



República Federativa do Brasil
Ministério da Indústria, Comércio Exterior
e Serviços
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0602366-5 B1

(22) Data do Depósito: 26/04/2006

(45) Data de Concessão: 12/12/2017



(54) Título: USO DE AGONISTAS DO RECEPTOR ACOPLADO A PROTEÍNA G, MAS, NO TRATAMENTO DA SINDROME METABÓLICA, SEUS COMPONENTES E SUAS COMPLICAÇÕES

(51) Int.Cl.: A61K 48/00; C07K 7/14; A61P 3/00

(73) Titular(es): UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

(72) Inventor(es): ROBSON AUGUSTO SOUZA DOS SANTOS; SÉRGIO HENRIQUE SOUSA SANTOS; JAQUELINE ISAURA ALVAREZ LEITE; MARINA MATOS DE MOURA; ANDRÉA SIQUEIRA HAIBARA; LUCIANA RODRIGUES FERNANDES

**“USO DE AGONISTAS DO RECEPTOR ACOPLADO A PROTEÍNA G, MAS,
NO TRATAMENTO DA SÍNDROME METABÓLICA, SEUS COMPONENTES
E SUAS COMPLICAÇÕES”.**

A presente invenção se caracteriza pelo uso de agonistas do receptor
5 acoplado à proteína G, Mas, como mecanismo de controle, prevenção e
tratamento dos níveis corporais de triglicérides, colesterol e glicose, bem como
do controle do aumento do peso corporal e hipertensão arterial, característicos
do quadro de síndrome metabólica e de suas complicações.

Uma outra característica da invenção é o uso de agonistas do receptor
10 acoplado à proteína G, Mas, incluindo o peptídeo Angiotensina-(1-7) e seus
análogos, agonistas, peptídicos ou não peptídicos como moduladores dos
quadros de resistência à insulina e intolerância à glicose e na prevenção e
tratamento das alterações relacionadas.

A invenção reivindica o uso de agonistas do receptor acoplado à
15 proteína G, MAS, formulados com excipientes ou carreadores aceitáveis
farmacêutica e farmacologicamente, e agonistas do receptor acoplado à
proteína G, Mas, incluindo o peptídeo Angiotensina-(1-7) e seus análogos,
agonistas, peptídicos ou não peptídicos como moduladores da síndrome
metabólica, as doenças que a compõe e suas complicações.

20 As formas de aplicação ora descritas contém, mas não são limitadas, ao
uso de agonistas e antagonistas do receptor acoplado à proteína G, Mas,
incluindo o peptídeo Angiotensina-(1-7) e seus análogos, agonistas, peptídicos
ou não peptídicos e suas formulações para uso pelas vias de aplicações orais,
intramusculares, endovenosas, subcutâneas, tópicas, transdérmica, anal,

inalação (pulmonar, intranasal, intrabucal) ou como dispositivos que possam ser implantados ou injetados para, prevenção e tratamento de doenças.

O sistema renina-angiotensina (SRA) constitui uma cascata hormonal coordenada que é iniciada pela biossíntese da enzima renina pelas células justaglomerulares das arteríolas aferentes renais. A renina é então liberada por
5 essas células através de exocitose, agindo enzimaticamente sobre o angiotensinogênio (AGT) clivando-o em um decapeptídeo inativo, a angiotensina I (Ang I), que por sua vez será catabolizada pela enzima conversora de angiotensina (ECA) em um octapeptídeo biologicamente ativo, a
10 angiotensina II (Ang II).

A renina não possui ação (não enzimática) biológica direta, porém a prorenina teve recentemente seu receptor identificado, exercendo assim ações biológicas diretas. [Nguyen, G. et. al. (1996) Specific receptor binding of renin on human mesangial cells in culture increases plasminogen activator inhibitor 1
15 antigen. *Kidney Int.* 50, 1897-1903; Nguyen, G. et. al. (2002) Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin. *J. Clin. Invest.* 109, 1417-1427]. Outras enzimas agem sobre o AGT para formar Ang II (catepsinas e quimases) somando-se a renina nessa catálise.

A Ang II exerce o seu mais potente e conhecido efeito (vasoconstrição)
20 e outros através do receptor AT₁, porém recentemente seu segundo receptor, o AT₂, vem sendo caracterizado, mostrando na maioria das vezes, exercer efeitos opostos às ações mediadas via receptor AT₁.

Acreditava-se que a Ang II era metabolizada em fragmentos de peptídeos biologicamente inativos por peptidases da circulação e teciduais; no

entanto, estudos mostraram que pelo menos três desses produtos metabólicos mostram atividade biológica.

A Ang II pode ser degradada à des-aspartil¹-Ang II (Ang III) que é eqüipotente a Ang II em sua interação com o receptor AT₁, mas tem baixa
 5 eficácia *in vivo* devido ao seu metabolismo acelerado na circulação. O segundo produto metabólico da Ang II é o hexapeptídeo Ang IV, que tem demonstrado, em estudos, causar vasodilatação e natriurese [Handa R. K. et. al. (2001) Autoradiographic analysis and regulation of angiotensin receptor subtypes AT (4), AT (1) and AT (1-7) in the kidney. *Am. J. Physiol.* 281, F936-F947].

10 A angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)] é o terceiro e mais promissor metabólito da Ang II, visto que recentes estudos já apontam seu possível papel terapêutico [Santos, R.A.S. et. al. (2005) Angiotensin-(1-7) and its receptor as a targets for new cardiovascular drugs. *Expert Opin. Investig. Drugs* 14(8), 1019-1031], sendo ela formada diretamente da Ang II ou por vias paralelas, pela
 15 ação da recentemente identificada, enzima conversora de angiotensina II (ECA 2) [Donoghue, M. et. al. (2000) A novel angiotensin-converting enzyme related carboxypeptidase (ACE 2) converts angiotensin I to angiotensin (1-9). *Circ. Res.* 87, 1-9; Crackower, M.A. et. al. (2002) Angiotensin converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. *Nature* 417, 822-828].

20 A Ang-(1-7) libera óxido nítrico (NO) e prostaglandinas (PGI₂) causando vasodilatação, inibindo a proliferação celular e a trombogênese [Rajendran S, Chirkov YY, Campbell DJ, Horowitz JD. Angiotensin-(1-7) enhances anti-aggregatory effects of the nitric oxide donor sodium nitroprusside. *J Cardiovasc Pharmacol* 46(4):459-463, 2005; Kucharewicz I, Pawlak R, Matys T, et al.

Antitrombotic effect of captopril and losartan is mediated by angiotensin-(1-7).

Hypertension 40 (5):774-9, 2002] atenuando o efeito vasoconstritor da Ang II

[Lemos VS, Cortes SF, Silva DM, Campagnole-Santos MJ, Santos RA.

Angiotensin-(1-7) is involved in the endothelium-dependent modulation of the

5 phenylephrine-induced contraction in the aorta mREN-2 transgenic rats. *Br. J*

Pharmacol 135(7):1743-8,2002; Clark MA, Diz DI, Tallant EA. Angiotensin-(1-7)

downregulates the angiotensin II type I receptor in vascular smooth cells.

Hypertension 37: 1141-1146, 2001] e inibindo a ECA [Deddish PA, Marcic B,

Jackmann HL, et al. N-domain specific substrate and C- domain inhibitors of

10 angiotensin-converting enzyme: angiotensin-(1-7) and Keto-ACE. Hypertension

31: 912-917,1998]. Desequilíbrios na interação harmônica entre Ang II e

Ang-(1-7) parecem contribuir para o início e desenvolvimento de patologias.

Não existem no estado da técnica, no entanto, aplicações do uso de agonistas do receptor acoplado a proteína G, Mas, no tratamento da síndrome

15 metabólica, seus componentes e suas complicações.

Sistema renina-angiotensina como integrador de distúrbios metabólicos

A síndrome metabólica, também conhecida como síndrome de resistência à insulina, é caracterizada pela coexistência variável de obesidade, hiperinsulinemia, dislipidemia e hipertensão. Outros achados incluem estado

5 pró-inflamatório, microalbuminúria e hipercoagulabilidade. O conjunto de fatores de risco que identificam a síndrome metabólica foi reconhecido, pela primeira vez, em 1983. Em 1988, Reaven introduziu o termo síndrome X e identificou a resistência à insulina, definida como a menor captação da glicose pelos tecidos periféricos, como o substrato fisiopatológico comum da síndrome.

10 Outros sinônimos têm sido utilizados para denominar essa constelação de fatores de risco (dislipidemia, resistência à insulina, hipertensão e obesidade), tais como síndrome plurimetabólica, síndrome da resistência à insulina e quarteto mortal, entre outros [Miname MH; Chacra APM. Síndrome Metabólica. *Revista Sociedade Cardiol. Est. São Paulo* 6: 482-489, 2005].

15 Em 1998, a Organização Mundial da Saúde estabeleceu o termo unificado síndrome metabólica, pois estudos não identificaram a presença de resistência à insulina como único fator causal de todos os componentes da síndrome. A patogênese da síndrome é multifatorial, sendo a obesidade, a vida sedentária, a dieta e a interação com fatores genéticos responsáveis pelo

20 aparecimento da mesma. Mutações e polimorfismos nos genes associados com resistência à insulina, anormalidades nos adipócitos, hipertensão e alterações lipídicas ocupam papel central na etiopatogenia da síndrome.

