



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO DE FISIOLOGIA E BIOFÍSICA

Avaliação dos Peptídeos Potenciadores de Bradicininina (BPPs) da
Bothrops jararaca na modulação do óxido nítrico e vias hipertróficas
em cardiomiócitos.

Isabella Bernardes Silva Freitas

Belo Horizonte

2014



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO DE FISIOLOGIA E BIOFÍSICA

Avaliação dos Peptídeos Potenciadores de Bradicinina (BPPs) da
Bothrops jararaca na modulação do óxido nítrico e vias hipertróficas
em cardiomiócitos.

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação
em Ciências Biológicas – Fisiologia e Biofísica da
Universidade Federal de Minas Gerais como requisito
para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Aluna: Isabella Bernardes Silva Freitas

Orientadora: Prof. Dra. Silvia Guatimosim

Co-orientadora: Dra. Danielle Ianzer

Belo Horizonte

2014

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Jesus por me abençoar e estar ao meu lado todos os dias me fortalecendo e me sustentando, pelo seu amor incondicional em minha vida.

A minha orientadora, professora Silvia Guatimosim, pela oportunidade de desenvolver este trabalho, por todos os conselhos, dedicação e ajuda.

A minha co-orientadora Danielle lanzer, pela colaboração, conhecimentos transmitidos, compreensão e ajuda.

A todos os meus colegas de laboratório Eletrocel, pelas alegrias, companheirismo, dedicação e ajuda com os experimentos realizados.

Meus pais que sempre me incentivaram e estiveram ao meu lado em todos os momentos, amo muito vocês.

A minha irmã pelo amor e carinho.

Ao meu noivo pelo amor, orações, carinho, que me aconselha e esta sempre ao meu lado.

A toda a minha família e amigos pelo amor e palavras de carinho.

Lista de Tabelas e Figuras

Tabela 1: BPPs descritos para a serpente <i>Bothrops jararaca</i>	3
Figura 1: Estrutura química primária do BPP-10c	5
Figura 2: Ilustração das etapas envolvidas na síntese do óxido nítrico.....	6
Figura 3: Estrutura primária do BPP-5a	7
Figura 4: Protocolo experimental da medida de produção de óxido nítrico nos cardiomiócitos ventriculares de camundongos.....	18
Figura 5: Protocolo experimental da expressão de proteínas envolvidas na via de óxido nítrico nos cardiomiócitos ventriculares de camundongos.....	19
Figura 6: Protocolo experimental do tratamento da cultura de cardiomiócitos provenientes de ratos neonatos.	22
Figura 7: Protocolo experimental do tratamento de ratos Wistar adultos.	24
Figura 8: Curva concentração-resposta na produção de óxido nítrico do BPP-10c em cardiomiócitos ventriculares de camundongos incubados por 20 minutos nas concentrações de 0,1µM, 1µM e 10µM.	27
Figura 9: Efeito tempo-dependente na produção de óxido nítrico do BPP-10c (0,1µM) nos tempos de incubação de 5,10, 15 e 20 minutos em cardiomiócitos ventriculares de camundongos.....	28
Figura 10: Efeito tempo-dependente na produção de óxido nítrico do BPP-5a (0,1µM) nos tempos de incubação de 5,10, 15 e 20 minutos em cardiomiócitos ventriculares de camundongos.....	29

- Figura 11:** Efeito na produção de óxido nítrico do BPP-10c nas concentrações de 0,1µM e 1µM incubados por 20 minutos em cardiomiócitos ventriculares de camundongos nocaute para o receptor de bradicinina do tipo 2 (B₂KO)..... 30
- Figura 12:** Efeito na produção do óxido nítrico do BPP-10c na concentração de 1µM incubados por 20 minutos em cardiomiócitos ventriculares de camundongos nocaute para o receptor de bradicinina do tipo 1 e 2 (B₁B₂KO).. 31
- Figura 13:** Expressão da proteína eNOS fosforilada no sítio de ativação Ser 1177 em cardiomiócitos ventriculares de camundongos tratados com BPP-10c (1µM) por 10 minutos de incubação..... 32
- Figura 14:** Expressão da proteína AKT fosforilada em cardiomiócitos ventriculares de camundongos tratados com BPP-10c (1µM) por 10 minutos de incubação.. 33
- Figura 15:** Análise da translocação nuclear da GRK5 em cardiomiócitos provenientes de ratos neonatos tratados com Isoproterenol (10µM) e BPP-10c (1µM) por um período de 72 horas. 35
- Figura 16:** Análise da translocação nuclear da GRK5 em cardiomiócitos provenientes de ratos neonatos tratados com Isoproterenol (10µM), BPP-5a (1µM), e L-NAME (1µM), por um período de 72 horas.36
- Figura 17:** Análise da translocação nuclear da GRK5 em cardiomiócitos provenientes de ratos neonatos tratados com Fenilefrina (50µM) e BPP-10c (1µM) por um período de 72. 38
- Figura 18:** Medida da área celular dos cardiomiócitos provenientes de ratos neonatos tratados com fenilefrina (50µM) e BPP-10c (1µM) por um período de 72 horas.... 39
- Figura 19:** Medida da hipertrofia cardíaca através da razão entre o peso do coração (em gramas) e o comprimento da tíbia (em centímetros) nos ratos Wistar adultos tratados com administração (i.p.) de isoproterenol (4,5mg/Kg) e mini-bombas osmóticas de BPP-10c (71nmol/Kg) por sete dias consecutivos..... 41

Figura 20: Análise da espessura da parede posterior ventricular esquerda na diástole (mm) em ratos Wistar adultos tratados com administração (i.p.) de isoproterenol (4,5mg/Kg) e mini-bombas osmóticas de BPP-10c (71nmol/Kg) por sete dias consecutivos.....42

Figura 21: Análise da espessura da parede posterior ventricular esquerda na sístole (mm) em ratos Wistar adultos tratados com administração (i.p.) de isoproterenol (4,5mg/Kg) e mini-bombas osmóticas de BPP-10c (71nmol/Kg) por sete dias consecutivos..... 42

Figura 22: Análise da dimensão interna do ventrículo esquerdo na diástole (mm) em ratos Wistar adultos tratados com administração i.p. de isoproterenol (4,5mg/Kg) e mini-bombas osmóticas de BPP-10c (71nmol/Kg) por sete dias consecutivos.
..... 43

Figura 23: Análise da dimensão interna do ventrículo esquerdo na sístole (mm) em ratos Wistar adultos tratados com administração i.p. de isoproterenol (4,5mg/Kg) e mini-bombas osmóticas de BPP-10c (71nmol/Kg) por sete dias consecutivos. . 44

Figura 24: Análise da fração de ejeção (EF%) em ratos Wistar adultos tratados com administração i.p. de isoproterenol (4,5mg/Kg) e mini-bombas osmóticas de BPP-10c (71nmol/Kg) por sete dias consecutivos..... 45

Figura 25: Análise da Fração de encurtamento (FS%) em ratos Wistar adultos tratados com administração i.p. de isoproterenol (4,5mg/Kg) e mini-bombas osmóticas de BPP-10c (71nmol/Kg) por sete dias consecutivos..... 45

Lista de Abreviaturas e Siglas

Akt: Proteína Kinase B

Ang I: Angiotensina I

Ang II: Angiotensina II

ARA-c: citosina-d-arabinofuranosida

AsL: Enzima agininosuccinatoliase

AsS: Enzima argininosuccinatosintetase

ATP: Adenosina trifosfato

B₁: Receptor de bradicinina do tipo 1

B₁B₂KO: Nocaute para o receptor de bradicinina do tipo 1 e 2.

B₂: Receptor de bradicinina do tipo 2

B₂KO: Nocaute para o receptor de bradicinina do tipo 2

Bj: *Bothrops jararaca*

BK: Bradicinina

BPP: Peptídeo Potenciador de Bradicinina

BSA: Albumina de soro bovino

cm: centímetro

CT: Controle

DAF-FM: sonda fluorescente sensível ao óxido nítrico; 4 amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluoresceindiacetate

DAPI: Marcador nuclear; 4', 6'-diamidino-2 phenylindole

ECA: Enzima conversora de Angiotensina

EF: Fração de ejeção

eNOS: óxido nítrico sintase endotelial

FE: Fenilefrina

FS: Fração de encurtamento

g: grama

GAPDH: Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

GRK5: Receptor de Kinase 5 acoplado à proteína G

HBSS: Solução balanceada de Hank's

i.p.: intraperitoneal

iNOS: óxido nítrico sintase induzível

IPP: Isoleucina-Prolina-Prolina

ISO: Isoproterenol

Kg: Quilograma

L-Arg: L-arginina

L-NAME: Nitro-L-arginina metil éster hidrocloreto

LVIDd: dimensões internas do ventrículo esquerdo em diástole

LVIDs: dimensões internas do ventrículo esquerdo em sístole

LVPWd: espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo em diástole

LVPWs: espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo em sístole

M₁: receptor muscarínico

mg: miligrama

MHz: megahertz

min: minuto

ml: mililitro

mm: milímetro

nmol: nanomolar

nNOS: óxido nítrico sintase neuronal

NO: óxido nítrico

NOS: óxido nítrico sintase

PBS: Tampão fosfato salino

PFA: Paraformaldeído

s.c.: sub-cutanea

Ser: Serina

SHR: Rato espontaneamente hipertenso

VE: Ventrículo esquerdo

μl: microlitro

μM: micromolar

μm²: micrometro quadrado

Resumo

Os peptídeos potenciadores de bradicinina (BPPs) presentes no veneno da serpente *Bothrops jararaca* foram os primeiros inibidores naturais descritos da enzima conversora de angiotensina I (ECA). Este efeito inibitório parecia explicar a forte ação anti-hipertensiva desses peptídeos, contudo relatos recentes sugerem que a atividade dos BPPs não está relacionada exclusivamente à inibição da ECA e, portanto, pode envolver a participação de outros mecanismos de ação. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar se BPPs teriam uma ação direta no coração, com o foco na produção de óxido nítrico e na via de sinalização hipertrófica em cardiomiócitos. Nossos resultados mostram que os BPP-10c e BPP-5a promovem um aumento da produção de óxido nítrico, tanto nos cardiomiócitos provenientes de camundongos selvagens, quanto nos cardiomiócitos provenientes de camundongos nocautes para os receptores de bradicinina tipo 1 e 2. Ao analisarmos a fosforilação das proteínas envolvidas na via do óxido nítrico, p-AKT e p-eNOS, observamos um aumento significativo dos níveis de fosforilação eNOS nos cardiomiócitos tratados com BPP-10c, sugerindo que o aumento da produção de óxido nítrico envolve a participação desta enzima. Além disso, foi observado que o BPP-10c e o BPP-5a são capazes de prevenir a translocação nuclear da GRK5 induzida pelos agonistas adrenérgicos isoproterenol e fenilefrina, deste modo, prevenindo o aumento da área celular dos cardiomiócitos provenientes de ratos neonatos. Observou-se que o efeito anti-hipertrófico do BPP-5a é dependente da participação do óxido nítrico. *In vivo* avaliou-se o efeito da infusão do BPP-10c, durante sete dias consecutivos, sobre a função cardiovascular e na hipertrofia cardíaca induzida por isoproterenol. Observamos que o tratamento concomitante com o BPP-10c não promoveu alterações significativas na função cardíaca desses animais, no entanto preveniu a hipertrofia cardíaca induzida pelo isoproterenol. Em conjunto, os dados apontam que os BPPs são importantes cardioprotetores e este estudo abre perspectivas para o desenvolvimento de fármacos baseado em um novo alvo terapêutico.

Palavras-chave: Peptídeos Potenciadores de Bradicininas (BPPs), óxido nítrico, hipertrofia cardíaca, cardiomiócito.

Abstract

The bradykinin potentiating peptides (BPPs) present in the venom of *Bothrops jararaca* were the first natural inhibitors described for the angiotensin converting enzyme (ACE). This inhibitory effect seems to explain the strong anti-hypertensive actions of these peptides; however, recently studies suggest that the activity of BPPs is not only related to the inhibition of ACE but may also involve other mechanisms. Therefore, the aim of this work was to evaluate the effects of BPPs on the production of nitric oxide and on hypertrophic signaling in cardiomyocytes. Our results show that BPP-10c and BPP-5a promoted an increase on nitric oxide production in cardiomyocytes isolated from wild type mice and also isolated from Bradykinin B1 and B2 receptor knockout mice. We analyzed the phosphorylation levels of proteins involved on the nitric oxide pathway, p-AKT and p-eNOS, and observed an increase on p-eNOS levels in cardiomyocytes treated with BPP-10c, suggesting an involvement of this enzyme in the nitric oxide production. We also observed that BPP-10c and BPP-5a were able to inhibit the nuclear translocation of GRK5 induced by isoproterenol and phenylephrine and therefore prevented the cellular hypertrophy. Moreover, the anti-hypertrophic effect of BPP-5a was dependent on nitric oxide production. On our *in vivo* experiments, we evaluated the effects of the BPP-10c infusion on the cardiovascular function and cardiac hypertrophy of wistar rats treated with isoproterenol for seven consecutive days. We observed that concomitant treatment with BPP-10c did not promote any significant alterations on the cardiovascular function of isoproterenol treated rats, however, prevented the cardiac hypertrophy induced by isoproterenol. Taken together, these findings suggested that BPPs are important cardioprotectors opening new perspectives for the development of drugs based on BPPs.

Keywords: Bradykinin potentiating peptides (BPPs), nitric oxide, cardiac hypertrophy, cardiomyocytes.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	2
Descrição dos Peptídeos Potenciadores de Bradicinina (BPPs)	2
1.2 BPP-10c	5
1.3 BPP-5a	7
1.4 O óxido nítrico e seu papel em cardiomiócitos..	8
1.5 Hipertrofia cardíaca.	9
2. OBJETIVOS	12
2.1 Objetivo geral	12
2.2 Objetivos específicos.....	12
3. MATERIAIS E MÉTODOS	15
3.1 Animais.....	15
3.2 BPPs	15
3.3 Isolamento dos cardiomiócitos ventriculares provenientes de camundongos..	15
3.4 Medida de óxido nítrico	16
3.5 Western Blot.....	17
3.6 Protocolo experimental da avaliação da via do óxido nítrico em cardiomiócitos ventriculares de camundongos.....	18
3.7 Isolamento e cultura dos cardiomiócitos ventriculares provenientes de ratos neonatos.....	19
3.8 Imunofluorescência	20
3.9 Medida da área celular dos cardiomiócitos provenientes de ratos neonatos..	19
3.10 Protocolo experimental da cultura de cardiomiócitos provenientes de ratos neonatos.....	21
3.11 Implantação de mini-bomba osmótica	22
3.12 Ecocardiografia	22
3.13 Medida da hipertrofia cardíaca	23
3.14 Protocolo de hipertrofia cardíaca em ratos induzida pelo isoproterenol.....	23
3.15 Análises estatísticas	24

4.RESULTADOS	26
4.1 Produção de óxido nítrico em cardiomiócitos ventriculares de camundongos tratados com BPP-10c e BPP-5a.	26
4.2 Produção de óxido nítrico em cardiomiócitos ventriculares de camundongos nocaute para o receptor de bradicinina	30
4.3 Expressão da eNOS fosforilada em cardiomiócitos ventriculares de camundongos tratados com BPP-10c	32
4.4 Expressão da proteína Akt fosforilada em cardiomiócitos ventriculares de camundongos tratados com BPP-10c.	33
4.5 Efeito dos BPPs na translocação nuclear da GRK5 e na medida da área celular em cardiomiócitos provenientes de ratos neonatos tratados com agonistas adrenérgicos.....	34
4.6 Efeito da administração crônica do BPP-10c na hipertrofia cardíaca e função cardiovascular induzida pelo isoproterenol em ratos Wistar adultos <i>in vivo</i>	40
5.DISSCUSSÃO	47
6.CONCLUSÃO	53
7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Peptídeos Potenciadores de Bradicinina (BPPs)

Na década de 60, estudos realizados para avaliação do veneno bruto da serpente *Bothrops jararaca* (*Bj*) permitiram o isolamento, identificação e o sequenciamento de algumas toxinas. Essas toxinas do veneno foram chamados de peptídeos potenciadores de bradicinina (do inglês, bradykinin potentiating peptides – BPPs), devido à capacidade de potencializar os efeitos biológicos evocados pela bradicinina (BK) em diversas preparações de órgãos isolados (Ferreira, 1965, Ferreira e cols., 1970a). Além disso, foi observado que os BPPs foram capazes de inibir a atividade catalítica da enzima conversora de angiotensina I (ECA) (Ferreira e cols., 1970b). Sabendo do papel dessa enzima na regulação da pressão arterial (Skeggs e cols., 1956), diversos estudos foram conduzidos em animais e pacientes para avaliar o potencial terapêutico do BPP-9a (Krieger e cols., 1971; Gavras e cols., 1974; Gavras e cols. 1975). Mais tarde o BPP-9a foi utilizado como protótipo para o desenvolvimento do Captopril, primeiro anti-hipertensivo comercial da classe dos inibidores de ECA (Ondetti e Cushman, 1984; Vane, 1999).

Uma grande variedade de peptídeos foram identificados no veneno e no cérebro da *Bj* (Ferreira e cols., 1970a; Murayama e cols., 1997; Hayashi e cols., 2005; lanzer e cols., 2004; Pimenta e cols., 2007; Zelanis e cols., 2010; Tashima e cols., 2012). Até o momento já foram descritas para a *B. jararaca* 36 sequências de BPPs, conforme apresentado na Tabela 1. As moléculas dos BPPs apresentam de 5 a 17 resíduos de aminoácidos e similaridades estruturais comuns, como: I) presença de um resíduo de ácido piroglutâmico na posição N-terminal; II) alto conteúdo de prolínas; III) resíduo de prolina na posição C-terminal na maioria das sequências; IV) BPPs contendo mais de 7 resíduos de aminoácidos geralmente apresentam o tripeptídeo isoleucina-prolina-prolina (IPP) na porção C-terminal (lanzer e cols., 2004; Zelanis e cols., 2010).

Tabela 1: BPPs descritos para a serpente *Bothrops jararaca*. (N-t)=N-terminal, (C-t)=C-terminal, <E=ácido piroglutâmico.

Sequências de aminoácidos	Nomenclatura	MM (Da)
<EKWAP	BPP-5a ^{a,c,d,e}	611,7
<EWPRP	BPP-5b ^e ou BPP-9a cleaved ^{f*}	665,8
<ESWPGP	BPP-6a ^{a,e}	653,7
<ENWPRP	BPP-10b cleaved ^{f*}	779,4
<ENWPHP	BPP-10c cleaved ^{f*}	760,3
<EDGPIPP	BPP-7a ^e	705,8
<EWPRPTP	BPP-11a	863,4
<EWPRPQIPP	BPP-9a ^{a,b,e}	1101,3
<ESWPGPNIPP	BPP-10a ^{a,b,c,e,g}	1075,2
<ENWPRPQIPP	BPP-10b ^{b,e,g}	1215,4
<ENWPHPQIPP	BPP-10c ^{a,b,c,d,e}	1196,3
<EQWAQNWPHPQIPP	BPP-10c +<EQWA(N-t) ^g	1709,5
<EWPRPTPQIPP	BPP-11a ^{b,e}	1299,5
<EGRAPGPPIPP	BPP-11b ^{c,e}	1069,2
<EGRAPHPPIPP	BPP-11c ^c	1149,3
<EGRPPGPPIPP	BPP-11d ^e	1095,3
<EARPPHPPIPP	BPP-11e ^{d,h}	1189,4
<EARPPHPPIPPAP	BPP-11e +AP(C-t) ^g	1357,7
<EARPPHPPIPPAPL	BPP-11e +APL(C-t) ^g	1470,6
<EARPRHP[Q/K][I/L]PP	BPP-11g ^h	1278,7
<EGRHPP[I/L]PPAP	BPP-11h ^h	1148,7
<ENGPRP[I/L]G[I/L]PP	BPP-11i ^h	1127,7
<ENRHPP[I/L]PPAP	BPP-11j ^h	1205,6
<EQWAQARPPHPPIPPAP	BPP-11e +<EQWA(N-t), AP(C-t) ^g	1870,5
<EGWAWPRPQIPP	BPP-12a ^{a,e}	1415,6
<EWGRPPGPPIPP	BPP-12b ^d	1281,5
<EWAQWPRPQIPP	BPP 12c ^{e,g}	1485,8
<ELGPPPRPQIPP	BPP-12d ^g	1279,8
<EARPRGPG[Q/K][I/L]PP	BPP-12e ^h	1295,6
<EGGWPRPGPEIPP	BPP-13a ^{d, e,g}	1370,5
<GWPRPGPEIPP	BPP-13a -<EG (N-t) ^g	1202,6
<EWAQGGWPRPGPEIPP	BPP-13a +<EWA (N-t) ^g	1756,6
<EQWAQGGWPRPGPEIPP	BPP-13a +<EQWA (N-t) ^g	1884,5
<EGGLPRPGPEIPP	BPP-13b ^{a,b,c,d,e}	1297,5
<EGRPPHPP[I/L]PPAP	BPP-13c	1342,6
<EGRAPHPP[I/L]PPAP	BPP-13d	1316,7

^a(Ferreira e cols., 1970a); ^b(Ondetti e cols., 1971); ^c(Murayama e cols., 1997); ^d(Hayashi e cols., 2003); ^e(Ilanzer e cols., 2004); ^f(Pimenta e cols., 2007); ^g(Zelanis e cols., 2010); ^h(Tashima e cols., 2012).

