



Thiago Verano Braga

**Estudos bioquímicos,
farmacológicos e de minimização
da estrutura do peptídeo TsHpT-I
isolado do veneno do escorpião
*Tityus serrulatus***

**Belo Horizonte
Minas Gerais, Brasil
Fevereiro / 2005**

Thiago Verano Braga

**Estudos bioquímicos, farmacológicos e de
minimização da estrutura do peptídeo TsHpT-I
isolado do veneno do escorpião *Tityus serrulatus***

Orientador: Adriano Monteiro de Castro Pimenta

**Co-orientadores: Maria Elena de Lima Perez Garcia
Marcelo Porto Bemquerer**

Colaborador: Robson Augusto Souza dos Santos

**Dissertação apresentada ao curso de
Pós-graduação em Bioquímica e
Imunologia do Instituto de Ciências
Biológicas – Universidade Federal de
Minas Gerais, para obtenção do grau de
mestre em Bioquímica e Imunologia.**

**Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Bioquímica e Imunologia
Belo Horizonte – Minas Gerais
Fevereiro / 2005**

A Carol....amor da minha vida!

A minha querida mãe - me orgulho muito de você!!!

Jojo...minha querida irmã!

Ao meu pai...exemplo de pessoa ... pena que a vida é assim...

AMO VOCÊS!!!

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Venenos e Toxinas Animais (LVTA), do Depto. de Bioquímica e Imunologia (ICB-UFMG) e no Núcleo de Estrutura e Função de Biomoléculas do Instituto de Ciências Biológicas (UFMG). Parte deste trabalho foi desenvolvida no Laboratório de Hipertensão, Depto. de Fisiologia e Biofísica (ICB-UFMG). Este trabalho contou ainda com o apoio financeiro das agências: CAPES, CNPq e FAPEMIG.

Parte dos resultados que constituem esta dissertação foi apresentada nos seguintes congressos:

- **1st International Congress - Natural Peptides to Drugs, 30 de novembro a 03 de dezembro (2004), Zermatt, Suíça.**
- **VIII Congresso da Sociedade Brasileira de Toxinologia e Symposium of the Pan American Section of the IST, 19 a 23 de setembro (2004), Angra dos Reis, Rio de Janeiro, Brasil.**
- **IX Simpósio Brasileiro de Fisiologia Cardiovascular, 18 a 20 de fevereiro (2005), Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil.**

Agradecimentos

Ao meu orientador, Adriano, que me confiou este trabalho. Pimenta, lhe agradeço pelos seus ensinamentos, paciência, dedicação, amizade e pelas caronas esporádicas.

À Maria Elena, um exemplo de ética. Sempre disponível para dar sugestões e discutir sobre o “andamento” do trabalho. Agradeço-te por me acolher em seu laboratório por tanto tempo.

Ao Marcelo Bemquerer, dedicado, paciente e sempre disponível para esclarecer dúvidas e curiosidades. Ensinou-me a gostar de síntese de peptídeos... “peptide synthesis is for man with strong legs and weak mind”.

Ao Robson, pela oportunidade de realizar os experimentos, que não foram poucos, em seu laboratório. Obrigado pelas horas de discussão e aprendizado!!!

Ao Jader e a Roberta, por realizarem os experimentos de eletrofisiologia.

Aos amigos do LVTA, pela amizade, companheirismo e ajudas nas horas de sufoco...Alexandre, Breno, Bia, Daniele, Fernanda, Guilherme, Julinho, Kênia, Leida, Márcia, Pryscila, Rosangela e Zuzu. Gostaria de fazer um agradecimento especial aos colegas Danielle, Daniel e principalmente a Thaíssa, que muito contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos colegas do laboratório de hipertensão, em especial Aline, Anderson, Betinha, Dani, Gisele, Leonor, Renata e Zezé.

Ao Jamil, pela constante ajuda e empréstimos de material, alguns até mesmo sem saber...mas devolvi todos, viu!

Aos colegas de BASES I (2003), grandes amigos que fiz! “Stick together team”!