O diagnóstico da síndrome metabólica parece identificar pacientes com um risco cardiovascular adicional em relação aos fatores de risco clássicos. Em

2001, o "Third Report of the National Cholesterol Education Program Expert Panel on Detection, Evaluation, and treatment of High Blood Cholesterol in Adults" (NCEP-ATPIII) [Executive Summary of The Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). JAMA 2001; 285:2486-97], propôs os critérios diagnósticos para a síndrome metabólica, baseado em cinco parâmetros: circunferência abdominal, triglicérides, colesterol de lipoproteína de alta densidade (HDL-colesterol), pressão arterial e glicemia de jejum [Miname MH; Chacra APM. Síndrome Metabólica. *Revista Sociedade Cardiol. Est. São Paulo* 6: 482-489, 2005].

A dislipidemia, principal alteração encontrada na síndrome metabólica, é caracterizada pelo aumento dos ácidos graxos livres circulantes e pela elevação dos triglicérides (esterificação inadequada). Outra alteração é uma falha dos adipócitos em reter os ácidos graxos livres em seu interior, aumentando seu fluxo para a circulação. Esse mecanismo é facilitado pela resistência à insulina. Essas alterações aumentam a quantidade de ácidos graxos livres para o fígado.

Na resistência à insulina, o fígado estimula a síntese hepática de triglicérides, pois promove a reesterificação desses ácidos graxos, formando triglicérides, os quais são liberados na circulação na forma de lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) [Miname MH; Chacra APM. Síndrome Metabólica. *Revista Sociedade Cardiol. Est. São Paulo* 6: 482-489, 2005].

O SRA tem sido reconhecido como um importante regulador da pressão arterial sistêmica e do balanço hidroeletrólítico renal. Na última década, vários

componentes desse sistema foram identificados em glândulas adrenais, rins, cérebro, coração e vasos sanguíneos. Recentemente, dados substanciais indicam a presença de componentes do SRA no tecido adiposo [Massiera F, Seydoux J, Geloën A, et al Angiotensin-deficient mice exhibit impairment of diet
 5 induced weight gain with alteration in adipose tissue development and increased locomotor activity. *Endocrinology* 142: 5220-5225,2001].

Além disso, o SRA local tem sido implicado como coadjuvante em processos patológicos através da modulação da expressão genética, do crescimento, fibrose e possivelmente da resposta inflamatória. Já foram
 10 identificados alguns componentes do SRA nos adipócitos tais como: o AGT, renina, ECA, Ang II e os receptores angiotensinérgicos AT₁ e AT₂.

Dentre as alterações metabólicas associadas ao tecido adiposo, podem-se destacar: maior atividade de renina plasmática, maior nível plasmático de angiotensinogênio, maior atividade da ECA, e maior nível plasmático de
 15 aldosterona [Engeli S, Negrel Raymond, Sharma A. Physiology of the adipose tissue renin-angiotensin system. *Hypertension* 35: 1270-1277, 2000]. Os níveis de RNAm de AGT são 60% maiores no tecido adiposo do que no fígado, considerado até então, a principal fonte do substrato da renina [HarpJB, DiGirolamo M. Components of the renin-angiotensin system in adipose tissue :
 20 changes with maturation and adipose mass enlargement. *J. Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 50: B270-276,1995]. Tem-se demonstrado que a expressão de RNAm do AGT é regulada por ácidos graxos livres e estudos com ratos Wistar-Kyoto mostraram que o envelhecimento, geralmente associado com o ganho de peso, resultou na expressão diminuída do AGT no tecido adiposo desses ratos e de

ratos obesos Wistar, mas não em ratos Sprague–Dawley e em ratos obesos Zucker [HarpJB, DiGirolamo M. Components of the renin-angiotensin system in adipose tissue : changes with maturation and adipose mass enlargement. *J. Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 50: B270-276,1995; Giacchetti G, Faloia E, Sardu C, et al. Different gene expression of the RAS in human subcutaneous and visceral adipose tissue: *Intern J Obes Relat Metab Disord.* 23(suppl 5): S71, 1999.Abstract].

Além disso, a expressão de AGT é mais elevada em adipócitos viscerais do que em adipócitos subcutâneos nestes tipos de ratos, assim como na espécie humana [Safonova I, Aubert J, Negrel R, Ailhaud G. Regulation by fatty acids of angiotensinogen gene expression in preadipose cells. *Biochem J* 322: 235-239,1997.]

Uma relação positiva entre níveis de AGT no plasma e os níveis pressóricos, foi descrita primeiramente em 1979 por Walker et al [Walker WG, Whelton PK, Saito H, Russel RP, Hermann J. Relation between blood pressure and renin, renin substrate, angiotensin II, aldosterone and urinary sodium and potassium in 574 ambulatory subjects. *Hypertension* 1:287-291, 1979.] e tem sido confirmada, não somente nos seres humanos [Caulfield M, Lavender P, Newell-PriceJ, Kamdar S, Farrall M, Clark AJL. Angiotensinogen in human essential hypertension. *Hypertension* 28: 1123-1125,1996], mas também em modelos de ratos espontaneamente hipertensos [Nyhui N, Tamura K, Yamaguchi S, et al. Tissue Angiotensinogen gene expression induced by lipopolysaccharide in hypertensive rats.*Hypertension* 30:859-867,1997; Alonso-Galicia M, Brands MW, Zappe DH, Hall JE. Hypertension in obese Zucker rats:

role of angiotensin II and adrenergic activity. *Hypertension* 28: 1047-1054,1996.]

É interessante notar, que alguns estudos encontraram correlações positivas entre níveis de AGT plasmático e o índice de massa corporal em populações humanas diferentes. Também já foi descrita a relação entre a
5 obesidade e o polimorfismo de AGT em uma população geneticamente isolada. Não somente o AGT, mas também a atividade da renina e a atividade da ECA plasmática, foram correlacionadas positivamente ao índice de massa corporal em indivíduos obesos [Boustany CM, Bharadwaj K, et al. Activation of the
10 systemic and adipose renin-angiotensin system in rats with diet-induced obesity and hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Com Physiol* 287: 943-949, 2004.] Estes resultados não foram observados em ratos obesos Zucker, entretanto, a infusão de Ang II conduziu a um aumento mais proeminente na pressão arterial em ratos obesos se comparada com os animais magros [Crandall DL,
15 Herziinlinger HE, Saunders BD, et al. Developmental aspects of the adipose tissue renin-angiotensin system: therapeutic implications. *Drug Dev Res* 32: 117-125,1994.]

Já os receptores angiotensinérgicos AT₁ e AT₂ da Ang II foram identificados em adipócitos de ratos e de humanos, embora a funcionalidade
20 desses precise ser melhor determinada. In vivo, a expressão do gene para AT₁ no tecido adiposo parece ser dependente da idade, uma vez que foi observada uma menor densidade de receptores AT₁ nos ratos idosos e obesos Sprague-Dawley quando comparados com ratos jovens e magros. Estudos utilizando cultura de células adiposas mostraram que o AGT e a Ang II participam da

regulação e diferenciação do fenótipo do adipócito. É provável que o aumento no conteúdo de triglicerídeos e da atividade de duas enzimas lipolíticas, a sintetase de ácidos graxos e a glicerol-3-fosfato desidrogenase, sejam mediadas pela Ang II, mostrando que esse peptídeo controla a adiposidade
5 pela regulação da síntese e armazenamento de lipídios. Além disso, a Ang II participa da liberação de norepinefrina pelo sistema nervoso simpático (SNS).

Foi demonstrado, que a infusão crônica de Ang II resulta em importante redução no peso e na ingestão de alimentos, possivelmente pela maior liberação de norepinefrina, o que contribuiria para o aumento da atividade
10 metabólica e elevação do dispêndio energético. Esse efeito da Ang II demonstrou ser independente das mudanças da pressão arterial e foi abolido pelo losartan. Também já foi visto que em cultura de células adiposas, a Ang II é fator adipogênico, enquanto no animal vivo, atua como importante redutor do peso e da massa adiposa. Além de uma relação significativa entre a pressão
15 arterial, o índice de massa corporal, e os níveis do AGT plasmático em sujeitos normotensos e magros [Engeli S, Negrel Raymond, Sharma A. Physiology of the adipose tissue renin-angiotensin system. *Hypertension* 35: 1270-1277, 2000].

Estudos relatam que aproximadamente 20% da variação do AGT
20 plasmático é passível de ser explicada pelos níveis da leptina presente no plasma. Tomando a leptina plasmática como um indicador da massa de tecido adiposo esta observação poderia ser explicada pela contribuição do tecido adiposo aos níveis de AGT plasmático [Prasad A, Quyyumi A. Renin-angiotensin system and angiotensin receptor blockers in the metabolic

syndrome. *Circulation* 110:1507-1512, 2004]. Entretanto, a expressão de AGT não foi diferente no tecido adiposo do indivíduo obeso se comparado com indivíduos magros e indivíduos obesos - hipertensos com indivíduos obesos normotensos.

