

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TECNOLÓGICA E  
PROPRIEDADE INTELECTUAL

PEDRO HENRIQUE MAYRINK SOARES

AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTI-HIPERTENSIVO E ERGOGÊNICO DE UM  
PEPTÍDEO DA PEÇONHA DO ESCORPIÃO *TITYUS SERRULATUS* EM MODELO  
MURINO

BELO HORIZONTE

2025

PEDRO HENRIQUE MAYRINK SOARES

AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTI-HIPERTENSIVO E ERGOGÊNICO DE UM  
PEPTÍDEO DA PEÇONHA DO ESCORPIÃO *TITYUS SERRULATUS* EM MODELO  
MURINO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Tecnológica e Propriedade Intelectual da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para obtenção do título de Mestre em Inovação Tecnológica e Propriedade Intelectual.

Área de concentração: Inovação Biofarmacêutica e Tecnológica

Orientador: Prof. Dr. Thiago Verano-Braga

Coorientador (a): Dra. Nícia Soares

Prof. Dr. Dawit Gonçalves

BELO HORIZONTE

2025

043 Soares, Pedro Henrique Mayrink.  
Avaliação do efeito anti-hipertensivo e ergogênico de um peptídeo da  
peçonha do escorpião *Tityus serrulatus* em modelo murino [manuscrito] / Pedro  
Henrique Mayrink Soares. – 2025.  
87 f.: il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Thiago Verano-Braga. Coorientador (a): Dra. Nícia  
Soares; Prof. Dr. Dawit Gonçalves.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de  
Ciências Biológicas. Mestrado Profissional em Inovação Tecnológica e  
Propriedade Intelectual.

1. Inovação. 2. Venenos de Escorpião. 3. Hipertensão. 4. Peptídeos.  
I. Verano-Braga, Thiago. II. Soares, Nícia Pedreira. III. Gonçalves, Dawit  
Albieiro Pinheiro. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de  
Ciências Biológicas. V. Título.

CDU: 608.5



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

**ATA**

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
MESTRADO PROFISSIONAL EM INOVAÇÃO TECNOLÓGICA E PROPRIEDADE INTELECTUAL

**ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Nº 202 de Pedro Henrique Mayrink Soares**

Às 14:00 horas do dia 27 de fevereiro de 2025, em ambiente virtual, realizou-se a sessão pública para a defesa da Dissertação de Pedro Henrique Mayrink Soares. A presidência da sessão coube ao Prof. Dr. Thiago Verano Braga, ICB/UFMG – Orientador. Inicialmente o Presidente fez a apresentação da Comissão Examinadora assim constituída: Dra. Maria Elena de Lima Perez Garcia, Hospital Santa Casa; Profa. Dra. Maria José Campagnole dos Santos, ICB/UFMG; Prof. Dr. Dawit Albieiro Pinheiro Gonçalves, EEEFTO/UFMG - Coorientador; Dra. Nícia Pedreira Soares, UFMG - Coorientadora; Dra. Daniela Ravizzoni Dartora, Centre Hospitalier Universitaire Sainte-Justine - Suplente; e Prof. Dr. Thiago Verano Braga, ICB/UFMG – Orientador. Em seguida, o candidato fez a apresentação do trabalho que constitui sua Dissertação de Mestrado, intitulada "Avaliação do Efeito Anti-hipertensivo e Ergogênico de um Peptídeo da Peçonha do Escorpião Tityus serrulatus em Modelo Murino". Seguiu-se a arguição pelos examinadores e, logo após, a Comissão reuniu-se, sem a presença do candidato e do público e decidiu considerar aprovada a Dissertação de Mestrado. O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo Presidente da comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ata que, depois de lida, se aprovada, será assinada pela Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 27 de fevereiro de 2025.



Documento assinado eletronicamente por **Thiago Verano Braga, Professor do Magistério Superior**, em 28/02/2025, às 13:02, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Maria Elena de Lima Perez Garcia, Usuário Externo**, em 07/03/2025, às 12:14, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Dawit Albieiro Pinheiro Goncalves, Professor do Magistério Superior**, em 07/03/2025, às 16:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Maria Jose Campagnole dos Santos, Professor(a)**, em 08/03/2025, às 09:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Nícia Pedreira Soares, Usuária Externa**, em 13/03/2025, às 14:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **4013398** e o código CRC **95D373F0**.

---



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

MESTRADO PROFISSIONAL EM INOVAÇÃO TECNOLÓGICA E PROPRIEDADE INTELECTUAL

**FOLHA DE APROVAÇÃO**

**"Avaliação do Efeito Anti-hipertensivo e Ergogênico de um Peptídeo da Peçonha do Escorpião *Tityus serrulatus* em Modelo Murino"**

**Pedro Henrique Mayrink Soares**

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia 27 de fevereiro de 2025, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes membros:

**Profa. Dra. Maria José Campagnole dos Santos**  
**ICB/UFMG**

**Dra. Maria Elena de Lima Perez Garcia**  
**Hospital Santa Casa**

**Prof. Dr. Dawit Albieiro Pinheiro Gonçalves - Coorientador**  
**EEFFTO/UFMG**

**Dra. Nícia Pedreira Soares - Coorientadora**  
**UFMG**

**Prof. Dr. Thiago Verano Braga – Orientador**  
**ICB/UFMG**

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

**27 de fevereiro de 2025**



Documento assinado eletronicamente por **Thiago Verano Braga, Professor do Magistério Superior**, em 28/02/2025, às 13:02, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Maria Elena de Lima Perez Garcia, Usuário Externo**, em 07/03/2025, às 12:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Dawit Albieiro Pinheiro Goncalves, Professor do Magistério Superior**, em 07/03/2025, às 16:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Maria Jose Campagnole dos Santos, Professor(a)**, em 08/03/2025, às 09:29, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Nícia Pedreira Soares, Usuária Externa**, em 13/03/2025, às 14:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **4013479** e o código CRC **DF21B133**.

## **AGRADECIMENTO**

A Deus, meu refúgio e força, por ter cuidado de mim em cada instante desses dois anos. Foram momentos difíceis, em que eu tinha certeza de que não ia conseguir, mas Ele, como sempre, foi perfeito. Tudo aconteceu no tempo certo, e no final, recebi muito mais do que imaginava. Hoje sou mais forte, realizei sonhos e aprofundei laços com família e amigos.

Ao meu marido, Ian, meu alicerce. Obrigado por me encorajar, por estar ao meu lado em cada passo, por me apoiar e me ajudar, pelas madrugadas que acordou e ia ao escritório me chamar para dormir quando eu insistia em continuar estudando. Obrigada por dividir comigo as alegrias e segurar minha mão nas tristezas. Ter você ao meu lado tornou tudo mais leve.

Às minhas irmãs, Bárbara, Bruna e Débora, meu porto seguro. Obrigada por me inspirarem, me ensinarem e cuidarem de mim, sempre. Aos meus pais, por terem me dado caráter, valores e amor incondicional. Aos meus amigos, que me viram rir e chorar, saibam que amo vocês com todo o coração. Obrigado por estarem comigo nessa caminhada.

Ao meu grande orientador, Professor Dr. Thiago Verano, minha gratidão por acreditar em mim e, apesar dos desafios, da orientação a distância, permitiu que eu mergulhasse na ciência a ponto de me apaixonar e mudar de profissão.

À minha coorientadora, Dra. Nícia Soares, por cada ensinamento e treinamento. Obrigado por toda paciência do mundo ao pegar na minha mão para ensinar e confiar para colaborar. Obrigado por ser muito mais do que você precisava ser e se tornar uma amiga que levarei comigo no peito.

Ao meu segundo coorientador, Professor Dr. Dawit Gonçalves, por me receber de braços abertos e compartilhar seu conhecimento comigo. Obrigado pela didática incrível e por ensinar com brilho nos olhos. É nítido e apaixonante seu amor pela ciência.

Aos amigos do Laboratório de Hipertensão, vocês são incríveis! Obrigado por cada aprendizado, cada troca, cada apoio. Aos amigos Zanetti e Lucas do LAFISE, Kamyille, Cris, Gabi, Cláudia, Héric e ao grupo NPF; sério, eu não teria conseguido sem vocês! E a todos aqueles que cruzaram meu caminho nessa jornada na UFMG, meu muito, muito obrigado. Ninguém faz ciência sozinho!

## RESUMO

A busca por novas abordagens terapêuticas contra a hipertensão tem incentivado a investigação de moléculas bioativas, incluindo peptídeos derivados de toxinas animais. Neste contexto, esta dissertação examina os efeitos do KPP, um tripeptídeo sintético inspirado em uma toxina presente na peçonha do escorpião *Tityus serrulatus*, sobre a pressão arterial e o desempenho físico sob diferentes condições ambientais. Para isso, foram realizados experimentos com modelos murinos normotensos e hipertensos submetidos a protocolos de testes de carga incremental, permitindo uma avaliação abrangente da influência do KPP na resposta cardiovascular e na capacidade física.

Os achados revelaram que, em ratos hipertensos (SHR), o KPP promoveu uma redução significativa da pressão arterial média (PAM), nas duas doses avaliadas (33 e 330 µg/kg), enquanto em animais normotensos esse efeito não foi significativo, demonstrando o seu efeito anti-hipertensivo e não hipotensor. O KPP não foi capaz de induzir o mesmo efeito observado em machos para as fêmeas, mas o problema pode ser o tamanho amostral utilizado, menor para as ratas. Nos testes envolvendo camundongos submetidos ao teste de carga incremental, o peptídeo não demonstrou impacto positivo sobre a força muscular ou a resistência aeróbica, reforçando a ausência de propriedades ergogênicas associadas ao doping. Além disso, os resultados não indicaram uma inibição significativa da enzima conversora de angiotensina (ECA), o que sugere que seu efeito hipotensivo ocorra por vias alternativas.

Esses resultados posicionam o KPP como um promissor candidato para o desenvolvimento de novas terapias anti-hipertensivas, especialmente voltadas para indivíduos hipertensos fisicamente ativos. A ausência de impacto na performance atlética indica que seu uso não implicaria riscos relacionados ao doping, tornando-o uma alternativa viável para aplicações clínicas. Estudos futuros devem aprofundar a investigação sobre sua formulação e biodisponibilidade, garantindo sua eficácia e segurança terapêutica.

**Palavra chave:** KPP, Hipertensão; Peptídeo bioativo; *Tityus serrulatus*; Desempenho físico

## **ABSTRACT**

The search for new therapeutic approaches against hypertension has encouraged the investigation of bioactive molecules, including peptides derived from animal toxins. In this context, this dissertation examines the effects of KPP, a synthetic tripeptide inspired by a toxin present in the venom of the scorpion *Tityus serrulatus*, on blood pressure and physical performance under different environmental conditions. To achieve this, experiments were conducted using normotensive and hypertensive murine models, as well as mice subjected to exercise protocols, allowing a comprehensive evaluation of KPP's influence on cardiovascular response and physical capacity.

The findings revealed that, in hypertensive rats (SHR), KPP significantly reduced mean arterial pressure (MAP) at both evaluated doses (33 and 330 µg/kg), while this effect was not significant in normotensive animals, demonstrating its antihypertensive but not hypotensive effect. KPP did not induce the same effect in females as observed in males; however, this discrepancy may be due to the smaller sample size used for female rats. In tests involving mice subjected to physical training, the peptide did not show a positive impact on muscle strength or aerobic endurance, reinforcing the absence of ergogenic properties associated with doping. Additionally, the results did not indicate significant inhibition of angiotensin-converting enzyme (ACE), suggesting that its hypotensive effect may occur through alternative pathways.

These findings position KPP as a promising candidate for the development of new antihypertensive therapies, particularly for physically active hypertensive individuals. The lack of impact on athletic performance indicates that its use would not pose doping-related risks, making it a viable alternative for clinical applications. Future studies should further investigate its formulation and bioavailability to ensure its therapeutic efficacy and safety.

**Keywords:** KPP; Hypertension; Bioactive peptides; *Tityus serrulatus*; Physical performance

## **LISTA DE ILUSTRAÇÕES**

FIGURA 1. TITYUS SERRULATUS FÊMEA NO ESTADO DA BAHIA (FOTO DE TIAGO J. PORTO).....	17
FIGURA 2. ÁRVORE DE CORRELAÇÃO FENÉTICA.. .....	18
FIGURA 3. O SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA EM CASCATA. ....	22
FIGURA 4. CASCATA DE FORMAÇÃO E DEGRADAÇÃO DAS CININAS.....	25
FIGURA 5. ESTRUTURA DO PEPTÍDEO KPP.....	32
FIGURA 6. REATIVIDADE VASCULAR.....	33
FIGURA 7. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO MÉTODO DE AVALIAÇÃO E DA CARACTERÍSTICA CELULAR NAS DIFERENTES FASES DO CICLO ESTRAL ATRAVÉS DE COLETA DO ESFREGAÇO VAGINAL .....	40
FIGURA 8. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO MÉTODO DE CANULAÇÃO DE VEIA E ARTÉRIA FEMORAL .....	41
FIGURA 9. PROTOCOLO DE MEDIDA DE PA NO SISTEMA DE AQUISIÇÃO DE DADOS (BIOPAC SYSTEM), EM ANIMAIS CONSCIENTES. ....	42
FIGURA 10. ILUSTRAÇÃO REPRESENTATIVA DA ESTEIRA UTILIZADA NO PROTOCOLO DE FAMILIARIZAÇÃO À CORRIDA E TESTE DE CARGA INCREMENTAL.....	46
FIGURA 11. ESPECTROS DE MASSA OBTIDOS UTILIZANDO UM INSTRUMENTO DO TIPO MALDI-TOF MS .....	48
FIGURA 12. EFEITO DO KPP SOBRE A ATIVIDADE DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA (ECA).....	48
FIGURA 13. PAS BASAL EM DIFERENTES FASES DO CE.....	50
FIGURA 14. EFEITO DO PEPTÍDEO KPP SOBRE A PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA (PAM) EM RATOS MACHOS HIPERTENSOS (SHR) E NORMOTENSOS (WISTAR).....	51
FIGURA 15. EFEITO DO PEPTÍDEO KPP SOBRE A PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA (PAM) EM RATAS HIPERTENSAS (SHR) E NORMOTENSAS (WISTAR).....	53
FIGURA 16. ALTERAÇÕES TERMORREGULATÓRIAS INDUZIDAS PELOS TRATAMENTOS AO LONGO DO TEMPO. ....	54
FIGURA 17. ANÁLISE DA FORÇA MUSCULAR EM RESPOSTA AOS TRATAMENTOS. ....	56
FIGURA 18. VARIAÇÕES DE TEMPERATURA CORPORAL EM AMBIENTES TEMPERADO E QUENTE E EFEITOS DOS TRATAMENTOS. ....	58
FIGURA 19. IMPACTO DOS TRATAMENTOS E DA TEMPERATURA AMBIENTE NO DESEMPENHO FÍSICO. ....	59

## **LISTA DE TABELAS**

TABELA 1. CLASSIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE PRESSÃO ARTERIAL SEGUNDO PARÂMETROS CLÍNICOS.....	28
TABELA 2. SEQUÊNCIA PRIMÁRIA DE PEPTÍDEOS ISOLADOS DA PEÇONHA DO ESCORPIÃO TITYUS SERRULATUS E PERTENCENTES À FAMÍLIA DENOMINADA HIPOTENSINAS.....	31
TABELA 3. GRUPOS EXPERIMENTAIS UTILIZADOS PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE PRESSORA DO PEPTÍDEO KPP	39
TABELA 4. GRUPOS EXPERIMENTAIS UTILIZADOS PARA AVALIAÇÃO DOS TRATAMENTOS POR GAVAGEM. ....	43
TABELA 5. PROTOCOLO DE FAMILIARIZAÇÃO PLANEJADO PARA ENSINAR O CAMUNDONGO A CORRER NA ESTEIRA ROLANTE.....	45

## **LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS**

AKT – Proteína Cinase B  
AMPc – Monofosfato de Adenosina Cíclico  
ANG I – Angiotensina I  
ANG II – Angiotensina II  
ANG-(1-7) – Angiotensina (1-7)  
ANG-(1-7)-CD – Angiotensina (1-7)-Ciclodextrina  
AVC – Acidente Vascular Cerebral  
B1 – Receptor de Bradicinina do tipo 1  
B2 – Receptor de Bradicinina do tipo 2  
BK – Bradicinina  
BPPs – Peptídeos Potencializadores de Bradicinina  
Ca<sup>2+</sup> – Cálcio  
Cl<sup>-</sup> – Cloro  
COI – Comitê Olímpico Internacional  
Da – Daltons  
DCVs – Doenças Cardiovasculares  
ECA – Enzima Conversora de Angiotensina  
ECA2 – Enzima Conversora de Angiotensina II  
eNOS – Óxido Nítrico Sintase Endotelial  
EROs – Espécies Reativas de Oxigênio  
HA – Hipertensão Arterial  
HAS – Hipertensão Arterial Sistêmica  
HPβ-CD – Hidroxipropil-Beta-Ciclodextrina  
IAM – Infarto Agudo do Miocárdio  
KD – Calidina  
K<sup>+</sup> – Potássio  
KPP – Tripeptídeo Lys-Pro-Pro  
L-NAME – Nω-Nitro-L-Arginina Metil Éster  
LDH – Lactato Desidrogenase  
MALDI – Dessorção/Ionização a Laser Assistida por Matriz  
MAS – Receptor associado a MAS  
NEP – Neprilisina

NO – Óxido Nítrico

OMS – Organização Mundial de Saúde

Q – Quente

SCC – Sistema Calicreína-Cinina

SHI – Sociedade Internacional de Hipertensão

SINAN – Sistema de Informação de Agravos de Notificação

sECA – ECA Somática

SRA – Sistema Renina Angiotensina

T – Temperado

tECA – ECA Testicular

TCI – Teste de Carga Incremental

TGI – Trato Gastrointestinal

TNF- $\alpha$  – Fator de Necrose Tumoral  $\alpha$

TOF – Tempo de Voo

VEGF – Fator de Crescimento Endotelial V

WADA – Agência Mundial Antidoping

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>16</b>
1.1    BIOLOGIA DO ESCORPIÃO <i>TITYUS SERRULATUS</i>	16
1.2    PEÇONHA DE ESCORPIÃO: UMA FONTE RICA DE BIOMOLÉCULAS COM POTENCIAL APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA	18
1.3    O SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA (SRA)	21
1.4    O SISTEMA CALICREÍNA-CININA	24
1.5    A ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA (ECA)	26
1.6    HIPERTENSÃO ARTERIAL	27
1.7    PEPTÍDEOS POTENCIADORES DE BRADICININA (PPB)	30
1.7.1 <i>Hipotensinas: Estrutura e atividade biológica</i>	30
1.7.2 <i>O peptídeo KPP</i>	31
1.8    IMPORTÂNCIA DO DESENVOLVIMENTO DE NOVOS FÁRMACOS	33
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>36</b>
2.1    OBJETIVOS GERAIS	36
2.2    OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>37</b>
3.1    EXPERIMENTOS IN VITRO.	37
3.1.1. <i>Avaliação qualitativa do peptídeo sintético por espectrometria de massa</i>	37
3.1.2. <i>Ensaio de atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA)</i>	37
3.2    EXPERIMENTO IN VIVO	38
3.2.1 <i>Experimentos com ratas e ratos</i>	38
3.2.2. <i>Experimentos com camundongos machos</i>	42
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>47</b>
4.1    RESULTADOS IN VITRO	47
4.1.1. <i>Análise qualitativa do peptídeo sintético KPP purificado por espectrometria de massa</i>	47
4.1.2. <i>Ensaio da Atividade da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA)</i>	48
4.2    RESULTADOS IN VIVO	49
4.2.1. <i>Resultados dos animais murinos</i>	49
4.2.2. <i>Resultados dos animais camundongos</i>	54

<b>5. DISCUSSÃO</b>	<b>60</b>
<b>6. CONCLUSÕES</b>	<b>64</b>
<b>7. LIMITAÇÕES DO TRABALHO E PERSPECTIVAS</b>	<b>65</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>66</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Biologia do escorpião *Tityus serrulatus*

Os escorpiões são artrópodes pertencentes à classe *Arachnida*, subfilo *Chelicerata* e ordem *Scorpiones*, que incluem cerca de 1.500 espécies distribuídas em diversas regiões do mundo, principalmente em áreas tropicais e subtropicais, mas apenas uma fração é considerada perigosa para os humanos (Oliveira *et al.*, 2018; Lourenço, 2022). Os escorpiões existem há mais de 400 milhões de anos, datando do período Carbonífero, sendo, portanto, considerados os mais antigos aracnídeos conhecidos (Cruz, 1994; Bortoluzzi, Querol & Querol, 2007; Fuzita *et al.*, 2015). O escorpionismo é o quadro clínico de envenenamento provocado pela picada de um escorpião e pode ser classificado como um problema de saúde pública (Dias *et al.*, 2024; Oliveira *et al.*, 2024). No território brasileiro, podemos identificar somente quatro famílias de escorpiões: *Bothriidae*, *Buthidae*, *Chactidae* e *Ischnuridae*. O *Tityus serrulatus* (Lutz & Mello, 1922) pertencente à família *Buthidae*, é uma das espécies de escorpiões mais notórias e amplamente distribuídas não só no Brasil, mas em toda a América do Sul, com exceção do Chile e da região sul da Argentina (Lourenço, 2022). Esta espécie foi descrita há mais de um século, e foi identificada inicialmente em Belo Horizonte, Minas Gerais (Lourenço, 2022).

O escorpião *T. serrulatus*, comumente conhecido como escorpião amarelo, é endêmico do Brasil, com registros de sua presença em diversas regiões, incluindo os estados de Minas Gerais, São Paulo, Goiás e Distrito Federal, bem como nas áreas urbanas (Lourenço, 2015; Kalapothakis *et al.*, 2021). A reprodução partenogenética, que é a capacidade de reproduzir-se sem fertilização e sem um coparental (Costa *et al.*, 2020), foi descoberta por Matthiensen em 1962, como sendo o método de reprodução utilizado por esta espécie, sendo uma das principais razões da sua rápida expansão geográfica, uma vez que um único escorpião pode fundar uma nova colônia num novo local sem a necessidade de um parceiro sexual. Além disso, indivíduos da espécie *T. serrulatus* podem sobreviver com restrição alimentar, apenas consumindo água, por até 400 dias (Pimenta *et al.*, 2019; Kalapothakis *et al.*, 2021). Tais fatores são decisivos no seu sucesso adaptativo, se estabelecendo e proliferando em áreas urbanas e periurbanas, incluindo cemitérios e redes de esgotos (Lourenço & Cloudsley-Thompson, 1999).

Acredita-se, também, que essa espécie represente uma variação de padrão confluyente dentro do complexo *Tityus stigmurus*, marcada pela fusão das manchas dorsais em um arranjo contínuo. Esse padrão morfológico foi identificado em populações nas proximidades de Belo Horizonte, Minas Gerais, durante o período de construção da capital no final do século XIX. Com as rápidas mudanças ambientais e o aumento da pressão seletiva, a subpopulação que se reproduz por partenogênese e se diferenciou em *T. serrulatus*, pode ter conseguido se adaptar e prosperar mais facilmente nesse novo ambiente em comparação à população que se reproduz sexualmente (*T. stigmurus*).

O escorpião *T. serrulatus* (Fig. 1), também chamado de escorpião amarelo, possui uma morfologia distinta, caracterizada por um corpo segmentado, pinças (pedipalpos) e um órgão de injeção de peçonha localizado na cauda. Eles têm entre 55 e 70 mm de comprimento e apresentam coloração amarela com manchas escuras nos tergitos. Seu metasoma apresenta características específicas, que justificam o nome "*serrulatus*", referência à reentrância formada por seleções modificadas de pinças (Lourenço, 2015).



Figura 1. *Tityus serrulatus* fêmea no estado da Bahia (foto de Tiago J. Porto).