Mesmo com similaridade entre as sequências peptídicas, os BPPs apresentam diferenças funcionais tanto sobre a inibição da ECA quanto a potencialização da BK (Cotton e cols., 2002; Hayashi e cols., 2003; lanzer e cols., 2004; Mueller e cols., 2005; Gomes e cols., 2007; lanzer e cols., 2007; Verano-Braga e cols., 2008).

A ECA é uma enzima de fundamental importância na fisiologia cardiovascular, pois converte a angiotensina I em angiotensina II e degrada a BK (Margolius, 1995). A bradicinina é um nonapeptídeo que pertence ao grupo das cininas, que é derivado do cininogênio, devido à ação da enzima calicreína (Meki e cols., 1995). As cininas estão presentes em vários processos fisiológicos que podem causar a vasodilatação e a estimulação da produção de NO (Moreau e cols., 2005).

As diversas atividades promovidas pelas cininas são mediadas através da ligação destas a dois tipos de receptores específicos, os receptores de bradicinina do tipo 1 e 2 (B_1 e B_2). Ações como a vasodilatação, hipotensão e liberação de NO, são mediadas pelo receptor B_2 e que é expresso constitutivamente em muitos tecidos, inclusive no coração (Regoli e cols., 1993; Kinshurashvili e cols., 2005), enquanto as ações mediadas pelos receptores B_1 tem um papel importante em processos inflamatórios e na angiogênese (Couture e Girolami, 2004; Campbell, 2003).

Os BPPs foram descritos como os primeiros inibidores naturais da ECA, ou seja, atuam impedindo tanto a formação de Ang II, como também inibindo a degradação da BK, ocasionando respostas anti-hipertensivas (Stewart e cols., 1971). Apesar da inibição da ECA ter sido conceitualmente estabelecida como mecanismo responsável pela ação dos BPPs, recentemente foi comprovado que outros alvos moleculares estão envolvidos nos efeitos causados por esses peptídeos (lanzer e cols., 2007; Camargo e cols., 2012; Moraes e cols., 2013).

1.2 BPP-10c

O BPP-10c é um oligopeptídeo rico em prolina com uma sequência peptídica de 10 resíduos de aminoácidos (Figura 1). Foi primeiramente isolado e sequenciado no veneno bruto da *Bothrops jararaca* por Ondetti e colaboradores (1971). O BPP-10c também foi identificado nos venenos das serpentes *Bothrops insularis* (Cintra e cols., 1990) e *Bothrops jararacussu* (Rioli e cols., 2008), e recebeu diferentes nomenclaturas: BPPIV-1-B β , V-7, SQ 20858, S₄⁻,_{3,1}⁻ e BPP-10c, este último sugerido por Stewart e cols. (Stewart e cols., 1971).

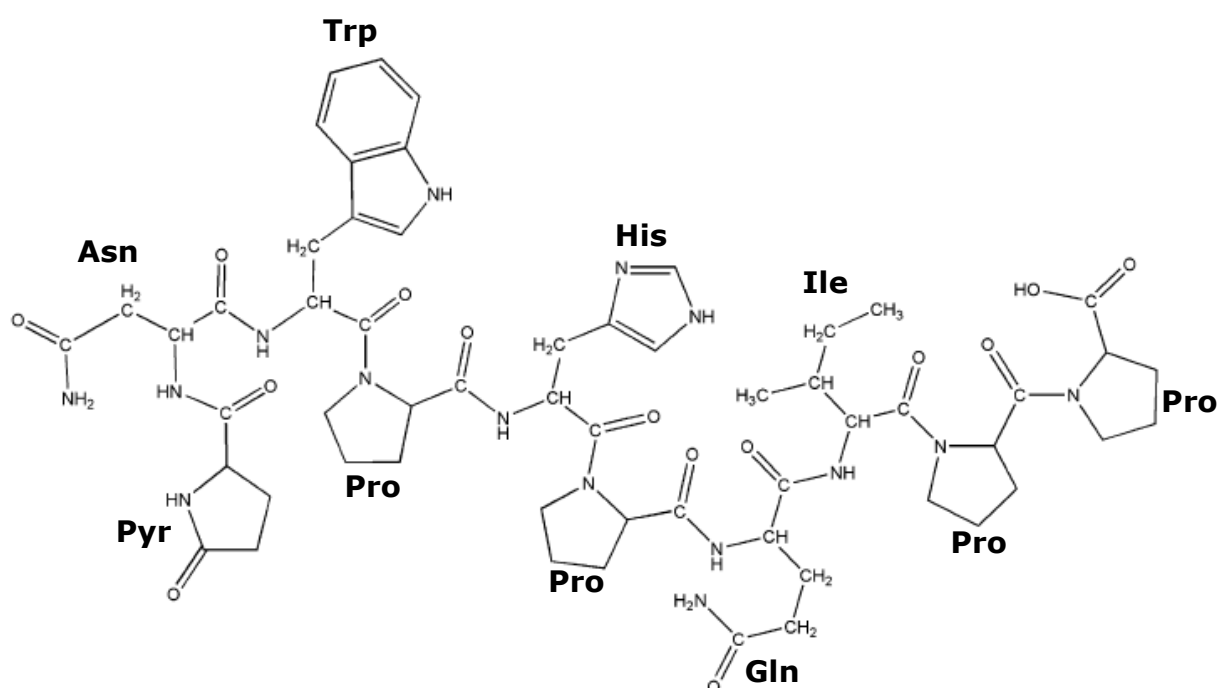


Figura 1: Estrutura primária do BPP-10c (De Sousa e cols., 2010).

Estudos de biodistribuição do BPP-10c marcado com I¹²⁵ em camundongos demonstraram que esse peptídeo se acumula em vários órgãos, incluindo o coração, mesmo após a administração do inibidor de ECA, o Captopril (Silva e cols., 2008).

Até o momento, estudos *in vivo* demonstraram que os BPPs 5a, 7a, 10c, 11e, 12b e 13a promovem uma duradoura redução da pressão arterial e da frequência cardíaca em ratos espontaneamente hipertensos (SHRs) (lanzer D. A., 2006, lanzer e cols., 2007, lanzer e cols., 2011, Morais e cols., 2013).

Dentre os BPPs avaliados, o BPP-10c é considerado o mais potente para reduzir a pressão arterial de animais hipertensos. No entanto, o efeito anti-hipertensivo do BPP-10c não está diretamente relacionado com sua capacidade de inibir a ECA (Ilanzer e cols., 2007). Ensaios *in vitro* e *in vivo* mostraram que o aumento da atividade catalítica da enzima argininosuccinatosintetase (AsS) é, em parte, o responsável pelo efeito anti-hipertensivo evocado pelo BPP-10c (Guerreiro e cols., 2009).

A enzima argininosuccinatosintetase é uma enzima passo limitante na produção de óxido nítrico (NO) e pode ser encontrada no citoplasma, na mitocôndria e na membrana plasmática (Husson e cols., 2003). A AsS é responsável pela conversão da citrulina em argininosuccinato, que sob ação da argininosuccinatoliase (AsL) forma L-arginina (L-Arg) e fumarato. A L-Arg serve de substrato para síntese de óxido nítrico através da ação da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS). A L-citrulina, sub-produto da conversão de L-Arg em NO pela eNOS, pode ser reciclada novamente a L-arginina pela ação da AsS (Hecker e cols., 1990; Shen e cols., 2005; Flam e cols., 2007) (Figura 2).

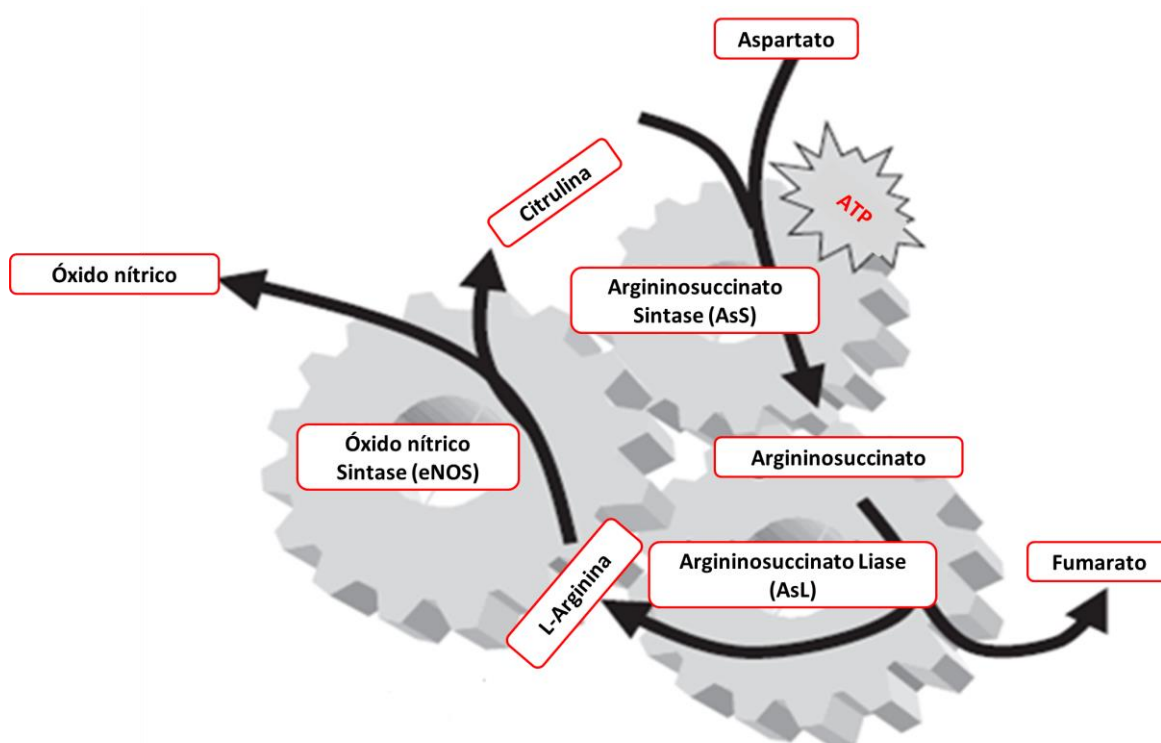


Figura 2: Ilustração das etapas envolvidas na síntese do óxido nítrico (Adaptado de Solomonson e cols., 2003).

1.3 BPP-5a

O BPP-5a foi o primeiro peptídeo isolado do veneno bruto da *Bj* (Figura 3). Diferente da maioria dos BPPs, o BPP-5a não possui o tripeptídeo IPP na sua porção C-terminal (Ferreira e cols., 1970a).

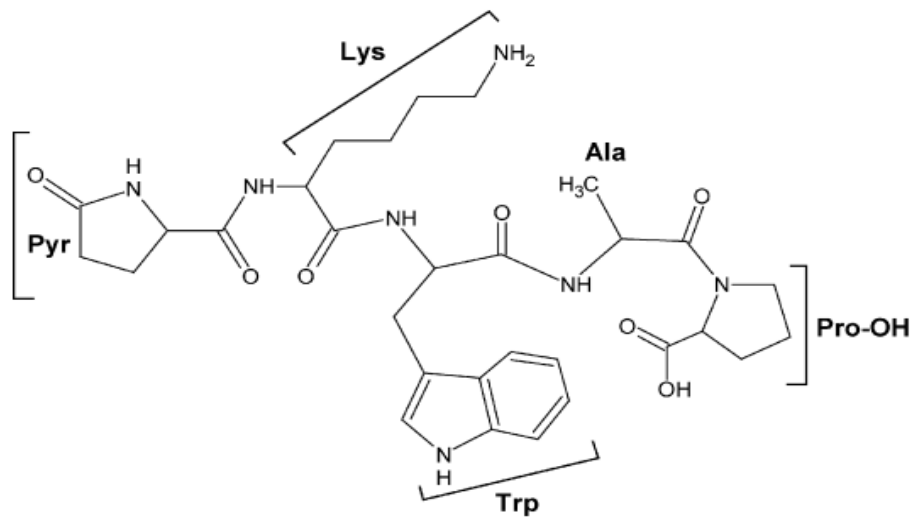


Figura 3: Estrutura primária do BPP-5a (Denadai e cols., 2007).

Embora o BPP-5a tenha sido descrito como um agente potencializador da BK (Ferreira e cols., 1970a; Ondetti e cols., 1971; Murayama e cols., 1997), sua ação sobre a ECA não explica seu efeito anti-hipertensivo (lanzer e cols., 2011). A ECA possui dois sítios ativos homólogos, C- e N-terminal, com atividades catalíticas distintas. O sítio C-terminal, envolvido na regulação da pressão arterial, é responsável pela hidrólise da BK e na formação de angiotensina II (Wei e cols., 1991; Coates, 2003). O BPP-5a tem maior afinidade para o sítio N-terminal da ECA, dando sustentação à hipótese da possível existência de outros alvos moleculares (lanzer e cols., 2011).

Recentemente, foi mostrado que os efeitos anti-hipertensivo e vasodilatador evocados pelo BPP-5a são dependentes de NO, sem o envolvimento dos receptores de bradicinina B₁ e B₂ (lanzer e cols., 2011). No entanto, esses efeitos não estão esclarecidos na literatura, uma vez que foi sugerido que a ação vasodilatadora do BPP-5a é mediada pelos receptores de BK, (B₂) e Muscarínico, (M₁) (Morais e cols., 2011).

1.4 O óxido nítrico e seu papel em cardiomiócitos

O óxido nítrico (NO) é uma molécula que está envolvida em diversas funções fisiológicas e fisiopatológicas, com ações importantes na regulação da homeostase. O papel biológico do NO foi demonstrado inicialmente nos vasos, nos quais participa do mecanismo de relaxamento e na regulação do tônus vascular (Harrison, 1996).

A biossíntese do NO ocorre a partir da oxidação de L-arginina (L-Arg) pela enzima óxido nítrico sintase (NOS). Há três isoformas de NOS que são codificadas por genes distintos: a NOS neuronal (nNOS), encontrada em concentrações elevadas em tecidos neuronais, a NOS induzível (iNOS) que é encontrada em macrófagos e expressa em resposta a estímulos pró-inflamatórios, e a NOS endotelial (eNOS) que foi identificada como a enzima que produz fatores relaxantes derivados do endotélio (Davis e cols., 2001; Marleta, 1994; Murad, 1996). As três isoformas da NOS estão presentes em cardiomiócitos (Oess e cols., 2006; Mungrue e cols., 2002).

A nNOS e a eNOS apresentam expressão constitutivas e tem suas ações regulada pelo $[Ca^{+2}]_i$ via calmodulina (Balligand e cols., 1997). Nos cardiomiócitos, a eNOS localiza-se nas caveolas, ancorada pela caleolina 3 na membrana plasmática, próximo aos canais de Ca^{+2} tipo L (Kempf e cols., 2004). A nNOS está presente nos gânglios nervosos intracardíacos, nas fibras nervosas atriais e algumas fibras nervosas perivasculares dos ventrículos. (Klimaschewski e cols., 1992).

O NO produzido no endotélio possui ação vasodilatadora por ação na musculatura lisa dos vasos. Além disso, efetores circulantes, como a BK, ligam-se a receptores específicos na membrana das células endoteliais, sinalizando uma liberação do transiente de cálcio intracelular, o qual se liga à calmodulina formando o complexo cálcio-calmodulina (Ca^{+2} /CaM) responsável pela ativação da eNOS. Desse modo, a eNOS torna-se ativada para produzir NO na presença adequada de

L-arginina o que possibilita que essa enzima catalise reações de oxidação da L-arginina em citrulina e liberação de NO (Busse e Fleming, 1995).

O NO formado no endotélio difundiu-se para a musculatura lisa do vaso promovendo a ativação da guanilato ciclase e conseqüente a produção de GMP cíclico (cGMP). O cGMP atua sobre canais de K^+ dependentes de voltagem dificultando a despolarização destas células, além de promover diretamente a diminuição da $[Ca^{+2}]_i$ promovendo relaxamento muscular (Cawley e cols., 2007).

Além disso, o NO está envolvido em um papel benéfico na hipertrofia cardíaca (Shah, 2005; Jansses e cols., 2004). Estudos demonstraram que o NO promove efeito anti-hipertrofico por meio da modulação da via dependente de cGMP. A via NO/cGMP desenvolve uma regulação negativa sobre a hipertrofia em cardiomiócitos induzido por agonistas adrenérgico inibindo os fatores de crescimento em cardiomiócitos e fibroblastos. (Calderone e cols., 1998).

1.5 Hipertrofia cardíaca

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) (2005), as doenças cardiovasculares lideram as causas de mortes no mundo, dentre essas doenças está a hipertrofia ventricular esquerda (HVE). A HVE ocorre em resposta à sobrecarga hemodinâmica descrita em várias condições fisiológicas e patológicas e pode ser definida como um aumento na massa cardíaca, associada ao aumento da fibrose intersticial, morte celular e disfunção cardíaca (Bernardo e cols., 2010). No plano celular, é caracterizada pelo aumento do tamanho celular, aumento da síntese protéica e ativação de genes hipertroficos (Frey e Olson, 2003).

O crescimento dos cardiomiócitos na hipertrofia ventricular esquerda pode ocorrer pela adição de sarcômeros em série, ocasionando o aumento do espessamento da parede e diminuição da luz do ventrículo ou em paralelo, ocasionando o aumento do espessamento da parede e ampliação da luz do ventrículo, permitindo que a célula aumente em comprimento ou em diâmetro, levando à hipertrofia excêntrica ou concêntrica, respectivamente (Kempf, 2004)

O estímulo primário para a hipertrofia é traduzido no interior da célula como alterações bioquímicas e levam a ativação de segundos mensageiros que irão agir no núcleo celular, regulando a transcrição, e finalmente determinarão a expressão gênica que induz a hipertrofia (Knowlton e cols., 1993).

Os cardiomiócitos expressam tanto receptores α_1 -adrenérgicos (α_1 -AR), quanto receptores β -adrenérgicos (β -AR). A estimulação dos receptores β -AR ativa a adenilato-ciclase pela interação com a proteína G estimulatória (Gs), a qual desencadeia cascatas intracelulares que ativam proteínas quinases A (PKA), estimulando vias pró-hipertróficas (Dash e cols., 2003). A estimulação crônica dos β -AR pela administração do isoproterenol, induz o aumento da massa cardíaca dos cardiomiócitos e aumento de fibrose miocárdica, o que culmina com a insuficiência cardíaca (Ozaki e cols., 2002).

A estimulação dos receptores α_1 -adrenérgicos (α_1 -AR) induz a ativação da proteína Gq, esta provoca a ativação da fosfolipase C, que estimula hidrólise de fostadil inositolis da membrana, gerando dois segundos mensageiros, o diacilglicerol (DAG) e o inositol trifosfato (IP3). O IP3 estimula a liberação de Ca^{+2} do retículo sarcoplasmático, enquanto o DAG ativa a proteína quinase C (PKC) e, esta, por sua vez, induz a hipertrofia em cultura e miócitos neonatais (Knowlton, 1993)

Os receptores acoplados a proteínas G quinases (GRKs) desempenham um papel fundamental na hipertrofia cardíaca é abundantemente expressa em cardiomiócitos. A estimulação de agonistas adrenérgicos em cardiomiócitos promove a ativação da calmodulina (CaM) que em sequência promove uma interação com a GRK5 na membrana plasmática, assim a GRK5 é dirigida para o núcleo. Uma vez no núcleo, a GRK5 atua em genes hipertróficos, como a MEF2 e HDAC5, induzindo um aumento da transcrição desses genes, contribuindo para a hipertrofia cardíaca e o aumento da área celular (Gold, e cols., 2013; Martini, e cols., 2008).