Lista de Abreviaturas

Ac - Acetilado

ACN - Acetonitrila

Am - Amidado

ANG I - Angiotensina I

ANG II - Angiotensina II

BK - Bradicinina

B₁ - Receptor de cininas subtipo 1

B₂ - Receptor de cininas subtipo 2

BPM - Batimentos por minuto

Ca²⁺ - Íon cálcio

CHO - *Chinese hamster ovary*

Cl⁻ - Íon cloreto

CPN - Carboxipeptidase N

CPY - Carboxipeptidase Y

Da - Dalton

DAC - Diacilglicerol

DAF - Di-amino fluoresceína

DIPC - 1,3-diisopropilcarbodimida

DMF - Dimetilformamida

ECA - Enzima conversora de angiotensina

EPN - Endopeptidase N

ESI-Q-TOF - *Electrospray ionization quadrupole time of flight*

FC - Frequência cardíaca

GMPc - Guanosilmonofosfato cíclico

HBS - *Hank's balanced salt*

Hip - *trans*-4-hidróxi-prolina

HOBt - 1H-hidroxibenzotriazol

IP₃ - Inositol - 1,4,5 - trifosfato

i.v. - Intra-venosa

K⁺ - Íon potássio

KDa - Kilodalton

LC - Cromatografia líquida

MALDI-TOF - *Matrix assisted laser desorption ionization time of flight*

MeOH - Metanol
mmHg - Milímetros de mercúrio
MS - Espectometria de massas
m/z - Relação massa/carga
Na⁺ - Íon sódio
NO - Óxido nítrico
PAM - Pressão arterial média
PKC - Proteína cinase C
PLA₂ - Fosfolipase A₂
PLC β - Fosfolipase C- β
PLD - Fosfolipase D
PPB - Peptídeo potenciador de bradicinina
Pyr - Ácido piroglutâmico
SNC - Sistema nervoso central
TES - Trietilsilano
TFA - Ácido trifluoracético
TsHpT-I - *Tityus serrulatus* Hipotensin peptide I
TsHpT₁₇₋₂₅ - *Tityus serrulatus* Hipotensin peptide 17-25
TsHpT_{ac17-25am} - *Tityus serrulatus* Hipotensin peptide ac17-25am
Zn²⁺ - Íon zinco

Abreviaturas dos resíduos de aminoácidos

Glicina	(Gly)G	(57,05 Da)
Alanina	(Ala)A	(71,08 Da)
Prolina	(Pro)P	(97,12 Da)
Valina	(Val)V	(99,13 Da)
Leucina	(Leu)L	(113,16 Da)
Isoleucina	(Ile)I	(113,16 Da)
Metionina	(Met)M	(131,20 Da)
Fenilalanina	(Phe)F	(147,18 Da)
Tirosina	(Tyr)Y	(163,18 Da)
Triptofano	(Trp)W	(186,21 Da)
Serina	(Ser)S	(87,08 Da)
Treonina	(Thr)T	(101,11 Da)
Cisteína	(Cys)C	(103,14 Da)
Asparagina	(Asn)N	(114,10 Da)
Glutamina	(Gln)Q	(128,13 Da)
Lisina	(Lys)K	(128,17 Da)
Histidina	(His)H	(137,14 Da)
Arginina	(Arg)R	(156,19 Da)
Ácido Aspártico	(Asp)D	(115,09 Da)
Ácido Glutâmico	(Glu)E	(129,12 Da)

ÍNDICE

	Página
Lista de abreviaturas	vi
Abreviaturas dos resíduos de aminoácidos	viii
Lista de figuras	xii
Lista de tabelas	xiv
Resumo	xv
Abstract	xvi
1. INTRODUÇÃO	01
1.1. Biologia do escorpião <i>Tityus serrulatus</i>	02
1.2. O veneno do escorpião <i>Tityus serrulatus</i>	05
1.3. Homeostase do sistema circulatório: A pressão arterial	08
1.4. Hipertensão arterial	17
1.5. Peptídeos potenciadores de bradicinina	20
1.6. Drogas utilizadas no tratamento da hipertensão: o veneno que cura	27
2. OBJETIVOS	33
2.1. Objetivo geral	34
2.2. Objetivos específicos	34
3. MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1. Animais	36
3.2. Drogas e peptídeos	36
3.3. Reagentes: síntese e purificação	37
3.4. Espectrometria de massas	37
3.4.1. ESI-Q-TOF/MS	37
3.4.2. MALDI-TOF/MS	38
3.5. Ensaio enzimático com CPY	38