Nascimento e colaboradores (2006) conduziram uma investigação comparativa dos compostos moleculares presentes na peçonha das três principais espécies do gênero *Tityus* no Brasil: *T. serrulatus*, *T. bahiensis* e *T. stigmurus*, além de espécies do gênero *Leiurus*, não encontradas nas Américas. O objetivo era estabelecer uma relação filogenética fundamentada nas características físico-químicas desses compostos. Os achados desse estudo apoiaram as classificações taxonômicas

tradicionais, identificando *T. serrulatus* como uma morfoespécie de *T. stigmurus* (Fig. 2).

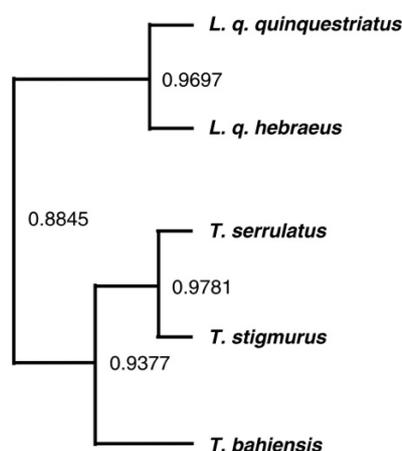


Figura 2. Árvore de correlação fenética de *T. bahiensis*, *T. stigmurus*, *T. serrulatus*, *L. q. hebraeus* e *L. q. quinquestriatus*. A árvore foi gerada utilizando o método de agrupamento hierárquico com o software Cluster. Os números nos indicam os coeficientes de correlação entre os grupos. Fonte: Adaptado de Ward et al. (2006). Disponível em: doi:10.1016/j.toxicon.2006.01.015.

Por fim, *T. serrulatus* é uma das principais causas de acidentes escorpiônicos no Brasil. O número de ocorrências aumentou significativamente nos últimos anos, com mais de 180.000 casos notificados anualmente, sendo esta espécie responsável pela maioria dos incidentes graves e fatais (Pimenta *et al.*, 2019; Oliveira *et al.*, 2024).

## 1.2 Peçonha de escorpião: Uma fonte rica de biomoléculas com potencial aplicação biotecnológica

Peçonhas de origem animal são misturas complexas de moléculas, principalmente proteínas e peptídeos, que são capazes de induzir respostas farmacológicas e imunológicas em seus alvos.

Conforme o boletim epidemiológico de 2023 da Secretaria de Vigilância em Saúde, do Ministério da Saúde do Brasil, os escorpiões são os animais responsáveis pelo maior número de casos de envenenamento registrados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan) desde 2004. Entre 2009 e 2019, o número de notificações de acidentes envolvendo escorpiões aumentou aproximadamente 150%. Estima-se que mais de 183.000 casos de acidentes com escorpiões ocorram anualmente no Brasil, com Minas Gerais sendo o segundo estado com o maior número de incidentes, registrando aproximadamente 20% dos acidentes

do país, onde a espécie *T. serrulatus* prevalece como a principal causadora de envenenamentos (Pimenta *et al.*, 2019).

A grande variedade de peptídeos presentes na peçonha do escorpião se manifesta pela existência de cerca de 400 polipeptídeos, com ou sem ligações dissulfeto. Peptídeos com ligações dissulfeto desempenham diferentes funções farmacológicas, afetando uma grande variedade de canais iônicos. Em contraste, os peptídeos sem ligações dissulfeto pertencem a uma subfamília composta por peptídeos com uma baixa homologia de sequência e que desempenham diversas funções, como potencialização do efeito hipotensor do hormônio bradicinina, ação antimicrobiana e regulação imunológica (Zhijian *et al.*, 2006).

A peçonha do escorpião *T. serrulatus* inclui neurotoxinas com ligações dissulfeto que afetam canais de sódio e potássio, além de outras moléculas com funções antimicrobianas, anti-hipertensivas e moduladoras do sistema imunológico, esses últimos peptídeos lineares (sem ligações dissulfeto) (Zhijian *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2018; Dias *et al.*, 2024). Essas toxinas, especialmente as neurotoxinas, são responsáveis pelos sintomas graves de envenenamento, que podem incluir dor local intensa, sudorese, taquicardia e, em casos graves, edema pulmonar e falência múltipla de órgãos (Oliveira *et al.*, 2018; Pimenta *et al.*, 2019).

Nas últimas décadas, além das preocupações clínicas, as peçonhas de escorpião têm despertado interesse na pesquisa científica devido ao seu potencial terapêutico. Componentes isolados da peçonha podem apresentar propriedades analgésicas e antitumorais, sugerindo que essas peçonhas podem ser uma fonte valiosa para o desenvolvimento de novos fármacos (Srinivasan *et al.*, 2002; Kalapothakis *et al.*, 2021). O conhecimento sobre as toxinas da peçonha não só contribui para a compreensão de processos biológicos e patológicos, mas também abre novas possibilidades na medicina, como o desenvolvimento de medicamentos mais eficazes e específicos (Pimenta *et al.*, 2003; Rates *et al.*, 2008). Além disso, Pimenta & De Lima (2005), afirmaram que há um vasto repertório de moléculas na peçonha do escorpião que possuem alvos específicos, como os canais iônicos em tecidos excitáveis e os sistemas cardiovascular e respiratório (Pimenta & De Lima, 2005).

Acredita-se que cada espécie de escorpião possua entre 50 e 100 toxinas polipeptídicas, resultando em uma estimativa de aproximadamente 100.000 peptídeos

potenciais nas peçonhas de todas as espécies (Srinivasan *et al.*, 2002). No entanto, apenas cerca de 400 desses peptídeos foram descritos até o momento, representando menos de 0,4% do total (Zuo & Ju, 2004; Veja & Possani, 2005; Zhijian *et al.*, 2006; Dias *et al.*, 2024).

Nascimento e colaboradores (2006) realizaram estudos proteômicos sobre a peçonha de *Tityus serrulatus* e determinaram a presença de centenas de peptídeos e proteínas nessa peçonha. As pesquisas descreveram uma peçonha mais complexa do que a encontrada em outros gêneros de escorpiões, como é o caso de *Leiurus*, o que sugere uma maior diversidade molecular dentro do mesmo gênero *Tityus*. As toxinas presentes nas peçonhas de escorpiões podem ser classificadas em várias famílias, com base em diferentes critérios. Por exemplo, há a distinção entre toxinas de cadeias longas ou curtas, que considera o tamanho da estrutura primária, e a separação entre toxinas ativas em mamíferos, insetos e crustáceas, que se relaciona com sua atividade em diferentes grupos animais. Além disso, essas toxinas podem ser categorizadas em neurotoxinas e citotoxinas, levando em conta seu mecanismo de ação, e ainda em toxinas com e sem pontes dissulfeto, como já mencionado nesta dissertação (Zhijian *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2018; Dias *et al.*, 2024).

Algumas toxinas foram especificamente caracterizadas como neurotoxinas e citotoxinas que atuam em canais iônicos. As toxinas de cadeia longa, por exemplo, afetam os canais de sódio ( $\text{Na}^+$ ) dependentes de voltagem e contêm entre 60 e 70 resíduos de aminoácidos, estabilizadas por quatro pontes dissulfeto. Essas toxinas são subdivididas em toxinas  $\alpha$  e  $\beta$ , que se ligam aos sítios de receptores 3 e 4 dos canais de sódio, respectivamente, impactando assim a excitabilidade celular.

As toxinas direcionadas aos canais de potássio ( $\text{K}^+$ ) são um pouco menores, geralmente com cerca de 40 a 45 resíduos de aminoácidos. Elas também incluem pontes dissulfeto e frequentemente atuam bloqueando canais de potássio em células excitáveis, linfócitos e eritrócitos. (Oliveira *et al.*, 2024). O envolvimento de toxinas que atuam em canais de cloro ( $\text{Cl}^-$ ) e cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) também foi relatado (Kalapothaskis *et al.*, 2021). Este último grupo parece ser mais relevante, especialmente por suas ações intracelulares nos canais de cálcio; por exemplo, a toxina Maurocalcina foi isolada da peçonha do escorpião *Scorpio maurus palmatus*, que ativa os canais de cálcio do tipo RyR (Zhijian *et al.*, 2006).

Na década de 2000, foi demonstrado que a peçonha de *T. serrulatus* contém

peptídeos desprovidos de pontes dissulfeto. Esses peptídeos apresentam tamanhos variados, com 13 a 50 resíduos, e baixa similaridade entre si. Segundo Verano-Braga e colaboradores (2010), moléculas como TsHpt-I (conhecido atualmente como Ts14) e o Peptídeo T, isolados da peçonha de *T. serrulatus*, apresentam uma gama de atividades biológicas, incluindo efeitos antimicrobianos e imunomoduladores, além de potencialização da bradicinina (Pucca *et al.*, 2016). Esses peptídeos bioativos atuam em sistemas celulares por meio de interações que levam à sinalização e à modulação das respostas imunológicas, prometendo ser candidatos importantes no desenvolvimento de novos agentes terapêuticos (Pimenta & De Lima 2005).

Como as Hipotensinas são foco deste trabalho, existe um tópico adiante dedicado a sua introdução.

### **1.3 O sistema renina-angiotensina (SRA)**

A descoberta do sistema renina-angiotensina (SRA) iniciou-se em 1898 com os estudos de Tigerstedt & Bergman, que relataram o efeito pressor de extratos renais e denominaram a substância como renina (Tigerstedt & Bergman, 1898). Segundo Paul, Poyan Mehr & Kreutz (2006), a descrição clássica do SRA é de que se trata de um complexo sistema endócrino peptídico que desempenha um papel crucial na regulação da pressão arterial, equilíbrio dos fluidos e eletrólitos e em outras funções fisiológicas e patológicas, incluindo ações cardiovasculares, metabólicas e musculares. O angiotensinogênio, produzido e liberado pelo fígado (Deschepper, 1994), é clivado na circulação pela renina, uma enzima liberada pelos rins no aparelho justaglomerular, para formar o decapeptídeo angiotensina I (Ang I) (Hanna *et al.*, 2002; Persson, Skalweit & Thiele, 2004). A enzima conversora de angiotensina (ECA), uma metaloproteinase associada à membrana, converte a Ang I no octapeptídeo Ang II. A ECA apresenta uma expressão constitutiva elevada na superfície das células endoteliais dos vasos sanguíneos, especialmente nos pulmões. A Ang II interage com receptores específicos, como o receptor AT1R, desencadeando respostas como vasoconstrição nas células musculares lisas dos vasos sanguíneos e aumento da liberação de aldosterona pelo córtex adrenal (Reid, Morris & Ganong, 1978; Wollert & Drexler, 1999; Santos, Campagnole-Santos & Andrade, 2000).

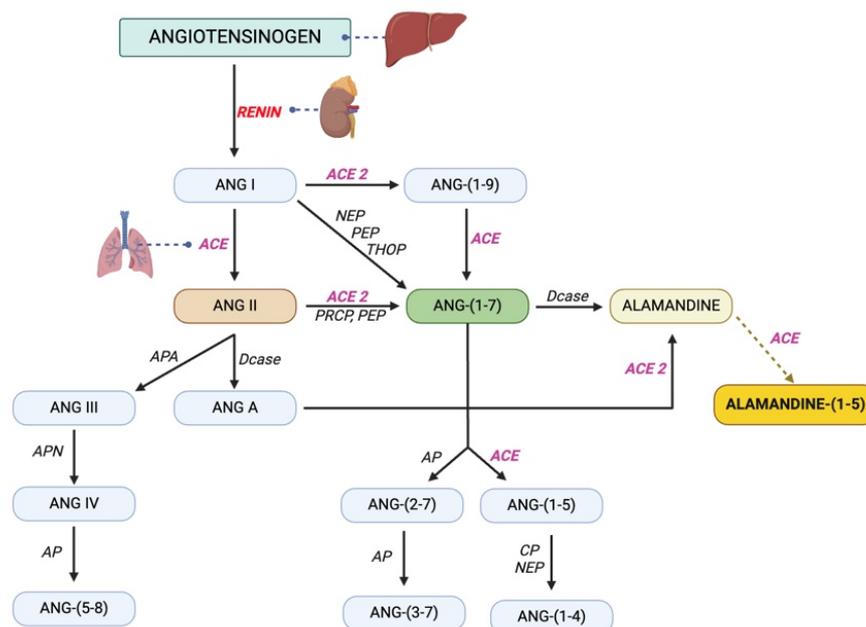


Figura 3. O sistema renina-angiotensina em cascata: visão atualizada. ACE, enzima conversora de angiotensina; ACE2, enzima conversora de angiotensina 2; APA, aminopeptidase A; APN, aminopeptidase N; PRCP, prolil endopeptidase; PCP, prolilcarboxi-endopeptidase; NEP, endopeptidase neutra; PEP, prolil endopeptidase; CP, carboxipeptidase; AP, aminopeptidase; Dcase, descarboxilase; THOP, oligopeptidase tima.

Recentemente, a compreensão do SRA expandiu-se para além do eixo clássico ECA/Ang II/AT1R, abrangendo um eixo alternativo envolvendo o heptapeptídeo Ang-(1-7), identificado como agonista endógeno do receptor Mas (Santos et al., 2003). Esse eixo alternativo apresenta efeitos antagônicos ao eixo clássico, promovendo ações vasodilatadoras, anti-inflamatórias e antifibróticas, além de ser cardioprotetor (Santos et al., 2018; Becker et al., 2019; Santos et al., 2019).

Em condições patológicas, como hipertensão arterial sistêmica (HAS) e insuficiência cardíaca, a ativação excessiva do eixo clássico contribui para remodelamento cardíaco, disfunção endotelial e danos cardiovasculares, enquanto o eixo alternativo atua de forma protetora, promovendo aumento na biodisponibilidade de óxido nítrico (NO), inibição de processos fibróticos e sensibilização à insulina (Marques et al., 2011; Sabharwal et al., 2014; Moura et al., 2021). A descoberta desse eixo revelou novos alvos terapêuticos para o tratamento de doenças cardiovasculares, hipertensão, insuficiência cardíaca e complicações metabólicas, como a resistência à insulina (Wu et al., 2018).

Além dessas propriedades cardioprotetoras, outro papel importante do sistema SRA está no metabolismo e no controle da massa muscular. A Ang-(1-7) atua no

receptor MAS para estimular a captação de glicose em resposta à insulina e prevenir a perda muscular frente a estímulos como o estresse oxidativo e a resistência à insulina. O SRA também influencia o músculo esquelético devido à regulação do tônus vascular e da microvasculatura. Evidências de estudos *in vitro* e *in vivo* sugerem que a Ang-(1-7) aumenta a sensibilidade à insulina e promove a captação de glicose nos músculos esqueléticos por meio da ativação do receptor MAS e do aumento da biodisponibilidade de óxido nítrico, facilitando a perfusão muscular e a entrega de insulina ao tecido.

Além disso, estudos em modelos animais demonstram que a administração de Ang-(1-7) durante exercícios intensos preserva a integridade muscular e reduz o aumento de biomarcadores de dano muscular, como lactato desidrogenase (LDH) e alfa-actinina, sugerindo um efeito protetor durante atividades de alta intensidade (Becker et al., 2019; Santos et al., 2018). Esse efeito protetor tem sido investigado em condições como distrofias musculares e durante exercícios intensos, com destaque para a formulação encapsulada de Ang-(1-7), que tem demonstrado atenuar danos musculares e melhorar a recuperação funcional, indicando seu potencial uso terapêutico para preservar a função muscular e prevenir atrofia em condições patológicas (Fu et al., 2014; Becker et al., 2019).

A Ang-(1-7) também possui propriedades vasodilatadoras, via aumento da produção de NO pela ativação da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), o que contribui para a regulação do tônus vascular e exerce ações cardioprotetoras, especialmente em modelos de infarto do miocárdio e insuficiência cardíaca (Fu *et al.*, 2014). A utilização de Ang-(1-7) na forma de complexos de inclusão, como a ciclodextrina, HP $\beta$ -CD/Ang-(1-7), mostrou-se eficaz em melhorar a biodisponibilidade do composto após administração oral, potencializando os seus efeitos terapêuticos, com redução de áreas infartadas e atenuação do remodelamento cardíaco (Marques *et al.*, 2011). O eixo alternativo do SRA, portanto, revela-se essencial não só na proteção cardiovascular, mas também na manutenção da saúde muscular e no tratamento de condições metabólicas e patológicas.

Assim, o SRA deve ser visto como um sistema dinâmico que contribui para a regulação da pressão arterial e do equilíbrio hidroeletrólítico, mas que também atua em diversos processos fisiológicos em tecidos, como o coração, os vasos sanguíneos e os músculos esqueléticos. Essa dualidade de ação nos níveis dos eixos clássico e

alternativo do SRA abre novos horizontes para intervenções terapêuticas, destacando o papel de componentes como a Ang-(1-7) e o seu receptor MAS na modulação dos efeitos negativos da Ang II e na indução de respostas benéficas em condições cardiovasculares e metabólicas (Reid, Morris & Ganong, 1978; Marques *et al.*, 2011; Santos, Campagnole-Santos & Andrade, 2000; Santos *et al.*, 2019).

#### **1.4 O sistema calicreína-cinina**

O sistema calicreína-cinina (SCC) é um sistema endócrino complexo envolvido em diversos processos fisiológicos e patológicos, desempenhando papéis essenciais na regulação da pressão arterial, na resposta inflamatória e na função renal (Goto *et al.*, 1995; Campbell, 2000, Duka *et al.*, 2006). Sua descoberta aconteceu em 1909, quando Abelous & Badier identificaram uma substância na urina humana que, ao ser administrada intravenosamente em cães anestesiados, causava uma redução significativa da pressão arterial. Desde então, a compreensão do SCC evoluiu com importantes marcos científicos (Colman & Schmaier, 1997, Hillmeister & Persson, 2012).

Em 1928, Kraut e colaboradores avançaram o conhecimento ao identificar que a substância vasodilatadora e hipotensora presente na urina era, de fato, um composto enzimático. Posteriormente, essa proteína ativa foi nomeada calicreína (Bhoola, Figueroa & Worthy 1992). Werle & Berek (1948), demonstraram que a calicreína atuava sobre um precursor inativo, liberando uma substância capaz de causar contração do íleo em cobaias e induzir hipotensão. Essa substância foi chamada de calidina (KD, sigla do nome em inglês *kallidin*). Em um marco subsequente, Rocha & Silva e colaboradores, em 1949, isolaram uma molécula semelhante, que denominaram bradicinina (BK, sigla do nome em inglês *bradykinin*), destacada por sua ação lenta em induzir contrações musculares (Rocha e Silva *et al.*, 1949, Bhoola *et al.*, 1992).

A BK e a KD são peptídeos vasoativos derivados da hidrólise dos cininogênios pelas calicreínas. Existem dois tipos de calicreínas, a plasmática e a tecidual. A calicreína plasmática é formada a partir da pré-calicreína pela ação do fator XII ativado, enquanto a calicreína tecidual é expressa em vários órgãos, como rins, testículos e glândulas salivares (Fig. 4) (Marceau *et al.*, 1997, Baxter & Ebrahim, 2002). Essas enzimas clivam o cininogênio de alta massa molecular no plasma para liberar a BK;

nos tecidos, a caliceína age sobre o cininogênio de baixa massa molecular para liberar a KD (Bhoola, Figueroa & Worthy, 1992; Kaplan, Meier & Mandle, 2008; Pesquero & Bader, 2006).

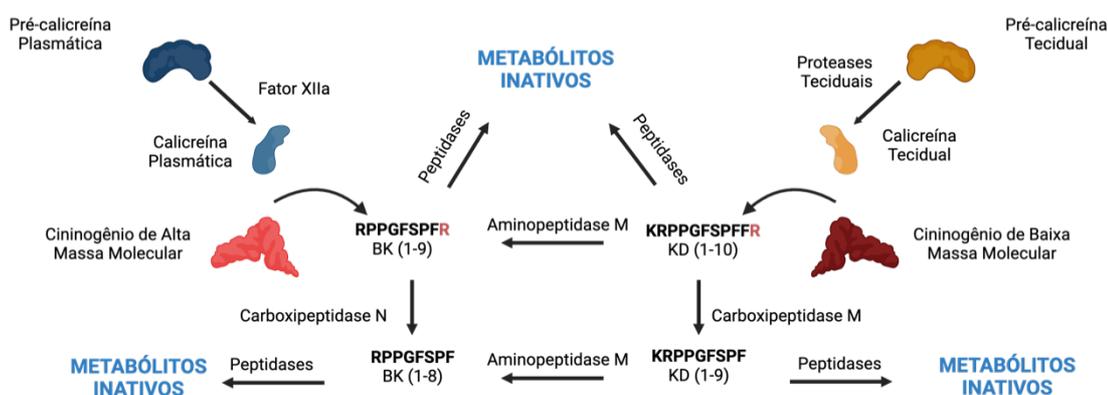


Figura 4. Cascata de formação e degradação das cininas (Adaptado de Silva, 2020)

Existem dois receptores principais para as cininas: B1 e B2. O receptor B2 é expresso de forma constitutiva e responde preferencialmente à BK e KD, enquanto o receptor B1 é induzido por inflamação ou injúria tecidual e tem afinidade por formas modificadas de BK e KD, respectivamente a des-Arg9-BK e a des-Arg10-KD (Regoli & Barabe, 1980; Qadri & Bader, 2013). A ativação desses receptores resulta em diferentes vias de sinalização celular, sendo a produção de NO e o aumento de cálcio intracelular processos centrais que desencadeiam respostas inflamatórias e efeitos cardiovasculares (Blaukat, 2003).

O SCC está diretamente envolvido em processos como a regulação da pressão arterial, inflamação e, em alguns casos, cardioproteção. A BK é um potente vasodilatador que age relaxando o músculo liso vascular para reduzir a pressão arterial, por meio da ligação direta aos receptores B2 em várias partes do corpo, incluindo vasos sanguíneos, cérebro e coração (Hess *et al.*, 1992; Menke *et al.*, 1994). Essa ativação leva à produção de NO e outras moléculas, como prostaglandinas, com efeitos como vasodilatação e proteção contra lesão isquêmica (Blaukat, 2003).

Além da regulação cardiovascular, o SCC está envolvido em respostas inflamatórias e nociceptivas. As cininas são liberadas em tecidos inflamados, promovendo dor, rubor, calor e edema (Campbell, 2000; Pesquero & Bader, 2006). Esses efeitos são mediados principalmente pela ação de prostaglandinas liberadas a

partir de vias de sinalização desencadeadas pela ativação dos receptores de cininas (Marceau *et al.*, 1997). Estudos demonstram que o SCC também possui um papel na proteção tecidual durante condições de estresse, como mostrado por Dong *et al.* (2013), onde a administração de BK reduziu o dano celular em cardiomiócitos de ratos expostos a agentes oxidativos.

O metabolismo das cininas é complexo e envolve diversas enzimas conhecidas como cininases. A ECA e a neprilisina (NEP) são exemplos de cininases que degradam rapidamente a BK no plasma, o que explica a curta meia-vida desses peptídeos no sistema circulatório (Qadri & Bader, 2018). A ação dessas enzimas não só regula a disponibilidade de cininas como também modula o equilíbrio entre vasodilatação e vasoconstrição, uma vez que a ECA também participa da conversão de Ang I em Ang II, esse último um potente agente vasoconstritor (Yang *et al.*, 1970; Bhoola *et al.*, 1992).

### **1.5 A enzima conversora de angiotensina (ECA)**

A enzima conversora de angiotensina (ECA) desempenha um papel central no sistema cardiovascular, sendo um ponto de convergência entre o SRA e o SCC. A ECA regula a pressão arterial ao converter Ang I em Ang II, que é um peptídeo com forte ação vasoconstritora. A Ang II exerce seus efeitos através dos receptores de angiotensina II do tipo 1 (AT1), presentes em vários tecidos, incluindo células glomerulares da adrenal, endotélio e músculo liso vascular. Nas células adrenais, a interação com AT1 estimula a síntese e a liberação de aldosterona, o que, por sua vez, aumenta a reabsorção de sódio e água nos rins, elevando indiretamente a pressão arterial. Nas células do músculo liso vascular, a Ang II causa vasoconstrição direta e estimula a liberação de norepinefrina, contribuindo ainda mais para a elevação da pressão arterial (Cotton *et al.*, 2002; Hayashi *et al.*, 2003; Brew, 2003; Fernandez *et al.*, 2004).