5 Por outro lado, correlações positivas foram relatadas entre a expressão de AGT do tecido adiposo e a relação cintura/quadril bem como entre a secreção de AGT por adipócitos isolados e conjunto de adipócitos e índice de massa corporal. Resultados de pesquisa recente, em que se avaliaram as relações entre AGT, leptina e níveis de pressão arterial em um grupo de jovens
10 normotensos, evidenciaram que o substrato da renina se correlaciona significativamente com o índice de massa corporal, níveis plasmáticos de leptina e pressão arterial, nos indivíduos com história positiva para hipertensão arterial sistêmica (HAS).

Desta forma, foi demonstrado que os níveis circulantes de AGT podem
15 contribuir para a relação entre peso corporal e pressão arterial. Outro fator evidenciado, foi a capacidade relativamente maior do tecido visceral em secretar os componentes do SRA, o que poderia ser um fator a mais para justificar o maior risco cardiovascular associado à distribuição central da gordura [Prasad A, Quyyumi A. Renin- angiotensin system and angiotensin
20 receptor blockers in the metabolic syndrome. *Circulation* 110:1507-1512, 2004.]

Não existem no estado da técnica, no entanto, aplicações do uso de agonistas do receptor acoplado a proteína G, Mas, no tratamento da síndrome metabólica, seus componentes e suas complicações.

Estudos experimentais sugerem que o SRA do tecido adiposo, regulado por fatores hormonais e nutricionais, é influenciado pelo grau de obesidade e que a Ang II pode modular o fluxo sanguíneo, fatores de crescimento e o metabolismo local, desta forma, a ativação do SRA pode culminar em efeitos deletérios locais e sistêmicos em pacientes obesos e pode contribuir para o surgimento da HAS e da resistência à insulina nestes pacientes. A resistência à insulina, por sua vez, está associada com a redução da queima e aumento da liberação dos ácidos graxos livres, que são convertidos no fígado em partículas lipoprotéicas de muita baixa densidade (VLDL) ricas em triglicérides.

A hipertriglicerinemia leva a um estado dislipidêmico e altamente aterogênico, através do aumento de síntese de partículas lipoprotéicas de baixa densidade (LDL), facilmente oxidáveis, e ao mesmo tempo, a redução das partículas lipoprotéicas de alta densidade (HDL) [Ginsberg HN. Insulin resistance and cardiovascular resistance. *J Clin Invest* 106: 453-458,2000.]

Contudo, o perfil aterogênico evidenciado nos portadores da síndrome metabólica (SM) é resultante de fatores como a disfunção vascular, um estado próinflamatório e prócoagulante, dislipidemia, HAS e resistência à insulina.

Em estudos observacionais e prospectivos, tem sido sugerido que a resistência à insulina pode ter papel crucial para predizer a incidência e a mortalidade relacionada às doenças cardiovasculares como a doença arterial coronariana e acidentes vasculares encefálicos [Ginsberg HN. Treatment for patients with the metabolic syndrome. *Am J Cardiol* 91(suppl): 29E-39E,2003.]

Tanto no estado de resistência à insulina quanto na síndrome metabólica, a

disfunção endotelial pode ser evidenciada de maneira importante, sendo primordialmente acompanhada da redução da biodisponibilidade do NO.

Por sua vez, a redução de NO, resulta em maior produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), tais como os íons superóxido ($O_2^{\cdot-}$). Os íons superóxido inativam o NO para formar o peróxidonitrito, que por sua vez, desacopla a óxido nítrico sintase endotelial pela oxidação de seu co-fator, tetrahydrobiopterina, o que resulta em produção de mais $O_2^{\cdot-}$ em vez de síntese de NO. Esta cascata de eventos é denominada de estresse oxidativo. Desta forma, a redução de NO e de outros fatores relaxantes derivados do endotélio pode ser acompanhada pelo aumento da produção de endotelina, prostanóides vasoconstritores e Ang II [Schiffrin EL. Beyond blood pressure: the endothelium and atherosclerosis progression. *AJH* 15: 115S-122-S, 2002; Shinozaki K, Ayajiki K, Nishio Y, et al. Evidence for a causal role of the renin-angiotensin system in vascular dysfunction associated with insulin resistance *Hypertension* 43:255-262, 2004].

A redução da biodisponibilidade do NO foi confirmada em modelos experimentais de resistência à insulina, onde foram observados os seguintes fatos: existe uma correlação entre a sensibilidade à insulina e a produção basal de NO em indivíduos saudáveis. Indivíduos insulino-resistentes apresentam resposta vasodilatadora endotélio-dependente prejudicada e a disfunção endotelial pode ser também detectada em indivíduos saudáveis com primeiro grau de parentesco com os indivíduos diabéticos do tipo 2 [Shinozaki K, Ayajiki K, Nishio Y, et al. Evidence for a causal role of the renin-angiotensin system in

vascular dysfunction associated with insulin resistance. *Hypertension* 43:255-262,2004].

Portanto, a disfunção endotelial parece ser um elo comum entre a HAS, diabetes mellitus e a síndrome metabólica. Sabe-se que o endotélio é um órgão

5 complexo e dinâmico que apresenta substâncias vasoativas, vasoconstritoras tais como a Ang II e vasodilatadoras como a Ang-(1-7) e o NO. As substâncias vasoativas medeiam o tônus vascular, estrutura e a função influenciando o crescimento do músculo liso vascular, apoptose, agregação plaquetária, adesão de leucócitos e monócitos e a trombose. O balanço entre as

10 substâncias vasoconstritoras, as quais geralmente induzem ao crescimento celular, e as vasodilatadoras, as quais inibem o crescimento celular, faz-se necessário para a manutenção da estrutura vascular normal e sua função. Como dito anteriormente, dentro do SRA, o heptapeptídeo vasodilatador, Ang-(1-7) exerce importante papel contraregulatório, opondo-se à maioria das ações

15 da Ang II via receptor AT₁, através de seu receptor acoplado à proteína G, Mas [Santos RAS, Simões e Silva AC, Maric C et al. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the protein G-coupled receptor Mas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:8258-8263,2003.] Sua expressão já foi identificada na circulação, coração, vasos sanguíneos e rins. [Santos RAS, Campagnole-Santos MJ,

20 Andrade SP. Angiotensin-(1-7): an update. *Reg Pept* 91:45-62,2000].

A Ang-(1-7), na maioria dos tecidos, age diretamente através do seu receptor Mas [Santos RAS, Ferreira AJ, Pinheiro SVB, et al. Angiotensin-(1-7) and its receptor as a potential targets for new cardiovascular drugs. *Expert Opin. Investig. Drugs* 14(8): 1-13,2005]. As ações fisiológicas da Ang-(1-7)

parecem modular as ações da Ang II, especialmente em situações onde a atividade da Ang II encontra-se aumentada, como na HAS. Portanto o SRA é um sistema dual, vasoconstritor representado principalmente pela Ang II e por outro lado, vasodilatador tendo como agente mais importante, a Ang-(1-7).

- 5 A Ang II está altamente correlacionada com a disfunção endotelial presente nos indivíduos hipertensos, diabéticos, obesos e com a síndrome metabólica. Esse peptídeo está implicado com o crescimento celular e com o processo inflamatório evidenciado nesses indivíduos.

 Desta forma, o estresse oxidativo provocado pela a Ang II pode resultar
10 em aumento da produção de endotelina (ET-1), das moléculas de adesão como a molécula de adesão da célula vascular (VCAM-1) e a molécula de adesão intercelular-1(ICAM-1), fator nuclear-k B (NF-kB), interleucina 6 (IL-6) dentre outros mediadores inflamatórios. A ativação do NF-kB, por sua vez, promove a síntese do inibidor ativador do plasminogênio do tipo-1(PAI-1), um inibidor
15 natural do ativador do plasminogênio do tipo-1 em vasos ateroscleróticos, resultando em prejuízo do processo de fibrinólise [Gusik TJ, Mussa S, Gastaldi D, et al. Mechanisms of increased vascular superoxid production in human diabetes mellitus:role of NAD(P)H oxidase and endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 105: 1656-1662,2002]. Em pacientes portadores da síndrome
20 metabólica, os níveis de PAI-1 e fibrinogênio apresentam-se elevados, sendo que os níveis de PAI-1 correlacionam-se com os níveis de insulina plasmática e com o grau de resistência à insulina.

 Desta forma, o PAI-1 parece contribuir como fator preditor do aparecimento de diabetes mellitus (DM) nesses pacientes. Além disso, o

distúrbio de coagulação na síndrome metabólica pode ser evidenciado pelo fato que as plaquetas apresentam-se com resistência as ações fisiológicas da insulina, a qual é inibidora da agregação plaquetária via liberação do NO.

Contudo, as alterações funcionais plaquetárias e a ativação da cascata de coagulação e de inflamação descritas acima, propiciam o aparecimento de um estado prótrombótico e próinflamatório, o que pode culminar em processo aterosclerótico nos pacientes portadores da síndrome metabólica [Schiffn EL. Beyond blood pressure: the endothelium and atherosclerosis progression. *AJH* 15: 115S-122-S, 2002].

