

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA E BIOFÍSICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
FISILOGIA E FARMACOLOGIA

Igor Maciel Souza Silva

**CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE FRAGMENTOS
N-TERMINAIS DA BRADICININA**

Belo Horizonte

2020

Igor Maciel Souza Silva

CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE FRAGMENTOS N-TERMINAIS DA BRADICININA

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

Orientador: Prof. Dr. Thiago Verano Braga

Área de concentração: Fisiologia

Belo Horizonte

2020

043 Silva, Igor Maciel Souza.
Caracterização da atividade biológica de fragmentos N-terminais da bradicinina
[manuscrito] / Igor Maciel Souza Silva. - 2020.
97 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Thiago Verano Braga.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia.

1. Fisiologia. 2. Sistema Caliceína-Cinina. 3. Bradicininina. I. Braga, Thiago
Verano. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências
Biológicas. III. Título.

CDU: 612

ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Nº 523 DE IGOR MACIEL SOUZA SILVA

Às 09:00 horas do dia 26 do mês de março de 2020, no DE FORMA VIRTUAL, realizou-se a sessão pública para a defesa da Dissertação de **Igor Maciel Souza Silva**. A presidência da sessão coube ao **Prof. Dr. Thiago Verano Braga**, orientador. Inicialmente, o presidente fez a apresentação da Comissão Examinadora assim constituída: **Profa. Dra. Maria José Campagnole dos Santos**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, **Prof. Dr. Stéfany Bruno de Assis Cau**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, e **Prof. Dr. Thiago Verano Braga**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, orientador. Em seguida, o candidato fez a apresentação do trabalho que constitui sua **Dissertação de Mestrado**, intitulada: "**CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE FRAGMENTOS N-TERMINAIS DA BRADICININA**". Seguiu-se a arguição pelos examinadores e logo após, a Comissão reuniu-se, sem a presença do candidato e do público e decidiu considerar **APROVADA** a Dissertação de Mestrado. O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ata que, depois de lida, se aprovada, será assinada pela Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 26 de março de 2020.

Assinatura dos membros da banca examinadora:

* De acordo com as Normas Gerais de Pós-Graduação da UFMG o grau de Mestre só será concedido ao aluno que entregar ao Colegiado do Curso, no prazo máximo de 60 dias, a versão final da dissertação, em conformidade com as indicações da Comissão Examinadora. Após a entrega da versão final com a documentação exigida para emissão de diploma, a secretaria emitirá certificado de conclusão do mestrado.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente e acima de tudo minha mãe, minha irmã e meu pai pelo amor e apoio incondicional que me permitiu chegar até aqui.

À irmã Sheila, minha segunda mãe, pelos aconselhamentos e proteção.

Aos meus amigos Bruna, Lucas, Thaysa, Sávio, Vinícius T., Vinícius e Felipe por deixarem a vida mais leve.

Aos amigos do laboratório de Hipertensão, especialmente a Isabella, Cristiane, Filipe, Ednéia, Lucas, Sthéfanie, Héric e Filipi por toda a ajuda, tanto aquela imprescindível para o desenvolvimento deste trabalho, bem como naquela responsável por tornar o laboratório um lugar mais feliz.

Aos amigos do departamento de Fisiologia e Biofísica, Iara, Caio e Bruna pela grande amizade e por estarem ao meu lado em tantos momentos.

À professora Silvia Guatimosim e seus alunos Anderson, Sérgio e Vanessa pela colaboração, cujo sem a qual realização deste trabalho seria impossível.

Ao professor Jarbas Magalhães e sua aluna Lídia Barbosa pela ajuda na síntese de alguns peptídeos utilizados neste trabalho.

Ao professor Gustavo Barbosa e sua aluna Maísa Antunes pela colaboração que resultou na aquisição de algumas imagens de microscopia confocal.

Ao professor Flávio Amaral e sua aluna Vívian Louise pelos conselhos que resultaram na colaboração nos experimentos de inflamação.

Ao apoio técnico primoroso da Adriana e Jamil.

Ao meu orientador, professor Thiago Verano pela confiança depositada.

Às agências de fomento e pesquisa, CAPES, CNPq e FAPEMIG.

RESUMO

O Sistema Calicreína-Cinina (SCC) é um sistema humoral peptídico complexo, apresentando ações em diversos sistemas, contudo as ações cardiovasculares e inflamatórias são as mais estudadas. A bradicinina [BK-(1-9)] e seu metabólito des-Arg⁹-bradicinina [BK-(1-8)] são os hormônios efetores desse sistema e ligantes endógenos dos receptores de bradicinina do tipo 2 (B2) e do tipo 1 (B1), respectivamente. Desde o final da década de 1970, os metabólitos da BK-(1-9) são tidos como inativos. Desta forma, o objetivo principal deste manuscrito foi avaliar a atividade biológica dos seguintes fragmentos N-terminais da BK-(1-9): a BK-(1-7), BK-(1-5) e BK-(1-3). A atividade destes peptídeos foi avaliada, primeiramente, em modelo *in vitro* por intermédio da quantificação da produção de óxido nítrico (NO). A BK-(1-9), BK-(1-7), BK-(1-5) e BK-(1-3) foram capazes de induzir a produção de NO nos três tipos celulares testados de maneira independente da ativação dos receptores de cininas. Como este radical livre é um dos principais mediadores da vasodilatação, a hipótese de que os metabólitos da BK-(1-9) estudados poderiam promover a vasodilatação não pode ser descartada. Foi observado que a BK-(1-7), BK-(1-5) e BK-(1-3) foram capazes de promover a vasodilatação de anéis aórticos pré-contraídos por fenilefrina, enquanto a BK-(1-9) promoveu vasodilatação em baixas concentrações e vasoconstrições em altas concentrações. Os efeitos vasculares da BK-(1-9) e de seus metabólitos possuem mecanismos diferentes entre si, contudo a BK-(1-7), BK-(1-5) e BK-(1-3) atuam de maneira independente da ativação dos receptores de cinina. O efeito vasodilatador quando observado sob a óptica *in vivo* geralmente é codificado em hipotensão. A BK-(1-9) promoveu uma hipotensão transiente de ratos não anestesiados de maneira dose-dependente. Surpreendentemente, os metabólitos da BK-(1-9) também promoveram a hipotensão transiente, porém esse efeito não foi dose-dependente nas doses testadas. A atividade biológica da BK-(1-7), BK-(1-5) e BK-(1-3) também foi avaliada em dois importantes parâmetros inflamatórios, a permeabilidade vascular e hipernocicepção. A BK-(1-9) promoveu aumento da permeabilidade vascular no coxim plantar de camundongos, o que não observado com a BK-(1-7), BK-(1-5) e BK-(1-3). Além disto, a BK-(1-9) e seus metabólitos foram capazes de induzir estímulos nociceptivos no coxim plantar de camundongos adultos, porém o efeito dos metabólitos foi cerca de 50% menor do que o observado para a BK-(1-9). Coletivamente, esses dados

apontam que os metabólitos BK-(1-7), BK-(1-5) e BK-(1-3) apresentam atividade biológica *in vitro* nas três espécies mais utilizadas em estudos farmacológicos, além de possuir atividade biológica *in vivo* em modelos cardiovasculares e inflamatórios por vias independentes da ativação dos receptores de BK-(1-9). Contudo, estudos futuros serão necessários para elucidar o(s) alvo(s) molecular(es) e o mecanismo de ação dessas moléculas.

ABSTRACT

The Kallikrein-Kinin System (KKS) is a complex peptide-based hormonal system acting on various tissues throughout the body, but its most relevant actions are on cardiovascular system and inflammation. Bradykinin [BK-(1-9)] and its biologically active metabolite des-Arg⁹-bradykinin [BK-(1-8)] are the known effectors of KKS and endogenous ligands of bradykinin receptors type 2 (B2) and type 1 (B1), respectively. Since the late 1970's, all other metabolites of BK-(1-9) have been considered inactive. Thus, the main objective of this work is to evaluate whether some N-terminal fragments of BK-(1-9), namely BK-(1-7), BK-(1-5) and BK-(1-3) are, indeed, devoid of biological activity. *In vitro* NO quantification on DAF-FM diacetate loaded mouse, rat and human cells was employed to assess biological activity of BK-(1-9) metabolites. BK-(1-9), BK-(1-7), BK-(1-5) and BK-(1-3) were able to induce NO production in all cell types tested. The observed effects of BK-(1-7), BK-(1-5) and BK-(1-3) were not affected by kinin receptor antagonists nor by kinin receptor knockout mice. NO is one of the main mediators in vasodilation. Thus, it was very reasonable to presume that BK-(1-9) metabolites could also induce vasodilation. By vascular reactivity assays of rat thoracic aorta rings, it was observed that BK-(1-7), BK-(1-5) and BK-(1-3) were able to produce a dose-dependent vasodilation in rings pre-contracted by phenylephrine, while BK-(1-9) induced vasodilation in low concentrations and vasoconstriction in high concentrations. The mechanism by which vascular responses were mediated by BK-(1-9) and its metabolites are slightly different among them, but it was observed that these responses were not mediated by kinin receptors. Vasodilation is often translated *in vivo* in hypotension; thus, blood pressure of non-anesthetized rats was measured after administration of BK-(1-9) and its metabolites to assess whether these peptides could reduce blood pressure. BK-(1-9) induced a transient dose-dependent hypotension while, and surprisingly, BK-(1-7), BK-(1-5) and BK-(1-3) were also able to promote transient hypotension, however, the observed effect was not dose-dependent. Biological activity of BK-(1-9) was also assessed by two important inflammatory components: vascular permeability and hypernociception. When administered in the footpad of mice, BK-(1-9) provoked an increase vascular permeability, while its metabolites did not induce this effect. Pain stimulus was observed in footpad of mice injected with BK-(1-9), BK-(1-7), BK-(1-5) or BK-(1-3), but the response of BK-(1-9) was almost 100% higher than of its

metabolites. Taken together, these data indicate that BK-(1-7), BK-(1-5) and BK-(1-3) are biologically active *in vitro* in the most relevant species employed in pharmacological studies, by which were independent from kinin receptor activation. These peptides were also shown to have biological activity *in vivo* using cardiovascular and inflammatory models. Further studies are necessary to uncover the molecular target(s) and the mechanism of action of BK-(1-9) metabolites.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 – Metabolismo da BK-(1-9)..... | 20 |
| Figura 2 – O sistema calicreína-cinina | 22 |
| Figura 3 – Panorama geral do número de publicações do SCC e SRAA | 29 |
| Figura 4 – Quantificação de NO em cardiomiócitos estimulados por BK-(1-9) e análogos..... | 30 |
| Figura 5 – Cromatograma do processo de purificação da BK-(1-9) | 52 |
| Figura 6 – Espectro de massa e espectro de massa em tandem do pico majoritário da purificação da BK-(1-9)..... | 53 |
| Figura 7 - Cromatograma do processo de purificação da BK-(1-5) | 54 |
| Figura 8 - Espectro de massa e espectro de massa em tandem do pico majoritário da purificação da BK-(1-5)..... | 55 |
| Figura 9 - Cromatograma do processo de purificação da Lys-(des-Arg9, Leu8)-BK | 57 |
| Figura 10 - Espectro de massa e espectro de massa em tandem do pico majoritário da purificação da Lys-(des-Arg9, Leu8)-BK..... | 58 |
| Figura 11 – Produção de NO mediada pela BK-(1-9) e seus metabólitos em células humanas, de rato e camundongos | 60 |
| Figura 12 – Expressão de mRNA dos receptores de BK-(1-9) em células de humano, rato e camundongo | 61 |
| Figura 13 – Antagonistas seletivos dos receptores de bradicinina e a produção de NO por metabólitos da BK em cardiomiócitos de ratos neonatos | 63 |
| Figura 14 – Antagonistas seletivos dos receptores de bradicinina e a produção de NO por metabólitos da BK em U 87-MG | 64 |
| Figura 15 – A produção de NO mediada pela BK-(1-9) e seus metabólitos em cardiomiócitos de camundongos knockout | 66 |
| Figura 16 – Curva de tensão passiva por tensão desenvolvida após incubação com KCl 6×10^{-2} mol.L ⁻¹ | 68 |
| Figura 17 – Curva concentração-resposta de fenilefrina..... | 68 |

| | |
|---|-----------|
| Figura 18 – Vasomotricidade da BK-(1-9) e de seus metabólitos | 69 |
| Figura 19 – Avaliação da dependência endotelial para os efeitos da BK-(1-9) e de seus metabólitos | 70 |
| Figura 20 – Avaliação da dependência de NO para o efeito vasodilatador da BK-(1-9) e de seus metabólitos | 71 |
| Figura 21 – Dependência de prostanóides para os efeitos da BK-(1-9) e seus metabólitos | 72 |
| Figura 22 – Bloqueio seletivo dos receptores de bradicinina no efeito da BK-(1-9) | 73 |
| Figura 23 – Bloqueio seletivo dos receptores de bradicinina no efeito da BK-(1-7) | 74 |
| Figura 24 – Bloqueio seletivo dos receptores de bradicinina no efeito da BK-(1-5) | 74 |
| Figura 25 – Bloqueio seletivo dos receptores de bradicinina no efeito da BK-(1-3) | 75 |
| Figura 26 – Expressão gênica dos receptores de BK-(1-9) em aorta torácica de ratos | 76 |
| Figura 27 – Hipotensão induzida pela BK-(1-9) e seus metabólitos | 77 |
| Figura 28 – Indução de hipernocicepção pela BK-(1-9) e seus metabólitos | 78 |
| Figura 29 – Análise de extravasamento de azul de Evans mediado pela BK-(1-9) e seus metabólitos | 79 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 – Massa dos aminoácidos e grupos protetores utilizados..... | 33 |
| Tabela 2 – Sequência de primers utilizados para qPCR | 49 |
| Tabela 3 – Síntese da BK-(1-9) | 51 |
| Tabela 4 – Síntese da BK-(1-5) | 53 |
| Tabela 5 – Síntese da Lys-(des-Arg9, Leu8)-BK | 56 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|------------------|---|
| Akt | Proteína Cinase B |
| AMPC | Monofosfato de Adenosina Cíclico |
| Ang (1-5) | Angiotensina (1-5) |
| Ang (1-7) | Angiotensina (1-7) |
| Ang (1-9) | Angiotensina (1-9) |
| Ang I | Angiotensina I |
| Ang II | Angiotensina II |
| Ara-C | Citosina β -D-arabinofuranosídeo |
| B1 | Receptor de Bradicinina do tipo 1 |
| B2 | Receptor de Bradicinina do tipo 2 |
| BK-(1-3) | Bradicinina (1-3) |
| BK-(1-5) | Bradicinina (1-5) |
| BK-(1-7) | Bradicinina (1-7) |
| BK-(1-8) | Bradicinina (1-8) |
| BK-(1-9) | Bradicinina |
| C18 | Octadecilsilano |
| cDNA | Fita complementar de Ácido Desoxirribonucleico |
| CO ₂ | Dióxido de Carbono |
| COX | Ciclooxygenases |
| CPM | Carboxipeptidase M |
| CPN | Carboxipeptidase N |
| DAF-FM | 4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluoresceína |
| DCM | Diclorometano |
| DIPEA | N,N-diisopropiletilamina |
| DMEM-F12 | <i>Dubelcco's Modified Eagle Medium: Nutrient</i> |
| DMF | Dimetilformamida |
| EC ₅₀ | Concentração Efetiva Mediana |
| ECA | Enzima Conversora de Angiotensina |
| eNOS | Óxido Nítrico Sintase Endotelial |
| ERK 1/2 | Proteína Cinase Regulada por Sinal Extracelular 1 e 2 |
| Fmoc | Fluorenilmetiloxicarbonil |
| GLUT4 | Transportador de Glicose do tipo 4 |

| | |
|-----------|---|
| GMPc | Monofosfato de Guanosina Cíclico |
| HBSS | <i>Hank's Balanced Salt Solution</i> |
| HBTU | (2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronium hexafluorofosfato |
| HOBT | 1-Hidroxibenzotriazol |
| HOE-140 | Icatibante |
| ICAM-1 | Molécula de Adesão Intercelular do tipo 1 |
| IL-8 | Interleucina do tipo 8 |
| iNOS | Óxido Nítrico Sintase Induzível |
| KD (1-10) | Calidina |
| KPP | Tripeptídeo Lys-Pro-Pro |
| L-15 | Meio Leibovitz L-15 |
| L-NAME | N _ω -Nitro-L-Arginina Metil Éster |
| MALDI | Dessorção/Ionização a Laser Assistida por Matriz |
| MrgD | Receptor Acoplado à Proteína G relacionado ao Mas do tipo D |
| NEP | Neprilisina |
| nNOS | Óxido Nítrico Sintase Neuronal |
| NO | Óxido Nítrico |
| PDBu | Forbol 12,13-dibutirato |
| PKG | Proteína Cinase G |
| qPCR | Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa |
| MRNA | Fita de Ácido Ribonucleico Mensageiro |
| SCC | Sistema Calicreína-Cinina |
| SERCA | Ca ²⁺ -ATPase do Retículo Sarco/Endoplasmático |
| SRAA | Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona |
| TFA | Ácido Trifluoroacético |
| TIS | Triisopropilsilano |
| TNF-α | Fator de Necrose Tumoral α |
| TOF | Tempo de Voo |

LISTA DE SÍMBOLOS

| | |
|------------------|----------------------------|
| % | Porcentagem |
| °C | Grau Celsius |
| µL | Microlitro |
| µm | Micrômetro |
| Å | Ångström |
| Ca ²⁺ | Cátion Divalente de Cálcio |
| Da | Unidade de Massa Atômica |
| kV | Kilovolts |
| m/z | Relação Massa/Carga |
| mg | Miligrama |
| mL | Mililitros |
| mm | Milímetro |
| mm ³ | Milímetro Quadrado |
| nm | Nanômetro |
| RPM | Rotações Por Minuto |
| U | Unidade |

ÍNDICE

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 18 |
| 1.1 Um Breve histórico do Sistema Calicreína-Cinina | 18 |
| 1.2 Ações cardiovasculares da BK-(1-9) | 22 |
| 1.3 Ações inflamatórias da BK-(1-9) | 25 |
| 1.4 Ações nociceptivas da BK-(1-9) | 27 |
| 2 JUSTIFICATIVA | 29 |
| 3 OBJETIVOS | 31 |
| 3.1 Objetivos específicos | 31 |
| 4 MATERIAIS E MÉTODOS | 32 |
| 4.1 Reagentes | 32 |
| 4.2 Síntese de peptídeos carboxilados em fase sólida pela estratégia Fmoc 32 | |
| 4.2.1 <i>Preparo do cartucho de síntese</i> | 33 |
| 4.2.2 <i>Etapa de desproteção (remoção do grupo Fmoc)</i> | 34 |
| 4.2.3 <i>O teste de Kaiser</i> | 34 |
| 4.2.4 <i>Ativação do Fmoc-aminoácido e alongamento da cadeia peptídica</i> | 35 |
| 4.2.5 <i>Clivagem do peptídeo da peptidil-resina</i> | 36 |
| 4.3 Purificação de produtos da síntese de peptídeos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) | 36 |
| 4.3.1 <i>Padronização do método de purificação</i> | 37 |
| 4.3.2 <i>Escalonamento do método de purificação</i> | 37 |
| 4.4 Caracterização de peptídeos por espectrometria de massa | 39 |
| 4.5 Animais | 39 |
| 4.6 Cultura celular | 40 |
| 4.6.1 <i>Cultura celular de glioblastoma humano</i> | 40 |
| 4.6.2 <i>Isolamento de cardiomiócitos ventriculares de ratos neonatos</i> | 40 |
| 4.6.3 <i>Isolamento de cardiomiócitos ventriculares de camundongos adultos</i> | 41 |
| 4.7 Quantificação da produção de NO por microscopia confocal | 42 |
| 4.8 Reatividade vascular mediada pela BK-(1-9) e seus metabólitos | 43 |
| 4.8.1 <i>Preparação do Krebs-Henseleit e obtenção dos anéis de aorta</i> | 43 |
| 4.8.2 <i>Obtenção do registro de tensão isométrica em anéis de aorta de ratos</i> | 43 |

| | | |
|-------------|--|-----------|
| 4.8.3 | <i>Curva de tensão</i> | 43 |
| 4.8.4 | <i>Curva de fenilefrina</i> | 44 |
| 4.8.5 | <i>Viabilidade muscular e endotelial vascular</i> | 44 |
| 4.8.6 | <i>Vasoatividade da BK-(1-9) e seus metabólitos</i> | 45 |
| 4.8.7 | <i>Intervenções farmacológicas</i> | 45 |
| 4.9 | Registros de pressão arterial | 46 |
| 4.9.1. | <i>Canulação da artéria e veia femoral de ratos</i> | 46 |
| 4.9.2 | <i>Registro da pressão arterial</i> | 46 |
| 4.10 | Avaliação de parâmetros inflamatórios mediados pela BK-(1-9) e seus metabólitos | 47 |
| 4.10.1 | <i>Protocolo de permeabilidade vascular</i> | 47 |
| 4.10.2 | <i>Protocolo de hipernocicepção</i> | 48 |
| 4.11 | Avaliação da expressão dos receptores de bradicinina por reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR) | 49 |
| 4.12 | Análise estatística | 50 |
| 5 | RESULTADOS | 51 |
| 5.1 | Síntese, purificação e caracterização da BK-(1-9), BK-(1-5) e Lys-(des-Arg⁹, Leu⁸)-BK | 51 |
| 5.1.1 | <i>Detalhes da síntese, purificação e caracterização da BK-(1-9)</i> | 51 |
| 5.1.2 | <i>Detalhes da síntese, purificação e caracterização da BK-(1-5)</i> | 53 |
| 5.1.3 | <i>Detalhes da síntese, purificação e caracterização da Lys-(des-Arg⁹, Leu⁸)-BK</i> | 55 |
| 5.2 | Atividade dos metabólitos de BK-(1-9) sob a produção de NO em cultura celular | 58 |
| 5.2.1 | <i>Avaliação da atividade dos metabólitos da BK em células de três espécies diferentes</i> | 58 |
| 5.2.2 | <i>Relevância dos receptores de BK-(1-9) na produção de NO mediada pelos metabólitos da BK-(1-9)</i> | 61 |
| 5.3 | Avaliação dos efeitos vasomotores da BK-(1-9) e de seus metabólitos ...66 | |
| 5.3.1 | <i>Padronização da tensão passiva e concentração de fenilefrina</i> | 67 |
| 5.3.2 | <i>Vasomotricidade induzida pela BK-(1-9) e seus metabólitos</i> | 68 |
| 5.3.3 | <i>Papel dos principais mediadores vasodilatadores na resposta da BK-(1-9) e seus metabólitos</i> | 70 |

| | |
|---|-----------|
| 5.3.4 Relevância dos receptores de BK-(1-9) para os efeitos vasodilatadores mediados pela BK-(1-9) e seus metabólitos | 72 |
| 5.4 Avaliação da potencial atividade hipotensora dos metabólitos da BK-(1-9) | 76 |
| 5.5 Avaliação da potencial atividade inflamatória induzida pela BK-(1-9) e seus metabólitos..... | 77 |
| 6 DISCUSSÃO | 80 |
| 7 CONCLUSÃO | 87 |
| 8 REFERÊNCIAS..... | 88 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 Um Breve histórico do Sistema Calicreína-Cinina

Diversos grupos no começo do século XX constataram que extratos de urina possuíam um efeito hipotensor quando injetado em animais teste. As características deste possível agente hipotensor permaneceram elusivas até que Kraut *et al.*, (1928) estabeleceu que a substância era encontrada tanto na urina quanto na circulação e que os efeitos observados eram perdidos após a diálise ou filtração das amostras, bem como sua acidificação. Alguns anos mais tarde, Werle e colaboradores confirmaram que a substância encontrada na urina e no plasma apresentava atividade enzimática, logo sendo uma proteína, e que agia em um precursor inativo, liberando uma substância ativa capaz de promover contração no íleo de cobaia e hipotensão. À proteína com atividade enzimática, os pesquisadores deram o nome de calicreína (Revisado por BHOOLA *et al.*, 1992)

Em um elegante estudo realizado por Rocha e Silva *et al.* (1949), os autores foram capazes de isolar a substância liberada pelo precursor inativo e subsequentemente procederam com a caracterização biológica e química do composto. Ao tratar plasma de cachorro com pequenas doses da peçonha de *Bothrops jararaca*, foi observado contração de preparações de íleo de cobaia após a adição deste plasma tratado à solução de banho do tecido. Além da atividade contrátil em músculo liso, constatou-se que a substância ainda era capaz de induzir hipotensão quando administrada em pequenas doses e que levava ao choque circulatório quando administrada em altas doses. Devido à atividade proteolítica desse veneno, um teste foi realizado incubando plasma de cachorro com tripsina e a mesma resposta contrátil foi observada no íleo de cobaia. A produção desta substância no plasma após a adição da peçonha ou tripsina era aguda e caso a incubação se estendesse por longos períodos a resposta era perdida. Os autores isolaram uma fração do plasma obtendo um material com características proteicas pelo qual o tratamento com a peçonha ou tripsina produziam respostas contráteis semelhantes em íleo de cobaia. Ao caracterizar quimicamente a substância provinda da substância proteica, os autores inferiram que este composto deveria ter natureza peptídica devido à forte reação com ninidrina, substância que reage com aminas primárias presentes em cadeias peptídicas, e completa inatividade ao aquecer o composto em soluções alcalinas, além de ser formada e destruída pela tripsina. Nesse trabalho, deu-se o

nome de bradicinina (BK-(1-9)) a substância responsável pela indução da contração de íleo de cobaia e bradicininogênio a proteína que originava a BK-(1-9). Concomitantemente a esse estudo, Werle e Berek em 1948 (Revisado por BHOOLA *et al.*, 1992) chegaram a conclusões semelhantes sobre a característica do composto e o nomearam de calidina (KD (1-10)) e sua proteína de origem calidinogênio.

Estudos posteriores com extratos purificados de BK-(1-9) e KD (1-10) mostraram-se desafiadores devido a impossibilidade de se distinguir quimicamente ou farmacologicamente os dois compostos. Desta forma, os autores discutiram que estas duas substâncias deveriam apresentar similaridade química bastante elevada (GADDUM; HORTON, 1959; HOLDSTOCK *et al.*, 1957; MATHIAS e SCHACHTER, 1958). A BK-(1-9) e a KD (1-10) foram sequenciadas no começo da década de 1960, confirmando a teoria supracitada (ELLIOTT *et al.*, 1960; PIERCE e WEBSTER, 1961). As respectivas sequências da BK-(1-9) e da KD (1-10) são: Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg e Lys-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg.

Habal e Movat (1976) discorreram em detalhes sobre o laborioso processo de purificação do cininogênio, pelo qual duas proteoformas foram detectadas no plasma: o cininogênio de alta massa molecular, que preferencialmente leva a produção de BK-(1-9) sob ação da calicreína plasmática e o cininogênio de baixa massa molecular, que preferencialmente leva a produção da KD (1-10) sob ação da calicreína tecidual. Por intermédio de clonagem de cDNA, foi possível descobrir que as proteoformas existentes do cininogênio são derivadas de um único gene, visto que a região 5' é comum aos dois transcritos enquanto a região 3' difere enormemente (KITAMURA *et al.* 1983).

Na década de 1960, esforços também foram concentrados para desvendar o metabolismo da BK-(1-9). Erdös e Sloane (1962) procederam com um estudo laborioso para a identificação das enzimas que promoviam a metabolização da BK-(1-9). Ao incubar frações de plasma humano e BK-(1-9), com subsequente teste desta mistura em modelo de órgão isolado, os autores identificaram uma enzima que abolia o efeito contrátil da BK-(1-9) em útero de rata. O metabolismo da BK-(1-9) nessas condições consistia na produção de um octapeptídeo e arginina. Subsequentemente, este octapeptídeo foi sequenciado e os autores foram capazes de identificar que o metabolismo da BK-(1-9) ocorria na posição C-terminal, dando

origem à BK-(1-8). Os autores nomearam essa enzima capaz de promover a metabolização da BK-(1-9) de carboxipeptidase N, também conhecida como cininase I. Alguns anos depois, Yang e Erdös (1967) identificaram uma segunda enzima capaz de metabolizar a BK-(1-9) enquanto trabalhavam na purificação da carboxipeptidase N. Esta enzima era também capaz de metabolizar a BK-(1-9) na porção C-terminal, mas desta vez dando origem à BK-(1-7). Cininase II foi o nome proposto para esta enzima neste trabalho. Yang *et al.* (1970) descreveram que a cininase II, além de promover a metabolização da BK-(1-9), era capaz de converter a Ang-I à Ang-II. Desta forma, os autores concluíram que a cininase II e a enzima conversora de angiotensina (ECA) eram uma única enzima. Além do metabolismo C-terminal, Ryan *et al.*, (1968) descreveram que a BK-(1-9) poderia ainda ser metabolizada na posição N-terminal, dando origem ao peptídeo inativo BK (3-9).

Apesar de haver várias vias de metabolismo para a BK-(1-9), a ECA e neprilisina (NEP) são consideradas as principais enzimas responsáveis pelo metabolismo do peptídeo. Primeiramente, a BK-(1-9) é convertida em BK-(1-7) e posteriormente à BK-(1-5), sendo esse peptídeo o metabólito mais estável no plasma. A metabolização da BK-(1-9) pela carboxipeptidase N também é uma importante via, como discutido a seguir. (KUOPPALA *et al.*, 2000; MURPHEY *et al.*, 2000). Diversos estudos utilizando matrizes biológicas diferentes foram capazes de identificar a BK-(1-8), BK-(1-7), BK-(1-5) e BK-(1-3) como os principais metabólitos da BK-(1-9) (DENDORFER *et al.*, 2001; KOPYLOV *et al.*, 2016; MARSHALL *et al.*, 2002; SHEIKH e KAPLAN, 1989; ORAWSKI e SIMMONS, 1989).

A **Figura 1** sumariza o conhecimento atual acerca das principais vias de metabolismo da BK-(1-9).

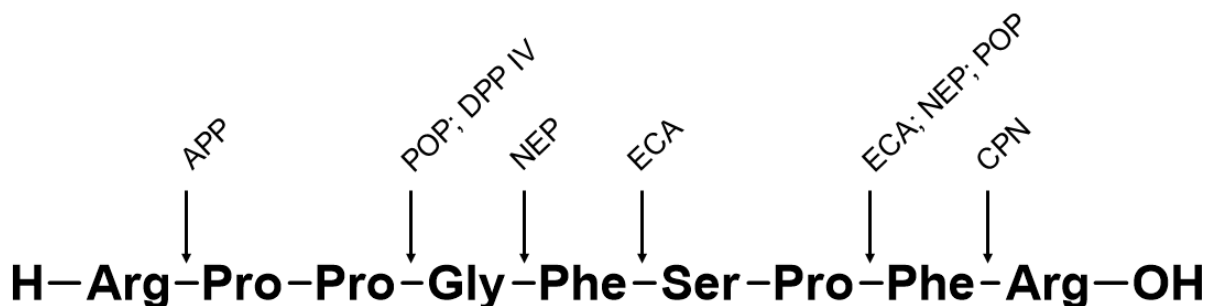


Figura 1 – Metabolismo da BK-(1-9): Enzimas responsáveis pela metabolização da BK-(1-9) e seus respectivos sítios de clivagem. APP – aminopeptidase P; POP – Proliloligopeptidase; DPP IV –

dipeptidilpeptidase IV; NEP – neprilisina; ECA – enzima conversora de angiotensina; CPN – carboxipeptidase. Fonte: Adaptado de Bujak-Gizycka *et al.*, 2011.