Além de promover a produção de Ang II, a ECA também degrada a BK [BK (1-9)], um peptídeo que, como mencionado, promove a vasodilatação ao se ligar aos receptores B2. Assim, a ECA induz um aumento da pressão arterial, tanto pela produção de Ang II quanto pela inativação da BK (Brew 2003).

A ECA é uma dipeptidil carboxipeptidase dependente de  $Zn^{2+}$ , existindo em duas formas principais derivadas de um único gene e geradas por meio de splicing

alternativo: ECA somática (sECA) e ECA testicular (tECA). A sECA é encontrada em células endoteliais, epiteliais e neuroepiteliais e possui dois domínios catalíticos, denominados N- e C-terminais. Embora ambos os domínios possam catalisar a hidrólise de substratos, o domínio C-terminal é particularmente crucial na regulação da pressão arterial devido ao seu papel na degradação de BK e na formação de Ang II. O domínio N-terminal, por outro lado, está ligado à degradação de um peptídeo específico, acetil-Ser-Asp-Lys-Pro (Ac-SDKP), que tem funções na regulação da proliferação e diferenciação de células-tronco hematopoiéticas (Cotton *et al.*, 2002; Hayashi *et al.*, 2003; Fernandez *et al.*, 2004).

Por outro lado, a tECA é expressa principalmente nos testículos e contém apenas um domínio catalítico semelhante ao domínio C-terminal da sECA. Ambas as formas são proteínas de membrana do tipo 1, ou seja, suas regiões N-terminais estão fora da célula, mas diferem na expressão tecidual e na estrutura dos domínios. A maior forma somática possui dois domínios metaloproteinases (domínios N- e C-terminais), cada um contendo um motivo de ligação canônico ao Zn<sup>2+</sup>: HExxH (His-Glu-x-x-His).

Dado o papel crucial da ECA na produção de Ang II e na regulação da pressão arterial, ela foi alvo de vários medicamentos, incluindo inibidores da ECA, amplamente utilizados no tratamento de hipertensão, insuficiência cardíaca e neuropatia diabética. No entanto, esses inibidores podem causar efeitos colaterais como tosse, náusea, vômito, cólicas abdominais e o aumento do risco de angioedema, uma condição rara, mas potencialmente grave (Leru *et al.*, 2021).

## 1.6 Hipertensão arterial

A hipertensão arterial (HA) é a doença crônica não transmissível com o maior índice de prevalência no mundo e é caracterizada por níveis elevados e persistentes de pressão arterial, comumente estabelecidos com valores  $\geq 140$  mmHg de pressão sistólica e/ou  $\geq 90$  mmHg de pressão diastólica (Hall *et al.*, 2012; Malta *et al.*, 2018; Malachias *et al.*, 2016; Mills, Stefanescu & He, 2020) (Tabela 1). Para se ter conhecimento da sua gravidade, um aumento de 3 a 4 mmHg na pressão arterial pode aumentar em 20% a mortalidade causada por acidente vascular cerebral (AVC) segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) e a Sociedade Internacional de Hipertensão (SHI), como mencionado por Jones & Hall (2007). Em 1990, estimava-se que 650 milhões de pessoas no mundo eram diagnosticadas com hipertensão arterial,

de acordo com a OMS. Estudos projetavam que esse número dobraria até 2025; no entanto, tal previsão já havia sido ultrapassada em 2019, atingindo cerca de 1,3 bilhão de indivíduos diagnosticados com HA. Além disso, projeções da OMS sugerem um aumento cada vez mais expressivo para as próximas décadas. Esse crescimento é atribuído ao envelhecimento populacional e à intensificação de fatores de risco ambientais e comportamentais (Ribeiro, Furtado & Pereira, 2013).

Tabela 1. Classificação dos Níveis de Pressão Arterial segundo parâmetros clínicos.

<b>Categoria</b>	<b>Pressão Arterial Sistólica (PAS)</b>	<b>Pressão Arterial Diastólica (PAD)</b>
<b>Normal</b>	≤ 120	≤ 80
<b>Pré-Hipertensão</b>	121 – 139	81 – 89
<b>Hipertensão Estágio 1</b>	140 – 159	90 – 99
<b>Hipertensão Estágio 2</b>	160 – 179	100 – 109
<b>Hipertensão Estágio 3</b>	≥ 180	≥ 110

A HA é considerada especialmente perigosa por ser, em grande parte dos casos, uma condição silenciosa, sem apresentar sintomas claros. Isso faz com que muitas vezes seu diagnóstico ocorra apenas em fases avançadas. De acordo com o estudo de Kearney *et al.*, (2005), é crucial que os órgãos de saúde priorizem ações de prevenção, detecção precoce, tratamento e controle da hipertensão, visando reduzir os riscos associados à doença.

A HA é um importante fator de risco para DCV e insuficiência renal crônica, desempenhando papel significativo no desenvolvimento de complicações graves, como AVC, infarto agudo do miocárdio (IAM) e doenças cardíacas (Mills, Stefanescu & He, 2020). Segundo Masson *et al.* (2014), 50% da população com HA não a tem controlada, mesmo com a utilização de medicamentos, quadro denominado hipertensão refratária. No entanto, apesar dos avanços terapêuticos, o controle da pressão arterial permanece insatisfatório para uma parte considerável dos pacientes, especialmente nos países em desenvolvimento (Campbell *et al.*, 2022). Além disso, comportamentos atuais como sedentarismo, excesso de ingestão de sódio e calorias,

tabagismo e privação de sono continuam inalterados (La Rovere *et al.*, 2002). A resistência ao tratamento e a falta de adesão a regimes medicamentosos contribuem para a carga global da doença, resultando em alto custo econômico e social para os sistemas de saúde (Hering *et al.*, 2017).

O estudo conduzido por Kearney *et al.* (2005) trouxe uma observação interessante sobre a incidência da HA, revelando que, apesar da distribuição relativamente igual entre os sexos, há variações geográficas na prevalência entre homens e mulheres. Em países da América Latina, por exemplo, a prevalência é maior entre homens, enquanto nas antigas economias socialistas observa-se um predomínio entre mulheres. Em termos de fatores de risco para o desenvolvimento e a progressão da HA, estes se dividem em não modificáveis e modificáveis. Entre os não modificáveis, destacam-se a predisposição genética e o envelhecimento. Já entre os modificáveis, incluem-se hábitos como o consumo excessivo de sódio, sedentarismo, tabagismo e o consumo elevado de álcool, todos potenciais alvos de intervenção para a redução dos índices de HA (Sun *et al.*, 2008; Oliveira *et al.*, 2021).

Em caráter fisiopatológico, o estresse oxidativo e a disfunção endotelial são elementos de progressão da HA. As espécies reativas de oxigênio (EROs) interagem com NO, diminuindo sua disponibilidade e prejudicando a vasodilatação, o que contribui para o aumento da resistência vascular periférica (Bai *et al.*, 2009). Além disso, a disfunção da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) é frequentemente observada em pacientes hipertensos, impactando a resposta vasodilatadora e promovendo a rigidez arterial (Sun *et al.*, 2008). O SRA participa diretamente no controle da pressão arterial e é fundamental para o aumento do tônus simpático e a modulação inflamatória associada à hipertensão (Agarwal *et al.*, 2011).

Compreender os fatores ambientais, sociais e fisiopatológicos da HA é essencial para desenvolver intervenções eficazes. A OMS recomenda estratégias preventivas, como a redução do consumo de sal e a promoção de atividade física regular, para minimizar o impacto da HA na saúde pública (Campbell *et al.*, 2022). Ademais, intervenções comportamentais, aliadas a terapias farmacológicas personalizadas, são fundamentais para a prevenção de complicações e para a redução do risco de eventos cardiovasculares graves (Barbosa *et al.*, 2008).

### 1.7 Peptídeos potenciadores de bradicinina (PPB)

Os peptídeos potencializadores de bradicinina (BPPs) são compostos de baixa massa molecular que amplificam a ação fisiológica da BK. Sua principal característica é a atividade hipotensora e a capacidade de contrair o músculo liso. Descritos inicialmente por Ferreira (1965), esses peptídeos foram identificados na peçonha das serpentes *Bothrops jararaca* e posteriormente em outras peçonhas de animais, como os de aranhas, escorpiões e até secreções de anfíbios. A descoberta dos PPBs levou a avanços expressivos em biotecnologia, como o desenvolvimento do primeiro inibidor comercial da ECA, o captopril, usado no tratamento da HA (Ferreira *et al.*, 1965; Ondetti *et al.*, 1977; Cushman *et al.*, 1979; Cushman & Ondetti, 1980; Cushman & Ondetti, 1991).

A maioria dos PPBs caracterizados atua inibindo a ECA, o que impede tanto a formação de Ang II quanto a degradação da BK, resultando em um efeito vasodilatador e anti-hipertensivo prolongado. Essa característica biológica se deve principalmente à estrutura molecular típica dos PPBs, geralmente apresentando um resíduo de ácido p-aminobenzoico na extremidade N-terminal e um dímero de prolina na extremidade C-terminal, juntamente com outros resíduos que podem influenciar suas propriedades farmacológicas (Erdős, 1990; Cummins & O'Connor, 1998).

Frente a crescente compreensão da diversidade estrutural e funcional dos PPBs, destaca seu potencial na pesquisa biomédica. Peptídeos de várias fontes revelam que, apesar das diferenças na estrutura primária, a presença do dímero Pro-Pro é essencial para suas atividades biológicas.

Assim, a pesquisa contínua de novos PPBs de diferentes origens pode contribuir para o desenvolvimento de novas terapias anti-hipertensivas e anti-inflamatórias baseadas nos mecanismos desses peptídeos (Ferreira *et al.*, 1993, 1996; lanzer *et al.*, 2004; Pimenta & De Lima, 2005; Camargo *et al.*, 2012; Jiang *et al.*, 2014).

#### 1.7.1 Hipotensinas: Estrutura e atividade biológica

As hipotensinas são peptídeos bioativos identificados na peçonha do escorpião *Tityus serrulatus* (Verano-Braga *et al.*, 2008). As hipotensinas apresentam uma sequência específica de 24 a 25 resíduos de aminoácidos, com massa molecular entre 2600 e 2800 Da, além de dois resíduos de prolina na região C-terminal, que contribui para sua atividade biológica (Tabela 2).

Tabela 2. Sequência primária de peptídeos isolados da peçonha do escorpião *Tityus serrulatus* e pertencentes à família denominada Hipotensinas. Os resíduos destacados em vermelho foram as diferenças entre as *Tityus serrulatus* Hipotensinas I a IV (Adaptado de Pimenta et al., 2001)

Nome	Estrutura Primária	MM* (Da)
TsHpt-I	AEIDFSGIPEDIIKQIKETNAKPPA	2723,44
TsHpt-II	AEIDFSGIPEDIIEIKETNAKPPA	2724,42
TsHpt-III	AEIDFSGIPEDIIKQIKETNAKPP_	2652,40
TsHpt-IV	AEIDFSGIPEDIIEIKETNAKPP_	2653,38

Diferentemente dos PPBs clássicos, que atuam principalmente como inibidores da ECA, o peptídeo TsHpt-I não inibe a ECA, mas atua como um agonista do receptor B2 da BK, promovendo uma série de respostas cardiovasculares de interesse terapêutico, como vasodilatação por induzir o aumento de produção de NO (Verano-Braga *et al.*, 2008). Um resíduo de lisina hidrofílico e carregado positivamente, antecedendo os dois resíduos de prolina C-terminas (Lys-Pro-Pro), na estrutura primária do TsHpt-I, é parcialmente responsável por seu efeito hipotensor, diferenciando-o estruturalmente dos PPBs de serpentes, que frequentemente contêm um resíduo hidrofóbico de isoleucina antes do dímero de Prolina (Ile-Pro-Pro) (Verano-Braga *et al.*, 2008).

### 1.7.2 O peptídeo KPP

Dentro do espectro das hipotensinas, segundo Verano-Braga e colaboradores (2008), após um estudo sobre mimetização estrutural do peptídeo TsHpt-I (AEIDFSGIPEDIIEIKETNAKPPA), patente número BR0202157A, isolado da peçonha de escorpião *T. serrulatus*, o tripeptídeo KPP (Lys-Pro-Pro) (Fig. 5) emerge como um fragmento peptídico de interesse particular e alvo central desse trabalho. Classificado como um peptídeo críptico; peptídeos biologicamente ativos formados após a proteólise de precursores nativos presentes em peçonhas de animais; retém a capacidade de atuar sobre o sistema cardiovascular de maneira independente e funcional (Gómez-Mendoza *et al.*, 2020). Estudos demonstram que o KPP se liga e ativa o receptor de bradicinina B2 (B2R), resultando em uma série de efeitos biológicos que incluem a vasodilatação, a redução transitória da PA, além de outros

mecanismos intracelulares, como modulação de vias associadas à apoptose e ao metabolismo celular. Essa ação hipotensora depende de um mecanismo endotelial mediado por NO, conforme apresentam os estudos farmacológicos. Este peptídeo induziu vasorrelaxamento, em experimentos com anéis de aorta, o que foi significativamente reduzido na presença de L-NAME, um inibidor da síntese de NO, indicando que o efeito vasodilatador desse peptídeo está intimamente relacionado à produção de NO (Fig. 6) (Verano-Braga *et al.*, 2008; Verano-Braga *et al.*, 2010).

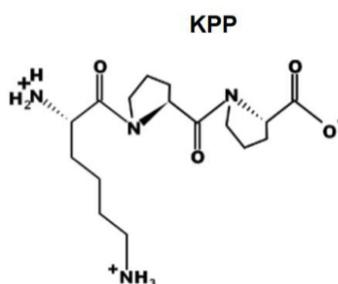


Figura 5. Estrutura do peptídeo KPP (Adaptado de Oliveira, 2019)

O KPP ativa a via de sinalização da AKT e induz a fosforilação de sua principal proteína efetora, a sintase de óxido nítrico (eNOS), resultando na produção de NO, um fator chave para a vasodilatação dependente do endotélio. Além disso, o peptídeo promove a desfosforilação da fosfolamban (PLN) nos cardiomiócitos, reduzindo a contratilidade celular. Isso sugere um potencial papel cardioprotetor do KPP, especialmente em situações de sobrecarga cardíaca (Gómez-Mendoza *et al.*, 2020).

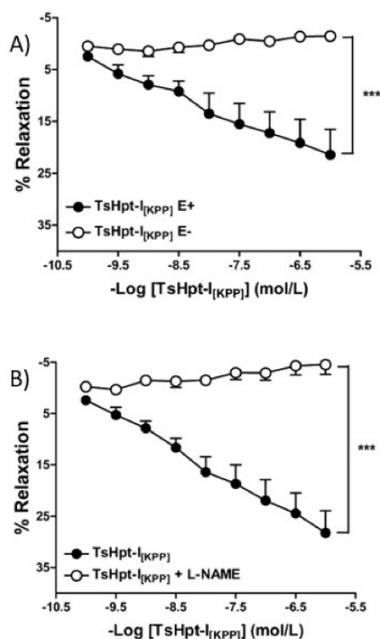


Figura 6. Reatividade Vascular. A) KPP incubado em preparação de anel de aorta de rato com endotélio (E+) e sem endotélio funcional (E-). B) KPP pré-incubado com o L-NAME, inibidor da enzima NOS. (Verano-Braga et al., 2010)

Outro aspecto relevante do mecanismo de ação do KPP envolve o resíduo de lisina (Lys). A carga positiva na cadeia lateral desse resíduo é crucial para a sua interação com o receptor B2. Estudos de modificações estruturais, como a acetilação da cadeia lateral, visando neutralizar a sua carga positiva (acKPP), mostraram que a ausência dessa carga positiva leva à perda da sua capacidade de ativar os receptores B2, ressaltando a importância desse resíduo para o desenvolvimento de análogos terapêuticos (Verano-Braga *et al.*, 2010).

A investigação dos efeitos moleculares e funcionais do KPP vai além do entendimento dos mecanismos das hipotensinas, ele também propõe este tripeptídeo como uma molécula modelo para o desenvolvimento de novos agentes cardiovasculares.

### 1.8 Importância do desenvolvimento de novos fármacos

O desenvolvimento de medicamentos inovadores a partir de biomoléculas ocupa um papel central na vanguarda da biofarmacêutica, graças à sua elevada especificidade, potência e diversidade estrutural. Essas moléculas, que frequentemente têm como origem fontes naturais, como organismos marinhos,

plantas, microrganismos e até mesmo animais, constituem metabólitos secundários com uma ampla diversidade estrutural e química. Esse caráter diversificado confere a elas uma notável gama de atividades biológicas, tornando-as ferramentas valiosas no combate a diversas doenças (Pham *et al.*, 2019).

As estratégias modernas, como a aplicação da biologia sintética e o emprego de abordagens químicas avançadas, têm ampliado as possibilidades de modificação dessas substâncias. Isso também tem permitido a criação de extensas bibliotecas de compostos análogos a produtos naturais, acelerando significativamente o processo de descoberta de agentes terapêuticos inovadores. À medida que os avanços tecnológicos continuam, o potencial dessas moléculas na identificação de novas terapias se expande, abrindo caminhos promissores para o tratamento de inúmeras condições médicas (Zhang *et al.*, 2020; Wright, 2018). Exemplos importantes incluem toxinas extraídas de caracóis marinhos, como o Ziconotide (comercializada como Prialt), utilizado para o tratamento de dores severas e crônica (McIntosh M *et al.*, 1982), e peptídeos, como a semaglutida (comercializada como Ozempic), que têm revolucionado o tratamento de condições metabólicas (Lau *et al.*, 2015; Peraire *et al.*, 2024). Nesse cenário, a pesquisa em torno de novas moléculas, como o KPP, abre caminhos promissores para avanços terapêuticos, destacando-se especialmente por sua aplicação potencial no tratamento da HA.

O tripeptídeo KPP, objeto central deste estudo, apresenta propriedades bioativas que a posicionam como uma candidata interessante para terapias inovadoras. Sua estrutura única e origem natural sugerem uma afinidade específica com receptores vasculares, essencial para o desenvolvimento de tratamentos eficazes voltados à vasodilatação (Verano-Braga *et al.*, 2010). Entretanto, a pesquisa básica frequentemente negligencia as diferenças biológicas entre os sexos, priorizando estudos em modelos masculinos. Investigações voltadas à fisiologia feminina são indispensáveis para preencher lacunas na ciência e promover terapias mais inclusivas. Nesse contexto, avaliar as propriedades do KPP em um espectro fisiológico diverso não só amplia as possibilidades terapêuticas, como também reforça a necessidade de uma abordagem mais equitativa na pesquisa farmacológica

No contexto da HA, os medicamentos desempenham um papel indispensável no controle da doença, mas enfrentam desafios relacionados ao uso indevido no esporte. Diversos fármacos anti-hipertensivos estão listados como substâncias

proibidas pelo Comitê Olímpico Internacional e pela Agência Mundial Antidoping (WADA), devido ao seu potencial de melhorar o desempenho físico ou mascarar o uso de substâncias proibidas. Desenvolver novos fármacos, como a KPP, exige uma estratégia inovadora que equilibre eficácia clínica e conformidade regulatória. Ademais, a busca por alternativas mais seguras e específicas ressalta o potencial da KPP como uma solução capaz de atender às demandas médicas e aos critérios de regulação.

Um dos maiores desafios no desenvolvimento de medicamentos baseados em moléculas naturais é superar limitações farmacocinéticas, como baixa solubilidade e biodisponibilidade restrita. Estratégias tecnológicas, como o uso de excipientes avançados, têm sido essenciais para contornar essas barreiras [Wright, 2018]. Um exemplo amplamente adotado é o emprego de ciclodextrinas, que aumentam a solubilidade e a estabilidade de moléculas bioativas, como demonstrado na formulação oral para a Ang-(1-7) (Fraga-Silva et al., 2011).

Os avanços tecnológicos na biofarmacêutica têm sido determinantes para a criação de terapias disruptivas e soluções personalizadas. Tecnologias como biossimilares, plataformas de RNA e sistemas avançados de liberação de medicamentos estão transformando a prática clínica e o mercado farmacêutico (Coelho et al., 2010; Liu et al., 2016; Pei et al., 2024). Nesse cenário, o KPP se destaca como uma oportunidade única de explorar biomoléculas para atender necessidades médicas ainda não supridas, como a demanda por vasodilatadores mais seguros e eficazes. Além disso, o impacto econômico gerado por patentes e o incentivo ao uso de fontes naturais sustentáveis posicionam o KPP como uma molécula alinhada às tendências emergentes da ciência e da inovação.

Sendo assim, a molécula KPP apresenta um potencial significativo para revolucionar o tratamento de condições cardiovasculares, como a HA, enquanto aborda lacunas importantes na pesquisa científica. A combinação de estudos básicos diversificados, tecnologias avançadas de formulação e inovação biofarmacêutica posiciona o KPP como um exemplo promissor de como as biomoléculas podem ser integradas em terapias inovadoras. Essa abordagem não apenas expande as fronteiras do conhecimento, mas também ressalta a relevância de investir em ciência inclusiva e sustentável para atender às demandas da sociedade.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivos gerais

Investigar a influência de um peptídeo sintético, análogo a uma toxina presente na peçonha de *Tityus serrulatus*, sobre a regulação da pressão arterial, explorando seu potencial efeito anti-hipertensivo, além de avaliar o seu impacto na performance física, visando assegurar que não tenha características associadas ao doping.

### 2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito hipotensivo do peptídeo em ratos normotensos;
- Determinar se o peptídeo induz um efeito anti-hipertensivo em ratos hipertensos;
- Estudar possíveis diferenças sexo-específicas da ação cardiovascular do peptídeo;
- Padronizar uma forma de administração oral do tripeptídeo KPP;
- Avaliar se o peptídeo induz melhora na performance física.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Experimentos in vitro.**

##### **3.1.1. Avaliação qualitativa do peptídeo sintético por espectrometria de massa**

Nesta análise, utilizou-se um espectrômetro de massa do tipo MALDI-TOF MS AutoFlex III™ (Bruker Daltonics, Billerica, USA). O peptídeo sintético foi depositado sobre uma placa metálica, juntamente com uma matriz apropriada Ácido 2,5-Diidroxibenzoico (DHB), que facilitou a dessorção e ionização do peptídeo.

Os íons gerados foram acelerados por um campo elétrico e atravessaram um tubo de vácuo (tubo de voo), onde foram separados segundo a razão massa-carga ( $m/z$ ). Os espectros foram analisados em termos de intensidade e número de íons presentes na amostra. Também foi verificada a presença do íon representando a massa molecular monoisotópica monoprotônica calculada para o peptídeo KPP:  $[M+H]^+ = 341,2$  Da.

##### **3.1.2. Ensaio de atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA)**

Para avaliar se o peptídeo KPP atua como inibidor da ECA, conforme discutido por Verano-Braga e colaboradores (2010), empregamos um ensaio específico que mede a atividade enzimática da ECA na presença do peptídeo. Utilizamos um método fluorométrico, que quantifica a liberação de His-Leu a partir do substrato Hip-His-Leu, permitindo quantificar a atividade da ECA.

Para o ensaio, o KPP foi utilizado na concentração final de 0,005 mg/mL. Para isso, uma alíquota de 10  $\mu$ L de uma solução estoque de KPP a 1 mg/mL foi adicionada ao plasma sanguíneo, previamente obtido após a centrifugação a  $10.600 \times g$  (RCF), por 5 minutos a 4°C, do sangue de rato. Em seguida, ao plasma contendo KPP foi adicionado o substrato específico para a enzima conversora de angiotensina (ECA), o Hip-His-Leu, na concentração de 5 mM, dando início à reação enzimática.

A hidrólise do substrato pela ECA foi monitorada por espectrofluorimetria, o que possibilitou a detecção direta dos produtos formados. A atividade da ECA foi determinada com base na conversão do substrato em produto, medida pelo aumento de absorbância em um comprimento de onda de 365nm de excitação e 495nm de emissão. Um experimento controle foi utilizado sem a adição do KPP. Todos os

experimentos foram realizados em duplicata.