As vias de sinalização que promovem a hipertrofia cardíaca já estão bem estabelecidas, no entanto ainda não estão esclarecidos por completo os mecanismos que se opõem à hipertrofia em cardiomiócitos. Assim, o óxido nítrico tem apresentado um papel benéfico na hipertrofia cardíaca (Shah, 2005; Jansses ecol., 2004)

Contudo, o presente estudo propôs avaliar a ação dos BPP-10c e BPP-5a na produção de óxido nítrico em cardiomiócitos, além disso, verificar se este efeito é mediado via receptor(es) de bradicinina. Identificar o possível efeito dos BPPs nas vias de sinalização de óxido nítrico em cardiomiócitos e avaliar o efeito dos BPPs em modelos de hipertrofia cardíaca *in vitro* e *in vivo*.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Estudar a ação dos BPP-10c e BPP-5a na liberação do óxido nítrico, nas vias hipertróficas em cardiomiócitos e sobre a hipertrofia cardíaca *in vivo*.

2.2 Objetivos Específicos

Avaliar os efeitos do BPP-10c e do BPP-5a na via do óxido nítrico e vias hipertróficas *in vitro*.

- I. Avaliar a produção de óxido nítrico induzida pelos BPP-10c e BPP-5a em cardiomiócitos ventriculares de camundongos.
- II. Avaliar a produção de óxido nítrico induzida pelo BPP-10c em cardiomiócitos ventriculares de camundongos nocautes para os receptores de bradicinina tipo 1 e do tipo 2.
- III. Investigar a expressão das proteínas envolvidas no aumento do óxido nítrico através da via p-NOS e p-AKT, em cardiomiócitos ventriculares de camundongos tratados com BPP-10c.
- IV. Avaliar os efeitos dos BPP-10c e BPP-5a na hipertrofia celular através da via da GRK5 e medida da área celular induzida por agonistas adrenérgicos em cardiomiócitos provenientes de ratos neonatos.
- V. Investigar se o efeito benéfico do BPP-5a na hipertrofia celular induzida por agonistas adrenérgicos é dependente de óxido nítrico em cardiomiócitos provenientes de ratos neonatos.

Avaliar os efeitos da administração crônica do BPP-10c em ratos com hipertrofia cardíaca induzida pelo isoproterenol *in vivo*.

- I. Verificar o efeito da infusão de BPP-10c na hipertrofia cardíaca e função cardiovascular induzida pelo isoproterenol em ratos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Para a realização dos ensaios *in vitro* foram utilizados camundongos C57BL/6, camundongos nocaute para os receptores de bradicinina tipo 1 (B₁KO) e camundongos nocaute para os receptores de bradicinina tipo 1 e tipo 2 (B₁B₂KO) com idade de 8 a 12 semanas. Para os experimentos de cultura celular de cardiomiócitos neonatos foram utilizados ratos Wistar de 3 a 5 dias de idade. Para experimentos *in vivo* foram utilizados ratos Wistar com idade entre 10 a 12 semanas. Os animais foram provenientes do Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB-UFMG) e foram mantidos no Biotério do Departamento de Fisiologia e Biofísica com livre acesso à água e ração, à temperatura ambiente entre 22-24°C e ciclo claro-escuro de 14/10 horas.

3.2 BPPs

Os peptídeos BPP-10c e o BPP-5a foram fornecidos pela Dra. Danielle lanzer, sintetizados no Laboratório Especial de Toxinologia do Instituto Butantan – São Paulo / Brasil, segundo o método de síntese de fase-sólida pela estratégia Fmoc e purificados por cromatografia de fase-reversa em sistema de HPLC como descrito em lanzer e cols. 2004.

3.3 Isolamento dos cardiomiócitos ventriculares provenientes de camundongos

Para a obtenção dos cardiomiócitos ventriculares de camundongos C57BL/6 e camundongos nocaute para os receptores de bradicinina tipo 1 e tipo 2, foi utilizado o procedimento padrão para a dissociação enzimática do tecido cardíaco. Após o sacrifício dos animais, os corações foram retirados e rapidamente perfundidos retrogradamente pelo método de Langendorff com uma solução tampão de digestão

livre de Ca^{+2} , contendo NaCl (130mM), KCl (5,4mM), HEPES (25mM), MgCl_2 (0,5mM), NaH_2PO_4 (0,33mM), ácido láctico (1mM), ácido pirúvico (3mM), glicose (22mM) e insulina (10u/L). Os corações foram perfundidos com o tampão de digestão até a retirada dos resíduos de sangue. Após isso, os corações foram perfundidos com o tampão de digestão suplementado com CaCl_2 (50 μM) e colagenase tipo II (1mg/mL) até ficar macio.

Após a digestão, foram utilizadas apenas as câmaras ventriculares que foram picotadas e homogeneizadas para a dissociação mecânica. Após a dissociação dos cardiomiócitos ventriculares, as células foram colocadas em solução Tyrode contendo NaCl (140mM), KCl (5mM), HEPES (5mM), NaH_2PO_4 (1mM), MgCl_2 (1mM), CaCl_2 (1,8mM) e glicose (10mM). Após o isolamento, as células foram prontamente utilizadas para os experimentos de medida da produção do óxido nítrico e Western Blot.

3.4 Avaliação da produção de óxido nítrico

A produção de óxido nítrico foi avaliada em cardiomiócitos ventriculares de camundongos C57BL/6 e camundongos nocaute para os receptores de bradicinina tipo 1 e tipo 2. A medida da produção de NO foi realizada através de uma sonda sensível ao óxido nítrico, DAF-FM (4amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetate) (Molecular Probes). Os cardiomiócitos ventriculares foram incubados a 37° C por 30 minutos com 5 $\mu\text{mol/L}$ de DAF-FM. Após o período de incubação, as células foram lavadas e mantidas a 37° C por mais 30 minutos com solução de Tyrode (os componentes da solução está descrito no item 3.3). Após a lavagem, os cardiomiócitos foram tratados com BPP-10c nas concentrações 0,1 μM ; 1 μM e 10 μM nos tempos de 5 a 20 minutos e BPP-5a nas concentrações de 0,1 μM nos tempos de 5 a 20 minutos e posteriormente a sonda DAF-FM foi excitada no comprimento de onda de 488nm e com emissão em 515nm. As imagens da fluorescência decorrente da produção de óxido nítrico foram obtidas por microscopia confocal (Zeiss 510 Meta) (ICB, CEMEL, UFMG) e mensuradas pelo software Image J (NIH).

3.5 Western Blot

Para investigar os níveis de expressão das proteínas envolvidas na via do óxido nítrico, foram utilizados cardiomiócitos ventriculares provenientes de camundongos C57BL/6 e incubados por 10 minutos com BPP-10c (1 μ M). As células foram homogeneizadas em tampão de lise contendo NaCl (100mM), Tris-base (50mM), EDTA-2 Na (5mM), Na₄P₂O₇ x 10H₂O (50mM), MgCl₂ (1mM), detergentes (Nonidet P40 1%; Triton X-100 0,3% e Sodiumdeoxycholate 0,5%), inibidores de protease (200mM de PMSF; 15,7mg/mL de benzamidina e 10 μ L de pepstatina) e inibidores de fosfatase (20mM de NAF e 1mM de Na₃VO₄).

Ao fim deste processo, o conteúdo foi centrifugado a 8.000 rpm por 12 minutos, a 4°C. As proteínas foram quantificadas utilizando o método de Bradford (Bradford, 1976). Entre 30 μ g e 50 μ g de proteína foram diluídas em tampão de amostra (5x – 2M Tris pH=6,8, 20% glicerol, 30% SDS, 25% β -mercaptoetanol, 0,1 % Azul de Bromofenol) para a separação em gel de SDS-PAGE (sodiumdodecyl (lauryl) sulfate-poliacrilamide) em concentração de 10-12%, dependendo da massa molecular da proteína a ser avaliada, e o gel de concentração a 4%. Para controle da massa molecular das proteínas, foi utilizado um padrão de massa molecular (BIO-RAD).

Após serem separadas em gel, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose ou PVDF. A qualidade da transferência foi monitorada através da coloração da membrana com solução de Ponceau (0,2%). As membranas foram lavadas com TBS-Tween e colocadas por 1 hora em solução de bloqueio (TBS-Tween com 5% de leite desnatado) a fim de bloquear as ligações não específicas. Após o bloqueio, as membranas foram incubadas com o anticorpo primário específico, durante a noite em câmara fria (4°C).

Os seguintes anticorpos primários foram utilizados: anti-gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) (1:5000, Santa Cruz), anti-eNOS fosforilada (1:1000, AbCam) e anti-AKT fosforilada no sítio Serina 1177 (1:1000, Cell Signaling). Após incubação com o anticorpo primário, as membranas foram lavadas com TBS-Tween durante 5 minutos por 5 vezes e incubadas com o anticorpo secundário conjugado a peroxidase (HRP) Goat anti-mouse IgG-HRP 1:5000 ou Goat anti-rabbit IgG-HRP 1:5000 (Sigma). Seguida da incubação com o anticorpo secundário, as membranas foram novamente lavadas em TBS-Tween durante 5 minutos por 5 vezes. As bandas

foram detectadas por reação de quimioluminescência (ECL plus – AmershamBiotechnology) e a intensidade das mesmas foi avaliada por análise densitométrica através do software ImageQuant™. Nos experimentos, os níveis de proteínas foram normalizados pelos níveis de expressão da GAPDH.

3.6 Protocolo experimental da avaliação da via do óxido nítrico em cardiomiócitos ventriculares de camundongos.

Com intuito de avaliar a produção de óxido nítrico em camundongos C57BL/6, B₂KO e B₁B₂KO, os cardiomiócitos provenientes de cada animal foram subdivididos em grupos experimentais controle, BPP-10c e BPP-5. Para a obtenção dos cardiomiócitos ventriculares foi utilizado o procedimento de isolamento de cardiomiócito (item 3.3), posteriormente incubados com a sonda DAF por 1 hora para a medida do óxido nítrico (item 3.4). Os cardiomiócitos foram tratados com BPP-10c e BPP-5a por um período de 20 minutos e as imagens foram obtidas por microscopia confocal (Figura 4).

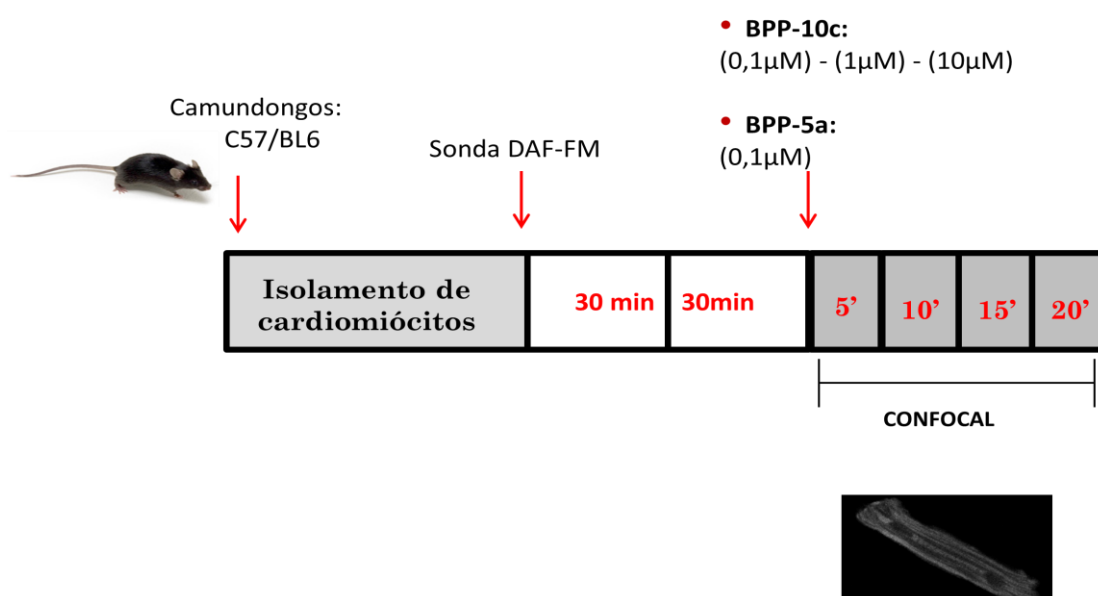


Figura 4: Protocolo experimental da medição de produção de óxido nítrico nos cardiomiócitos ventriculares de camundongos.

Com o intuito de avaliar a expressão das proteínas envolvidas na via do óxido nítrico, foram utilizados cardiomiócitos de camundongos C57/BL6, por meio do procedimento de isolamento de cardiomiócito (item 3.3). Posteriormente, os cardiomiócitos foram incubados com BPP-10c (1 μ M) por 10 minutos. Ao final deste processo as proteínas foram extraídas e realizado o experimento de Western Blot (item 3.5) (Figura 5).

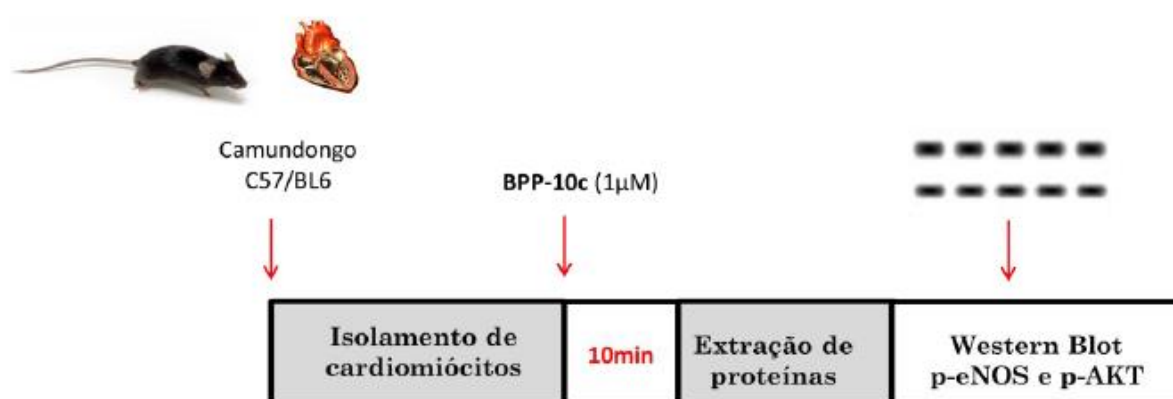


Figura 5: Protocolo experimental da expressão de proteínas envolvidas na via de óxido nítrico nos cardiomiócitos ventriculares de camundongos.

3.7 Isolamento e cultura dos cardiomiócitos ventriculares provenientes de ratos neonatos.

Os cardiomiócitos foram isolados de corações de ratos Wistar neonatos, de 3 a 5 dias de idade, conforme descrito por Guatimosim e cols. (2008). Após a decapitação, o coração de cada animal foi retirado e colocado em uma placa contendo meio HBSS (Solução balanceada de Hank's) gelado. Os corações foram picotados e os pedaços de tecido foram colocados em um tubo contendo solução de tripsina (100 μ g/mL) e HBSS, onde foram homogeneizados delicadamente e incubados sob agitação a uma temperatura de 2-8°C, durante à noite (16-20hs).

Ao fim deste período, foi adicionado ao tudo colagenase (5mg) e inibidor de tripsina (0,25%) e mantidos sob agitação durante 40 minutos em temperatura

ambiente. Após digestão do tecido pela ação da colagenase, a solução foi homogeneizada e deixada em repouso por 5 minutos. O procedimento foi repetido até os tecidos serem digeridos a pedaços bem pequenos. A solução contendo os cardiomiócitos foi filtrada em um filtro previamente umidificado com meio L-15 (Gibco-Carlsbad, CA) e mantida em repouso por 30 minutos. Após 5 minutos de centrifugação (1450rpm), as células foram ressuspensas em meio 199 (Sigma) suplementado com 10% de soro fetal (SFB-Gibco), 10000 unidades/mL de penicilina e 10 mg/mL de estreptomicina (Sigma).

Os cardiomiócitos foram plaqueados em lamínulas pré-tratadas com fibronectina e incubadas em estufa a 37°C e 5% CO₂. Um dia após o plaqueamento, foi adicionado ao meio de cultura 20µg/mL de citosina-d-arabinofuranosida (ARA-c) para prevenir o crescimento e divisão de células não miocitárias na cultura e mantidas a 37°C e 5% CO₂ por 48 horas. Os cardiomiócitos foram mantidos em placas de cultura de seis poços e divididos entre diferentes grupos experimentais. O tratamento de cada grupo experimental teve duração total de 36 horas, sendo realizado um tratamento a cada período de 12 horas. As células foram mantidas durante todo o experimento a 37°C e 5% de CO₂.

3.8 Imunofluorescência

Após o término do tratamento, as células foram lavadas com PBS 1x e fixadas em paraformaldeído 4% por 15 minutos à temperatura ambiente. A permeabilização da membrana plasmática foi feita com solução de PBS 1X/Triton 0,5% e o bloqueio foi feito com solução PBS 1X, BSA 10%, Triton 0,5%, por 1 hora em câmara úmida. Em seguida, as células foram incubadas durante 2 horas com os seguintes anticorpos: anticorpo policlonal anti-GRK-5 (1:50) e anticorpo monoclonal anti- α -actinina (1:150).

Após lavagens, as células foram incubadas com o anticorpo secundário anti-coelho conjugado ao Alexa-488 (1:500), anticorpo anti-camundongo conjugado ao Alexa-633 e para a marcação nuclear foi utilizado o DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) (1:25). Após as lavagens para a retirada dos excessos de anticorpos, as lâminas foram montadas com uma gota de Hydromount®.

As imagens foram obtidas por microscópio confocal Zeiss 510 Meta do centro de microscopia CEMEL da UFMG, utilizando a objetiva de 63x com imersão em óleo. Para garantir a especificação da marcação, alguns parâmetros do microscópio foram

padronizados, o *pinhole* e o detector de ganho foram mantidos sempre o mesmo para a captura das imagens do controle e dos tratamentos.

3.9 Medida da área celular dos cardiomiócitos provenientes de ratos neonatos

Após o tratamento e a marcação do citoesqueleto dos cardiomiócitos provenientes de ratos neonatos com anticorpo anti- α -actinina conjugado ao Alexa-633, a área celular (em μm^2) foi obtida através do microscópio Confocal Zeiss 510 Meta e mensurada através da demarcação da área dos cardiomiócitos analisadas pelo *software* LSM Image Browser.

3.10 Protocolo experimental da cultura de cardiomiócitos provenientes de ratos neonatos

Para a obtenção dos cardiomiócitos provenientes de ratos neonatos, foi utilizado o procedimento de isolamento de cardiomiócitos e em seguida a cultura de cardiomiócitos (item 3.7).

Os cardiomiócitos foram mantidos em placas de cultura de seis poços e distribuídos entre os diferentes grupos experimentais:

- I) Controle (CT);
- II) Isoproterenol (ISO -10 μM) ou fenilefrina (FE-50 μM);
- III) Isoproterenol ou fenilefrina co-administrado com os BPPs (1 μM);
- IV) Isoproterenol ou fenilefrina co-administrado com os BPPs, associados com o inibidor da NO sintase, o L-NAME (1 μM).

Ao término dos tratamentos foi realizado a imunofluorescência (item 3.8) e as imagens foram obtidas por microscopia confocal.

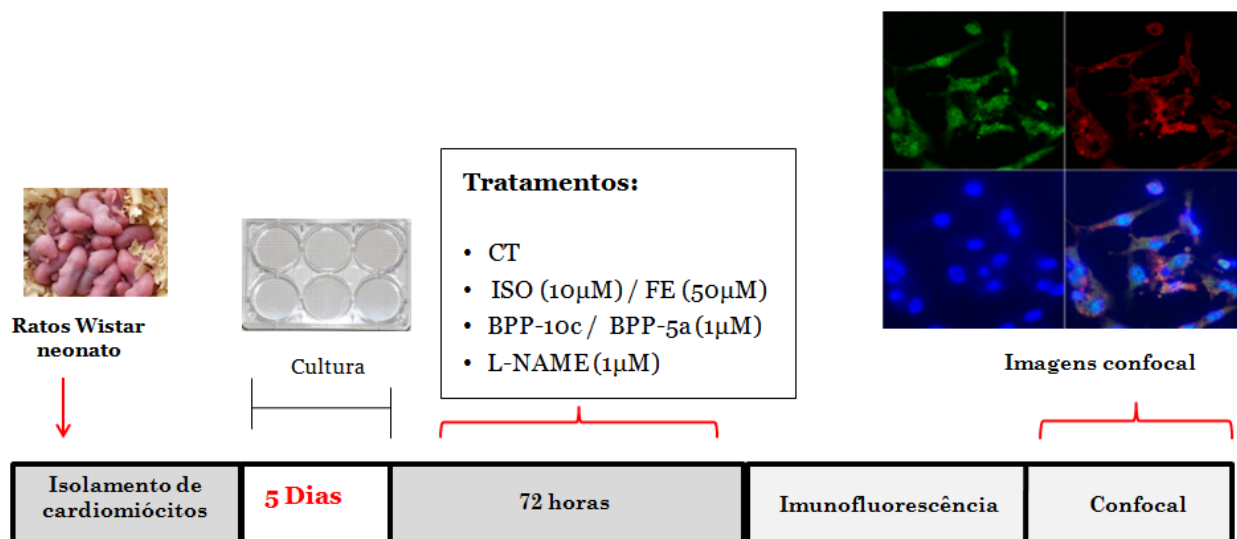


Figura 6: Protocolo experimental do tratamento da cultura de cardiomiócitos provenientes de ratos neonatos.