Regoli *et al.* (1977) fizeram duas importantes constatações que revolucionaram o sistema calicreína-cinina (SCC). A primeira delas foi a detecção de atividade biológica de um metabólito da BK-(1-9), sendo até então considerados inativos. Em ensaios utilizando aorta de coelho, os pesquisadores foram capazes de mensurar a ação contrátil da BK-(1-9) e de seu metabólito BK-(1-8). Além disto, por elegantes análises farmacológicas os autores propuseram que a BK-(1-9) e a BK-(1-8) agiam por dois receptores distintos. Até a presente data, outros metabólitos da BK-(1-9) ou KD (1-10), por processamento C-terminal ou N-terminal são considerados inativos (YAROVAYA e NESHKOVA, 2015).

De fato, Regoli e colaboradores estavam corretos sobre a existência de dois receptores de BK. McEachern *et al.* (1991) foram capazes de clonar o receptor de bradicinina do tipo 2 (B2) de ratos e ainda procederam com alguns importantes ensaios. Neste trabalho, os pesquisadores concluíram de que se tratava de um receptor acoplado à proteína G devido à similaridade estrutural inerente às proteínas da mesma superfamília. Alguns anos depois, Menke *et al.* (1994) clonaram o receptor de bradicinina do tipo 1 (B1) humano, que também pertence à classe da superfamília de receptores acoplados à proteína G.

Os receptores de BK-(1-9) possuem, molecularmente, diversas similaridades. A primeira delas vem pelo fato de ter sido demonstrado que ambos receptores possuem atividade constitutiva, sendo de maior intensidade para o receptor B1. Contudo esta atividade ainda é de certa forma elusiva para o receptor B1 devido a indisponibilidade de agonistas inversos para estudos probatórios (MARCEAU *et al.*, 2020; MCEACHEM *et al.*, 1991; MENKE *et al.*, 1994). Além disto, ambos receptores acoplam com as proteínas $G\alpha_q$ e $G\alpha_i$ primariamente e possuem vias de sinalização intracelular bastante similares, tendo a produção de NO como mediador chave nestes eventos. Uma importante diferença entre esses receptores concerne sobre o perfil de expressão, pelo qual na maioria dos tecidos é constitutivo para o receptor B2 e induzível para o receptor B1. Além disto, o receptor B1 é pouco passível de sofrer dessensibilização, enquanto o receptor B2 é extensivamente dessensibilizado após sua ativação. Essas divergências podem explicar as diferenças observadas

nos perfis de sinalização de cada receptor e nos efeitos gerados, apesar da similaridade das vias ativadas (LEEB-LUNDBERG et al. 2005).

Um panorama geral com os conhecimentos atuais acerca do SCC está resumido na **Figura 2**.

A BK-(1-9) e KD (1-10) promovem ações fisiológicas e patológicas em diversos sistemas devido à expressão de receptores de BK-(1-9) no endotélio e músculo liso vascular, músculo liso não vascular, cardiomiócito, fibroblasto, leucócitos, epitélio renal, tecido neuronal, dentre outros. (BHOOLA *et al.*, 1992; LEEB-LUNDBERG *et al.*, 2005; MANOLIS *et al.*, 2010). Contudo, é notória a participação da BK-(1-9) nos eventos cardiovasculares, inflamatórios e nociceptivos, dos quais serão brevemente discutidos a seguir.

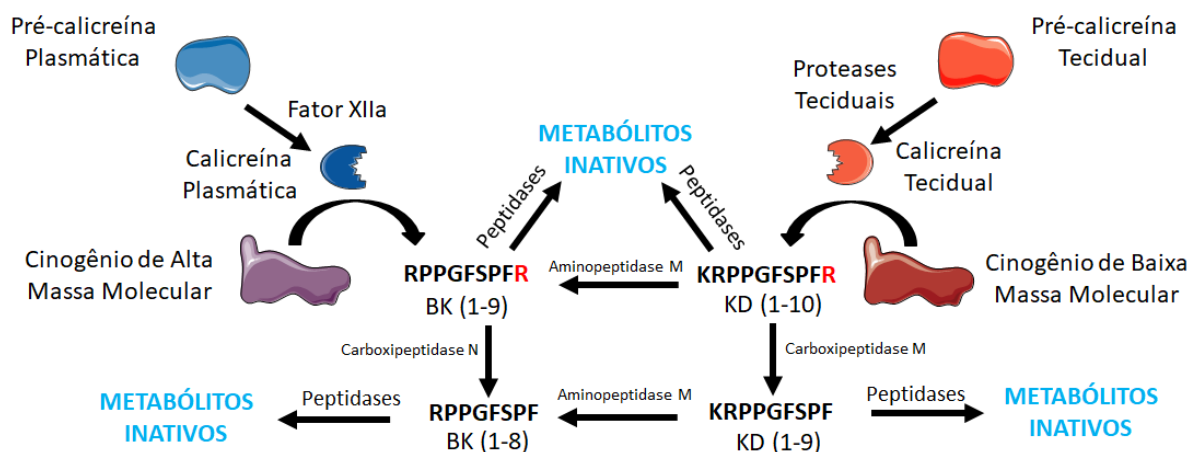


Figura 2 – O sistema caliceína-cinina: Esquema resumindo os conhecimentos atuais sobre os componentes do SCC.

1.2 Ações cardiovasculares da BK-(1-9)

A BK-(1-9) é reconhecida por ser um potente agente vasodilatador. As ações cardiovasculares dessa molécula foram primeiramente descritas por Rocha e Silva *et al.* (1949), sendo extensivamente estudadas desde então. Diversas são as ações cardiovasculares da BK-(1-9), porém os efeitos vasodilatadores e hipotensivos desta molécula são os mais elucidados e serão descritos em detalhes a seguir. Além do efeito vascular, efeitos cardioprotetores da BK-(1-9) foram descritos graças ao uso de inibidores de ECA (MANOLIS *et al.*, 2010).

A BK-(1-9) possui um potente efeito vasodilatador na microcirculação coronariana de cobaias, coelhos, gatos, cachorros e ratos (ANTONIO e ROCHA E SILVA, 1962). Curiosamente, quando experimentos visando avaliar a reatividade da BK-(1-9) em vasos isolados eram realizados, efeitos contráteis eram comumente observados. Altura e Chand (1981) constataram que a BK-(1-9) induzia uma potente vasodilatação em artérias pulmonares e renais, desde que a camada endotelial estivesse íntegra e funcional. Rhaleb *et al.* (1989) descreveu que a BK-(1-9) agia nas células endoteliais por meio da ativação dos receptores B2 induzindo a produção do fator de relaxamento derivado do endotélio, que por sua vez modula células musculares lisas culminando na vasodilatação. O efeito da BK-(1-9) nessas condições foi abolido com azul de metileno, um composto comumente utilizado como inibidor de guanilato ciclase solúvel. Como discutido por Furchgott (1999) alguns anos depois, a identidade do fator de relaxamento derivado do endotélio corresponde ao NO. Esse radical livre, produzido pelas células endoteliais, se difunde para a camada de células musculares lisas e ativa a guanilato ciclase solúvel, enzima responsável pela produção de GMPc. O GMPc, por sua vez, ativa proteína cinase G que desacopla a maquinaria contrátil no músculo liso, promovendo a vasodilatação (MARTÍNEZ-RUIZ *et al.*, 2011).

A BK-(1-9) ainda possui outro mecanismo clássico para induzir a vasodilatação em artérias. Como constatado por Bartha *et al.* (1989), a ativação dos receptores de BK-(1-9) pela BK-(1-9) induz a ativação da fosfolipase C, culminando na produção de inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) e diacilglicerol (DAG). Por aumento da concentração intracelular de Ca²⁺ ou ativação da proteína cinase C, induzida pelo IP₃ e DAG, respectivamente, há ativação da fosfolipase A₂, responsável pela produção de ácido araquidônico. Por uma cascata enzimática, o ácido araquidônico é convertido em um intermediário pela ação das ciclooxygenases, para então ser convertido em prostaciclina pela prostaciclina sintase. A prostaciclina age nos receptores de prostaciclina nas células musculares lisas induzindo o aumento do AMPc, culminando na vasodilatação por ativação da proteína cinase A (NARUMIYA *et al.*, 1999; PARKINGTON *et al.*, 2004). Siltari *et al.* (2016) identificaram em artérias mesentérica e aorta a vasodilatação da BK-(1-9) mediada tanto pela produção de NO e prostanóides.

A vasodilatação dos leitos arteriais induzida pela BK-(1-9) promove a hipotensão em *in vivo*, efeito que vêm sendo observado em diferentes espécies desde a caracterização do peptídeo por Rocha e Silva *et al.* (1949) (CHOLLET *et al.*, 2018; HELLER e MOHRMAN, 1998).

Além dos efeitos na vasculatura, a BK-(1-9) exerce efeitos importantes no coração. Já foi descrito a participação do composto no desempenho cardíaco, visto que a BK-(1-9) induz o aumento da frequência cardíaca, além de aumentar o fluxo coronariano e reduzir a força de contração (MANZINI *et al.* 1989). A BK-(1-9) induz à cardioproteção por mecanismos complexos que não foram, ainda, totalmente elucidados. Como descrito Yang *et al.* (1997) animais *knockout* tanto para o receptor B2 quanto para o cininogênio de alta massa molecular apresentaram áreas infartadas maiores que animais selvagens, indicando a participação do SCC no processo de proteção tecidual. Parte deste efeito protetor observado emerge da ativação direta dos receptores B2 em cardiomiócitos, induzindo a ativação da AKt e, conseqüentemente, aumentando a produção de NO (KRIEG *et al.*, 2004; MANOLIS *et al.*, 2010).

Além do efeito direto sobre os cardiomiócitos ativando vias de sinalização intracelulares protetoras, a BK-(1-9) agindo via receptor B2 induz mudanças endócrinas importantes. A resistência à insulina no tecido cardíaco, como ocorre em diversas condições inclusive relacionadas à ausência/ineficiência da ativação ou sinalização do receptor B2, promove o aumento de citocinas pró-inflamatórias, catecolaminas, hiper-reatividade do sistema renina-angiotensina aldosterona (SRAA), dentre outros, que além de serem fatores de risco para diversas patologias cardíacas *per se*, agravam quadros isquêmicos (RIEHLE e ABEL, 2016). Como demonstrado por Duka *et al.* (2001), animais *knockout* para o receptor B2 apresentam resistência à insulina quando comparados aos animais selvagens, evidenciando o efeito benéfico da BK-(1-9) na manutenção da homeostasia de glicose. Os autores discutiram que o efeito positivo observado pela BK-(1-9) nestas condições se deve ao aumento da atividade e efetividade da sinalização do receptor de insulina, culminando no transporte mais eficiente dos receptores GLUT4 do citosol para a membrana celular. Curiosamente, os efeitos sobre o metabolismo de glicose são independentes da produção de prostanóides e de NO. Desta forma, tanto o aumento a sensibilidade à insulina quanto ativação de vias protetoras no

tecido cardíaco parecem ser mecanismos importantes para a cardioproteção mediada pela BK-(1-9).

1.3 Ações inflamatórias da BK-(1-9)

A inflamação é um processo fisiológico por onde o organismo arquiteta uma complexa resposta frente à um estímulo nocivo, sendo dividida em fase aguda, crônica e resolutive. As respostas observadas na fase aguda da inflamação têm como objetivo transportar células e moléculas efetoras presentes na circulação para o local de lesão. Caso esta resposta seja eficiente, é estabelecida a fase resolutive por onde mediadores são secretados para bloquear o processo inflamatório agudo e para reconstruir o tecido lesado. Caso a resposta não seja eficiente, instala-se a fase crônica da inflamação por onde há uma resposta imune exacerbada e geralmente fora de controle, provocando danos ao tecido afetado (MEDZHITOV, 2008). Conceitos sobre inflamação crônica e a fase resolutive da inflamação fogem do escopo dessa dissertação, sendo dada atenção especial na fase aguda, por quais diversas ações da BK-(1-9) e BK-(1-8) podem ser observadas.

Um dos efeitos mais importantes para o estabelecimento do processo inflamatório e possivelmente um dos mais notórios exercidos pela BK-(1-9) é a indução do aumento da permeabilidade vascular, que facilita o transporte de células e moléculas efetoras do sistema imune da circulação para o tecido inflamado. O endotélio vascular funciona como uma barreira semipermeável e para que esta característica seja funcional, as células são organizadas de uma maneira especial. Esta organização se dá pela existência de junções aderentes, compostas principalmente por caderina do endotélio vascular (caderina-EV), e junções oclusivas, compostas principalmente pela claudina-5. As proteínas das junções oclusivas e aderentes se encontram na membrana celular e são ancoradas a proteínas do citoesqueleto celular e a proteínas citoplasmáticas, por quais podem transmitir estímulos externos à célula bem como receber sinais da célula, caracterizando-as como estruturas bastante dinâmicas (DEJANA *et al.*, 2009). Além da caderina-EV e claudina-5, diversas proteínas coexistem nas junções aderentes e oclusivas para estabilizar o complexo juncional. Um dos mecanismos responsáveis por controlar a permeabilidade vascular é o estado de fosforilação da caderina-EV que quando fosforilada, perde afinidade pela proteína p120, responsável por inibir sua internalização. A internalização da caderina-EV culmina na desestabilização da

junção aderente com consequente aumento da permeabilidade vascular. Elliott *et al.* (1960) observou que em animais submetidos à administração de azul celeste de pontamina, cromóforo semelhante ao azul de Evans, a BK-(1-9) promoveu um intenso aumento da permeabilidade vascular no sítio de injeção, caracterizado pelo aumento da coloração azul neste sítio, sendo que o efeito do peptídeo foi cerca de 15 vezes maior que o observado para a histamina. A BK-(1-9) ao ativar os receptores B2 induz o aumento intracelular da concentração de Ca^{2+} , que indiretamente ativa a cinase Src. Essa cinase fosforila a caderina-EV, induzindo a perda da estabilidade da junção aderente e consequentemente aumentando a permeabilidade vascular. Além de fosforilar a caderina-EV, a BK-(1-9) induz a diminuição da expressão dessa proteína a nível proteico bem como a de claudina-5 a nível transcricional. Vale ressaltar que o efeito da BK-(1-9) sob a permeabilidade vascular é mais observado em vênulas pós-capilares (KEMPE *et al.*, 2019; LEEB-LUNDBERG *et al.*, 2005; ORSENIGO *et al.*, 2012).

Além dos efeitos sobre a permeabilidade vascular, a BK-(1-9) ainda é capaz de induzir outra grande mudança na vasculatura. A BK-(1-9) e KD (1-9) são capazes de induzir o aumento da expressão de ICAM-1 nas células endoteliais, proteína responsável por aumentar a adesão de leucócitos no endotélio vascular. A adesão leucocitária no endotélio vascular é um dos diversos processos responsáveis pelo recrutamento de células efetoras do sistema imune para o sítio de inflamação, a fim de se resolver o processo inflamatório (GUEVARA-LORA *et al.*, 2011).

A BK-(1-9) também age em outro processo do recrutamento de leucócitos para o sítio de inflamação. Durante o processo inflamatório diversos mediadores são produzidos, incluindo a BK-(1-9) que ao ativar os receptores de BK-(1-9) em células estromais ou leucocitárias, como fibroblastos ou músculo liso no contexto da asma, induz a ativação de ERK 1/2 culminando no aumento da expressão e secreção de interleucina-8 (IL-8). Essa citocina é um importante agente quimiotático, recrutando principalmente neutrófilos e eosinófilos para o sítio de inflamação (ROSCIONI *et al.*, 2009).

A BK-(1-9) participa ativamente no estabelecimento da resposta inflamatória aguda após dano tecidual. Como discutido anteriormente, esse peptídeo é capaz de induzir a expressão e secreção de citocinas pró-inflamatórias por células estromais e leucocitárias residentes a fim de promover o recrutamento dos leucócitos efetores,

principalmente neutrófilos no contexto da inflamação aguda. Além disto, A BK-(1-9) promove alterações vasculares essenciais para a instalação do processo inflamatório, como o aumento da expressão de moléculas de adesão no endotélio e aumento da permeabilidade vascular, eventos que facilitam a migração dos leucócitos recrutados da circulação para o sítio inflamatório.

1.4 Ações hipernociceptivas da BK-(1-9)

Como discutido anteriormente, o processo inflamatório emerge quando o tecido ou o sistema é submetido a um estímulo nocivo e em resposta, o organismo arquiteta uma complexa e elegante resposta para resolver a lesão. Como descrito por Celsus (Revisado por TALAMONTI *et al.*, 2020), a hipernocicepção é um dos pontos cardiais do processo inflamatório, inclusive este estímulo pode estar presente mesmo na ausência de inflamação, como observado em pacientes com a dor do membro fantasma. Durante a instalação da lesão tecidual, diversos mediadores inflamatórios despolarizam nociceptores (como prostanoídes, IL-1 β , TNF- α e IL-6), estruturas constituídas por fibras não mielinizadas do tipo C e fibras mielinizadas do tipo A δ , que conduzem o estímulo nociceptivo até o corno dorsal da medula espinhal. Nessa área, neurônios são projetados para centros superiores no sistema nervoso central, como o sistema tálamo-cortical, onde o estímulo da dor se torna subjetivo (GARLAND, 2012; LOESER e MELZACK, 1999; RONCHETTI *et al.* 2017).

Armstrong *et al.* (1954) observaram que ao incubar plasma em feridas, respostas hipernociceptivas eram observadas em animais teste. A incubação deste mesmo plasma induzia a contração de útero em preparações de órgãos isolados. Ao proceder com caracterização química e biológica da substância presente no plasma neste estudo, os autores sugeriram que o composto capaz de induzir estes efeitos poderia ser a BK-(1-9). De fato, alguns anos mais tarde Elliott *et al.* (1960) procederam com estudos utilizando BK-(1-9) sintética e puderam verificaram que a substância era capaz de induzir a hipernocicepção.

O efeito hipernociceptivo mediado pela BK-(1-9) começou a ser elucidado na década de 1980 por Steranka *et al.* (1988). Os autores deste trabalho foram capazes de demonstrar a localização dos receptores B2 por ensaios autorradiográficos em regiões superficiais da medula espinhal com finas fibras não-mielinizadas e corpos celulares neuronais pequenos nos gânglios sensoriais. Essas estruturas são

responsáveis por transmitir sinais nociceptivos da periferia para o sistema nervoso central. Alguns anos depois, Dray *et al.* (1992) demonstrou a capacidade da BK-(1-9) em promover a despolarização as fibras do tipo C, sendo esta resposta abolida pelo antagonista seletivo do receptor B2, HOE-140. Além disto, o efeito despolarizante parece ser dependente de prostanóides e da ativação da proteína cinase C, visto que inibidores de ciclooxigenases bloquearam o efeito despolarizante e o éster de forbol, PDBu, foi capaz de mimetizar o efeito mediado pela BK-(1-9). Além do efeito direto ao despolarizar as terminações nervosas, a BK-(1-9) promove sensibilização dos neurônios envolvidos na captação de sinais nociceptivos, diminuindo assim o limiar necessário para o disparo dessas estruturas (WERNER *et al.*, 2007). O papel hipernociceptivo mediado pela ativação do receptor B1 foi descrito no ano seguinte, pelo qual o efeito hiperalgésico da BK-(1-8) foi bloqueado pelo antagonista seletivo do receptor B1, Leu⁸-BK-(1-8) (PERKINS *et al.*, 1993).

Diante da baixa expressão de receptores B1 em condições normais em grande parte dos tecidos, Perkins *et al.* (1993) discutiram, ainda, que o efeito hipernociceptivo da BK-(1-8) só se instala alguns dias após o dano tecidual, condizente com o aumento da expressão dos receptores B1 por citocinas pró-inflamatórias. Desta forma, acredita-se atualmente que os estímulos nociceptivos agudos sejam mediados pelos receptores B2 enquanto os estímulos nociceptivos crônicos sejam mediados via receptores B1 (LEEB-LUNDBERG *et al.* 2005).

2 JUSTIFICATIVA

A **Figura 3** representa um levantamento bibliográfico na plataforma PubMed sobre dois sistemas hormonais peptídicos com altíssima relevância no sistema cardiovascular, o SCC e SRAA. Pode-se perceber que o SRAA possui número de publicações consideravelmente superior ao SCC desde o descobrimento de ambos sistemas. Além disto é possível observar uma diminuição progressiva nos números de publicações do SCC após os anos 2000, época pelo qual a atividade biológica de diversos metabólitos no SRAA foram elucidadas, como: i) identificação do ligante endógeno do receptor Mas, a Ang-(1-7) (SANTOS *et al.*, 2003); ii) caracterização da atividade biológica da Ang-(1-9) (OCARANZA *et al.*, 2010); iii) identificação e caracterização da atividade biológica da alamandina e identificação do receptor MrgD como seu alvo molecular (LAUTNER *et al.*, 2013); iv) e a caracterização da atividade biológica da Ang-(1-5) (YU *et al.*, 2016). Murphey *et al.*, (2006) descreveu que o fragmento BK-(1-5) era capaz de inibir a coagulação em humanos, porém publicações posteriores negligenciam a aparente atividade biológica desse fragmento e consideram todos os metabólitos da BK-(1-9), exceto a BK-(1-8), como inativos (YAROVAYA e NESHKOVA, 2015). O aparente desinteresse no SCC é bastante negativo visto que uma porção considerável de conhecimento acerca do SCC está sendo perdida ou atrasada.

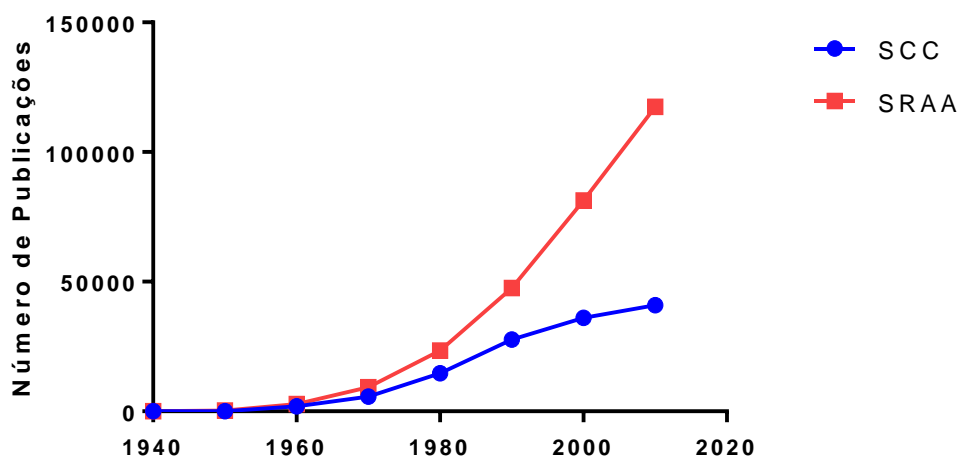


Figura 3 – Panorama geral do número de publicações do SCC e SRAA: Número de publicações relacionadas ao sistema caliceína-cinina (SCC) e sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) desde 1940 até 2019. Os valores representam o número de artigos cumulativos em cada década. As palavras chaves utilizadas para a pesquisa na plataforma PubMed para o SCC foi kinin, ao passo que para o SRAA foram angiotonin, hypertensin (nomes previamente utilizados) e angiotensin.

Ao investigar grupos químicos essenciais para a ativação dos receptores de BK-(1-9) utilizando análogos desse peptídeo, nosso grupo obteve resultados intrigantes como explicitados pela **Figura 4**. Foi constatado que a BK-(1-9) era capaz de induzir a produção de NO em cardiomiócitos, como esperado. Além disto, o criptídeo derivado da hipotensina-1, peptídeo encontrado no veneno do escorpião *Tityus serrulatus*, também foi capaz de induzir a produção de NO (VERANO-BRAGA *et al.*, 2010). O criptídeo derivado da hipotensina-1 possui sequência de aminoácidos Lys-Pro-Pro, apresentando alta similaridade físico-química com o fragmento BK-(1-3), com sequência de Arg-Pro-Pro. Ambos peptídeos possuem um resíduo de aminoácido positivamente carregado seguido por dois resíduos de prolina. Devido a essas características, hipotetizamos que a BK-(1-3) poderia também apresentar atividade biológica.

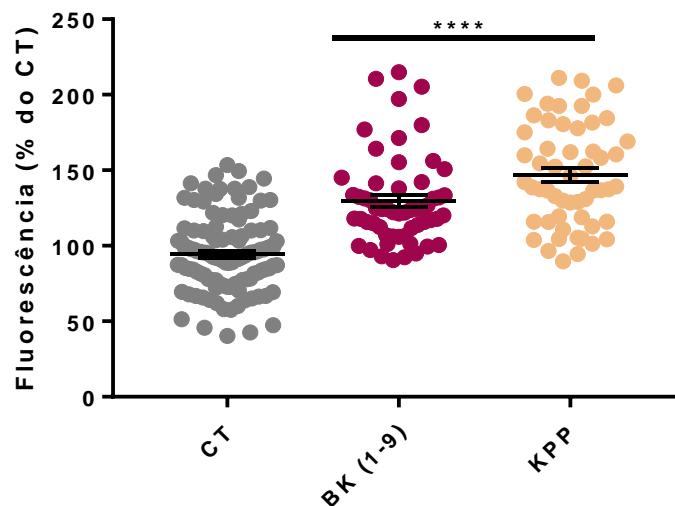


Figura 4 – Quantificação de NO em cardiomiócitos estimulados por BK-(1-9) e análogos: Quantificação de NO realizada em cardiomiócitos de camundongos adultos após a estimulação na concentração final de 10^{-7} mol.L⁻¹ de BK-(1-9) e KPP [Lys¹-BK-(1-3)]. A análise estatística foi realizada pelo teste One-Away ANOVA com teste *post-hoc* múltipla comparação de Tukey. **** p < 0,0001 em relação ao veículo. Dados expressos pela média ± erro padrão.

Visando revisar os conceitos quase dogmáticos acerca do SCC, decidimos realizar uma revisão desse sistema de forma a avaliar o potencial biológico dos principais metabólitos da BK-(1-9).

3 OBJETIVOS

O objetivo geral do presente trabalho é avaliar se os principais metabólitos da BK-(1-9) que ainda são dados como inativos apresentam atividade biológica.

3.1 Objetivos específicos

- Síntese, purificação e caracterização da BK-(1-9), BK-(1-5) e Lys-(des-Arg⁹-Leu⁸)-BK;
- Avaliação da produção de NO *in vitro* mediados pela BK-(1-9), BK-(1-7), BK-(1-5) e BK-(1-3) em diferentes tipos celulares;
- Avaliação do perfil de expressão dos receptores de cininas *in vitro*;
- Avaliar a participação dos receptores de cininas na produção de NO mediado pela BK-(1-9), BK-(1-7), BK-(1-5) e BK-(1-3) *in vitro*;
- Avaliação dos efeitos vasculares mediados pela BK-(1-9), BK-(1-7), BK-(1-5) e BK-(1-3) em aorta torácica de ratos;
- Avaliação do perfil de expressão dos receptores de cininas em aorta torácica de ratos;
- Avaliação da atividade hipotensora *in vivo* da BK-(1-9), BK-(1-7), BK-(1-5) e BK-(1-3) em ratos não-anestesiados;
- Avaliação do extravasamento plasmático mediado pela BK-(1-9), BK-(1-7), BK-(1-5) e BK-(1-3) em camundongos;
- Avaliação do efeito hipernociceptivo mediados pela BK-(1-9), BK-(1-7), BK-(1-5) e BK-(1-3) em camundongos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Reagentes

Os peptídeos BK-(1-7) (Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro) e BK-(1-3) (Arg-Pro-Pro) foram adquiridos pela GenOne (GenOne Biotechnologies, Rio de Janeiro, Brasil). Outros reagentes utilizados neste trabalho terão características detalhadas à medida que forem citados no texto.

4.2 Síntese de peptídeos carboxilados em fase sólida pela estratégia Fmoc

A BK-(1-9) (Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg), seu fragmento BK-(1-5) e antagonista seletivo do receptor B1 Lys-(des-Arg⁹, Leu⁸)-BK (Lys-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Leu) foram sintetizados em fase sólida pela estratégia Fmoc. Especificamente nessa estratégia de síntese, visa-se a produção de peptídeos com o grupo amino (H₂N-) livre na porção N-terminal e grupo carboxila (-COOH) na porção C-terminal. A estratégia Fmoc consiste na proteção do grupo α -amino pela molécula Fmoc. Este grupo é facilmente removido em meio básico, possibilitando que a amina-N^o promova ataques nucleofílicos a carboxilas ativadas de Fmoc-aminoácidos. Há, também, proteção de cadeias laterais de aminoácidos com grupos reativos, sendo removidos ao final da síntese concomitantemente com a clivagem do peptídeo ancorado na resina. Estas abordagens minimizam que o aminoácido ativado sofra ataques nucleofílicos por outros grupos que não o α -amino, minimizando a síntese de produtos secundários (GÓNGORA-BENÍTEZ *et al.*, 2013).

É importante salientar que a síntese química de peptídeos ocorre da posição C-terminal para a posição N-terminal. Em outras palavras, o último resíduo de aminoácido da sequência é acoplado em um suporte polimérico, sendo o primeiro resíduo a emergir da cadeia peptídica. Em seguida o restante da cadeia é incorporada, terminando a síntese quando o primeiro resíduo de aminoácido da sequência é acoplado ao peptídeo nascente.

A síntese de peptídeos carboxilados ocorre, em vias gerais, como explicitado adiante. As massas dos Fmoc-aminoácidos utilizados na síntese com seus respectivos grupos protetores estão explicitadas pela **Tabela 1**. Os Fmoc-aminoácidos-TGA foram obtidos pela NovaSyn (Merck, Darmstadt, Alemanha),

Tabela 1 – Massa dos aminoácidos e grupos protetores utilizados

| Aminoácido (grupo protetor) | Massa (g.mol ⁻¹) |
|-----------------------------|------------------------------|
| Fmoc-Arg(Pbf)-OH | 647,8 |
| Fmoc-Pro-OH | 337,4 |
| Fmoc-Ser(tBu)-OH | 383,4 |
| Fmoc-Phe-OH | 387,4 |
| Fmoc-Gly-OH | 297,3 |
| Fmoc-Lys(Boc)-OH | 468,5 |
| Fmoc-Leu-OH | 353,4 |

Legenda: Massa dos Fmoc-aminoácidos, incluindo a massa dos grupos protetores, utilizados na síntese dos peptídeos

4.2.1 Preparo do cartucho de síntese

O cartucho de síntese foi preparado utilizando seringas descartáveis como frasco reacional. O volume da seringa pode ser variável, mas é importante que a seringa tenha volume suficiente para abrigar o filtro, a peptidil-resina, o líquido reacional e mais um espaço com ar para que ocorra a mistura adequada do meio reacional. Um filtro foi adicionado no interior da seringa para que não ocorressem perdas da resina com a cadeia peptídica, permitindo a expulsão do líquido reacional quando necessário.

O suporte polimérico utilizado para a síntese dos peptídeos foi a resina carboxilada NovaSyn-TGA acoplada à Fmoc-aminoácidos, com grau de substituição de $2,1 \times 10^{-4}$ mol.g⁻¹. Para a síntese da BK-(1-9) foi utilizada a resina Fmoc-Arg(Pmc)-NovaSyn-TGA (Merck, Darmstadt, Alemanha), para BK-(1-5) foi utilizada a resina Fmoc-Phe-NovaSyn-TGA (Merck, Darmstadt, Alemanha) e para a Lys-(des-Arg⁹, Leu⁸)-BK foi utilizada a resina Fmoc-Leu-NovaSyn-TGA (Merck, Darmstadt, Alemanha).