### **3.2 Experimento in vivo**

#### **3.2.1 Experimentos com ratas e ratos**

##### **3.2.1.1. Animais**

Foram utilizados 21 ratos, com 12 semanas de idade, espontaneamente hipertensos (SHR) e 22 ratos Wistar (WI). O grupo Wistar incluiu machos (234g – 408g) e fêmeas (172g – 245g), com idades entre 10 e 12 semanas. Os ratos SHR (machos e fêmeas) foram fornecidos pelo Biotério do Instituto de Ciências Biológicas-2 (BICBIO-2) e os ratos Wistar (machos e fêmeas) pelo Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas (CEBIO), ambos da UFMG.

Todos os animais foram mantidos sob condições controladas de temperatura e ciclo claro/escuro de 12 horas, com acesso a ração e água filtrada *ad libitum*. Os procedimentos experimentais seguiram as diretrizes aprovadas pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA-UFMG), sob o protocolo nº 141/2023.

##### **3.2.1.2. Grupos experimentais utilizados para avaliar a atividade pressora do peptídeo KPP**

Nos experimentos realizados com ratos, os animais foram divididos em grupos conforme o sexo, a linhagem e o tipo de fármaco administrado durante o teste, formando os seguintes grupos experimentais:

Tabela 3. Grupos experimentais utilizados para avaliação da atividade pressora do peptídeo KPP.

LINHAGEM	SEXO	FÁRMACO	DOSE	VIA DE ADMINISTRAÇÃO	VOLUME ADMINISTRADO
<b>WISTAR</b>	Macho	NaCl 0,9%		Intravenoso	0,2ml
<b>WISTAR</b>	Macho	KPP	33 ou 330 µg/kg	Intravenoso	0,2ml
<b>SHR</b>	Macho	NaCl 0,9%		Intravenoso	0,2ml
<b>SHR</b>	Macho	KPP	33 ou 330 µg/kg	Intravenoso	0,2ml
<b>WISTAR</b>	Fêmea	NaCl 0,9%		Intravenoso	0,2ml
<b>WISTAR</b>	Fêmea	KPP	33 ou 330 µg/kg	Intravenoso	0,2ml
<b>SHR</b>	Fêmea	NaCl 0,9%		Intravenoso	0,2ml
<b>SHR</b>	Fêmea	KPP	33 ou 330 µg/kg	Intravenoso	0,2ml

### 3.2.1.3. Avaliação do ciclo estral

A avaliação do ciclo estral (CE) foi realizada por meio da coleta de esfregaços vaginais que ocorreram sempre no mesmo horário, entre 13 e 14h (Horário de Brasília), durante um período de 15 dias, a fim de certificar-se a regularidade do ciclo, antes do início dos experimentos. Com uso de pipeta Pasteur contendo 0,5 ml de solução de NaCl 0,9%, a ponta da pipeta era introduzida no orifício vaginal das ratas e uma gota da solução salina coletada, aspirada e gotejada em lâminas de vidro para a observação em microscópio óptico comum (Fig. 7). O objetivo dessa avaliação foi verificar se havia diferença na pressão arterial sistólica (PAS) basal entre as fases do ciclo estral. A PAS basal e a fase do ciclo foram avaliadas no mesmo dia e nos mesmos animais. Neste estudo, foi considerado apenas o último dia da avaliação do ciclo, correspondente ao dia do registro da PAS.

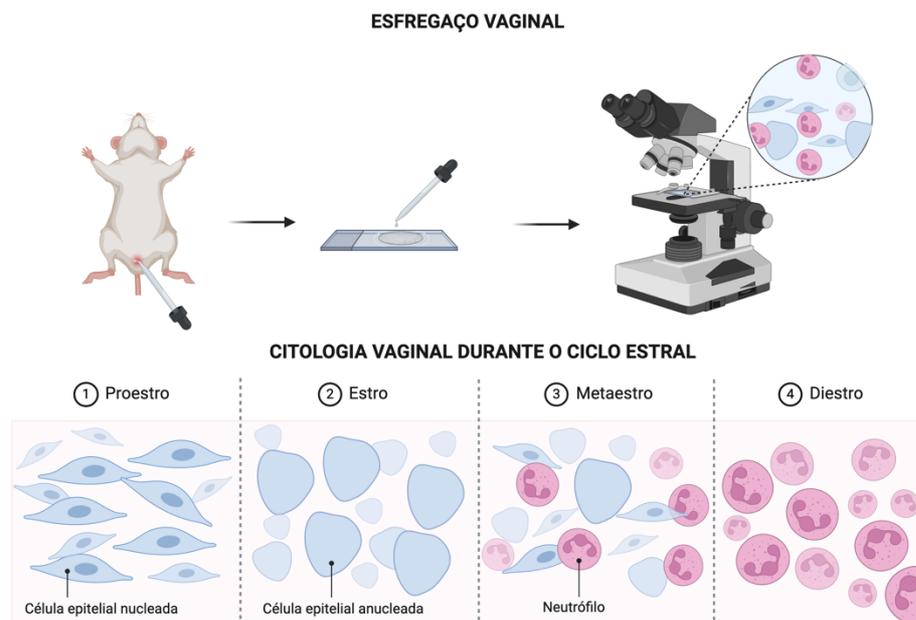


Figura 7. Representação esquemática do método de avaliação e da característica celular nas diferentes fases do ciclo estral através de coleta do esfregaço vaginal

#### 3.2.1.4. Cirurgia para canulação da artéria e veia femoral

Os animais foram anestesiados com uma solução contendo Cetamina (80mg/Kg) e Xilazina (8mg/kg), que foi injetada por via intraperitoneal (0,1mL/100g), no quadrante inferior direito. As cânulas utilizadas foram confeccionadas a partir da polimerização por aquecimento de tubos de polietileno PE10, que eram introduzidos nos vasos (4cm na artéria; 3cm na veia), e PE50 (17cm), que foi direcionado pelo subcutâneo até o dorso do animal. As cânulas foram preenchidas previamente com salina estéril 0,9% contendo heparina (5000UI/ml) a fim de prevenir a formação de coágulos de sangue em seu interior. Após a preparação da sala cirúrgica, os animais foram posicionados em decúbito dorsal sobre a mesa cirúrgica, onde teve a região inguinal delimitada e tricotomizada, e uma pequena incisão na pele (~ 1cm) foi realizada. Após a incisão de divulsão do tecido adjacente, o feixe vaso-nervoso femoral foi localizado, e a artéria e a veia femoral foram cuidadosamente isoladas. Primeiro, a cânula foi introduzida na veia femoral para futura administração de fármacos. Na sequência, uma segunda cânula foi introduzida na artéria aorta abdominal, através da artéria femoral, para o registro da pressão arterial pulsátil (PAP). Por fim, após a canulação dos vasos, as cânulas foram direcionadas pelo subcutâneo para serem exteriorizadas e fixadas ao dorso do animal na região entre

as escápulas com fio de sutura cirúrgico. Todas as incisões foram então suturadas. Ao término da cirurgia, foi realizada a injeção intramuscular de antimicrobiano de amplo espectro (Pentabiótico veterinário Ford Dodge 2.400 UI/ 0,1 ml; dose única) e os animais eram colocados em gaiolas individuais próximo a lâmpadas infravermelhas para ajudar a manter a temperatura corporal dos animais durante o período de recuperação (Fig. 8).

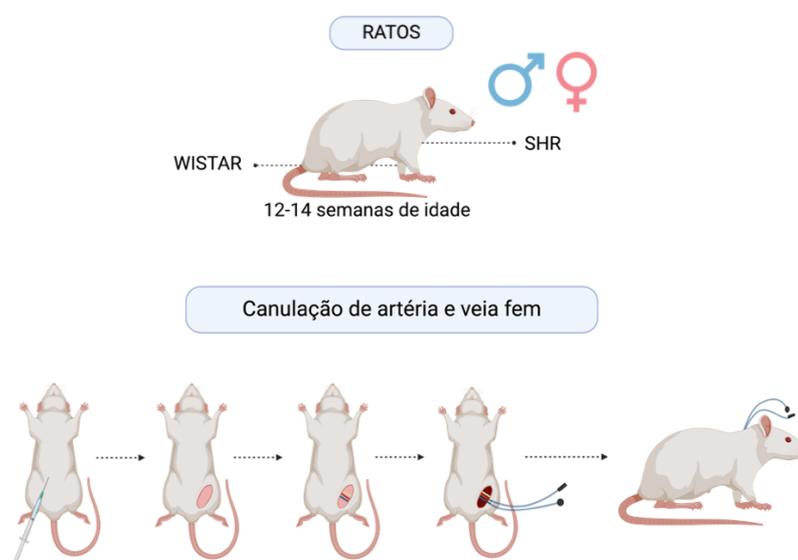


Figura 8. Representação esquemática do método de canulação de veia e artéria femoral

### 3.2.1.5. Medida direta de parâmetros cardiovasculares

Para medir os parâmetros cardiovasculares, como pressão arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD), média (PAM) e frequência cardíaca (FC), utilizou-se um transdutor de pressão conectado a um amplificador de sinal, integrado a um sistema de aquisição de dados (Biopac® Systems, CA, USA). A pressão arterial foi registrada e a administração da droga em potencial realizada, respectivamente, via cânula introduzida na artéria femoral e veia femoral.

### 3.2.1.6. Avaliação da resposta cardiovascular à administração de KPP

Nesse método, os animais foram submetidos à injeção intravenosa (0,2 ml em bolus) de dose de KPP (33 ou 330  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), após um período de 60min de adaptação no sistema de monitoramento Biopac, visando obter resposta pressora à

administração do peptídeo. Durante o período de adaptação, os parâmetros cardiovasculares, como PAM e FC, foram estabilizados a fim de garantir a obtenção de valores basais consistentes. A solução contendo a droga em potencial foi preparada a partir de alíquotas (mantidas a  $-20^{\circ}\text{C}$ ) de uma solução estoque contendo  $2\text{mg/mL}$ . Após a administração do KPP ( $33$  ou  $330\ \mu\text{g/kg}$ ), os animais foram monitorados por um período adicional de 6 horas, durante o qual os registros contínuos de PAM e FC foram realizados com o objetivo de avaliar o potencial efeito do KPP em reduzir a pressão arterial e a frequência cardíaca. Essa administração do KPP juntamente com o monitoramento prolongado permitira observar tanto o efeito imediato quanto os sustentados do fármaco, proporcionando uma análise detalhada de sua eficácia (Fig. 9).

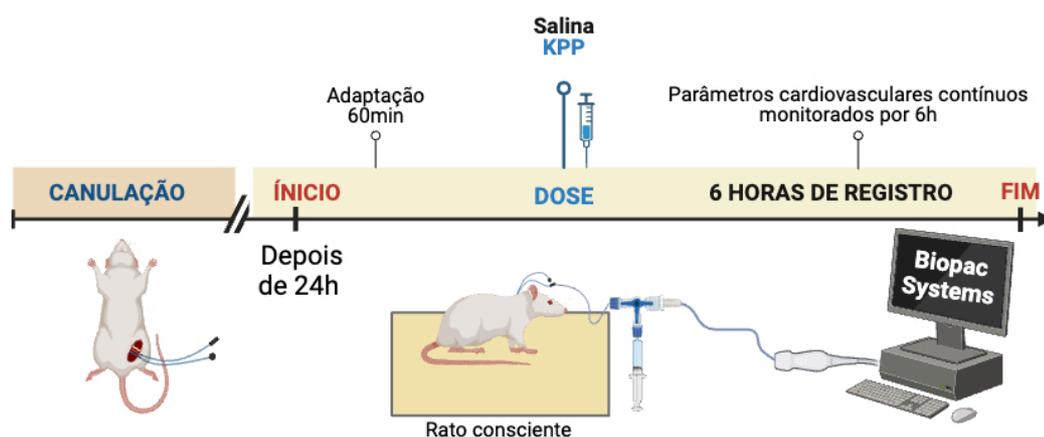


Figura 9. Protocolo de medida de PA no sistema de aquisição de dados (BIOPAC System), em animais conscientes.

### 3.2.2. Experimentos com camundongos machos

#### 3.2.2.1 Animais

Neste estudo, foram utilizados dois grupos de animais. O primeiro grupo foi composto por 44 camundongos machos da linhagem C57BL/6, com idades entre 10 e 12 semanas ( $16,5\ \text{g} - 20\ \text{g}$ ), provenientes do biotério do Laboratório de Fisiologia do Exercício (LAFISE) da Escola de Educação Física, Fisioterapia e Terapia Ocupacional (EEFFTO) da UFMG.

Os animais foram mantidos sob condições controladas e todos os procedimentos durante o período de treinamento com intervenção (TCI), descrito adiante, foram realizados entre 7 e 14 horas. Após a conclusão do protocolo de TCI,

as amostras de tecidos foram coletadas e armazenadas em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  para análises subsequentes no Laboratório de Hipertensão da UFMG.

### 3.2.2.2. Grupo experimental

Os animais foram divididos de forma balanceada quanto ao peso em três grupos experimentais, que receberam o mesmo volume de solução por gavagem (via oral) durante um período de 10 dias após a realização da primeira rodada de testes:

Tabela 4. Grupos experimentais utilizados para avaliação dos tratamentos por gavagem.

<b>Grupo</b>	<b>Tratamento administrado</b>	<b>Volume administrado</b>	<b>Dose</b>
<i>Grupo 1</i>	Solução Salina (0,9%)	0,2 mL	-
<i>Grupo 2</i>	Angiotensina (1-7)	0,2 mL	0,143 mg/kg
<i>Grupo 3</i>	Peptídeo KPP	0,2 mL	0,82 mg/kg

Essa divisão permitiu avaliar o efeito específico de cada substância nos parâmetros analisados ao longo do experimento.

### 3.2.2.3. Instalação dos sensores de telemetria

Os animais foram anestesiados com solução anestésica contendo Cetamina (84mg/kg de peso corporal) e Xilazina (8mg/kg de peso corporal) por via intraperitoneal do lado direito. Após, foi realizada uma pequena incisão na linha alba do músculo abdominal, e a cavidade foi exposta. Assim, um transmissor de telemetria (série G2 E-Mitter, Mini Mitter, Bend, OR) foi implantado na cavidade e fixado na parede abdominal lateral esquerda utilizando suturas e, por fim, o músculo abdominal e as camadas superiores suturados (Steiner et al., 2007), com o objetivo de medir a temperatura interna.

Os camundongos passaram por um período de recuperação de 7 dias após a cirurgia, antes de serem introduzidos ao processo de familiarização na esteira. Esse tempo foi suficiente para garantir a recuperação completa dos animais e o retorno à massa corporal anterior à cirurgia. Os sensores telemétricos tinham uma massa média de 1,1g.

#### **3.2.2.4. Análise Térmica dos Animais por Termografia**

A avaliação da temperatura dos animais foi realizada por meio de uma câmera térmica pontual infravermelha E8-XT [Teledyne FLIR LLC, Wilsonville, OR, USA), apresentando sensibilidade de 320 x 240 (76800 pixels), com uma faixa de temperatura de -20 a 550° C, uma faixa espectral de 7,5 a 13 µm e precisão  $\pm 2^\circ$  C ou  $\pm 2\%$ ] para avaliar as variações térmicas nos diferentes grupos experimentais. O ensaio foi realizado em sala vazia e os animais foram adaptados uma hora antes da captação das imagens. Durante este tempo, os animais foram mantidos em caixas apropriadas com maravalha e a sala manteve uma temperatura constante de 24°C. A câmera termográfica foi usada para captar imagens térmicas mantendo uma distância padrão de 1 metro das caixas. Os animais foram divididos em três grupos distintos: Salina, KPP e Ang (1-7), foi realizada a mensuração da temperatura em três animais por grupo experimental (n=3). As concentrações e volumes administrados foram os mesmos citados anteriormente. As imagens térmicas foram obtidas em diferentes tempos, sendo: 0 h, 2 h, 3 h, 4 h e 6 h de intervalo da gavagem das soluções. A temperatura dos animais foi avaliada pelo software Apollo (características do software) que permitiu a mensuração da Regiões de Interesse (ROIs) e avaliação das temperaturas. Os dados obtidos foram usados para verificar a temperatura de resposta dos animais em relação ao tratamento administrado.

#### **3.2.2.5. Teste de Força**

O teste de força foi realizado em camundongos utilizando o método de “grip strength”, modelo de teste usado para as patas anteriores (2 patas) quanto para as quatro patas (4 patas). O equipamento utilizado foi um dinamômetro (Grip Strenght Meter, BONTHER, Ribeirão Preto, SP) específico para pequenos roedores, no qual mede a força exercida pelos animais ao segurar a barra horizontal. Os animais foram familiarizados ao teste a fim de padronizar a posição da pegada na barra e em seguida foram suavemente puxados pela cauda, de modo a medir a força máxima exercida antes se soltarem.

Cada animal realizou 6 tentativas em cada uma das posições (2 ou 4 patas), com um descanso de 1 minuto entre as sessões, para evitar fadiga muscular. Ao fim, foram feitas duas análises, média da força máxima exercida pelos animais e média da força exercida pelos animais.

### 3.2.2.6. Familiarização à corrida na esteira rolante

O experimento foi realizado com todos os animais em uma esteira rolante (Panlab/Havard Apparatus, Cornella, Espanha), mantida com inclinação de 5°, durante cinco sessões consecutivas, conforme descrito na Tabela 5. O protocolo consistiu em três estágios: o primeiro estágio sempre foi de repouso, com duração de 3 minutos, com os animais posicionados na baía da esteira desligada. No segundo estágio, a duração foi fixada em 5 minutos, com a intensidade da corrida aumentando progressivamente de 5 para 6 m/min ao longo dos dias. O terceiro estágio apresentou aumento progressivo tanto da duração quanto da intensidade, variando de 3 a 5 minutos e de 6 a 8 m/min, respectivamente (adaptado de Wanner et al., 2014). No quinto dia, os animais foram submetidos à familiarização com o teste de carga incremental, com critério de interrupção atenuado (5 segundos na zona de fadiga; Tabela. 5) (Dougherty; Springer; Gershengorn, 2016).

Tabela 5. Protocolo de familiarização planejado para ensinar o camundongo a correr na esteira rolante\*.

<b>Dia</b>	<b>Estágio 1</b>	<b>Estágio 2</b>	<b>Estágio 3</b>
<b>1</b>	3 min de repouso	5 min à 5 m/min	3 min à 6 m/min
<b>2</b>	3 min de repouso	5 min à 6 m/min	3 min à 8 m/min
<b>3 e 4</b>	3 min de repouso	5in à 6 m/min	5 min à 8 m/min
<b>5</b>	Familiarização ao teste de carga incremental (na mesma esteira do teste)		

\*, a inclinação da esteira rolante foi sempre configurada em 5°

É importante destacar que os animais foram submetidos aos testes tanto antes quanto após o tratamento com o fármaco, permitindo que cada indivíduo servisse como seu próprio controle. Esse delineamento foi adotado para minimizar possíveis vieses relacionados a diferenças intrínsecas na aptidão física dos animais, principalmente no desempenho durante a corrida.

Os camundongos foram incentivados a correr por meio de estimulação elétrica leve (0,5 mA), aplicada de forma contínua e intermitente por uma grade localizada na extremidade posterior da esteira.

### 3.2.2.7. Protocolo de teste de carga incremental em esteira rolante

Utilizado como parâmetro do desempenho físico, o TCI em esteira rolante (AVS projetos®, São Carlos, SP, Brasil; Fig. 10) foi executado por todos os animais em ambas as temperaturas (22 e 32 °C) em dois momentos, i.e., pré-tratamento e após 7 dias de tratamento, a fim de determinar as variáveis de desempenho físico, tais como tempo até a fadiga, distância percorrida e velocidade máxima atingida. O teste foi iniciado na velocidade de 10 m/min, com aumento de 3 m/min a cada 3 min (inclinação em 5°). A fadiga foi determinada quando os animais eram incapazes de acompanhar o ritmo da esteira, permanecendo na grade de choque ( Fig. 10) por 5 s (Ayachi *et al.*, 2016).

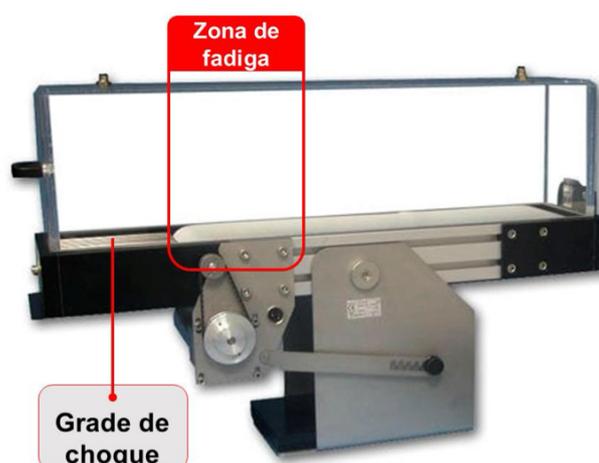


Figura 10. Ilustração representativa da esteira utilizada no protocolo de familiarização à corrida e teste de carga incremental (Adaptado de Panlab/Havard Apparatus, Cornella, Espanha).

Ambos os testes, em ambiente quente (Q, 32 °C) e temperado (T, 22 °C), foram conduzidos em uma câmara (model WMD 1150-5, Russells Technical Products, Holland, MI, USA) de controle de temperatura localizada no laboratório LAFISE (UFMG). A câmara foi projetada para manter o ambiente interno com temperatura rigorosamente controlada, garantindo condições experimentais estáveis e precisas durante todo o período de realização dos testes. Os testes em ambiente T e Q foram separados por pelo menos 48 h e realizados entre 7h e 14h para minimizar influências cronobiológicas.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Resultados in vitro

#### 4.1.1. Análise qualitativa do peptídeo sintético KPP purificado por espectrometria de massa

Os gráficos apresentados (Fig. 11) revelam os espectros de massa das amostras analisadas utilizando a técnica de ionização/dessorção a laser assistida por matriz acoplada ao espectrômetro de massa utilizando um analisador de massa por tempo de voo (MALDI-TOF MS). Os espectros obtidos demonstram a separação dos íons com base em suas razões massa-carga ( $m/z$ ), permitindo a identificação de padrões específicos para cada amostra.

Na Fig. 11A, está representado o espectro da matriz DHB utilizada como controle, sem a presença do peptídeo KPP. Esse espectro apresenta picos distribuídos ao longo do intervalo de  $m/z$  310 a 370, com destaque para os íons com  $m/z$  324,549 e 360,636, que correspondem a íons próprios da matriz. Importante destacar que não foi observado nenhum pico no intervalo de  $m/z$  ~341, o que confirma que a matriz DHB não interfere na detecção do peptídeo KPP.

A Fig. 11B, por sua vez, apresenta o espectro do peptídeo KPP cocrystalizado à matriz DHB, com um pico predominante em 340,717  $m/z$ , que corresponde ao íon protonado do peptídeo KPP ( $[M + H]^+ = 340,717$ ). O outro íon predominante, em 362,763  $m/z$ , corresponde ao aduto de sódio do íon KPP ( $[M + Na]^+ = 362,763$ ). Sendo assim, podemos concluir que o peptídeo KPP foi detectado intacto, sem contaminação significativa e com pouca degradação.