3.11 Implantação de mini-bomba osmótica

Os ratos Wistar foram anestesiados com tribromoetanol 2,5% (1ml/100g peso corporal, via intraperitoneal) para a implantação das mini-bombas osmóticas (modelo 2001,ALZET®), previamente preparadas e preenchidas com o BPP-10c (para administração média de 71nmol/Kg/dia, com fluxo de infusão de 1µl/Kg/h), colocadas na região dorsal dos ratos. Uma pequena incisão foi feita na região escapular para colocação da mini-bomba. Uma tesoura de ponta romba foi introduzida na incisão para abrir espaço e a mini-bomba foi acomodada. Em seguida, a incisão foi suturada com fio cirúrgico. Os peptídeos foram infundidos continuamente por via sub-cutanea (s.c.) durante 7 dias consecutivos.

3.12 Ecocardiografia

Ao final do tratamento de sete dias, todos os animais foram submetidos ao exame ecocardiográfico transtorácico sob anestesia com Isoflurano para análise da morfologia e função cardíaca *in vivo*. Foi utilizada uma forma não invasiva, de alta frequência, o sistema de ecocardiografia de alta resolução, que consiste de uma máquina de ultra-som Vevo 2100 equipado com 16-40MHz (Visual Sonic, Toronto, Canadá).

Após anestesia com Isoflurano 3,5%, os ratos foram colocados em posição supina em uma mesa e submetidos à tricotomia do tórax e abdome. A mesa foi equipada com elétrodos para a monitorização eletrocardiográfica e com um sistema de aquecimento para a manutenção de temperatura corporal em 37°C. A anestesia foi mantida através de cone focinho com Isoflurano entre 2 e 2,5 % de concentração.

Imagens de alta resolução foram obtidas em posição paraesternal direita e esquerda e foram obtidas imagens do eixo longo, eixo curto e apical. As imagens registradas e os cálculos foram realizados de acordo com as recomendações da Sociedade Americana de Ecocardiografia.

As seguintes medidas foram realizadas em Modo-M: as dimensões internas do ventrículo esquerdo (VE) em diástole e sístole (LVIDd e LVIDs, respectivamente) e espessura da parede posterior do VE em diástole e sístole (LVPWd e LVPWs respectivamente). A partir dessas medidas foram calculadas a fração de encurtamento (FS) e fração de ejeção (FE). Para avaliação desses parâmetros, foram feitas medidas de regiões específicas do miocárdio de acordo com Cikes e colaboradores (2010), utilizando o software Vevostrain.

3.13 Medida da hipertrofia cardíaca

Após a realização da ecocardiografia, a hipertrofia cardíaca foi avaliada nos animais dos diferentes grupos experimentais através da razão entre o peso do coração (em gramas) e o comprimento da tíbia (em centímetros).

3.14 Protocolo de hipertrofia cardíaca em ratos induzida pelo isoproterenol

Para os experimentos *in vivo* de hipertrofia cardíaca induzida por isoproterenol, foram utilizados ratos Wistar adultos e separados em 4 grupos experimentais:

- 1) Grupo controle (CT):** os animais foram submetidos à administração intraperitoneal (i.p.) de salina 0,9%, uma vez ao dia, durante sete dias consecutivos.

- 2) Grupo Isoproterenol (ISO): os animais receberam Isoproterenol (4,5 mg/kg – i.p.), uma vez ao dia, durante sete dias consecutivos.
- 3) Grupo Isoproterenol + BPP-10c (ISO+BPP-10c): os animais receberam Isoproterenol (4,5mg/Kg/dia, i.p.) e foram tratados com BPP-10c (71nmol/Kg/dia, s.c.) durante sete dias consecutivos por via sub-cutanea (s.c.). O BPP foi administrado através de infusão s.c. contínua utilizando mini-bomba osmótica (ALZET[®], modelo 2001).
- 4) Grupo BPP-10c (BPP-10c): os animais foram submetidos à administração intraperitoneal de salina 0,9% durante sete dias consecutivos e foram tratados com BPP-10c (71nmol/Kg/dia, s.c.) infundido por mini-bomba osmótica durante sete dias consecutivos.

Os animais foram anestesiados para a implantação das mini-bombas (item 3.11), posteriormente tratados por 7 dias. No oitavo dia todos os animais foram submetidos a exames de ecocardiografia (item 3.12) e sacrificados para a avaliação da medida da hipertrofia cardíaca (item 3.13) (Figura 7).

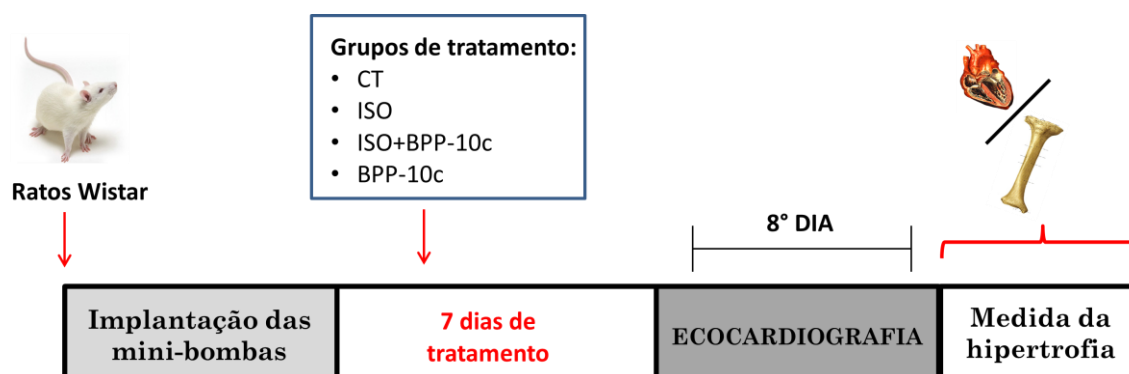


Figura 7: Protocolo experimental do tratamento de ratos Wistar adultos.

3.15 Análises estatísticas

Os dados foram apresentados como média \pm erro padrão. As análises foram realizadas através do teste *t* de Student ou análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Bonferroni. O nível de significância foi estabelecido como $*p < 0,05$.

4.RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Produção de óxido nítrico em cardiomiócitos ventriculares de camundongos tratados com BPP-10c e BPP-5a.

Sabendo que os efeitos anti-hipertensivos promovidos pelos BPPs envolvem a liberação de NO (Guerreiro e cols, 2009 e lanzer e cols., 2011), a primeira etapa deste trabalho teve como principal intuito investigar se o tratamento com o peptídeo BPP-10c seria capaz de estimular a produção de óxido nítrico (NO) em cardiomiócitos ventriculares de camundongos.

Para isso, foram utilizados cardiomiócitos ventriculares de camundongos C57BL/6 marcados com uma sonda fluorescente sensível ao NO (DAF-FM). Os cardiomiócitos foram incubados com diferentes concentrações deste peptídeo, a fim de se obter uma curva concentração-resposta e identificar a concentração ideal capaz de promover a produção de NO.

Observamos na figura 8 que os cardiomiócitos ventriculares de camundongos tratados por 20 minutos com o BPP-10c nas concentrações de 0,1 μ M e 1 μ M promoveu um aumento significativo da fluorescência do DAF-FM, sugerindo um aumento da produção do óxido nítrico quando comparados ao grupo controle. No entanto, conforme apresentado, nenhuma alteração significativa foi observada nos cardiomiócitos ventriculares de camundongos incubados por 20 minutos com BPP-10c na concentração de 10 μ M.

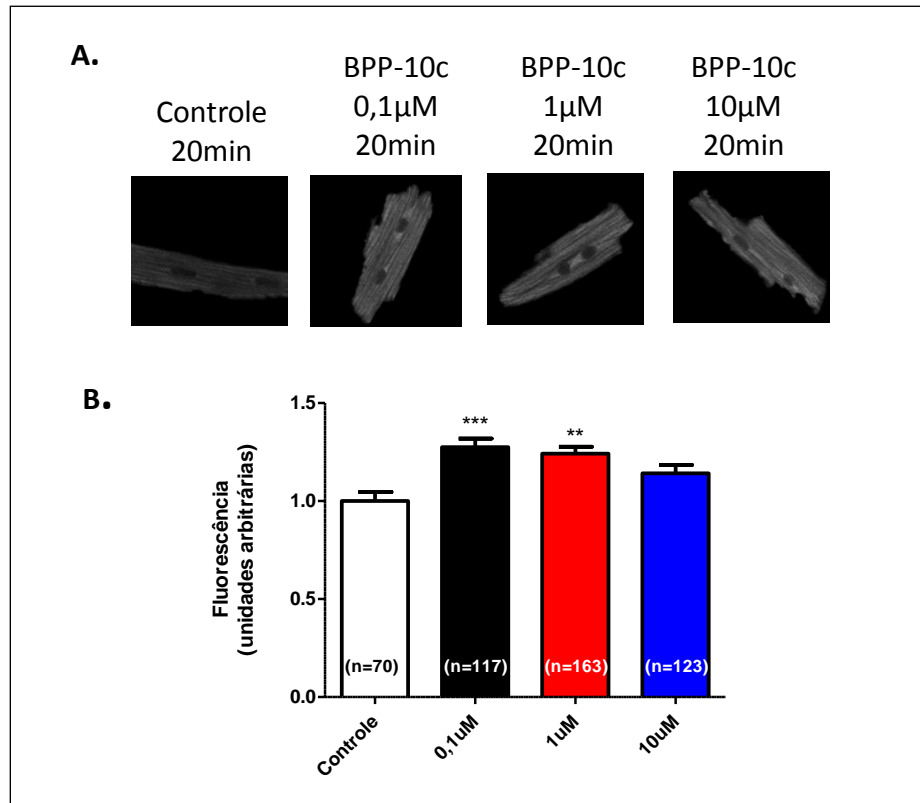


Figura 8: Curva concentração-resposta na produção de óxido nítrico do BPP-10c em cardiomiócitos ventriculares de camundongos incubados por 20 minutos nas concentrações de 0,1µM, 1µM e 10µM. **A.** Imagens representativas da fluorescência do DAF-FM em cardiomiócitos obtidas através de microscopia confocal. **B.** Média da fluorescência (representada em unidades arbitrárias) obtida em cardiomiócitos ventriculares de camundongos incubados com BPP-10c. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; n=número de células analisadas.

Adicionalmente, foi investigado o efeito tempo-dependente do BPP-10c, para avaliarmos qual seria o tempo ideal para promover as alterações na produção de NO. Para isto, foram utilizados cardiomiócitos ventriculares de camundongos marcados com uma sonda fluorescente sensível ao NO (DAF-FM). A Figura 9 apresenta análise do curso temporal da produção de NO em cardiomiócitos incubados com BPP-10c na concentração de 0,1µM nos tempos de 5, 10, 15 e 20 minutos.

Foi observado que o BPP-10c na concentração de 0,1µM promoveu aumento significativo da fluorescência do DAF-FM após o tempo de 15 e 20 minutos de incubação quando comparado ao grupo controle (Figura 9B).

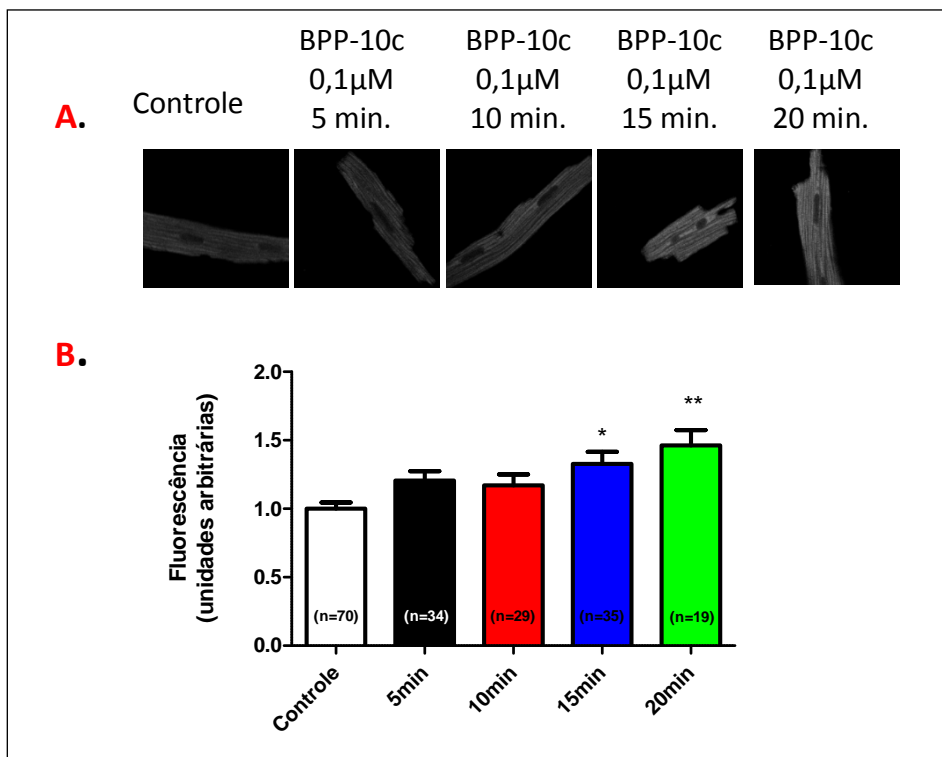


Figura 9: Efeito tempo-dependente na produção de óxido nítrico do BPP-10c (0,1μM) nos tempos de incubação de 5,10, 15 e 20 minutos em cardiomiócitos ventriculares de camundongos. **A.** Imagem representativa da fluorescência do DAF-FM em cardiomiócitos ventriculares incubados por diferentes tempos com BPP-10c, obtidas através de microscopia confocal. **B.** Média da fluorescência (representada em unidades arbitrárias) obtida em cardiomiócitos ventriculares de camundongos. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; n=número de células analisadas.

Da mesma forma, nosso próximo passo foi avaliar o tempo de incubação ideal do BPP-5a na concentração de 0,1μM na produção de óxido nítrico (NO), durante os tempos de 5, 10, 15 e 20 minutos em cardiomiócitos ventriculares de camundongos (Figura 10).

Os resultados da análise do curso temporal da produção de NO mostraram um aumento significativo da fluorescência do DAF-FM após 20 minutos de incubação com o BPP-5a, conforme observado na Figura 10.

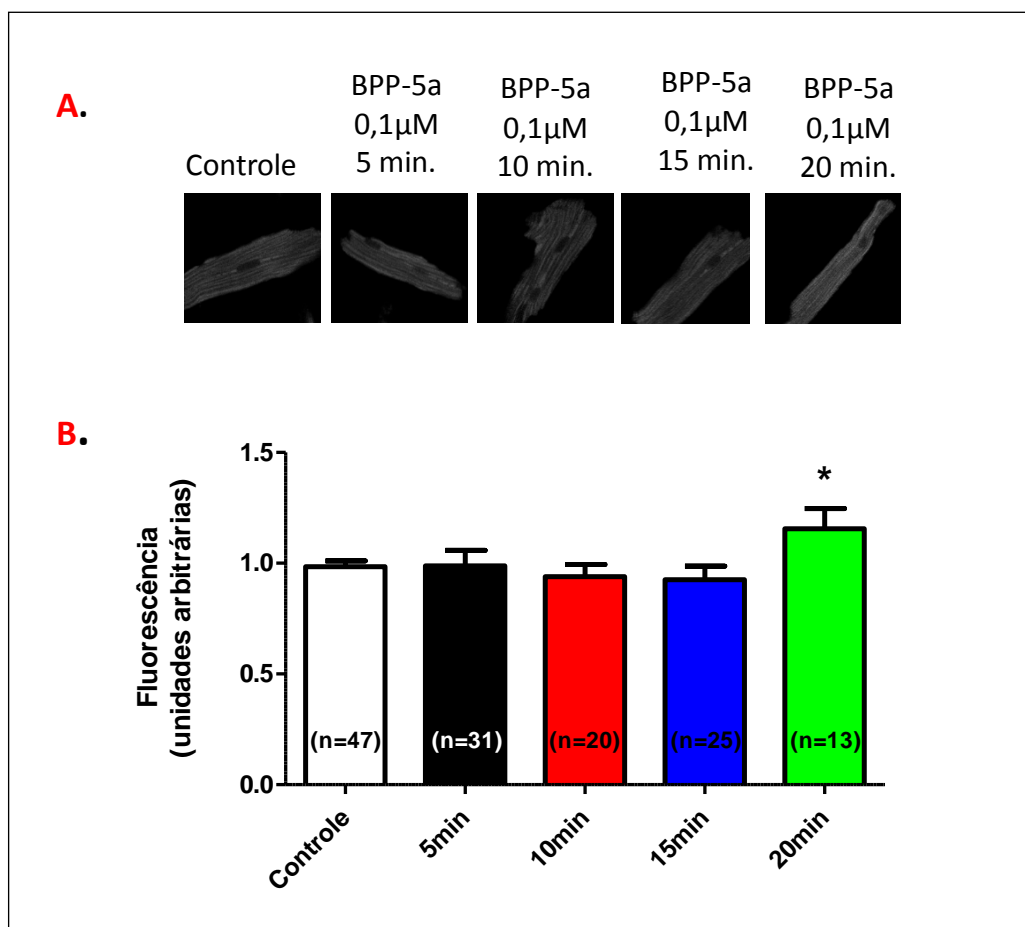


Figura 10: Efeito tempo-dependente na produção de óxido nítrico do BPP-5a (0,1 μ M) nos tempos de incubação de 5,10, 15 e 20 minutos em cardiomiócitos ventriculares de camundongos. **A.** Imagens representativas de cardiomiócitos obtidas através de microscopia confocal mostrando a fluorescência do DAF-FM nos cardiomiócitos ventriculares de camundongos submetidos a diferentes tempos de incubação com BPP-5a. **B.** Gráfico de barras mostra a média da fluorescência (representada em unidades arbitrárias) obtida em cardiomiócitos ventriculares de camundongos. * $p < 0,05$; n=número de células analisadas.

4.2 Produção de óxido nítrico em cardiomiócitos ventriculares de camundongos nocaute para o receptor de bradicinina.

Nosso próximo passo foi investigar se a produção de NO promovida pelo BPP-10c teria como alvo o receptor de bradicinina os receptores do tipo 1 e 2, e conseqüentemente promover alterações na produção de NO. Para isto primeiramente utilizamos os cardiomiócitos ventriculares de camundongos nocaute para o receptor de bradicinina do tipo 2 (B_2 KO) marcados com o DAF-FM.

A figura 11 mostra um aumento significativo da fluorescência do DAF-FM, após 20 minutos de incubação com o BPP-10c nas concentrações de $0,1\mu\text{M}$ e $1\mu\text{M}$ quando comparado ao grupo controle (Figura 11).

