



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO PROFISSIONAL EM INOVAÇÃO TECNOLÓGICA E
PROPRIEDADE INTELECTUAL**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO CARDIOVASCULAR E ANTIHIPERTENSIVO
DE PEPTÍDEOS SINTÉTICOS SIMILARES ÀS HIPOTENSINAS**

ÉRIKA ANGELA OLIVEIRA

**BELO HORIZONTE
AGOSTO/2019**



ÉRIKA ANGELA OLIVEIRA



AVALIAÇÃO DO EFEITO CARDIOVASCULAR E ANTIHIPERTENSIVO DE PEPTÍDEOS SINTÉTICOS SIMILARES ÀS HIPOTENSINAS

Projeto de dissertação de mestrado profissional apresentado ao Programa de Pós-Graduação: Mestrado Profissional em Inovação Tecnológica e Propriedade Intelectual da Universidade Federal de Minas Gerais.

Área de concentração: Inovação Biofarmacêutica e Tecnologia

Linha de pesquisa: Abordagens Biotecnológicas no Desenvolvimento de Medicamentos

Orientador: Prof. Dr. Thiago Verano Braga

**BELO HORIZONTE
AGOSTO/2019**

“AVALIAÇÃO DO EFEITO CARDIOVASCULAR E ANTIHIPERTENSIVO DE PEPTÍDEOS SINTÉTICOS SIMILARES ÀS HIPOTENSINAS”

ÉRIKA ANGELA DE OLIVEIRA

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia 05 de julho de 2019, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes membros:


DRA. DANIELLE CARVALHO DE OLIVEIRA COUTINHO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS/UFMG


PROF.^a DRA. MARIA ELENA DE LIMA PEREZ GARCIA
INSTITUTO DE ENSINO E PESQUISA DA SANTA CASA DE BH


PROF. DR. THIAGO VERANO BRAGA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS/UFMG – ORIENTADOR

Instituto de Ciências Biológicas – Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG

Belo Horizonte, 05 de julho de 2019.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Thiago Verano Braga, pela grande oportunidade, pelos conselhos, ensinamentos e pela paciência com um profissional iniciante na área acadêmica.

À minha família, meus pais, Ivandi e Angela, pelo incentivo na minha formação e por respeitarem minhas decisões, minha irmã Aline, que mesmo distante fisicamente, esteve sempre ao meu lado me aconselhando.

Aos meus colegas que me ensinaram sobre as rotinas de laboratório e sobre os testes que realizei neste trabalho.

Gabriel Sanglard Santos Resende por me ensinar a técnica de Reatividade Vascular, Silvia Amaral Zebral por operar os ratos que utilizei no teste de Atividade Anti-Hipertensiva e Igor Maciel por realizar os testes com o confocal.

Às agências de fomento (FAPEMIG, CNPq e CAPES) pelo apoio financeiro.

E a todos que não foram citados, mas que estão cientes de sua participação direta ou indireta na realização deste trabalho.

RESUMO

A Hipertensão arterial é um problema de saúde pública, e mesmo após a descoberta de várias classes de medicamentos, ainda existem pacientes que não respondem de forma eficiente aos tratamentos. Uma nova classe a ser estudada são os Peptídeos Potenciadores de Bradicinina (PPB's) não canônicos, o diferencial destes peptídeos, comparando com os PPB's clássicos ou canônicos, é o mecanismo de ação, sendo que os PPB's clássicos agem via inibição da enzima conversora de angiotensina, e os PPB's não clássicos agem como agonistas dos receptores B2, potencializando os efeitos fisiológicos da bradicinina (BK), um peptídeo endógeno responsável, dentre outros efeitos, pela regulação da pressão arterial. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito cardiovascular de um peptídeo sintético similar ao peptídeo KPP, com a sua porção N-terminal acetilada e C-terminal amidada ($H_3CO-Lys-Pro-Pro-NH_2$ ou acKPPam), um Peptídeo Potenciador de Bradicinina (PPB) não clássico. Através de testes de reatividade vascular *ex vivo* foram verificados que o peptídeo é capaz de uma ação vasodilatadora, utilizando a cascata de síntese do óxido nítrico e endotélio dependente. Outro teste utilizado foi o de atividade anti-hipertensiva *in vivo*, onde foi possível verificar que o peptídeo acKPPam possui uma atividade anti-hipertensiva. Desta forma, o peptídeo acKPPam apresenta um potencial para, futuramente, servir como modelo para o desenvolvimento de uma nova classe de medicamentos anti-hipertensivos.

ABSTRACT

Hypertension is a public health problem, and even after discovering various antihypertensive drugs, there are still patients that do not respond effectively to current treatments. A new class to be studied is the non-canonical Bradykinin Potentiating Peptides (BPPs). Unlike the canonical BPPs that are inhibitors of the angiotensin-converting enzyme (ACEi), the non-canonical BPPs act as B2 receptor agonists, enhancing the physiological effects of bradykinin (BK), an endogenous peptide responsible, among other effects, for regulating blood pressure. The aim of this study was to evaluate the cardiovascular effects of a synthetic peptide similar to the KPP peptide, a non-canonical BPP, with its N-terminal acetylated and C-terminal amidated (H₃CO-Lys-Pro-Pro-NH₂ or acKPPam). Using ex vivo vascular reactivity assays, it was verified that the peptide induces vasodilating in nitric oxide- and endothelium-dependent manner. In vivo antihypertensive assay was also done, where it was possible to verify that the acKPPam peptide has antihypertensive activity. Thus, the acKPPam peptide has the potential to serve as a model for future development of a new class of antihypertensive drugs.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 Sistema Renina Angiotensina
- Figura 2 Vias de formação das cininas
- Figura 3 Sequência primária de peptídeos isolados do veneno do escorpião *Tityus serrulatus*
- Figura 4 Reatividade Vascular
- Figura 5 Estrutura do peptídeo
- Figura 6 Esquema do teste de reatividade vascular
- Figura 7 Vasodilatação induzida pelo peptídeo acKPPam
- Figura 8 Teste acKPPam com endotélio x sem endotélio
- Figura 9 Avaliação do efeito do NO sobre o efeito vasodilatador do acKPPam
- Figura 10 Avaliação do efeito de acKPPam via receptor B2
- Figura 11 Avaliação do efeito de acKPPam via receptor B1
- Figura 12 Cirurgia da Atividade Anti-Hipertensiva
- Figura 13 Registro da Atividade Anti-Hipertensiva
- Figura 14 Metodologia realizada com Microscopia Confocal
- Figura 15 Efeito hipotensor dose dependente de acKPPam observado no teste de reatividade vascular.
- Figura 16 Efeito hipotensor endotélio dependente de acKPPam observado no teste de reatividade vascular.
- Figura 17 Efeito hipotensor dose dependente do acKPPam x KPP observado no teste de reatividade vascular
- Figura 18 Efeito hipotensor óxido nítrico dependente de acKPPam
- Figura 19 Antagonista B2 bloqueia o efeito vasodilatador de acKPPam observado no teste de reatividade vascular.
- Figura 20 Antagonista B1 bloqueia o efeito vasodilatador de acKPPam observado no teste de reatividade vascular.
- Figura 21 Antagonista B1 + Antagonista B2, bloqueiam o efeito vasodilatador de acKPPam
- Figura 22 Frequência cardíaca no teste de atividade anti-hipertensiva
- Figura 23 Pressão arterial média no teste de atividade anti-hipertensiva
- Figura 24 Imagem da microscopia confocal com os peptídeos KPP x acKPPam
- Figura 25 Gráfico da microscopia confocal com os peptídeos KPP x acKPPam
- Figura 26 Esquema Espectrometria de Massa
- Figura 27 Esquema do sistema Langendorff

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ac	Acetilação
Ach	Acetilcolina
am	Amidação
BPM	Batimentos por minuto
BK	Bradicinina
DB	Tampão de dissociação
ECA	Enzima Conversora de Angiotensina
EGTA	Etilenoglicol-bis(β -éter aminoetílico)-N,N,N',N'- ácido tetraacético
FC	Frequência Cardíaca
HA	Hipertensão Arterial
HOE 140	Antagonista seletivo do receptor B2
HMW	Alta massa molecular
L-NAME	N(ω)-nitro-L-arginina éter metílico, (inibidor não seletivo da óxido nítrico sintase, NOS)
LMW	Baixa massa molecular
PA	Pressão Arterial
PPBs	Peptídeos Potenciadores de Bradicininina
Phe	Fenilefrina
SRA	Sistema Renina Angiotensina
MAPA	Monitorização ambulatorial da pressão arterial

SUMÁRIO

1. Introdução	09
1.1 Sistema Renina-Angiotensina e Calicreína-Cininas	09
1.2 Hipertensão Arterial	11
1.3 Peptídeos Potenciadores de Bradicininina	13
1.4 Minimização estrutural do peptídeo TsHpT-I	15
2. Justificativa	17
3. Objetivos	19
3.1 Objetivos Gerais	19
3.2 Objetivos Específicos	19
4. Métodos	20
4.1 Peptídeo acKPPam	20
4.2 Animais	20
4.3 Reatividade Vasculuar	20
4.4 Atividade Anti-hipertensiva	25
4.5 Microscopia Confocal	27
5. Resultados e Discussão	29
5.1 Reatividade Vasculuar	29
5.2 Atividade Anti-hipertensiva	35
5.3 Microscopia Confocal	37
6. Conclusão	38
7. Perspectivas	39
8. Referências	41

1. INTRODUÇÃO

1.1 Os Sistemas Renina-Angiotensina e Calicreína-Cininas

O sistema renina angiotensina (SRA) é um dos principais componentes que controlam a homeostase, através do controle central e periférico da pressão arterial. O SRA é composto por uma proteína plasmática de alta massa molecular, o angiotensinogênio, e vários peptídeos que são originados dessa proteína pela ação de enzimas proteolíticas (Figura 1). O SRA apresenta dois eixos funcionais, o eixo clássico e o eixo protetor. O eixo clássico é formado pela enzima conversora de angiotensina (ECA), a angiotensina II e o seu receptor AT1. Este eixo induz o aumento da pressão arterial, aumento da reabsorção renal de água e sódio, hipertrofia e proliferação celular. O eixo protetor, composto por uma proteoforma da ECA (ECA 2), o peptídeo angiotensina-(1-7) e o seu receptor Mas, é assim chamado pois modula negativamente vários efeitos deletérios do eixo clássico (Passos-Silva *et al.*, 2013; Santos *et al.*, 2013).