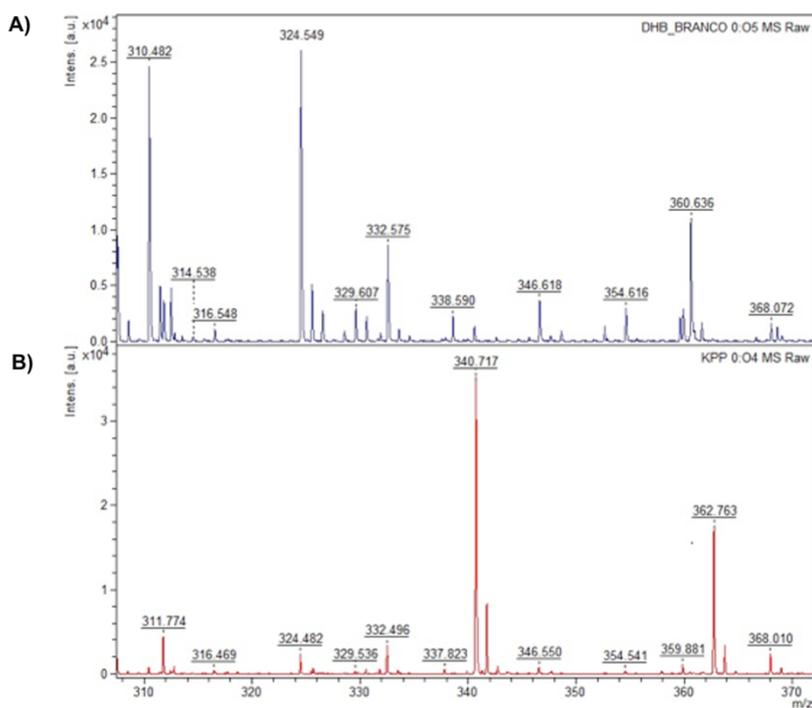


Figura 11. Espectros de massa obtidos utilizando um instrumento do tipo MALDI-TOF MS. A) Espectro de massa da matriz utilizada (DHB), correspondendo a um branco, ou seja, uma análise sem a adição do peptídeo. B) Espectro de massa da amostra contendo o KPP, com pico predominante em  $m/z$  340,717, correspondendo ao íon do peptídeo KPP  $[M + H]^+$ .

#### 4.1.2. Ensaio da Atividade da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA)

O gráfico abaixo (Figura 12) mostra o impacto da adição do peptídeo KPP (0,02 mg/mL) na atividade enzimática da ECA, medida em termos da taxa de liberação do dipeptídeo His-Leu (em nmol/mL/min). Os resultados indicam que a presença de KPP não alterou a atividade da ECA em comparação ao controle (sem KPP).

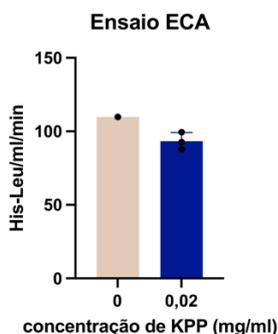


Figura 12. Efeito do KPP sobre a atividade da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA). A atividade

enzimática foi quantificada pelo ensaio colorimétrico, expressa em His-Leu/ml/min. Os grupos avaliados correspondem à condição controle (0 mg/ml) e à presença de KPP (0,02 mg/ml). Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão (0 mg/ml:  $102,3 \pm 4,1$ ; 0,02 mg/ml:  $94,7 \pm 3,5$ ). A análise estatística foi realizada por teste t de Student pareado, indicando que não houve diferença significativa entre os grupos ( $P = 0,12$ ).

No grupo controle (sem KPP), observou-se uma atividade da ECA levemente superior, mas dentro da variação esperada (0 mg/ml:  $102,3 \pm 4,1$ ; 0,02 mg/ml:  $94,7 \pm 3,5$ ). No grupo com KPP (0,02 mg/mL), a atividade da enzima manteve-se praticamente igual à do controle, indicando que a adição do peptídeo KPP não interferiu significativamente na hidrólise do substrato Hip-His-Leu.

Esses resultados sugerem que, na concentração avaliada, o KPP não apresentou efeito inibitório relevante sobre a atividade da ECA no plasma de ratos.

## **4.2 Resultados in vivo**

### **4.2.1. Resultados dos animais murinos**

#### **4.2.1.1. Ciclo estral**

A avaliação do ciclo reprodutivo, como o ciclo estral em ratas, desempenha um papel fundamental na pesquisa científica devido às flutuações hormonais que ocorrem ao longo de suas quatro fases distintas: proestro, estro, metaestro e diestro. Essas variações hormonais provocam mudanças significativas na mucosa vaginal, que podem ser identificadas por meio da análise de esfregaço vaginal. Essa técnica examina a presença de diferentes tipos celulares, incluindo células epiteliais, células queratinizadas e leucócitos. Reconhecer essas especificidades é especialmente importante, visto que fêmeas têm sido historicamente sub-representadas na pesquisa biomédica. No entanto, as características sexuais são variáveis biológicas essenciais, e a inclusão de fêmeas em números iguais aos de machos nos estudos científicos tem sido cada vez mais recomendada. Isso é crucial, pois machos e fêmeas podem apresentar respostas completamente diferentes a uma mesma tarefa comportamental. A adoção dessa abordagem garante resultados mais robustos e amplamente aplicáveis, respeitando as características únicas de cada sexo (Becegato M, Silva RH, 2022).

A Figura 13 representa a pressão arterial sistólica (PAS) das ratas em função do ciclo estral (CE). As médias obtidas para as fases diestro, proestro, estro e metaestro foram, respectivamente,  $155,3 \pm 16,0$  mmHg,  $168,7 \pm 4,2$  mmHg,  $139,0$

mmHg e 140.0 mmHg ( $P = 0.2106$ ). Dessa forma, não se observou influência significativa da fase do ciclo estral sobre a PAS no dia do registro, sugerindo que esse fator não teve impacto significativo na medida da pressão arterial. Contudo, considerando o tamanho reduzido do tamanho amostral, esses achados ainda requerem investigação adicional. Estudos futuros com uma amostragem mais ampla poderão oferecer maior robustez estatística para confirmar ou refutar essa tendência.

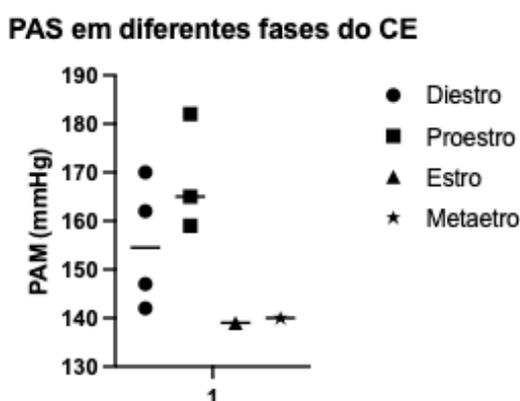


Figura 13. PAS basal em diferentes fases do CE. A figura apresenta a distribuição da pressão arterial sistólica (PAS) em diferentes fases do ciclo estral (CE), com valores individuais para diestro, proestro, estro e metaestro. O eixo Y exibe a PAS em mmHg, variando entre 130 e 190 mmHg, enquanto os pontos representam os dados de cada animal, com a linha horizontal indicando a média do grupo. One-way ANOVA seguida pelo teste de Tukey;  $P > 0,05$ .

#### 4.2.1.2. Avaliação da função cardiovascular

Os resultados apresentados nas figuras 14 e 15 demonstram os efeitos do peptídeo KPP, em doses de 33  $\mu\text{g}/\text{kg}$  e 330  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , sobre a pressão arterial média (PAM) de ratos hipertensos espontâneos (SHR) e normotensos (Wistar), separados por sexo. O grupo controle foi tratado com solução salina, e a hipótese do estudo era que o KPP fosse capaz de reduzir a PAM, com maior eficácia esperada em SHR devido ao perfil hipertensivo desses animais.

Na figura 14, que representa os resultados obtidos nos machos, observa-se que o tratamento com KPP reduziu significativamente a PAM nos SHR em comparação ao grupo controle tratado com salina. Na Fig. 14.A, os valores de PAM no grupo controle permaneceram elevados ao longo das 6 horas de avaliação, apresentando ainda variações positivas da PAM durante esse período. Em contraste, o tratamento com KPP, especialmente na dose de 330  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , causou uma redução

constante e sustentada da PAM a partir de aproximadamente 3 horas após a administração, variando em valores próximos a 10 mmHg. A dose de 33  $\mu\text{g}/\text{kg}$  também promoveu uma diminuição da PAM, embora de forma menos pronunciada e acompanhada de grandes oscilações ao longo do período de registro. Essa diferença é reforçada na Fig. 14.C, que mostra a variação média da PAM ( $\Delta\text{PAM}$ ) em cada grupo. A redução foi mais acentuada no grupo tratado com 330  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (-15 mmHg), apresentando diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle, indicando que os efeitos do KPP são dose-dependentes e consistentes em SHR.

Nos Wistar machos, representados nos painéis B e D, os efeitos do KPP foram mais discretos. Os valores de PAM permaneceram estáveis no grupo controle tratado com salina, enquanto os grupos tratados com KPP apresentaram reduções leves e transitórias da PAM, mais evidentes na dose de 330  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Contudo, a variação média da PAM, apresentada no painel D, mostra que essas reduções foram mais variáveis entre os indivíduos e não alcançaram significância estatística em relação ao controle. Esses resultados sugerem que o efeito do KPP sobre a PAM é mais pronunciado em animais hipertensos, possivelmente devido a características fisiopatológicas específicas da hipertensão, caracterizando este peptídeo como uma molécula anti-hipertensiva.

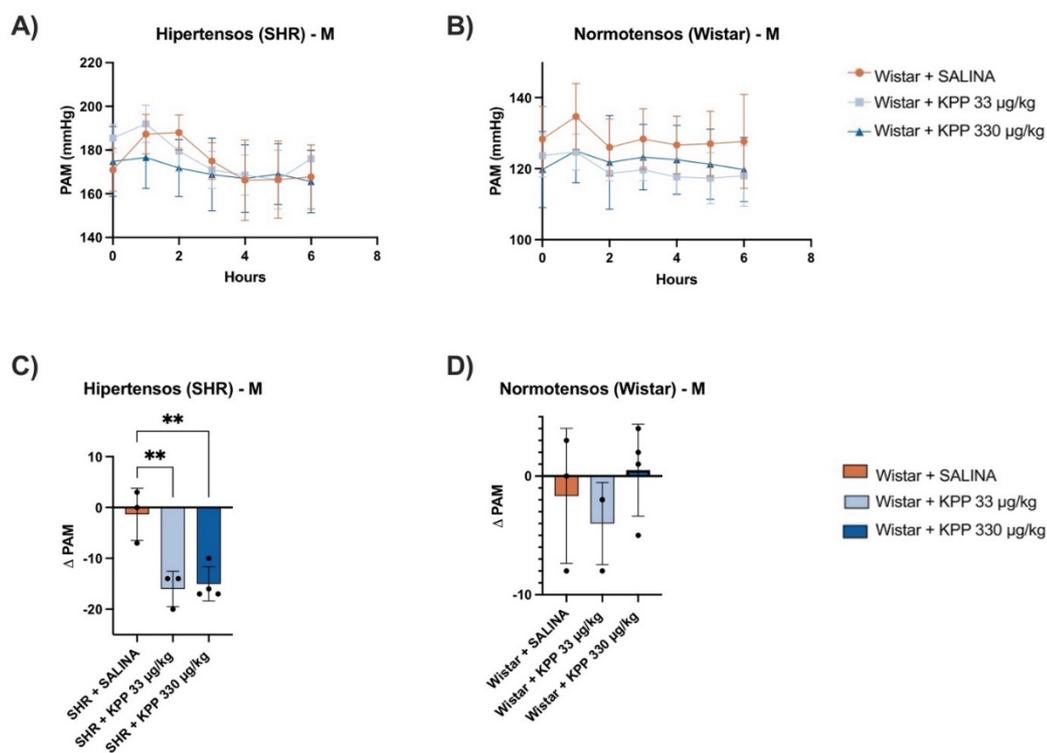


Figura 14. Efeito do peptídeo KPP sobre a pressão arterial média (PAM) em ratos machos hipertensos

(SHR) e normotensos (Wistar). As imagens A e B mostram a variação da PAM ao longo de 6 horas nos grupos tratados com salina (controle) ou com KPP nas doses de 33 µg/kg e 330 µg/kg, em machos SHR e Wistar, respectivamente. Na figura A, observa-se que nos animais SHR o tratamento com KPP, especialmente na dose de 330 µg/kg, promoveu uma redução constante e significativa da PAM a partir de 3 horas, enquanto o grupo controle manteve valores elevados com variações positivas ao longo do tempo. A dose de 33 µg/kg também reduziu a PAM, mas de forma menos pronunciada e com maiores oscilações. Já na figura B, os valores de PAM em Wistar permaneceram estáveis no grupo controle, e o tratamento com KPP resultou em reduções leves e transitórias, sem diferenças significativas entre os grupos. As figuras C e D apresentam a variação média da PAM ( $\Delta$ PAM) ao longo do período experimental em machos SHR e Wistar, respectivamente. Na figura C, observa-se que nos SHR a dose de 330 µg/kg promoveu a maior redução média da PAM, seguida pela dose de 33 µg/kg, ambas com diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle. Na figura D, nos Wistar, embora o KPP tenha promovido uma leve tendência de redução com a dose de 330 µg/kg, as variações médias não foram estatisticamente significativas em relação ao controle. Os dados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). O teste estatístico utilizado foi ANOVA de uma via, seguida pelo pós-teste de Tukey. \*\*P < 0,01.

Na figura 15, que representa os resultados obtidos nas fêmeas, observa-se que, ao contrário do observado nos machos, o tratamento com KPP não promoveu diferenças estatisticamente significativas na PAM, tanto em ratas hipertensas (SHR) quanto em normotensas (Wistar), em comparação ao grupo controle tratado com salina. No painel A, os valores de PAM no grupo controle permaneceram elevados (~180 mmHg) nas SHR ao longo das 6 horas de avaliação, enquanto os grupos tratados com KPP, embora apresentassem uma tendência de redução, especialmente com a dose de 330 µg/kg, não alcançaram uma diferença significativa em relação ao controle. No painel C, a análise da variação média da PAM ( $\Delta$ PAM) reforça a ausência de significância estatística, mesmo com uma leve maior redução observada na dose de 330 µg/kg. Esses resultados sugerem que, diferentemente dos machos, as fêmeas SHR e Wistar não apresentaram uma resposta ao KPP com significância estatística, o que pode indicar uma diferença sexual na sensibilidade ao peptídeo. Contudo, há de se destacar que o tamanho amostral utilizado para as ratas foi menor, o que pode ter influenciado os experimentos. Sendo assim, é importante realizar novos experimentos para determinar se o KPP realmente não induz uma resposta anti-hipertensiva em ratas SHR.

No mesmo sentido, as fêmeas Wistar, representadas na figura 15.B, os efeitos do KPP foram semelhantes aos observados nos machos normotensos. A PAM no grupo controle permaneceu estável ao longo do tempo, enquanto as reduções

observadas nos grupos tratados com KPP foram leves e transitórias. Na figura 15.D, que representa a variação média da PAM ( $\Delta$ PAM), observa-se que a dose de 330  $\mu$ g/kg promoveu uma maior redução em comparação à dose de 33  $\mu$ g/kg, mas sem diferenças significativas em relação ao controle. Assim como nos machos, os efeitos do KPP em Wistar normotensos foram menos marcantes, reforçando sua maior eficácia em modelos hipertensos.

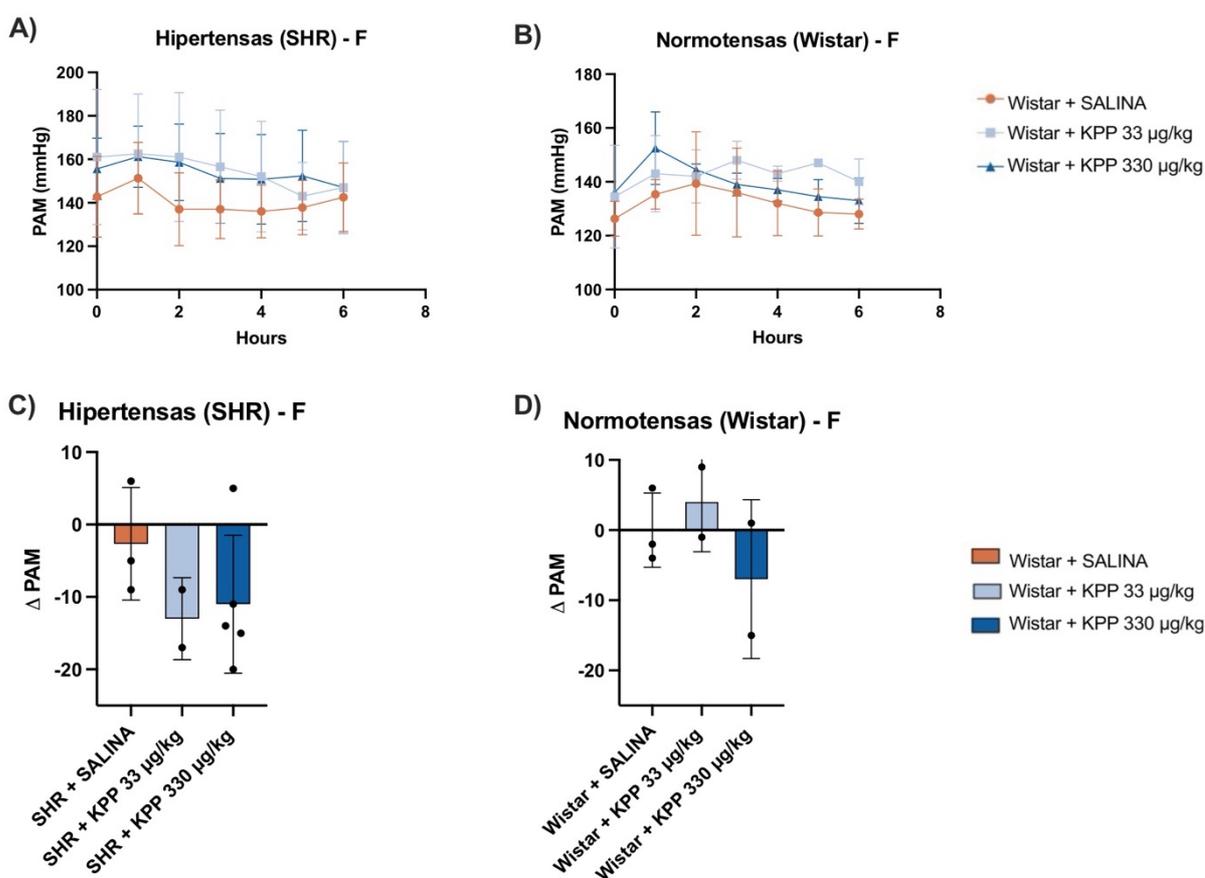


Figura 15. Efeito do peptídeo KPP sobre a pressão arterial média (PAM) em ratas hipertensas (SHR) e normotensas (Wistar). As figuras A e B mostram a variação da PAM ao longo de 6 horas nos grupos tratados com salina (controle) ou com KPP nas doses de 33  $\mu$ g/kg e 330  $\mu$ g/kg, em ratas SHR e Wistar, respectivamente. Observa-se que, nas SHR (A), o tratamento com KPP reduziu a PAM de forma mais pronunciada com a dose de 330  $\mu$ g/kg, enquanto a dose de 33  $\mu$ g/kg apresentou maior variabilidade ao longo do tempo. Nas Wistar (B), os valores de PAM foram mais estáveis e apresentaram leve redução após o tratamento com KPP, sem diferenças significativas. Os painéis C e D representam a variação média da PAM ( $\Delta$ PAM) ao longo do período experimental em ratas SHR e Wistar, respectivamente. Embora as SHR tratadas com KPP tenham apresentado tendência de redução da PAM em ambas as doses, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo controle. De forma semelhante, nas Wistar, as alterações na PAM também não foram significativas, apesar da tendência de redução observada na dose de 330  $\mu$ g/kg. Os dados são apresentados como média  $\pm$  erro

padrão da média (EPM). O teste estatístico utilizado foi ANOVA de uma via, seguida pelo pós-teste de Tukey.

## 4.2.2. Resultados dos animais camundongos

### 4.2.2.1. Alterações termorregulatórias induzidas pelos tratamentos ao longo do tempo

Os gráficos apresentados (Fig. 16) ilustram a variação da temperatura corporal ( $\Delta$ Temp) ao longo do tempo em quatro regiões específicas dos animais: (A) Corpo, (B) Tecido Adiposo Marrom (TAM), (C) Tronco e (D) Olhos. Cada gráfico reflete o comportamento térmico dos grupos experimentais (Salina, KPP e Ang-(1-7)-CD) em relação ao momento inicial (0h), com medições realizadas em 2, 3, 4 e 6 horas após a administração do peptídeo.

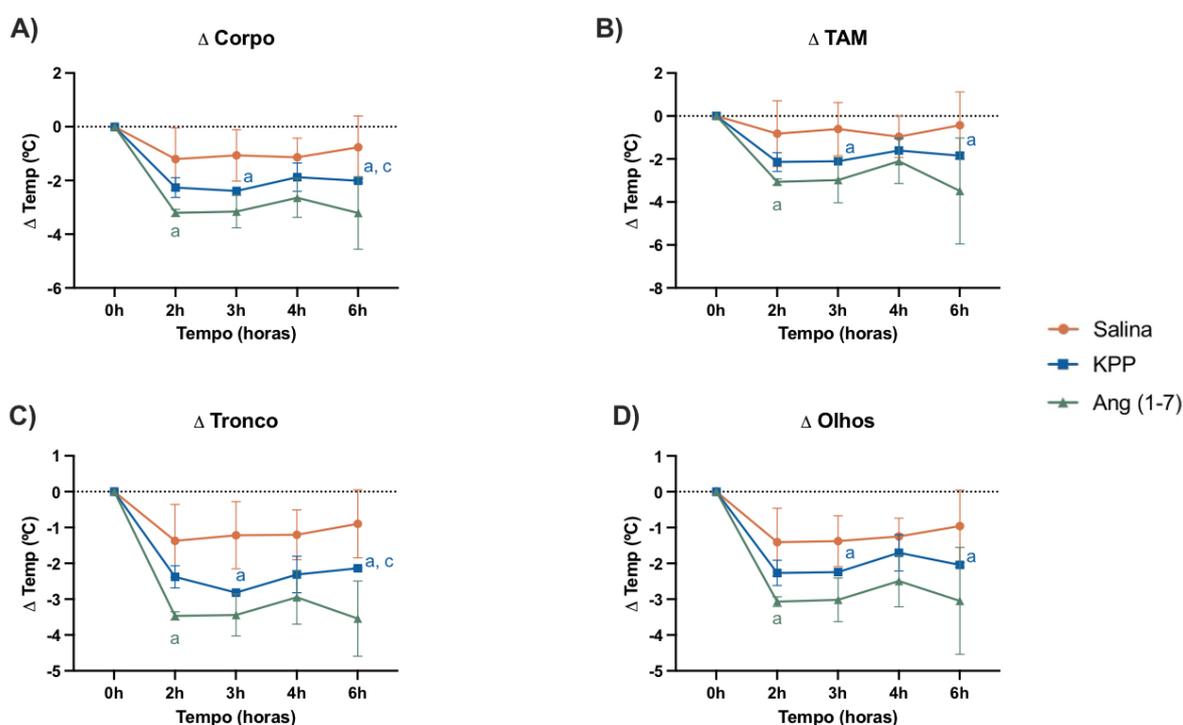


Figura 16. Alterações Termorregulatórias Induzidas pelos Tratamentos ao Longo do Tempo. A) Variação da temperatura corporal total dos animais ao longo do tempo. B) Variação da temperatura corporal total dos animais ao longo do tempo. C) Variações na temperatura do tronco. D) Variação na temperatura da região dos olhos. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias (two-way ANOVA), seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. As letras "a" e "c" indicam os tempos em que foram observadas diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos e os respectivos grupos controles.

Os dados revelam mudanças significativas ( $P < 0,05$ ) de temperatura causadas pelo tratamento oral com os peptídeos KPP e Ang-(1-7)-CD em comparação ao grupo controle (Salina), particularmente em intervalos de tempo específicos. Notavelmente,

o grupo Ang-(1-7) exibiu a queda de temperatura mais acentuada cerca de 2 horas após a administração, enquanto o grupo KPP atingiu seu efeito máximo entre 3 e 6 horas após a sua administração. Esses achados sugerem que o impacto fisiológico das moléculas investigadas, incluindo a Angiotensina-(1-7)-CD e o KPP, é mais evidente nesses períodos e, aparentemente, reflete as características de suas formulações, enquanto a Ang-(1-7) está incluída em ciclodextrina, para aumentar a sua estabilidade no trato gastrointestinal (TGI) e a sua absorção (Lula *et al.*, 2007), o KPP está apenas em solução salina. De toda forma, estes resultados indicam que o KPP é absorvido pelo TGI, além de ser resistente a ação de enzimas proteolíticas.