Além da contribuição do SRA principalmente via Ang II na gênese da síndrome metabólica já descrita acima, interações em diferentes níveis desse sistema com a insulina tem sido implicadas como fator fundamental ao desenvolvimento de DM e síndrome metabólica.

Evidências sugerem que a Ang II, via receptor AT₁ pode modular as ações da insulina. Assim, a ativação do SRA induz o aparecimento de resistência às ações metabólicas da insulina, provocando hiperglicemia e elevação dos níveis de colesterol (VLDL) e triglicérides, e potencializa o efeito proliferativo da insulina. Além disso, a hiperglicemia e a hiperinsulinemia ativam o SRA através do aumento da expressão de AGT, Ang II e receptores AT₁, que, por sua vez, podem induzir o aparecimento de hipertensão arterial, disfunção cardiovascular e renal [Engeli S, Schilling G P, Gorzeliniak K, et al. The adipose-tissue renin-angiotensin-aldosterone system: role in the metabolic syndrome? *Intern Jf Biochem & Cell Biol* 35 :807-25,2003].

Ainda, o estresse oxidativo causado principalmente pela Ang II via fosfato-dinucleotídeo adenina nicotinamida (NADPH) e NAD(P)H oxidasas resulta na glicação avançada de aminoácidos nas proteínas, lípidos e ácidos nucleicos.

5 Como já descrito anteriormente, além da síntese de angiotensinas, o tecido adiposo possui outros produtos secretórios que interferem diretamente na regulação da pressão arterial e/ou dano tecidual tais como: leptina, TNF-*, PAI-1, PGL 2 *, TGF-, resistina, adiponectina e outros [Blaj S, Stanciu S, Jurcut C, Ciobica L.; Hypertension in obese patients: a dysmetabolic hypertension with
10 a possible adipocyte dysfunction mechanism. *Rom J Intern Med.*; 41(2):103-11, 2003].

A leptina influencia a regulação da pressão arterial através de diversos mecanismos como: ativação direta do SNS e do eixo hipófise-adrenal, balanço hidro-eletrolítico, modulação da função endotelial e altera o remodelamento
15 vascular.

A adiponectina, uma proteína expressa especificamente nos adipócitos, é homóloga aos colágenos VIII e X e se liga a proteínas da matriz protéica, estando envolvida, portanto, em processos de injúria e reparo tecidual. Essa proteína, assim como a Ang II, aumenta a expressão de TNF-*, através de
20 mecanismos de sinalização que envolvem o NF- κ B [Ran J, Hirano T, Fukui T, Saito K, Kageyama H, Okada K, Adachi M; Angiotensin II infusion decreases plasma adiponectin level via its type 1 receptor in rats: an implication for hypertension-related insulin resistance. *Metabolism*; 55(4):478-88, 2006]. As concentrações de TNF-* e de resistina estão envolvidas com resistência à

insulina, disfunção endotelial e com altas concentrações de proteína C-reativa e IL-6 encontrada em obesos, predispondo esses indivíduos à maior morbidade e mortalidade cardiovascular.

Todas essas substâncias podem interagir com o SRA reforçando suas
5 ações, participando, portanto, das alterações cardiovasculares e renais associadas à obesidade e à síndrome metabólica.

Não existem no estado da técnica, no entanto, aplicações do uso de agonistas do receptor acoplado a proteína G, Mas, no tratamento da síndrome metabólica, seus componentes e suas complicações.

10 **Vias convergentes de sinalização na síndrome metabólica relacionadas ao SRA**

Complicações cardiovasculares e renais são líderes na morbimortalidade nos pacientes com diabetes. A tríade resistência insulínica/hiperglicemia/Ang II está intimamente envolvida na patogênese das
15 lesões dos órgãos-alvo [Carey RM and Siragy HM. The intrarenal renin-angiotensin system and diabetic nephropathy. *Trends Endonc Metab*, 14(6): 274-281

Assim como outros fatores de crescimento, a insulina estimula a via MAPK. A cascata inicia-se com a fosforilação das proteínas IRS e/ou Shc, que
20 interagem com a proteína Grb2, constitutivamente associada à SOS, proteína que em sequência ativa a Ras, uma pequena proteína G. A Ras desencadeia a fosforilação sequencial da cascata das MAPKs, levando à proliferação e diferenciação celular [Marrero MB, Fulton D, Stepp D, Stern DM. Angiotensin

II-induced insulin resistance and protein tyrosine phosphatases. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24:2009-2013, 2004].

Por outro lado, as respostas da Ang II nas células vasculares são mediadas por vários e complexos sistemas efetores da membrana plasmática, tais como: fosfolipases (A, C e D), adenilciclase, PKC e canais iônicos que são
5 ativados em conjunto com uma série de microdomínios protéicos formados principalmente por proteínas adaptadoras.

Essas vias proximais levam, na sua maioria, à ativação de cascatas como Ras/MAPK/ERK e JAK/STAT que amplificam o sinal e se estendem até o
10 núcleo regulando expressão gênica e estimulando a proliferação celular [Touyz RM. Reactive oxygen species as mediators of calcium signaling by angiotensin II: implications in vascular physiology and pathophysiology. *Antioxid Redox Signal*.(9-10):1302-14, 2005; Watanabe T, Barker TA, Berk BC. Angiotensin II and the endothelium: diverse signals and effects. *Hypertension*. 45(2):163-9,
15 2005; Touyz RM. Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: what is the clinical significance? *Hypertension*.44(3):248-52, 2004].

Em adição, a Ang II estimula o TGF- β , importante mediador da formação de colágeno e, portanto, da deposição de matriz extracelular e fibrose, causadores principais da nefropatia diabética [Carey RM; Siragy HM, The
20 intrarenal renin-angiotensin system and diabetic nephropathy. *Trends Endocrin. Metabol*.14(6): 274-281, 2003]. Por sua vez, a hiperglicemia reforça as ações vasoconstritoras e proliferativas da Ang II, aumentando a hiperplasia vascular e progressão da nefropatia.

Antagonistas que possam, direta ou indiretamente, inibir a ativação dessas cascatas tem sido considerados uma importante estratégia para o tratamento das complicações cardiovasculares no DM e os antagonistas do SRA já demonstraram atenuar a progressão das lesões de órgãos-alvo [Carey RM and Siragy HM. The intrarenal renin-angiotensin system and diabetic nephropathy. . *Trends Endonc Metab*, 14(6): 274-281 2003]. Um dos poucos dados na literatura referentes aos mecanismos de ação intracelulares da Ang-(1-7) são de Tallant e Clark, 2003 [Tallant EA, Clark MA. Molecular mechanisms of inhibition of vascular growth by angiotensin-(1-7). *Hypertension*. Oct;42(4):574-9, 2003] demonstrando justamente que os efeitos antiproliferativos da Ang-(1-7) no músculo liso vascular estão relacionados com a inibição da atividade da ERK1/2 (p44/42 MAPK).

Não existem no estado da técnica, no entanto, aplicações do uso de agonistas do receptor acoplado a proteína G, Mas, no tratamento da síndrome metabólica, seus componentes e suas complicações.

A Ang II estimula a associação e translocação das subunidades citoplasmáticas da NAD(P)H oxidase (p47phox, p67phox e p40phox) resultando em ativação dessa enzima que é a maior fonte de íons superóxido na vasculatura. A formação de espécies reativas de oxigênio parece ser um dos principais mecanismos pelos quais a Ang II altera a sinalização da insulina. Além disso, a resistência à insulina leva a superexpressão dos receptores AT₁, potencializando a formação de radicais livres nos vasos.

Outra via essencial na sinalização da insulina é a da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3-K). A fosforilação do IRS-1 cria sítios de reconhecimento para

moléculas com domínios SH2, como a PI3K. A PI3-K é importante na regulação da mitogênese, na diferenciação celular e essencial para o transporte de glicose estimulado pela insulina. O fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato gerado pela PI3K regula PDK-1 ("phosphoinositide-dependent kinase 1"), uma

5 serina/treonina quinase que fosforila a proteína quinase B (PKB)/Akt [Sowers JR, Insulin resistance and hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 286(5): H1597-1602, 2004].

Recentemente, foi demonstrado que além da via clássica dependente de cálcio, a formação de óxido nítrico pode ser modulada através da fosforilação

10 direta de aminoácidos específicos da sintase de NO endotelial. A fosforilação da serina 1177, pela proteína quinase B/Akt, aumenta a atividade enzimática e a produção de óxido nítrico (NO) [Fulton D, Gratton JP, McCabe TJ, Fontana J, Fujio Y, Walsh K, Franke TF, Papapetropoulos A, Sessa WC; Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature,*

15 10; 399(6736):597-601, 1999].

A habilidade da insulina em aumentar a geração de NO já foi demonstrada em cultura de células endoteliais. Outro mecanismo vasodilatador da insulina e IRS-1 dependente da via PI3K é a redução da $[Ca^{2+}]$ através do aumento da atividade da bomba $Na^+-K^+-ATPase$ no músculo liso [Sowers JR,

20 Insulin resistance and hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 286(5): H1597-1602, 2004]. Essa ação inclui também desensibilização da ligação Ca^{2+} -MLC ("miosin light-chain"). Alguns dados na literatura sugerem que a Ang II agindo em receptor AT_1 inibe a ação vascular da insulina interferindo na cascata da PI3K, reduzindo a disponibilidade de NO. Essa alteração na via

PI3K também altera utilização e transporte da glicose. Também já foi demonstrado que o aumento dos níveis de Ang II está associado à alteração no GLUT4.