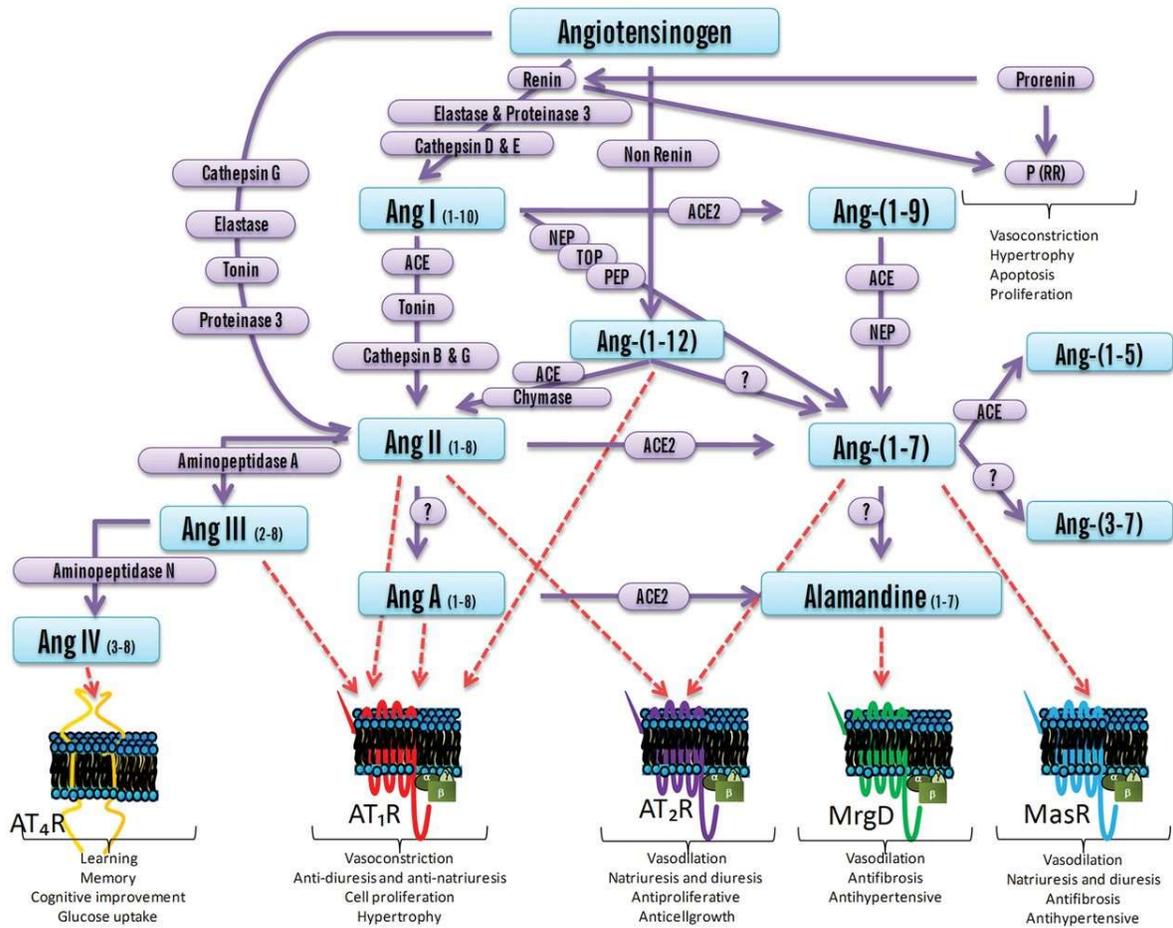


Figura 1 –Visão atual do sistema renina angiotensina, seus componentes e efeitos principais (Gironacci *et al.*, 2014).

O sistema caliceína-cinina é composto pelas enzimas caliceína plasmática e tecidual, cininases e enzimas conversoras de cininas, além da proteína plasmática cininogênio, que pode ser de alta e baixa massa molecular, HMWK e LMWK, respectivamente, e pelas cininas, que são peptídeos plasmáticos. Os efeitos fisiológicos das cininas são mediados pelo receptor B1, levando a angiogênese, inflamação e choque séptico, e pelo receptor B2, produzindo as ações de vasodilatação e hipotensão (Morais *et al.*, 2013).

Como mencionado anteriormente, existem dois tipos de cininogênios em mamíferos, o cininogênio de baixa massa molecular (LMW) e o de alta massa

molecular (HMW). O cininogênio de baixa massa molecular (LMW) é hidrolisado em Lisil-bradicinina (Lys-BK), reação catalisada pela calicreína tissular, conforme descrito na figura 2. O cininogênio de alta massa molecular (HMW), secretado pelo fígado na circulação sanguínea, se liga a pré-calicreína e ao fator XI, formando um complexo que ativa a calicreína plasmática, que por sua vez ativa o fator XII, ativando novamente a calicreína plasmática e levando a liberação da bradicinina (BK), sequência de aminoácidos **RPPGFSPFR** (Pesquero e Bader, 2006).

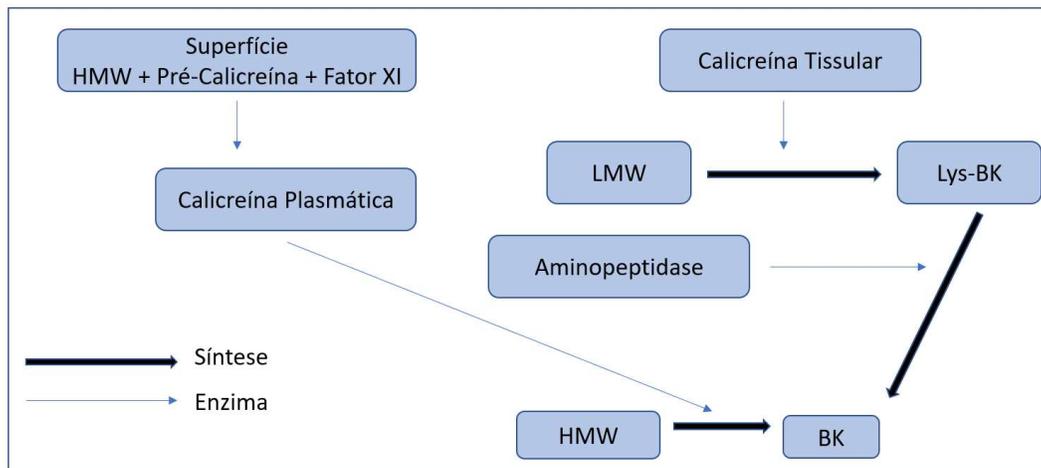


Figura 2 – Vias de formação das cininas.

1.2 Hipertensão Arterial

A Hipertensão Arterial (HA) é caracterizada por níveis elevados e sustentados da pressão arterial, é uma doença multifatorial que sofre a influência de fatores ambientais, possui uma alta prevalência e um baixo controle, atingindo um grande número de indivíduos (Rosário *et al.*, 2009).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), as doenças cardiovasculares (DCV) causam o óbito de 17,7 milhões de pessoas todos os anos, sendo responsáveis por 31% de todas as mortes globais (Oms, 2017).

No Brasil a hipertensão arterial afeta 36 milhões de brasileiros (Silva *et al.*, 2018) e, segundo um estudo do Instituto Karolinska (Suécia) e da Universidade

do Estado de Nova York, até 2025, o número de hipertensos pode crescer até 80% nos países em desenvolvimento (Silva *et al.*, 2018).

A insuficiência ventricular esquerda e a insuficiência cardíaca são geralmente aliviadas quando a hipertensão é controlada. A pressão arterial é influenciada por fatores ambientais, sendo aumentada pela raiva, medo, dor, frio, entre outras, como uma consequência direta do aumento do tônus simpático (Pickering, 1972).

Segundo a Sociedade Brasileira de Hipertensão (SBH), são considerados normotensos os indivíduos que apresentam a pressão arterial (PA) $\leq 120 \times 80$ mmHg. A SBH considera hipertensão arterial (HA) controlada quando um paciente em tratamento com anti-hipertensivos permanece com a PA dentro desses valores. A pré-hipertensão é caracterizada pela presença sustentada de PA sistólica entre 121 e 139 mmHg e PA diastólica entre 81 e 89 mmHg. O diagnóstico da hipertensão arterial ocorre quando os pacientes apresentam a PA $\geq 140 \times 90$ mmHg em consultório e, após o uso do MAPA (Monitorização ambulatorial da pressão arterial), PA $\geq 135 \times 85$ mmHg em vigília, PA $\geq 120 \times 80$ mmHg durante o sono, e uma média de PA $\geq 135 \times 85$ mmHg por 24h (Cardiologia, 2016).

A hipertensão arterial pode ser causada por vários fatores como, por exemplo, a desregulação do sistema renina angiotensina (SRA), um dos sistemas humorais envolvidos no controle central e periférico da pressão arterial (PA) (Santos *et al.*, 2000).

O tratamento é realizado associando a forma não medicamentosa com o tratamento com drogas anti-hipertensivas. Dentre os tratamentos não medicamentosos, inclui o aumento da atividade física, a diminuição do consumo de álcool e de sódio (Cardiologia, 2016). Para estabilizar a PA, várias drogas podem ser utilizadas, como por exemplo, diuréticos, β -bloqueadores, inibidores da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA), antagonistas dos canais de cálcio e antagonistas do receptor AT1 da angiotensina II (Bralet e Schwartz, 2001).

Contudo, ainda existem pacientes que não conseguem estabilizar a pressão arterial utilizando um ou mais desses medicamentos, quadro denominado hipertensão resistente ou refratária. Segundo o Instituto Nacional de Excelência e Cuidados a Saúde (NICE), a hipertensão arterial clínica descontrolada é definida pela PA $\geq 140 \times 90$ mmHg, mesmo após o tratamento com três ou mais drogas anti-hipertensivas (Sheppard *et al.*, 2017).

A chamada hipertensão "pseudo-resistente" pode ser causada por técnicas de medição da pressão arterial precárias, falta de adesão ao medicamento prescrito, intolerância do paciente a certos medicamentos antihipertensivo (Sheppard *et al.*, 2017).

Pensando nos pacientes que não respondem satisfatoriamente aos tratamentos convencionais, é necessário estudar novas classes de medicamentos anti-hipertensivos, como, por exemplo, os Peptídeos Potenciadores de Bradicinina (PPB's) não clássicos, ou seja, PPB's que não são inibidores da ECA.

1.3 Peptídeos Potenciadores de Bradicinina

Peptídeos são biomoléculas que contém, no mínimo, dois resíduos de aminoácidos, e, no máximo, 50 resíduos, unidos através de ligações peptídicas. Os peptídeos apresentam grande diversidade funcional, podem atuar como hormônios, fatores liberadores de hormônios, neuropeptídios, neurotransmissores, antibióticos naturais, e outros (Gutte, 1995).

Os Peptídeos Potenciadores de Bradicinina (PPB's) são moléculas de baixa massa molecular, sem pontes dissulfeto, capazes de potencializar os efeitos fisiológicos da bradicinina (BK), sobretudo a vasodilatação e hipotensão (Verano-Braga, 2009)

1.4 Minimização estrutural do peptídeo TsHpt-I

Segundo Verano-Braga e colaboradores (2008), após um estudo sobre a estrutura primária do peptídeo TsHpt-I (AEIDFSGIPEDIKQIKETNAKPPA), patente número BR0202157A, isolado do veneno de escorpião *Tityus serrulatus*, foi constatado que além de potencializar o efeito da bradicinina, ele também é um agente hipotensor e anti-hipertensivo, sendo capaz de reduzir a PA de ratos hipertensos.

Após este estudo, realizou-se uma minimização estrutural do peptídeo TsHpt-I, visando identificar a estrutura primária mínima capaz de mimetizar os efeitos cardiovasculares observados para o peptídeo nativo. Após esse estudo, verificou-se que a carga positiva da cadeia lateral da lisina e as duas prolinas, ambos resíduos localizados na porção C-terminal, são essenciais para que o peptídeo possa exercer os efeitos descritos. Os autores concluíram que tripeptídeo KPP era capaz de potencializar os efeitos da BK, induzir vasodilatação e hipotensão em animais hipertensos. Neste mesmo estudo, verificou-se que o alvo farmacológico do TsHpt-I e do tripeptídeo KPP era o receptor B2 da BK, exercendo um efeito agonista (Verano-Braga *et al.*, 2010).

O peptídeo KPP induz um efeito vasodilatador dose-dependente e endotélio-dependente, via produção de NO pela enzima óxido nítrico sintase (NOS), uma vez que o uso do inibidor inespecífico dessa enzima (L-NAME) aboliu tal efeito vascular (figura 4).

