



1. INTRODUÇÃO

1.1. Biologia do escorpião *Tityus serrulatus*

No Brasil, são encontradas apenas quatro famílias de escorpiões: Bothriuridae, Buthidae, Chactidae e Ischnuridae. A família Buthidae é a mais abundante, sendo distribuída por todo território brasileiro e por toda América do Sul, com exceção do Chile e região sul da Argentina (LOURENÇO, 2002).

O gênero *Tityus* (Buthidae) possui ampla distribuição no Brasil, estando presente em todo tipo de vegetação e área geográfica (LOURENÇO, 2002). Neste gênero estão incluídas, do ponto de vista clínico, as principais espécies da América do Sul. Considerando as estatísticas de envenenamento escorpiônico do Brasil, as principais espécies deste gênero são *Tityus serrulatus* e *Tityus bahiensis*, encontradas principalmente na região Sudeste, e *Tityus stigmurus*, encontrada na região Nordeste do Brasil. Uma grande variedade morfológica e capacidade adaptativa conferem a este gênero uma notável distribuição em diferentes tipos de habitats, desde matas úmidas tropicais, até campos abertos e de cerrado, passando por áreas degradadas (LOURENÇO *et al.*, 1996; Apud: FET *et al.*, 2003).

LUTZ & MELLO descreveram pela primeira vez, em 1922, o escorpião *Tityus serrulatus* na cidade de Belo Horizonte. É uma das nove espécies conhecidas de escorpiões que se reproduzem assexuadamente, por meio de partenogênese. Acredita-se que essa espécie, considerada uma morfo-espécie do complexo *Tityus stigmurus*, tenha se desenvolvido a partir de uma sub-população assexuada de *T. stigmurus* que vivia nos arredores da cidade de Belo Horizonte, quando esta capital foi construída no final do século XIX. Com a rápida modificação ambiental e, conseqüentemente aumento da pressão seletiva, a sub-população partenogenética talvez tenha tido mais facilidade em se prosperar neste novo ambiente do que a população sexuada (LOURENÇO & CLOUDSLEY-THOMPSON, 1999; PIMENTA *et al.*, 2003).

A partenogênese é considerada uma estratégia reprodutiva que ocorre em resposta a pressões ambientais intensas. Se em longo prazo a partenogênese é desvantajosa, pois não ocorre o cruzamento genético, que é de suma importância para a evolução, em um curto espaço de tempo é altamente vantajosa, pois confere à espécie uma plasticidade ecológica necessária para o pioneirismo e desenvolvimento populacional em ambientes inóspitos, como os ambientes dos grandes centros urbanos (LOURENÇO & CLOUDSLEY-THOMPSON, 1999; PIMENTA *et al.*, 2003). Como mencionado anteriormente, a espécie *T. serrulatus* pode ser considerada uma praga urbana, uma vez que esta espécie vem ganhando terreno nos grandes centros urbanos brasileiros.

Morfologia do escorpião *Tityus serrulatus*

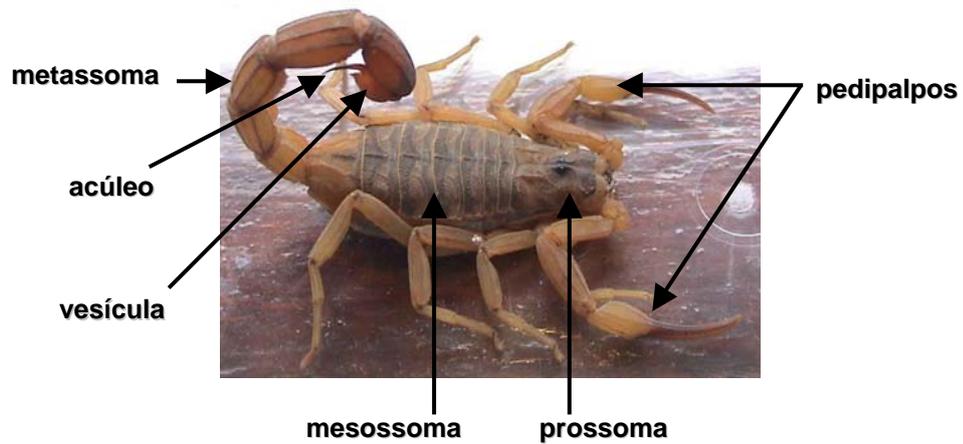


Figura 1 – Morfologia do escorpião *Tityus serrulatus*.

Fonte: <http://www.serrulatus.theblog.com.br/20040108-20040114.html>



Figura 2 – Diferenciação morfológica da espécie.

Destaque das “serrilhas” no IV segmento do metassoma, que caracterizam a espécie *Tityus serrulatus*.

Fonte: <http://www.serrulatus.theblog.com.br/20040108-20040114.html>

1.2. O veneno do escorpião *Tityus serrulatus*

Escorpiões do gênero *Tityus* representam um problema de saúde pública no Brasil, principalmente nas regiões Nordeste, Sudeste e Centro-Oeste, onde podem ser encontrados em habitações humanas. Dados recentes mostram que cerca de 8.000 casos de escorpionismo ocorrem anualmente em todo o Brasil (Guia de Vigilância Sanitária da Fundação Nacional de Saúde - Ministério da Saúde <http://www.funasa.gov.br/pub/GVE/GVE0501A.htm>). Cinqüenta por cento desses casos ocorrem no Estado de Minas Gerais, onde prevalece a espécie *Tityus serrulatus*, responsável por acidentes fatais com taxa de mortalidade de 1% (CARDOSO *et al.*, 1995).