A ação da insulina também é atenuada por proteínas fosfatases de
5 tirosina (PTPases), que catalisam a rápida desfosforilação do receptor de insulina e de seus substratos. A PTP1B parece ser uma fosfatase importante nessa dessensibilização já que camundongos com deleção genética para PTP1B têm aumento da fosforilação em tirosina do receptor de insulina e
10 euglicêmicos com metade dos níveis de insulina em relação à espécie selvagem. Além disso, esses animais são resistentes à obesidade induzida por dieta.

A Ang II induz a ativação da PTP1B, via proteína quinase A (PKA), no músculo liso vascular essa fosfatase é provavelmente molécula chave na
15 inibição da sinalização da insulina induzida pela Ang II [Marrero MB, Fulton D, Stepp D, Stern DM. Angiotensin II-induced insulin resistance and protein tyrosine phosphatases. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24:2009-2013, 2004]. A interferência e antagonismo da Ang II na sinalização intracelular da insulina podem explicar em parte os efeitos benéficos do bloqueio do SRA na
20 sensibilidade à insulina e função vascular em pacientes com SM.

Não existem no estado da técnica, no entanto, aplicações do uso de agonistas do receptor acoplado a proteína G, Mas, no tratamento da síndrome metabólica, seus componentes e suas complicações.

Tratamento Clínico do portador da Síndrome metabólica

O tratamento da síndrome metabólica deve estender os cuidados a cada um dos fatores de risco modificáveis que promovem a síndrome, como sobrepeso e obesidade, sedentarismo e dietas aterogênicas.

5 A modificação comportamental, representada pela perda de peso e pelos exercícios físicos, é a terapia de primeira linha. O tratamento medicamentoso para cada um dos componentes da síndrome deve estar presente caso não se atinjam os alvos terapêuticos para a redução da morbimortalidade cardiovascular apenas com a mudança de hábitos.

10 A inibição do SRA através do uso dos inibidores da ECA (iECA) e os bloqueadores do receptor da Ang II (BRA) têm sido extensivamente estudados no tratamento da hipertensão, insuficiência cardíaca, doença arterial coronariana e doenças renais. Ambos os grupos de drogas consistentemente reduzem o risco de eventos coronarianos, acidente vascular cerebral e
15 complicações microvasculares do DM. Além disso, inúmeros estudos têm demonstrado a redução na incidência de diabetes tipo 2.

Não existem no estado da técnica, no entanto, aplicações do uso de agonistas do receptor acoplado a proteína G, Mas, no tratamento da síndrome metabólica, seus componentes e suas complicações.

20 Os iECA aumentam a sensibilidade à insulina em modelos de insulino-resistência tanto de animais quanto em humanos [Jauch KW, Hartl W, Guenther B, Wicklmayr M, Rett K, Dietze G; Captopril enhances insulin responsiveness of forearm muscle tissue in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Eur J Clin Invest.* 17(5):448-454, 1987], reduzindo a produção de Ang

II . Vários mecanismos são implicados nesse achado, porém não são totalmente compreendidos. O papel da bradicinina (BK) foi observado por Carvalho *et. al.* [Carvalho CR, Thirone AC, Gontijo JA, Velloso LA, Saad MJ; Effect of captopril, losartan, and bradykinin on early steps of insulin action.

- 5 *Diabetes*; 46(12):1950-1957, 1997], que descreveram, após administração aguda de captopril em ratos, um aumento nos receptores insulínicos induzidos pela insulina e aumento na fosforilação do IRS-1 (substrato 1 do receptor da insulina), no fígado e nos músculos. Esses procedimentos foram acompanhados pelo aumento na IRS-1/PI3-quinase em ambos os tecidos. A
- 10 PI3quinase é necessária para a translocação de GLUT1 e para a estimulação de GLUT4, além do metabolismo do glicogênio [Czech MP, Corvera S.; Signaling mechanisms that regulate glucose transport. *J Biol Chem*. 22;274(4):1865-1868, 1999]. Acredita-se que a IRS 1/PI 3-quinase esteja ligada ao transporte de glicose muscular, assim como à síntese de glicogênio no
- 15 fígado e músculos e que o aumento dessa associação, em animais tratados agudamente com captopril, possa melhorar a sensibilidade insulínica. Além disso, esse medicamento inibe a cininase II (uma enzima semelhante à ECA, que atua degradando a BK), gerando, conseqüentemente, aumento nas suas concentrações.

- 20 Não existem no estado da técnica, no entanto, aplicações do uso de agonistas do receptor acoplado a proteína G, Mas, no tratamento da síndrome metabólica, seus componentes e suas complicações.

A literatura tem apontado que a administração de BK melhora a ação da insulina e reduz os níveis plasmáticos de glicose [Uehara M, Kishikawa H,

Isami S, Kisanuki K, Ohkubo Y, Miyamura N, Miyata T, Yano T, Shichiri M; Effect on insulin sensitivity of angiotensin converting enzyme inhibitors with or without a sulphydryl group: bradykinin may improve insulin resistance in dogs and humans. *Diabetologia*. 37(3):300-307, 1994]. Novamente, o estudo de

5 CARVALHO *et al.* (1997) [Carvalho CR, Thirone AC, Gontijo JA, Velloso LA, Saad MJ; Effect of captopril, losartan, and bradykinin on early steps of insulin action. *Diabetes*; 46(12):1950-1957, 1997], demonstrou que a BK aumenta o número de receptores induzidos pela insulina e a fosforilação do IRS-1, assim como a associação IRS-1/PI 3 quinase no fígado e nos músculos, melhorando
10 a sensibilidade insulínica.

Além do uso dos iECA e dos BRA, a Ang-(1-7) pode ser considerada uma candidata em potencial para o uso terapêutico, uma vez que esse peptídeo é capaz de induzir a produção de NO e prostaglandinas I₂, de modular as ações da Ang II assim também como potencializa a redução da pressão
15 arterial através dos iECA.

Não existem no estado da técnica, no entanto, aplicações do uso de agonistas do receptor acoplado a proteína G, Mas, no tratamento da síndrome metabólica, seus componentes e suas complicações.

ESTUDOS CLÍNICOS RELACIONADOS À INIBIÇÃO DO SRA E A 20 SÍNDROME METABÓLICA

1) RELACIONADOS À REDUÇÃO DA INCIDÊNCIA DE DIABETES:

No estudo HOPE (Heart Outcomes Prevention Evaluation), a incidência de diabetes foi 34% mais baixa no grupo tratado com ramipril que no grupo recebendo placebo [Yusuf S, Sleight P, Pogue J, Bosch J, Davies R,

Dagenais G.; Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med*. 20;342(3):145-53, 2000. Erratum in: 4;342(18):1376, 2000. *N Engl J Med* 9;342(10):748]. No estudo LIFE (Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension study) [Lindholm LH, Ibsen H, Dahlof B, Devereux RB, Beevers G, de Faire U, Fyhrquist F, Julius S, Kjeldsen SE, Kristiansson K, Lederballe-Pedersen O, Nieminen MS, Omvik P, Oparil S, Wedel H, Aurup P, Edelman J, Snapinn S; LIFE Study Group; Cardiovascular morbidity and mortality in patients with diabetes in the Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension study (LIFE): a randomised trial against atenolol. *Lancet*. 23;359(9311):1004-10, 2002] losartan associou-se com redução de 25% no surgimento de novos casos de diabetes quando comparado ao atenolol. O mesmo ocorreu quando comparados pacientes em uso de candesartan àqueles em uso de hidroclorotiazida para tratamento de hipertensão arterial, com redução significativa na incidência de diabetes tipo 2. Os resultados do estudo VALUE indicaram também uma redução de 23% nos casos novos de diabetes, quando comparados pacientes hipertensos tratados com valsartan e amlodipina [Julius S, Kjeldsen SE, Weber M, Brunner HR, Ekman S, Hansson L, Hua T, Laragh J, McInnes GT, Mitchell L, Plat F, Schork A, Smith B, Zanchetti A; VALUE trial group; Outcomes in hypertensive patients at high cardiovascular risk treated with regimens based on valsartan or amlodipine: the VALUE randomised trial. *Lancet*. 19;363(9426):2022-31, 2004].

Já os estudos CAPP (Cognition and Prognosis in the Elderly by the Captopril Prevention Project) e STOP-HTN (Cardiovascular Events in Elderly

Patients with Isolated Systolic Hypertension) não mostraram diferença significativa na redução de incidência de diabetes quando comparados iECA e BRA [Vijayaraghavan K, Deedwania PC; The renin angiotensin system as a therapeutic target to prevent diabetes and its complications. *Cardiol Clin.* 5 23(2):165-83, 2005].