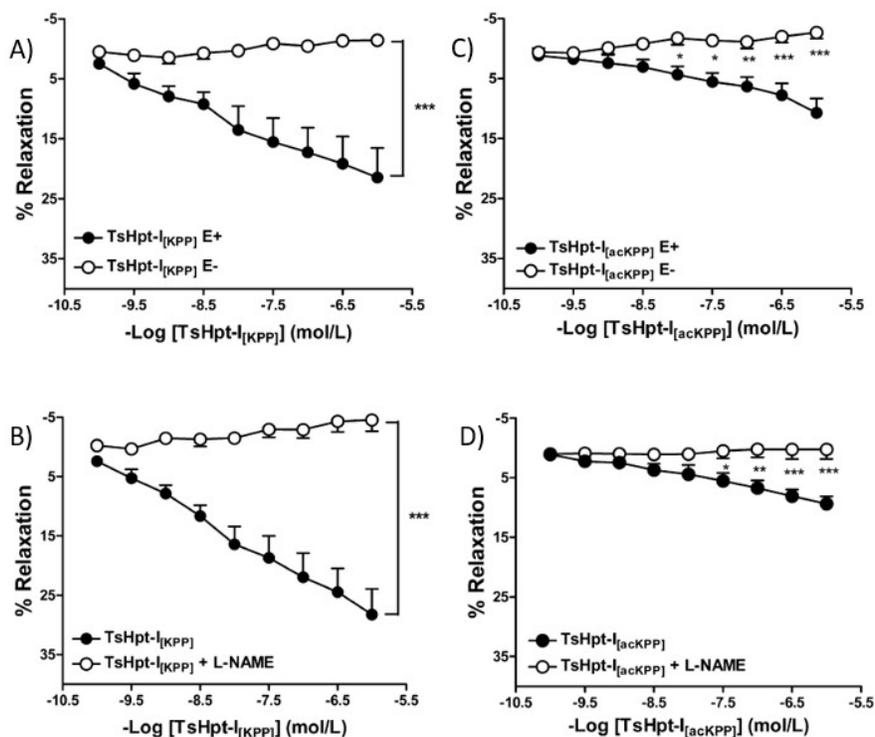


Figura 4 – Reatividade Vascular - A) KPP com endotélio x sem endotélio funcional. B) KPP pré-incubado com L-NAME C) acKPP com endotélio x sem endotélio funcional. D) acKPP pré-incubado com L-NAME (Verano-Braga *et al.*, 2010)

O peptídeo acKPP, que apresenta um grupo acetil ($\text{C}_2\text{H}_3\text{O}$) na amina primária localizada na sua cadeia lateral, não possui a mesma efetividade do peptídeo KPP, comprovando, assim, a necessidade da carga positiva localizada na sua cadeia lateral. Contudo, nestes estudos não foram avaliadas outras alterações químicas do peptídeo KPP, como a acetilação do seu N-terminal e a amidação do seu C-terminal (acKPPam), o que poderia aumentar a sua estabilidade no plasma e, conseqüentemente, sua meia-vida.

Vale ressaltar que a minimização estrutural do peptídeo TshpT-I se faz necessária pois peptídeos com baixa massa molecular são absorvidos com maior eficiência pela mucosa gastrointestinal, essencial para a formulação de medicamentos (Verano-Braga *et al.*, 2008).

2. JUSTIFICATIVA

A hipertensão arterial sistêmica (HAS), caracterizada por níveis elevados e sustentados da PA, é uma condição clínica multifatorial. Geralmente é associada a alterações funcionais e/ou estruturais em órgãos-alvo, como coração, encéfalo, rins e artérias periféricas, e a alterações metabólicas, com o aumento do risco de problemas cardiovasculares que podem progredir ao óbito (Lewington *et al.*, 2002).

Várias drogas são utilizadas na tentativa de estabilizar a pressão arterial, como por exemplo, diuréticos, β -bloqueadores, inibidores da Enzima Conversora de Angiotensina (iECA), antagonistas dos canais de cálcio e antagonistas do receptor AT1 da angiotensina II. Contudo, alguns pacientes não apresentam melhoras nos seus quadros clínicos com esses fármacos, por isso existe o interesse em desenvolver novas classes de fármacos anti-hipertensivos (Bralet e Schwartz, 2001).

Uma classe a ser estudada, e com grande aplicabilidade terapêutica, são os Peptídeos Potenciadores de Bradicinina (PPB's) que não agem via a inibição da ECA, como os peptídeos apresentados nesta dissertação.

Como mencionado na seção anterior desta dissertação, a minimização estrutural das Hipotensinas revelou que o tripeptídeo KPP foi capaz de manter os efeitos farmacológicos observados para o peptídeo nativo. A alteração química deste tripeptídeo, através da inserção de um grupo acetil (C_2H_3O) na sua cadeia lateral, interferiu na atividade vasodilatadora deste peptídeo, pois tal versão não foi capaz de ativar os receptores B2.

Sendo assim, sabendo da importância da cadeia lateral da lisina, o presente estudo visou avaliar o efeito cardiovascular do peptídeo sintético KPP, com as porções N-terminal acetilada e C-terminal amidada ($H_3CO-Lys-Pro-Pro-NH_2$ ou acKPPam), a estrutura deste peptídeo é apresentada na figura 5. O objetivo principal deste trabalho foi avaliar se tal molécula iria apresentar os efeitos farmacológicos similares aos observados no peptídeo KPP.

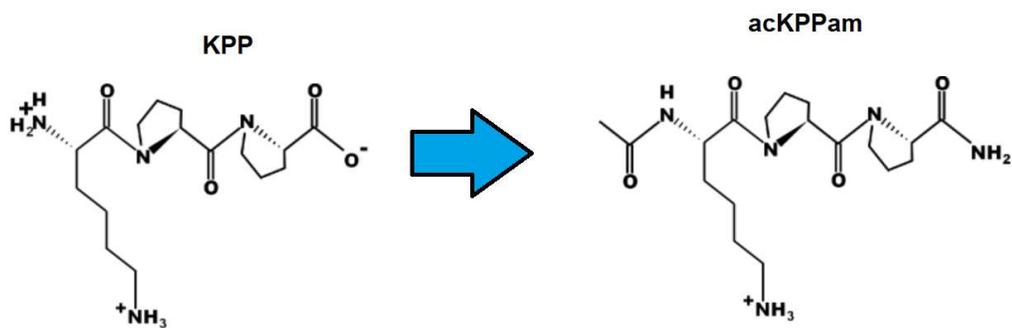


Figura 5 – Estrutura do peptídeo KPP e após acetilação e amidação, acKPPam.

(Figura elaborada utilizando o site <http://pepdraw.com/>)

Além disso, ao proteger o N-terminal e o C-terminal deste peptídeo, provavelmente iríamos aumentar a meia vida desta molécula no plasma, diminuindo sua degradação enzimática e depuração (Kubo et al., 2014). Essas alterações químicas, em teoria, devem aumentar a estabilidade do KPP. Ao compararmos os efeitos do KPP com a sua versão modificada, podemos verificar se tais alterações não comprometem os efeitos cardiovasculares benéficos produzidos pelas Hipotensinas.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

O objetivo geral do nosso trabalho é avaliar o potencial efeito cardiovascular do peptídeo sintético KPP acetilado e amidado (acKPPam).

3.2 Objetivos Específicos

- Estudar os possíveis alvos moleculares dos peptídeos sintéticos por Microscopia Confocal.
- Avaliar reatividade vascular do acKPPam em modelo ex vivo utilizando com os anéis isolados de artéria aorta;
- Verificar a possível atividade anti-hipertensiva do peptídeo acKPPam in vivo utilizando ratos espontaneamente hipertensos (Linhagem SHR);
- Comparar os resultados obtidos para o acKPPam com os resultados previamente publicados do KPP.na literatura do peptídeo KPP.

4. MÉTODOS

4.1 Peptídeo acKPPam

O peptídeo acKPPam foi comprado da empresa GenOne Biotechnologies.

4.2 Animais

Foram utilizados ratos machos, pesando entre 250-350g, das linhagens Wistar e SHR, procedentes, respectivamente, do Centro de Bioterismo do ICB-UFMG (CEBIO) e do Biotério de Ratos do Laboratório de Hipertensão. Os animais foram mantidos em condições padrão de laboratório, recebendo água e alimentação *ad libitum*.

Os experimentos propostos neste projeto foram aprovados pela Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA) da UFMG (Protocolo nº. 213 / 2016).

4.3 Reatividade Vascular

Os animais foram eutanasiados e a artéria aorta torácica foi dissecada e colocada em solução de Krebs, onde foi seccionada em forma de anéis de 3 a 4 mm, e inseridos entre duas hastes de metal em formato triangular, posteriormente colocadas no lúmen da artéria para produzir tensão. Esse sistema foi inserido no equipamento, onde a haste superior se liga a um transdutor de registro de força e a haste inferior se liga a um suporte fixo ajustável (Resende, 2014).

O sistema foi montado em cuba para órgão isolado contendo 10 mL de solução de Krebs (NaCl 135,0 mmol.L⁻¹; KCl 5,0 mmol.L⁻¹; KH₂PO₄ 1,17 mmol.L⁻¹; CaCl₂ 2,5 mmol.L⁻¹; MgSO₄ 1,4 mmol.L⁻¹; NaHCO₃ 20 mmol.L⁻¹; glicose 11,0 mmol.L⁻¹); em pH 7,4, mantida a 37 °C e borbulhamento com uma mistura de 95% O₂ e 5% CO₂ (Mistura Carbogênica) (Resende, 2014).

No período de estabilização, os anéis ficaram em repouso dentro da cuba por um período de 60 minutos, com tensão basal de 1 g/força por cuba, durante esse período, em intervalos de 15 minutos, a solução de Krebs era substituída (Resende, 2014).

Após a estabilização, foi testada a viabilidade da preparação com fenilefrina 100 mmol.L^{-1} a fim de verificar a integridade do músculo liso. Após verificar a contração dos anéis, foi administrada acetilcolina (ACh) $1 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$ para verificar a integridade do endotélio. Foram utilizadas apenas as preparações que apresentassem, pelo menos, 80% de relaxamento induzido pela acetilcolina após pré-contração com fenilefrina (Phe). Podemos verificar o esquema de reatividade vascular na figura 6.

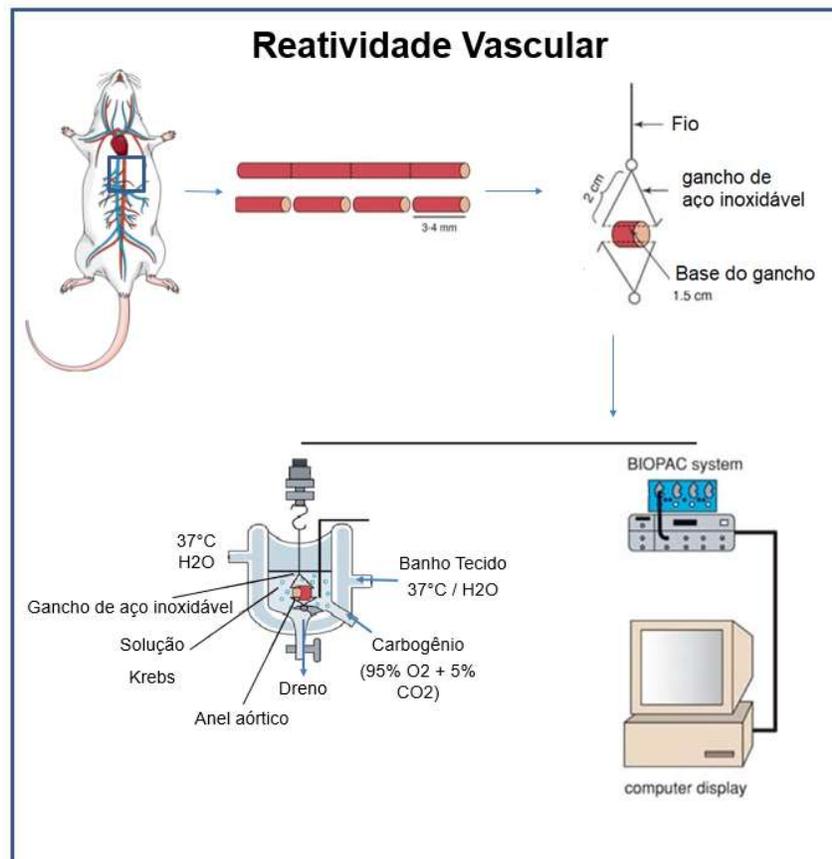


Figura 6. Esquema do teste de reatividade vascular. Os anéis de aorta são retirados após eutanásia do animal, no lúmen do segmento foram colocadas as hastas de metal para acoplar o segmento no equipamento, onde é possível verificar contração e relaxamento do vaso (Figura elaborada utilizando o site <https://mindthegraph.com>).