A síntese foi planejada de forma a se obter, aproximadamente, $8,32 \times 10^{-5}$ mol de BK-(1-9); $8,73 \times 10^{-5}$ mol de BK-(1-5) e; $7,99 \times 10^{-5}$ mol de Lys-(des-Arg⁹, Leu⁸)-BK. Foi pesado e transferidas, individualmente para os cartuchos de síntese, cerca de 396 mg de resina para a síntese da BK-(1-9); 420 mg para a síntese de BK-(1-5) e; 376 mg para a síntese de Lys-(des-Arg⁹, Leu⁸)-BK.

Foi adicionado aos cartuchos cerca de dois equivalentes de volume ocupado pela resina de diclorometano (DCM) (Vetec, Duque de Caxias, Brasil) e logo após os cartuchos foram submetidos a agitação mecânica em uma mesa agitadora, a 240 rpm, por cerca de 30 minutos para a dilatação e ativação da resina. Decorrido esse tempo, o volume de DCM foi descartado.

4.2.2 Etapa de desproteção (remoção do grupo Fmoc)

Antes de se realizar a primeira desproteção da resina, os cartuchos foram submetidos a uma lavagem com dimetilformamida (DMF) (Vetec, Duque de Caxias, Brasil) e outra com DCM. Após essa lavagem, o cartucho foi preenchido com DMF e agitado por 15 minutos.

A desproteção foi realizada adicionando ao cartucho de síntese uma solução a 20% de 4-metilpiperidina (Sigma-Aldrich, San Luis, EUA) em DMF, agitado por 12 minutos. Decorrido o tempo, os cartuchos foram lavados 3 vezes, alternadamente, com DMF e DCM.

4.2.3 O teste de Kaiser

Avaliar a eficiência da desproteção e acoplamento dos grupamentos aminos-N^α de aminoácidos é de suma importância para que a síntese prossiga como planejado. O método de identificação por intermédio da ninidrina foi desenvolvido por Moore e Stein (1948) para síntese de peptídeos em fase líquida e posteriormente foi modificada para a síntese em fase sólida por Kaiser *et al.* (1970).

Alguns grãos de peptidil-resina foram transferidos para um tubo de ensaio e em seguida foram adicionados 1 gota de solução de ninidrina 5% em etanol; 2 gotas de solução fenol 80% em etanol e; 1 gota de solução de KCN/piridina (2mL KCN 0,001 mol.L⁻¹ em água e 98mL de piperidina). O tubo de ensaio foi aquecido a 100°C por cinco minutos (CHAN e WHITE, 2000).

Decorrido o tempo, o teste de Kaiser pode fornecer dois resultados. O primeiro destes é não coloração dos grãos de peptidil-resina, indicando que não há grupos α-amino livres. O segundo desfecho é a coloração dos grãos de peptidil-resina, indicando que há grupos α-amino livres. A coloração desenvolvida neste teste depende do tipo de resina usada e os grãos podem ficar opacos, desenvolver tons pastéis sutis ou desenvolver cores intensas de azul ou verde escuro.

Após a etapa de desproteção, deve-se somente prosseguir com o processo de síntese caso os grãos da peptidil-resina tenham desenvolvido opacidade ou tonalidades. Caso os grãos se mantiverem translúcidos, deve-se proceder novamente com a desproteção.

4.2.4 Ativação do Fmoc-aminoácido e alongamento da cadeia peptídica

A reação entre o grupo α -amino de um aminoácido e a α -carboxila de outro aminoácido para a formação da ligação peptídica não é termodinamicamente favorável em condições normais. Desta forma, é necessário utilizar alguns artifícios para que esta reação ocorra de maneira mais eficaz. Na síntese química de peptídeos em fase sólida, a α -carbonila é quimicamente modificada a fim de se produzir um grupo mais eletrofílico (GÓNGORA-BENÍTEZ *et al.*, 2013).

Neste trabalho, para a ativação da α -carboxila foi utilizado DIPEA para a formação do carboxilato Fmoc-aminoácido correspondente; HBTU para a conversão da hidroxila da α -carboxila em um derivado uronil, grupo abandonador mais eficiente que a hidroxila e; HOBt que formará o éster ativo do Fmoc-aminoácido correspondente. Este éster ativo é rapidamente atacado pelo grupo α -amino livre e como produto tem-se o acoplamento entre dois aminoácidos (GÓNGORA-BENÍTEZ *et al.*, 2013).

Foi pesado e transferido para um recipiente 5 equivalentes de Fmoc-aminoácido a ser acoplado na sequência nascente do peptídeo; 5 equivalentes de HOBt (Sigma-Aldrich, San Luis, EUA); 4,9 equivalentes de HBTU (Sigma-Aldrich, San Luis, EUA). O conteúdo foi completamente solubilizado em cerca de 1,5mL de DMF com auxílio de vórtex. A essa solução, foi adicionado 6 equivalentes de DIPEA (Sigma-Aldrich, San Luis, EUA). O recipiente contendo a solução final foi agitado, com auxílio de vórtex, por cinco minutos. Decorrido o tempo, o conteúdo foi transferido para o cartucho reacional e mantido sob agitação a 240 rpm por 1 hora.

O acoplamento foi verificado via teste de Kaiser e a reação foi considerada satisfatória quando ao final do teste os grãos de peptidil-resina se mostraram translúcidos. As reações de desproteção e acoplamento foram repetidas até que todos os aminoácidos da sequência estivessem sido acoplados.

4.2.5 Clivagem do peptídeo da peptidil-resina

A clivagem do peptídeo da peptidil-resina tem como objetivo o isolamento do produto bruto. Para isto, foi primeiramente realizada a desproteção do grupamento α -amino e a confirmação por teste de Kaiser, como descrito nas seções 4.2.2 e 4.2.3, respectivamente.

A solução de clivagem foi preparada de forma a se obter uma proporção de 10mL de solução para cada 1g de peptidil-resina. A solução de clivagem foi constituída de uma mistura de ácido trifluoroacético/triisopropilsilano/água (TFA:TIS:H₂O) 95,0:2,5:2,5% (v/v). Esta solução foi transferida para o cartucho de síntese e mantida sob agitação a 240 rpm por 1 hora.

Discorrido o tempo, a solução de clivagem foi expulsa do cartucho de síntese para um tubo falcon. Em seguida, o cartucho foi lavado 2 vezes com cerca de 3mL de TFA (Sigma-Aldrich, San Luis, EUA) para certificar que a maior quantidade possível de peptídeo fosse extraída da resina. O TFA resultante desta lavagem foi transferido para o tubo falcon que continha a solução de clivagem. Esta solução final foi concentrada por auxílio de jato de nitrogênio gasoso.

Em seguida, foi adicionado ao tubo falcon contendo o peptídeo bruto em solução concentrada cerca de 8mL de éter diisopropílico (Merck, Darmstadt, Alemanha) gelado. O tubo falcon foi imerso em nitrogênio líquido para precipitação do peptídeo bruto e o material resultante foi posteriormente centrifugado. O sobrenadante foi cuidadosamente descartado. Para maior rendimento na precipitação do produto bruto, as etapas de adição do éter diisopropílico, imersão no nitrogênio líquido e centrifugação foram realizadas 4 vezes. Após esse ciclo de etapas, o produto bruto precipitado foi submetido a secagem por jato de nitrogênio gasoso.

4.3 Purificação de produtos da síntese de peptídeos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

O produto bruto da síntese de peptídeos consiste no produto almejado, presumivelmente em maior quantidade, e diversos subprodutos. Desta forma, uma etapa de purificação para isolamento do produto desejável é imprescindível. A cromatografia líquida de alta eficiência é a técnica analítica padrão para separação de moléculas em matrizes complexas ou simples.

As purificações dos produtos brutos foram realizadas em um cromatógrafo CBM-20A (Shimadzu, Tóquio, Japão) com duas bombas LC-20AT (Shimadzu, Tóquio, Japão) acopladas a um detector UV-Vis SPD-20AV (Shimadzu, Tóquio, Japão), utilizando-se lâmpada de deutério, excitando a amostra no comprimento de onda de 214 nm. A fase móvel A consistiu em uma solução a 0,1% de TFA em água ultrapura do tipo I e a fase móvel B consistiu em uma solução de 0,1% de TFA em acetonitrila grau cromatográfico (Sigma-Andrich, San Luis, EUA), utilizadas tanto na padronização do método de purificação quanto no processo de purificação. Os produtos brutos foram solubilizados de forma a se obter soluções a $1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ em 0,1% TFA em água ultrapura do tipo I.

4.3.1 *Padronização do método de purificação*

Uma primeira análise em uma coluna analítica foi realizada a fim de se estabelecer condições ideais para a purificação dos produtos brutos em maior escala, minimizando a perda do produto bruto e o uso de solventes orgânicos. Para isto, foi empregado uma coluna Vydac C18 com partícula de $5\mu\text{m}$ de diâmetro, dimensões de $4,6\text{mm} \times 250\text{mm}$ e tamanho de poro de 300\AA (Hichrom, Leicestershire, Reino Unido). Para o desenvolvimento do método, $100\mu\text{L}$ de uma solução a $1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ em 0,1% TFA em água ultrapura do tipo I de cada peptídeo foi injetado, a fluxo constante de $1\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Para esta etapa, o seguinte perfil de eluição foi utilizado: 0 a 5 minutos 0% de fase móvel B; 5 a 65 minutos 0 a 100% de fase móvel B; 65 a 70 minutos 100% de fase móvel B; 70 a 75 minutos 0% B. O pico majoritário desenvolvido em cada corrida deveria corresponder ao produto de síntese desejado e para fins de confirmação, o pico majoritário foi coletado para subsequente análise por espectrometria de massa.

Após a confirmação de que pico majoritário era o peptídeo desejado, o método previamente utilizado foi otimizado de modo a minimizar o tempo de corrida e aumentar a resolução do pico de interesse. Novas corridas com métodos otimizados foram realizadas e os picos majoritários foram novamente coletados para identificação por espectrometria de massa.

4.3.2 *Escalonamento do método de purificação*

A purificação de grandes quantidades de produto em uma coluna cromatográfica analítica é impraticável, visto que a prática demandaria muito tempo e levaria a

produção desnecessária de resíduo químico. De forma a contornar esta desvantagem, existe no mercado diversas colunas cromatográficas capazes de carregar quantidades consideráveis de amostra. Estas colunas suportam pressões maiores que as colunas cromatográficas analíticas convencionais e, conseqüentemente, suportam fluxos maiores.

A mudança de fluxo em um método cromatográfico é acompanhada por mudanças nos padrões de picos no cromatograma, fazendo-se necessário uma padronização prévia do método escalonado antes que o processo de purificação se proceda (MAZZEI e D'AVILA, 2003). Os métodos de purificação padronizados de cada peptídeo em coluna analítica foram submetidos a corridas em uma coluna semi-preparativa Discovery Bio Wide Pore C18, com partícula de 10 μ m de diâmetro, dimensões de 10mm x 250mm e tamanho de poro de 300Å (Sigma-Aldrich, San Luis, EUA). Foi utilizado um fluxo de 5mL/min. Ajustes finos foram realizados para cada método de forma a minimizar o tempo de corrida mantendo resolução dos picos de interesse. Estes métodos ajustados foram utilizados para a subsequente etapa de purificação dos peptídeos.

- O programa final de purificação da BK-(1-9): i) 0 a 5 minutos, 0% fase móvel B; ii) 5 a 10 minutos, 20% fase móvel B; iii) 10 a 25 minutos, 23% fase móvel B; iv) 25 a 30 minutos, 100% fase móvel B; v) 30 a 35 minutos, 100% fase móvel B; vi) 35 a 40 minutos, 0% fase móvel B.
- Programa final de purificação da BK-(1-5): i) 0 a 5 minutos, 0% fase móvel B; ii) 5 a 15 minutos, 15% fase móvel B; iii) 15 a 25 minutos, 17% fase móvel B; iv) 25 a 30 minutos, 100% fase móvel B; v) 30 a 35 minutos, 100% fase móvel B; vi) 35 a 40 minutos, 0% fase móvel B.
- Programa final de purificação da Lys-(des-Arg⁹, Leu⁸)-BK: i) 0 a 5 minutos, 0% fase móvel B; ii) 5 a 10 minutos, 23% fase móvel B; iii) 10 a 25 minutos, 28% fase móvel B; iv) 25 a 30 minutos, 100% fase móvel B; v) 30 a 35 minutos, 100% fase móvel B; vi) 35 a 40 minutos, 0% fase móvel B.

O processo de purificação em coluna semi-preparativa discorreu-se coletando as frações correspondentes aos picos majoritários dos cromatogramas de cada produto bruto e, logo após, as frações foram liofilizadas e estocadas a -20°C. As identidades

dos produtos purificados foram estabelecidas por espectrometria de massa afim de se confirmar a eficiência da purificação.

4.4 Caracterização de peptídeos por espectrometria de massa

O processo de síntese de peptídeos, bem como em outros tipos de síntese, pode levar a produtos não desejáveis. Além disto, o pico majoritário em um cromatograma pode não ser o produto de interesse, caso a síntese não tenha procedido de maneira adequada. Desta forma, é extremamente importante a aplicação de um método pelo qual é possível identificar a natureza dos compostos formados na síntese e dos compostos purificados.

Todas as análises para a caracterização dos peptídeos foram realizadas em um espectrômetro MALDI TOF/TOF Autoflex III Smartbeam (Bruker Daltonics, Billerica, EUA). Quando necessário, as amostras foram resuspendidas em 0,1% TFA em água ultrapura do tipo I. Todas as amostras foram misturadas em uma razão 1:1 com matriz ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA) e posteriormente esta mistura foi transferida para uma placa MTP 384 Polished Steel (Bruker Daltonics, Billerica, EUA). Antes da aquisição dos espectros, uma calibração externa foi realizada para garantir acurácia de massa nas análises. Para isto, homogeneizou-se na razão 1:1 a matriz ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico e o calibrante Peptide Calibration Standard II (Bruker Daltonics, Billerica, EUA). Os espectros de massa foram obtidos em modo refletido positivo com 300 tiros de laser, enquanto a voltagem de aceleração foi mantida entre 15-20kV.

Sequencialmente, as principais relações massa/carga (m/z) foram selecionadas para fragmentação na fonte de ionização utilizando o modo LIFT. Os espectros MS/MS das principais relações m/z foram utilizados para sequenciar e identificar as respectivas moléculas.

4.5 Animais

Todos os animais utilizados neste trabalho foram provenientes do Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Ratos Wistar adultos de 8 a 12 semanas, ratos Wistar neonatos de 3 a 5 dias e camundongos C57Bl/6 adultos de 8 a 12 semanas foram mantidos no Biotério de Ratos Transgênicos do Laboratório de Hipertensão e no Biotério de

Experimentação de Camundongos do Departamento de Fisiologia e Biofísica, respectivamente, com ciclos claro/escuro de 12 horas de duração. Além disto, os animais receberam dieta adequada e água *ad libitum*. Todas as práticas realizadas com os animais foram previamente aprovadas pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA/UFMG) pelo projeto número 213/2016.

4.6 Cultura celular

4.6.1 *Cultura celular de glioblastoma humano*

Células imortalizadas de glioblastoma humano U-87 MG (Banco de Células do Rio de Janeiro, Duque de Caxias, Brasil) foram cultivadas em meio DMEM-F12 (Sigma-Aldrich, San Luis, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (Cultilab, Campinas, Brasil) e solução antibiótica-antimicótica a 1%, contendo 10000U/mL de penicilina, 10mg/mL de estreptomicina e 25mg/mL de anfotericina B (Thermo Fisher, Waltham, EUA) a 37°C em estufa com alimentação de 5% de CO₂.

4.6.2 *Isolamento de cardiomiócitos ventriculares de ratos neonatos*

A cultura primária de cardiomiócitos de ratos neonatos foi realizada conforme descrito por Guatimosim *et al.* (2008). Resumidamente, em um fluxo laminar, ratos Wistar machos de 3 a 5 dias de idade foram decapitados e submetidos a toracotomia para a retirada do coração. Os corações extraídos foram rapidamente submergidos em HBSS (Sigma-Aldrich, San Luis, EUA) a 4°C e lavados abundantemente com esta solução para a retirada de hemácias. Os corações sofreram uma dissociação mecânica para obtenção de pedaços de tecido cardíaco de cerca de 1mm³. O tecido cardíaco foi transferido para um tubo falcon contendo tripsina (Sigma-Aldrich, San Luis, EUA) a 100µg/mL diluída em HBSS e submetido ao primeiro passo de digestão enzimática por 16 horas a 4°C, sob agitação constante. Decorrido o tempo, foi adicionado ao tubo falcon inibidor de tripsina (Sigma-Aldrich, San Luis, EUA) a 2mg/mL diluída em HBSS e colagenase do tipo II (Worthington, Lakewood, EUA) a 1mg/mL diluída em meio L-15 (Sigma-Aldrich, San Luis, EUA). O tubo falcon contendo o tecido cardíaco sofreu uma segunda digestão enzimática por 40 minutos a 37°C. Logo após, o tecido foi submetido a uma dissociação mecânica com auxílio de pipeta e filtrado por uma malha de 40 µm. Lamínulas foram previamente tratadas com fibronectina (Sigma-Aldrich, San Luis,

EUA) a 10µg/mL diluída em meio L-15 para auxiliar a adesão de cardiomiócitos. As células foram plaqueadas nestas lamínulas e incubadas em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado e 1% de solução antibiótica-antimicótica a 37°C em uma estufa com alimentação de 5% de CO₂ por 48 horas. Decorrido as 48 horas, o meio foi trocado por DMEM sem soro, suplementado com 1% de solução antibiótica-antimicótica e 20µg/mL de ARA-C (Sigma-Aldrich, San Luis, EUA) e incubado por 24 horas a 37°C em uma estufa com alimentação de 5% de CO₂. O ARA-C é um agente antiproliferativo que quando suplementado em meio de cultura celular, acaba por selecionar tipos celulares com baixas taxas de replicação, como no caso do cardiomiócito. Decorrida as 24 horas, o meio de cultura foi novamente trocado para meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado e 1% de solução antibiótica-antimicótica, incubadas a 37°C em estufa com alimentação a 5% de CO₂ até a utilização em experimentos.

4.6.3 *Isolamento de cardiomiócitos ventriculares de camundongos adultos*

O isolamento de cardiomiócitos ventriculares de camundongos adultos foi realizado como descrito por Gómez *et al.* (2001). Cerca de 15 minutos antes da eutanásia, os animais receberam uma injeção de 100U de heparina, para prevenir a formação de trombos cardíacos que prejudicam a digestão enzimática do tecido. Os animais foram eutanasiados por decapitação e o coração foi rapidamente retirado e submerso em solução Tyrode modificada livre de Ca²⁺ (NaCl 1,3 x 10⁻¹ mol.L⁻¹, KCl 5,4 x 10⁻³ mol.L⁻¹, HEPES 2,5 x 10⁻² mol.L⁻¹, MgCl₂ 5 x 10⁻⁴ mol.L⁻¹, NaH₂PO₄ 3,3 x 10⁻⁴ mol.L⁻¹, Glicose 2,2 x 10⁻² mol.L⁻¹ e insulina 100U/mL pH=7,4) à 4°C. Procedeu-se com a canulação da aorta para retro-perfusão do tecido cardíaco com a mesma solução descrita acima, aquecida a 37°C por alguns minutos. A solução de perfusão foi trocada pela solução de Tyrode modificada, agora suplementada com 5,0 x 10⁻⁵ mol.L⁻¹ de CaCl₂ e colagenase do tipo 2 (Worthington, Lakewood, EUA) a 1mg.mL⁻¹ por 12 minutos para que a digestão enzimática do tecido cardíaco fosse realizada. Discorrida a digestão enzimática, o coração foi seccionado na altura dos átrios e o tecido ventricular foi submetido à uma digestão mecânica por 2 minutos. O tecido remanescente foi filtrado por uma malha de 40 µm para retirada de material não digerido. Os cardiomiócitos em suspensão foram centrifugados três vezes para que a concentração de Ca²⁺ fosse gradativamente aumentada até a concentração final de 5 x 10⁻⁴ mol.L⁻¹. O meio foi trocado mais uma vez por Tyrode com 1,8 x 10⁻³ mol.L

de Ca^{2+} , solução pela qual os cardiomiócitos permaneceram até a realização dos experimentos.

4.7 Quantificação da produção de NO por microscopia confocal

A sonda permeável DAF-FM diacetato (Thermo Fisher, Waltham, EUA) *per se* é pouco fluorescente, mas quando conjugada com NO a sonda se torna fortemente fluorescente. Partindo desta característica, é possível quantificar a produção de NO em células utilizando uma técnica por onde a fluorescência emitida possa ser analisada (KOJIMA *et al.*, 1999). Os meios de cultura das células utilizadas foram trocados por solução salina balanceada de Hanks na ausência de soro fetal bovino inativado por pelo menos uma hora antes de incubar com o fluoróforo. Decorrido o tempo, as células foram incubadas com DAF-FM diacetato, na concentração final de 5×10^{-6} mol.L⁻¹ por 30 minutos, sendo homogeneizadas a cada 10 minutos, a temperatura ambiente. Após o período de incubação, as células foram lavadas com HBSS para a retirada de excesso de fluoróforo. As células marcadas foram incubadas por 15 minutos com BK-(1-9), BK-(1-7), BK-(1-5) ou BK-(1-3) na concentração final de 10^{-7} mol.L⁻¹. Decorrido o tempo, as células tratadas foram fixadas por intermédio de uma solução de paraformaldeído a 4% em salina estéril por 15 minutos. A análise das células foi realizada em um microscópio confocal Zeiss LSM 5 LIVE (Zeiss, Oberkochen, Alemanha) do Centro de Aquisição e Processamento de Imagens da UFMG (CAPI/UFMG) ou em um microscópio confocal Nikon Eclipse Ti (Nikon, Shinagawa, Japão) sob o comprimento de onda de excitação de 495nm e comprimento de onda de emissão de 515nm. As imagens obtidas foram processadas pelo software ImageJ (SCHNEIDER *et al.*, 2012) a fim de se obter o perfil de produção de NO promovido pela BK-(1-9) e seus metabólitos estudados. A relevância dos receptores de BK-(1-9) na produção de NO em cultura celular foi avaliada pela incubação de antagonistas seletivos dos receptores B1 ou B2 (Lys-(des-Arg⁹, Leu⁸)-BK e HOE-140 (Tocris, Bristol, Reino Unido), respectivamente) ou uma mistura de ambos antagonistas na concentração final de 10^{-7} mol.L⁻¹ por 15 minutos antes da adição da BK-(1-9) e seus metabólitos. Cardiomiócitos de camundongos *knockout* para os receptores B1 ou B2 foram tratados com BK-(1-9), BK-(1-7), BK-(1-5) ou BK-(1-3) na concentração final de 10^{-7} mol.L⁻¹ por 15 minutos, fixados e analisados a fim de se corroborar com os resultados utilizando antagonistas seletivos.

4.8 Reatividade vascular mediada pela BK-(1-9) e seus metabólitos

A atividade da BK-(1-9) e de seus metabólitos na dinâmica vascular foi avaliada por registros isométricos de força em anéis de aorta de ratos.

4.8.1 *Preparação do Krebs-Henseleit e obtenção dos anéis de aorta*

O Krebs-Henseleit foi preparado no dia de cada experimento utilizando água destilada e a seguinte composição de sais e glicose: NaCl $1,18 \times 10^{-1}$ mol.L⁻¹, KCl $4,7 \times 10^{-3}$ mol.L⁻³, KH₂PO₄ $1,17 \times 10^{-3}$ mol.L⁻¹, MgSO₄.7H₂O $1,22 \times 10^{-3}$ mol.L⁻¹; Glicose $1,11 \times 10^{-2}$ mol.L⁻¹mM; NaHCO₃ $2,5 \times 10^{-2}$ mol.L⁻¹; CaCl₂.2H₂O $2,51 \times 10^{-3}$ mol.L⁻³. O pH dessa solução foi fixado entre 7,2 e 7,4.

Ratos Wistar de 8 a 12 semanas foram eutanasiados por decapitação e submetidos a toracotomia para a dissecação do seguimento torácico da artéria aorta. O tecido conjuntivo perivascular foi cuidadosamente removido e a aorta foi segmentada em anéis de 3 a 5 mm de comprimento. Os anéis de aorta foram colocados, cuidadosamente, entre dois ganchos triangulares confeccionados a partir de fio de aço inoxidável de 0,25 mm de diâmetro para serem acoplados em transdutores de força. Os anéis de aorta foram banhados por 10mL da solução de Krebs-Henseleit, aquecida a 37°C e levemente borbulhadas por uma mistura de gás 95% O₂ / 5% CO₂ ao longo de todo o experimento.

4.8.2 *Obtenção do registro de tensão isométrica em anéis de aorta de ratos*

Os sinais de tensão isométrica gerados pelos anéis de aorta de ratos foram captados por um transdutor de força MLT0420 (ADInstruments, Sydney, Austrália), amplificados por um amplificador FE224 (ADInstruments, Sydney, Austrália) para então serem convertidos em sinais digitais por um conversor PowerLab 8/35. Os sinais convertidos foram processados pelo software LabChart v.7.3.8 (ADInstruments, Sydney, Austrália) para obtenção dos registros de tensão isométrica.

4.8.3 *Curva de tensão*

Os anéis de aorta devem ser equilibrados em uma tensão passiva ótima, correspondente a tensão sob a qual o anel de aorta deve ser submetido para que se desenvolva contração máxima em resposta a agentes contráteis não dependente de

receptores, como o KCl, ou agentes contráteis dependente de receptores, como agonistas α_1 adrenérgicos (DE MOUDT *et al.*, 2017).

Após o período de equilíbrio dos anéis de aorta na tensão passiva de 0,25 g, KCl foi adicionado às cubas na concentração final de $6 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ para evocar a contração máxima. Decorrido este evento, os anéis foram lavados com Krebs-Helsenleit até que a tensão passiva fosse reestabelecida. A tensão passiva foi aumentada em acréscimos de 0,25 g até 2g, realizando o procedimento de estabilização da nova tensão passiva, contração por KCl $6 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ e lavagem em cada ciclo. As tensões máximas de contração evocadas por KCl $6 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ em cada tensão passiva foram plotadas em um gráfico para se estabelecer a tensão passiva mínima responsável por levar a máxima contração.

4.8.4 *Curva de fenilefrina*

Após a estabilização dos anéis de aorta na tensão passiva ótima, uma curva concentração-resposta de fenilefrina foi realizada para estabelecer a concentração necessária para levar a contração subótima (EC_{50}). Para isto, foi realizada uma curva concentração-resposta de fenilefrina nas concentrações finais de 10^{-9} a 10^{-4} em incrementos de 0,5 log.

4.8.5 *Viabilidade muscular e endotelial vascular*

Tendo em vista que a camada endotelial no leito vascular é essencial para a vasodilatação mediada por diversas moléculas, é necessário que essas células estejam preservadas e ativas após a dissecação da aorta e montagem dos anéis nos transdutores de força para a avaliação dos efeitos vasculares de uma determinada molécula potencialmente vasodilatadora (FURCHGOTT e ZAWADZKI, 1980).

A viabilidade muscular foi determinada pela presença de resposta contrátil mediada por KCl na concentração final de $6 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$. Ao fim da contração, os anéis foram lavados com Krebs-Henseleit até que a tensão passiva fosse restabelecida. Após o período de estabilização dos anéis de aorta, foi adicionado às cubas fenilefrina na concentração final de $10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$. Decorrida a estabilização da contração, a cada cuba foi adicionado acetilcolina na concentração final de $10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ para promoção da vasodilatação. Anéis de aorta foram considerados com

camada endotelial funcional quando a vasodilatação mediada por acetilcolina foi maior ou igual a 80% a partir da pré-contracção por fenilefrina.

4.8.6 *Vasoatividade da BK-(1-9) e seus metabólitos*

A avaliação da atividade da BK-(1-9) e seus metabólitos foi realizada conforme descrito a seguir. Decorrido o período de estabilização dos anéis, o teste de viabilidade muscular e endotelial foi realizado e somente anéis com vasodilatação superior a 80% foram considerados aptos para a realização deste ensaio. Os anéis foram pré-contráidos com fenilefrina na concentração final de 10^{-7} mol.L⁻¹. Após a estabilização da contracção, uma curva concentração-resposta com a BK-(1-9) e seus metabólitos foi realizada para determinar a vasoatividade desses compostos, com concentrações finais de 10^{-12} a 10^{-6} mol.L⁻¹ adicionadas em incrementos de 0,5 log.

4.8.7 *Intervenções farmacológicas*

Algumas intervenções farmacológicas foram realizadas para avaliar se o relaxamento mediado pela BK-(1-9) e seus metabólitos são dependentes da funcionalidade do endotélio, da produção de NO e prostanóides, além de estabelecer a relevância dos receptores de BK-(1-9) para a promoção do efeito vasodilatador dessas moléculas. Para avaliar se os efeitos mediados pela BK-(1-9) e seus metabólitos são dependentes das células endoteliais, a túnica íntima foi mecanicamente removida por friccionar levemente o anel de aorta sob o gancho de aço inoxidável. Ao realizar o teste de viabilidade endotelial, a preparação foi considerada satisfatória para os ensaios somente quando os anéis de aorta, pré-contráidos por fenilefrina na concentração final de 10^{-7} mol.L⁻¹, não apresentavam relaxamento após a adição de acetilcolina na concentração final de 10^{-6} mol.L⁻¹. A atividade da BK-(1-9) e de seus metabólitos na ausência de endotélio foi avaliada conforme descrito no item 4.8.6.

A dependência dos efeitos da BK-(1-9) e de seus metabólitos por NO e prostanóides foi avaliada utilizando L-NAME (Sigma-Aldrich, San Luis, EUA) na concentração final de 10^{-6} mol.L⁻¹ e indometacina (Sigma-Aldrich, San Luis, EUA) na concentração final de 10^{-6} mol.L⁻¹, inibidores não seletivos das NOS e ciclooxigenases, respectivamente. A importância dos receptores de BK-(1-9) sob o efeito vasodilatador da BK-(1-9) e de seus metabólitos foi avaliada empregando Lys-(des-

Arg⁹, Leu⁸)-BK na concentração final de 10^{-7} mol.L⁻¹, HOE-140 na concentração final de 10^{-7} mol.L⁻¹ ou uma mistura dos antagonistas seletivos dos receptores de BK-(1-9), ambos na concentração final de 10^{-7} mol.L⁻¹. Esses compostos foram incubados por 20 minutos e em seguida os anéis foram pré-contraídos por fenilefrina na concentração final de 10^{-7} mol.L⁻¹. Após a estabilização da contração, uma curva concentração-resposta foi realizada, conforme descrito no item 4.8.6 com BK-(1-9) e seus metabólitos.

4.9 Registros de pressão arterial

A atividade dos metabólitos da BK-(1-9) sob a pressão arterial de ratos acordados foi avaliada via canulação da artéria femoral para a aferição da pressão arterial pulsátil e da veia femoral, para administração dos compostos estudados.

4.9.1. Canulação da artéria e veia femoral de ratos

No dia anterior aos registros, ratos Wistar machos entre 8 a 12 semanas foram anestesiados por uma mistura anestésica contendo cetamina/xilazina nas doses de 55,6 mg.Kg⁻¹ e 8,9 mg.Kg⁻¹, respectivamente, por via intraperitoneal. Os animais foram considerados anestesiados quando havia ausência de reflexo interdigital em decorrência a pressão na pata.

Uma incisão na região inguinal foi realizada para que a dissecação do feixe vasculo-nervoso femoral fosse possível. Para a aferição da pressão arterial, uma cânula foi inserida na artéria femoral de forma a se comunicar com a artéria aorta abdominal. Para a injeção da BK-(1-9) e de seus metabólitos, foi inserida uma cânula na veia femoral. Ambas as cânulas foram fixadas por amarraduras com fios de sutura. Para facilitar o acoplamento do transdutor de pressão e injeção a dos compostos, as cânulas foram alojadas no tecido subcutâneo por meio de um trocáter, emergindo na região interescapular de cada animal. As incisões realizadas foram devidamente suturadas após o término do procedimento de canulação e os animais foram condicionados individualmente para o período de recuperação.