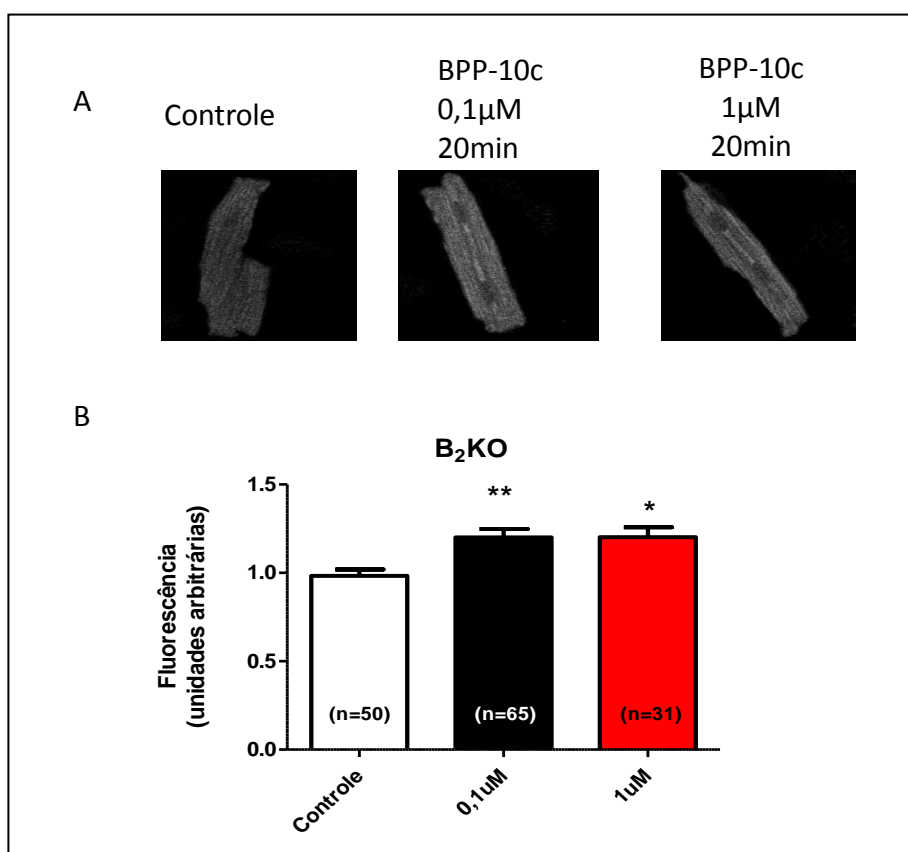


Figura 11: Efeito na produção de óxido nítrico do BPP-10c nas concentrações de $0,1\mu\text{M}$ e $1\mu\text{M}$ incubados por 20 minutos em cardiomiócitos ventriculares de camundongos nocaute para o receptor de bradicinina do tipo 2 (B_2 KO). **A.** Imagens representativas da fluorescência do DAF-FM em cardiomiócitos ventriculares obtidas através de microscopia confocal. **B.** Média da fluorescência (representada em unidades arbitrárias) obtida em cardiomiócitos ventriculares de camundongos incubados com BPP-10c. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; n=número de células analisadas.

Com o objetivo de confirmarmos os resultados anteriores, que mostram a não participação do receptor de bradicinina para o aumento da produção de NO em resposta ao tratamento com BPP-10c, utilizamos cardiomiócitos de camundongos duplo nocaute para o receptor de bradicinina do tipo 1 e tipo 2 (B_1B_2KO) e avaliamos a produção de NO.

Corroborando com os resultados anteriores (figura 11), foi observado na figura 12 um aumento significativo na produção de NO em cardiomiócitos ventriculares de camundongos B_1B_2KO depois de incubados por 20 minutos do BPP-10c ($1\mu M$) quando comparado ao grupo controle. Interessantemente, notamos que o aumento na produção de NO promovida pelo BPP-10c obteve resposta semelhantes nos animais B_2KO e animais B_1B_2KO , quando comparados aos animais selvagens.

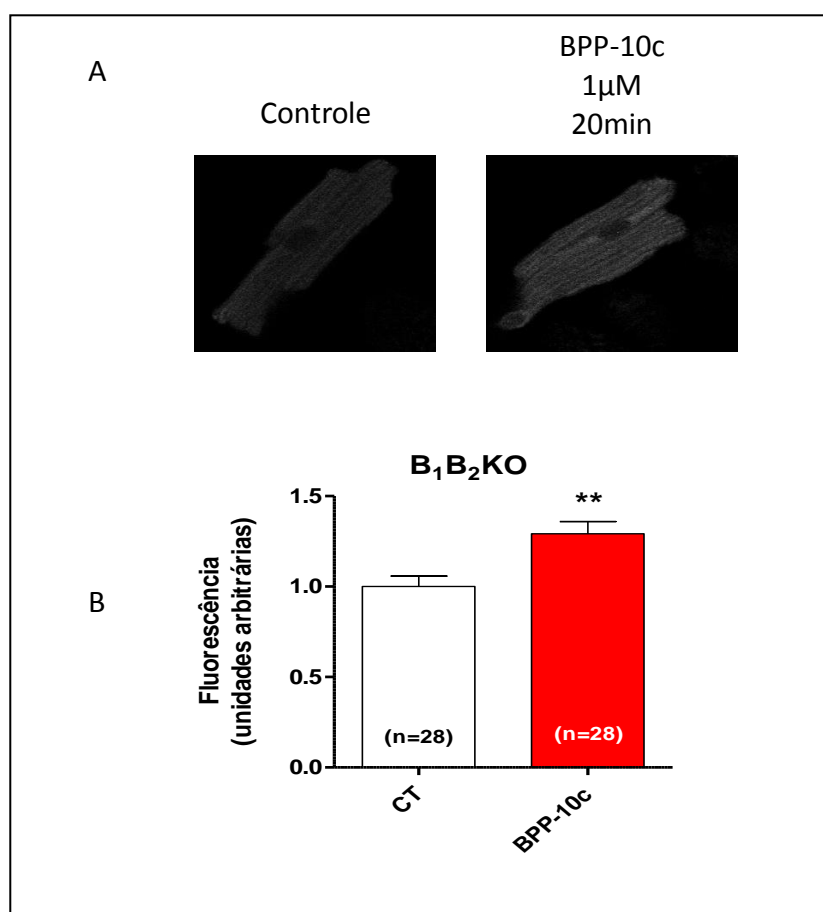


Figura 12: Efeito na produção do óxido nítrico do BPP-10c na concentração de $1\mu M$ incubados por 20 minutos em cardiomiócitos ventriculares de camundongos nocaute para o receptor de bradicinina do tipo 1 e 2 (B_1B_2KO). **A.** Imagens representativas da fluorescência do DAF-FM em cardiomiócitos ventriculares obtidas através de microscopia confocal. **B.** Média da fluorescência (representada em unidades arbitrárias) obtida em cardiomiócitos ventriculares de camundongos incubados com BPP-10c. $**p < 0,01$; n=número de células analisadas.

4.3 Expressão da eNOS fosforilada em cardiomiócitos ventriculares de camundongos tratados com BPP-10c.

Baseado nas observações de que o BPP-10c promove um aumento na produção de NO, nosso próximo passo foi investigar se este aumento poderia estar diretamente relacionado à fosforilação da enzima eNOS em seu sítio de ativação serina 1177 nos cardiomiócitos ventriculares de camundongos.

Como apresentado na Figura 13, a incubação por 10 minutos do BPP-10c na concentração de 1 μ M, promoveu um aumento significativo da fosforilação da enzima eNOS no sítio Ser 1177 em cardiomiócitos ventriculares de camundongos, quando comparado ao grupo controle.

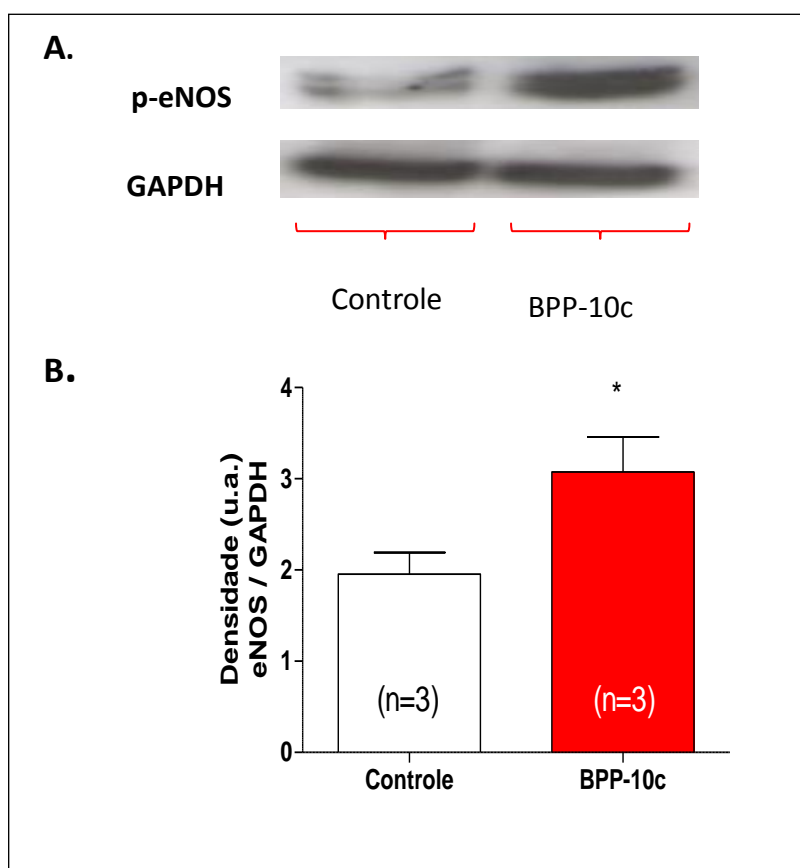


Figura 13: Expressão da proteína eNOS fosforilada no sítio de ativação Ser 1177 em cardiomiócitos ventriculares de camundongos tratados com BPP-10c (1 μ M) por 10 minutos de incubação. **A.** Imagem representativa do Western-Blot em cardiomiócitos ventriculares. A expressão do GAPDH foi utilizada para a normalização dos resultados. **B.** Média da densidade das bandas das proteínas (representadas em unidades arbitrárias) obtida em cardiomiócitos ventriculares de camundongos incubados com BPP-10c. * $p < 0,05$. n= número de amostras analisadas.

4.4 Expressão da proteína Akt fosforilada em cardiomiócitos ventriculares de camundongos tratados com BPP-10c.

Uma vez verificada o aumento da produção de NO e da expressão da fosforilação da enzima eNOS no sítio Ser 1177 em cardiomiócitos tratados com BPPs, decidimos investigar possíveis vias de sinalização envolvidas na produção de NO.

Sabe-se que a Akt é uma importante proteína envolvida na ativação da eNOS, uma vez que é capaz de fosforilar a eNOS em seu sítio de ativação Ser 1177, levando a um aumento da atividade desta enzima e conseqüentemente a produção de NO (Wu e cols., 2002).

Deste modo, foram analisados os níveis de fosforilação da Akt em cardiomiócitos de camundongos C57BL/6 incubados por 10 minutos na concentração de 1 μ M do BPP-10c. Conforme observado na Figura 14, apesar da tendência em aumento na fosforilação da proteína Akt com um valor de $p < 0,08$, este aumento não foi significativo, quando comparado ao grupo controle.

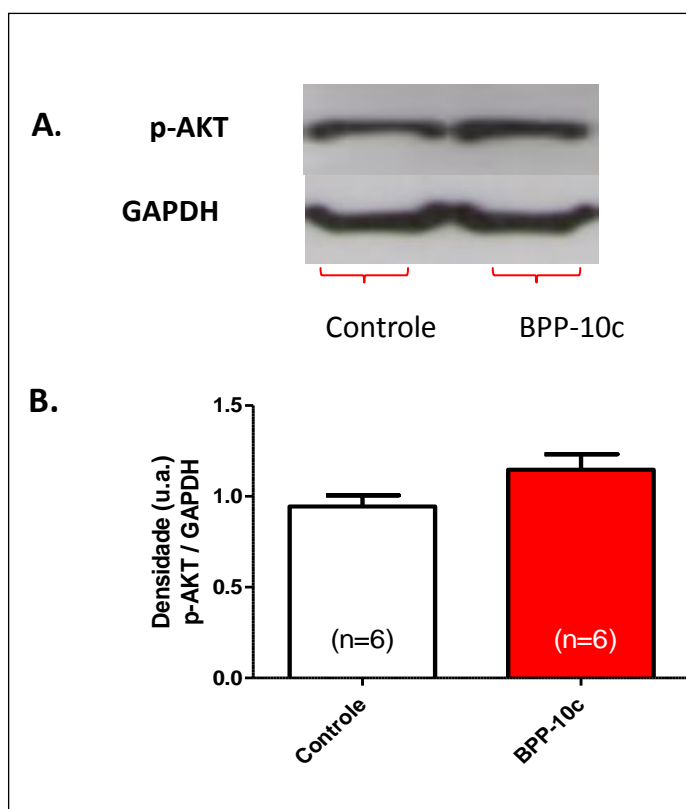


Figura 14: Expressão da proteína AKT fosforilada em cardiomiócitos ventriculares de camundongos tratados com BPP-10c (1 μ M) por 10 minutos de incubação. **A.** Imagem representativa do Western-Blot em cardiomiócitos ventriculares. A

expressão do GAPDH foi utilizada para a normalização dos resultados. **B.** Média da densidade das bandas das proteínas (representadas em unidades arbitrárias) obtida em cardiomiócitos ventriculares de camundongos incubados com BPP-10c. * $p < 0,05$. n= número de amostras analisadas.

4.5 Efeito dos BPPs na translocação nuclear da GRK5 e na medida da área celular em cardiomiócitos provenientes de ratos neonatos tratados com agonistas adrenérgicos.

Para verificarmos se a ativação e a translocação nuclear da GRK5 mediada por agonistas adrenérgicos poderia ser modulada pelos BPPs, ensaios de imunofluorescência foram realizados utilizando anticorpos específicos para avaliar a localização celular da GRK5 em cardiomiócitos provenientes de ratos neonatos.

Como esperado, foi observado aumento da translocação nuclear da GRK5 em cardiomiócitos provenientes de ratos neonatos tratados com o agonista β -adrenérgico isoproterenol (ISO) na concentração de 10 μ M por 72 horas. A co-administração com o BPP-10c na concentração de 1 μ M por 72 horas preveniu a translocação nuclear da GRK5 induzida pelo isoproterenol. Quando administrado somente o BPP-10c e o ISO+BPP-10c, nenhuma alteração significativa foi observada ao ser comparada com o grupo controle (Figura 15).

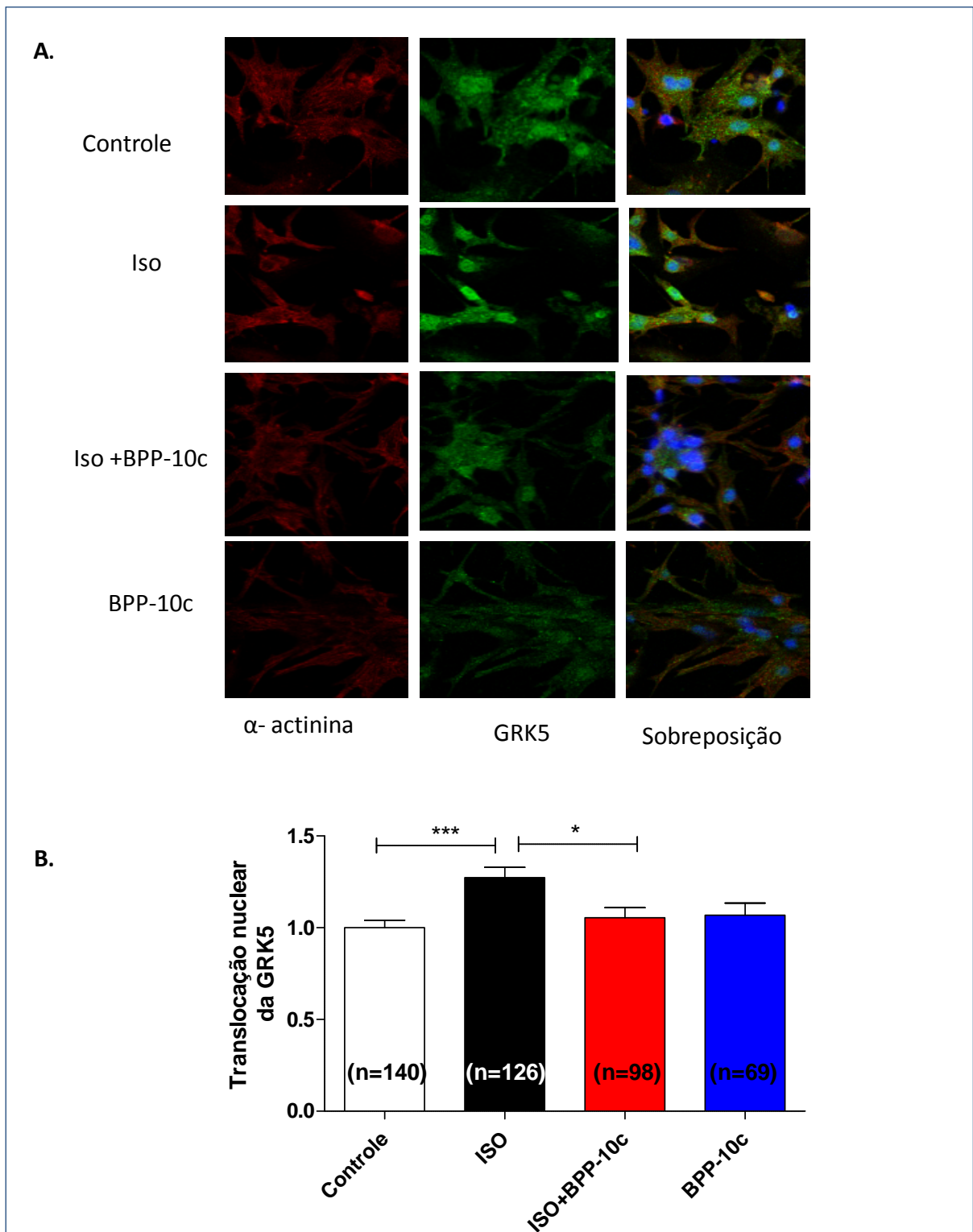


Figura 15: Análise da translocação nuclear da GRK5 em cardiomiócitos provenientes de ratos neonatos tratados com Isoproterenol ($10\mu\text{M}$) e BPP-10c ($1\mu\text{M}$) por um período de 72 horas. **A.** Imagens representativas obtidas a partir da microscopia confocal. A marcação em vermelho representa a α -actinina, em verde a GRK5 e em azul o DAPI que marca o núcleo da célula. A última coluna representa a sobreposição das imagens. **B.** Translocação da GRK5 do núcleo para o citosol em cardiomiócitos de ratos neonatos * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$; n= número de células.

Em seguida, avaliamos se, assim como observado na figura 15, em que a administração do BPP-10c foi capaz de prevenir o aumento da translocação nuclear da GRK5 induzida pelo isoproterenol, se o BPP-5a também seria capaz de promover a mesma resposta, e se esta estaria envolvida com a produção de NO.

De fato, como observado na Figura 16, a translocação nuclear da GRK5 induzida pelo isoproterenol (10 μ M) por 72 horas foi prevenida nos cardiomiócitos provenientes de ratos neonatos tratados concomitantemente por 72 horas do BPP-5a (1 μ M) e este efeito foi abolido na presença do inibidor da NO sintase, o L-NAME (1 μ M). Quando comparado o ISO+BPP-5a e o BPP-5a com o grupo controle, não apresentaram diferença significativa.