As reduções de temperatura observadas provavelmente decorrem dos efeitos fisiológicos dos fármacos, incluindo modificações nos mecanismos de termorregulação. Essas mudanças podem envolver ajustes no fluxo sanguíneo periférico e na atividade metabólica, impulsionados pela ação de peptídeos vasodilatadores e hipotensores. O efeito de resfriamento pode indicar uma redistribuição do fluxo sanguíneo, redirecionando a circulação da superfície corporal para o núcleo, ou uma redução na taxa metabólica (Souissi *et al.*, 2024).

Com base nessas observações, foi feito um ajuste importante no protocolo experimental: a administração das moléculas por gavagem 2 horas antes dos testes de atividade física para a Ang-(1-7)-CD e 3 horas antes para o KPP. Esse cronograma alinha o efeito termorregulatório máximo de cada tratamento com o teste comportamental, garantindo maior precisão e relevância nos resultados.

Ao sincronizar o pico do efeito dos fármacos com a execução dos testes, o protocolo maximiza a probabilidade de capturar comportamentos influenciados pelas condições térmicas específicas induzidas por cada tratamento. Essa abordagem aprimora a confiabilidade dos achados e assegura que os dados reflitam o impacto completo dos fármacos.

#### **4.2.2.2. Análise da força muscular em resposta aos tratamentos**

Os gráficos mostram os resultados do teste de força grip strength realizado em camundongos, comparando as médias e os valores máximos de força nas condições pré e pós-tratamento. Os testes foram conduzidos em duas configurações: 2 patas (patas anteriores) e 4 patas (todas as patas). Os grupos experimentais incluem

camundongos tratados com Salina (controle), KPP e Ang-(1-7).

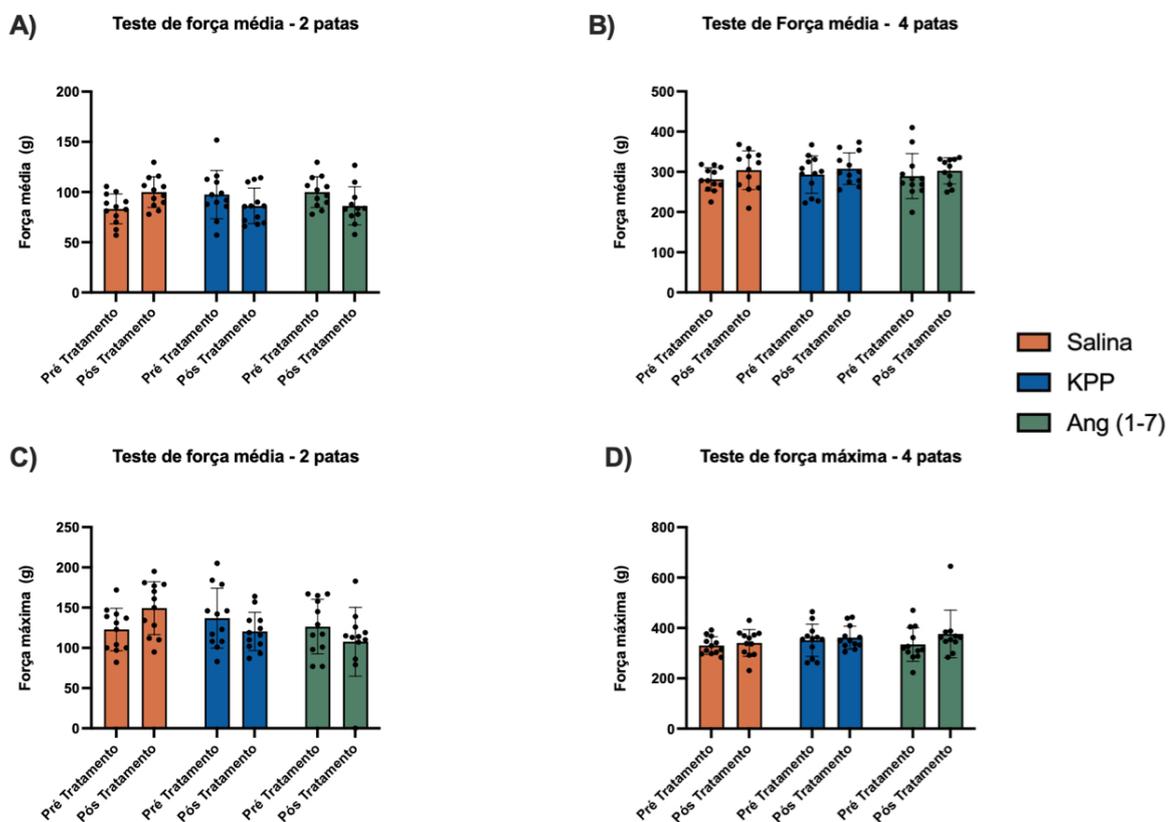


Figura 17. Análise da força muscular em resposta aos tratamentos. A) Média da força exercida com as patas anteriores (2 patas) antes e após o tratamento. B) Média da força exercida com todas as patas (4 patas) nos momentos pré e pós-tratamento. C) Força máxima medida nas patas anteriores (2 patas) antes e após o tratamento. D) Força máxima exercida com as quatro patas (4 patas) antes e após o tratamento. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias (two-way ANOVA), seguida pelo teste de comparações múltiplas de Sidak. Nenhuma diferença significativa foi observada entre as condições pré e pós-tratamento para Salina, KPP e Ang-(1-7)-CD.

A Fig. 17 A e B representa a força média desenvolvida pelos animais. No gráfico A, que mede a força média nas patas anteriores (2 patas), e no gráfico B, que mede a força média nas quatro patas (4 patas), não foram observadas diferenças significativas entre os valores de força pré e pós-tratamento em nenhum dos grupos. Todos os grupos (Salina, KPP e Ang-(1-7)) mantiveram a força média relativamente constante, sugerindo que os tratamentos não influenciaram a força muscular média de maneira significativa.

A Fig. 17 C e D representa a força máxima desenvolvida pelos animais. Assim

como observado na força média, não houve mudanças significativas na força máxima entre as condições pré e pós-tratamento em todos os grupos experimentais. Isso sugere que as substâncias testadas (KPP e Ang-(1-7)) não alteraram a capacidade dos animais de exercer força máxima, tanto nas patas anteriores quanto em todas as patas.

Esses resultados indicam que os tratamentos com KPP e Ang-(1-7) não têm um efeito relevante sobre a força muscular nos camundongos, conforme avaliado pelo método de “grip strength”. Portanto, as substâncias testadas não afetaram o desempenho de força muscular nos parâmetros observados.

#### **4.2.2.3. Efeito do ambiente quente na temperatura interna de camundongos em atividade**

A análise da temperatura corporal dos animais em condições de ambiente temperado e quente revelou uma diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos ( $p < 0,05$ ). Conforme ilustrado na Fig. 18A, a temperatura corporal média dos animais foi maior em condições de ambiente quente ( $39,6^{\circ}\text{C} \pm 0,36$ ) comparado ao ambiente temperado ( $38,79^{\circ}\text{C} \pm 0,52$ ). Essa diferença sugere que a exposição ao ambiente quente aumenta a temperatura corporal dos animais, provavelmente devido à maior necessidade de dissipação de calor e limitações dos mecanismos de termorregulação durante a atividade física. Na Fig. 18B nossos achados mostram um aumento significativo da temperatura dos animais do grupo Salina ( $38,41^{\circ}\text{C} \pm 0,32$ ) e no grupo KPP ( $38,70^{\circ}\text{C} \pm 0,75$ ). No entanto, os animais que receberam Ang-(1-7) mantiveram uma temperatura corporal estável ( $36,81^{\circ}\text{C} \pm 1,37$ ), independentemente do ambiente. Os gráficos C e D mostram que não houve diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos (Salina, KPP e Ang-(1-7)) em nenhum dos dois ambientes, seja temperado ou quente.

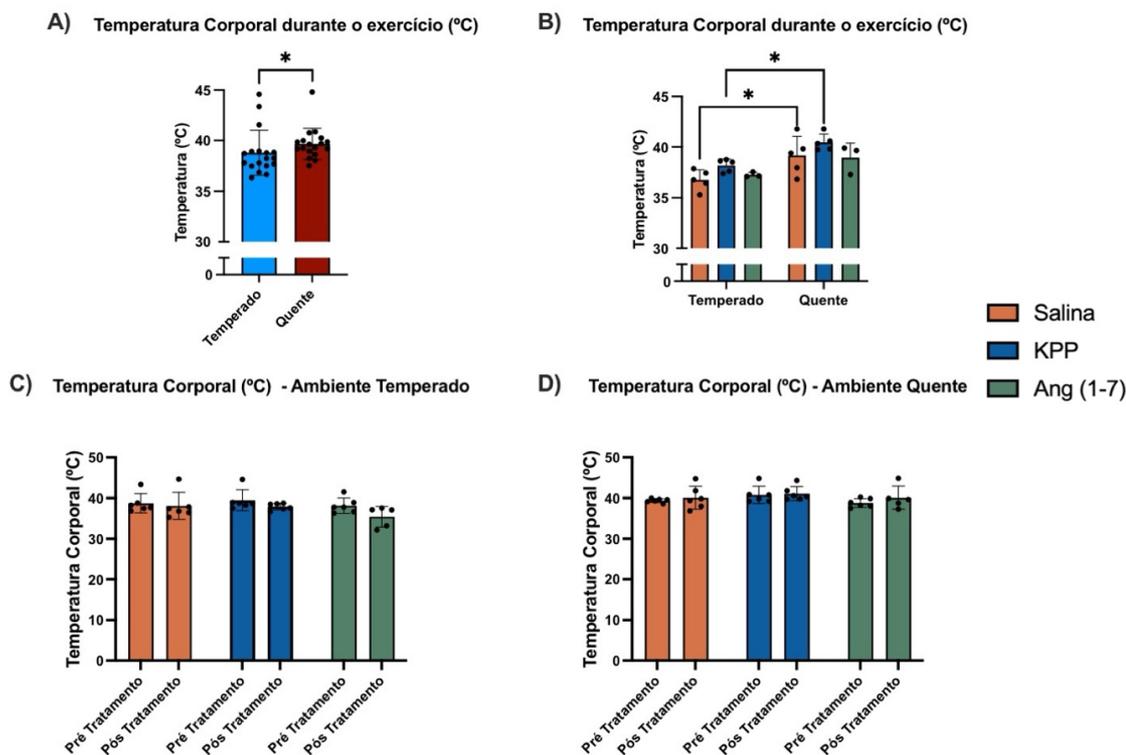


Figura 18. Variações de Temperatura Corporal em Ambientes Temperado e Quente e Efeitos dos Tratamentos. A) Mostra que a temperatura corporal dos camundongos foi significativamente maior no ambiente quente do que no temperado, independentemente do tratamento administrado (analisada por teste t de Student para amostras pareadas). B) Exibe diferenças estatísticas entre os tratamentos nos dois ambientes, exceto para o grupo Ang-(1-7), que manteve uma temperatura mais consistente entre os ambientes. C) Demonstra que não houve diferença significativa na temperatura corporal entre os diferentes tratamentos no ambiente temperado. D) Mostra que não foram observadas diferenças estatísticas na temperatura corporal entre os tratamentos no ambiente quente. As análises das imagens B, C e D foram realizadas por ANOVA de duas vias (two-way ANOVA), seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. \*P < 0,05.

#### 4.2.2.4. Impacto dos tratamentos e da temperatura ambiente no desempenho físico

A Fig. 19 representa os dados obtidos a partir dos testes de desempenho físico em esteira rolante realizados em condições de ambiente temperado (22 °C) e ambiente quente (32 °C), nos momentos pré e pós-tratamento com Salina, KPP e Ang-(1-7). As variáveis analisadas foram: tempo até a fadiga e velocidade máxima atingida. Nos dois ambientes, temperado e quente, o tempo até a fadiga (A e B) e a velocidade máxima atingida (C e D) não apresentaram diferenças significativas entre os momentos pré e pós-tratamento nos três grupos experimentais (Salina, KPP e Ang-(1-7)). Isso sugere que os tratamentos não alteraram de forma relevante a resistência

e performance dos camundongos.

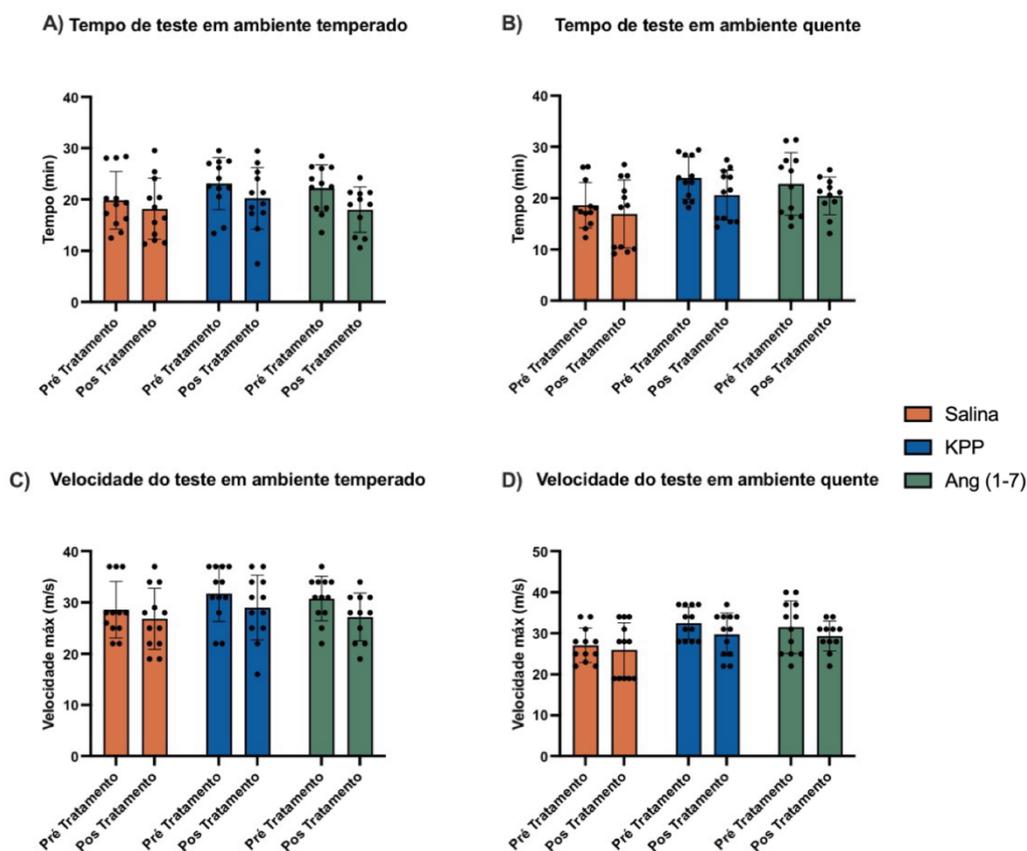


Figura 19. Impacto dos tratamentos e da temperatura ambiente no desempenho físico. A) Exibe o tempo até a fadiga nos momentos pré e pós-tratamento em ambiente temperado. B) Apresenta o tempo até a fadiga nos momentos pré e pós-tratamento em ambiente quente. C) Mostra que a velocidade máxima atingida no ambiente temperado foi semelhante entre os tratamentos e os momentos pré e pós-tratamento. D) Indica que a velocidade máxima atingida no ambiente quente foi semelhante entre os tratamentos e os momentos pré e pós-tratamento. Os dados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) e analisados por ANOVA de duas vias, seguida pelo teste de comparações múltiplas de Sidak.

## 5. DISCUSSÃO

A crescente valorização da prática de exercícios físicos tem levado um número cada vez maior de pessoas a adotar um estilo de vida ativo e saudável, em consonância com a definição da Organização Mundial da Saúde (OMS), que entende saúde como um estado de completo bem-estar físico, mental e social, e não apenas a ausência de enfermidades. Paralelamente, a expansão de eventos esportivos e a popularização de novas modalidades têm impulsionado políticas públicas focadas na promoção de estilos de vida saudáveis. Entre os inúmeros benefícios da atividade física, destacam-se a melhora da saúde cardiovascular, o controle de peso, a redução de ansiedade e depressão, bem como o fortalecimento do sistema imunológico (Warburton, Nicol, and Bredin, 2006; Miller et al., 2016; Warburton and Bredin, 2017).

Nesse cenário, a HA destaca-se como uma preocupação significativa, sendo o fator de risco mais prevalente para doenças cardiovasculares em atletas de elite (Berge *et al.*, 2015). Apesar de a prática moderada e regular de esportes trazer benefícios para o sistema cardiovascular, atividades intensas e prolongadas, como o triatlo e o ciclismo de estrada, podem resultar em hipertensão sistólica de esforço e remodelações cardíacas patológicas, incluindo fibrose miocárdica e arritmias ventriculares, observadas com frequência em atletas veteranos (Hilken et al., 2023). Além disso, a hipertensão do jaleco branco, recorrente durante avaliações pré-participação, destaca a importância de medições fora do consultório para uma avaliação mais precisa da pressão arterial (Leddy & Izzo, 2009). Medicamentos anti-hipertensivos tradicionais, como diuréticos e beta-bloqueadores, apresentam limitações no uso por atletas devido ao impacto no desempenho físico e ao fato de serem classificados como substâncias proibidas por regulamentações antidopings (Leddy & Izzo, 2009; Cadwallader et al., 2010).

Nesse contexto, o presente estudo analisou os efeitos do tripeptídeo KPP (H-Lys-Pro-Pro-OH), um análogo do peptídeo TsHpT-I derivado da peçonha do escorpião amarelo *Tityus serrulatus* (Thiago Verano-Braga et al., 2010), como uma abordagem terapêutica inovadora para controle da pressão arterial em praticantes de atividades físicas intensas. Diferentemente de medicamentos convencionais, o KPP demonstra um perfil promissor, sem efeitos ergogênicos ou ergolíticos, alinhando-se às regulamentações do Comitê Olímpico Internacional (COI) e da

Agência Mundial Antidoping (WADA) (WADA, 2009). Além disso, o KPP destaca-se por sua segurança cardiovascular potencial, ajudando a mitigar riscos associados ao overtraining, como o estresse oxidativo e a perda da homeostasia, ambos entre os principais desafios enfrentados por atletas de alta intensidade (Ferreira et al., 2007). A relevância deste estudo é ampliada pelo aumento de atletas amadores e profissionais que buscam alternativas seguras para otimizar desempenho e saúde cardiovascular, em um contexto em que a hipertensão e suas complicações frequentemente são subdiagnosticadas e subtratadas em populações atléticas.

Nossos resultados demonstram que o KPP possui um efeito anti-hipertensivo sem inibir a ECA, como relatado por Verano-Braga *et al.* (2010) e confirmado neste estudo; o que o diferencia dos inibidores convencionais de ECA, como o Captopril e Enalapril, que frequentemente causam efeitos adversos, como tosse e angioedema (Vasconcelos et al., 2007). Esse efeito foi corroborado por estudos prévios que indicam que peptídeos de origem animal, especialmente de peçonhas, possuem propriedades farmacológicas vantajosas, incluindo a modulação do sistema vasodilatador (Verano-Braga *et al.*, 2008; Verano-Braga *et al.*, 2010). Diferente dos inibidores tradicionais de ECA, o KPP atua potencializando a bradicinina e é agonista do receptor B2R, o principal mediador da Bradicinina, induzindo a vasodilatação por meio da síntese de NO (Gómez-Mendonza *et al.*, 2020). Esse mecanismo sugere que o KPP pode oferecer uma alternativa mais segura e eficaz para indivíduos hipertensos e atletas, que precisam manter o equilíbrio hemodinâmico sem efeitos colaterais, ergogênicos ou ergolíticos que interfiram na performance (Ferreira, 1965; Soffer, 1976).

Nos experimentos realizados em ambiente quente, observou-se que o exercício físico elevou significativamente a temperatura corporal dos animais, conforme já descrito por Zanetti et al. (2024). No entanto, a administração do composto KPP não comprometeu a capacidade dos animais de responder ao estresse térmico, indicando que esse composto não impediu o aumento natural da temperatura corporal associado a exercícios com alta demanda energética, conforme ilustrado na Fig. 18B.

Estudos prévios, como o de Martins e Santos (2012), já demonstraram que atividades físicas intensas em ambientes quentes aumentam a carga cardiovascular e o fluxo sanguíneo cutâneo, ajustes fisiológicos essenciais para a termorregulação. Embora o KPP não tenha sido capaz de modular diretamente essa resposta

termorregulatória, foi possível observar um efeito protetor nos animais que receberam Ang-(1-7). Esse efeito sugere que a Ang-(1-7) possui propriedades vasodilatadoras e anti-inflamatórias que podem facilitar a dissipação de calor, reduzindo o impacto do estresse térmico sobre os animais em condições de calor intenso.

Esses achados indicam que a Ang-(1-7) pode desempenhar um papel importante na proteção contra o aumento excessivo da temperatura corporal durante exercícios em ambiente quente, enquanto o KPP não afeta significativamente esse mecanismo de adaptação térmica.

Nesse contexto, a ação do KPP em reduzir a pressão arterial sem afetar o desempenho sugere que ele pode beneficiar atletas de resistência, mantendo a pressão dentro de faixas seguras, sem comprometer a resposta cardiovascular necessária para a termorregulação durante o exercício em ambiente temperado ou quente (Verano-Braga *et al.*, 2010; Castro *et al.*, 2014).

Os testes de força (Fig. 17) não mostraram alterações significativas no desempenho muscular, reforçando que o KPP não apresenta efeitos ergogênicos ou ergolíticos que possam interferir negativamente em esportes que exigem força e resistência. Essa ausência de impacto ergogênico é relevante, considerando que o uso de substâncias que alteram artificialmente a força muscular é proibido em competições esportivas, segundo regulamentações antidopings (WADA, 2020). Além disso, a manutenção da força sugere que o KPP respeita o processo de simpatólise funcional, um mecanismo que redistribui o fluxo sanguíneo aos músculos durante o exercício. Segundo (Gliemann *et al.*, 2019), a simpatólise funcional ajusta o controle do fluxo sanguíneo sem gerar vasoconstrição desnecessária nos músculos ativos. Esses achados confirmam o potencial do KPP como uma alternativa segura para manejo da hipertensão, sem prejudicar a função muscular ou o desempenho em atividades físicas de alta demanda.

Um ponto relevante para o uso do KPP em contextos esportivos é justamente sua ausência de efeitos ergogênicos e ergolíticos, que possibilita sua aplicação como uma alternativa prática e ética para o controle da pressão arterial em atletas hipertensos. Essa segurança em termos de performance reforça a viabilidade do KPP como opção terapêutica, promovendo estabilidade cardiovascular sem o comprometimento do desempenho físico, e representando uma inovação biofarmacêutica para o tratamento da hipertensão.

Além disso, os resultados sugerem que o KPP possui um perfil de ação uniforme em diferentes estados hormonais das fêmeas, conforme a Fig.13, sem variação de efeito associada ao ciclo estral, o que amplia seu potencial de uso para populações femininas que possam apresentar flutuações hormonais. Estudos anteriores apontam que fases distintas do ciclo estral podem alterar a resposta cardiovascular, o que não foi observado com o uso do KPP neste estudo (*Lebrun et al.*, 1995; *Conti et al.*, 2011; *Julian et al.*, 2017; *Ayala-Méndez et al.*, 2023). Isso ressalta o potencial do KPP como agente anti-hipertensivo para mulheres hipertensas que praticam atividades físicas intensas, sugerindo efeitos consistentes independentemente de variações hormonais. Contudo, é importante destacar que, nas doses testadas, o KPP não induziu um efeito anti-hipertensivo nas fêmeas comparável ao observado em machos.