4.9.2 Registro da pressão arterial

Os registros de parâmetros cardiovasculares foram realizados por meio de um transdutor de pressão TSD104A (BIOPAC Systems, Goleta, EUA), acoplado à cânula arterial. Os sinais da pressão arterial pulsátil foram transmitidos para um

amplificador DA100C (BIOPAC Systems, Goleta, EUA) e a um sistema conversor analógico-digital para aquisição dos dados MP100A (BIOPAC Systems, Goleta, EUA). A pressão arterial média e frequência cardíaca foram calculadas pelo software AcqKnowledge 3.8 a partir dos sinais de pressão arterial pulsátil (BIOPAC Systems, Goleta, EUA).

Após o transdutor de pressão ser acoplado à cânula arterial dos animais, procedeu-se com o registro até que os parâmetros cardiovasculares dos animais se mantivessem estáveis. Decorrido o período de estabilização, cerca de 100 µL de veículo e dos compostos foram injetados *in bolus* na cânula acoplada à veia femoral. As doses de BK-(1-9) e de seus metabólitos administradas em cada injeção foi de $2,5 \times 10^{-9}$, 5×10^{-9} ou 10^{-8} mol.

4.10 Avaliação de parâmetros inflamatórios mediados pela BK-(1-9) e seus metabólitos

O extravasamento plasmático e hipernocicepção mediados pela BK-(1-9) e seus metabólitos foram parâmetros escolhidos para avaliar o papel destes compostos na dinâmica inflamatória.

4.10.1 Protocolo de permeabilidade vascular

O azul de Evans é um cromóforo com altas taxas de ligação à albumina e, conseqüentemente, é ampla e rapidamente distribuído quando injetado sistemicamente. Este cromóforo é rotineiramente utilizado em protocolos por quais se objetiva analisar a extensão do extravasamento plasmático mediado por algum composto de interesse pela sua relativa facilidade de utilização e baixo custo (WICK *et al.*, 2018).

Para avaliar se a BK-(1-9) e seus metabólitos promovem extravasamento plasmático, camundongos de 8 a 12 semanas receberam 100 µL de solução de azul de Evans (Merck, Darmstadt, Alemanha) a 2%, diluída em salina, por via retro-orbital. Imediatamente após a administração do cromóforo, uma dose de BK-(1-9) ou de seus metabólitos a 10^{-8} mol foi administrada, por via intradérmica, no coxim plantar traseiro dos animais. Na pata contralateral da administração dos compostos, foi administrada salina como controle.

Trinta minutos após as injeções, os animais foram sacrificados e o coxim plantar de ambas patas foram retirados e acondicionados em tubos devidamente identificados. Os tecidos foram secados em estufa a 60°C por 24 horas e após o período de secagem, os tecidos foram pesados. A extração do azul de Evans dos tecidos procedeu-se pela adição de 100 µL de formamida (Merck, Darmstadt, Alemanha) em cada tubo. Os tubos foram mantidos em agitação constante por 72 horas. Decorrido o tempo, 50 µL da solução extraída mais 50 µL de formamida foram transferidas para uma placa de 96 poços. Considerou-se como branco a formamida. Uma curva de calibração de 1 mg.mL⁻¹ até 10⁻⁵ mg.mL⁻¹ foi realizada para fins quantitativos da quantidade de azul de Evans extravasado após a injeção dos compostos. Procedeu-se com a leitura da placa em um espectrofotômetro Synergy HT (Biotek, Winooski, EUA) no comprimento de onda de 620 nm. As leituras de absorbância foram normalizadas pela massa dos tecidos coletados para a expressão do resultado experimental.

4.10.2 *Protocolo de hipernocicepção*

Para avaliar se a BK-(1-9) e seus metabólitos induzem hipernocicepção, foi utilizado o protocolo de hipernocicepção por pressão crescente na pata de camundongos (AMARAL *et al.*, 2016). Brevemente, camundongos de 8 a 12 semanas foram submetidos a administrações de BK-(1-9) ou de seus metabólitos no coxim plantar traseiro, na dose de 10⁻⁸ mol, por via intradérmica. Na pata contralateral, foi administrada salina. Os animais foram individualmente transferidos para caixas de acrílico com assoalho de malha de arame para habituação por vinte minutos. Decorrido este tempo, o teste foi realizado.

Para a realização deste experimento foi utilizado um analgesímetro digital EFF302 (Insight Pesquisa e Ensino, Ribeirão Preto, Brasil), constituído por um transdutor de pressão que contém uma ponteira descartável em uma de suas extremidades para a estimulação pontual da área de interesse. Por meio desta ponteira, níveis crescentes de pressão foram aplicados no coxim plantar até que o animal apresentasse um reflexo de retirada quando a pressão aplicada lhe causasse dor. Cada animal foi submetido por cinco mensurações em cada pata e o maior e menor valor de pressão detectado foram excluídos. O resultado de cada condição experimental se dá pela média das três mensurações de pressão, expresso em gramas (g).

4.11 Avaliação da expressão dos receptores de bradicinina por reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR)

Para a análise de expressão gênica por PCR em tempo real, foram selecionados os genes explicitados pela **Tabela 2**. O RNA da aorta torácica de ratos adultos, de células U 87-MG, cardiomiócitos de ratos neonatos e de cardiomiócitos de camundongos adultos foram extraídos pelo método Trizol (Thermo Fisher, Waltham, EUA). O cDNA foi sintetizado a partir de 2µg de RNA total com Kit First Strand cDNA Synthesis (Thermo Fisher, Waltham, EUA) seguindo as especificações do fabricante.

A qPCR foi realizada em um sistema StepOnePlus Real-Time PCR (Applied Biosystems, Foster City, EUA). A reação para o protocolo de qPCR consistiu na adição do kit Maxima SYBR PCR 2x, de forma que a concentração final fosse de 1x (Thermo Fisher, Waltham, EUA), primers na concentração final de 6×10^{-7} mol.L⁻¹ e cDNA diluído na proporção 1:100 em água livre de RNase. O protocolo da corrida da qPCR foi composto por desnaturação à 95°C por 5 minutos, seguido por 50 ciclos de 1 minuto de anelamento/extensão à 60°C e 10 segundos de desnaturação à 95°C. A fluorescência foi detectada ao final de cada fase de extensão para quantificação dos genes. Para excluir a contaminação de produtos inespecíficos da PCR, tais como os dímeros de primer, a análise da curva de dissociação foi aplicada a todos os produtos ao final da ciclagem. O cálculo da expressão gênica foi realizado utilizando-se o $2^{-\Delta Ct}$, com o gene S26 como normalizador (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001).

Tabela 2 – Sequência de primers utilizados para qPCR

| Gene | Direção | Sequência | Espécie |
|--------|---------|------------------------|------------|
| Bdkrb1 | Foward | CAGCCCTCTAACCGAAGC | Rato |
| Bdkrb1 | Reverse | CGATACAGCAGGTCCCAGTC | Rato |
| Bdkrb2 | Foward | AGAGAGAGGCCCTCAGTTGCT | Rato |
| Bdkrb2 | Reverse | TGGAATTGTGAGGGAGATGCT | Rato |
| Bdkrb1 | Foward | AATGCTACGGCCTGTGACAAT | Humano |
| Bdkrb1 | Reverse | ATTTCTGCCACGTTTCAGTTGC | Humano |
| Bdkrb2 | Foward | CCGAAAGAAGTCTTGGGAGGT | Humano |
| Bdkrb2 | Reverse | CTGGCGTTCCACGGAGATG | Humano |
| Bdkrb1 | Foward | CAGCCCTCTAACCGAAGC | Camundongo |
| Bdkrb1 | Reverse | CGATACAGCAGGTCCCAGTC | Camundongo |
| Bdkrb2 | Foward | AGAGAGAGGCCCTCAGTTGCT | Camundongo |
| Bdkrb2 | Reverse | TGGAATTGTGAGGGAGATGCT | Camundongo |
| S26 | Foward | CGTGCTTCCCAAGCTCTATGT | R/H/C |
| S26 | Reverse | CGATTCTGACAACCTTGCTATG | R/H/C |

Legenda: Sequência dos primers derivados de genes do receptor B1, B2 e S26 de rato, humano e camundongo. R/H/C – Para ratos, humanos e camundongos.

4.12 Análise estatística

As análises estatísticas dos dados obtidos foram realizadas pelo GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, San Diego, EUA), por onde considerou-se $p < 0,05$ como estatisticamente significativa. Valores expressos pela média \pm erro padrão. Detalhes dos testes estatísticos, bem como dos pós-testes realizados estão explicitados nas legendas dos gráficos ao longo do texto.

5 RESULTADOS

5.1 Síntese, purificação e caracterização da BK-(1-9), BK-(1-5) e Lys-(des-Arg⁹, Leu⁸)-BK

A síntese de peptídeos com sequências corretas e purezas elevadas são indispensáveis para a correta avaliação da atividade dos metabólitos da BK-(1-9). A síntese em fase sólida dos três peptídeos ocorreu sem maiores problemas, assim como a purificação e caracterização. Os detalhes de síntese, purificação e caracterização de cada peptídeo está explicitado a seguir.

5.1.1 Detalhes da síntese, purificação e caracterização da BK-(1-9)

Os detalhes dos reagentes utilizados na síntese da BK-(1-9) seguem na **Tabela 3**, contendo as massas teóricas e massas pesadas, além da quantidade de DIPEA utilizada. Os aminoácidos estão na ordem de acoplamento.

Tabela 3 – Síntese da BK-(1-9)

| AA | AA _t (mg) | AA _p (mg) | HOBt _t (mg) | HOBt _p (mg) | HBTU _t (mg) | HBTU _p (mg) | DIPEA (µL) |
|-----|-------------------------|-------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------|
| Phe | 146,15 | 146,12 | 57,76 | 58,80 | 140,24 | 139,02 | 79 |
| Pro | 127,29 | 126,60 | 57,76 | 56,83 | 140,24 | 142,27 | 79 |
| Ser | 144,65 | 145,91 | 57,76 | 58,13 | 140,24 | 141,02 | 79 |
| Phe | 146,15 | 146,04 | 57,76 | 56,93 | 140,24 | 140,57 | 79 |
| Gly | 112,16 | 111,40 | 57,76 | 56,92 | 140,24 | 141,65 | 79 |
| Pro | 127,29 | 126,97 | 57,76 | 57,40 | 140,24 | 140,13 | 79 |
| Pro | 127,29 | 128,29 | 57,76 | 57,17 | 140,24 | 141,18 | 79 |
| Arg | 244,77 | 246,97 | 57,76 | 57,87 | 140,24 | 140,65 | 79 |

Legenda: AA – aminoácido; AA_t – massa de aminoácido teórica; AA_p – massa de aminoácido pesada; HOBt_t – massa de HOBt teórica; HOBt_p – massa de HOBt pesada; HBTU_t – massa de HBTU teórica; HBTU_p – massa de HBTU pesada.

Partindo do planejamento da síntese de 80 mg de BK-(1-9), ao final da clivagem do peptídeo da resina obteve-se uma massa de produto bruto de cerca de 69,56 mg, correspondendo ao rendimento bruto de 86,95%. No cromatograma do processo de purificação da BK-(1-9), um pico intenso foi eluído em cerca de 16,09 minutos. Como houve a presença de um pico não resolvido juntamente com o pico majoritário,

coletou-se somente a metade superior do pico. Esta medida foi tomada para minimizar a contaminação por subprodutos indesejados. O cromatograma representativo do processo de purificação da BK-(1-9) está explicitado na **Figura 5**.

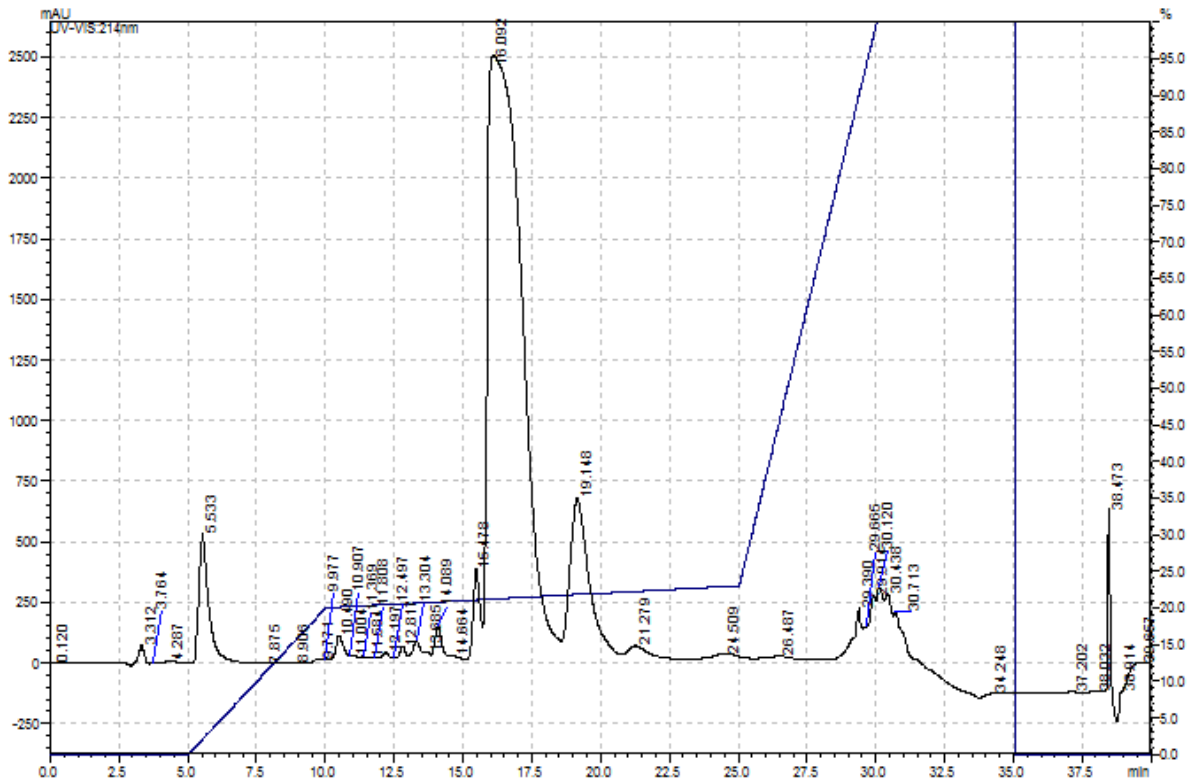


Figura 5 – Cromatograma do processo de purificação da BK-(1-9): Perfil cromatográfico de purificação da BK-(1-9). No eixo y, à esquerda, intensidade de absorvância no comprimento de onda de 214nm. No eixo y, à direita, graduação da concentração da fase móvel B, constituída de 0,1% de TFA em acetonitrila grau cromatográfico. No eixo x, tempo em minutos. A linha azul demonstra o programa de eluição utilizado no processo de purificação.

Para verificar a eficiência do processo de síntese e purificação, a fração correspondente ao pico majoritário teve sua identidade analisada por espectrometria de massa. O espectro de massa, explicitado pela **Figura 6A**, resultou em algumas relações m/z , porém o íon mais intenso $1061,078 [M+H]^+$, com massa experimental de $1060,070$, corresponde a massa molecular teórica da BK-(1-9), de $1060,56$ Da. Neste espectro foi, também, possível identificar adutos de Na^+ e K^+ , com relações m/z de $1077,109$ e $1083,111$, respectivamente. Tais íons são frequentemente identificados em espectros de massa do tipo MALDI TOF e correspondem ao íon do peptídeo acrescido de Na^+ e K^+ . Apesar de ainda haver alguns íons contaminantes na amostra purificada, representados pelos íons com relação m/z menor que da BK-(1-9) ($1061,078$ m/z), o íon correspondente à massa molecular da BK-(1-9) possui

intensidade muito superior e dominante em relação às outras, demonstrando que o processo de purificação foi eficaz. A **Figura 6B** explicita a fragmentação da relação m/z 1061,078, por onde foi possível identificar que o composto purificado era, de fato, a BK-(1-9).

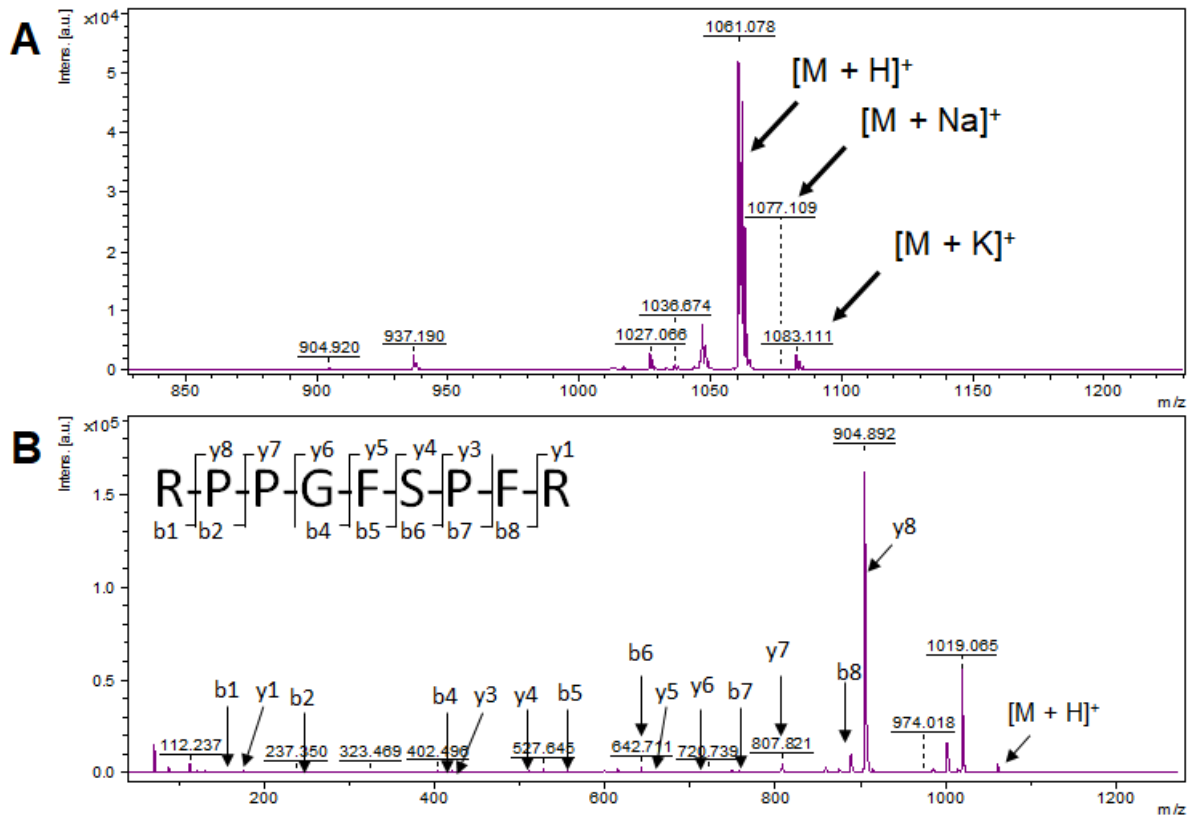


Figura 6 – Espectro de massa e espectro de massa em tandem do pico majoritário da purificação da BK-(1-9): Espectros de massa obtidos a partir da coleta da porção superior do pico majoritário no processo de purificação. Em **A** espectro de massa e em **B** espectro de massa em *tandem*. Eixo y representa a intensidade do íon em unidades arbitrárias e o eixo x representa a relação massa-carga (m/z).

5.1.2 Detalhes da síntese, purificação e caracterização da BK-(1-5)

A **Tabela 4** sumariza os reagentes e quantidades utilizadas para a síntese da BK-(1-5). Os aminoácidos explicitados estão na ordem de acoplamento.

Tabela 4 – Síntese da BK-(1-5)

| AA | AA _t (mg) | AA _p (mg) | HOB _t (mg) | HOB _p (mg) | HBTU _t (mg) | HBTU _p (mg) | DIPEA (μ L) |
|-----|-------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------|
| Gly | 129,79 | 132,62 | 66,83 | 65,84 | 162,27 | 162,02 | 92 |
| Pro | 147,29 | 147,31 | 66,83 | 66,08 | 162,27 | 161,21 | 92 |

| | | | | | | | |
|-----|--------|--------|-------|-------|--------|--------|----|
| Pro | 147,29 | 146,01 | 66,83 | 66,78 | 162,27 | 161,87 | 92 |
| Arg | 283,23 | 281,79 | 66,83 | 67,96 | 162,27 | 161,84 | 92 |

Legenda: AA – aminoácido; AA_t – massa de aminoácido teórica; AA_p – massa de aminoácido pesada; HOB_t – massa de HOBt teórica; HOB_p – massa de HOBt pesada; HBTU_t – massa de HBTU teórica; HBTU_p – massa de HBTU pesada.

A síntese da BK-(1-5) foi planejada de forma a se obter, teoricamente, 50 mg de produto. Após a clivagem do peptídeo, obteve-se 50,49 mg de produto, correspondendo a um rendimento bruto de 100,98%. O alto rendimento provavelmente foi causado por um processo ineficiente de secagem do produto bruto nos passos finais da clivagem. O cromatograma do processo de purificação da BK-(1-5), explicitado pela **Figura 7**, explicita um pico majoritário eluído a 19,37 minutos. Coletou-se o pico majoritário em sua totalidade.

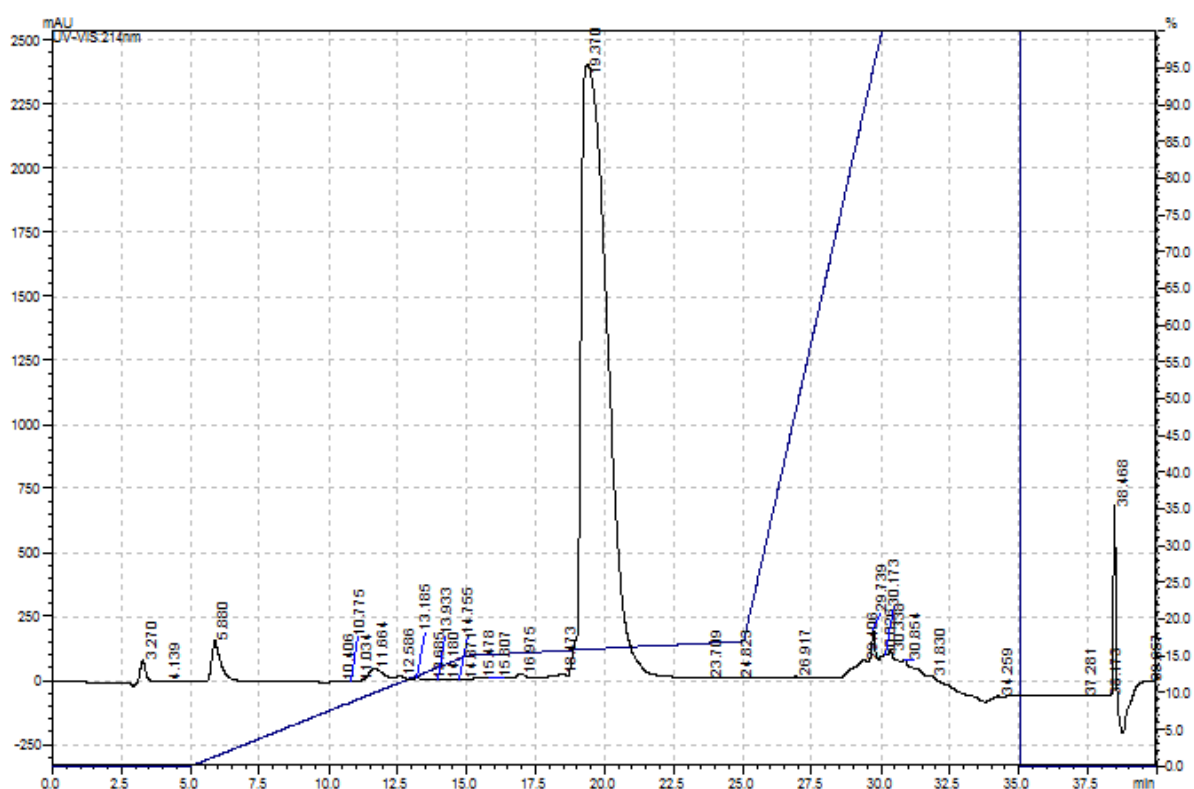


Figura 7 - Cromatograma do processo de purificação da BK-(1-5): Perfil cromatográfico de purificação da BK-(1-5). No eixo y, à esquerda, intensidade de absorvância no comprimento de onda de 214nm. No eixo y, à direita, graduação da concentração da fase móvel B, constituída de 0,1% de TFA em acetonitrila grau cromatográfico. No eixo x, tempo em minutos. A linha azul demonstra o programa de eluição utilizado no processo de purificação.

O pico majoritário do processo de purificação da BK-(1-5) teve sua identidade analisada por espectrometria de massa para verificação da eficiência de síntese e

purificação do produto. O espectro de massa, representado pela **Figura 8A**, explicita uma relação m/z majoritária de 573,603, correspondendo à massa molecular de 572,595 Da, similar a massa molecular teórica da BK-(1-5), de 572,310 Da. Além dessa relação m/z , somente outras duas foram identificadas, correspondendo aos adutos de Na^+ e K^+ , com as m/z de 595,594 e 617,575, respectivamente. A pureza obtida desse produto foi bastante elevada, visto que somente relações m/z correspondentes às espécimes do íon majoritário foram identificadas. A fragmentação da relação m/z de 573,603, explicitada pela **Figura 8B**, confirma a identidade da BK-(1-5).

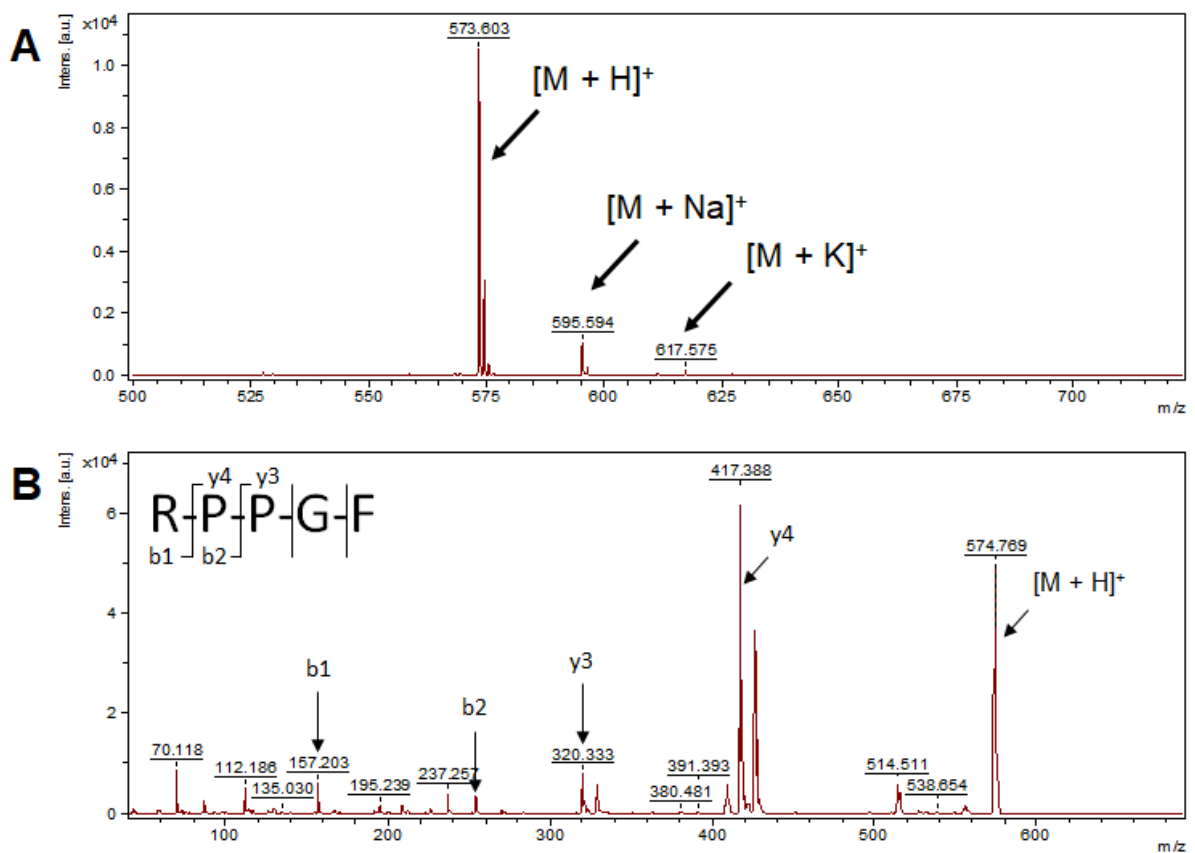


Figura 8 - Espectro de massa e espectro de massa em tandem do pico majoritário da purificação da BK-(1-5): Espectros de massa obtidos a partir da coleta do pico majoritário no processo de purificação. Em **A** espectro de massa e em **B** espectro de massa em *tandem*. Eixo y representa a intensidade do íon em unidades arbitrárias e o eixo x representa a relação massa-carga (m/z)

5.1.3 Detalhes da síntese, purificação e caracterização da Lys-(des-Arg⁹, Leu⁸)-BK

Para a síntese da Lys-(des-Arg⁹, Leu⁸)-BK foram utilizado os seguintes reagentes nas quantidades explicitadas pela **Tabela 5**. Os aminoácidos estão na ordem do acoplamento.

Tabela 5 – Síntese da Lys-(des-Arg⁹, Leu⁸)-BK

| AA | AA _t (mg) | AA _p (mg) | HOBt _t (mg) | HOBt _p (mg) | HBTU _t (mg) | HBTU _p (mg) | DIPEA (μL) |
|-----|-------------------------|-------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------|
| Pro | 133,07 | 134,12 | 60,39 | 60,26 | 146,60 | 144,97 | 82 |
| Ser | 151,28 | 150,34 | 60,39 | 60,25 | 146,60 | 145,14 | 82 |
| Phe | 152,79 | 151,49 | 60,39 | 60,46 | 146,60 | 145,74 | 82 |
| Gly | 117,25 | 115,26 | 60,39 | 61,52 | 146,60 | 145,45 | 82 |
| Pro | 133,07 | 130,28 | 60,39 | 59,55 | 146,60 | 143,86 | 82 |
| Pro | 133,07 | 133,41 | 60,39 | 59,30 | 146,60 | 144,60 | 82 |
| Arg | 255,89 | 254,70 | 60,39 | 61,30 | 146,60 | 144,10 | 82 |
| Lys | 184,78 | 184,16 | 60,39 | 59,89 | 146,60 | 147,26 | 82 |

Legenda: AA – aminoácido; AA_t – massa de aminoácido teórica; AA_p – massa de aminoácido pesada; HOBt_t – massa de HOBt teórica; HOBt_p – massa de HOBt pesada; HBTU_t – massa de HBTU teórica; HBTU_p – massa de HBTU pesada.

Planejou-se a síntese de Lys-(des-Arg⁹, Leu⁸)-BK para obtenção de 80 mg. Ao final da clivagem, obteve-se cerca de 69,03 mg, correspondendo ao rendimento bruto de 86,29%. Com o cromatograma do processo de purificação da Lys-(des-Arg⁹, Leu⁸)-BK, explicitado pela **Figura 9**, é possível observar que o pico principal é sobreposto por um pico menos intenso. A metade superior do pico majoritário, com tempo de retenção de 14,8 minutos, foi coletado. Essa medida foi tomada para evitar contaminação por subprodutos indesejáveis.