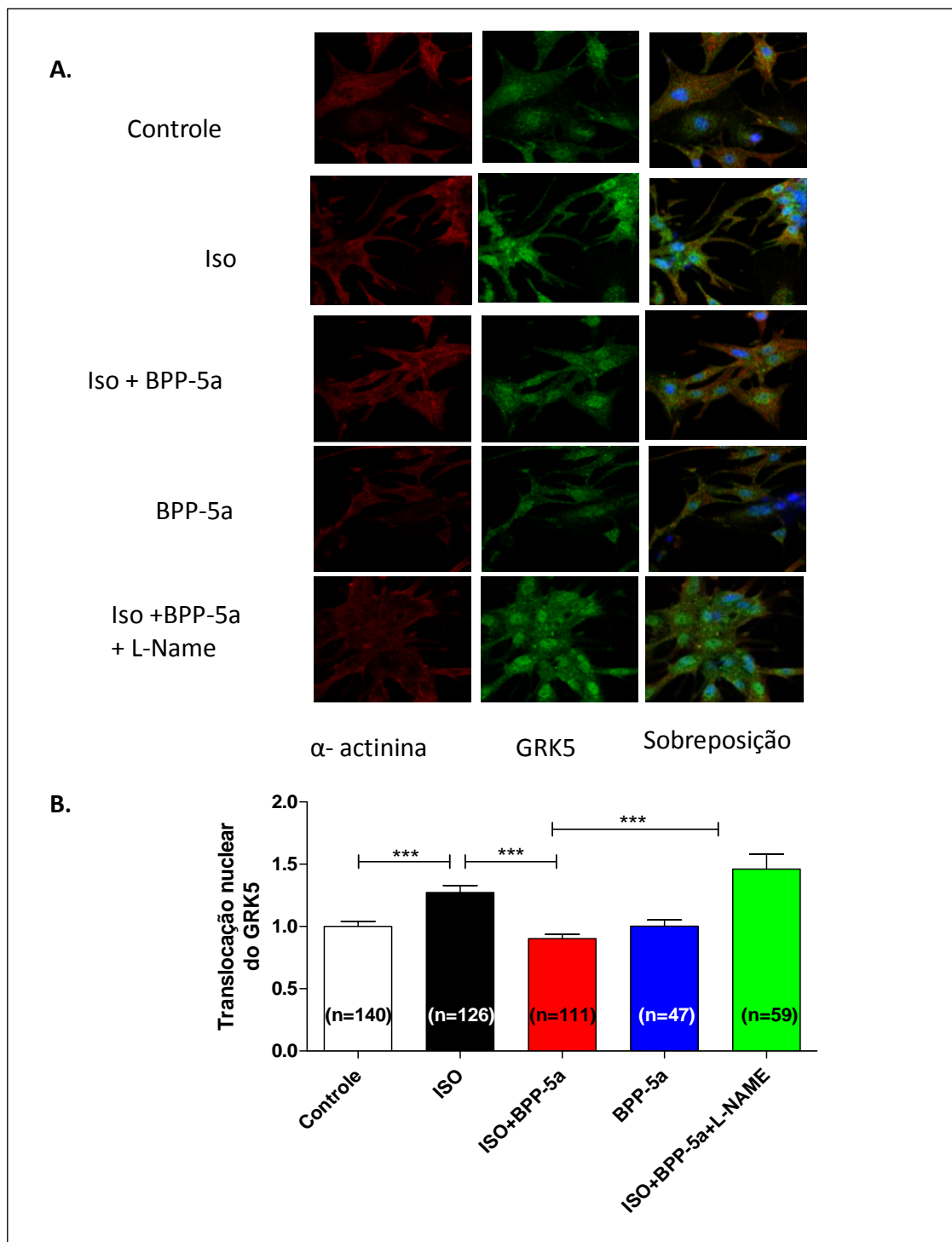


Figura 16: Análise da translocação nuclear da GRK5 em cardiomiócitos provenientes de ratos neonatos tratados com Isoproterenol (10 μ M), BPP-5a (1 μ M), e L-NAME (1 μ M), por um período de 72 horas. **A.** Imagens representativas obtidas a partir da microscopia confocal. A marcação em vermelho representa a α -actinina, em verde a GRK5 e em azul o DAPI. A última coluna representa a sobreposição das imagens. **B.** Translocação da GRK5 do núcleo para o citosol em cardiomiócitos de ratos neonatos. *** $p < 0,001$; n= número de células.

Sabe-se que agonistas α -adrenérgicos também podem induzir o aumento da massa cardíaca e ativação de vias relacionadas ao processo hipertrófico (Knowlton e cols., 1993; Bhambi e cols., 1991). Portanto, como um segundo modelo de estudo, avaliamos o efeito da fenilefrina (FE) na imunolocalização da GRK5 em cardiomiócitos provenientes de ratos neonatos.

Corroborando os resultados anteriores, a fenilefrina (50 μ M) por 72 horas promoveu um aumento da translocação da GRK5 para o núcleo dos cardiomiócitos. Como observado na figura 16, o tratamento concomitante com BPP-10c (1 μ M) por 72 horas preveniu o aumento da translocação nuclear da GRK5 induzido por fenilefrina. Quando comparado o grupo ISO+BPP-10c com o grupo controle, não apresentou diferença significativa.

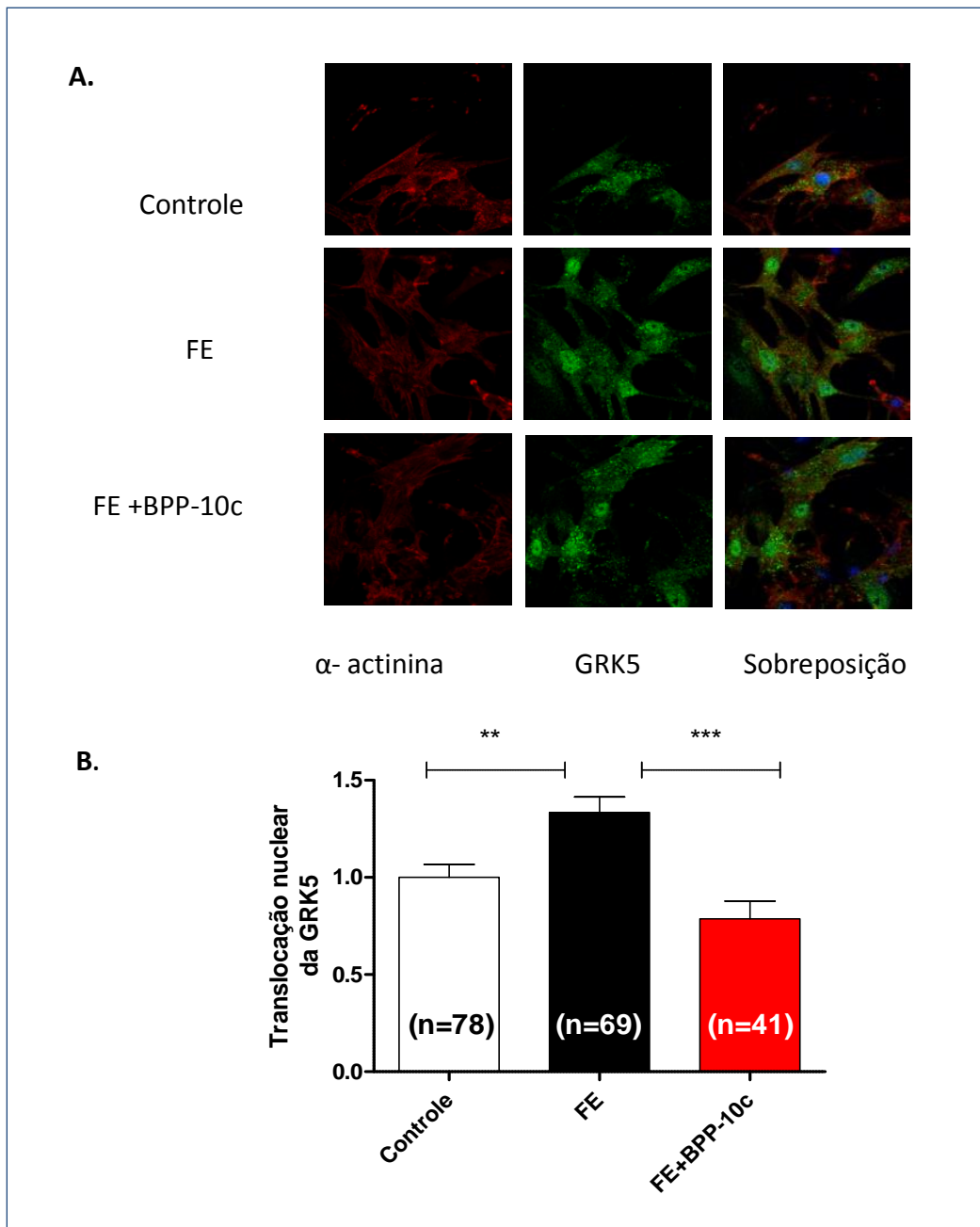


Figura 17: Análise da translocação nuclear da GRK5 em cardiomiócitos provenientes de ratos neonatos tratados com Fenilefrina (50 μ M) e BPP-10c (1 μ M) por um período de 72. **A.** Imagens representativas obtidas a partir da microscopia confocal. A marcação em vermelho representa a α -actinina, em verde a GRK5 e em azul o DAPI que marca o núcleo da célula. A última coluna representa a sobreposição das imagens. **B.** Translocação da GRK5 do núcleo para o citosol em cardiomiócitos de ratos neonatos. n=número de células; ** p <0,01, *** p <0,001.

Sabendo-se que a hipertrofia cardíaca é caracterizada por um aumento individual no tamanho dos cardiomiócitos (Lorell, 2000), nosso próximo passo foi verificar as alterações na área celular dos cardiomiócitos submetidos a diferentes tratamentos. Os cardiomiócitos tiveram a actinina do citoesqueleto marcada com um anticorpo específico para esta proteína e as imagens de imunofluorescência foram obtidas por microscopia confocal para medida da área celular (em μm^2).

Como observado na Figura 18, o tratamento com fenilefrina ($50\mu\text{M}$) por 72 horas promoveu um aumento significativo na área celular dos cardiomiócitos quando comparado ao grupo controle. O tratamento da fenilefrina ($50\mu\text{M}$) concomitante com BPP-10c ($1\mu\text{M}$) por 72 horas foi capaz de prevenir o aumento da área celular induzida pela fenilefrina. Não observamos diferenças significativas ao compararmos o grupo controle com o grupo o FE+BPP-10c.

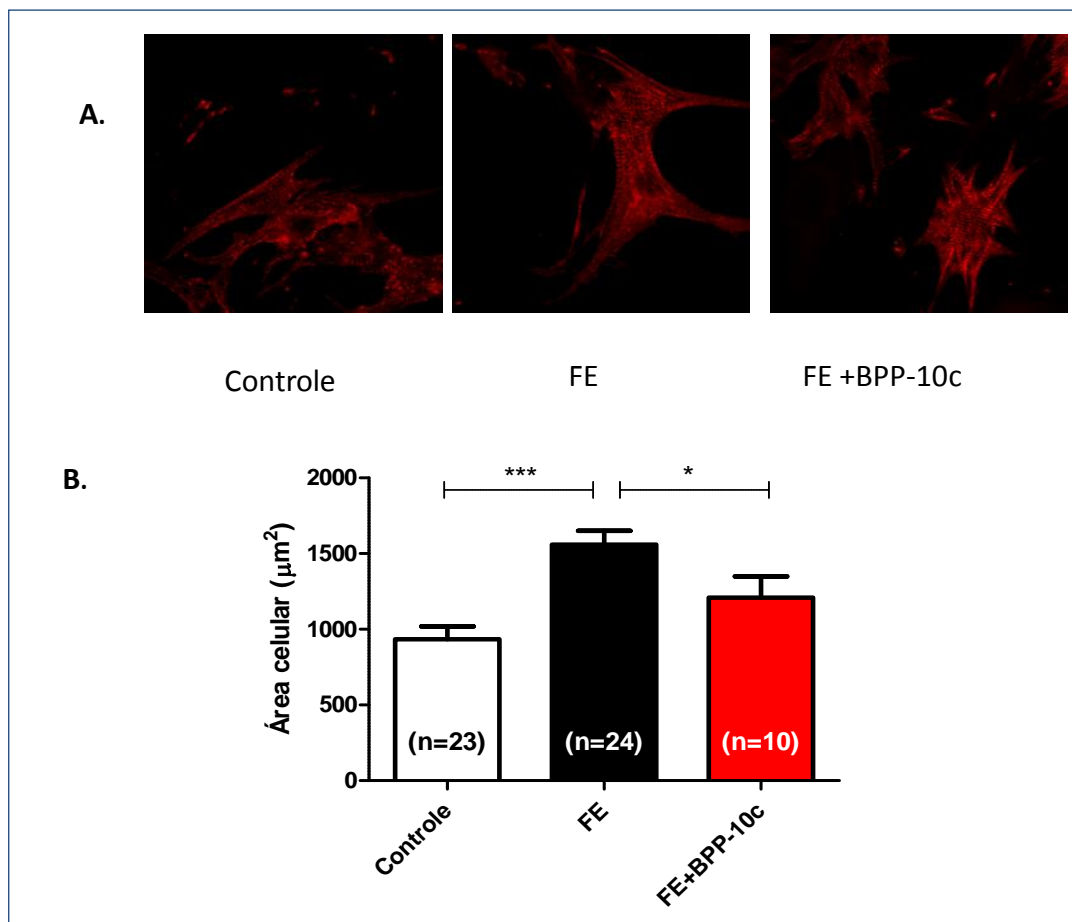


Figura 18: Medida da área celular dos cardiomiócitos provenientes de ratos neonatos tratados com fenilefrina ($50\mu\text{M}$) e BPP-10c ($1\mu\text{M}$) por um período de 72 horas. **A.** Imagens representativas obtidas a partir da microscopia confocal. A marcação em vermelho representa imunofluorescência com anticorpo anti- α -actinina

em cardiomiócitos. **B.** Quantificação das áreas celulares; n=número de células; * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

4.6 Efeito da administração crônica do BPP-10c na hipertrofia cardíaca e função cardiovascular induzida pelo isoproterenol em ratos Wistar adultos *in vivo*.

A estimulação do receptor β -adrenérgico é essencial para alcançar efeitos inotrópicos positivos. A estimulação promovida pela administração contínua de isoproterenol é um modelo experimental clássico de hipertrofia patológica, cujo aumento da massa ventricular é seguido por um aumento de necrose e fibrose cardíaca, contribuindo para a fisiopatologia da insuficiência cardíaca (Benjamin e cols., 1989). Desta forma, avaliamos o efeito do BPP-10c (71nmol/kg) administrado por infusão de mini-bombas osmóticas em sete dias consecutivos em um modelo de hipertrofia e disfunção cardíaca induzida pela administração intraperitoneal de isoproterenol (4,5mg/Kg) durante 7 dias consecutivos.

Para avaliação da hipertrofia cardíaca foi realizado o cálculo da razão entre o peso do coração e o comprimento da tíbia dos ratos Wistar adultos nos diferentes grupos experimentais.

Os animais que receberam administração intraperitoneal por sete dias consecutivos de isoproterenol (4,5mg/Kg) apresentaram um aumento significativo do tamanho do coração quando comparado aos animais do grupo controle. A hipertrofia cardíaca induzida pelo isoproterenol foi prevenida pelo tratamento concomitante com BPP-10c (71nmol/kg) infundidos por mini-bombas osmóticas por sete dias consecutivos. Nenhuma alteração significativa foi observada no coração dos animais tratados apenas com BPP-10c e ISO+BPP-10c quando comparado ao grupo controle (Figura 19).

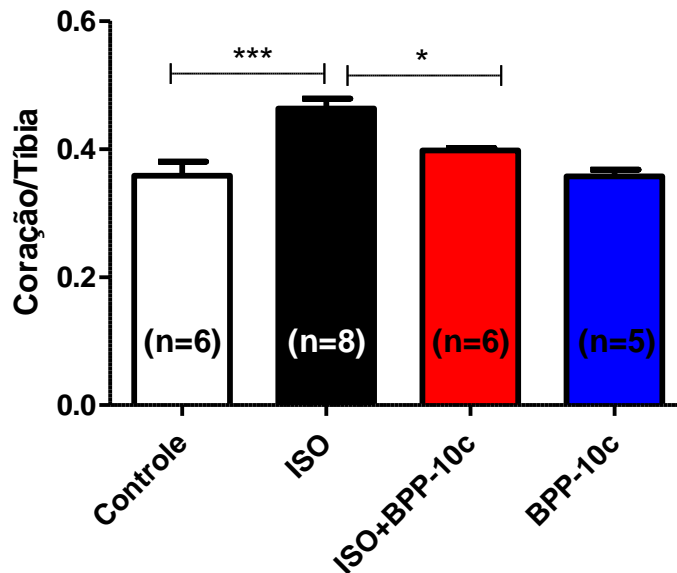


Figura 19: Medida da hipertrofia cardíaca através da razão entre o peso do coração (em gramas) e o comprimento da tíbia (em centímetros) nos ratos Wistar adultos tratados com administração (i.p.) de isoproterenol (4,5mg/Kg) e mini-bombas osmóticas de BPP-10c (71nmol/Kg) por sete dias consecutivos. n= número de animais, * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

Nas análises dos registros de ecocardiografia para a avaliação da função cardiovascular foi observado um aumento significativo da parede posterior ventricular esquerda (V.E.) na sístole e na diástole dos animais que receberam o tratamento com isoproterenol (4,5mg/Kg) por sete dias consecutivos. Além disso, os animais que foram tratados concomitantemente com isoproterenol e BPP-10c (71nmol/Kg) infundidos por mini-bomba osmótica durante sete dias consecutivos apresentaram uma redução significativa da parede posterior ventricular esquerda (V.E.), tanto na diástole quanto na sístole. O grupo tratado com ISO+BPP-10c apresentou um valor igual a $p < 0,01$ quando comparado ao grupo controle na sístole e na diástole. No entanto, nenhuma alteração foi observada no grupo tratado apenas com o BPP-10c quando comparado ao grupo controle (Figuras 20 e 21).

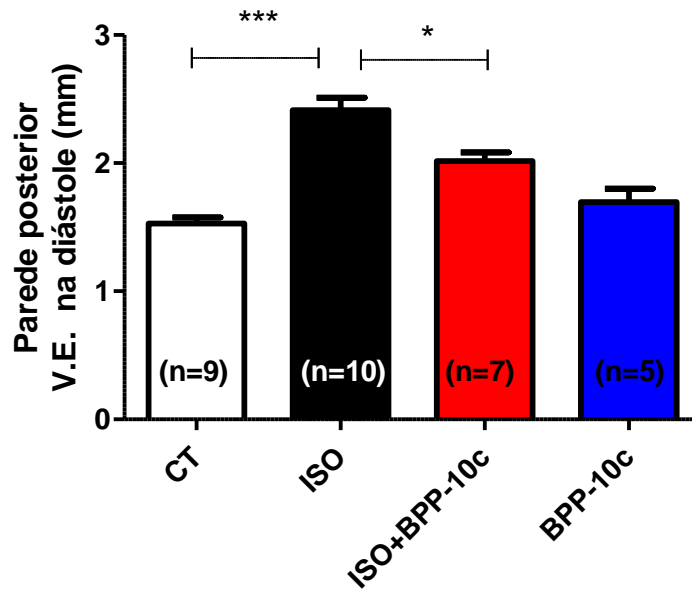


Figura 20: Análise da espessura da parede posterior ventricular esquerda na diástole (mm) em ratos Wistar adultos tratados com administração (i.p.) de isoproterenol (4,5mg/Kg) e mini-bombas osmóticas de BPP-10c (71nmol/Kg) por sete dias consecutivos. n= número de animais, * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

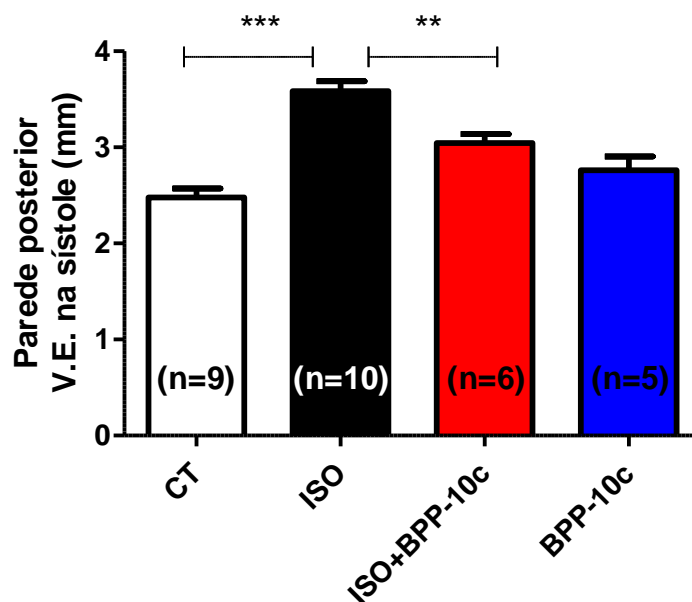


Figura 21: Análise da espessura da parede posterior ventricular esquerda na sístole (mm) em ratos Wistar adultos tratados com administração (i.p.) de isoproterenol (4,5mg/Kg) e mini-bombas osmóticas de BPP-10c (71nmol/Kg) por sete dias consecutivos. n= número de animais, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Avaliamos também nos registros de ecocardiografia a dimensão interna do ventrículo esquerdo (V.E.) durante a diástole e sístole (Figura 22 e 23). Observamos uma redução da dimensão interna do ventrículo esquerdo (V.E.) nos animais que receberam isoproterenol (4,5mg/Kg) por administração intraperitoneal durante sete dias consecutivos. O tratamento de isoproterenol concomitante com BPP-10c (71nmol/Kg) por infusão de mini-bombas osmóticas por sete dias consecutivos não apresentaram nenhuma alteração sobre a dimensão interna do ventrículo esquerdo comparado ao grupo que recebeu apenas o isoproterenol tanto na diástole quanto na sístole. Os animais tratados apenas BPP-10c não apresentaram alterações significativas em relação ao grupo controle (Figuras 21 e 22).