3.6. Síntese de peptídeos (estratégia Fmoc).....	38
3.7. Purificação e análise de pureza por cromatografia líquida de fase reversa	40
3.8. Procedimentos cirúrgicos	41
3.9. Medidas de pressão arterial e frequência cardíaca	42
3.10. Experimentos de potenciação do efeito hipotensor da BK	43
3.11. Experimentos para avaliar o efeito hipotensor do peptídeo TsHpT ₁₇₋₂₅ em ratos hipertensos (linhagens SHR e TGR)	44
3.12. Experimentos de inibição da ECA	45
3.12.1. Método qualitativo	45
3.12.2. Método quantitativo	45
3.13. Microscopia confocal	47
3.13.1. Produção de NO em células CHO B ₂	47
3.14. Análise estatística	48
4. RESULTADOS	49
4.1. Efeito das injeções (i.v.) do peptídeo TsHpT-I sobre o efeito hipotensor de BK	50
4.2. Ensaio enzimático com CPY	52
4.3. Síntese dos peptídeos TsHpT ₁₇₋₂₅ e TsHpT _{ac17-25am}	54
4.4. Efeito das injeções (i.v.) dos peptídeos sintéticos TsHpT ₁₇₋₂₅ e TsHpT _{ac-17-25am} sobre o efeito hipotensor de BK	56
4.5. Ação do peptídeo TsHpT ₁₇₋₂₅ sobre a pressão arterial e frequência cardíaca de ratos hipertensos	58
4.5.1. Ratos espontaneamente hipertensos (SHR).....	58
4.5.2. Ratos transgênicos (TGR).....	60

4.6. Avaliação da atividade inibitória da ECA pelos peptídeos TsHpT-I e TsHpT _{ac17-25am}	62
4.6.1. Método qualitativo	62
4.6.2. Método quantitativo	67
4.7. Produção de NO em células CHO B ₂	68
5. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	70
5.1. Estudo do efeito farmacológico do peptídeo TsHpT-I e de seus análogos sintéticos	71
5.2. Mecanismos de ação do peptídeo TsHpT-I e de seus análogos sintéticos	76
5.3. Sumário e conclusões	84
5.4. Perspectivas	86
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 - Morfologia do escorpião <i>Tityus serrulatus</i>	04
Figura 2 - Diferenciação morfológica da espécie	04
Figura 3 - Formação da angiotensina I	08
Figura 4 - Formação da angiotensina II	09
Figura 5 - Resumo do sistema renina-angiotensina	09
Figura 6 - Vias de síntese do peptídeo Angiotensina (1-7)	11
Figura 7 - Diagrama esquemático da síntese de bradicinina	14
Figura 8 - Sítios de clivagem da bradicinina	14
Figura 9 - Alinhamento das seqüências de aminoácidos dos BPP's depositados no Swiss-Prot.....	21
Figura 10 - Seqüência primária dos peptídeos isolados do veneno do escorpião <i>Tityus serrulatus</i>	24
Figura 11 - Mecanismos de ação dos PPB's: Inibição da ECA	25
Figura 12 - Mecanismos de ação dos PPB's: Ação direta e indireta nos receptores	26
Figura 13 - Estrutura molecular da droga Captopril®.....	27
Figura 14 - Etapas da cirurgia	42
Figura 15 - Protocolo do ensaio de potenciação de BK ...	44
Figura 16 - Experimento de potenciação de BK com o peptídeo TSHpT-I	51
Figura 17 - Ensaio enzimático com CPY	52
Figura 18 - Seqüência de aminoácidos dos peptídeos sintéticos	54
Figura 19 - Controle de qualidade da síntese do peptídeo TSHpT _{ac17-25am}	55

Figura 20 - Experimento de potenciação de BK com o peptídeo TsHpT ₁₇₋₂₅	56
Figura 21 - Experimento de potenciação de BK com o peptídeo TsHpT _{ac17-25am}	57
Figura 22 - Ensaio com ratos SHR	59
Figura 23 - Ensaio com ratos TGR	61
Figura 24 - Ensaio qualitativo para avaliar a inibição da ECA (controle)	64
Figura 25 - Ensaio qualitativo para avaliar a inibição da ECA (TsHpT-I)	65
Figura 26 - Ensaio qualitativo para avaliar a inibição da ECA (TsHpT _{ac17-25am})	66
Figura 27 - Ensaio de produção de NO (Fotos)	68
Figura 28 - Ensaio de produção de NO (Gráfico)	69

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 - Estrutura dos agonistas e dos antagonistas das cininas	13
Tabela 2 - Peptídeos potenciadores de bradicinina isolados do veneno de serpentes e depositados no Swiss-Prot	21
Tabela 3 - Categorias de divisão das toxinas conhecidas	29
Tabela 4 - Peptídeos e proteínas aprovados para terapia nos EUA e Canadá	31
Tabela 5 - Novas técnicas de administração de peptídeos	32
Tabela 6 - Ensaio quantitativo para avaliar a inibição da ECA pelo peptídeo TsHpT-I	68

Resumo

O veneno de escorpião é uma rica fonte de peptídeos biologicamente ativos que atuam em diferentes alvos nos sistemas nervoso e cardiovascular. Uma nova família estrutural de peptídeos foi encontrada no veneno do escorpião amarelo *Tityus serrulatus*. Essa família, denominada TsHpTP (“*Tityus serrulatus* HypoTensive Peptides”), possui uma assinatura estrutural típica dos peptídeos potenciadores de bradicinina (PPB) na sua porção C-terminal.