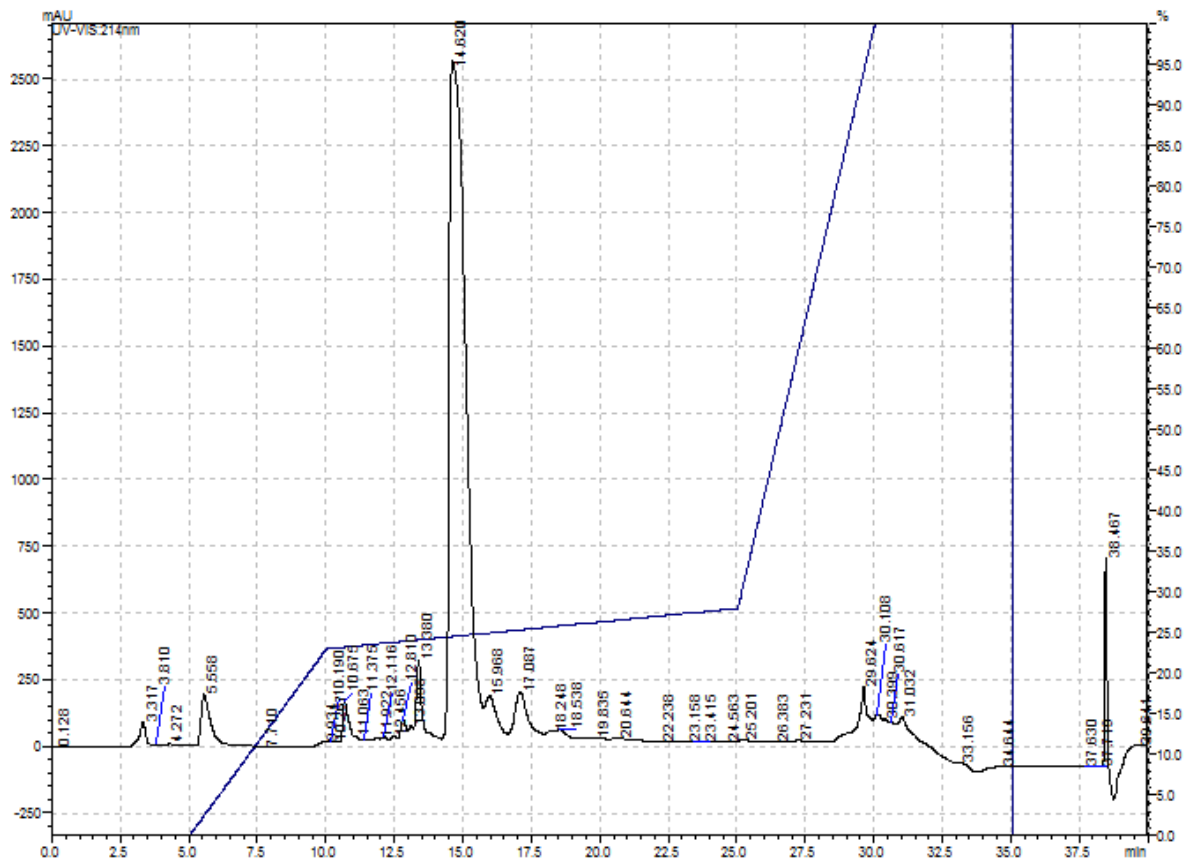


Figura 9 - Cromatograma do processo de purificação da Lys-(des-Arg⁹, Leu⁸)-BK: Perfil cromatográfico de purificação da Lys-(des-Arg⁹, Leu⁸)-BK. No eixo y, à esquerda, intensidade de absorbância no comprimento de onda de 214nm. No eixo y, à direita, graduação da concentração da fase móvel B, constituída de 0,1% de TFA em acetonitrila grau cromatográfico. No eixo x, tempo em minutos. A linha azul demonstra o programa de eluição utilizado no processo de purificação.

A eficiência do processo de síntese e purificação da Lys-(des-Arg⁹, Leu⁸)-BK, foi avaliada por espectrometria de massa. O espectro de massa, explicitado pela **Figura 10A**, demonstra três relações m/z, sendo a majoritária correspondente à 999,018 [M+H]⁺. As outras duas relações m/z corresponde aos adutos de Na⁺ e K⁺, com relações m/z de 1021,019 e 1037,005. Esta análise reflete ao alto grau de pureza atingido pelo processo de purificação. A fragmentação da relação m/z correspondente a 999,018 confirma a identidade da Lys-(des-Arg⁹, Leu⁸)-BK, explicitada pela **Figura 10B**.

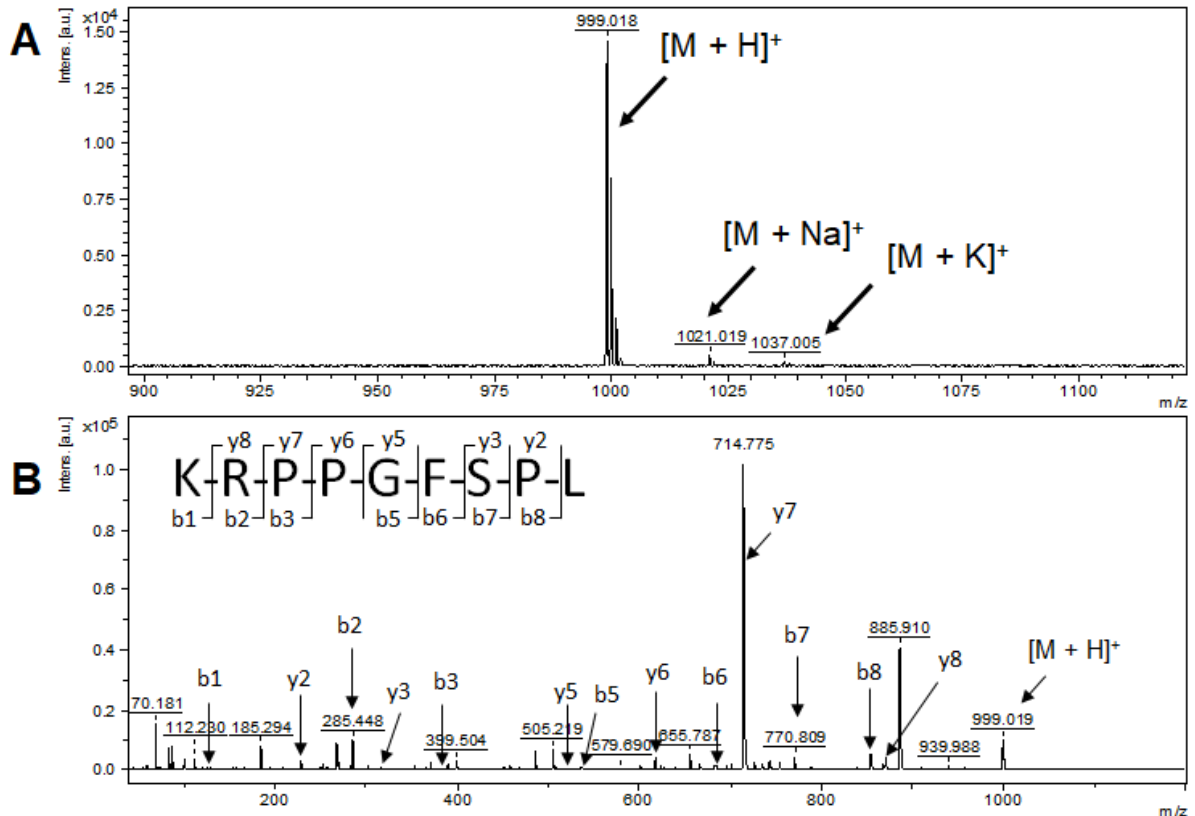


Figura 10 - Espectro de massa e espectro de massa em tandem do pico majoritário da purificação da Lys-(des-Arg9, Leu8)-BK: Espectros de massa obtidos a partir da coleta do meio pico majoritário no processo de purificação. Em **A** espectro de massa e em **B** espectro de massa em *tandem*. Eixo y representa a intensidade do íon em unidades arbitrárias e o eixo x representa a relação massa-carga (m/z).

5.2 Atividade dos metabólitos de BK-(1-9) sob a produção de NO em cultura celular

Como discutido anteriormente, o NO é um dos principais mediadores das ações da BK. Devido à similaridade estrutural dos metabólitos estudados, foi avaliado se estas moléculas também poderiam levar ao aumento da produção de NO em modelo *in vitro*.

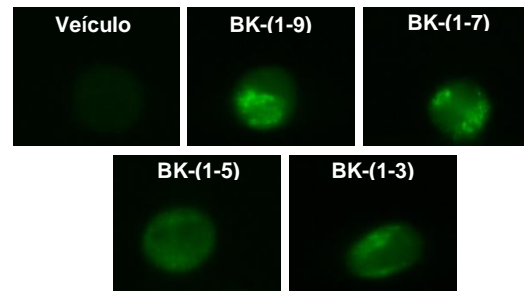
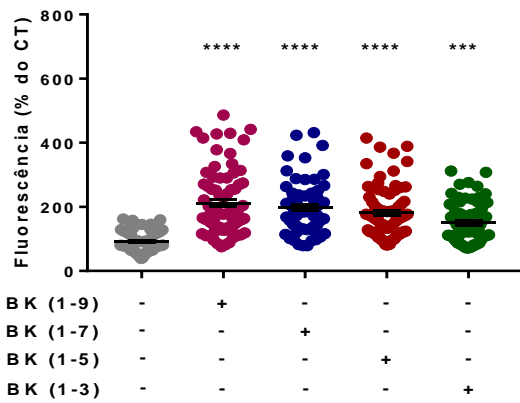
5.2.1 Avaliação da atividade dos metabólitos da BK em células de três espécies diferentes

Desejou-se avaliar, primeiramente, se os metabólitos da BK-(1-9) teriam atividade nas principais espécies utilizadas em estudos farmacológicos. O motivo da escolha dos tipos celulares em específico foi devida a alta expressão dos receptores de BK-(1-9), como no caso da célula de glioblastoma humano U 87-MG (UHLÉN *et al.*,

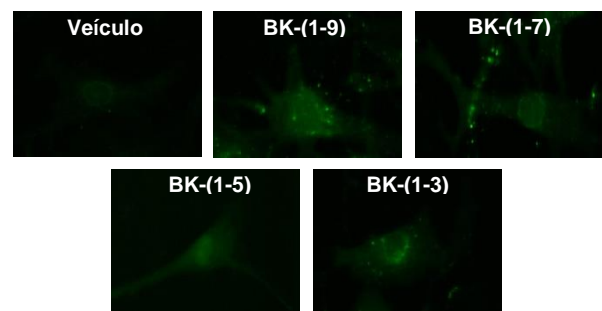
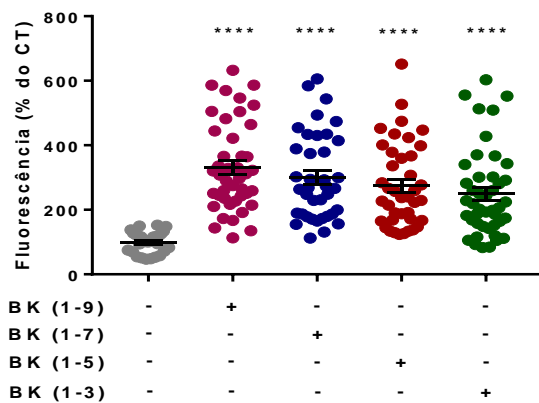
2015) e pela relevância da ação da BK-(1-9) no tecido cardíaco, como no caso de cardiomiócitos isolados de camundongos e ratos (MANOLIS *et al.*, 2010).

Quando incubada às células por 15 minutos, na concentração final de 10^{-7} mol.L⁻¹, a BK-(1-9) promove o aumento significativo da produção de NO em todas as células testadas, como esperado. Surpreendentemente quando os metabólitos da BK-(1-9) estudados foram incubados às células nas mesmas condições, também houve aumento significativo da produção de NO. A **Figura 11** sumariza os resultados obtidos. Estes dados indicam que os metabólitos da BK-(1-9) testados são ativos, ao menos em modelos *in vitro*, nos organismos mais relevantes rotineiramente utilizados em estudos farmacológicos.

A



B



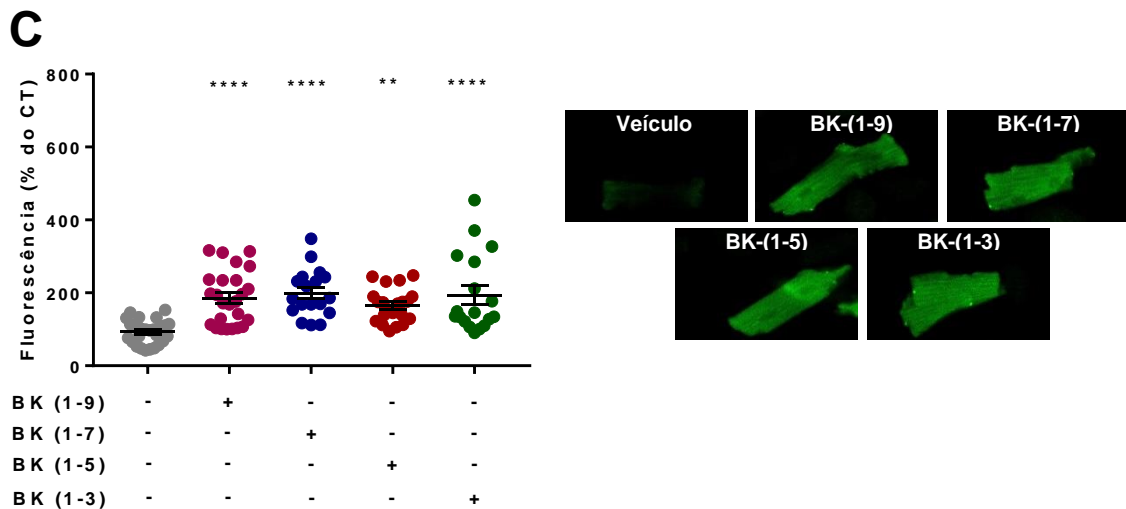


Figura 11 – Produção de NO mediada pela BK-(1-9) e seus metabólitos em células humanas, de rato e camundongos: Quantificação da produção de NO e imagens representativas de cada condição, em células de: (A) glioblastoma humano U 87-MG; (B) cardiomiócitos de ratos neonatos e; (C) cardiomiócitos de camundongos adultos após estimulação pela BK-(1-9) e seus metabólitos na concentração final de 10^{-7} mol.L⁻¹. Cada símbolo representa a fluorescência de cada célula analisada, originadas de três experimentos diferentes. A análise estatística foi realizada pelo teste One-Away ANOVA com teste *post-hoc* múltipla comparação de Tukey. ** $p < 0,01$ em relação ao controle. *** $p < 0,001$ em relação ao controle. **** $p < 0,0001$ em relação ao controle. Dados expressos pela média \pm erro padrão, n=3.

A **Figura 12** resume os achados da análise da transcrição gênica dos receptores e BK-(1-9) em células de glioblastoma humano (U 87-MG), cardiomiócitos de ratos neonatos e cardiomiócitos de camundongos adultos. Como demonstrado na **Figura 12A**, os mRNA para receptores de BK-(1-9) são altamente expressos em U 87-MG, com a expressão do receptor B1 quase duas vezes mais proeminente. Em cardiomiócitos de rato neonato e de camundongos adultos (**Figuras 12B e C**, respectivamente), foi possível identificar a expressão do mRNA do receptor B2, mesmo que em baixas taxas quando comparada às taxas observadas em U 87-MG, enquanto a expressão do receptor B1 nestas células não parece ser significativa.

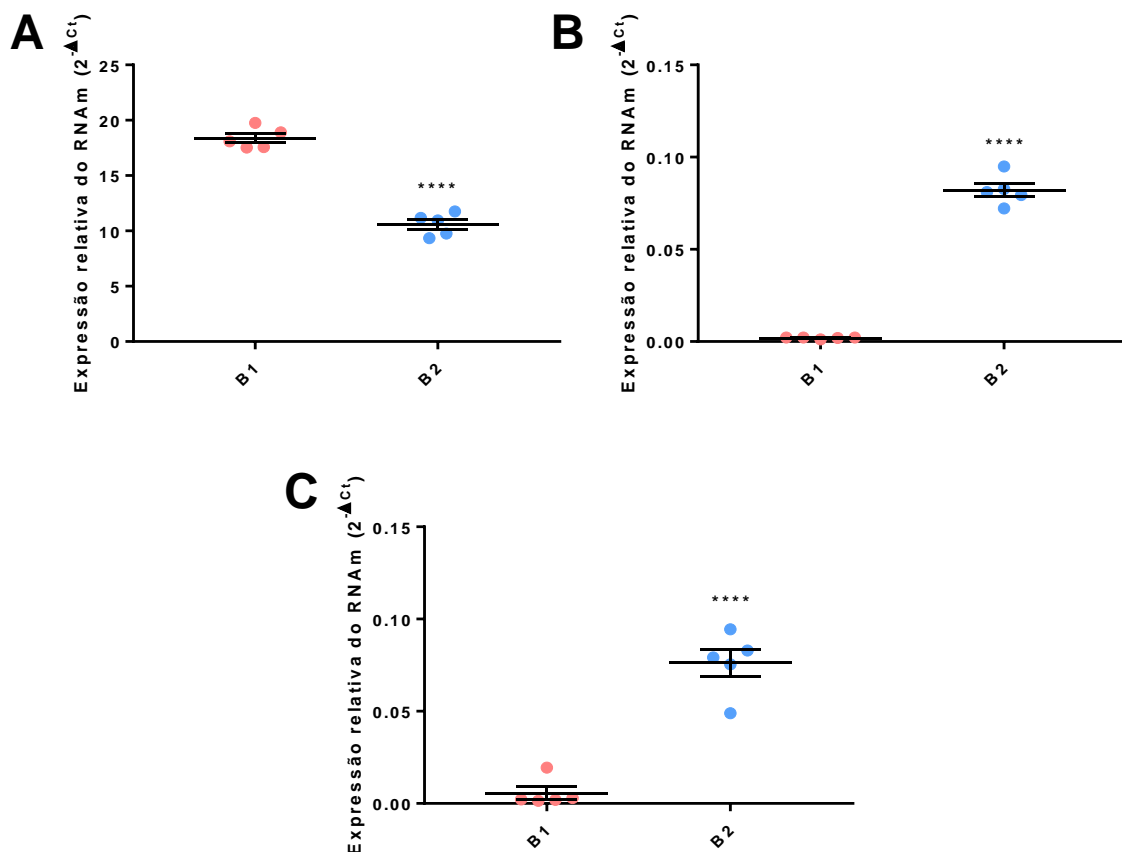


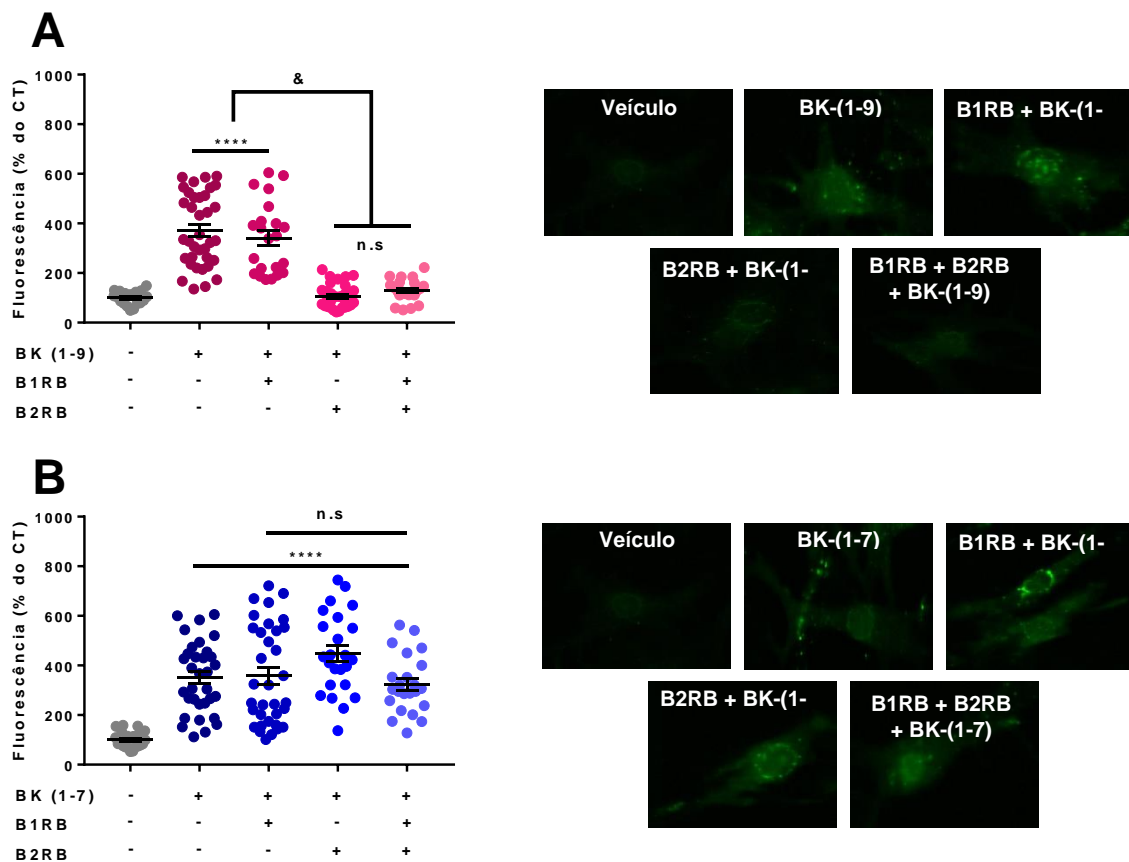
Figura 12 – Expressão de mRNA dos receptores de BK-(1-9) em células de humano, rato e camundongo: Análise da expressão relativa dos MRNA dos receptores B1 e B2 em células de glioblastoma humano (U 87-MG) (A), cardiomiócito de ratos neonatos (B) e cardiomiócito de camundongos adultos (C), respectivamente, utilizando o transcrito do gene S26 como normalizador. A análise estatística foi realizada pelo teste-t não pareado. **** $p < 0,0001$. Dados expressos pela média \pm erro padrão, $n=3$.

5.2.2 Relevância dos receptores de BK-(1-9) na produção de NO mediada pelos metabólitos da BK-(1-9)

Devido à similaridade estrutural entre os metabólitos da BK-(1-9) com a própria BK-(1-9), especulou-se que estes peptídeos poderiam agir via receptores de bradicinina. Antagonistas seletivos do receptor B1 (Lys-(des-Arg⁹, Leu⁸)-BK), B2 (HOE-140) ou uma mistura desses foram pré-incubados às células para avaliar a dependência desses receptores na produção de NO mediada pelos metabólitos de BK-(1-9).

Em cardiomiócitos de ratos neonatos, a pré-incubação com o antagonista seletivo do receptor B2 ou uma mistura dos antagonistas seletivos dos receptores B1 e B2 bloqueou a produção de NO mediada pela BK-(1-9), enquanto a pré-incubação do antagonista seletivo do receptor B1 não promoveu alteração desta resposta. Como

esperado, esses resultados sugerem que a BK-(1-9) age seletivamente via receptor B2 para induzir à produção de NO. É importante ressaltar que não pudemos detectar a expressão do mRNA do receptor B1, como representado pela **Figura 12B**, sugerindo que o receptor B1 não é expresso nesse tipo celular. Já a pré-incubação com os antagonistas seletivos dos receptores de BK-(1-9), ou uma mistura deles, não promoveu a alteração da resposta dos metabólitos da BK-(1-9) testados, indicando que estas moléculas não agem pelos receptores clássicos de BK-(1-9). A **Figura 13** sumariza esses achados. Em células de glioblastoma humano (U 87-MG), o antagonismo dos receptores de BK-(1-9) levou ao mesmo perfil de resposta observado em cardiomiócitos de ratos neonatos, por onde a resposta da BK-(1-9) foi abolida somente pelo antagonismo dos receptores B2 enquanto a resposta dos metabólitos de BK-(1-9) não foi alterada pelos antagonistas seletivos dos receptores de BK-(1-9). Os receptores de BK-(1-9) são altamente expressos nessa linhagem celular, comprovando assim que a BK-(1-9) age seletivamente pelos receptores B2 e sugerindo que os metabólitos de BK-(1-9) induzem a produção de NO por outros receptores que não os de BK-(1-9). Estes achados estão explicitados na **Figura 14**.



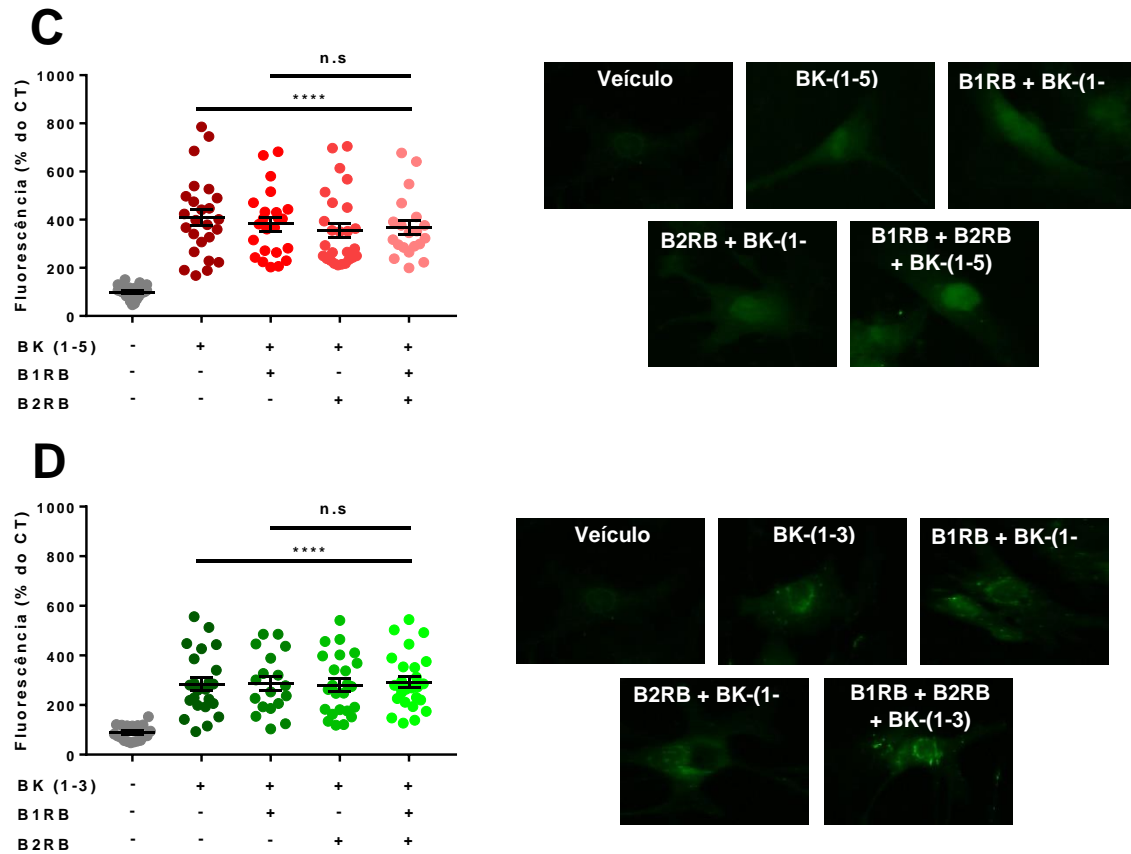


Figura 13 – Antagonistas seletivos dos receptores de bradicinina e a produção de NO por metabólitos da BK-(1-9) em cardiomiócitos de ratos neonatos: Quantificação da produção de NO e imagens representativas em cada condição utilizando cardiomiócitos de ratos neonatos. Os cardiomiócitos foram pré-incubados com antagonistas seletivos dos receptores de bradicinina na concentração final de 10^{-7} mol.L $^{-1}$ e então estimulados com a BK-(1-9) ou seus metabólitos, também na concentração final de 10^{-7} mol.L $^{-1}$. B1RB – antagonista seletivo do receptor B1, Lys-(des-Arg 9 , Leu 8)-BK; B1RB antagonista seletivo do receptor B2, HOE-140; B1RB + B2RB – mistura equimolar dos antagonistas seletivos dos receptores B1 e B2. Cada símbolo nos gráficos representa a fluorescência de uma célula, originadas de três experimentos diferentes. A análise estatística foi realizada pelo teste One-Away ANOVA com teste *post-hoc* múltipla comparação de Tukey. **** $p < 0,0001$ em relação ao controle. & $p < 0,0001$ em relação à BK-(1-9) e B1RB + BK-(1-9). n.s não significativo em relação à BK-(1-3), BK-(1-5) ou BK-(1-7), em seus respectivos gráficos. Dados expressos pela média \pm erro padrão.