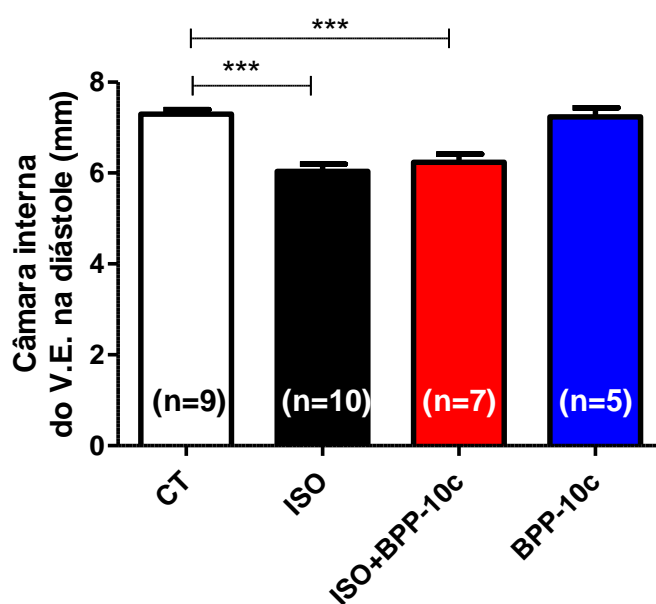


Figura 22: Análise da dimensão interna do ventrículo esquerdo na diástole (mm) em ratos Wistar adultos tratados com administração i.p. de isoproterenol (4,5mg/Kg) e mini-bombas osmóticas de BPP-10c (71nmol/Kg) por sete dias consecutivos. n= número de animais, *** $p < 0,001$.

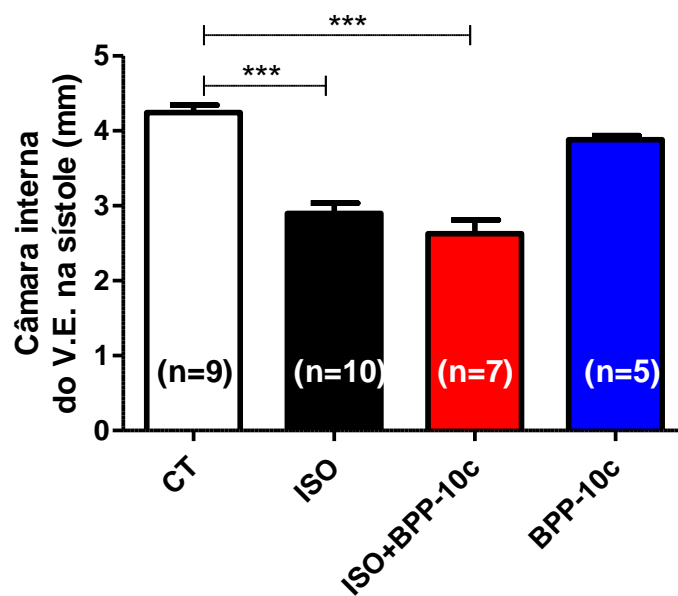


Figura 23: Análise da dimensão interna do ventrículo esquerdo na sístole (mm) em ratos Wistar adultos tratados com administração i.p. de isoproterenol (4,5mg/Kg) e mini-bombas osmóticas de BPP-10c (71nmol/Kg) por sete dias consecutivos. n= número de animais, *** $p<0,001$.

Como observado nas análises dos registros ecocardiográficos das figuras 23 e 24, o tratamento com isoproterenol promoveu um aumento significativo da fração de ejeção (%) e fração de encurtamento (%) do ventrículo esquerdo quando comparado ao grupo controle, características condizentes com a cardiomiopatia hipertrófica. Como observado, o tratamento do isoproterenol concomitante com BPP-10c não promoveu alterações significativas no desempenho ventricular quando comparado aos animais tratados apenas com isoproterenol. Nenhuma alteração significativa foi observada nos animais que receberam apenas infusão de BPP-10c em relação ao grupo controle.

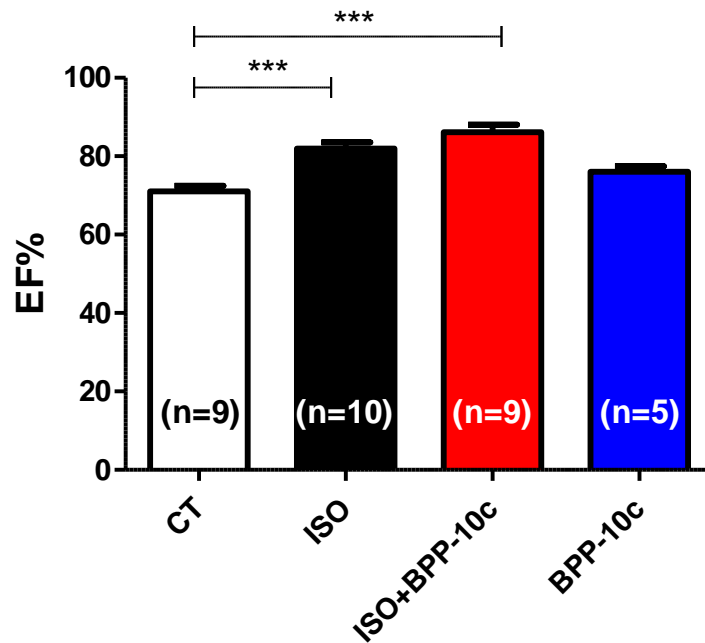


Figura 24: Análise da fração de ejeção (EF%) em ratos Wistar adultos tratados com administração i.p. de isoproterenol (4,5mg/Kg) e mini-bombas osmóticas de BPP-10c (71nmol/Kg) por sete dias consecutivos. n= número de animais, *** $p < 0,001$.

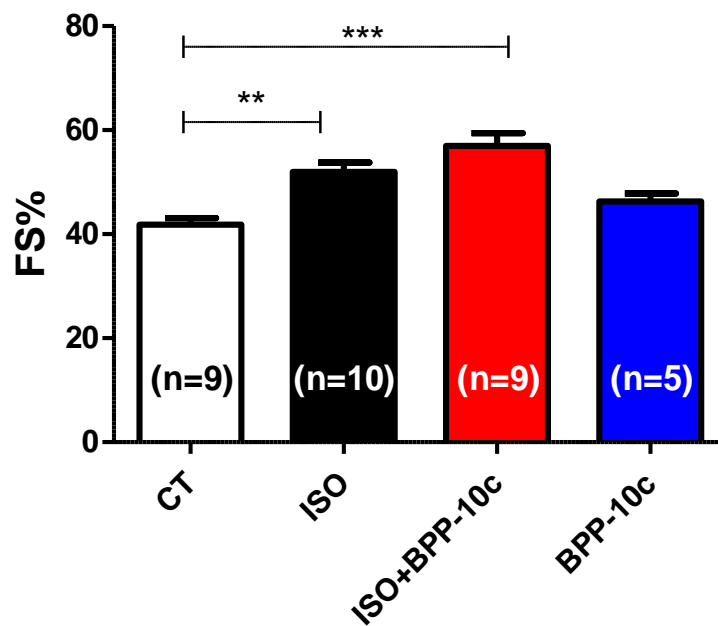


Figura 25: Análise da Fração de encurtamento (FS%) em ratos Wistar adultos tratados com administração i.p. de isoproterenol (4,5mg/Kg) e mini-bombas osmóticas de BPP-10c (71nmol/Kg) por sete dias consecutivos. n= número de animais, ** $p <$

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Por muito tempo, os efeitos causados pelos peptídeos potenciadores de bradicinina (BPPs) foram atribuídos à capacidade em inibir a ECA (*in vivo*) e a potencialização da BK (*ex vivo*) (Stewart e cols., 1971). Entretanto, estas ações não são suficientes para justificar as alterações nos parâmetros cardiovasculares promovidos pelos BPPs (lanzer e cols., 2007; lanzer e cols., 2011; Silva e cols., 2008; Guerreiro e cols., 2009; Morais e cols., 2013).

Além disso, existem relatos que sugerem que os inibidores da ECA podem promover vasodilatação através de mecanismos independentes da inibição dessa enzima, por exemplo, estudos com Captopril mostraram que esse inibidor da ECA é capaz de produzir redução nos níveis da pressão arterial em animais onde o sistema renina-angiotensina não é o responsável pela manutenção da pressão arterial (Greene e cols., 1972; Marks e cols. 1980).

Apesar de estudos não ter sido identificado o alvo molecular do BPP-5a, experimentos *in vitro* e *in vivo* mostraram que os efeitos evocados por este peptídeo são dependentes de NO (lanzer e cols., 2011). Por sua vez, a atividade anti-hipertensiva do BPP-10c pode ser explicada devido a sua capacidade de modular a atividade catalítica da enzima argininosuccinatosintetase (AsS), e consequentemente produzindo aumento da disponibilidade de L-arginina que resulta no aumento da liberação de NO (Guerreiro e cols., 2009).

Nossos resultados demonstraram importantes evidências de que os BPP-10c e BPP-5a são capazes de estimular a produção de óxido nítrico diretamente em cardiomiócitos, indicando desta forma, um efeito direto destes peptídeos na célula cardíaca.

Nosso estudo mostrou primeiramente por meio de uma curva concentração-resposta que o BPP-10c na concentração de 0,1 μ M obteve a melhor resposta para o aumento da produção de óxido nítrico, no entanto a concentração de 1 μ M também foi capaz de aumentar a produção de óxido nítrico em cardiomiócitos ventriculares marcados com sonda fluorescente sensível ao NO.

Além disso, determinamos o tempo de incubação ideal por meio de uma análise do curso temporal e observamos que os BPP-10c nos tempos de 15 e 20 minutos e o BPP-5a no tempo de 20 minutos, levaram a um aumento da produção de óxido nítrico em cardiomiócitos ventriculares. Esta dependência temporal para a produção de NO em células cardíacas é similar a obtida com outros peptídeos, como a Angiotensina-(1-7), capazes de induzir a produção de NO neste tipo celular (Dias-Peixoto e cols. 2008).

No presente estudo decidimos investigar se o BPP-10c poderia atuar modulando os receptores B₁ e B₂ e promover aumento na produção de óxido nítrico via receptores de bradicinina. Hipótese esta que foi descartada, através dos nossos experimentos com cardiomiócitos provenientes de camundongos duplo nocaute para os receptores B₁ e B₂. Assim, observamos em nossos resultados que o BPP-10c não utiliza receptores de bradicinina para a geração de óxido nítrico em células cardíacas, uma vez que cardiomiócitos provenientes de camundongos duplo nocaute para os receptores B₁ e B₂ apresentaram aumento de NO em resposta a incubação com BPP-10c.

Uma vez verificado o aumento da produção de NO em cardiomiócitos pelos BPPs, decidimos verificar a via de ativação envolvida no aumento do NO. Neste trabalho foram avaliadas as alterações da proteína Akt e da enzima eNOS. O aumento na fosforilação da eNOS em resposta ao BPP 10c, sugere a participação desta via no aumento da produção de NO. Além disso, sabe-se que BPP-10c atua sobre a AsS promovendo aumento na produção de L-arginina (Guerreiro e cols., 2009). Dessa maneira, pode-se sugerir que o BPP-10c provoca aumento na expressão e atividade de componentes envolvidos na via óxido nítrico, culminando numa maior liberação de NO em cardiomiócitos. Esse dado, no entanto, não descarta a possibilidade de que outras vias celulares estejam envolvidas na produção de óxido nítrico em cardiomiócitos, como, por exemplo, a óxido nítrico sintase neuronal, que também é expressa em células cardíacas (Oess e cols., 2006; Mungrue e cols., 2002).

Tendo em vista que a modulação da AsS pode influenciar no aumento de NO e conseqüentemente na modulação da hipertrofia cardíaca, uma vez que, o NO desempenha um papel benéfico na hipertrofia cardíaca (Shah, 2005; Jansses e cols., 2004).

As primeiras evidências de que o NO pode apresentar efeitos anti-hipertróficos no coração foram obtidas em ratos espontaneamente hipertensos (SHRs), sob tratamento crônico com L-arginina (Matsuoka e cols., 1996). Posteriormente, tal papel do NO foi confirmado em camundongos que hiperexpressam óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), nos quais o NO atenuou a hipertrofia cardíaca induzida pela infusão crônica de isoproterenol (Ozaki e cols., 2002).

O óxido nítrico tem um importante papel na modulação hipertrófica da célula cardíaca, sendo capaz de antagonizar o aumento da área celular produzido por angiotensina II (Gomes e cols., 2010). Portanto, um ponto importante investigado neste trabalho foi se os BPP-10c e BPP-5a são capazes de antagonizar a hipertrofia da célula cardíaca causada por estímulos adrenérgicos. Sabe-se que a GRK5 tem um importante papel no desenvolvimento da hipertrofia celular (Gold, e cols., 2013; Martini, e cols., 2008). Desta forma, para verificarmos se a ativação e a translocação da GRK5 através de agonistas adrenérgicos poderia ser modulada pelos BPPs em cardiomiócitos provenientes de ratos neonatos, nós realizamos imunofluorescência utilizando o anticorpo anti-GRK5, e analisamos a translocação do citosol para o núcleo deste fator nas células cardíacas. As células foram estimuladas com fenilefrina ou isoproterenol, agonistas adrenérgicos que promovem hipertrofia cardíaca, mas que ativam receptores distintos (Zierhut e Zimmer, 2011).

O presente estudo mostrou, como já esperávamos, que o tratamento *in vitro* de cardiomiocitos neonatos com agonistas adrenérgicos promove um aumento da translocação da GRK5 do citosol para o núcleo celular, além de promover um aumento significativo da área celular. A administração dos agonistas adrenérgicos juntamente com os BPP-10c e BPP-5a levou a uma diminuição da translocação da GRK5 para o núcleo celular, prevenindo a ativação da sinalização hipertrófica nestas células. Este efeito anti-hipertrófico importante do BPP-5a está relacionado a produção de óxido nítrico, uma vez que o L-NAME foi capaz de inibir a resposta anti-hipertrófica deste peptídeo. Esses dados fornecem informações importantes sobre o possível mecanismo pelo qual esses peptídeos atuam e estão de acordo com achados na literatura que descrevem que o óxido nítrico apresenta um papel benéfico na hipertrofia cardíaca (Shah, 2005; Jansses S. e cols., 2004).

Para avaliação *in vivo*, adotamos o modelo de hipertrofia cardíaca induzida pelo tratamento com isoproterenol, que é largamente utilizado e que mimetiza a hipertrofia cardíaca semelhante àquela observada em humanos (Itahayarasi e cols., 1997). Confirmando os dados descritos na literatura, o isoproterenol promoveu hipertrofia ventricular em ratos, devido ao aumento da parede posterior ventricular esquerda e uma diminuição da dimensão interna do ventrículo esquerdo, tanto na diástole quanto na sístole.

A atenuação do aumento na medida da parede posterior ventricular em ratos com hipertrofia cardíaca induzida pelo isoproterenol em ratos tratados com o BPP-10c sugere uma importante ação anti-hipertrofica *in vivo* dos BPPs. De forma complementar, a prevenção do aumento da medida da razão entre o peso do coração e comprimento da tibia é outro indicativo do efeito anti-hipertrofico evocado pelo BPP-10c. É plausível que parte dos efeitos sejam causados pela ação do BPP-10c sobre a enzima AsS, levando ao aumento da produção de L-arginina (Guerreiro e cols., 2009), uma vez que disponibilidade de L-arginina influencia na liberação de NO (Higashi e Chayama, 2002).

A hipertrofia cardíaca pode aumentar em muitas vezes os riscos e os eventos cardiovasculares pelo aumento da demanda de oxigênio no tecido miocárdico hipertrofiado. Isto aumentaria a prevalência e a severidade de arritmias, por fim levando a alterações na contratilidade miocárdica e, conseqüentemente, ao prejuízo na função cardíaca (Macmahon e cols., 1989). É muito interessante o fato de que ratos tratados com isoproterenol na presença do BPP-10c apresentem um aumento da fração de ejeção e de encurtamento, mesmo não apresentando um coração tão hipertrofiado quanto o de ratos tratados apenas com isoproterenol. É importante ressaltar que o aumento da fração de encurtamento no rato tratado com isoproterenol é em parte resultado da hipertrofia cardíaca observada neste modelo. Alterações na fração de encurtamento e de ejeção, por sua vez não foram observadas em ratos tratados apenas com BPP 10c, que apresentaram um ligeiro aumento da fração de ejeção e encurtamento com relação ao grupo controle.

Desta forma pode-se especular que o efeito observado *in vivo* nos ratos tratados com isoproterenol e BPP-10c, com relação à fração de ejeção e encurtamento seja resultado de alterações intracelulares sinérgicas ativadas pelo NO e isoproterenol, uma vez que o óxido nítrico é capaz de alterar a sensibilidade das proteínas envolvidas no manejo do cálcio na célula cardíaca (Seddon e cols., 2007). Mais especificamente o óxido nítrico é capaz de modular a sensibilidade do receptor de rianodina ao cálcio (Petroff e cols., 2001) e alterar a função da fosfolambam um importante modulador da SERCA (Wang e cols., 2008). Conjuntamente, os dados apresentados suportam a hipótese de que o BPP-10c e BPP-5a são cardioprotetores, e apresentam ação direta na célula cardíaca onde levam a produção de NO. A geração de NO na célula cardíaca envolve a princípio, ativação da produção de NO via ativação da eNOS. Diretamente o óxido nítrico é um importante mediador da resposta *in vitro* e possivelmente *in vivo*.

6. CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

Considerando os dados obtidos no presente trabalho pode-se concluir que o BPP-10c e BPP-5a são agentes anti-hipertróficos, devido à capacidade de aumentar a liberação de óxido nítrico em cardiomiócitos. Em conjunto, os dados apontam que os BPP-10c e BPP-5a atuam como cardioprotetores. No entanto, estudos adicionais são necessários para melhor compreender os mecanismos de ação envolvidos. Este estudo abre perspectivas para o desenvolvimento de fármacos baseado na estrutura dos BPPs direcionados para uma nova aplicação terapêutica.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Balligand J L, Cannon PJ. Nitric oxide synthases and cardiac muscle autocrine and paracrine influences (1997). ***Arterioscler Thromb Vasc Biol.***17: 1846-58.

Benjamin I, Jalil j, Tan L, Cho K, Weber K, Clark W (1989). Isoproterenol-induced myocardial fibrosis in relation to myocyteneclerosis. ***Circ Res*** 65:657-670.

Beny JL, Nguyen NM, Marino M, Matsui M. (2008). Muscarinic receptor Knockout mice confirm involvement of M3 receptor in endothelium-dependent vasodilatation in mouse arteries. ***J Cardiovasc pharmacol*** 51 (5): 505-512.

Bernardo BC, Weeks KL, Pretorius L, McMuller JR. (2010). Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: Experimental findings and therapeutic strategies. ***Pharmacology & Therapeutics.*** 128.

Bhambi B, Eghbal M. (1991) Effect of norepinephrine on myocardial collagen gene expression and response of cardiac fibroblasts after norepinephrine treatment. ***Am J Pathol.*** 139 (5): 1131-42.

Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. ***Anal Biochem.*** 72: 248-254.

Bradykinin Potentiating Peptide and its high soluble supramolecular complex. ***Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*** 67:407-422.

Busse R, Fleming I (1995). Regulation and functional consequences of endothelial nitric oxide formation. ***Ann Med.*** 27(3):331-371.

Calderone A, Thaik M, Takahashi N, Chang D and Colucci W. (1998) Nitric Oxide, Atrial Natriuretic Peptide, and cyclic GMP Inhibit the Growth-promoting Effects of Norepinephrine in Cardiac Myocytes and Fibroblasts. ***The Journal of Clinical Investigation.*** 101: 812–818.

Camargo ACM, Ianzer D, Guerreiro JR, Serrano SMT (2012). Bradykinin-potentiating peptides: Beyond captopril. **Toxicon**. 59: 516-523

Campbell DJ (2003). The renin-angiotensin and the Kallikrein-kinin systems. **Int J Biochem Cell Biol**. 35:784-791.