Em comparação com outros peptídeos bioativos, o KPP se destaca pela segurança e ausência de efeitos colaterais dependentes da ECA, e esses achados apoiam a viabilidade de estudos em modelos mais próximos ao humano, com possibilidade de ensaios clínicos que abordem potencial toxicidade e perfis adversos ainda não investigados (*Gómez-Mendonza et al.*, 2020).

Concluindo, os resultados deste estudo posicionam o KPP como um candidato promissor para desenvolvimento de novos tratamentos anti-hipertensivos, especialmente em contextos que envolvem atividade física intensa. Aplicar essas tecnologias na formulação do KPP pode potencializar o seu uso clínico, garantindo uma liberação mais eficiente e controlada no organismo. Essa abordagem reforça a importância de integrar biotecnologia e inovação farmacêutica para superar desafios inerentes às propriedades físico-químicas de moléculas naturais. Estudos futuros poderão aprofundar a investigação dos efeitos do KPP em diferentes condições fisiológicas, buscando também avaliar o impacto em biomarcadores e vias de sinalização cardiovascular. Esses achados indicam que o KPP tem o potencial de ser uma alternativa biofarmacêutica segura para o controle da hipertensão, promovendo a qualidade de vida de hipertensos fisicamente ativos e oferecendo uma opção inovadora e segura na medicina esportiva. A originalidade e a relevância dos dados contribuem para o avanço da pesquisa sobre peptídeos de peçonhas como agentes terapêuticos, destacando seu potencial em novas abordagens para doenças cardiovasculares e na promoção de segurança em práticas esportivas.

## 6. CONCLUSÕES

Os achados deste estudo sugerem que o peptídeo KPP possui um efeito anti-hipertensivo significativo em um modelo experimental de hipertensão em ratos machos, sem afetar negativamente o desempenho de força ou resistência durante o exercício físico em camundongos. Esses resultados destacam o potencial inovador do KPP como uma alternativa biofarmacêutica para o manejo da hipertensão em populações específicas, como atletas, que frequentemente enfrentam limitações com medicamentos tradicionais, como inibidores da ECA, beta-bloqueadores e diuréticos.

Além disso, o KPP se destaca como uma solução potencialmente segura, livre de efeitos colaterais como tosse ou angioedema, e sem representar risco de violações de doping. Essa vantagem tecnológica posiciona o KPP como uma opção estratégica para atletas hipertensos, proporcionando um controle eficaz da pressão arterial sem comprometer o desempenho físico.

Por fim, este trabalho representa uma importante contribuição inicial para o entendimento dos efeitos do KPP, mas ressalta a necessidade de pesquisas adicionais para avaliar seu impacto em protocolos de treinamento, e não apenas em exercícios agudos. Estudos clínicos em humanos serão essenciais para confirmar sua aplicabilidade e segurança, ampliando suas implicações nos campos da fisiologia do exercício e da farmacologia esportiva.

## 7. LIMITAÇÕES DO TRABALHO E PERSPECTIVAS

Ao interpretar os resultados deste estudo, é essencial considerar algumas limitações. Primeiramente, o efeito anti-hipertensivo do KPP mostrou-se menos pronunciado em ratas, o que sugere a necessidade de investigar possíveis diferenças sexuais na resposta ao peptídeo. Além disso, a ausência de testes com outras doses restringe a compreensão da relação dose-resposta e da otimização dos efeitos terapêuticos.

Outro ponto relevante diz respeito aos modelos experimentais adotados: enquanto os testes cardiovasculares foram realizados em ratos com administração intravenosa, os experimentos de exercício físico utilizaram camundongos com administração oral. Essa diferença metodológica pode influenciar a interpretação dos achados. Apesar de a administração oral ter demonstrado efeito, feita apenas com KPP diluído em solução salina, indica a necessidade de desenvolver formulações específicas para futuras aplicações clínicas.

Ainda assim, é importante destacar que, como o peptídeo foi capaz de induzir algum efeito vascular, evidenciado pela alteração na temperatura corporal após a sua administração, o KPP parece ser resistente à ação de enzimas proteolíticas encontradas no trato gastrintestinal e ser capaz de ser absorvido pela sua mucosa intestinal, reforçando seu potencial terapêutico.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agarwal, Deepmala, Michael A. Welsch, Jeffrey N. Keller, and Joseph Francis. 2011. "Chronic Exercise Modulates RAS Components and Improves Balance between Pro- and Anti-Inflammatory Cytokines in the Brain of SHR." *Basic Research in Cardiology* 106 (6): 1069. <https://doi.org/10.1007/s00395-011-0231-7>.

B, Rates; Ferraz, K.K.; Borges, M.H.; Richardson, M.; De Lima, M.E.; Pimenta, A.M.C. *Tityus serrulatus venom peptidomics: assessing venom peptide diversity*. PubMed. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18718845/>.

Bader, Michael, U. Muscha Steckelings, Natalia Alenina, Robson A. S. Santos, and Carlos M. Ferrario. 2024. "Alternative Renin-Angiotensin System." *Hypertension* (Dallas, Tex.: 1979), February. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.123.21364>.

Bai, Yongli, Bahman Jabbari, Shaohua Ye, Vito M. Campese, and Nosratola D. Vaziri. 2009. "Regional Expression of NAD(P)H Oxidase and Superoxide Dismutase in the Brain of Rats with Neurogenic Hypertension." *American Journal of Nephrology* 29 (5): 483–92. <https://doi.org/10.1159/000178817>.

Barbosa, a. A. M., d. N. Dudek, m. D. Maria, and a. C. C. Sanches. 2008. "frequência de efeitos adversos causados por inibidores da enzima conversora da angiotensina relatados por pacientes atendidos na unidade básica de saúde – laranjal – pr." *Visão Acadêmica* 9 (2). <https://doi.org/10.5380/acd.v9i2.14645>.

Basso, Nidia, and Norberto A. Terragno. 2001. "History About the Discovery of the Renin-Angiotensin System." *Hypertension* 38 (6): 1246–49. <https://doi.org/10.1161/hy1201.101214>.

Baxter, G. F., and Z. Ebrahim. 2002. "Role of Bradykinin in Preconditioning and Protection of the Ischaemic Myocardium." *British Journal of Pharmacology* 135 (4): 843–54. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0704548>.

Becegato M, Silva RH. Object recognition tasks in rats: Does sex matter? *Front Behav*

Neurosci. 2022 Aug 12;16:970452. PMID: 36035023; PMCID: PMC9412164. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2022.970452> .

Becker, Lenice Kappes, Nádia Lúcia Totou, Mariana Flávia Oliveira, Daniel Barbosa Coelho, Emerson Cruz de Oliveira, Daisy Motta-Santos, Emerson Silami-Garcia, Maria José Campagnole-Santos, and Robson Augusto Souza Santos. 2019. “Lifetime Overproduction of Circulating Angiotensin-(1-7) in Rats Attenuates the Increase in Skeletal Muscle Damage Biomarkers after Exhaustive Exercise.” *The Chinese Journal of Physiology* 62 (5): 226–30. [https://doi.org/10.4103/CJP.CJP\\_57\\_19](https://doi.org/10.4103/CJP.CJP_57_19).

Berge, Hilde Moseby; ISERN, Cecilie Benedicte; Berge, Eivind. Blood pressure and hypertension in athletes: a systematic review. *British Journal of Sports Medicine*, [s.l.], v. 49, n. 11, p. 716–723, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1136/bjsports-2014-093976>.

Bhoola, K. D., C. D. Figueroa, and K. Worthy. 1992. “Bioregulation of Kinins: Kallikreins, Kininogens, and Kininases.” *Pharmacological Reviews* 44 (1): 1–80.

Blaukat, A. 2003. “Structure and Signalling Pathways of Kinin Receptors.” *Andrologia* 35 (1): 17–23. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0272.2003.00533.x>.

Bortoluzzi, Luis Roberval, Marcus Vinícius Morini Querol, and Enrique Querol. n.d. “Notas sobre a ocorrência de *Tityus serrulatus* Lutz & Mello, 1922 (Scorpiones, Buthidae) no oeste do Rio Grande do Sul, Brasil.” Accessed October 14, 2024. <https://www.scielo.br/j/bn/a/CNyztTSLB4tK5qCYfnXsZ3R/?lang=pt>.

Brew K. Structure of human ACE gives new insights into inhibitor binding and design. *Trends Pharmacol Sci* 2003; 24(8): 391-4.

Cadwallader, Amy B, Xavier De La Torre, Alessandra Tieri, and Francesco Botrè. 2010. “The Abuse of Diuretics as Performance-Enhancing Drugs and Masking Agents in Sport Doping: Pharmacology, Toxicology and Analysis.” *British Journal of Pharmacology* 161 (1): 1–16. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.00789.x>.

Campbell, D.J. 2000. "Towards Understanding the Kallikrein-Kinin System: Insights from Measurement of Kinin Peptides." *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 33 (6): 665–77. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2000000600008>.

Campbell, Norm R.C., Melanie Paccot Burnens, Paul K. Whelton, Sonia Y. Angell, Marc G. Jaffe, Jennifer Cohn, Alfredo Espinosa Brito, et al. 2022. "Diretrizes de 2021 Da Organização Mundial Da Saúde Sobre o Tratamento Medicamentoso Da Hipertensão Arterial: Repercussões Para as Políticas Na Região Das Américas." *Revista Panamericana de Salud Pública* 46 (May): e55. <https://doi.org/10.26633/RPSP.2022.55>.

Caspersen, C. J., K. E. Powell, and G. M. Christenson. 1985. "Physical Activity, Exercise, and Physical Fitness: Definitions and Distinctions for Health-Related Research." *Public Health Reports* (Washington, D.C.: 1974) 100 (2): 126–31.

Cillekens, Bart, Matthias Lang, Willem van Mechelen, Evert Verhagen, Maaïke A. Huysmans, Andreas Holtermann, Allard J. van der Beek, and Pieter Coenen. 2020. "How Does Occupational Physical Activity Influence Health? An Umbrella Review of 23 Health Outcomes across 158 Observational Studies," December. <https://doi.org/10.1136/bjsports-2020-102587>.

Coelho, J., Ferreira, P., Alves, P., Cordeiro, R., Fonseca, A., Góis, J., & Gil, M. (2010). Drug delivery systems: Advanced technologies potentially applicable in personalized treatments. *O Jornal EPMA* ,1, 164 - 209. <https://doi.org/10.1007/s13167-010-0001-x>.

Colman, Robert W., and Alvin H. Schmaier. 1997. "Contact System: A Vascular Biology Modulator With Anticoagulant, Profibrinolytic, Antiadhesive, and Proinflammatory Attributes." *Blood* 90 (10): 3819–43. <https://doi.org/10.1182/blood.V90.10.3819>.

Conti, Filipe Fernandes, Iris Callado Sanches, Danielle da Silva Dias, Sebastião de Brito, Michelle Sartori, Maria Cláudia Irigoyen, and Kátia De Angelis. 2011. "Influence of Female Sexual Hormones on Exercise Capacity and on Cardiovascular Autonomic

Modulation.” The FASEB Journal 25 (S1): 1108.2-1108.2.  
[https://doi.org/10.1096/fasebj.25.1\\_supplement.1108.2](https://doi.org/10.1096/fasebj.25.1_supplement.1108.2).

Costa, Gg, Serejo Lfm, Coelho Js, Cândido Dm, Gadelha Madc, and Pardal Ppo. 2020. “First Report of Scorpionism Caused by *Tityus serrulatus*, Described by Lutz and Mello, 1922 (Scorpiones, Buthidae), a Species Non-Native to the State of Pará, Brazilian Amazon.” *PubMed*. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32187336/>.

Costa, Rafael R. et al. New insights into the hypotensins from *Tityus serrulatus* venom: Pro-inflammatory and vasopeptidases modulation activities. *Toxins*, v. 13, n. 12, p. 846, 2021. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6651/13/12/846>.

Cotton J; Hayashi MA; Cuniasse P; Vazeux G; lanzer D; Camargo ACM; Dive V. Selective inhibition of the C-domain of angiotensin I converting enzyme by bradykinin potentiating peptides. *Biochemistry* 2002; 41: 6065-71.

Cummins, P. M., and B. O’Connor. 1998. “Pyroglutamyl Peptidase: An Overview of the Three Known Enzymatic Forms.” *Biochimica Et Biophysica Acta* 1429 (1): 1–17.  
[https://doi.org/10.1016/s0167-4838\(98\)00248-9](https://doi.org/10.1016/s0167-4838(98)00248-9).

Cushman, D. W., and M. A. Ondetti. 1980. “Inhibitors of Angiotensin-Converting Enzyme.” *Progress in Medicinal Chemistry* 17:41–104. [https://doi.org/10.1016/s0079-6468\(08\)70157-7](https://doi.org/10.1016/s0079-6468(08)70157-7).

Cushman, D. W., and M. A. Ondetti. 1991. “History of the Design of Captopril and Related Inhibitors of Angiotensin Converting Enzyme.” *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)* 17 (4): 589–92. <https://doi.org/10.1161/01.hyp.17.4.589>.

Cushman, D. W., H. S. Cheung, E. F. Sabo, B. Rubin, and M. A. Ondetti. 1979. “Development of Specific Inhibitors of Angiotensin I Converting Enzyme (Kininase II).” *Federation Proceedings* 38 (13): 2778–82.

Danielle G. Nascimento, Breno Rates, Daniel M. Santos, Thiago Verano-Braga, Adriano Barbosa-Silva, Alexandre A.A. Dutra, Ilka Biondi, Marie France Martin-Eauclaire, Maria Elena De Lima, Adriano M.C. Pimenta,

Deschepper, C. F. 1994. "Angiotensinogen: Hormonal Regulation and Relative Importance in the Generation of Angiotensin II." *Kidney International* 46 (6): 1561–63. <https://doi.org/10.1038/ki.1994.446>.

Dias, N.B.; De Souza, B.M.; Cid-Alda, F.; Dorce, V.A.C.; Cocchi, F.K.; Palma, M.S. *Profiling the linear peptides of venom from the Brazilian scorpion Tityus serrulatus: structural and functional characterization*. PubMed. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38408354/>.

Dias, Nb, de Souza Bm, Cid-Alda F, Dorce Vac, Cocchi Fk, and Palma Ms. 2024. "Profiling the Linear Peptides of Venom from the Brazilian Scorpion *Tityus serrulatus*: Structural and Functional Characterization." *PubMed*. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38408354/>.

Dong, Ruolan, Xizhen Xu, Geng Li, Wenjing Feng, Gang Zhao, Junjie Zhao, Dao Wen Wang, and Ling Tu. 2013. "Bradykinin Inhibits Oxidative Stress-Induced Cardiomyocytes Senescence via Regulating Redox State." *PLoS ONE* 8 (10): e77034. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077034>.

Duka, Arvi, Irena Duka, Guohong Gao, Sherene Shenouda, Irene Gavras, and Haralambos Gavras. 2006. "Role of Bradykinin B1 and B2 Receptors in Normal Blood Pressure Regulation." *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 291 (2): E268-274. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00382.2005>.

Erdős, E. G. 1990. "Angiotensin I Converting Enzyme and the Changes in Our Concepts through the Years. Lewis K. Dahl Memorial Lecture." *Hypertension* (Dallas, Tex.: 1979) 16 (4): 363–70. <https://doi.org/10.1161/01.hyp.16.4.363>.

Fernandez JH; Neshich G; Camargo ACM. Using bradykinin-potentiating peptide structures to develop new antihypertensive drugs. *Genet Mol Res* 2004; 3(4): 554-63.

Ferreira, Filipe, Rita Ferreira, and José Duarte. 2007. "Stress Oxidativo e Dano Oxidativo Muscular Esquelético: Influência Do Exercício Agudo Inabitual e Do Treino Físico." *Revista Portuguesa de Ciências Do Desporto* 7 (February): 257–75.

<https://doi.org/10.5628/rpcd.07.02.257>.

Ferreira, L. A., E. W. Alves, and O. B. Henriques. 1993. "Peptide T, a Novel Bradykinin Potentiator Isolated from Tityus Serrulatus Scorpion Venom." *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology* 31 (8): 941–47. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(93\)90253-f](https://doi.org/10.1016/0041-0101(93)90253-f).

Ferreira, L. A., W. E. Alves, M. S. Lucas, and G. G. Habermehl. 1996. "Isolation and Characterization of a Bradykinin Potentiating Peptide (BPP-S) Isolated from Scaptocosa Raptoria Venom." *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology* 34 (5): 599–603. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(96\)00010-4](https://doi.org/10.1016/0041-0101(96)00010-4).

Ferreira, S. H. 1965. "a bradykinin-potentiating factor (bpf) present in the venom of bothrops jararaca." *British Journal of Pharmacology and Chemotherapy* 24 (1): 163–69. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1965.tb02091.x>.

Ferretti, Pedro Henrique Sena, and Samuel Penna Wanner. 2022. "Effectiveness of Regular Physical Activity in Preventing the Progression of Arterial Hypertension: Improved Cardiovascular Autonomic Control during Sleep." *Hypertension Research: Official Journal of the Japanese Society of Hypertension* 45 (7): 1213–16. <https://doi.org/10.1038/s41440-022-00942-z>.

Fraga-Silva, R., Costa-Fraga, F., De Sousa, F., Alenina, N., Bader, M., Sinisterra, R., & Santos, R. (2011). An orally active formulation of angiotensin-(1-7) produces an antithrombotic effect. *Clinics*, 66, 837 - 841. <https://doi.org/10.1590/S1807-59322011000500021>.

Fry, Rod W., Alan R. Morton, and David Keast. 1991. "Overtraining in Athletes." *Sports Medicine* 12 (1): 32–65. <https://doi.org/10.2165/00007256-199112010-00004>.

Fu, Zhuo, Lina Zhao, Kevin W. Aylor, Robert M. Carey, Eugene J. Barrett, and Zhenqi Liu. 2014. "Angiotensin-(1-7) Recruits Muscle Microvasculature and Enhances Insulin's Metabolic Action via Mas Receptor." *Hypertension* 63 (6): 1219–27.

<https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.03025>.

Fuzita, Felipe J., Martijn W. H. Pinkse, José S. L. Patane, Maria A. Juliano, Peter D. E. M. Verhaert, and Adriana R. Lopes. n.d. "Biochemical, Transcriptomic and Proteomic Analyses of Digestion in the Scorpion *Tityus serrulatus*: Insights into Function and Evolution of Digestion in an Ancient Arthropod." <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123841>.

Galvão, André, Elzylene Palazzo, Mildre Pinto, and Manuela Vieira. 2014. "Importance of Inflammation in Hypertension - Review." *Nucleus Animalium* 6 (May): 47–57. <https://doi.org/10.3738/1982.2278.1012>.

Gliemann, Lasse, Camilla Vestergaard Hansen, Nicolai Rytter, and Ylva Hellsten. 2019. "Regulation of Skeletal Muscle Blood Flow during Exercise." *Current Opinion in Physiology, Exercise Physiology*, 10 (August): 146–55. <https://doi.org/10.1016/j.cophys.2019.05.001>.

Gómez-mendoza, Diana P.; Lemos, Rafael P.; Jesus, Iara; Gorshkov, Vladimir; Mckinnie, Steven M. K.; Vederas, John C.; Kjeldsen, Frank; Guatimosim, Silvia; Santos, Robson .; Pimenta, Adriano M. C.; Verano-Braga, Thiago. Moving pieces in a cellular puzzle: a cryptic peptide from the scorpion toxin Ts14 activates AKT and ERK signaling and decreases cardiac myocyte contractility via dephosphorylation of phospholamban. *Journal of Proteome Research*, v. 19, n. 8, p. 3200-3211, 2020.

Goto, Mahiko, Yongge Liu, Xi-Ming Yang, Jeffrey L. Ardell, Michael V. Cohen, and James M. Downey. 1995. "Role of Bradykinin in Protection of Ischemic Preconditioning in Rabbit Hearts." *Circulation Research* 77 (3): 611–21. <https://doi.org/10.1161/01.RES.77.3.611>.

Hall, John E., Joey P. Granger, Jussara M. do Carmo, Alexandre A. da Silva, John Dubinion, Eric George, Shereen Hamza, Joshua Speed, and Michael E. Hall. 2012. "Hypertension: Physiology and Pathophysiology." In *Comprehensive Physiology*, 2393–2442. John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/cphy.c110058>.

Hanna, Ibrahim R., Yoshihiro Taniyama, Katalin Szöcs, Petra Rocic, and Kathy K. Griendling. 2002. "NAD(P)H Oxidase-Derived Reactive Oxygen Species as Mediators of Angiotensin II Signaling." *Antioxidants & Redox Signaling* 4 (6): 899–914. <https://doi.org/10.1089/152308602762197443>.

Hayashi MA; Murbach AF; lanzer D; Portaro FC; Prezoto BC; Fernandez BL; Silveira PF; Silva CA; Pires RS; Britto LR; Dive V; Camargo ACM. The C-type natriuretic peptide precursor of snake brain contains highly specific inhibitors of the angiotensin-converting enzyme. *J Neurochem* 2003; 85: 969-77.

Hess, J. F., J. A. Borkowski, G. S. Young, C. D. Strader, and R. W. Ransom. 1992. "Cloning and Pharmacological Characterization of a Human Bradykinin (BK-2) Receptor." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 184 (1): 260–68. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(92\)91187-u](https://doi.org/10.1016/0006-291x(92)91187-u).

Hillmeister, P., and P. B. Persson. 2012. "The Kallikrein–Kinin System." *Acta Physiologica* 206 (4): 215–19. <https://doi.org/10.1111/apha.12007>.

Hilkens, Luuk; Van schijndel, Nick; Weijer, Vera; Boerboom, Marleen; Van Der Burg, Esther; Peters, Velibor; Kempers, Robert; Bons, Judith; Van Loon, Luc J.C.; Van Dijk, Jan-Willem. Low bone mineral density and associated risk factors in elite cyclists at different stages of a professional cycling career. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, [s.l.], v. 55, n. 1, p. 10-18, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1249/MSS.0000000000003113>.

lanzer, Danielle, Katsuhiko Konno, Rafael Marques-Porto, Fernanda Calheta Vieira Portaro, Reto Stöcklin, Antônio Carlos Martins de Camargo, and Daniel Carvalho Pimenta. 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 (7): 1085–92. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2004.04.006>.

Jiang, Yingchun, Xinping Xi, Lilin Ge, Nan Yang, Xiaojuan Hou, Jie Ma, Chengbang Ma, et al. 2014. "Bradykinin-Related Peptides (BRPs) from Skin Secretions of Three

Genera of Phyllomedusine Leaf Frogs and Their Comparative Pharmacological Effects on Mammalian Smooth Muscles.” *Peptides* 52 (February): 122–33. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2013.12.013>.

Julian, Ross, Anne Hecksteden, Hugh H. K. Fullagar, and Tim Meyer. 2017. “The Effects of Menstrual Cycle Phase on Physical Performance in Female Soccer Players.” *PLOS ONE* 12 (3): e0173951. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173951>.

Kalapothakis, Y, Miranda K, Pereira Ah, Witt Asa, Marani C, Martins Ap, Leal Hg, et al. 2021. “Novel Components of *Tityus serrulatus* Venom: A Transcriptomic Approach.” *PubMed*. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33181162/>.

Kaplan, Allen, Henry Meier, and Robert Mandle. 2008. “The Hageman Factor Dependent Pathways of Coagulation, Fibrinolysis, and Kinin-Generation.” *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 3 (01): 1–26. <https://doi.org/10.1055/s-0028-1087162>.

La Rovere, Maria Teresa, Chiara Bersano, Marco Gnemmi, Giuseppe Specchia, and Peter J. Schwartz. 2002. “Exercise-Induced Increase in Baroreflex Sensitivity Predicts Improved Prognosis after Myocardial Infarction.” *Circulation* 106 (8): 945–49. <https://doi.org/10.1161/01.cir.0000027565.12764.e1>.