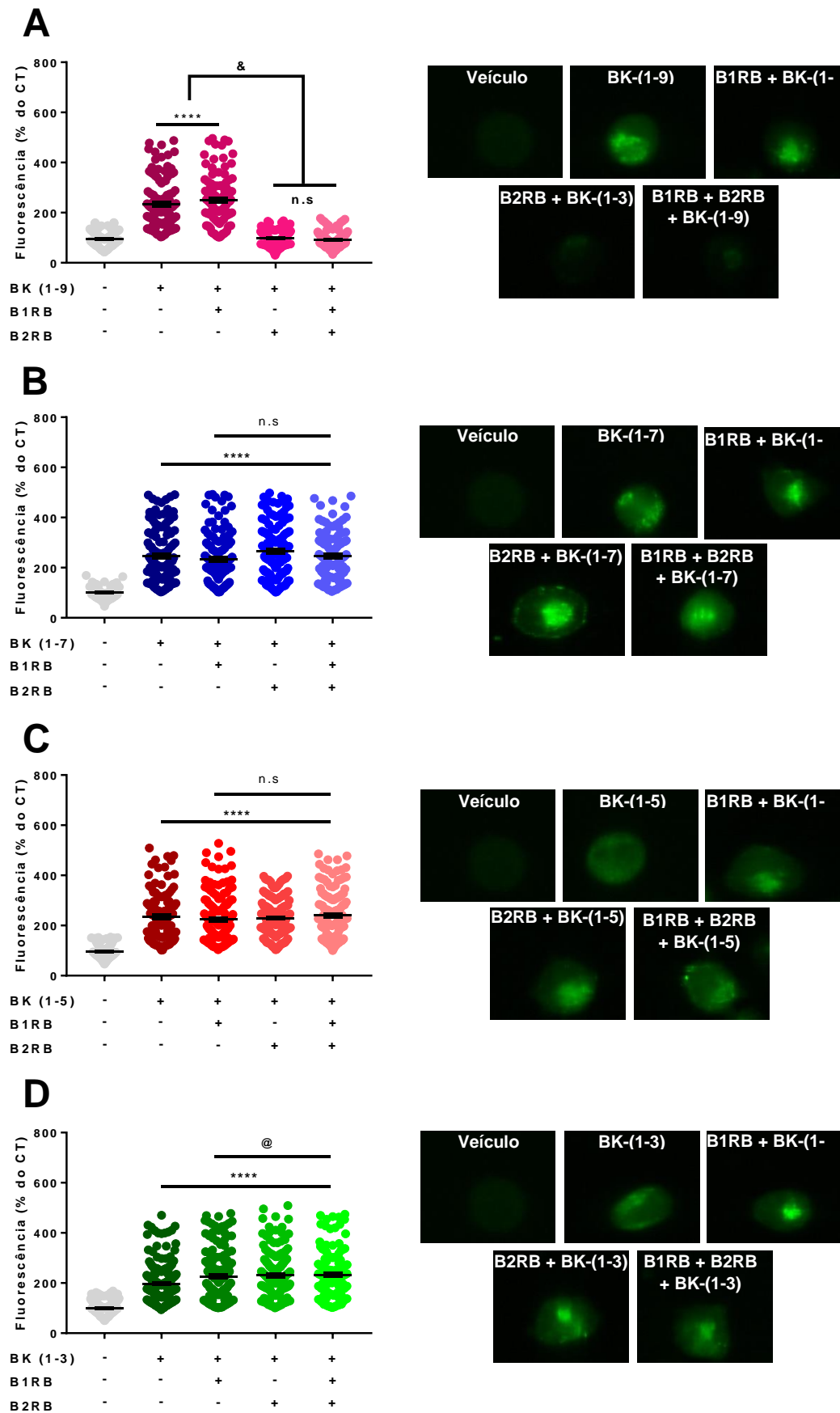
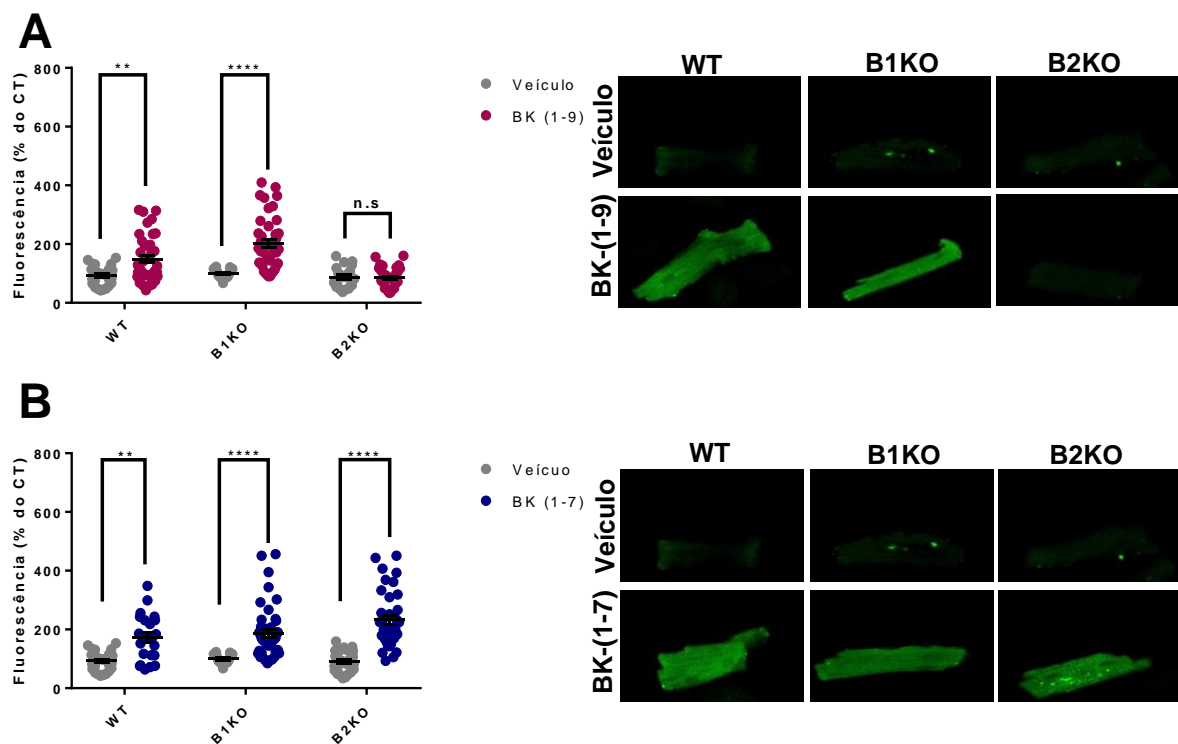


Figura 14 – Antagonistas seletivos dos receptores de bradicinina e a produção de NO por metabólitos da BK-(1-9) em U 87-MG: Quantificação da produção de NO e imagens representativas

em cada condição utilizando U-87 MG. As células foram pré-incubados com antagonistas seletivos dos receptores de BK-(1-9), na concentração final de 10^{-7} mol.L⁻¹, e então estimulados com a BK-(1-9) ou seus metabólitos também na concentração final de 10^{-7} mol.L⁻¹. B1RB – antagonista seletivo do receptor B1, Lys-(des-Arg⁹, Leu⁸)-BK; B2RB antagonista seletivo do receptor B2, HOE-140; B1RB + B2RB – mistura equimolar dos antagonistas seletivos dos receptores B1 e B2. Cada símbolo nos gráficos representa a fluorescência de uma célula, originadas de três experimentos diferentes. A análise estatística foi realizada pelo teste One-Away ANOVA com teste *post-hoc* múltipla comparação de Tukey. **** $p < 0,0001$ em relação ao controle. & $p < 0,0001$ em relação à BK-(1-9) e B1RB + BK-(1-9). n.s não significativo em relação à BK-(1-3), BK-(1-5) ou BK-(1-7), em seus respectivos gráficos. @ $p < 0,05$ em relação à BK-(1-3). Dados expressos pela média \pm erro padrão.

A fim de se confirmar os resultados obtidos utilizando antagonistas seletivos para os receptores de BK-(1-9), procedeu-se com a quantificação de NO em cardiomiócitos de camundongos adultos selvagens (WT) e *knockout* (KO) para o receptor B1 ou B2. A produção de NO mediada pela BK-(1-9) foi abolida em camundongos *knockout* para o receptor B2, enquanto a resposta nos animais *knockout* para o receptor B1 não foi afetada. As respostas da BK-(1-7), BK-(1-5) e BK-(1-3) não foram afetadas nos camundongos *knockout* para o receptor B1 e B2, corroborando os indícios de que os metabólitos da BK-(1-9) testados não agem via receptores clássicos de BK-(1-9). Os resultados estão sumarizados na **Figura 15**.



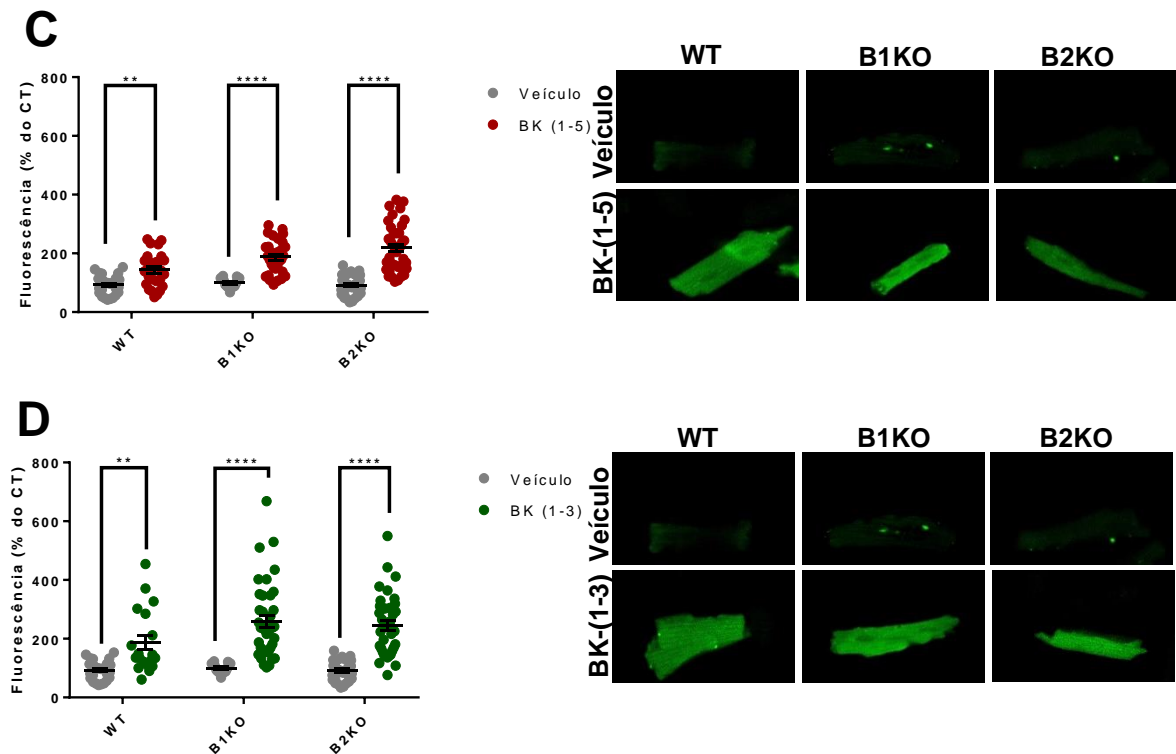


Figura 15 – A produção de NO mediada pela BK-(1-9) e seus metabólitos em cardiomiócitos de camundongos knockout: Quantificação de NO e imagens representativas de cada condição utilizando cardiomiócitos de camundongos selvagens e geneticamente modificados, onde os genes dos receptores B1 ou B2 estão deletados, com pré-incubação com BK-(1-9) ou um de seus metabólitos a 10^{-7} mol.L⁻¹. Cada símbolo representa a fluorescência de uma célula analisada, originadas de três experimentos diferentes. WT – animais selvagens; B1KO – animais *knockout* para o receptor B1; B2KO – animais *knockout* para o receptor B2. A análise estatística foi realizada pelo teste One-Away ANOVA com teste *post-hoc* múltipla comparação de Tukey. ** $p < 0,01$ em relação ao veículo. **** $p < 0,0001$ em relação ao veículo. n.s não significativo em relação ao veículo. Dados expressos pela média \pm erro padrão.

Coletivamente, os resultados obtidos com testes farmacológicos *in vitro* utilizando tanto antagonistas seletivos quanto animais *knockout* para os receptores B1 e/ou B2 indicam o envolvimento de outros receptores, que não os de BK-(1-9), para a indução da produção de NO *in vitro*. Como esperado, a BK-(1-9) nas condições experimentais possui ação seletiva sob o receptor B2.

5.3 Avaliação dos efeitos vasomotores da BK-(1-9) e de seus metabólitos

A importância do NO na promoção da vasodilatação mediada pela BK-(1-9), bem como por outras moléculas, é bem estabelecida há vários anos, conforme discutido anteriormente. Como os metabólitos da BK-(1-9) também foram capazes de induzir a

produção de NO em modelo *in vitro*, há a possibilidade de que estas moléculas possam induzir, também, à vasodilatação.

5.3.1 Padronização da tensão passiva e concentração de fenilefrina

Antes de se proceder com testes onde a vasomotricidade induzida pela BK-(1-9) e seus metabólitos fosse analisada, alguns parâmetros inerentes ao experimento precisam ser padronizados. A tensão passiva pela qual o anel de aorta é submetido durante todo o experimento é amplamente variável devido a idade e linhagem do animal utilizado. Estes fatores também impactam a concentração de agente vasoconstritor utilizado. Desta forma, não é incomum estudos utilizarem concentrações de vasoconstritor e tensão passiva diferentes, emergindo a necessidade de padronização (RAMESHRAD *et al.*, 2016).

Primeiramente procedeu-se com a padronização da tensão passiva pela qual o anel de aorta de rato seria submetido durante todo o experimento. O resultado obtido está representado pela **Figura 16**. Uma curva de tensão passiva por resposta à incubação de $6 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ de KCl foi realizada para que fosse estabelecido a tensão passiva mínima para obtenção da máxima contração dos anéis de aorta. Após uma regressão não linear dos dados obtidos, foi estabelecido que a tensão passiva mínima para gerar a contração máxima foi de $1,66 \pm 0,05 \text{ g}$. Desta forma, os anéis de aorta em todos os experimentos subsequentes foram submetidos a uma tensão passiva de 1,60 a 1,70 g.

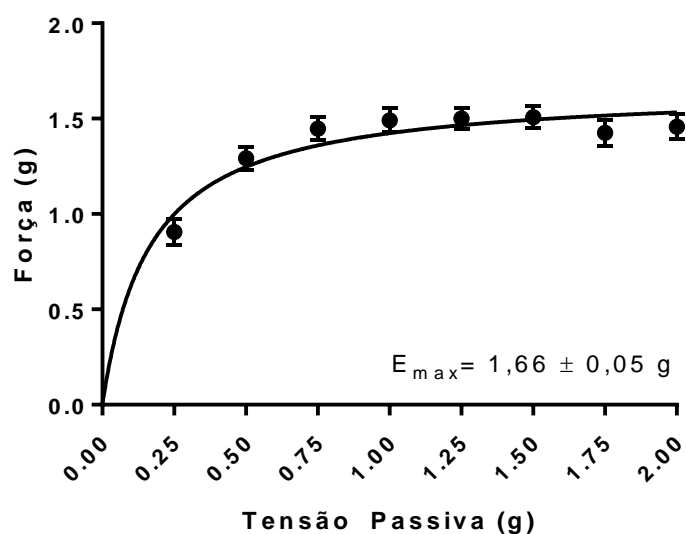


Figura 16 – Curva de tensão passiva por tensão desenvolvida após incubação com KCl 6×10^{-2} mol.L⁻¹: Curva tensão passiva por tensão desenvolvida após incubação com KCl 6×10^{-2} mol.L⁻¹ em anéis de aorta torácica de ratos entre 8 a 12 semanas. Os dados obtidos foram submetidos a uma regressão não linear hiperbólica. Dados expressos pela média \pm erro padrão, n=5.

A concentração de agente vasoconstritor necessária para produzir contração subótima foi definida por uma curva concentração-resposta. A fenilefrina, um agonista adrenérgico seletivo α_1 , foi usada como agente constritor. A tensão passiva deste experimento foi mantida entre 1,60 e 1,70g. A **Figura 17** sumariza os achados deste teste. A fenilefrina induziu vasoconstrição dos anéis de aorta de maneira concentração-dependente, com $\log_{EC_{50}} = -7,07 \pm 0,09$, correspondente a uma concentração de aproximadamente 10^{-7} mol.L⁻¹. Os testes subsequentes foram conduzidos pré-contraindo os anéis de aorta com fenilefrina na concentração final de 10^{-7} mol.L⁻¹.

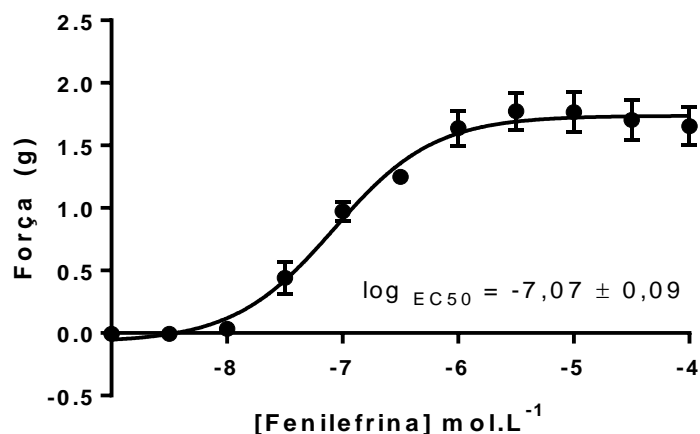


Figura 17 – Curva concentração-resposta de fenilefrina: Curva concentração-resposta de vasoconstrição utilizando a fenilefrina, um agonista seletivo α_1 . A fenilefrina induziu a uma vasoconstrição concentração dependente, com $\log_{EC_{50}} = -7,07 \pm 0,09$. Os dados obtidos foram submetidos à uma regressão não linear por onde os valores de EC_{50} foram estabelecidos. Dados expressos pela média \pm erro padrão, n=5.

5.3.2 Vasomotricidade induzida pela BK-(1-9) e seus metabólitos

Após a padronização descrita acima, a vasomotricidade induzida pela BK-(1-9) e seus metabólitos foi avaliada pela realização de curvas concentração-resposta. A **Figura 18** sumariza estes achados. Em anéis de aorta com endotélios funcionais, os metabólitos da BK-(1-9) induziram vasodilatação concentração-dependente, com $E_{max} = 25,52 \pm 5,03\%$ para BK-(1-3), $18,45 \pm 2,53\%$ para BK-(1-5) e $19,36 \pm 2,06\%$

para BK-(1-7). Já a BK-(1-9) induziu vasodilatação concentração dependente em baixas concentrações, com $E_{max} = 15,09 \pm 2,08\%$, e vasoconstrição em altas concentrações. A vasodilatação mediada pela BK-(1-3) é superior à mediada pela BK-(1-9). Já a vasodilatação mediada pela BK-(1-9), BK-(1-7) e BK-(1-5) parecem ser equivalentes. Esses resultados estão explicitados pela **Figura 18E**.

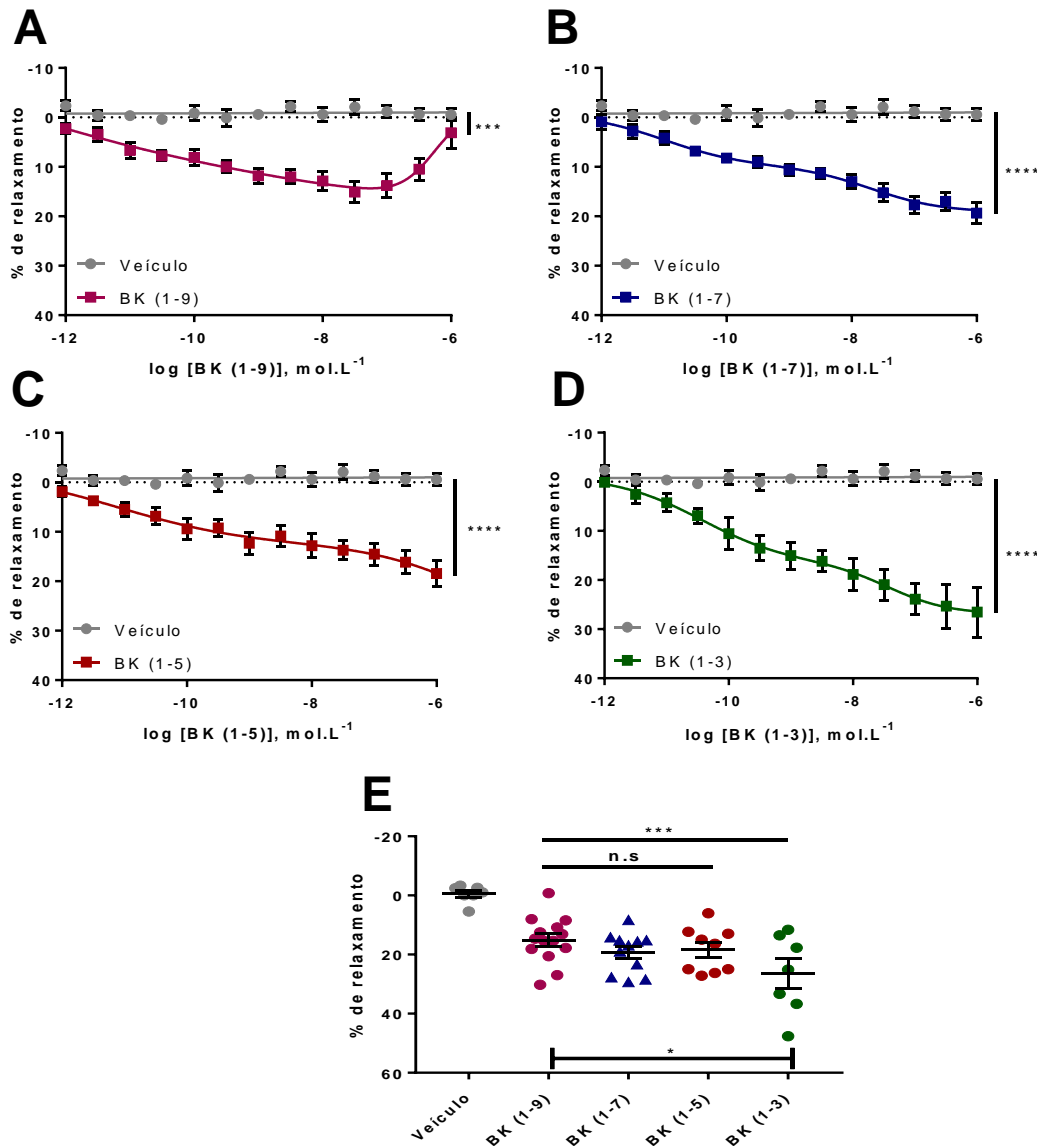


Figura 18 – Vasomotricidade da BK(1-9) e de seus metabólitos: Curvas concentração-resposta para: (A) BK-(1-9); (B) BK-(1-7); (C) BK-(1-5) e; (D) BK-(1-3). Uma curva controle foi realizada adicionando salina (Veículo) às cubas em volumes iguais ao adicionado às cubas com peptídeos. Em (E) o relaxamento máximo induzido pela BK-(1-9), BK-(1-7), BK-(1-5) e BK-(1-3). A análise estatística foi realizada pelo teste Two-Away ANOVA. *** p < 0,001 em relação ao veículo. **** p < 0,0001 em relação ao veículo. Dados expressos pela média \pm erro padrão, n=5.

5.3.3 Papel dos principais mediadores vasodilatadores na resposta da BK-(1-9) e seus metabólitos

A dependência dos efeitos vasculares da BK-(1-9) e de seus metabólitos pela camada endotelial, assim como pela produção de NO e prostanoídes, foi avaliada pela construção de curvas concentração-resposta. Foi verificado que o efeito vasodilatador da BK-(1-3), BK-(1-5) e BK-(1-9) é endotélio dependente, visto que a retirada da camada endotelial aboliu os efeitos observados. Já o efeito da BK-(1-7) foi reduzido em cerca de 74% quando a camada endotelial foi retirada dos anéis de aorta de ratos, sendo ainda observado um efeito vasodilatador não dependente de endotélio, com $E_{max} = 5,20 \pm 0,42\%$. Estes achados estão sumarizados na **Figura 19**.

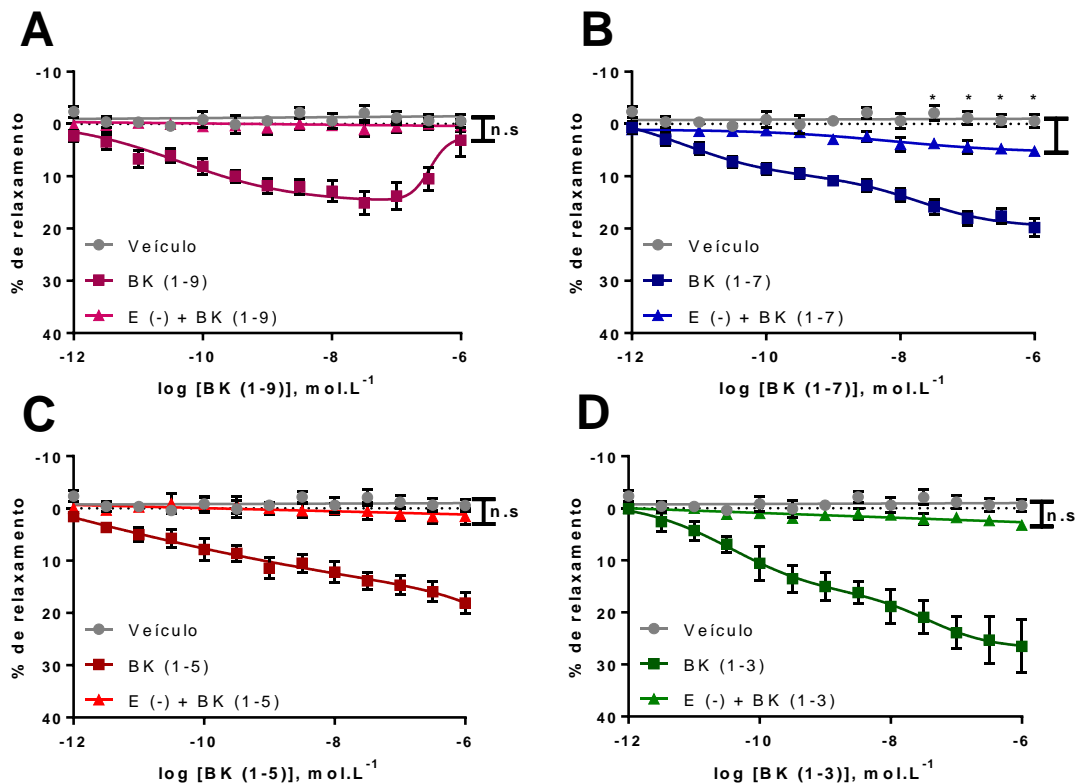


Figura 19 – Avaliação da dependência endotelial para os efeitos da BK-(1-9) e de seus metabólitos: Relação sobre dependência endotelial para os efeitos vasodilatadores mediados pela (A) BK-(1-9); (B) BK-(1-7); (C) BK-(1-5) e; (D) BK-(1-3), após retirada mecânica da túnica íntima. A análise estatística foi realizada pelo teste Two-Away ANOVA com teste *post-hoc* múltipla comparação de Tukey * $p < 0,05$. n.s não significativo em relação ao veículo. Dados expressos pela média \pm erro padrão, $n=5$.

O efeito vasodilatador da BK-(1-9) e de seus metabólitos é perdido quando há o bloqueio não seletivo da NOS pelo L-NAME, indicando que o efeito destes compostos é NO-dependente. Estes achados estão explicitados pela **Figura 20**.

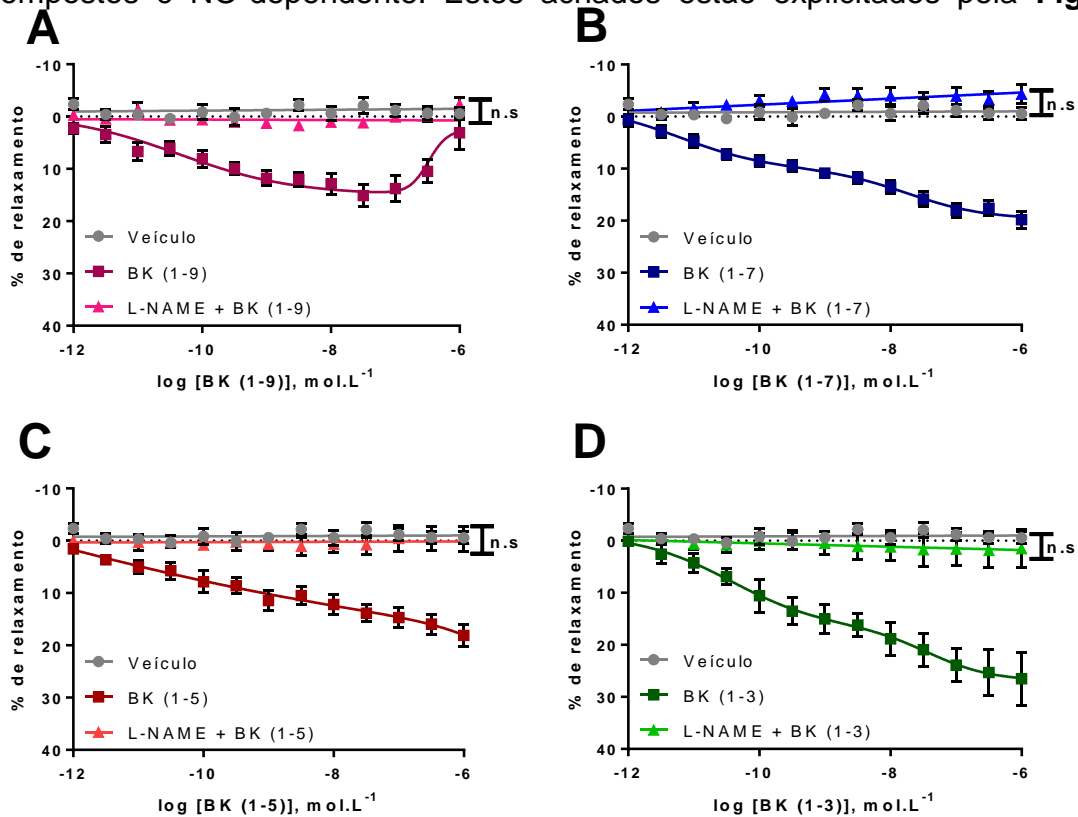


Figura 20 – Avaliação da dependência de NO para o efeito vasodilatador da BK-(1-9) e de seus metabólitos: Relação sobre dependência de NO para os efeitos vasodilatadores mediados pela (A) BK-(1-9); (B) BK-(1-7); (C) BK-(1-5) e; (D) BK-(1-3). A síntese de NO foi bloqueada pela incubação de L-NAME a 10^{-6} mol.L $^{-1}$, inibidor não seletivo das NOS. A análise estatística foi realizada pelo teste Two-Away ANOVA com teste *post-hoc* múltipla comparação de Tukey. n.s não significativo em relação às curvas da BK-(1-9) e seus metabólitos, respectivamente. Dados expressos pela média \pm erro padrão, n=5.

O bloqueio das ciclooxigenases reduziu a resposta vasodilatadora da BK-(1-7) e BK-(1-9) em 71% e 58%, respectivamente, com E_{max} BK-(1-7) = $5,75 \pm 0,36\%$ e E_{max} BK-(1-9) = $6,26 \pm 0,54\%$. O efeito vasodilatador da BK-(1-3) não foi alterado quando a produção de prostanóides foi bloqueada pela indometacina, inibidor não seletivo de ciclooxigenases. Já o efeito mediado pela BK-(1-5) foi abolido ao inibir a produção de prostanóides. Os achados são demonstrados na **Figura 21**.

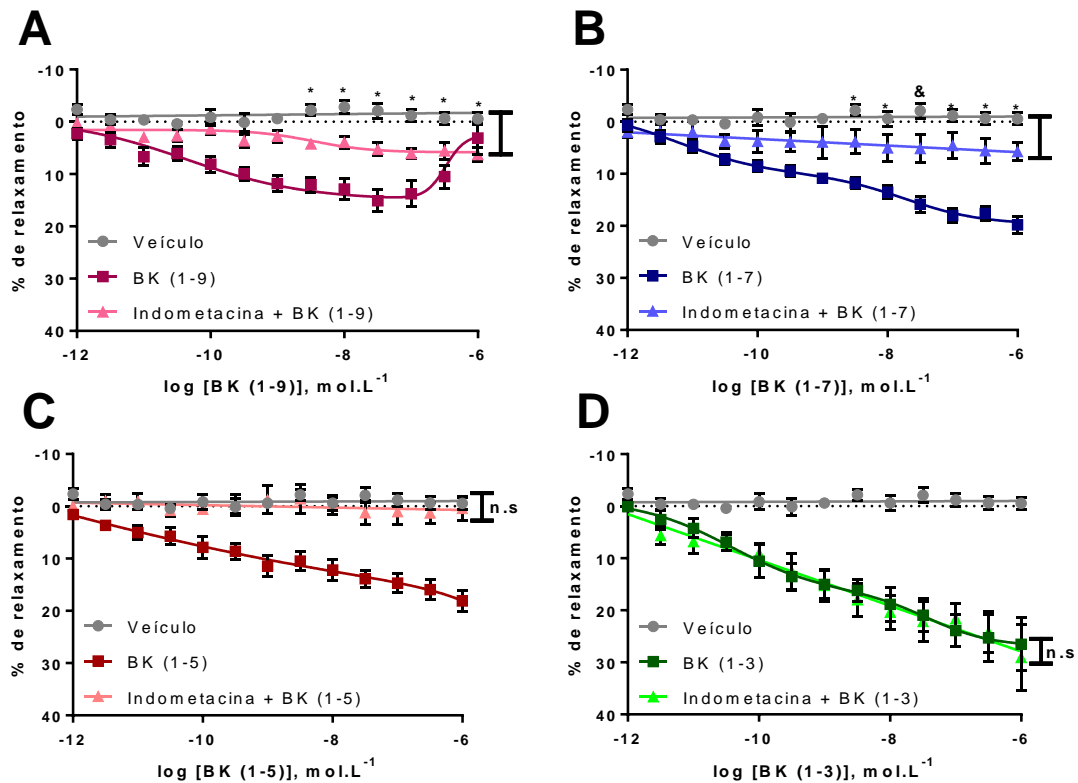


Figura 21 – Dependência de prostanóides para os efeitos da BK-(1-9) e seus metabólitos: Avaliação da dependência da produção de prostanóides para os efeitos vasodilatadores mediados pela (A) BK-(1-9); (B) BK-(1-7); (C) BK-(1-5) e; (D) BK-(1-3). O bloqueio não seletivo as COX procedeu-se pela incubação da indometacina a 10^{-6} mol.L $^{-1}$. A análise estatística foi realizada pelo teste Two-Away ANOVA com teste *post-hoc* múltipla comparação de Tukey * $p < 0,05$ em relação ao veículo. & $p < 0,01$ em relação ao veículo. n.s não significativo em relação à curva da BK-(1-3) ou BK-(1-5), respectivamente. Dados expressos pela média \pm erro padrão, $n=5$.