TsHpT-I, um peptídeo de 2722 Da, foi capaz de potencializar o efeito hipotensor da bradicinina (BK) em ratos normotensos, quando injetado via intravenosa. Foi verificado que este peptídeo possui na sua porção C-terminal, dois sítios de resistência à hidrólise por carboxipeptidase Y (Lys₁₇-Glu₁₈ e Pro₂₃-Pro₂₄), o que norteou a construção de dois peptídeos sintéticos (TsHpT₁₇₋₂₅ e TsHpT_{ac17-25am}, um análogo que possui uma acetilação N-terminal e uma amidação C-terminal), utilizando a porção C-terminal de TsHpT-I. O efeito hipotensor da bradicinina foi mantido nestes dois análogos sintéticos, indicando que a porção C-terminal do peptídeo nativo é essencial para sua ação farmacológica.

Ainda, um importante efeito hipotensor independente da injeção de BK foi verificado, o que mostra que estes peptídeos são, intrinsecamente, agentes hipotensores. Para estudar este efeito hipotensor causado por estes peptídeos, o peptídeo TsHpT₁₇₋₂₅ foi testado em ratos de linhagens hipertensas (SHR - *Spontaneous Hypertensive Rats* - e TGR - *Transgenic Rats*) sendo demonstrada, portanto, a capacidade de induzir uma hipotensão de longa duração. O peptídeo TsHpT₁₇₋₂₅ foi também capaz de causar uma bradicardia nestes animais.

Os mecanismos de ação dos peptídeos estudados não foram elucidados até o presente momento. Entretanto, é possível que a enzima conversora de angiotensina - um alvo conhecido dos PPB - não seja o alvo primário destes peptídeos. Experimentos preliminares obtidos por meio de estudo de microscopia confocal utilizando células CHO transfectadas com o receptor B₂ de bradicinina, indicam que estes peptídeos são capazes de potencializar a liberação de óxido nítrico mediada por bradicinina, muito embora os mecanismos moleculares desta potenciação não tenham sido elucidados ainda.

Abstract

Scorpion venom is a rich source of biologically active peptides that act in different systems, such as nervous and cardiovascular. A new structural family of peptides was found in the venom of the Brazilian yellow scorpion *Tityus serrulatus*. This family, named TsHpTP (*Tityus serrulatus* HypoTensive Peptides), has a typical bradykinin-potentiating peptide (BPP) amino acid signature at its C-terminal extremity.

TsHpT-I, a 2722 Da peptide, was able to potentiate the hypotensive effects of bradykinin (BK) in normotensive rats. It was observed that this peptide has two carboxypeptidase Y cleavage-resistance sites at its C-terminal portion (Lys₁₇-Glu₁₈ e Pro₂₃-Pro₂₄). Therefore, two synthetic analogs were constructed using TsHpT-I C-terminal as template (TsHpT₁₇₋₂₅ and TsHpT_{ac17-25am}, which is acetylated at N-terminal and amidated at C-terminal). The bradykinin-potentiating effect was maintained in these two analogs suggesting that the C-terminal portion of the native peptide is important to the pharmacological activity.

Also, a relevant hypotensive effect, which is independent on BK, was observed in all of these peptides, indicating that these peptides are themselves hypotensive agents. To study this hypotensive effect, TsHpT₁₇₋₂₅ was tested in hypertensive SHR (Spontaneous Hypertensive Rats) and TGR (Transgenic Rats) rat strains and it has been shown that this peptide induce a strong and long-lasting hypotensive effect. Interestingly, this peptide was also able to slow down the heart rate (HR) of these animals.

The mode of action of these peptides is yet to be solved, but it seems that angiotensin converting enzyme - a well known BPP target - is not the primary target. Instead, preliminary data using CHO cells with transfected B₂ receptor - carried out in confocal microscopy - has shown that these peptides are able to potentiate the nitric oxide release induced by BK, although the molecular mechanism of this potentiation is not clear yet.