Possíveis mecanismos responsáveis pela redução na incidência de diabetes tipo 2 nestes estudos são a melhora da captação de glicose mediada pela insulina, melhora da função endotelial, aumento da ativação do NO, redução na resposta inflamatória e aumento nos níveis de bradicinina e Ang-(1- 10 7) [Vijayaraghavan K, Deedwania PC; The renin angiotensin system as a therapeutic target to prevent diabetes and its complications. *Cardiol Clin.* 23(2):165-83, 2005].

Não existe, no entanto, no estado da técnica, nenhuma menção da possível participação do receptor Mas nos efeitos benéficos dos inibidores de 15 ECA ou BRA na síndrome metabólica.

2) RELACIONADOS À INSULINO-RESISTÊNCIA:

A inibição da ECA melhora a sensibilidade à insulina, permitindo inclusive, em alguns casos, a retirada da sulfoniluréia e redução nas doses de insulina [De Mattia G, Ferri C, Laurenti O, Cassone-Faldetta M, Piccoli A, 20 Santucci A; Circulating catecholamines and metabolic effects of captopril in NIDDM patients. *Diabetes Care.*; 19(3):226-30, 1996]. Vários estudos têm confirmado estes dados, através de *clamps* para avaliação da sensibilidade insulínica, como por exemplo, o de Paolisso em 1992, que comparou lisinopril e

placebo, o de Vuorinen-Markkola em 1995, que comparou enalapril e placebo, o de Falkner em 1995, comparando lisinopril e placebo, o de Fogari em 1998 que avaliou losartan comparando-o ao placebo, o de Higashiura em 1999 que comparou o candesartan (BRA) com placebo, entre outros [Vijayaraghavan K, Deedwania PC; The renin angiotensin system as a therapeutic target to prevent diabetes and its complications. *Cardiol Clin.* 23(2):165-83, 2005].

Pacientes portadores de DM ou da síndrome metabólica possuem risco de doença cardiovascular e renal aumentados. Tanto a DM quanto a síndrome metabólica são doenças multifatoriais e portanto necessitam de abordagem de vários dos seus fatores de risco como o controle glicêmico, terapia anti-agregante plaquetário, controle do perfil lipídico e controle dos níveis pressóricos. O benefício do controle dos níveis pressóricos em pacientes com diabetes tem sido demonstrado em vários estudos clínicos, através principalmente do uso de bloqueadores do SRA. O uso terapêutico dessa classe de fármacos nos portadores da síndrome metabólica tem reduzido o risco morbidade-mortalidade à medida que tem-se conseguido reduzir a incidência da diabetes do tipo 2 nesses pacientes.

Não existe, no entanto, no estado da técnica, nenhuma menção da possível participação do receptor Mas nos efeitos benéficos dos inibidores de ECA ou BRA na síndrome metabólica.

EXEMPLOS

Todas essas aplicações podem ser melhor entendidas pelos exemplos abaixo, não limitantes.

Exemplo I:

- 5 **Esse exemplo descreve o efeito da deleção do receptor Mas sobre o peso corporal de camundongos Knock-out FVBN para o gene do receptor Mas (Ko-Mas).**

Através de técnicas de biologia molecular, o gene responsável pela síntese do receptor Mas foi deletado em camundongos da linhagem FVBN, para seu uso como ferramenta para avaliação do papel da Ang-(1-7) via receptor Mas. Utilizando animais knock-out FVBN para o gene do receptor Mas (Ko-Mas) e animais controle Wild Type FVBN (WT-FVBN) com idade entre 9 e 10 semanas de vida, mantidos sob condições de temperatura e ciclo noite-dia, comida e água, à vontade, realizou-se experimentos com o objetivo de
15 caracterização dos mesmos.

Um total de sete animais WT-FVBN e o mesmo número de Ko-Mas foram pesados em balança semi-analítica para análise do peso corporal total. O resultado foi analisado estatisticamente utilizando-se teste t de Student não pareado, sendo considerados significantes os resultados que apresentaram
20 $P < 0,05$.

Observou-se diferença significativa entre os grupos, mostrando que a deleção do receptor Mas fez com que os animais ficassem mais pesados que os animais controle (Figura 1).

Esse resultado mostra que a deleção gênica do receptor Mas altera o metabolismo do animal fazendo com que ocorra aumento do peso, indicando assim a participação do eixo Mas/Ang-(1-7), na regulação metabólica.

Exemplo 2:

- 5 **Esse exemplo descreve o efeito da deleção do receptor Mas nos níveis sanguíneos de colesterol total e HDL de camundongos Knock-out FVBN para o gene do receptor Mas (Ko-Mas).**

Um total de seis animais WT-FVBN e o mesmo número de Ko-Mas foram colocados em jejum de 12 horas antes do experimento; em seguida
10 foram anestesiados com Ketamina (4.5 mg/Kg) + Xilazina (0.2 mg/Kg), e foi realizada uma incisão abdominal para exposição da artéria aorta. A coleta do sangue arterial foi feita a partir de um corte na artéria aorta, próximo à ramificação renal, coletando-se o sangue através de uma pipeta Pasteur.

O sangue foi então centrifugado e obteve-se a fração plasmática que
15 foi utilizada para a dosagem de acordo com as especificações do fabricante do Kit.

A leitura foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 492 nm para dosagem do colesterol total e HDL.

O resultado foi analisado estatisticamente utilizando-se teste t de
20 Student não pareado, sendo considerados significantes os resultados que apresentaram $P < 0,05$.

Observou-se diferença significativa entre os grupos, mostrando que a deleção do receptor Mas aumenta os níveis sanguíneos de colesterol total e HDL nesses animais quando comparados aos animais controles (Figura 2 e 3).

Esse resultado mostra que a deleção gênica do receptor Mas altera o metabolismo do animal fazendo com que ocorra aumento dos níveis de colesterol total e HDL, indicando assim a participação do eixo Mas/Ang-(1-7), na regulação metabólica de colesterol.

Exemplo 3:

Esse exemplo descreve o efeito da deleção do receptor Mas nos níveis sanguíneos de triglicérides de camundongos Knock-out FVBN para o gene do receptor Mas (Ko-Mas).

Um total de seis animais WT-FVBN e o mesmo número de Ko-Mas foram colocados em jejum de 12 horas antes do experimento; em seguida foram anestesiados com Ketamina (4.5 mg/Kg) + Xilazina (0.2 mg/Kg), e foi feita uma incisão abdominal para exposição da artéria aorta. A coleta do sangue arterial foi feita a partir de um corte na artéria aorta, próximo à ramificação renal, coletando-se o sangue utilizando uma pipeta Pasteur.

O sangue foi então centrifugado e obteve-se a fração plasmática que foi utilizada para a dosagem de acordo com as especificações do fabricante do Kit.

A leitura foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 500 nm para dosagem dos triglicérides.

O resultado foi analisado estatisticamente utilizando-se teste t de Student não pareado, sendo considerados significantes os resultados que apresentaram $P < 0,05$.

Observou-se diferença significativa entre os grupos, mostrando que a
5 deleção do receptor Mas altera os níveis sanguíneos de triglicérides nesses animais quando comparados aos animais controle (Figura 4).

Esse resultado mostra que a deleção gênica do receptor Mas altera o metabolismo do animal fazendo com que ocorra aumento dos níveis de triglicérides, indicando assim a participação do eixo Mas/Ang-(1-7), na
10 regulação metabólica de triglicérides.

Exemplo 4:

Esse exemplo descreve o efeito da deleção do receptor Mas na resistência à insulina em camundongos Knock-out FVBN para o gene do receptor Mas (Ko-Mas).

15 Um total de seis animais WT-FVBN e o mesmo número de Ko-Mas foram utilizados, estando os mesmos no estado alimentado. O teste iniciou-se com uma dosagem basal da glicemia, para a qual, um pequeno corte na ponta da cauda do animal foi realizado para coleta de uma gota de sangue e mensuração da concentração plasmática de glicose com o auxílio de um
20 glicosímetro.

Em seguida foi feita uma aplicação intraperitoneal de insulina, na dose de 0,75 UI de insulina/Kg de peso corporal e realizou-se dosagens seriadas da glicemia nos tempos de 15, 30 e 60 minutos após a aplicação.

A análise estatística foi realizada utilizando o teste Two Way ANOVA, sendo considerados significantes os resultados que apresentaram $P < 0,05$.

Os resultados mostraram que os animais Ko-Mas apresentam maior resistência à insulina, tanto quando se analisa a área sob o gráfico ao longo do tempo (Figura 6), quanto quando se faz uma análise ponto-a-ponto ao longo do tempo (Figura 7). Todos os resultados foram estatisticamente diferentes.

Esses dados mostram que a deleção gênica do receptor Mas altera a resistência tecidual à glicose fazendo com que ocorra aumento dos níveis glicêmicos, indicando assim a participação do eixo Mas/Ang-(1-7), na regulação metabólica da insulina e seus receptores.

Exemplo 5:

Esse exemplo descreve o efeito da deleção do receptor Mas na tolerância à glicose em camundongos Knock-out FVBN para o gene do receptor Mas (Ko-Mas).