4.3.1 Estudo do efeito vasodilatador do peptídeo

Para verificar se o peptídeo acKPPam possuía efeito vasodilatador, foram realizados os passos descritos anteriormente e, após a verificação da viabilidade do vaso, foram adicionadas as concentrações de 10^{-10} a 10^{-6} mmol.L⁻¹ do peptídeo. Em uma das cubas foi adicionada apenas salina, sendo este o grupo controle. Para cada animal foi possível realizar até cinco testes diferentes, protocolo mostrado na figura 7 (controle n = 10; acKPPam n = 12).

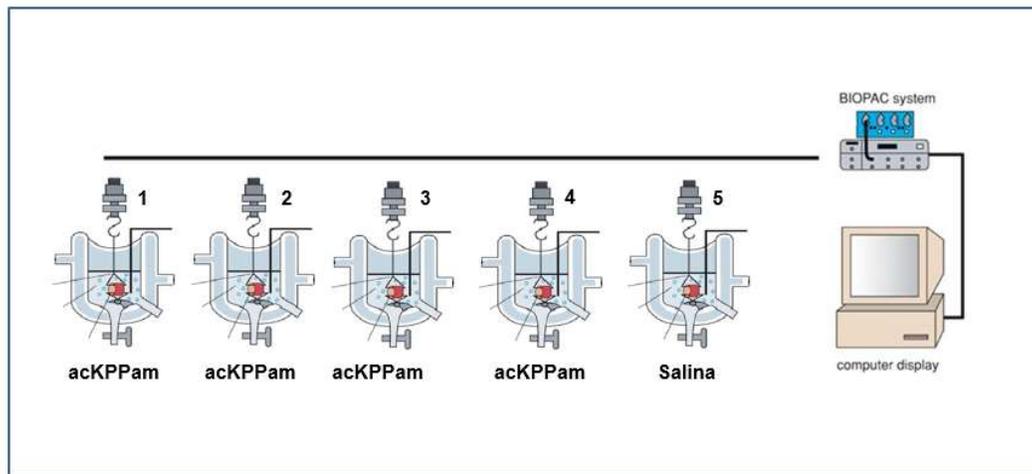


Figura 7. Protocolo esquemático para verificar a vasodilatação induzida pelo peptídeo acKPPam. Equipamento com o teste para verificar o efeito vasodilatador do peptídeo (10^{-10} a 10^{-6} mmol.L⁻¹) em solução de bicarbonato Krebs-Ringer, para cada animal foram retirados 5 segmentos da aorta, cada segmento correspondeu a um teste.

Com intuito de verificar a atividade do peptídeo sobre o endotélio, foram realizados testes usando o peptídeo acKPPam em preparações com o endotélio preservado e sem o endotélio funcional, que foi removido mecanicamente, conforme protocolo mostrado na figura 8. (com endotélio n = 6; sem endotélio n = 9).

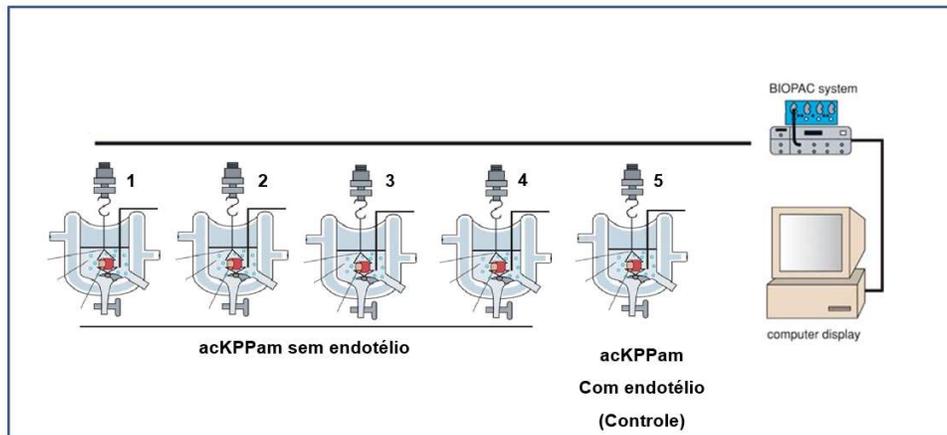


Figura 8. . Protocolo esquemático para verificar o teste do efeito vasodilatador induzido pelo acKPPam em preparações de anéis de aorta com o endotélio funcional vs. sem o endotélio funcional. Vasodilatação induzida pelo peptídeo acKPPam na presença e ausência de endotélio onde o controle é representado pelo endotélio preservado (Figura elaborada utilizando o site <https://mindthegraph.com>).

4.3.2 Avaliação do efeito vasodilatador do peptídeo acKPPam na presença de inibidores e antagonistas

Segundo Verano-Braga (2008), o peptídeo nativo TsHpT-I induz a síntese e liberação de NO pelas células endoteliais. Para verificar se o efeito vasodilatador do peptídeo acKPPam também era mediado pelo NO, foram adicionados 100 μL do inibidor de NOS, denominado L-NAME (N ω -Nitro-L-Arginine-Methyl Ester), na (Kubo *et al.*, 2014) concentração final de 10^{-7} mol.L $^{-1}$ 15 minutos antes da adição do peptídeo. Posteriormente, o peptídeo acKPPam foi adicionado para concentrações finais de 10^{-10} a 10^{-6} mmol.L $^{-1}$. Na cuba controle não foi adicionado o L-NAME, apenas o acKPPam, conforme protocolo mostrado na figura 9. (controle n = 5; acKPPam + L-NAME n = 15).

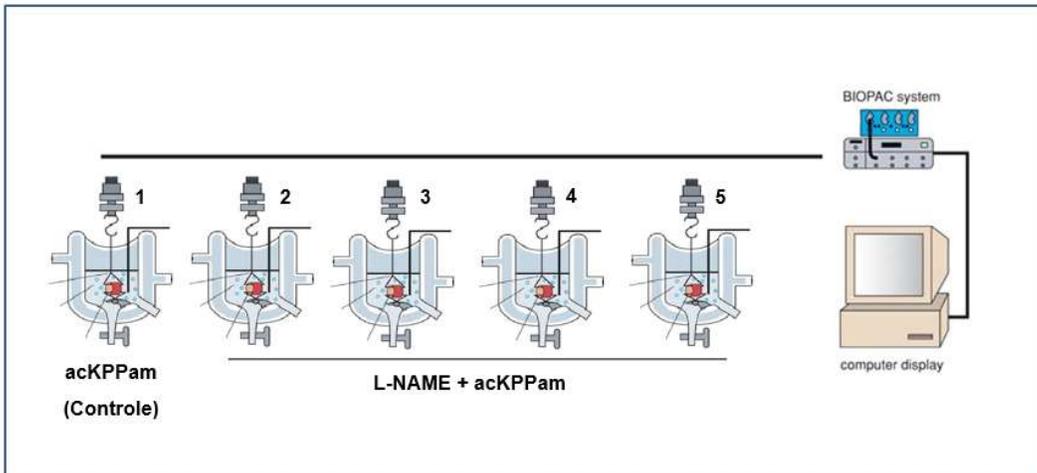


Figura 9. . Protocolo esquemático para verificar a avaliação do NO sobre o efeito vasodilatador do peptídeo acKPPam. Nas cubas de 2 a 5, foi adicionado o L-NAME 15 minutos antes da adição do peptídeo. Na cuba 1 foi adicionado apenas o peptídeo para ser utilizado como controle.

Segundo Verano-Braga e colaboradores (2010), o KPP age via o receptor B2. Para verificar se o peptídeo acKPPam age via o mesmo receptor, foi utilizado o antagonista seletivo HOE 140 (D-Arg-Arg-Pro-Hyp-Gly-Thi-Ser-D-Tic-Oic-Arg) (TOCRIS®).

Dez minutos antes de adicionar o peptídeo, foram colocados 10 μL de HOE 140, na concentração final de $10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$ e, posteriormente, foram adicionadas as concentrações de 10^{-10} a $10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ de acKPPam. Na cuba controle não foi adicionado o HOE 140, apenas o peptídeo acKPPam (controle), conforme protocolo mostrado na figura 10 (controle n = 5; acKPPam + HOE 140 n = 7).

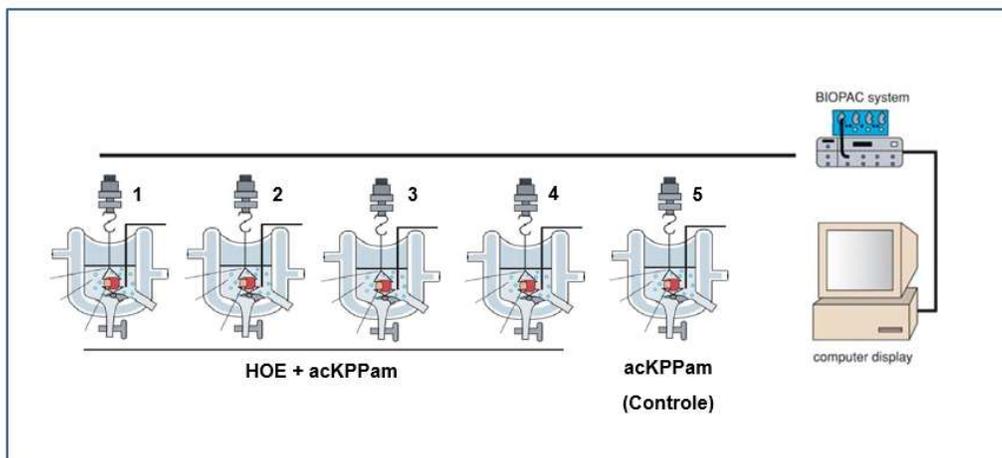


Figura 10. . Protocolo esquemático para verificar a avaliação do receptor B2 no efeito vasodilatador induzido pelo peptídeo acKPPam. Nas cubas de 1 a 4 foi adicionado o HOE 140 10 minutos antes da adição do peptídeo. Na cuba 1 foi adicionado apenas o peptídeo (controle).

Visando verificar se o peptídeo age via o receptor B1, foram colocados 10 µL do antagonista seletivo de B1 (KRPPGFSPL), nas concentrações de 10^{-10} a 10^{-6} mol.L⁻¹, 10 minutos antes de adicionar o acKPPam. Na cuba controle foi adicionado apenas o acKPPam, conforme protocolo mostrado na figura 11 (controle n = 4; antagonista B1 + acKPPam n = 12).