Lacerda, Débora Romualdo, Albená Nunes-Silva, Ana Letícia Malheiros Silveira, Kátia Anunciação Costa, Débora Fernandes Rodrigues, Michele Macedo Moraes, Vanessa Pinho, et al. 2023. “Acute Exercise Modulates the Inflammatory Response in Adipose Tissue in Both Lean and Obese Mice.” *Nutrition* (Burbank, Los Angeles County, Calif.) 115 (November): 112092. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2023.112092>.

Lebrun, Constance M., Donald C. McKENZIE, Jerilynn C. Prior, and Jack E. Taunton. 1995. “Effects of Menstrual Cycle Phase on Athletic Performance.” *Medicine & Science in Sports & Exercise* 27 (3): 437.

Leddy JJ, Izzo J. Hypertension in athletes. *J Clin Hypertens* (Greenwich). 2009 Apr;11(4):226-33. doi: 10.1111/j.1751-7176.2009.00100.x. PMID: 19614807; PMCID: PMC8673157.

Leru, Polliana Mihaela, Vlad Florin Anton and Dumitru Matei. 2021. "Clinical aspects of the safety profile of angiotensin converting enzyme inhibitors. Romanian Journal of Internal Medicine = Ref: Ro J Med Pract. 2021;16(3). DOI: 10.37897/RJMP.2021.3.5

Liu, D., Yang, F., Xiong, F., & Gu, N. (2016). O Sistema Inteligente de Administração de Medicamentos e seu Potencial Clínico. *Theranostics*, 6, 1306 - 1323.  
<https://doi.org/10.7150/thno.14858>.

Lourenço, Wilson R. n.d. "Back to *Tityus serrulatus* Lutz & Mello, 1922 (Scorpiones: Buthidae): New Comments about an Old Species."  
<https://www.scielo.br/j/jvatitd/a/rLkcmnYMV74h8ZgjYSgtTvG/?lang=en>.

Lourenço, Wilson R., and John L. Cloudsley-Thompson. 1999. "Discovery of a Sexual Population of *Tityus serrulatus*, One of the Morphs within the Complex *Tityus stigmurus* (Scorpiones, Buthidae)." *The Journal of Arachnology* 27 (1): 154–58.

Lourenço, Wr. 2015. "What Do We Know about Some of the Most Conspicuous Scorpion Species of the Genus *Tityus*? A Historical Approach." *PubMed*.  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26085830/>.

Lula I, Denadai AL, Resende JM, de Sousa FB, de Lima GF, Pilo-Veloso D, Heine T, Duarte HA, Santos RA, Sinisterra RD. Study of angiotensin-(1-7) vasoactive peptide and its beta-cyclodextrin inclusion complexes: complete sequence-specific NMR assignments and structural studies. *Peptides*. 2007 Nov;28(11):2199-210. doi: 10.1016/j.peptides.2007.08.011. Epub 2007 Aug 19. PMID: 17904691.

Malachias, M. V. B., F. L. Plavnik, C. A. Machado, D. Malta, L. C. N. Scala, and S. Fuchs. 2016. "7a Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial: Capítulo 1 - Conceituação, Epidemiologia e Prevenção Primária." *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* 107 (September): 1–6. <https://doi.org/10.5935/abc.20160151>.

Malta, Deborah Carvalho, Renata Patrícia Fonseca Gonçalves, Ísis Eloah Machado, Maria Imaculada de Fátima Freitas, Cimar Azeredo, and Celia Landman Szwarcwald. 2018. "Prevalência da hipertensão arterial segundo diferentes critérios diagnósticos, Pesquisa Nacional de Saúde." *Revista Brasileira de Epidemiologia* 21 (November):

e180021. <https://doi.org/10.1590/1980-549720180021.supl.1>.

Marceau, F., J. F. Larrivé, E. Saint-Jacques, and D. R. Bachvarov. 1997. "The Kinin B1 Receptor: An Inducible G Protein Coupled Receptor." *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 75 (6): 725–30.

Marques, Fúlvia D., Anderson J. Ferreira, Rubén D. M. Sinisterra, Bruno A. Jacoby, Frederico B. Sousa, Marcelo V. Caliani, Gerluza A. B. Silva, et al. 2011. "An Oral Formulation of Angiotensin-(1-7) Produces Cardioprotective Effects in Infarcted and Isoproterenol-Treated Rats." *Hypertension* (Dallas, Tex.: 1979) 57 (3): 477–83. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.167346>.

Martins, Faber Sérgio Bastos, and José Augusto Rodrigues dos Santos. 2012. "Alterações agudas induzidas por uma prova de triathlon longo em diferentes biomarcadores enzimáticos e da função imune." *Revista Brasileira de Fisiologia do Exercício* 11 (1): 7–12. <https://doi.org/10.33233/rbfe.v11i1.3373>.

Masson, Costa Ts, Yshii L, Fernandes Dc, Soares Pp, Laurindo Fr, Scavone C, and Michelini Lc. 2014. "Time-Dependent Effects of Training on Cardiovascular Control in Spontaneously Hypertensive Rats: Role for Brain Oxidative Stress and Inflammation and Baroreflex Sensitivity." PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24788542/>.

Masson, Gustavo S., Tassia S. R. Costa, Lidia Yshii, Denise C. Fernandes, Pedro Paulo Silva Soares, Francisco R. Laurindo, Cristoforo Scavone, and Lisete C. Michelini. 2014. "Time-Dependent Effects of Training on Cardiovascular Control in Spontaneously Hypertensive Rats: Role for Brain Oxidative Stress and Inflammation and Baroreflex Sensitivity." Edited by Henning Ulrich. *PLoS ONE* 9 (5): e94927. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094927>.

Matthiesen, F. A. 1962. "Parthenogenesis in Scorpions." *Evolution* 16 (2): 255–56. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1962.tb03217.x>.

McIntosh M, Cruz LJ, Hunkapiller MW, Gray WR, Olivera BM. Isolation and structure of a peptide toxin from the marine snail *Conus magus*. *Arch Biochem Biophys*. 1982 Oct 1;218(1):329-34. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(82\)90351-4](https://doi.org/10.1016/0003-9861(82)90351-4) .

Menke, J. G., J. A. Borkowski, K. K. Bierilo, T. MacNeil, A. W. Derrick, K. A. Schneck, R. W. Ransom, C. D. Strader, D. L. Linemeyer, and J. F. Hess. 1994. "Expression Cloning of a Human B1 Bradykinin Receptor." *The Journal of Biological Chemistry* 269 (34): 21583–86.

Miller, Keith R., Stephen A. McClave, Melina B. Jampolis, Ryan T. Hurt, Kristine Krueger, Sarah Landes, and Bryan Collier. 2016. "The Health Benefits of Exercise and Physical Activity." *Current Nutrition Reports* 5 (3): 204–12. <https://doi.org/10.1007/s13668-016-0175-5>.

Mills, Katherine T., Andrei Stefanescu, and Jiang He. 2020. "The Global Epidemiology of Hypertension." *Nature Reviews Nephrology* 16 (4): 223–37. <https://doi.org/10.1038/s41581-019-0244-2>.

Moura, Samara Silva de, Adália Táci Pereira Mendes, Francisco de Assis Dias Martins-Júnior, Nádia Lúcia Totou, Daniel Barbosa Coelho, Emerson Cruz de Oliveira, Daisy Motta-Santos, Robson Augusto Souza Dos Santos, and Lenice Kappes Becker. 2021. "Angiotensin-(1-7) Oral Formulation Improves Physical Performance in Mountain Bike Athletes: A Double-Blinded Crossover Study." *BMC Sports Science, Medicine & Rehabilitation* 13 (1): 47. <https://doi.org/10.1186/s13102-021-00274-4>.

Myers, Jonathan, Paul McAuley, Carl J. Lavie, Jean-Pierre Despres, Ross Arena, and Peter Kokkinos. 2015. "Physical Activity and Cardiorespiratory Fitness as Major Markers of Cardiovascular Risk: Their Independent and Interwoven Importance to Health Status." *Progress in Cardiovascular Diseases* 57 (4): 306–14. <https://doi.org/10.1016/j.pcad.2014.09.011>.

Nascimento, Rates B, Santos Dm, Verano-Braga T, Barbosa-Silva A, Dutra Aa, Biondi I, Martin-Eauclaire Mf, De Lima Me, and Pimenta Am. n.d. "Moving Pieces in a

Taxonomic Puzzle: Venom 2D-LC/MS and Data Clustering Analyses to Infer Phylogenetic Relationships in Some Scorpions from the Buthidae Family (Scorpiones).” PubMed.

Nascimento, Danielle G.; Rates, Breno; Santos, Daniel M.; Verano-Braga, Thiago; Barbosa-Silva, Adriano; Dutra, Alexandre A. A.; Biondi, Ilka; Martin-Eauclaire, Marie France; de Lima, Maria Elena; Pimenta, Adriano M. C. Moving pieces in a taxonomic puzzle: Venom 2D-LC/MS and data clustering analyses to infer phylogenetic relationships in some scorpions from the Buthidae family (Scorpiones). *Toxicon*, v. 47, n. 6, p. 628-639, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.01.015>

Oliveira, Érika Ângela. Avaliação do efeito cardiovascular e anti-hipertensivo de peptídeos sintéticos similares às hipotensinas. Projeto de dissertação (Mestrado Profissional em Inovação Tecnológica e Propriedade Intelectual) — Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2019.

Oliveira, U.C.; Nishiyama Jr, M.Y.; Santos, M.B.V.; Santos-da-Silva, A.P.; Chalkidis, H.M.; Souza-Imberg, A.; Candido, D.M.; Yamanouye, N.; Dorce, V.A.C.; Junqueira-de-Azevedo, I.L.M. *Proteomic endorsed transcriptomic profiles of venom glands from *Tityus obscurus* and *T. serrulatus* scorpions*. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193739>.

Oliveira, Vanessa, Anne E. Kwitek, Curt D. Sigmund, Lisa L. Morselli, and Justin L. Grobe. 2021. “Recent Advances in Hypertension.” *Hypertension* 77 (4): 1061–68. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.120.14513>.

Ondetti, M. A., B. Rubin, and D. W. Cushman. 1977. “Design of Specific Inhibitors of Angiotensin-Converting Enzyme: New Class of Orally Active Antihypertensive Agents.” *Science* (New York, N.Y.) 196 (4288): 441–44. <https://doi.org/10.1126/science.191908>.

Paluska, Scott A., and Thomas L. Schwenk. 2012. “Physical Activity and Mental Health.” *Sports Medicine* 29 (3): 167–80. <https://doi.org/10.2165/00007256-200029030-00003>.

Paul, Martin, Ali Poyan Mehr, and Reinhold Kreutz. 2006. "Physiology of Local Renin-Angiotensin Systems." *Physiological Reviews* 86 (3): 747–803. <https://doi.org/10.1152/physrev.00036.2005>.

Pei, J., Yan, Y., Palanisamy, C., Jayaraman, S., Natarajan, P., Umapathy, V., Gopathy, S., Roy, J., Sadagopan, J., Thalamati, D., & Mironescu, M. (2024). Abordagens de administração de medicamentos baseadas em materiais: avanços recentes e perspectivas futuras. *Green Processing and Synthesis*, 13. <https://doi.org/10.1515/gps-2023-0094>.

Peraire M, Gimeno-Vergara R, Pick-Martin J, Boscá M, Echeverria I. Ziconotide and psychosis: from a case report to a scoping review. *Front Mol Neurosci*. 2024 Oct 16;17:1412855. doi: 10.3389/fnmol.2024.1412855.

Persson, P. B., A. Skalweit, and B. J. Thiele. 2004. "Controlling the Release and Production of Renin." *Acta Physiologica Scandinavica* 181 (4): 375–81. <https://doi.org/10.1111/j.1365-201X.2004.01308.x>.

Pesquero, João B., and Michael Bader. 2006. "Genetically Altered Animal Models in the Kallikrein-Kinin System." *Biological Chemistry* 387 (2): 119–26. <https://doi.org/10.1515/BC.2006.017>.

Pham, J., Yilma, M., Feliz, A., Majid, M., Maffetone, N., Walker, J., Kim, E., Cho, H., Reynolds, J., Song, M., Park, S., & Yoon, Y. (2019). Uma revisão da produção microbiana de produtos naturais bioativos e biológicos. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01404>.

Pimenta, A.M.C.; De Lima, M.E. Small peptides, big world: biotechnological potential in neglected bioactive peptides from arthropod venoms. *Journal of Peptide Science: An Official Publication of the European Peptide Society*, v. 11, n. 11, p. 670–676, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/psc.701>.

Pimenta, A.M.C.; Legros, C.; Almeida, F.M.; Mansuelle, P.; De Lima, M.E.; Bougis, P.E.; Martin-Eauclaire, M.F. Novel structural class of four disulfide-bridged peptides from *Tityus serrulatus* venom. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 301, n. 4, p. 1086–1092, 2003. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(03\)00082-2](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)00082-2).

Pimenta, Adriano M. C., and Maria Elena De Lima. 2005. "Small Peptides, Big World: Biotechnological Potential in Neglected Bioactive Peptides from Arthropod Venoms." *Journal of Peptide Science: An Official Publication of the European Peptide Society* 11 (11): 670–76. <https://doi.org/10.1002/psc.701>.

Pimenta, R.J.G.; Brandão-Dias, P.F.P.; Leal, H.G.; Carmo, A.O.; Oliveira-Mendes, B.B.R.; Chávez-Olórtegui, C.; Kalapothakis, E. *Selected to survive and kill: Tityus serrulatus, the Brazilian yellow scorpion*. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214075>.

Pimenta, Ricardo José Gonzaga, Pedro Ferreira Pinto Brandão-Dias, Hortênsia Gomes Leal, Anderson Oliveira do Carmo, Bárbara Bruna Ribeiro de Oliveira-Mendes, Carlos Chávez-Olórtegui, and Evanguedes Kalapothakis. n.d. "Selected to Survive and Kill: *Tityus serrulatus*, the Brazilian Yellow Scorpion." <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214075>.

Possani, L.D.; Merino, E.; Corona, M.; Bolivar, F.; Becerril, B. Peptides and genes coding for scorpion toxins that affect ion-channels. *Biochimie*, v. 82, n. 9-10, p. 861–868, 2000.

Pucca, M.B.; Cerni, F.A.; Pinheiro-Junior, E.L.; Zoccal, K.F.; Bordon, K.C.F.; Amorim, F.G.; Peigneur, S., et al. Non-disulfide-bridged peptides from *Tityus serrulatus* venom: evidence for proline-free ACE-inhibitors. *Peptides*, v. 82, p. 44–51, ago. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2016.05.008>.

Qadri, Fatimunnisa, and Michael Bader. 2018. "Kinin B1 Receptors as a Therapeutic Target for Inflammation." *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 22 (1): 31–44. <https://doi.org/10.1080/14728222.2018.1409724>.

Regoli D.; Barabe J. 1980. "Pharmacology of Bradykinin and Related Kinins." *Pharmacological Reviews* 32: 1–46.

Reid, I. A., B. J. Morris, and W. F. Ganong. 1978. "The Renin-Angiotensin System." *Annual Review of Physiology* 40: 377–410. <https://doi.org/10.1146/annurev.ph.40.030178.002113>.

Ribeiro, Sónia, Cláudia Furtado, and João Pereira. 2013. "Association between Cardiovascular Disease and Socioeconomic Level in Portugal." *Revista Portuguesa De Cardiologia: Orgao Oficial Da Sociedade Portuguesa De Cardiologia = Portuguese Journal of Cardiology: An Official Journal of the Portuguese Society of Cardiology* 32 (11): 847–54. <https://doi.org/10.1016/j.repc.2013.01.008>.

Rocha e silva, m.; Beraldo, w. T.; rosenfeld, G. Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by trypsin. *The American journal of physiology*, 1949.

Rodriguez de la Vega, R.C.; Possani, L.D. Overview of scorpion toxins specific for Na<sup>+</sup> channels and related peptides: biodiversity, structure-function relationships and evolution. *Toxicon*, v. 46, n. 8, p. 831-844, 2005.

Sabharwal, Rasna, Michael Z. Cicha, Ruben D. M. Sinisterra, Frederico B. De Sousa, Robson A. Santos, and Mark W. Chapleau. 2014. "Chronic Oral Administration of Ang-(1-7) Improves Skeletal Muscle, Autonomic and Locomotor Phenotypes in Muscular Dystrophy." *Clinical Science* (London, England: 1979) 127 (2): 101–9. <https://doi.org/10.1042/CS20130602>.

Santos, R. A., M. J. Campagnole-Santos, and S. P. Andrade. 2000. "Angiotensin-(1-7): An Update." *Regulatory Peptides* 91 (1–3): 45–62. [https://doi.org/10.1016/s0167-0115\(00\)00138-5](https://doi.org/10.1016/s0167-0115(00)00138-5).

Santos, Robson Augusto Souza, Gavin Y. Oudit, Thiago Verano-Braga, Giovanni Canta, Ulrike Muscha Steckelings, and Michael Bader. 2019. "The Renin-Angiotensin System: Going beyond the Classical Paradigms." *American Journal of Physiology-*

*Heart and Circulatory Physiology* 316 (5): H958–70.  
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00723.2018>.

Santos, Robson Augusto Souza, Walkyria Oliveira Sampaio, Andreia C. Alzamora, Daisy Motta-Santos, Natalia Alenina, Michael Bader, and Maria Jose Campagnole-Santos. 2018. “The ACE2/Angiotensin-(1-7)/MAS Axis of the Renin-Angiotensin System: Focus on Angiotensin-(1-7).” *Physiological Reviews* 98 (1): 505–53.  
<https://doi.org/10.1152/physrev.00023.2016>.

Silva, Igor Maciel Souza. Caracterização da atividade biológica de fragmentos N-terminais da bradicinina. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia) — Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2020.

Soffer, R. L. 1976. “Angiotensin-Converting Enzyme and the Regulation of Vasoactive Peptides.” *Annual Review of Biochemistry* 45: 73–94.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.bi.45.070176.000445>.

Souissi, Amine; Dergaa, Ismail; Ernez HAJRI, Samia; Chamari, Karim; Ben Saad, Helmi. A new perspective on cardiovascular function and dysfunction during endurance exercise: identifying the primary cause of cardiovascular risk. *Biology of Sport*, Poznań, v. 41, n. 4, p. 131–144, 2024. DOI: 10.5114/biolsport.2024.134757.

Srinivasan, K.N.; Gopalakrishnakone, P.; Tan, P.T.; Chew, K.C.; Cheng, B.; Kini, R.M.; Koh, J.L.Y.; Seah, S.H.; Brusic, V. SCORPION, a molecular database of scorpion toxins. *Toxicon*, v. 40, n. 1, p. 23–31, 2002. Disponível em:  
[https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(01\)00182-9](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(01)00182-9).

Sun, Meng-Wei, Feng-Lei Qian, Jian Wang, Tao Tao, Jing Guo, Lie Wang, Ai-Yun Lu, and Hong Chen. 2008. “Low-Intensity Voluntary Running Lowers Blood Pressure with Simultaneous Improvement in Endothelium-Dependent Vasodilatation and Insulin Sensitivity in Aged Spontaneously Hypertensive Rats.” *Hypertension Research: Official Journal of the Japanese Society of Hypertension* 31 (3): 543–52.  
<https://doi.org/10.1291/hypres.31.543>.

Thune, I., and A. S. Furberg. 2001. "Physical Activity and Cancer Risk: Dose-Response and Cancer, All Sites and Site-Specific." *Medicine and Science in Sports and Exercise* 33 (6 Suppl): S530-550; discussion S609-610. <https://doi.org/10.1097/00005768-200106001-00025>.

Trillaud, Eric, Philip Klemmer, Steven K. Malin, and Uta Erdbrügger. 2023. "Tracking Biomarker Responses to Exercise in Hypertension." *Current Hypertension Reports* 25 (10): 299–311. <https://doi.org/10.1007/s11906-023-01252-6>.

Verano-Braga, T., C. Rocha-Resende, D. M. Silva, D. Ianzer, M. F. Martin-Eauclaire, P. E. Bougis, M. E. de Lima, R. a. S. Santos, and A. M. C. Pimenta. 2008. "Tityus Serrulatus Hypotensins: A New Family of Peptides from Scorpion Venom." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 371 (3): 515–20. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.04.104>.

Verano-Braga, Thiago, Flávia Figueiredo-Rezende, Marcella N. Melo, Roberto Q. Lautner, Enéas R. M. Gomes, Leonor T. Mata-Machado, Antonela Murari, et al. 2010. "Structure-Function Studies of Tityus Serrulatus Hypotensin-I (TsHpt-I): A New Agonist of B(2) Kinin Receptor." *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology* 56 (7): 1162–71. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.04.006>.

Warburton, Darren E. R., and Shannon S. D. Bredin. 2017. "Health Benefits of Physical Activity: A Systematic Review of Current Systematic Reviews." *Current Opinion in Cardiology* 32 (5): 541–56. <https://doi.org/10.1097/HCO.0000000000000437>.

Warburton, Darren E. R., Crystal Whitney Nicol, and Shannon S. D. Bredin. 2006. "Health Benefits of Physical Activity: The Evidence." *CMAJ: Canadian Medical Association Journal = Journal de l'Association Médicale Canadienne* 174 (6): 801–9. <https://doi.org/10.1503/cmaj.051351>.

Warburton, Darren E. R., Veronica K. Jamnik, Shannon S. D. Bredin, Don C. McKenzie, James Stone, Roy J. Shephard, and Norman Gledhill. 2011. "Evidence-

Based Risk Assessment and Recommendations for Physical Activity Clearance: An Introduction.” *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism = Physiologie Appliquee, Nutrition Et Metabolisme* 36 Suppl 1 (July): S1-2. <https://doi.org/10.1139/h11-060>.

Wollert, K. C., and H. Drexler. 1999. “The Renin-Angiotensin System and Experimental Heart Failure.” *Cardiovascular Research* 43 (4): 838–49. [https://doi.org/10.1016/s0008-6363\(99\)00145-5](https://doi.org/10.1016/s0008-6363(99)00145-5).

Wright, G. (2018). Unlocking the potential of natural products in drug discovery. *Microbial Biotechnology*, 12, 55 - 57. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13351>.

Wu, Chia-Hua, Shayan Mohammadmoradi, Jeff Z. Chen, Hisashi Sawada, Alan Daugherty, and Hong S. Lu. 2018. “Renin-Angiotensin System and Cardiovascular Functions.” *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 38 (7): e108–16. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.118.311282>.

Yang, H. Y. T.; Erdos, E. G.; Levin, Y. 1970. “A Dipeptidyl Carboxypeptidase That Converts Angiotensin I and Inactivates Bradykinin.” *BBA - Protein Structure*.

Zanetti, Gustavo de Oliveira, Pedro William Martins Pessoa, Tales Sambrano Vieira, Rodrigo de Almeida Garcia, Nicolas Henrique Santos Barbosa, Rosa Maria Esteves Arantes, Isis do Carmo Kettelhut, et al. 2024. “Long-Term Heat Acclimation Training in Mice: Similar Metabolic and Running Performance Adaptations despite a Lower Absolute Intensity than Training at Temperate Conditions.” *Journal of Thermal Biology* 119 (January): 103797. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2024.103797>.

Zhang, L., Song, J., Kong, L., Yuan, T., Li, W., Zhang, W., Hou, B., Lu, Y., & Du, G. (2020). The strategies and techniques of drug discovery from natural products.. *Pharmacology&therapeutics*,107686<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2020.107686>.

Zhijian, C.; Feng, L.; Yingliang, W.; Xin, M.; Wenxin, L. Genetic mechanisms of scorpion venom peptide diversification. *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*, v. 47, n. 3, p. 348–355, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.11.013>.

Zoladz, Jerzy A., Agnieszka Koziel, Andrzej Woyda-Ploszczyca, Jan Celichowski, and Wiesława Jarmuszkiewicz. 2016. "Endurance Training Increases the Efficiency of Rat Skeletal Muscle Mitochondria." *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology* 468 (10): 1709–24. <https://doi.org/10.1007/s00424-016-1867-9>.

Zuo, X.P.; Ji, Y.H. Molecular mechanism of scorpion neurotoxins acting on sodium channels: insight into their diverse selectivity. *Molecular Neurobiology*, v. 30, p. 265–278, 2004.