Um total de seis animais WT-FVBN e o mesmo número de Ko-Mas foram colocados em jejum de 12 horas antes do experimento. O teste iniciou-se com uma dosagem basal da glicemia de jejum, para a qual um pequeno corte na ponta da cauda do animal foi realizado para coleta de uma gota de sangue e mensuração da concentração plasmática de glicose com o auxílio de um glicosímetro.

Em seguida foi feita uma aplicação intraperitoneal de glicose, na dose de 2g/Kg de peso corporal e realizou-se dosagens seriadas da glicemia nos tempos de 15, 30, 60 e 120 minutos após a aplicação.

A análise estatística foi realizada utilizando o teste Two Way ANOVA, sendo considerados significantes os resultados que apresentaram $P < 0,05$.

Os resultados mostraram que os animais Ko-Mas apresentam glicemia de jejum maior que o grupo controle (Figura 5), além de apresentar maior
5 tolerância à glicose, tanto quando se analisa a área sob o gráfico ao longo do tempo (Figura 8), quanto quando se faz uma análise ponto-a-ponto ao longo do tempo (Figura 9). Todos os resultados foram estatisticamente diferentes.

Esses dados mostram que a deleção gênica do receptor Mas altera a tolerância à glicose fazendo com que ocorra aumento dos níveis glicêmicos,
10 indicando assim a participação do eixo Mas/Ang-(1-7), na regulação metabólica da glicose.

Exemplo 6:

**Esse exemplo descreve o efeito da deleção do receptor Mas na pressão arterial e frequência cardíaca de camundongos Knock-out FVBN para o
15 gene do receptor Mas (Ko-Mas).**

Um total de oito animais WT-FVBN e o mesmo número de Ko-Mas foram submetidos à medida da pressão arterial, realizada através da captação de um sinal de pressão pulsátil enviado ao transdutor de pressão conectado à cânula inserida na artéria aorta abdominal através da artéria femoral, pelo sistema de
20 aquisição de dados (Biopac System, modelo MP100, serial 96122386). As oscilações de pressão captadas foram amplificadas e convertidas através de placa de conversão analógico/digital em sinais que alimentam a placa de aquisição de dados. Através do software de leitura da placa, Acqknowledge

v.3.5.7, a pressão arterial pulsátil é coletada continuamente com uma frequência de amostragem de 2000-4000 Hz. Os valores de pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) são calculados a partir de pulsos de pressão arterial e registrados pelo sistema.

5 A canulação da artéria femoral foi realizada sob anestesia com Ketamina (4.5 mg/Kg) + Xilazina (0.2 mg/Kg), 24 horas antes do procedimento experimental. Após posicionamento do animal em decúbito dorsal sobre a mesa cirúrgica, foi realizada tricotomia da região inguinal esquerda do animal. Uma pequena incisão na pele foi realizada utilizando tesoura pequena. Com o
10 auxílio de lupa, o feixe vículo-nervoso femoral foi localizado e a artéria femoral foi cuidadosamente isolada. A cânula arterial é introduzida delicadamente através da artéria femoral até a artéria aorta abdominal.

Os resultados foram analisados estatisticamente utilizando o teste t de Student não-pareado. Foram considerados significantes os resultados com
15 $P < 0.05$.

Em conjunto, os resultados mostram que a pressão arterial média (PAM) dos animais Ko-Mas é significativamente mais elevada que a dos animais controle (WT-FVBN) (Figura 10). No entanto, os valores de frequência cardíaca (FC) não diferem entre os grupos experimentais (Figura 11).

20 Esses dados mostram que a deleção gênica do receptor Mas altera os valores basais de PAM, tornando os animais Ko-Mas hipertensos quando comparados aos animais controle (WT-FVBN), indicando assim a participação do eixo Mas/Ang-(1-7), na regulação da pressão arterial e gênese da hipertensão arterial.

Esses exemplos, baseados na deleção genética do receptor Mas, em conjunto, evidenciam que o eixo Mas/Ang-(1-7) apresenta um importante papel no quadro de síndrome metabólica, visto que essa deleção levou os animais a aumento de peso, aumento dos níveis plasmáticos de colesterol e triglicérides, aumento na resistência à insulina e na intolerância à glicose, aumento da glicemia de jejum e aumento da pressão arterial.

Reivindicações

“USO DE AGONISTAS DO RECEPTOR ACOPLADO A PROTEÍNA G, MAS, NO TRATAMENTO DA SINDROME METABÓLICA, SEUS COMPONENTES E SUAS COMPLICAÇÕES”.

- 5 1. Uso de agonistas do receptor acoplado à proteína G, Mas, peptídicos ou não peptídicos caracterizado por ser para preparação de um medicamento útil no tratamento ou prevenção da síndrome metabólica, bem como, de suas complicações.
2. O USO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelas complicações
10 serem cerebrais, disfunções hormonais, alterações no peso corporal, nos níveis plasmáticos e teciduais de colesterol, nos níveis plasmáticos e teciduais de triglicérides ou nos níveis plasmáticos e teciduais de glicose.
3. O USO, de acordo com as reivindicações 1 e 2, caracterizado pelo medicamento poder conter cDNAs que codifiquem seqüências peptídicas
15 correspondentes a Angiotensina-(1-7) e seus análogos, para uso em terapia gênica.
4. O USO, de acordo com as reivindicações 1 e 2, caracterizado pelo medicamento poder conter o peptídeo Angiotensina-(1-7) e seus análogos, peptídicos ou não peptídicos.
- 20 5. O USO, de acordo com as reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo medicamento poder ser dispositivos micro e nano-particulados, implantáveis, injetáveis ou para administração por via oral.