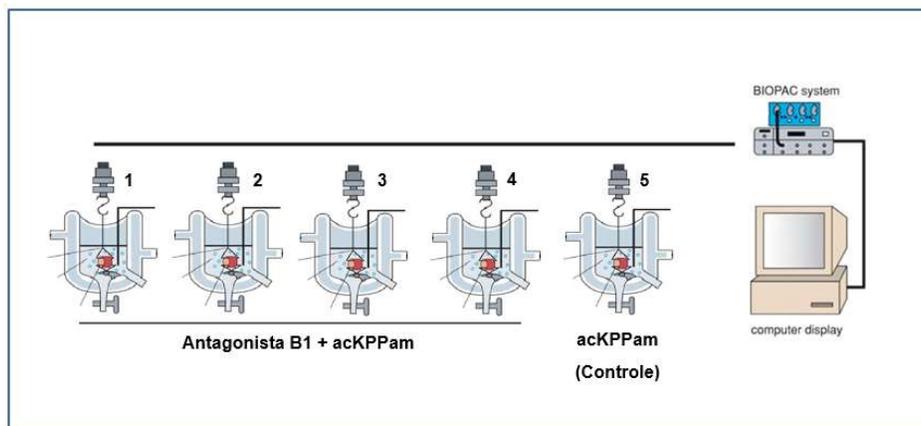


Figura 11. Protocolo esquemático para verificar a avaliação do receptor B1 no efeito vasodilatador induzido pelo peptídeo acKPPam. Nas cubas de 1 a 4 foi adicionado o antagonista do receptor B1 (KRPPGFSPL) 10 minutos antes da adição do peptídeo. Na cuba 1 foi adicionado apenas o peptídeo (controle).

4.4 Atividade Anti-Hipertensiva

4.4.1 Procedimentos Cirúrgicos

Antes dos experimentos (24 horas), os ratos espontaneamente hipertensos (SHR) foram anestesiados com 90 mg/kg de quetamina e 6 mg/kg xilasina, e submetidos a cirurgia para a implantação de cânulas de polietileno na veia e artéria femorais.

As cânulas foram confeccionadas com polietileno de dois diâmetros, PE50 e PE10, fundidos por aquecimento e preenchidas com solução de NaCl 0,9 % m/v. A cânula da artéria femoral foi usada para o registro da pressão arterial média (PAM) e a cânula inserida na veia femoral destinada para a

administração do peptídeo testado acKPPam (333 µg/Kg) e de salina (controle).

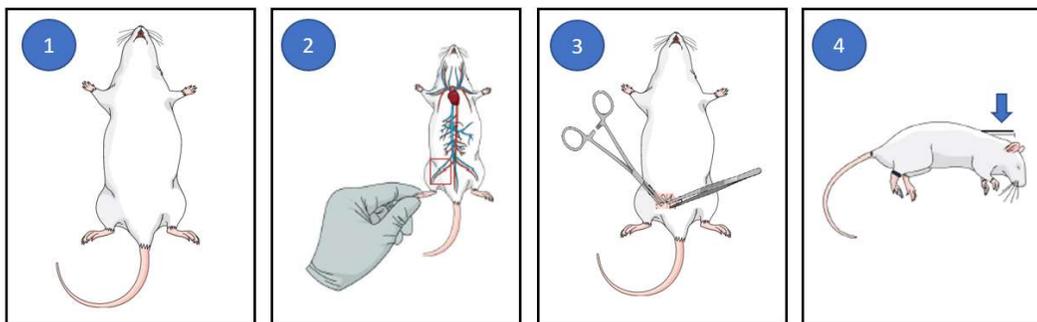


Figura 12. Cirurgia para implantação de cânulas para avaliar a atividade anti-hipertensiva do peptídeo. Durante o primeiro dia foi realizada a cirurgia para a implantação de cânulas de polietileno na veia e artéria femorais. 1) Animal anestesiado; 2) Incisão realizada na região da artéria e veia femorais; 3) Vasos dissecados e um pequeno corte feito para introdução das cânulas; 4) Cânulas exteriorizadas na região interescapular dos animais.

4.4.2 Avaliação do potencial efeito anti-hipertensivo do peptídeo acKPPam

A pressão arterial média (PAM) e a frequência cardíaca (FC) dos animais foram monitoradas antes e durante os experimentos pelo sistema Biopac Systems MP 150 e Biopac Systems MP 100A-CE. O peptídeo acKPPam foi diluído a partir de uma solução estoque (1 mg/mL), com uma solução de NaCl 0,9 % (m/v) para a injeção de 100 µg por animal (aproximadamente 333 µg/Kg) em um volume final de 0,1 mL.

Os parâmetros basais dos animais (PAM e FC) foram monitorados por, no mínimo, 30 minutos. Posteriormente, o peptídeo ou salina foi administrado i.v. *in bolus*, sendo os parâmetros cardiovasculares (PAM e FC) monitorados por 6 horas após injeção do peptídeo, conforme demonstrado na figura 13.

Foram utilizados 7 animais para administração do peptídeo e 7 animais controle (administração de salina).

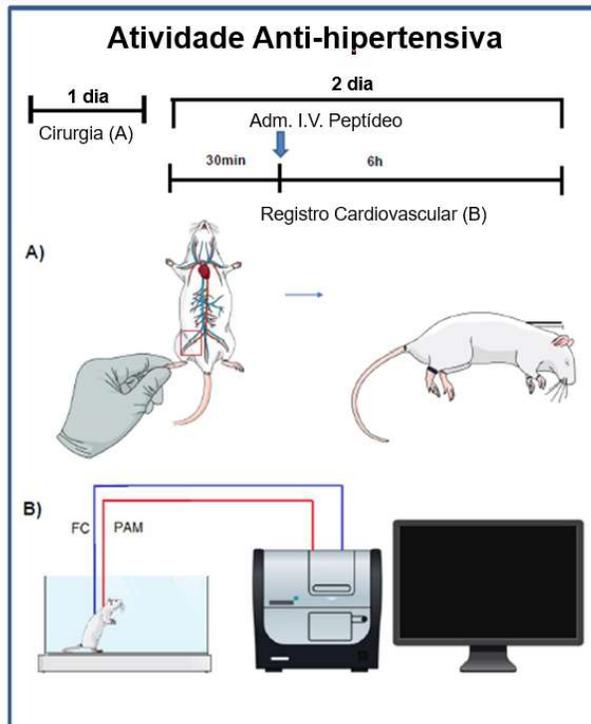


Figura 13. Avaliação *in vivo* da potencial atividade anti-hipertensiva do peptídeo acKPPam. Durante o primeiro dia foi realizada a cirurgia para a implantação de cânulas de polietileno na veia e artéria femorais. No segundo dia foi realizado o registro da pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) durante 6 horas, logo após o tempo de estabilização (Figura elaborada utilizando o site <https://mindthegraph.com>).

4.5 Microscopia Confocal

4.5.1 Isolamento dos Cardiomiócitos

O animal recebeu heparina e após 15 minutos foi realizada a eutanásia por deslocamento cervical, retirado o coração imediatamente e colocado em meio de cultura DB + EGTA gelada. Coração foi canulado pela aorta para adaptá-lo ao sistema e perfundir com DB + EGTA aquecido a 37 °C. O coração foi cortado na altura dos átrios e os ventrículos e colocados em um falcon para proceder com a digestão mecânica, o tecido foi filtrado e o sobrenadante descartado, o pellet foi suspenso em Tyrode, um meio de cultura próprio para Cardiomiócitos.

4.5.2 Fixação das células na placa e Microscopia Confocal

Após o isolamento dos cardiomiócitos, foi realizada a incubação com DAF-FM ($5 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$) 30 minutos antes dos experimentos. Posteriormente, as células foram lavadas com o meio de cultura, Tyrode, próprio para cardiomiócitos e incubadas com o peptídeo (KPP ou acKPPam) ou salina (controle) por 15 minutos. As células foram fixadas com paraformaldeído 4% por 15 minutos. Finalmente, as células foram analisadas por microscopia confocal Zeiss LSM 510 Meta, no comprimento de onda de excitação 495 nm e de emissão 505 nm. O programa Image J foi utilizado para analisar as imagens.

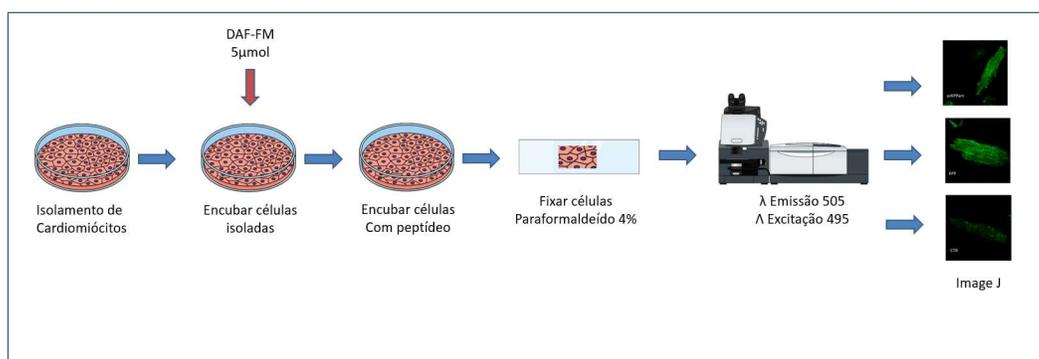


Figura 14. Protocolo de avaliação da produção de NO por cardiomiócitos tratados com o peptídeo utilizando a microscopia confocal. (Figura elaborada utilizando o site <https://mindthegraph.com>).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Reatividade Vascular

O teste de reatividade vascular mostrou que o peptídeo acKPPam induz vasodilatação dose-dependente (figura 15).

Estudos semelhantes usando o peptídeo sintético TsHpT-I_[17-25], que apresenta os 9 resíduos C-terminais da Hipotensina TsHpt-I, mostram que este peptídeo era capaz de induzir uma vasodilatação dose-dependente similar à observada para o peptídeo acKPPam (Verano-Braga *et al.*, 2008).

Estudos mostram que a proteção do N-terminal pode ser benéfica, como o Adrenomedulin (AM), um peptídeo isolado do feocromocitoma humano, que inibe a secreção de aldosterona, estresse oxidativo, apoptose e estimula a angiogênese, levando a proteção da estrutura do coração, mas que possui uma meia vida curta. Após a associação desse peptídeo com o polietilenoglicol (PEG), no N-terminal, o peptídeo resultante exibiu uma estabilidade e meia vida plasmática maior (Kubo *et al.*, 2014).

Peptídeos com baixa massa molecular são absorvidos com maior eficiência na mucosa gastrointestinal, reforçando a importância da minimização da estrutura do TsHpT-I. Ao proteger o N- e o C-terminal, é possível dificultar a sua depuração renal e degradação enzimática, (Kubo *et al.*, 2014) podendo em tese, aumentar a meia vida do acKPPam.