5.3.4 Relevância dos receptores de BK-(1-9) para os efeitos vasodilatadores mediados pela BK-(1-9) e seus metabólitos

O impacto nas curvas concentração-resposta em resposta ao bloqueio farmacológico dos receptores de BK-(1-9) foi avaliado para a BK-(1-9) e seus metabólitos. Como esperado, a resposta vasodilatadora da BK-(1-9) foi bloqueada quando pré-incubada com antagonista seletivo do receptor B2, ou uma mistura equimolar dos antagonistas seletivos dos receptores B1 e B2. Surpreendentemente, a resposta vasodilatadora desta molécula também foi bloqueada ao pré-incubar os anéis de aorta com o antagonista seletivo do receptor B1. Estes achados estão sumarizados na **Figura 22**.

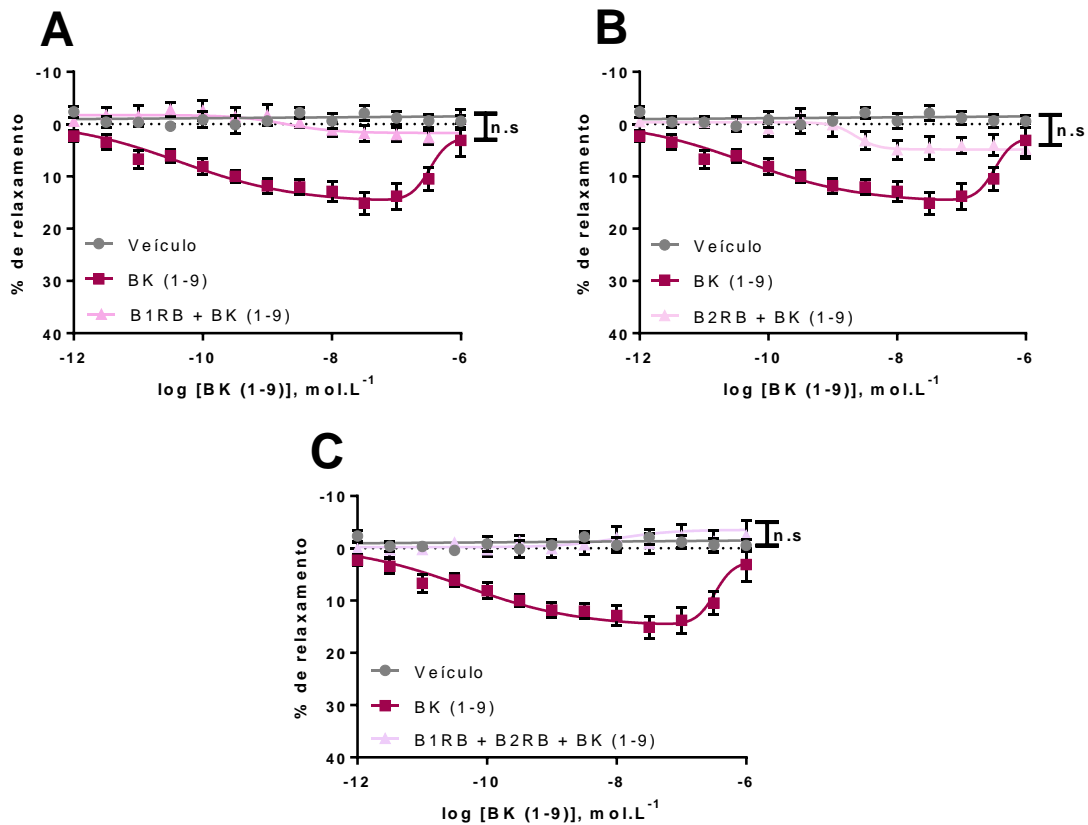
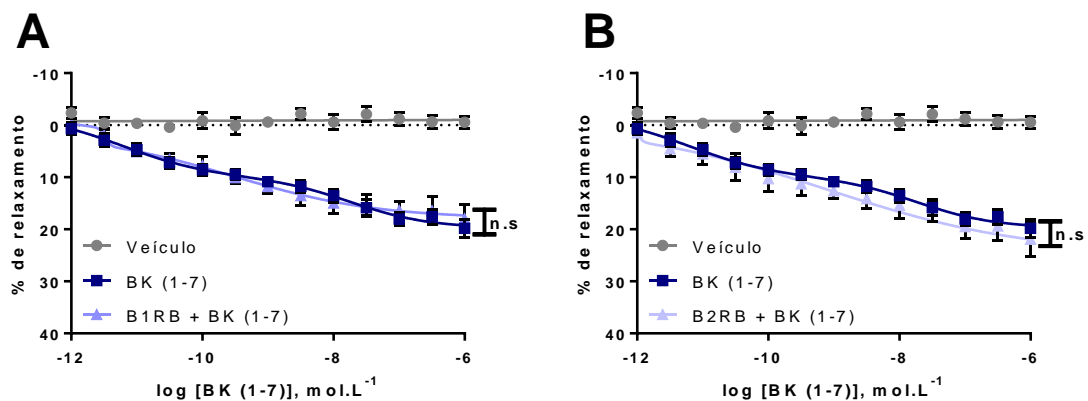


Figura 22 – Bloqueio seletivo dos receptores de bradicinina no efeito da BK-(1-9): A relevância dos receptores de BK-(1-9) para a ação vasodilatadora da BK-(1-9). B1RB – antagonista seletivo do receptor B1, Lys-(des-Arg⁹, Leu⁸)-BK; B2RB antagonista seletivo do receptor B2, HOE-140; B1RB + B2RB – mistura equimolar dos antagonistas seletivos dos receptores B1 e B2, incubados a 10⁻⁷ mol.L⁻¹. A análise estatística foi realizada pelo teste Two-Away ANOVA com teste *post-hoc* múltipla comparação de Tukey. n.s não significativo em relação ao veículo. Dados expressos pela média ± erro padrão, n=5.

A resposta vasodilatadora da BK-(1-7), BK-(1-5) e BK-(1-3) não foi alterada com o bloqueio seletivo do receptor B1 e/ou B2. Os resultados estão expressos na **Figura 23, Figura 24 e Figura 25**, respectivamente.



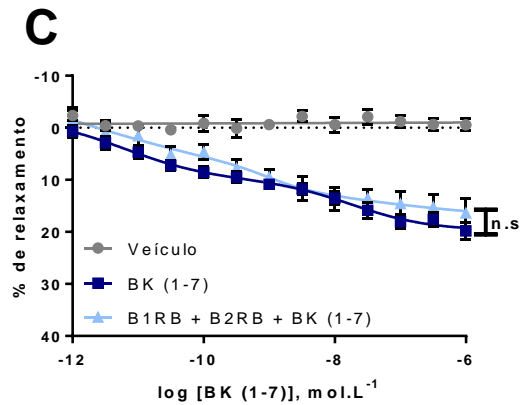


Figura 23 – Bloqueio seletivo dos receptores de bradicinina no efeito da BK-(1-7): A relevância dos receptores de BK-(1-9) para a ação vasodilatadora da BK-(1-7). B1RB – antagonista seletivo do receptor B1, Lys-(des-Arg⁹, Leu⁸)-BK; B2RB antagonista seletivo do receptor B2, HOE-140; B1RB + B2RB – mistura equimolar dos antagonistas seletivos dos receptores B1 e B2, incubados a 10⁻⁷ mol.L⁻¹. A análise estatística foi realizada pelo teste Two-Away ANOVA com teste *post-hoc* múltipla comparação de Tukey. n.s não significativo em relação à BK-(1-7). Dados expressos pela média ± erro padrão, n=5.

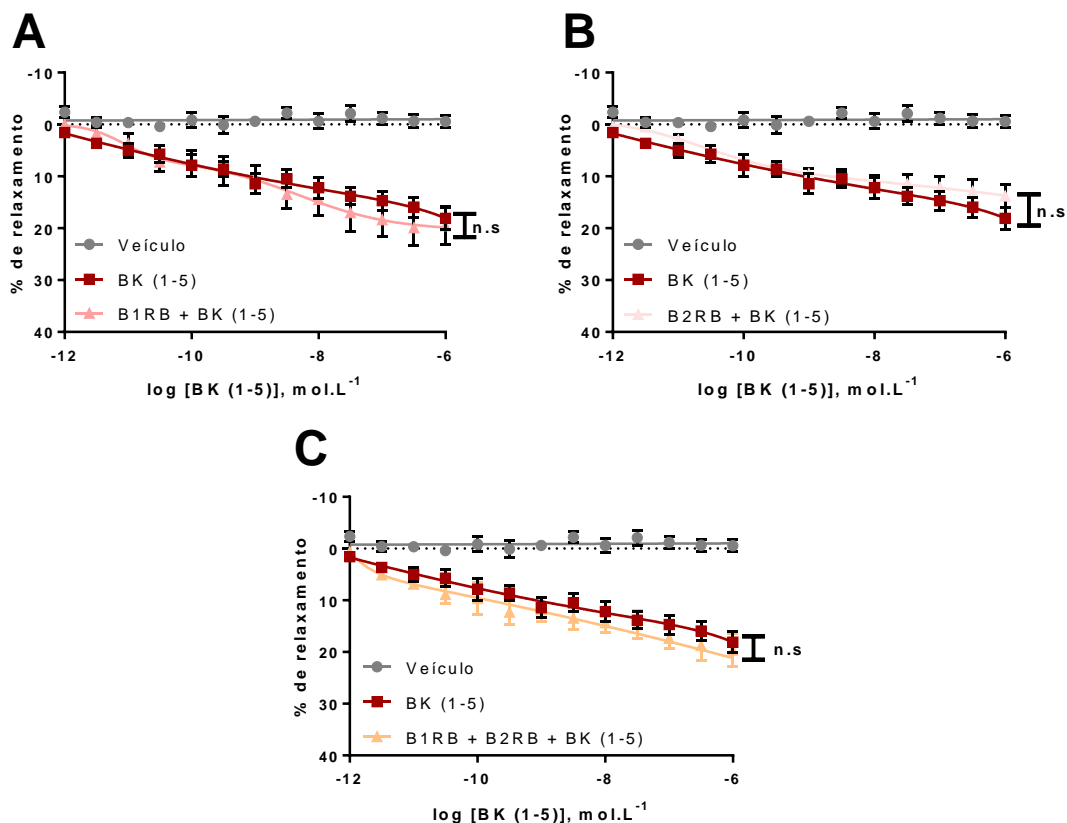


Figura 24 – Bloqueio seletivo dos receptores de bradicinina no efeito da BK-(1-5): A relevância dos receptores de BK-(1-9) para a ação vasodilatadora da BK-(1-5). B1RB – antagonista seletivo do receptor B1, Lys-(des-Arg⁹, Leu⁸)-BK; B2RB antagonista seletivo do receptor B2, HOE-140; B1RB + B2RB – mistura equimolar dos antagonistas seletivos dos receptores B1 e B2, incubados a 10⁻⁷ mol.L⁻¹. A análise estatística foi realizada pelo teste Two-Away ANOVA com teste *post-hoc* múltipla

comparação de Tukey. n.s não significativo em relação à BK-(1-5). Dados expressos pela média \pm erro padrão, n=5.

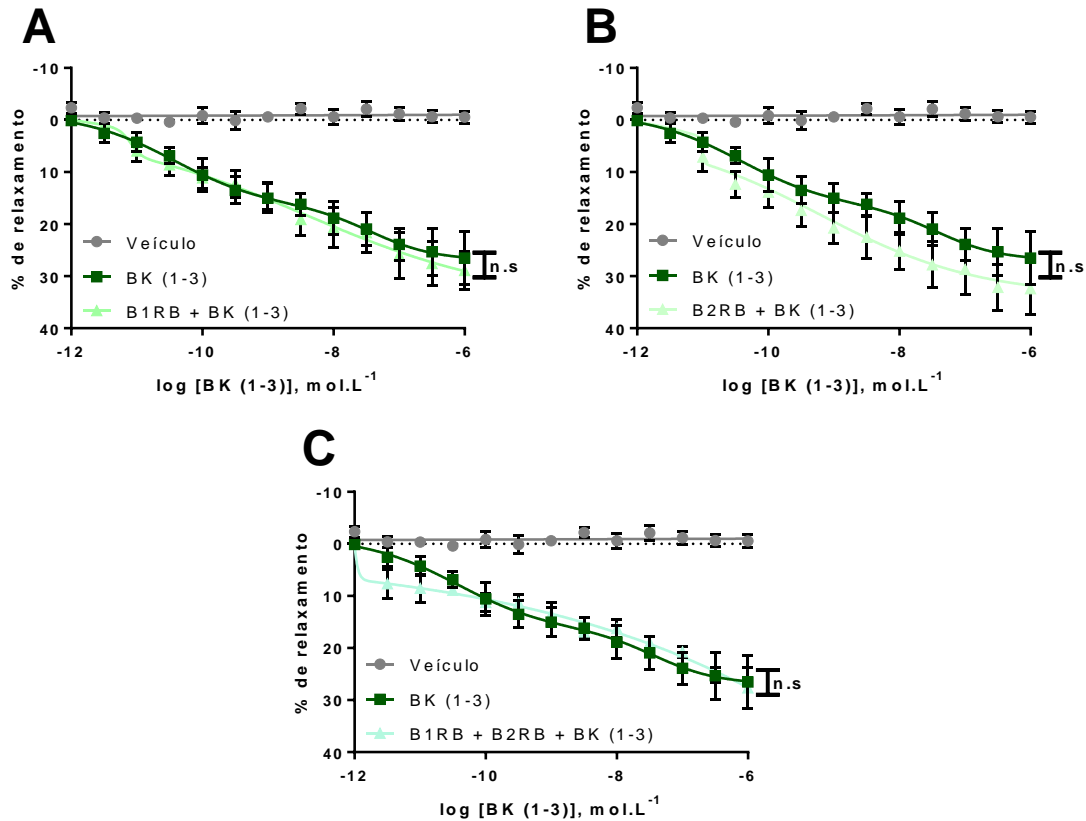


Figura 25 – Bloqueio seletivo dos receptores de bradicinina no efeito da BK-(1-3): A relevância dos receptores de BK-(1-9) para a ação vasodilatadora da BK-(1-3). B1RB – antagonista seletivo do receptor B1, Lys-(des-Arg⁹, Leu⁸)-BK; B2RB antagonista seletivo do receptor B2, HOE-140; B1RB + B2RB – mistura equimolar dos antagonistas seletivos dos receptores B1 e B2, incubados a 10⁻⁷ mol.L⁻¹. A análise estatística foi realizada pelo teste Two-Away ANOVA com teste *post-hoc* múltipla comparação de Tukey. n.s não significativo em relação à BK-(1-3). Dados expressos pela média \pm erro padrão.

A análise quantitativa da transcrição gênica dos receptores de BK-(1-9) foi realizada para confirmar a expressão destes receptores no seguimento torácico da artéria aorta de ratos Wistar adultos, entre 8 a 12 semanas de idade. Como explicitado na **Figura 26**, ambos receptores são expressos no seguimento torácico da aorta destes animais. Entretanto, o mRNA do receptor B2 foi detectado em maior abundância (podendo ser mais transcrito ou mais estável) do que o mRNA do receptor B1, sugerindo a possibilidade de haver maior densidade dos receptores B2 em aorta torácica de ratos.

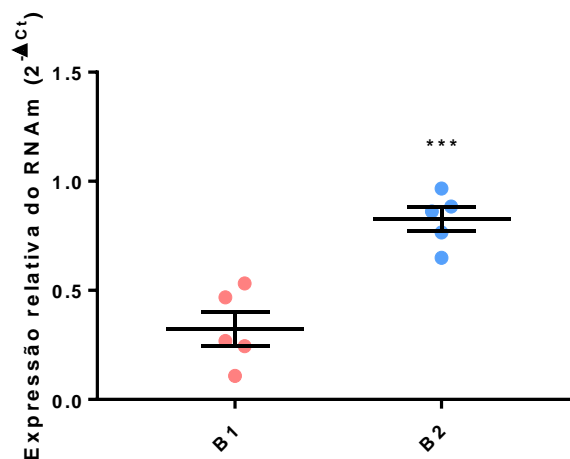


Figura 26 – Expressão gênica dos receptores de BK-(1-9) em aorta torácica de ratos: Análise da expressão relativa dos mRNA dos receptores B1 e B2 em aorta torácica de ratos, utilizando o transcrito do gene S26 como normalizador. A análise estatística foi realizada pelo teste-t não pareado. *** $p < 0,001$. Dados expressos pela média \pm erro padrão, $n=5$.

Coletivamente, os resultados obtidos nos experimentos de reatividade vascular, bem como pela análise da transcrição genica dos receptores de BK-(1-9) em aorta de ratos, indicam fortemente que os metabólitos da BK-(1-9) não agem pela ativação dos receptores clássicos de BK-(1-9). Além disto, foi possível observar que a BK-(1-3) e BK-(1-5) possuem mecanismo vasodilatador dependente de endotélio e da produção de NO, não sendo dependentes da ação de prostanóides. Já o efeito vasodilatador da BK-(1-7) é parcialmente dependente da integridade endotelial e de prostanóides, enquanto a produção de NO é essencial para o efeito observado. A BK-(1-9) tem seu efeito vasodilatador clássico dependente de endotélio e de NO, porém depende parcialmente da produção de prostanóides para exercer seu efeito.

5.4 Avaliação da potencial atividade hipotensora dos metabólitos da BK-(1-9)

A atividade hipotensora exercida pela BK-(1-9) e seus metabólitos foi avaliada em ratos Wistar não anestesiados, com 8 a 12 semanas de idade. A injeção de salina levou ao aumento transiente da pressão arterial nos animais testados devido ao aumento da carga volêmica. A BK-(1-9) induziu hipotensão transiente nos animais de maneira dose-dependente. Os metabólitos da BK-(1-9) também foram capazes de induzir a hipotensão, porém a extensão deste efeito foi semelhante nas três doses testadas. A **Figura 27** sumariza estes achados. Estes resultados indicam a

relevância sistêmica dos metabólitos da BK-(1-9), contrariando o conceito de que estas moléculas são desprovidas de atividade biológica.

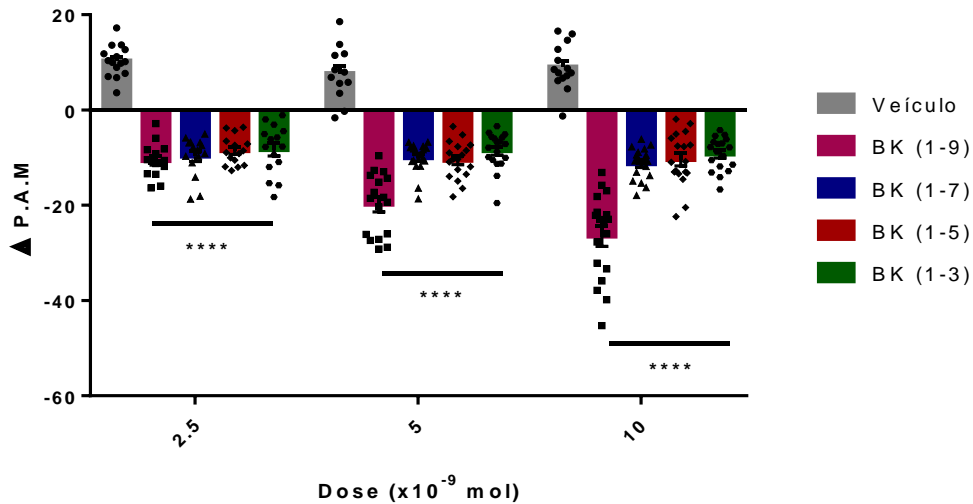


Figura 27 – Hipotensão induzida pela BK-(1-9) e seus metabólitos: Alterações nas pressões arteriais médias de animais ao serem submetidos à administração de salina, BK-(1-9) e seus metabólitos por via intravenosa, nas doses de 2,5, 5 e 10 x 10⁻⁹ mol. A análise estatística foi realizada pelo teste Two-Away ANOVA com teste *post-hoc* múltipla comparação de Tukey. **** p < 0,0001 em relação ao veículo. Dados expressos pela média ± erro padrão, n=5.

5.5 Avaliação da potencial atividade inflamatória induzida pela BK-(1-9) e seus metabólitos

A atividade inflamatória da BK-(1-9) e de seus metabólitos foi avaliada pela hipernocicepção e pelo aumento da permeabilidade vascular em camundongos C57Bl/6J entre 8 a 12 semanas de idade. A administração de 10⁻⁸ mol de BK-(1-9) induziu fortes estímulos hipernociceptivos quando injetada no coxim plantar dos animais, com limiar de retirada de 2,67 ± 0,37 g. Os metabólitos da BK-(1-9) também foram capazes de induzir hipernocicepção quando administrados na dose de 10⁻⁸ mol, porém o limiar de retirada foi aproximadamente a metade do observado pela BK-(1-9), com valores de 5,01 ± 0,19 g para a BK-(1-3); 5,10 ± 0,14 g para BK-(1-5) e; 5,5 ± 0,24 para a BK-(1-7). Os resultados obtidos estão representados pela **Figura 28**.

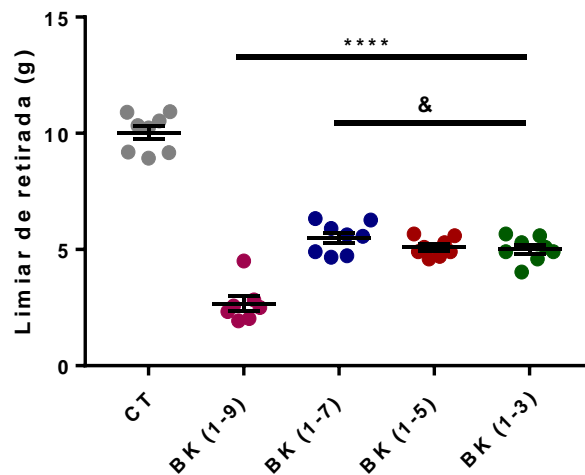


Figura 28 – Indução de hipernocicepção pela BK-(1-9) e seus metabólitos: Após a injeção de 10^{-8} mol de BK-(1-9) e de seus metabólitos na pata de camundongos, pressões crescentes foram aplicadas no coxim plantar até que o animal retirasse a pata por reflexos nociceptivos. A análise estatística foi realizada pelo teste One-Away ANOVA com teste *post-hoc* múltipla comparação de Tukey. **** $p < 0,0001$ em relação ao veículo. & $p < 0,0001$ em relação à BK-(1-9). Dados expressos pela média \pm erro padrão, $n=6$.

A capacidade da BK-(1-9) e de seus metabólitos induzirem aumento da permeabilidade vascular foi avaliada pela administração do cromóforo azul de Evans, com subsequente quantificação da taxa de extravasamento do corante no sítio de injeção. A administração de 10^{-8} mol de BK-(1-9) induziu o aumento do extravasamento vascular, com valores de $0,32 \pm 0,04$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tecido. Entretanto os metabólitos da BK-(1-9), também administrados na dose de 10^{-8} mol, não foram capazes de induzir aumento do extravasamento de azul de Evans nos tecidos analisados. Estes achados estão sumarizados na **Figura 29**.

Com esses resultados, é perceptível o envolvimento, em menor escala, dos metabólitos da BK-(1-9) na indução de processos inflamatórios. Coletivamente os resultados obtidos neste trabalho estabelecem a existência de efeitos dos metabólitos da BK-(1-9) nas principais espécies utilizadas em estudos fisiológicos e farmacológicos. Apesar da importância destes resultados, mais estudos deverão ser realizados a fim de se esclarecer o mecanismo de ação detalhado destas moléculas, bem como a ação em outros sistemas orgânicos.

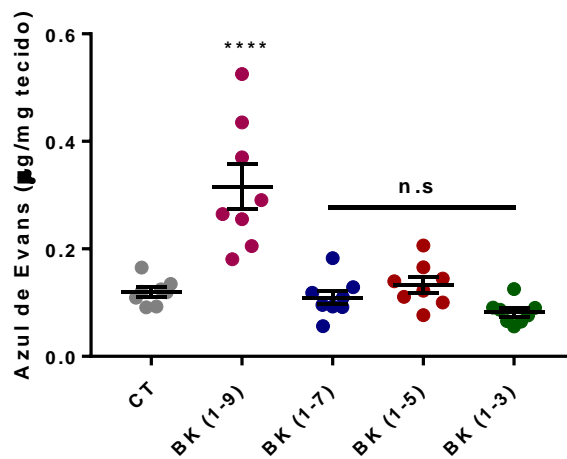


Figura 29 – Análise de extravasamento de azul de Evans mediado pela BK-(1-9) e seus metabólitos: Capacidade da BK-(1-9) e de seus metabólitos na dose de 10^{-8} mol, em promover extravasamento plasmático do cromóforo azul de Evans. A análise estatística foi realizada pelo teste One-Away ANOVA com teste *post-hoc* múltipla comparação de Tukey. **** $p < 0,0001$ em relação ao veículo. n.s não significativo em relação ao veículo. Dados expressos pela média \pm erro padrão, $n=6$.

6 DISCUSSÃO

Desde a descrição da BK-(1-9) por Rocha e Silva *et al.* (1949), diversos estudos emergiram para caracterizar suas ações, metabolismo e mecanismo de ação. Contudo, estes esforços (inclusive em outros sistemas hormonais de natureza peptídica) caminharam de maneira lenta devido à dificuldade de se purificar peptídeos em amostras biológicas, fato que se deve principalmente pela maquinaria analítica daquela época ser rudimentar quando comparada às disponíveis atualmente. Este cenário teve grande mudança quando a técnica de síntese química de peptídeos em fase sólida foi desenvolvida por Merrifield (1964) que, inclusive empregou-a para síntese da BK-(1-9). Com o desenvolvimento desta técnica, grandes quantidades de peptídeo poderiam ser sintetizadas e empregadas em diversos estudos.

De fato, os anos seguintes ao desenvolvimento da síntese química de peptídeos em fase sólida foram essenciais para o estabelecimento de alguns pontos importantes acerca do SCC. Do final da década de 1960 até 1970, diversos estudos visaram avaliar a atividade biológica de diversos fragmentos da BK-(1-9). O mais importante destes, talvez, seja o realizado por Suzuki *et al.* (1969), por onde os autores sintetizaram todos os possíveis fragmentos da BK-(1-9). Neste laborioso estudo, os autores constataram que a maioria dos fragmentos eram biologicamente inertes (inclusive a BK-(1-8); BK-(1-7); BK-(1-5) e; BK-(1-3)) e os que apresentavam alguma atividade biológica, possuíam efeitos quase nulos. Park *et al.* (1978), Redman *et al.* (1979) e Roch-Arveiller *et al.* (1983), em seus respectivos trabalhos, foram capazes de obter resultados que corroboram a ausência da atividade para a BK-(1-7) e BK-(1-5).

Como discutido anteriormente, Regoli *et al.* (1977) descreveram as ações contráteis da BK-(1-8) na aorta de coelho, contrariando o conceito estabelecido de que os metabólitos da BK-(1-9) eram biologicamente inertes. Atualmente, a BK-(1-8) é reconhecida por ser o ligante endógeno do receptor B1 e o único metabólito ativo da BK-(1-9). Contudo, no final da década de 1990, Hasan *et al.* (1996) descrevem que a BK-(1-9) e a BK-(1-5) eram capazes de inibir a α -trombina e, conseqüentemente, inibir a coagulação sanguínea. Mesmo após quase 25 anos da elucidação da atividade da BK-(1-5), corroborada com outros estudos nos anos seguintes, os metabólitos da BK-(1-9), exceto a BK-(1-8) são considerados inativos nos livros

textos mais relevantes em farmacologia e fisiologia, bem como em publicações concernindo o SCC.

No presente trabalho, foi demonstrado que os fragmentos N-terminais mais relevantes encontrados em diversas matrizes biológicas derivados do metabolismo da BK-(1-9), a BK-(1-7), BK-(1-5) e BK-(1-3), bem como a BK-(1-9), foram capazes de induzir a produção de NO *in vitro* em células transformadas de glia humana (U-87 MG), em cardiomiócitos de ratos neonatos e em cardiomiócitos de camundongo adulto. Surpreendentemente, os efeitos da BK-(1-7), BK-(1-5) e BK-(1-3) não foram mediados pela ativação dos receptores de BK-(1-9), visto que o uso de antagonistas seletivos para o receptor B1 ou B2, bem como o uso de animais *knockout* para os receptores esses receptores não alterou a produção de NO mediada pelos metabólitos da BK-(1-9) em cardiomiócitos neonatos de rato e U 87-MG ou de camundongos adultos, respectivamente. Estes achados são de extrema relevância, visto que atualmente a BK-(1-7) e BK-(1-3) são considerados como produtos inertes do metabolismo da BK-(1-9). Apesar de ter sido descrito atividade biológica para a BK-(1-5), esse composto também ainda é considerado como biologicamente inerte. O fato de termos sido capazes de observar atividade biológica para a BK-(1-7), BK-(1-5) e BK-(1-3) nesse trabalho se deve, principalmente, aos avanços científicos que foram responsáveis pelo surgimento de vários métodos de alta sensibilidade para detecção de segundos mensageiros quanto a melhora maciça nos métodos clássicos utilizados na área de farmacologia e fisiologia.

A ativação do receptor B2 pela BK-(1-9) no cardiomiócito induz a ativação da via PI3K/Akt/eNOS, promovendo o aumento da produção de NO que, por sua vez, induz o aumento das concentrações intracelulares de GMPc e, por consequência, da atividade da PKG. Essa proteína cinase age em diversos pontos, mas suas ações ao ativar vias de supressão de apoptose na mitocôndria e promover a abertura de canais de K⁺ sensíveis ao ATP (K_{ATP}) sejam, talvez, as mais relevantes para a promoção da cardioproteção (ANDREADOU *et al.*, 2015; SHARMA *et al.*, 2015). As ações do NO em câncer são dicotômicas, pois esse mediador apresenta efeitos antiproliferativos quanto proliferativos (KORDE CHOUDHARI *et al.* 2013). Diversos estudos demonstram ações deletérias da BK-(1-9) na progressão do câncer, visto que nestes casos o peptídeo induziu o crescimento tumoral ao interagir com os receptores de BK-(1-9), principalmente com o receptor B2. Corroborando com esse

fato, estudos vêm demonstrando efeitos antiproliferativos relevantes utilizando antagonistas não peptídicos dos receptores de BK-(1-9) em ensaios *in vitro* (AVDIEIEV et al. 2014).

Visto que a BK-(1-7), BK-(1-5) e BK-(1-3) induzem a produção de NO em cardiomiócitos e células tumorais por vias independentes da ativação dos receptores de BK-(1-9), esses peptídeos podem desempenhar ações importantes nestes contextos. Desta forma, fica evidente a necessidade de estudos subsequentes para avaliar se esses metabólitos possuem, de fato, efeitos cardioprotetores e na modulação da dinâmica tumoral, além de se estabelecer os respectivos mecanismos de ação para tais efeitos.