Figura 1

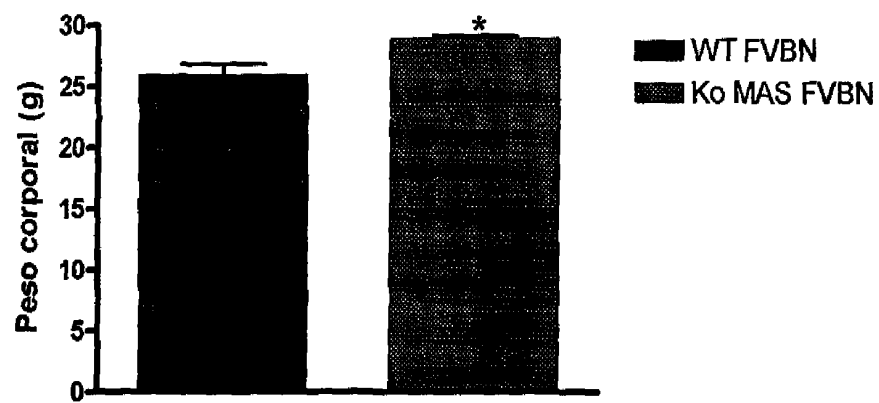


Figura 2

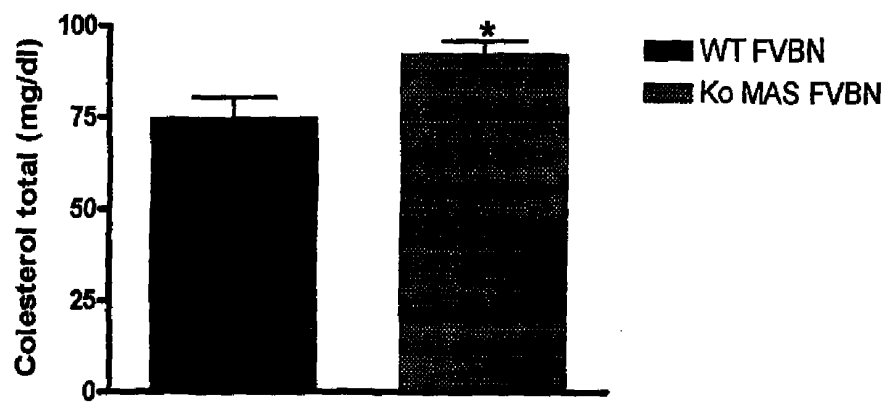


Figura 3

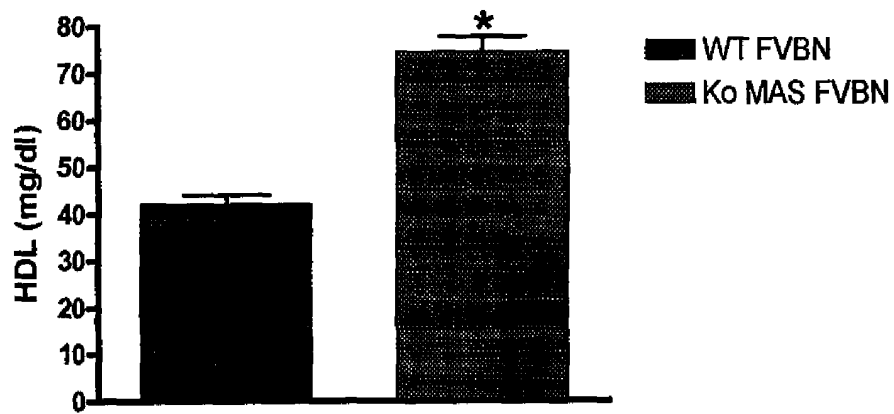


Figura 4

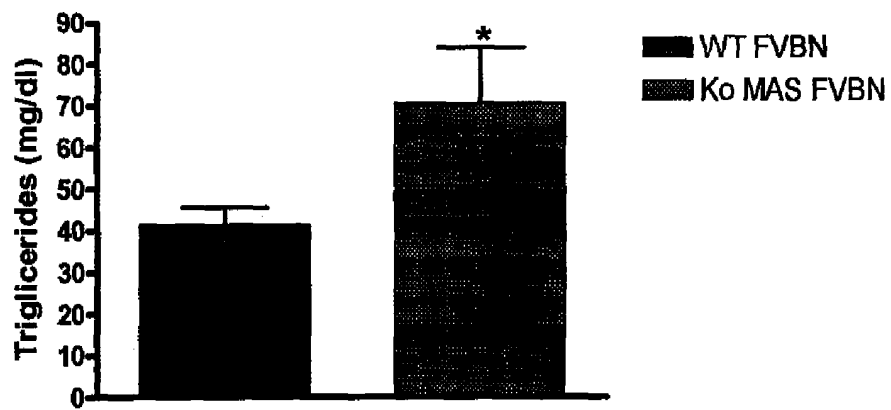


Figura 5

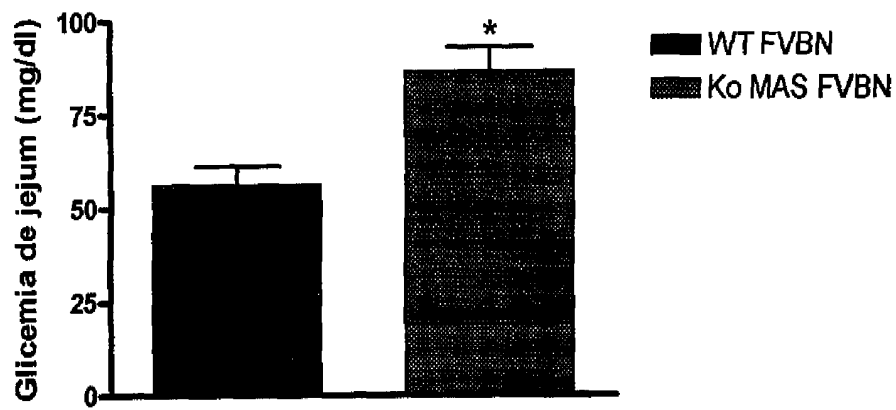


Figura 6

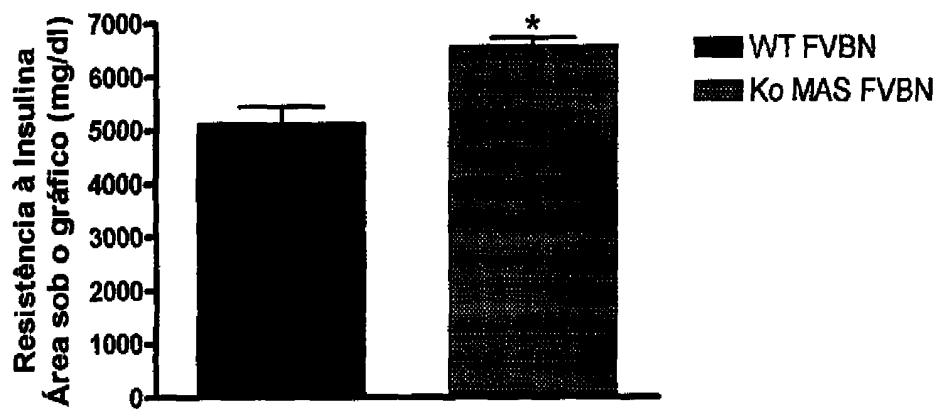


Figura 7

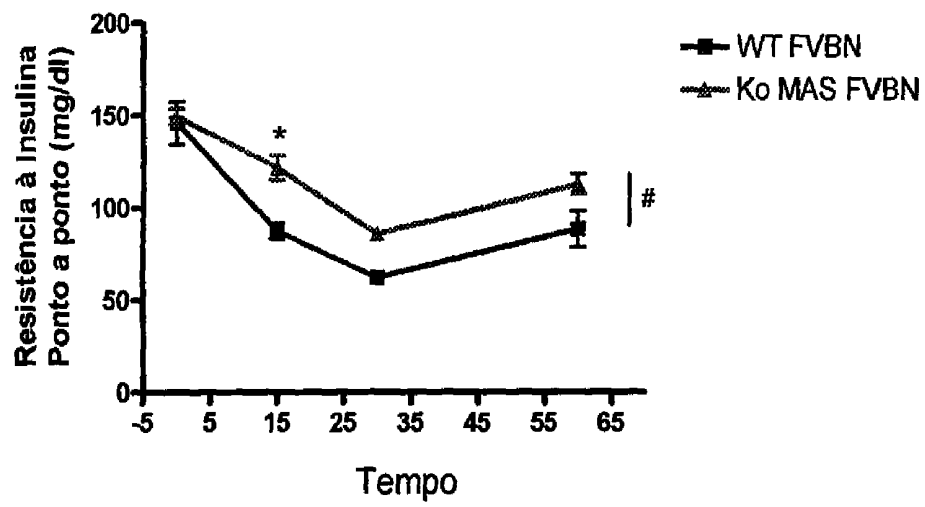


Figura 8

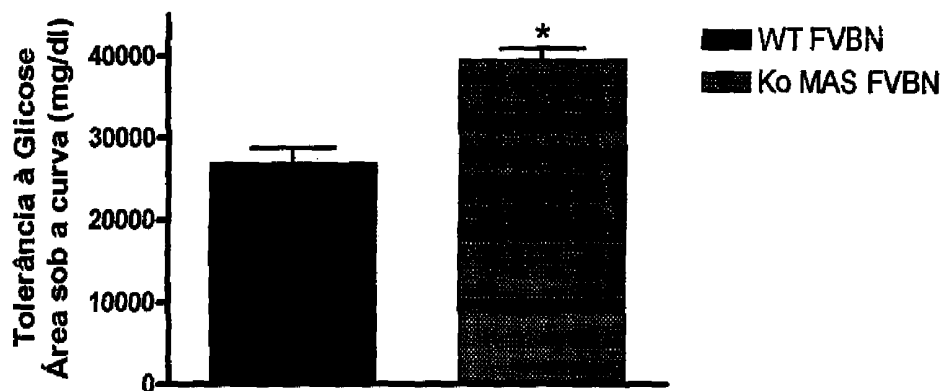


Figura 9

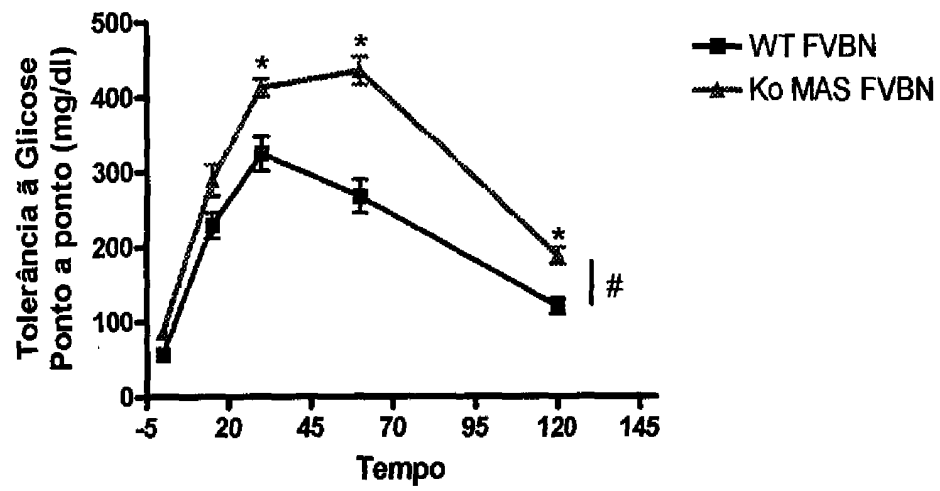


Figura 10

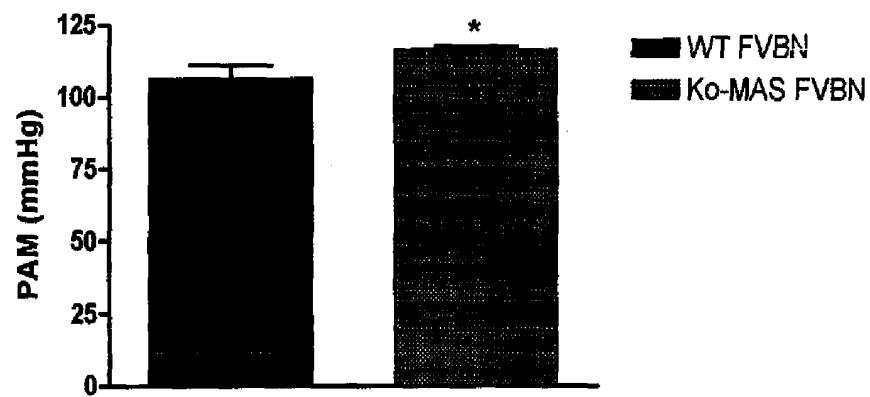


Figura 11