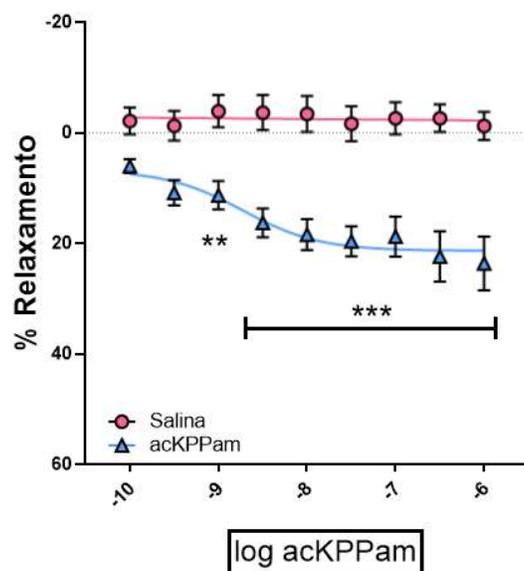


Figura 15. Efeito hipotensor dose-dependente do acKPPam. No teste de reatividade vascular, o o peptídeo foi adicionado nas concentrações de 10^{-10} a 10^{-6} mol.L⁻¹, sendo a solução salina usada como controle (controle n = 8 ; acKPPam n = 12). A análise estatística dos dados foi realizada no programa Prisma v.7. One-way ANOVA seguido de Bonferroni; **p<0,01; ***p<0,001.

Foi possível também comprovar que o efeito vasodilatador do peptídeo é endotélio dependente, uma vez que a retirada mecânica do endotélio causou a perda do efeito vasodilatador (figura 16).

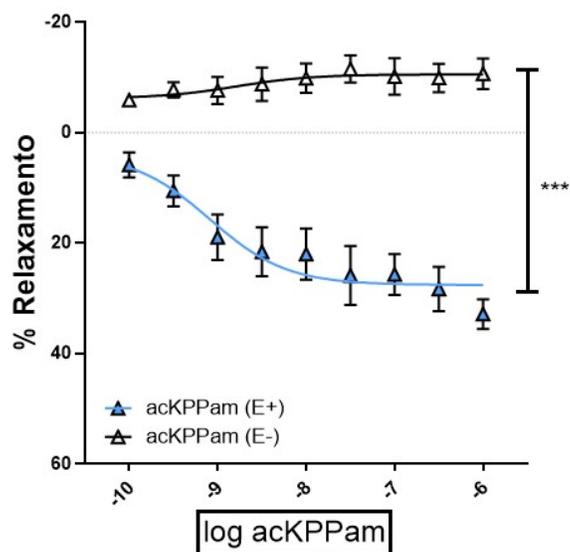


Figura 16 – Efeito vasodilatador endotélio dependente do peptídeo acKPPam. No teste de reatividade vascular, foi adicionado o peptídeo nas concentrações de 10^{-10} a 10^{-6} mol.L⁻¹, sendo o endotélio preservado usado como controle (controle n = 3 ; sem endotélio n = 5). A análise estatística dos dados foi realizada no programa Prisma v.7. One-way ANOVA seguido de Bonferroni; ***p<0,001.

Visando verificar o potencial efeito deletério da inserção de modificações químicas na atividade vasodilatadora de um peptídeo tão pequeno, resolvemos comparar os dados obtidos por Verano-Braga e colaboradores (2010), referentes ao peptídeo KPP, com os obtidos neste projeto. Como podemos perceber na figura 17, o peptídeo modificado acKPPam apresentou o maior efeito vasodilatador. Contudo, vale ressaltar que tais experimentos foram executados por pessoas diferentes e em momentos distintos. Desta forma, temos a perspectiva de realizar tais experimentos novamente, utilizando as mesmas condições, visando avaliar qual peptídeo apresenta o maior efeito vasodilatador.

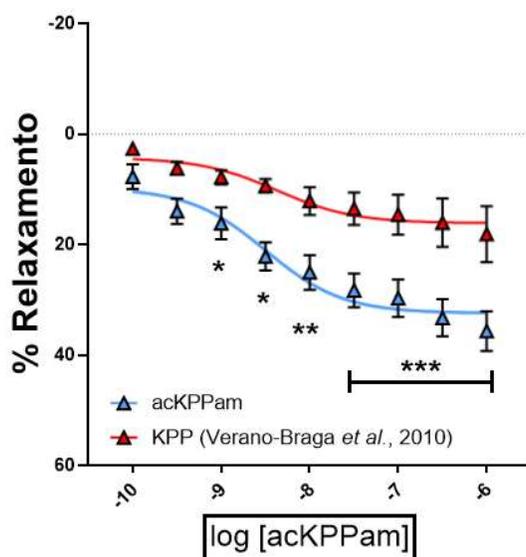


Figura 17 – Comparação do efeito vasodilatador induzido pelos peptídeos acKPPam (n = 18) e KPP (n = 11). Os resultados do peptídeo KPP foram obtidos no artigo publicado por Verano-Braga *et al.* 2010. A análise estatística dos dados foi realizada no programa Prisma v.7. One-way ANOVA seguido de Bonferroni; *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

Para avaliar o papel do óxido nítrico (NO) no efeito vasodilatador induzido pelo peptídeo acKPPam, o teste de reatividade vascular foi realizado também pré-incubando as preparações com L-NAME, um inibidor da NOS, 10 minutos antes de adicionar o peptídeo. Foi verificado que a vasodilatação induzida por acKPPam é dependente da produção de NO (figura 18). Resultados similares também foram verificados para o peptídeo KPP (Verano-Braga *et al.*, 2010).

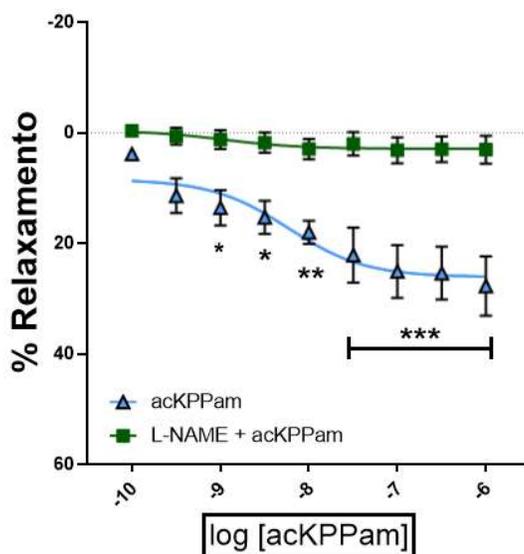


Figura 18 – Avaliação do óxido nítrico no efeito vasodilatador induzido pelo acKPPam. (acKPPam, n = 5 ; acKPPam + N L-NAME n = 15). A análise estatística dos dados foi realizada no programa Prisma v.7. One-way ANOVA seguido de Bonferroni; *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

Como o já mencionado, o KPP é um agonista do receptor B2 da BK (Verano-Braga *et al.*, 2010). Neste mesmo trabalho, os autores demonstraram que a carga positiva localizada na cadeia lateral do resíduo de lisina é crucial para tal atividade agonista (Verano-Braga *et al.*, 2010). No peptídeo acKPPam, foi neutralizada a carga positiva localizada na sua porção N-terminal. Desta forma, nos perguntamos, será que o peptídeo acKPPam também é um agonista do B2 ou tal efeito foi perdido após a sua alteração química? Conforme demonstrado na figura 19, o efeito vasodilatador do peptídeo acKPPam foi inibido pelo HOE 140, um antagonista seletivo do receptor B2. Desta forma, assim como o KPP, o acKPPam também é dependente da ativação do receptor B2 para induzir a vasodilatação.

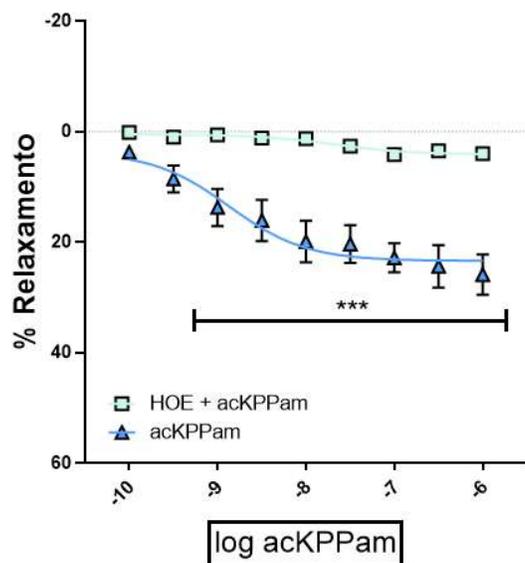


Figura 19 – O efeito vasodilatador do peptídeo acKPPam é dependente da ativação do receptor B2. (acKPPam, n = 6; acKPPam + HOE 140, n = 11). A análise estatística dos dados foi realizada no programa Prisma v.7. One-way ANOVA seguido de Bonferroni; ***p<0,001.

Para verificar se o peptídeo acKPPam era um agonista seletivo apenas para o receptor B2, foram realizados testes com o antagonista seletivo do receptor B1 (KRPPGFSP). Conforme apresentado na figura 20, percebemos que o efeito vasodilatador induzido pelo peptídeo acKPPam foi inibido parcialmente pelo antagonista de B1.

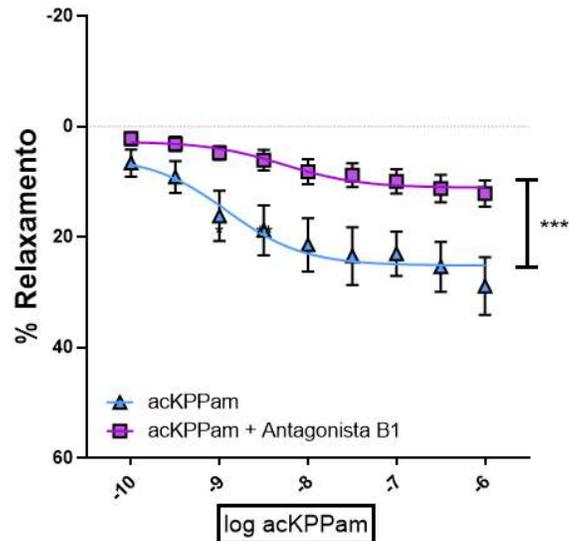


Figura 20 – O efeito vasodilatador do peptídeo acKPPam é parcialmente dependente da ativação do receptor B1. (acKPPam, n = 6; acKPPam + antagonista seletivo de B1, n = 14). A análise estatística dos dados foi realizada no programa Prisma v.7. One-way ANOVA seguido de Bonferroni; ***p<0,001.

Após verificarmos que o peptídeo apresentava um bloqueio parcial, quando utilizamos o antagonista de B1, resolvemos usar os dois antagonistas ao mesmo tempo (antagonistas seletivos de B1 e B2). Conforme demonstrado na figura 21, foi observado um bloqueio parcial da vasodilatação induzida pelo peptídeo. Desta forma, concluímos que, em altas concentrações, o peptídeo acKPPam induz vasodilatação através de um alvo ainda não identificado.

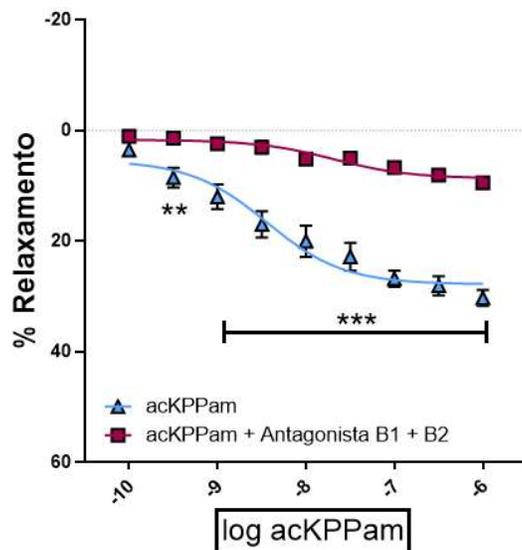


Figura 21 – O efeito vasodilatador do peptídeo acKPPam é parcialmente abolido pelo antagonismo dos receptores B1 e B2 (acKPPam, n = 6; acKPPam + antagonistas seletivos de B1 e B2, n = 9). A análise estatística dos dados foi realizada no programa Prisma v.7. One-way ANOVA seguido de Bonferroni; **p<0,01; ***p<0,001.