Cawley SM, Sawyer CL, Brunelle KM, Van Der Vliet A, Dostmann WR. (2007) Nitric oxide-evoked transient kinetics of cyclic GMP in vascular smooth muscle cells. **Cell Signal**. 19:1023-1033.

Cintra AC, Vieira CA and Giglio JR (1990). Primary structure and biological activity of bradykinin potentiating peptides from Bothrops insularis snake venom. **J Protein Chem** 9:221-227.

Coates D. (2003) The angiotensin converting enzyme (ECA). **Int J Biochem Cell Biol**. 35(6):769-73

Cotton J, Hayashi MA, Cuniasse P, Vazeux G, Ianzer D, De Camargo AC and Dive V (2002) Selective inhibition of the C-domain of angiotensin I converting enzyme by bradykinin potentiating peptides. **Biochemistry** 41:6065-6071.

Couture R, Girolami JP (2004) Putative roles of kinin receptors in the therapeutic effects of angiotensin 1-converting enzyme inhibitors in diabetes mellitus. **Eur J Pharmacol** 500:467-485.

Dash R, Schmidt AG, Pathak A, Gerst MJ, Biniakiewicz D, Kadambi VJ, et al. Differential regulation of p38 mitogen-activated protein kinase mediates gender-dependent catecholamine-induced hypertrophy. (2003). **Cardiovasc Res**. 57: 704-14.

Davis KL, Martin E, Turko IV. (2001). Novel effect of nitric oxide. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicon**. 41:203-236.

De Sousa FB, Denadai AML, Lula IS, Ianzer D, Malaspina ER, Camargo ACM, Santos RAS and Sinisterra RD (2010) Structural and physical–chemical evaluation of

Denadai AML, Ianzer D, Alcântara AFC, Santoro MM, Santos CFF, Lula IS, Camargo ACM, Faljoni-Alario A, Santos RAS, Sinisterra RD (2007). Novel pharmaceutical composition of bradykinin potentiating penta peptide with β -cyclodextrin: Physical-chemical characterization and anti-hypertensive evaluation. ***International journal of pharmaceuticals***. 336:90-98.

Dias-Peixoto MF, Santos RA, Gomes ER, Alves MN, Almeida PW, Greco L, Rosa M, Fauler B, Bader M, Alenina N, Guatimosim S. (2008) Molecular mechanisms involved in the angiotensin-(1-7)/Mas Signaling pathway in cardiomyocytes. ***Hypertension***. 52:542-548.

Ferreira SH (1965) A Bradykinin-Potentiating Factor (Bpf) Present in the Venom of Bothrops Jararaca. ***Br J Pharmacol Chemother*** 24:163-169.

Ferreira SH, Bartelt DC and Greene LJ (1970a) Isolation of bradykinin-potentiating peptides from Bothrops jararaca venom. ***Biochemistry*** 9:2583-2593.

Ferreira SH, Greene LH, Alabaster VA, Bakhle YS and Vane JR (1970b) Activity of various fractions of bradykinin potentiating factor against angiotensin I converting enzyme. ***Nature*** 225:379-380.

Flam BR, Eichler DC, Solomonson LP. (2007) Endothelial nitric oxide production is tightly coupled to the citrulline-NO cycle. ***Nitric Oxide*** 17:115-121.

Frey N, Olson EN. (2003). Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly. ***Annu. Rev. Physiol.*** 65:45-79.

Gavras H, Brunner HR, Laragh JH, Gavras I, Vukovich RA. (1975). The use of angiotensin-converting enzyme inhibitor in the diagnosis and treatment of hypertension. ***Clin Sci Mol Med.*** 57s-60.

Gavras H, Brunner HR, Laragh JH, Sealey JE, Gavras I and Vukovich RA (1974) An angiotensin converting-enzyme inhibitor to identify and treat vasoconstrictor and volume factors in hypertensive patients. ***N Engl J Med*** 291:817-821.

Gold JI, Martini JS, Hullmann J, Koch WJ. (2013) Nuclear translocation of cardiac G Protein-Coupled Receptor Kinase 5 Downstream of select Gq-activating hypertrophic ligands is a calmodulin-dependent process. ***Plos one*** 8:57324-371.

Gomes CL, Konno K, Conceição IM, Ianzer D, Yamanouye N, Prezoto BC, Assakura MT, Radis-Baptista G, Yamane T, Santos RA, de Carmargo AC, Hayashi MA. (2007). Identification of novel bradykinin-potentiating peptides (BPPs) in the venom gland of a rattlesnake allowed the evaluation of the structure-function relationship of BPPs. ***Biochem Pharmacol.*** 74 (9): 1350-60.

Gomes ER, Lara AA, Almeida PW, Guimarães D, Resende R, Campagnole-Santos MJ, Bader M, Santos RAS, Guatimosim S. (2010) Angiotensin-(1-7) prevents cardiomyocyte pathological remodeling through a nitric oxide/guanosine 3',5'-cyclic monophosphate dependent pathway. ***Hypertension.*** 55:153-160.

Goodwin BL, Pendleton LC, Levy MM, Solomonson LP, Eichler DC. (2007). Tumor necrosis factor- α reduces argininosuccinate synthase expression and nitric oxide production in aortic endothelial cells. ***Am J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*** 293, H1115-121.

Guatimosim S, Amaya MJ, Guerra MT, Aguiar CJ, Goes AM, Gómez-Viquez NL, Rodrigues MA, Gomes DA, Martins-Cruz J, Lederer WJ, Leite MF (2008) Nuclear Ca^{+2} regulates cardiomyocyte function. ***Cell Calcium.*** Aug;44(2): 230-42.

Guerreiro JR, Lameu C, Oliveira EF, Klitzke CF, Melo RL, Linares E, Augusto O, Fox JW, Lebrun I, Serrano SM and Camargo AC (2009) Argininosuccinate synthetase is a functional target for a snake venom anti-hypertensive peptide: role in arginine and nitric oxide production. ***J Biol Chem*** 284:20022-20033.

Harrison DG. (1996). Endothelial control of vasomotion and nitric oxide production. ***Cardiol. Clin.*** 14:1-15.

Hayashi MA and Camargo AC (2005) The Bradykinin-potentiating peptides from venom gland and brain of *Bothrops jararaca* contain highly site specific inhibitors of the somatic angiotensin-converting enzyme. ***Toxicon*** 45:1163-1170.

Hayashi MA, Murbach AF, Ianzer D, Portaro FC, Prezoto BC, Fernandes BL, Silveira PF, Silva CA, Pires RS, Britto LR, Dive V and Camargo AC (2003) The C-type natriuretic peptide precursor of snake brain contains highly specific inhibitors of the angiotensin-converting enzyme. **J Neurochem** 85:969-977.

Hecker M, Sessa WC, Harris HJ, Anggard EE and Vane JR (1990) The metabolism of L-arginine and its significance for the biosynthesis of endothelium-derived relaxing factor: cultured endothelial cells recycle L-citrulline to L-arginine. **Proc Natl Acad Sci USA** 87:8612-8616.

Higashi Y and Chayama K. (2002). Renal endothelial dysfunction and hypertension. **J Diabetes Complications** (1): 103-7.

Hussin A, Brasse-Lagnel C, Fairand A, Renouf S, Lavoine A. (2003). Argininosuccinate synthetase from the urea cycle to the citrulline-NO cycle. **Eur J Biochem.** 270:1987-1999.

Ianzer D, Konno K, Marques-Porto R, Vieira Portaro FC, Stocklin R, Martins de Camargo AC and Pimenta DC (2004) Identification of five new bradykinin potentiating peptides (BPPs) from Bothrops jararaca crude venom by using electrospray ionization tandem mass spectrometry after a two-step liquid chromatography. **Peptides** 25:1085-1092.

Ianzer D, Konno K, Xavier CH, Stocklin R, Santos RA, de Camargo AC and Pimenta DC (2006) Hemorphin and hemorphin-like peptides isolated from dog pancreas and sheep brain are able to potentiate bradykinin activity in vivo. **Peptides** 27:2957-2966.

Ianzer D, Santos RA, Etelvino GM, Xavier CH, de Almeida Santos J, Mendes EP, Machado LT, Prezoto BC, Dive V and de Camargo AC (2007) Do the cardiovascular effects of angiotensin-converting enzyme (ACE) I involve ACE-independent mechanisms? new insights from proline-rich peptides of Bothrops jararaca. **J Pharmacol Exp Ther** 322:795-805.

Ilanzer D, Xavier CH, Fraga FC, Lautner RQ, Guerreiro JR, Machado LT, Mendes EP, Camargo ACM and Santos RAS (2011) BPP-5a Produces potent and long-lasting NO-dependent antihypertensive effect. *Ther Adv in Cardiovasc Dis.* 5:281-295.

Ithayarasi AP, Devi CS (1997). Effect of alpha-tocopherol on lipid peroxidation in isoproterenol induce myocardial infarction in rats. *Indian Journal of Physiology and Pharmacology.* 41:369-376.

Jansses S, Pokreisz P, Schoonjans L, Pellens M, Vermeersch P, Tjwa M. (2004). Cardiomyocyte-specific overexpression of nitric oxide synthase 3 improves left ventricular performance and reduces compensatory hypertrophy after myocardial infarction. *Circulation Research.* 94: 1256-62.

Kempf T, Wollert KC. (2004). Nitric oxide and the enigma of cardiac hypertrophy. *Bioessays.* 6: 608-15.

Kintsurashvilli E, Duka A, Ignjacev I, Pattakos G, Gravas I, Gravas H. (2005). Agerelated changes of bradikinin B1 and B2 receptors in rat heart. *American Journal of Heart and Circulatory Physiology.* 289:H202-205.

Klimaschewski L, Kummer W, Mayer B, Couraud JY, Preissler U, Philippin B, et al. (1992). Nitric oxide synthase in cardiac nerve fibers and neurons of rat and guinea pig heart. *Circ Res.* 71: 1533-7.

Knowlton KU, Michel MC, Itani M, Shubeita HE, Ishihara K, Brown JH, Chien KR. (1993). The α 1A-adrenergic receptor subtype mediates biochemical, molecular, and morphologic features of cultured myocardial cell hypertrophy. *J Biol Chem.* 268:15374-80.

Krieger EM, Salgado HC and Assan CJ (1971) Greene LL, Ferreira SH: Potential screening test for detection of overactivity of renin-angiotensin system. *Lancet* 1:269-271.

Lamping KG, Wess J, Cui Y, Nuno DW, Faraci FM. (2004). Muscarinic (M) receptor in coronary circulation: gene-targeted mice define the role of M2 and M3 receptors in response to acetylcholine. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* (7): 1253-8.

Langmead CJ, Watson J, Reavill C. (2008) Muscarinic acetylcholine receptors as CNS drug targets. *Pharmacol Ther* 117:232-243

Lorell BH, Carabelo BA. (2000). Left ventricular hypertrophy: pathogenesis, detection, and prognosis. *Circulation.* 102:470-479.

Macmahon S, Collins G, Rautaharju P, Cutler J, Neaton J, Prineas R, Crow R, Stamler J. (1989) Eletrocardiographic left ventricular hypertrophy and effects of antihypertensive drug therapy in hypertensive participants in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Am J Cardiol* 63(3): 202-210.

Margolius HS (1995). Theodore Cooper Memorial Lecture. KalliKreins and Kinins. Some unanswered questions about system characteristics and roles in human disease. *Hypertension.* 26(2):221-9.

Marletta MA. (1994). Nitric oxide syntase: aspect concerning structure and catalysis. *Cell* 78(6): 927-930.

Martini JS, Raake P, Vinge LE, DeGeorge BR, Chuprun JK (2008). Uncovering G protein-coupled receptor Kinase-5 as a histone deacetylase kinase in th nucleus of cardiomyocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:12457-12462.

Matsuoka H, Nakata M, Kohno K, Koga Y, Nomura G, Toshima H, et al. (1996). Chronic L-arginine administration attenuates cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 27: 14-8.

Meki AMA, Nassar AY, Rochat H. (1995). A bradykinin-potentiating peptide (peptide K 12) isolated from the venom of Egyptian scorpion *Buthus occitanus*. *Peptides.* 16:1359-65.

Morais KLP, Hayashi MAF, Bruni FM, Lopes-Ferreira M, Camargo ACM, Ulrich H, Lameu C. (2001). B₁-PRO-5a, a natural angiotensin-converting enzyme inhibitor, promotes vasodilatation mediated by both bradykinin B₂ and M₁ muscarinic acetylcholine receptors. **Biochemical Pharmacology**. 81: 736–742.

Morais KLP, Ianze D, Miranda JR, Melo RL, Guerreiro JR, Santos RAS, Ulrich H, Lameu C. (2013). Proline rich-oligopeptides: Diverse mechanisms for antihypertensive action. **Peptides**. 48:124-133.

Moreau ME, Dubreuil P, Molinaro G, Chagnon M, Muller-Esterl W, Lepage Y, Marceau F, Adam A (2005). Expression of metallopeptidases and kinin receptors in swine oropharyngeal tissues: effects of angiotensin I-converting enzyme inhibition and inflammation. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 315 (3): 1065-1074.

Mueller S, Gothe R, Siems WD, Vietinghoff G, Paegelow I and Reissmann S (2005) Potentiation of bradykinin actions by analogues of the bradykinin potentiating nonapeptide BPP9 alpha. **Peptides** 26:1235-1247.

Mungrue IN, Gros R, You X, Pirani A, Azad A, Csont T, Schulz R, Butany J, Stewart DJ, Husain M. (2002). Cardiomyocyte overexpression of iNOS in mice results in peroxynitrite generation, heart block, and sudden death. **J. Clin. Invest.** 109:735-743.

Murad F. (1996). The 1996 Albert Lasker Medical Research Awards. Signal transduction using nitric oxide and cyclic guanosine monophosphate. **JAMA** 276(14): 1189-1192.

Murayama N, Hayashi MA, Ohi H, Ferreira LA, Hermann VV, Saito H, Fujita Y, Higuchi S, Fernandes BL, Yamane T and de Camargo AC (1997) Cloning and sequence analysis of a *Bothrops jararaca* cDNA encoding a precursor of seven bradykinin-potentiating peptides and a C-type natriuretic peptide. **Proc Natl Acad Sci U S A** 94:1189-1193.

Norel X, Walch L, Costantino M, Labat C, Gorenne I, Dulmete E, Rossi F, Brink C. (1996) M1 and M3 muscarinic receptors in human pulmonary arteries. **J Pharmacol** 119: 149-157.

Oess S, Icking A, Fulton D, Govers R, Muller-Esterl W. (2006). Subcellular targeting and trafficking of nitric oxide synthases. **Biochem J**. 396:401-409.

Ondetti MA and Cushman D. (1982). Enzymes of the rennin angiotensin system and their inhibitors. **Annual Review of Biochemistry**. 51:283-308.

Ondetti MA, Williams NJ, Sabo EF, Pluscec J, Weaver ER and Kocy O (1971) Angiotensin-converting enzyme inhibitors from the venom of *Bothrops jararaca*. Isolation, elucidation of structure, and synthesis. **Biochemistry** 10:4033-4039.

Ozaki M, Kawashima S, Yamashita T, Hirase T, Ohashi Y, Inoue N, et al. (2002). Overexpression of endothelial nitric oxide synthase attenuates cardiac hypertrophy induced by chronic isoproterenol infusion. **Circ J**. 66: 851-6.

Petroff MG, Kim SH, Pepe S, Dessy C, Marban E, Balligand JL, Sollott SJ. (2001). Endogenous nitric oxide mechanisms mediate the stretch dependence of Ca^{+2} release in cardiomyocytes. **Nat Cell Biol**. 3(10):867-73.

Pimenta DC, Prezoto BC, Konno K, Melo RL, Furtado MF, Camargo AC and Serrano SM (2007) Mass spectrometric analysis of the individual variability of *Bothrops jararaca* venom peptide fraction. Evidence for sex-based variation among the bradykinin-potentiating peptides. **Rapid Commun Mass Spectrom**. 21:1034-1042.

Regoli D, Jukic D, Gobeil F, Rhaleb NE. (1993) Receptors for bradykinin and related kinins: a critical analysis. **Can J Physiol Pharmacol**. 71:556-567.

Rioli V, Prezoto BC, Konno K, Melo RL, Klitzke CF, Ferro ES, Ferreira-Lopes M, Camargo AC and Portaro FC (2008) A novel bradykinin potentiating peptide isolated from *Bothrops jararacussu* venom using catalytically inactive oligopeptidase EP24.15. **FEBS J** 275:2442-2454.

Seddon M, Shah AM, Casadei B. (2007). Cardiomyocytes as effectores of nitric oxide signaling. **Cardiovasc Res.** 75:315-26.

Shah AM. (2005). Divergent roles of endothelial nitric oxide synthase in cardiac hypertrophy and chamber dilation? **Cardiovascular Research.** 66: 421-422.

Sheffler DJ, Williams R, Pontes TM, Xiang Z, Kane AS, Byun NE, Jadhav S, Mock MM, Zheng F, Lewis LM. (2009) A novel selective muscarinic acetylcholine receptor subtype 1 antagonist reduces seizures without impairing hippocampus-dependent learning. **Mol Pharmacol** 76:356-368.

Shen LJ, Beloussow K and Shen WC (2005) Accessibility of endothelial and inducible nitric oxide synthase to the intracellular citrulline-arginine regeneration pathway. **Biochem Pharmacol** 69:97-104.

Shirey JK, Brady AE, Jones PJ, Lindsley CW, Conn PJ. (2009). A selective allosteric potentiator of the M1 muscarinic acetylcholine receptor increases activity of medial prefrontal cortical neurons and restores impairments in reversal learning. **J Neurosci** 29:14271-14286.

Silva CA, Portaro FC, Fernandes BL, Ianzer DA, Guerreiro JR, Gomes CL, Konno K, Serrano SM, Nascimento N and Camargo AC (2008). Tissue distribution in mice of BPP 10c, a potent proline-rich anti-hypertensive peptide of Bothrops jararaca. **Toxicon** 51:515-523.

Skeggs LT, Kahn JR and Shumway NP (1956). The preparation and function of the hypertension-converting enzyme. **J Exp Med.** 103:295-299.

Solomonson LP, Flam BR, Pendleton LC. (2003) The caveolar nitric oxide synthase/arginine regeneration system for NO production in endothelial cells. **The Journal of Experimental Biology.** 206:2083-87.

Stewart JM, Ferreira SH and Greene LJ (1971) Bradykinin potentiating peptide PCA-Lys-Trp-Ala-Pro. An inhibitor of the pulmonary inactivation of bradykinin and conversion of angiotensin I to II. **Biochem Pharmacol** 20:1557-1567.

Tashima AK, Zelanis A, Kitano ES, Ianzer D, Melo RL, Rioli V. (2012) Peptidomics of three Bothrops snake venoms: insights into the molecular diversification of proteomes and peptidomes. ***Mol Cell Proteomics***.11:1245-62.

Vane JP (1999) The history of inhibitors of angiotensin converting enzyme. ***J Physiol Pharmacol***. 50:489-498.

Verano-Braga T, Rocha-Resende C, Silva DM, Ianzer D, Martin-Eauclaire MF, Bougis PE, de Lima ME, Santos RA and Pimenta AM (2008) Tityus serrulatus Hypotensins: a new family of peptides from scorpion venom. ***Biochem Biophys Res Commun*** 371:515-520.

Walch L, Gascard JP, Dulmet E, Brink C, Norel X. (2000). Evidence for M1 muscarinic receptor on the endothelium of human pulmonary veins. ***J Pharmacol***. 130: 73-78

Wang H, Kohr MJ, Traynham CJ, Wheeler DG, Janssen PM, Ziolo MT (2008). Neuronal nitric oxide synthase signaling within cardiac myocytes targets phospholamban. ***Am j Physiol Cell Physiol***. 294: C-1566-75.

Wei L, Alhenc-Gelas F, Corvol P, Clauser E (1991). The two homologous domains of human angiotensin I-converting enzyme are both catalytically active. ***J. Biol Chem***. 266(14):9002-8.

Wu KK (2002) Regulation of endothelial nitric oxide synthase activity and gene expression. ***Ann N Y Acad Sci*** 962:122-30.

Zelanis A, Tashima AK, Rocha MM, Furtado MF, Camargo AC, Ho PL and Serrano SM (2010) Analysis of the ontogenetic variation in the venom proteome/peptidome of Bothrops jararaca reveals different strategies to deal with prey. ***J Proteome Res*** 9:2278-2291.

Zierhut W and Zimmer H (2011) Significance of myocardial α -and- β - adrenoceptores in catecholamine-induced cardiac hypertrophy. ***Circulation research***. 65:1417-1452.