Como discutido por Furchgot (1999), o NO é um dos principais mediadores da vasodilatação e majoritariamente responsável pelo efeito vascular observado pela BK-(1-9). Visto que os metabólitos da BK-(1-9) induziram a produção desse importante mediador vasodilatador em modelo *in vitro*, hipotetizamos que a BK-(1-7), BK-(1-5) e BK-(1-3) também seriam capazes de aumentar a produção de NO no leito vascular e, conseqüentemente, promover a vasodilatação. A BK-(1-7), BK-(1-5) e BK-(1-3) promoveram vasodilatação concentração-dependente, enquanto a BK-(1-9) promoveu vasodilatação em baixas concentrações e vasoconstrição em concentrações mais altas. O efeito antagônico mediado pela BK-(1-9) não é incomum, visto que Félétou *et al.* (1994) observou a ocorrência destes efeitos em veia jugular de coelho e em artéria femoral de ovelha.

A vasodilatação mediada pela BK-(1-9), BK-(1-5) e BK-(1-3) foi totalmente dependente da integridade da camada endotelial, visto que a remoção mecânica desse tipo celular aboliu o efeito observado. Curiosamente, o efeito da BK-(1-7) em altas concentrações não foi totalmente abolido pela remoção da camada endotelial. Entretanto, foi possível observar um efeito residual da BK-(1-7) em altas concentrações na camada muscular, indicando que esse peptídeo possui algum alvo molecular de baixa afinidade nesse local. Este achado indica que os alvos moleculares da BK-(1-9), BK-(1-5), BK-(1-7) e BK-(1-3) são expressos na camada endotelial. Figueroa *et al.* (2001) demonstrou que os receptores B2 são majoritariamente expressos na camada endotelial da aorta de ratos e este fato foi indiretamente observado pela resposta endotélio-dependente da BK-(1-9) apresentada nesse trabalho.

A participação do NO é essencial para a promoção do efeito vasodilatador mediado pela BK-(1-9) e seus metabólitos, visto que o bloqueio não seletivo das NOS pelo L-NAME aboliu os efeitos observados. Especulamos que o efeito vasodilatador em altas concentrações endotélio-independente mediado pela BK-(1-7) possa ser dependente da produção de NO na túnica média da aorta, visto que o L-NAME bloqueou totalmente o efeito vasodilatador da BK-(1-7). Esta hipótese é suportada pelo fato de haver expressão de proteoformas da NOS na túnica média de aorta de ratos, como demonstrado por Boulanger *et al.* (1998). Um ensaio utilizando anéis de aorta desnudos e anéis de aorta desnudos com bloqueio das NOS pelo L-NAME poderia ser facilmente realizado para confirmar que o efeito vasodilatador endotélio-independente mediado pela BK-(1-7) é dependente de NO.

Os prostanóides constituem uma classe de compostos de extrema relevância para a homeostasia, com ações relevantes na dinâmica contrátil de vasos. A prostaciclina é um mediador produzido em resposta a diversos agentes, como a BK-(1-9), induzindo à vasodilatação por mecanismos já discutidos anteriormente (BARTHA *et al.*, 1989). Ao realizar o bloqueio não seletivo das ciclooxigenases pela indometacina, observou-se a diminuição dos efeitos da BK-(1-9) e BK-(1-7). Já a resposta da BK-(1-5) foi bloqueada pela indometacina, enquanto a exercida pela BK-(1-3) não apresentou alterações. Os resultados observados neste experimento, bem como nos experimentos com o bloqueio das NOS e com anéis de aorta desnudos, indicam que, apesar da semelhança estrutural desses peptídeos, a vasodilatação mediada por cada metabólito tem mecanismos consideravelmente distintos entre si. Desta forma, estudos subsequentes são necessários para a elucidação do mecanismo de ação pelo qual a BK-(1-7), BK-(1-5) e BK-(1-3) promovem a vasodilatação em aorta de ratos.

O efeito vasodilatador promovido pela BK-(1-7), BK-(1-5) e BK-(1-3) não sofreu alterações pela pré-incubação com Lys-(des-Arg⁹, Leu⁸)-BK, antagonista seletivo do receptor B1, HOE-140, antagonista seletivo do receptor B2 ou com uma mistura de ambos. Este dado sugere que os efeitos vasodilatadores observados pela BK-(1-7), BK-(1-5) e BK-(1-3) não são mediados pela ativação de receptores clássicos de BK-(1-9), corroborando com os ensaios *in vitro* discutidos anteriormente. Como esperado, a resposta vasodilatadora e contrátil observada pela BK-(1-9) foi abolida pelo antagonista do receptor B2. Entretanto, surpreendentemente o antagonista do

receptor B1 também aboliu os efeitos da BK-(1-9) sob o tônus vascular. Este efeito inesperado pode ser explicado por alguns fatores. O primeiro deles seria devido ao uso de concentrações bastante elevadas de antagonistas, visto que os antagonistas seletivos do receptor B1 e B2 utilizados possuem IC_{50} na faixa de 10^{-9} mol.L⁻¹ (HOCK *et al.*, 1991; MENKE *et al.*, 1994). Desta forma, há a possibilidade de que nas concentrações utilizadas, ambos antagonistas possam estar agindo de forma não-seletiva. Como demonstrado, a resposta da BK-(1-9) foi bloqueada em U87-MG, célula que expressa o mRNA de ambos receptores, somente pelo HOE-140 na mesma concentração utilizada nos ensaios em anéis de aorta. Esse dado exclui a possibilidade do antagonismo não seletivo devido a altas doses utilizadas de antagonistas. Outra possibilidade para este curioso padrão de resposta se daria pela ausência de receptores de BK-(1-9) em aorta de ratos com consequente ação não seletiva em outros alvos pela BK-(1-9). Essa hipótese também foi refutada pelo fato de ambos mRNA terem sido identificados e quantificados por qPCR, indicando fortemente que ambos receptores estejam presentes e funcionais nos anéis de aorta. A carboxipeptidase M é uma enzima expressa em diversos tecidos, inclusive em vasos, capaz de converter a BK-(1-9) à BK-(1-8), de maneira semelhante a carboxipeptidase N (DEITEREN *et al.* 2009). A possibilidade da resposta observada pela BK-(1-9) na dinâmica vascular ser na verdade uma mistura das atividades da BK-(1-8) e BK-(1-9) não pode ser descartada. Esta hipótese é, de certa forma, corroborada pelo fato de termos identificado a transcrição de ambos receptores na aorta. Este fato leva, conseqüentemente, a possibilidade de ativação de ambos receptores pelos seus respectivos ligantes produzidos *in situ* nos anéis de aorta. Para avaliar esta hipótese, um experimento bloqueando a carboxipeptidase M nos anéis de aorta geraria acúmulo de BK-(1-9) e conseqüentemente o efeito pleno deste peptídeo se tornaria evidente. Presumivelmente o efeito da BK-(1-9) nestas condições deveria ser bloqueado seletivamente pelo HOE-140.

A resistência periférica e o débito cardíaco são variáveis determinantes para o controle da pressão arterial. A resistência periférica, por sua vez, é controlada majoritariamente por mudanças do lúmen dos vasos, principalmente das artérias de resistência. O débito cardíaco é regulado por duas grandes variáveis: o volume sistólico e frequência cardíaca (GUYENET, 2006; MULVANY e AALKJAER, 1990). Como discutido por Leeb-Lundberg *et al.* (2005), o mecanismo pelo qual a BK-(1-9)

induz à hipotensão é pelo controle da resistência periférica, promovendo vasodilatação em artérias de resistência. O potencial efeito hipotensivo de uma molécula, desta forma, seria mais bem avaliado em preparações por onde a contratilidade vascular em artérias de resistência pudesse ser estudada ao invés de se usar artérias de condução, como realizado nesse trabalho. Contudo, ensaios em artérias de resistência são tecnicamente laboriosos, enquanto os ensaios em artérias de condução são relativamente mais simples. Devido a esses motivos, estudos da reatividade vascular mediada pela BK-(1-9) e seus metabólitos foram realizados em aorta.

Os dados obtidos em ensaios de reatividade vascular em anéis de aorta torácica de ratos nesse trabalho podem indicar que a BK-(1-7), BK-(1-5) e BK-(1-3) são capazes de induzir à hipotensão devido a vasodilatação observada. De fato, os metabólitos da BK-(1-9) foram capazes de promover a hipotensão em ratos não anestesiados e, curiosamente, esse efeito não se deu de maneira dose-dependente, como observado para a BK-(1-9). Acreditamos que esse fato possa ter ocorrido por dois motivos. O primeiro deles pode ser devido que, nas doses testadas, o efeito dessas moléculas pode ter chegado ao máximo devido a saturação de receptores nos sítios de ação. Para avaliar essa hipótese, doses menores poderiam ser testadas para verificar a ocorrência de um efeito dose-dependente. A segunda, e talvez mais plausível, seria devido ao extenso metabolismo que essas moléculas podem estar sofrendo *in vivo*, que está intimamente envolvido como local de administração. Ao injetar as moléculas no leito venoso, estes compostos são direcionados para a circulação pulmonar antes de ser distribuída para o organismo. Nesta trajetória, os metabólitos podem ser extensivamente metabolizados tanto no pulmão, devido à alta densidade de ECA neste local, quanto na circulação por ação de outras peptidases (BUJAK-GIŻYCKA *et al.*, 2011). Para avaliar esta hipótese, seria mais prudente administrar a BK-(1-7), BK-(1-5) e BK-(1-3) diretamente no leito arterial, minimizando o metabolismo pulmonar. Por consequência, o efeito pleno de cada peptídeo poderia ser melhor analisado. Caso a hipótese de metabolização destas moléculas seja de fato verdadeira, ensaios em anéis de aorta deverão ser reavaliados empregando um coquetel de inibidores de enzimas sabidamente relevantes na via do metabolismo da BK-(1-9) para que o efeito pleno de cada peptídeo sob a vasodilatação seja observado.

Além dos efeitos cardiovasculares bem estabelecidos e discutidos anteriormente, o NO possui importantes efeitos na dinâmica inflamatória. Como revisado por Guzik *et al.* (2003), devido a características entre as diferentes proteoformas das NOS, dois perfis principais podem emergir a partir da ativação destas enzimas. O primeiro deles é a produção em curta duração e de pequena amplitude de NO mediada pela ativação de eNOS e nNOS, levando à vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular. O último tipo de perfil é mediado pela ativação da iNOS, induzindo à produção sustentada de alta amplitude de NO, que provoca toxicidade ao tecido, ativando diversos mecanismos pró-inflamatórios.

Visto que os efeitos cardiovasculares da BK-(1-7), BK-(1-5) e BK-(1-3) são mediados pelo NO, levantou-se a hipótese de que esses metabólitos poderiam também mediar alguns aspectos da progressão do processo inflamatório. Os metabólitos da BK-(1-9) foram capazes de induzir hipernocicepção quando injetados no coxim plantar de camundongos, contudo o estímulo nociceptivo foi consideravelmente menor que o exercido pela BK-(1-9). Curiosamente, os metabólitos da BK-(1-9) na dose testada não foram capazes de aumentar a permeabilidade vascular, ao contrário da BK-(1-9). Estes dados apontam que a BK-(1-7), BK-(1-5) e BK-(1-3) exercem uma menor atividade inflamatória no geral. Contudo, este fato deve ser confirmado empregando extensos estudos avaliando outros parâmetros inflamatórios.

7 CONCLUSÃO

Coletivamente os dados explicitados nesse trabalho apontam para a existência de atividade biológica significativa para principais metabólitos da BK-(1-9), a BK-(1-7), BK-(1-5) e BK-(1-3). Apesar dessas moléculas exercerem ações no sistema cardiovascular similares às da BK-(1-9), os resultados aqui explicitados demonstram que o mecanismo pelo qual tais efeitos são conduzidos são distintos. Contudo, mais experimentos são necessários para identificar o(s) alvo(s) molecular(es) desses peptídeos. Além disso, os metabólitos da BK-(1-9) parecem induzir atividade inflamatória de menor intensidade quando comparada à BK-(1-9) nos parâmetros testados. De toda forma, mais estudos se fazem necessários para estabelecer a relevância dessas moléculas na inflamação. Apesar de não ter sido estabelecido o mecanismo de ação detalhado dos metabólitos da BK-(1-9) nas ações cardiovasculares e inflamatórias observadas, a premissa de que a BK-(1-7), BK-(1-5) e BK-(1-5) são compostos inertes do SCC não é verdadeira e, por isso, não deve mais ser difundida pela comunidade científica.

8 REFERÊNCIAS

- ALTURA, B. M.; CHAND, N. Bradykinin-induced relaxation of renal and pulmonary arteries is dependent upon intact endothelial cells. **British Journal of Pharmacology**, 1981.
- AMARAL, F. A.; BASTOS, L. F. S.; OLIVEIRA, T. H. C.; et al. Transmembrane TNF- α is sufficient for articular inflammation and hypernociception in a mouse model of gout. **European Journal of Immunology**, 2016.
- ANDREADOU, I.; ILIODROMITIS, E. K.; RASSAF, T.; et al. The role of gasotransmitters NO, H₂S and CO in myocardial ischaemia/reperfusion injury and cardioprotection by preconditioning, postconditioning and remote conditioning. **British Journal of Pharmacology**, 2015.
- ANTONIO, A.; ROCHA E SILVA, M. Coronary vasodilation produced by bradykinin on isolated mammalian heart. **Circulation research**, 1962.
- ARMSTRONG, D.; KEELE, C. A.; JEPSON, J. B.; STEWART, J. W. Development of pain-producing substance in human plasma. **Nature**, 1954.
- AVDIEIEV, S.; GERA, L.; HAVRYLYUK, D.; et al. Bradykinin antagonists and thiazolidinone derivatives as new potential anti-cancer compounds. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, 2014.
- BARTHA, K.; MULLER-PEDDINGHAUS, R.; VAN ROOIJEN, L. A. A. Bradykinin and thrombin effects on polyphosphoinositide hydrolysis and prostacyclin production in endothelial cells. **Biochemical Journal**, 1989.
- BHOOLA, K. D.; FIGUEROA, C. D.; WORTHY, K. Bioregulation of kinins: Kallikreins, kininogens, and kininases. **Pharmacological Reviews**, 1992.
- BOULANGER, C. M.; HEYMES, C.; BENESSIANO, J.; et al. Neuronal nitric oxide synthase is expressed in rat vascular smooth muscle cells: Activation by angiotensin II in hypertension. **Circulation Research**, 1998.
- BUJAK-GIZYCKA, B.; OLSZANECKI, R.; MADEJ, J.; et al. Metabolism of bradykinin in aorta of hypertensive rats. **Acta Biochimica Polonica**, 2011.
- CHOLLET, C.; PLACIER, S.; CHATZANTONIOU, C.; et al. Genetically increased

angiotensin I-converting enzyme alters peripheral and renal vascular reactivity to angiotensin II and bradykinin in mice. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, 2018.

DEITEREN, K.; HENDRIKS, D.; SCHARPÉ, S.; LAMBEIR, A. M. Carboxypeptidase M: Multiple alliances and unknown partners. **Clinica Chimica Acta**, 2009.

DEJANA, E.; TOURNIER-LASSERVE, E.; WEINSTEIN, B. M. The Control of Vascular Integrity by Endothelial Cell Junctions: Molecular Basis and Pathological Implications. **Developmental Cell**, 2009.

DENDORFER, A.; WOLFRUM, S.; WAGEMANN, M.; QADRI, F.; DOMINIAK, P. Pathways of bradykinin degradation in blood and plasma of normotensive and hypertensive rats. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, 2001.

DRAY, A.; PATEL, I. A.; PERKINS, M. N.; RUEFF, A. Bradykinin-induced activation of nociceptors: receptor and mechanistic studies on the neonatal rat spinal cord-tail preparation in vitro. **British Journal of Pharmacology**, 1992.

DUKA, I.; SHENOUDA, S.; JOHNS, C.; et al. Role of the B2 receptor of bradykinin in insulin sensitivity. **Hypertension**, 2001.

ELLIOTT, D. F.; HORTON, E. W.; LEWIS, G. P. Actions of pure bradykinin. **The Journal of Physiology**, 1960.

ELLIOTT, D. F.; LEWIS, G. P.; HORTON, E. W. The structure of bradykinin - A plasma kinin from ox blood. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 1960.

ERDÖS, E. G.; SLOANE, E. M. An enzyme in human blood plasma that inactivates bradykinin and kallidins. **Biochemical Pharmacology**, 1962.

FÉLÉTOU, M.; GERMAIN, M.; THURIEAU, C.; FAUCHÈRE, J. -L.; CANET, E. Agonistic and antagonistic properties of the bradykinin B2 receptor antagonist, Hoe 140, in isolated blood vessels from different species. **British Journal of Pharmacology**, 1994.

FIGUEROA, C. D.; MARCHANT, A.; NOVOA, U.; et al. Differential distribution of bradykinin B2 receptors in the rat and human cardiovascular system. **Hypertension**,

2001.

FURCHGOTT, R. F. Endothelium-derived relaxing factor: Discovery, early studies, and identification as nitric oxide. *Bioscience Reports*. **Anais...** , 1999.

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, 1980.

GADDUM, J. H.; HORTON, E. W. The extraction of human urinary kinin (substance z) and its relation to the plasma kinins. **British Journal of Pharmacology and Chemotherapy**, 1959.

GARLAND, E. L. Pain Processing in the Human Nervous System. A Selective Review of Nociceptive and Biobehavioral Pathways. **Primary Care - Clinics in Office Practice**, 2012.

GÓMEZ, A. M.; GUATIMOSIM, S.; DILLY, K. W.; VASSORT, G.; LEDERER, W. J. Heart failure after myocardial infarction altered excitation-contraction coupling. **Circulation**, 2001.

GÓNGORA-BENÍTEZ, M.; TULLA-PUCHE, J.; ALBERICIO, F. Handles for Fmoc solid-phase synthesis of protected peptides. **ACS Combinatorial Science**, 2013.

GUATIMOSIM, S.; AMAYA, M. J.; GUERRA, M. T.; et al. Nuclear Ca²⁺ regulates cardiomyocyte function. **Cell Calcium**, 2008.

GUEVARA-LORA, I.; LABEDZ, A.; SKRZECZYNSKA-MONCZNIK, J.; KOZIK, A. Bradykinin and des-Arg 10-kallidin enhance the adhesion of polymorphonuclear leukocytes to extracellular matrix proteins and endothelial cells. **Cell Communication and Adhesion**, 2011.

GUYENET, P. G. The sympathetic control of blood pressure. **Nature Reviews Neuroscience**, 2006.

GUZIK, T. J.; KORBUT, R.; ADAMEK-GUZIK, T. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. **Journal of Physiology and Pharmacology**, 2003.

HABAL, F. M.; MOVAT, H. Z. Kininogens of human plasma. **SEMIN.THROMB.HEMOST.**, 1976.

HASAN, A. A. K.; AMENTA, S.; SCHMAIER, A. H. Bradykinin and its metabolite, Arg-Pro-Pro-Gly-Phe, are selective inhibitors of α -thrombin-induced platelet activation. **Circulation**, 1996.

HELLER, L. J.; MOHRMAN, D. E. Comparison of blood pressure responses to intra-arterial and intra-venous injections of angiotensin I, angiotensin II and bradykinin. **Life Sciences**, 1998.

HOCK, F. J.; WIRTH, K.; ALBUS, U.; et al. Hoe 140 a new potent and long acting bradykinin-antagonist: in vitro studies. **British Journal of Pharmacology**, 1991.

HOLDSTOCK, D. J.; MATHIAS, A. P.; SCHACHTER, M. A comparative study of kinin, kallidin, and bradykinin. **British journal of pharmacology and chemotherapy**, 1957.

KAISER, E.; COLESCOTT, R. L.; BOSSINGER, C. D.; COOK, P. I. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. **Analytical Biochemistry**, 1970.

KEMPE, S.; FOIS, G.; BRUNNER, C.; et al. Bradykinin signaling regulates solute permeability and cellular junction organization in lymphatic endothelial cells. **Microcirculation**, 2019.

KITAMURA, N.; TAKAGAKI, Y.; FURUTO, S.; et al. A single gene for bovine high molecular weight and low molecular weight kininogens. **Nature**, 1983.

KOJIMA, H.; URANO, Y.; KIKUCHI, K.; et al. Fluorescent indicators for imaging nitric oxide production. **Angewandte Chemie - International Edition**, 1999.

KOPYLOV, A. T.; MYASOEDOV, N. F.; DADAYAN, A. K.; et al. Use of deuterium labeling by high-temperature solid-state hydrogen-exchange reaction for mass spectrometric analysis of bradykinin biotransformation. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, 2016.

KORDE CHOUDHARI, S.; CHAUDHARY, M.; BAGDE, S.; GADBAIL, A. R.; JOSHI, V. Nitric oxide and cancer: A review. **World Journal of Surgical Oncology**, 2013.

KRAUT, H.; FREY, E. K.; BAUER, E. Über ein neues Kreislaufhormon: II. Mitteilung. **Hoppe-Seyler's Zeitschrift fur Physiologische Chemie**, 1928.

KRIEG, T.; QIN, Q.; PHILIPP, S.; et al. Acetylcholine and bradykinin trigger preconditioning in the heart through a pathway that includes Akt and NOS. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, 2004.

KUOPPALA, A.; LINDSTEDT, K. A.; SAARINEN, J.; KOVANEN, P. T.; KOKKONEN, J. O. Inactivation of bradykinin by angiotensin-converting enzyme and by carboxypeptidase N in human plasma. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, 2000.

LAUTNER, R. Q.; VILLELA, D. C.; FRAGA-SILVA, R. A.; et al. Discovery and characterization of alamandine: A novel component of the renin-angiotensin system. **Circulation Research**, 2013.

LEEB-LUNDBERG, L. M. F.; MARCEAU, F.; MÜLLER-ESTERL, W.; PETTIBONE, D. J.; ZURAW, B. L. International union of pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: From molecular mechanisms to pathophysiological consequences. **Pharmacological Reviews**, 2005.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. **Methods**, 2001.

LOESER, J. D.; MELZACK, R. Pain: An overview. **Lancet**, 1999.

MANOLIS, A. J.; MARKETOU, M. E.; GAVRAS, I.; GAVRAS, H. Cardioprotective properties of bradykinin: Role of the B₂ receptor. **Hypertension Research**, 2010.

MANZINI, S.; PERRETTI, F.; DE BENEDETTI, L.; et al. A comparison of bradykinin- and capsaicin-induced myocardial and coronary effects in isolated perfused heart of guinea-pig: involvement of substance P and calcitonin gene-related peptide release. **British Journal of Pharmacology**, 1989.

MARCEAU, F.; BACHELARD, H.; BOUTHILLIER, J.; et al. Bradykinin receptors: Agonists, antagonists, expression, signaling, and adaptation to sustained stimulation. **International Immunopharmacology**, 2020.

MARSHALL, P.; HEUDI, O.; MCKEOWN, S.; AMOUR, A.; ABOU-SHAKRA, F. Study of bradykinin metabolism in human and rat plasma by liquid chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometry and orthogonal acceleration time-of-flight mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, 2002.

MARTÍNEZ-RUIZ, A.; CADENAS, S.; LAMAS, S. Nitric oxide signaling: Classical, less classical, and nonclassical mechanisms. **Free Radical Biology and Medicine**, 2011.

MATHIAS, A. P.; SCHACHTER, M. The chromatographic behaviour of wasp venom kinin, kallidin and bradykinin. **British journal of pharmacology and chemotherapy**, 1958.

MAZZEI, J. L.; D'AVILA, L. A. Chromatographic models as tools for scale-up of isolation of natural products by semi-preparative HPLC. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**, 2003.

MCEACHERN, A. E.; SHELTON, E. R.; BHAKTA, S.; et al. Expression cloning of a rat B2 bradykinin receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 1991.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, 2008.

MENKE, J. G.; BORKOWSKI, J. A.; BIERILO, K. K.; et al. Expression cloning of a human B1 bradykinin receptor. **Journal of Biological Chemistry**, 1994.

MERRIFIELD, R. B. Solid-Phase Peptide Synthesis. III. An Improved Synthesis of Bradykinin. **Biochemistry**, 1964.

MOORE, S.; STEIN, W. H. Photometric ninhydrin method for use in the chromatography of amino acids. **The Journal of biological chemistry**, 1948.

DE MOUDT, S.; LELOUP, A.; VAN HOVE, C.; DE MEYER, G.; FRANSEN, P. Isometric stretch alters vascular reactivity of mouse aortic segments. **Frontiers in Physiology**, 2017.

MULVANY, M. J.; AALKJAER, C. Structure and function of small arteries. **Physiological Reviews**, 1990.

MURPHEY, L. J.; HACHEY, D. L.; OATES, J. A.; MORROW, J. D.; BROWN, N. J. Metabolism of bradykinin in vivo in humans: Identification of BK1-5 as a stable plasma peptide metabolite. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 2000.

MURPHEY, L. J.; MALAVE, H. A.; PETRO, J.; et al. Bradykinin and its metabolite

bradykinin 1-5 inhibit thrombin-induced platelet aggregation in humans. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 2006.

NARUMIYA, S.; SUGIMOTO, Y.; USHIKUBI, F. Prostanoid receptors: Structures, properties, and functions. **Physiological Reviews**, 1999.

OCARANZA, M. P.; LAVANDERO, S.; JALIL, J. E.; et al. Angiotensin-(1-9) regulates cardiac hypertrophy in vivo and in vitro. **Journal of Hypertension**, 2010.

ORAWSKI, A. T.; SIMMONS, W. H. Degradation of bradykinin and its metabolites by rat brain synaptic membranes. **Peptides**, 1989.

ORSENIGO, F.; GIAMPIETRO, C.; FERRARI, A.; et al. Phosphorylation of VE-cadherin is modulated by haemodynamic forces and contributes to the regulation of vascular permeability in vivo. **Nature Communications**, 2012.

PARK, W. K.; ST-PIERRE, S. A.; BARABE, J.; REGOLI, D. Synthesis of peptides by the solid-phase method. III. Bradykinin: Fragments and analogs. **Canadian Journal of Biochemistry**, 1978.

PARKINGTON, H. C.; COLEMAN, H. A.; TARE, M. Prostacyclin and endothelium-dependent hyperpolarization. **Pharmacological Research**, 2004.

PERKINS, M. N.; CAMPBELL, E.; DRAY, A. Antinociceptive activity of the bradykinin B1 and B2 receptor antagonists, des-Arg9, [Leu8]-BK and HOE 140, in two models of persistent hyperalgesia in the rat. **Pain**, 1993.

PIERCE, J. V.; WEBSTER, M. E. Human plasma kallidins: Isolation and chemical studies. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 1961.

RAMESHRAD, M.; BABAEI, H.; AZARMI, Y.; FOULADI, R. F. Rat aorta as a pharmacological tool for in vitro and in vivo studies. **Life Sciences**, 2016.

REDMAN, L. W.; REGOLI, D.; TUSTANOFF, E. R. Immunological and biological activities of fragments and analogs of bradykinin. **Canadian Journal of Biochemistry**, 1979.

REGOLI, D.; BARABE, J.; PARK, W. K. Receptors for bradykinin in rabbit aortae. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, 1977.

RHALEB, N. E.; DION, S.; BARABÉ, J.; et al. Receptors for kinins in isolated arterial

vessels of dogs. **European Journal of Pharmacology**, 1989.

RIEHLE, C.; ABEL, E. D. Insulin Signaling and Heart Failure. **Circulation Research**, 2016.

ROCH-ARVEILLER, M.; CARANIKAS, S.; REGOLI, D.; GIROUD, J. P. Effects of bradykinin and some of its fragments on smooth muscles and chemotaxis. **European Journal of Pharmacology**, 1983.

ROCHA E SILVA, M.; BERALDO, W. T.; ROSENFELD, G. Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by trypsin. **The American journal of physiology**, 1949.

RONCHETTI, S.; MIGLIORATI, G.; DELFINO, D. V. Association of inflammatory mediators with pain perception. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, 2017.

ROSCIONI, S. S.; KISTEMAKER, L. E. M.; MENZEN, M. H.; et al. PKA and Epac cooperate to augment bradykinin-induced interleukin-8 release from human airway smooth muscle cells. **Respiratory Research**, 2009.

RYAN, J. W.; ROBLERO, J.; STEWART, J. M. Inactivation of bradykinin in the pulmonary circulation. **The Biochemical journal**, 1968.

SANTOS, R. A. S.; SIMOES E SILVA, A. C.; MARIC, C.; et al. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 2003.

SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nature Methods**, 2012.

SHARMA, R.; RANDHAWA, P. K.; SINGH, N.; JAGGI, A. S. Bradykinin in ischemic conditioning-induced tissue protection: Evidences and possible mechanisms. **European Journal of Pharmacology**, 2015.

SHEIKH, I. A.; KAPLAN, A. P. Mechanism of digestion of bradykinin and lysylbradykinin (kallidin) in human serum. Role of carboxypeptidase, angiotensin-converting enzyme and determination of final degradation Products. **Biochemical Pharmacology**, 1989.

SILTARI, A.; KORPELA, R.; VAPAATALO, H. Bradykinin –induced vasodilatation:

Role of age, ACE1-inhibitory peptide, mas- and bradykinin receptors. **Peptides**, 2016.

STERANKA, L. R.; MANNING, D. C.; DEHAAS, C. J.; et al. Bradykinin as a pain mediator: Receptors are localized to sensory neurons, and antagonists have analgesic actions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 1988.

SUZUKI, K.; ABIKO, T.; ENDO, N. Synthesis of Every Kinds of Peptide Fragments of Bradykinin¹). **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, 1969.

TALAMONTI, G.; D'ALIBERTI, G.; CENZATO, M. Aulus Cornelius Celsus and the Head Injuries. **World Neurosurgery**, 2020.

UHLÉN, M.; FAGERBERG, L.; HALLSTRÖM, B. M.; et al. Tissue-based map of the human proteome. **Science**, 2015.

VERANO-BRAGA, T.; FIGUEIREDO-REZENDE, F.; MELO, M. N.; et al. Structure-function studies of Tityus serrulatus Hypotensin-I (TsHpt-I): A new agonist of B2 kinin receptor. **Toxicon**, 2010.

WERNER, M. F. P.; KASSUYA, C. A. L.; FERREIRA, J.; et al. Peripheral kinin B1 and B2 receptor-operated mechanisms are implicated in neuropathic nociception induced by spinal nerve ligation in rats. **Neuropharmacology**, 2007.

WICK, M. J.; HARRAL, J. W.; LOOMIS, Z. L.; DEMPSEY, E. C. An optimized evans blue protocol to assess vascular leak in the mouse. **Journal of Visualized Experiments**, 2018.

YANG, H. Y. T.; ERDÖS, E. G. Second kininase in human blood plasma. **Nature**, 1967.

YANG, H. Y. T.; ERDÖS, E. G.; LEVIN, Y. A dipeptidyl carboxypeptidase that converts angiotensin I and inactivates bradykinin. **BBA - Protein Structure**, 1970.

YANG, X. P.; LIU, Y. H.; SCICLI, G. M.; WEBB, C. R. Role of Kinins in the Cardioprotective Effect of Preconditioning: Study of Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury in B2 Kinin Receptor Knockout Mice and Kininogen-Deficient Rats. **Hypertension**, 1997.

YAROVAYA, G. A.; NESHKOVA, A. E. Past and present research on the kallikrein-kinin system (on the 90th anniversary of the discovery of the system). **Russian Journal of Bioorganic Chemistry**, 2015.

YU, L.; YUAN, K.; PHUONG, H. T. A.; PARK, B. M.; KIM, S. H. Angiotensin-(1-5), an active mediator of renin-angiotensin system, stimulates ANP secretion via Mas receptor. **Peptides**, 2016.