5.2 Atividade Anti-Hipertensiva

O potencial efeito anti-hipertensivo do peptídeo acKPPam foi avaliado após a sua administração i.v. em animais hipertensos (SHR). A frequência cardíaca (FC) e a pressão arterial média (PAM) dos animais foram monitoradas (figuras 22 e 23, respectivamente). Em um primeiro momento, observamos uma queda acentuada da PAM após a administração do peptídeo. Contudo, ocorreu uma queda da PAM também nos animais controles, tratados com salina, este resultado não é conclusivo, e deverá ser repetido antes de concluirmos que este peptídeo é anti-hipertensivo, assim como o peptídeo nativo TsHpt-I (Verano-Braga *et al.*, 2008).

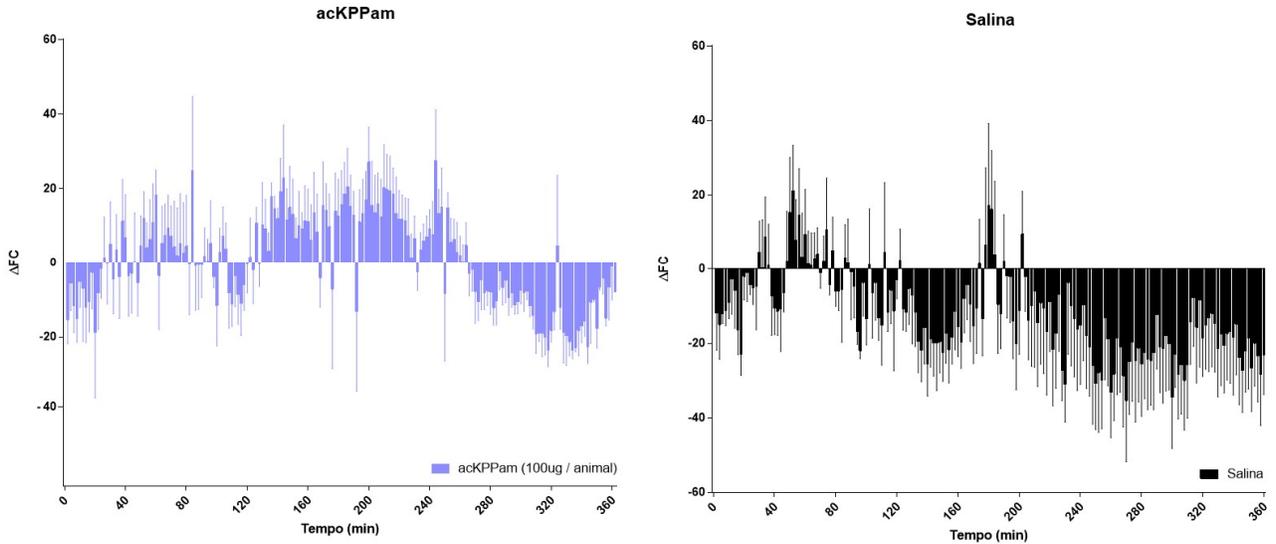


Figura 22 – Frequência cardíaca monitorada nos animais SHR. A frequência cardíaca dos animais foi monitorada por 1 hora (estabilização) antes da administração i.v de salina ou do peptídeo. Após a administração, a FC foi monitorada por 6 horas (controle n = 7; acKPPam n = 7). Os dados expressos são a diferença entre a FC basal e a FC após a administração do peptídeo ou da salina.

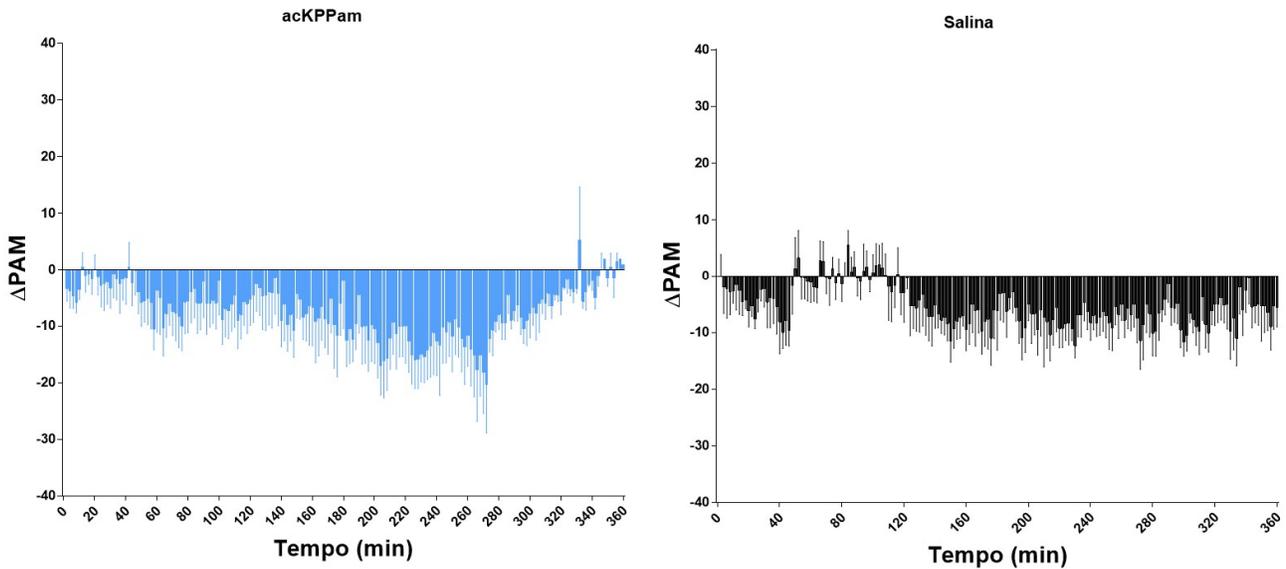


Figura 23 – Pressão arterial média monitorada nos animais SHR. A pressão arterial média (PAM) dos animais foi monitorada por 1 hora (estabilização) antes da administração i.v de salina ou do peptídeo. Após a administração, a PAM foi monitorada por 6 horas (controle n = 7; acKPPam n = 7). Os dados expressos são a diferença entre a PAM basal e a PAM após a administração do peptídeo ou da salina.

5.3 Microscopia Confocal

Verano-Braga et al. (2010) demonstraram que o peptídeo KPP era capaz de induzir a produção de NO em cardiomiócitos. Desta forma, decidimos testar se o peptídeo acKPPam também apresentava tal efeito. Como demonstrado nas figuras 24 e 25, assim como o KPP, o peptídeo acKPPam foi capaz de induzir o aumento da produção de NO pelos cardiomiócitos.

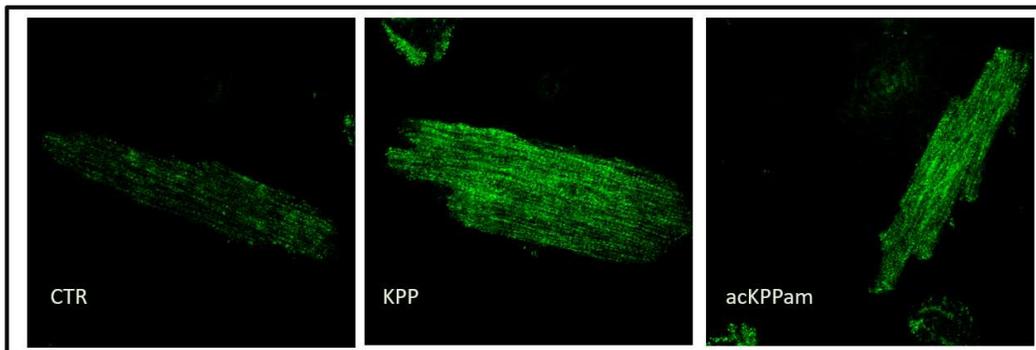


Figura 24 – Imagens representativas de microscopia confocal demonstrando o aumento da produção de NO pela ação dos peptídeos KPP e acKPPam. Foi utilizada a sonda fluorescente DAF-FM para quantificar a produção de NO.

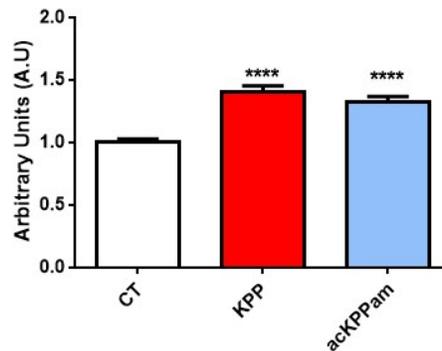


Figura 25 – Quantificação da produção de NO nos cardiomiócitos tratados com KPP, acKPPam ou controle. Teste realizado por Igor Maciel. (controle n = 125; KPP n = 61; acKPPam n = 57).

6. Conclusão

Com os resultados obtidos nos testes de reatividade vascular, foi possível concluir que o peptídeo acKPPam possui um efeito vasodilatador dose-dependente e endotélio dependente. Concluímos, também, que o efeito vasodilatador induzido pelo acKPPam é dependente de óxido nítrico. Além disso, a vasodilatação induzida pelo peptídeo parece, pelo menos parcialmente, ser via ativação dos receptores B1 e B2 da BK.

Ainda não podemos afirmar que o peptídeo acKPPam apresenta uma atividade anti-hipertensiva, pois, apesar de termos observado uma queda da pressão arterial média nos animais SHR, também observamos um efeito similar no nos animais controle tratados com salina. Contudo, acreditamos que estes dados discrepantes tenham sido um problema técnico, e iremos repetir estes experimentos para confirmar, ou não, que o peptídeo acKPPam apresenta um efeito anti-hipertensivo.

Em comparação com o peptídeo KPP, foi observado um vasorelaxamento mais intenso induzido pelo acKPPam. Este dado é muito importante, pois demonstramos que a alteração química do peptídeo não alterou o seu efeito.

A minimização estrutural do peptídeo TsHpT-I, o KPP, é necessária pois peptídeos com baixa massa molecular são absorvidos com maior eficiência pela mucosa gastrointestinal. Peptídeos são susceptíveis a degradação enzimática e depuração renal, diminuindo a meia vida de um possível medicamento. Em algumas moléculas ao acetilar N-terminal, dificulta a depuração renal e degradação enzimática, aumentando a meia vida e possivelmente melhorando a estabilidade no plasma. O acKPPam além de apresentar um resultado animador comparado KPP, em teoria, possui maior estabilidade no plasma.

7. Perspectivas

Como demonstrado nesta dissertação, verificamos que o peptídeo acKPPam mantém os efeitos cardiovasculares observados para o KPP. Contudo, algumas questões permanecem abertas, e que pretendemos responder em breve.

7.1 Verificar a estabilidade do peptídeo por espectrometria de massa.

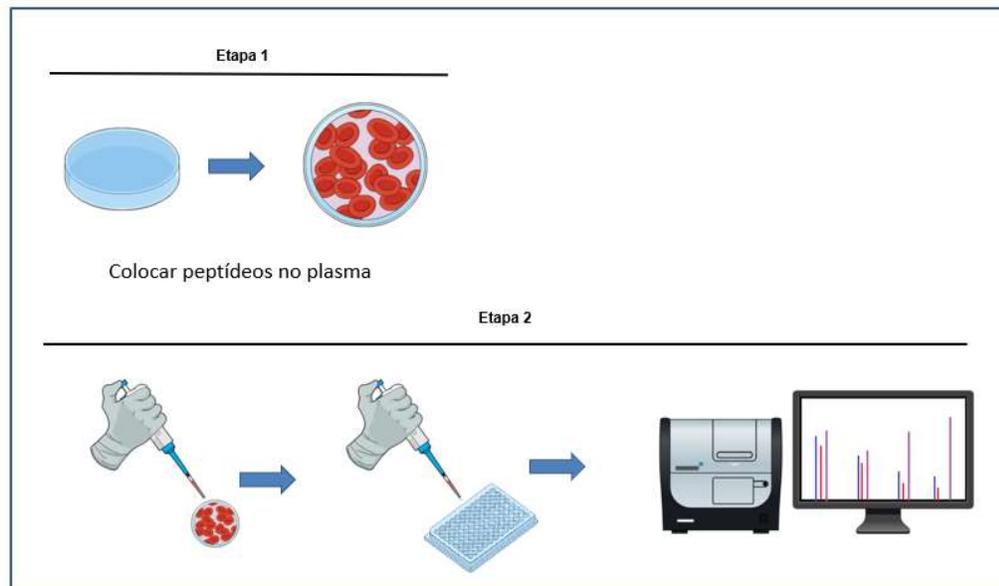


Figura 26 – Avaliar a estabilidade do peptídeo acKPPam no plasma. Etapa 1: Incubar os peptídeos (acKPPam ou KPP) ou salina (controle) no plasma. Etapa 2: Analisar as amostras, em espectrometria de massa, após diferentes tempos de incubação (Figura elaborada utilizando o site <https://mindthegraph.com>).

7.2 Verificar o efeito cardioprotetor do peptídeo acKPPam usando o modelo ex vivo de coração isolado mantido no Sistema de Langendorff

Estudos desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa, e não publicados, indicam que o peptídeo KPP apresenta um efeito cardioprotetor em modelo de isquemia/reperfusão. Desta forma, pretendemos avaliar se o peptídeo acKPPam também apresenta tal efeito. A figura 27 ilustra o protocolo que iremos utilizar.

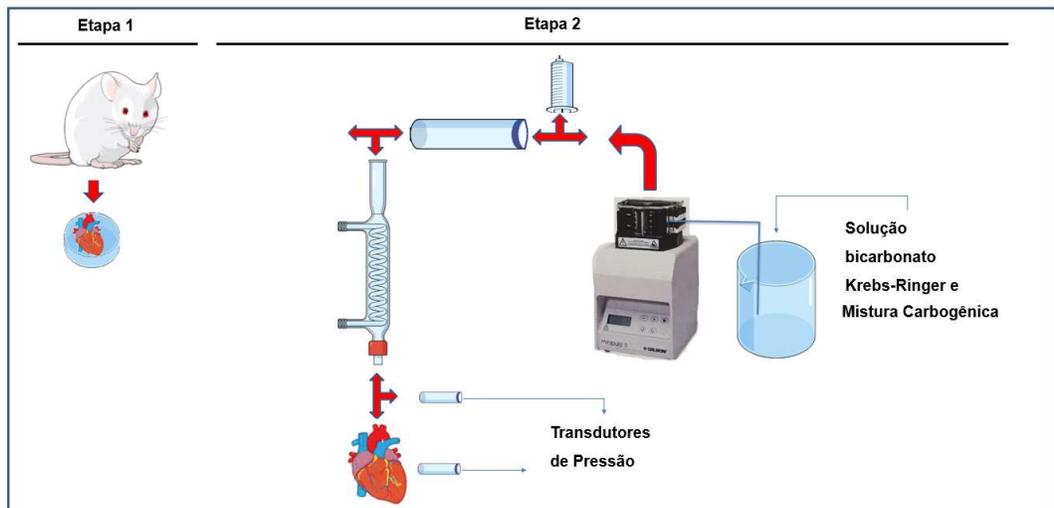


Figura 27 – Sistema Langendorff. Etapa 1: O coração é retirado do animal e colocado em solução de Krebs fria. Etapa 2: O coração é acoplado ao sistema Langendorff e os parâmetros da função cardíaca serão monitorados, após a isquemia e reperfusão, na presença ou não do peptídeo acKPPam (Figura elaborada utilizando o site <https://mindthegraph.com>).

8. REFERÊNCIAS

ARAÚJO, R. L.; GOMEZ, M. V. **Potentiation of bradykinin action on smooth muscle by a scorpion venom extract.** Gen Pharmacol, v. 7, n. 2-3, p. 123-6, Aug 1976. ISSN 0306-3623. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/976731> >.

BRAGA, T. V. **Estudos bioquímicos, farmacológicos e de minimização da estrutura do peptídeo TsHpT-I isolado do veneno do escorpião Tityus serrulatus.** 2005. 68 (Mestrado). Departamento de Bioquímica e Imunologia, Universidade Federal de Minas Gerais

BRALET, J.; SCHWARTZ, J. C. **Vasopeptidase inhibitors: an emerging class of cardiovascular drugs.** Trends Pharmacol Sci, v. 22, n. 3, p. 106-9, Mar 2001. ISSN 0165-6147. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11239563> >.

CARDIOLOGIA, S. B. D. **7ª DIRETRIZ BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO ARTERIAL** 2016. Disponível em < http://publicacoes.cardiol.br/2014/diretrizes/2016/05_HIPERTENSAO_ARTERIAL.pdf >

FERREIRA, L. A.; ALVES, E. W.; HENRIQUES, O. B. **Peptide T, a novel bradykinin potentiator isolated from Tityus serrulatus scorpion venom.** Toxicon, v. 31, n. 8, p. 941-7, Aug 1993. ISSN 0041-0101. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8212046> >.

GIRONACCI, M. M. Cerniello FM1, Longo Carbajosa NA1, Goldstein J2, Cerrato BD1. **Protective axis of the renin-angiotensin system in the brain.** Clin Sci (Lond), v. 127, n. 5, p. 295-306, Sep 2014. ISSN 1470-8736. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24827941> >.

GUTTE, B. **Peptides: Synthesis, Structure, and Applications.** 1. Academic Press: 1995. 1-501.

KUBO, K. Tokashiki M1, Kuwasako K2, Tamura M3, Tsuda S3, Kubo S3, Yoshizawa-Kumagaye K3, Kato J4, Kitamura K1. **Biological properties of adrenomedullin conjugated with polyethylene glycol.** Peptides, v. 57, p. 118-21, Jul 2014. ISSN 1873-5169. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24874704> >.

Bhoola KD; Figueroa CD; Worthy K. Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. Pharmacol Rev 1992; 44: 1-80.

LEWINGTON, S. Clarke R, Qizilbash N, Peto R, Collins R; Prospective Studies Collaboration. **Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies.** Lancet, v. 360, n. 9349, p. 1903-13, Dec 2002. ISSN 0140-6736. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12493255> >.

MORAIS, K. L. Ianzer D, Miranda JR, Melo RL, Guerreiro JR, Santos RA, Ulrich H, Lameu C. **Proline rich-oligopeptides: diverse mechanisms for antihypertensive**

action. Peptides, v. 48, p. 124-33, Oct 2013. ISSN 1873-5169. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23933300> >.

OMS, W. H. O. **Cardiovascular disease World Heart Day 2017** . Disponível em < https://www.who.int/cardiovascular_diseases/world-heart-day-2017/en/>

PASSOS-SILVA, D. G.; VERANO-BRAGA, T.; SANTOS, R. A. **Angiotensin-(1-7): beyond the cardio-renal actions.** Clin Sci (Lond), v. 124, n. 7, p. 443-56, Apr 2013. ISSN 1470-8736. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23249272> >.

PESQUERO, J. B.; BADER, M. **Genetically altered animal models in the kallikrein-kinin system.** Biol Chem, v. 387, n. 2, p. 119-26, Feb 2006. ISSN 1431-6730. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16497143> >.

PICKERING, G. Hypertension. **Definitions, natural histories and consequences.** Am J Med, v. 52, n. 5, p. 570-83, May 1972. ISSN 0002-9343. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4554876> >.

PIMENTA, A. M.; Stöcklin R.; Favreau P.; Bougis PE, Martin-Eauclaire MF. . **Moving pieces in a proteomic puzzle: mass fingerprinting of toxic fractions from the venom of Tityus serrulatus (Scorpiones, Buthidae).** Rapid Commun Mass Spectrom, v. 15, n. 17, p. 1562-72, 2001. ISSN 0951-4198. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11713783> >.

RESENDE, G. S. S. **Avaliação dos efeitos cardiovasculares da Angiotensina-(1-9)** 2014. Disponível em < http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/bitstream/handle/1843/BUOS-9QRJU4/diserta_o_a_ser_divulgada.pdf?sequence=1>

ROSÁRIO, T. M.; Scala L.C.; França GV, Pereira MR, Jardim PC. **Prevalence, control and treatment of arterial hypertension in Nobres - MT.** Arq Bras Cardiol, v. 93, n. 6, p. 622-8, 672-8, Dec 2009. ISSN 1678-4170. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20379643> >.

SANTOS, R. A.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J.; ANDRADE, S. P. **Angiotensin-(1-7): an update.** Regul Pept, v. 91, n. 1-3, p. 45-62, Jul 2000. ISSN 0167-0115. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10967201> >.

SANTOS, R. A.; Ferreira AJ; Verano-Braga T; Bader M. **Angiotensin-converting enzyme 2, angiotensin-(1-7) and Mas: new players of the renin-angiotensin system.** J Endocrinol, v. 216, n. 2, p. R1-R17, Feb 2013. ISSN 1479-6805. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23092879> >.

SHEPPARD, J. P.; MCMANUS, R. J.; MARTIN, U. **Diagnosis and management of resistant hypertension.** Education in Heart, v. 103, p. 1295–1302, 2017. Disponível em: < <https://heart.bmj.com/content/heartjnl/103/16/1295.full.pdf> >.

SILVA, A. F.; SANTOS. **Cardiovascular disease World Heart Day 2017.** World Health Organization, 2017. Disponível em < <https://www.who.int/health-topics/cardiovascular-diseases/>>

SILVA, A. F.; SANTOS J. B.D; CARDOSO I. B.; FERREIRA R. C **PERFIL CLÍNICO E BIOQUÍMICO DOS HIPERTENSOS DE MACEIÓ (AL)**. Revista Eletrônica de Farmácia, v. vol. 4, 2018. Disponível em: < <http://www.seer.ufal.br/index.php/gepnews/article/view/4694/3299> >.

VERANO-BRAGA, T. **Minimização da estrutura primária do peptídeo TsHpt-I: identificação dos resíduos de aminoácidos cruciais e da estrutura peptídica mínima para a manutenção de seus efeitos antihipertensivos**. 2009. 137 (Doutorado). Laboratório de Venenos e Toxinas Animais - LVTA, Universidade Federal de Minas Gerais

VERANO-BRAGA, Figueiredo-Rezende F, Melo MN, Lautner RQ, Gomes ER, Mata-Machado LT, Murari A, Rocha-Resende C, Elena de Lima M, Guatimosim S, Santos RA, Pimenta AM. **Structure-function studies of Tityus serrulatus Hypotensin-I (TsHpt-I): A new agonist of B(2) kinin receptor**. Toxicon, v. 56, n. 7, p. 1162-71, Dec 2010. ISSN 1879-3150. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20417225> >.

Jung DW1, Brierley GP. **Tityus serrulatus Hypotensins: a new family of peptides from scorpion venom**. Biochem Biophys Res Commun, v. 371, n. 3, p. 515-20, Jul 2008. ISSN 1090-2104. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18445483> >.