Venenos de origem animal são misturas complexas de moléculas, principalmente de proteínas e peptídeos, capazes de induzir respostas farmacológicas e imunológicas. A “corrida do ouro” para a descoberta de novas drogas destacou os venenos animais como uma das mais promissoras fontes de compostos bioativos naturais. Como sabemos, os venenos dos animais evoluíram nos sentidos predatórios e de defesa, o que contribuiu para a construção de um repertório maciço de moléculas com alvos específicos, como os canais iônicos presentes em tecidos excitáveis e os sistemas cardiovascular e respiratório, por exemplo (Pimenta & De Lima, 2005)

Os escorpiões estão entre os mais antigos artrópodes terrestres conhecidos, sendo que a ordem Scorpiones possui cerca de 1500 espécies, a maioria delas desconhecida por sua baixa periculosidade para o homem (LOURENÇO, 1994). Estima-se, entretanto, que cada espécie possua cerca de 50 a 100 toxinas polipeptídicas (LOURENÇO, 1994), podendo-se supor, portanto, que existam cerca de 100.000 peptídeos nestes venenos. Destes, apenas uma pequena parcela de

cerca de 200 peptídeos, provenientes de aproximadamente 30 espécies de escorpiões, é conhecida (SRINIVASAN *et al.*, 2002).

Segundo FUKUHARA *et al.* (2004), a maioria dos sintomas observados após a picada do escorpião *T. serrulatus* são atribuídos à interação de toxinas, presentes no veneno, com canais de sódio e uma subsequente liberação de neurotransmissores. Entretanto, a ocorrência de edema pulmonar, inflamação sistêmica, e mesmo o óbito de pacientes tratados com anticorpos específicos para o veneno de escorpiões, sugerem a participação de outros mediadores envolvidos na toxicidade do veneno.

As toxinas ativas em canais iônicos

As toxinas presentes em venenos de escorpiões são, em sua maioria, proteínas básicas, de baixo peso molecular, geralmente com 60-70 resíduos de aminoácidos e quatro pontes de dissulfeto, comumente denominadas toxinas de cadeias longas (para revisão ver: De LIMA & MARTIN-EAUCCLAIRE, 1995 e POSSANI *et al.*, 2000). Outras toxinas descritas são menores, possuindo cerca de 40-45 resíduos de aminoácidos enovelados por três (CARBONE *et al.*, 1982; STRONG, 1990; GARCIA *et al.*, 1994) ou quatro pontes dissulfeto (ROCHAT *et al.*, 1998; Pimenta *et al.*, 2003) sendo, por isso, chamadas de toxinas de cadeias curtas. Essas proteínas possuem atividade tóxica em vários grupos de vertebrados e invertebrados, podendo ser classificadas de acordo com seu espectro de ação como toxinas ativas em mamíferos, insetos ou crustáceos (ZLOTKIN *et al.*, 1972).

As toxinas de cadeias longas são ativas, exclusivamente, em canais de Na⁺ voltagem-dependentes de células excitáveis; e as toxinas de cadeias curtas são responsáveis pelo bloqueio de canais de K⁺ de células excitáveis, linfócitos e eritrócitos (LEGROS & MARTIN-EAUCCLAIRE, 1998; POSSANI *et al.*, 2000).

Primeiros estudos farmacológicos do veneno bruto e de toxinas isoladas do veneno de *Tityus serrulatus*

Na primeira metade do século passado, os estudos de caracterização farmacológica foram realizados baseando-se no veneno total de *T. serrulatus* e *T. bahiensis*, espécies mais abundantes e mais conhecidas por ocorrências clínicas, principalmente na região Sudeste do Brasil. Os primeiros trabalhos publicados nesta época demonstraram que o veneno desses escorpiões causava efeitos neurotóxicos, circulatórios e musculares (BRAZIL, 1918; HOUSSAY, 1919; MAGALHÃES, 1925 e CARVALHO, 1945; Apud: DINIZ *et al.*, 1966).

MAGALHÃES & TUPYNAMBÁ (1938) testaram o veneno de *T. serrulatus* em cães, e verificaram que ele induziu arritmias respiratórias, tais como taquipnéia, hiperpnéia e paralisções respiratórias periódicas por sua ação no sistema nervoso central.

DINIZ & GONÇALVES (1960) descreveram a separação, por eletroforese, de componentes com atividades tóxicas, contráteis, hialuronidásicas e potencializadoras de permeabilidade capilar.

A adição do veneno total de *T. serrulatus* em ensaio biológico do íleo de cobaia causou contração da musculatura longitudinal, sendo essa contração abolida pelo tratamento do íleo com cocaína ou atropina (DINIZ & GONÇALVES, 1960). Foi verificada, ainda, a indução da liberação de uma substância semelhante a acetilcolina em segmentos do íleo incubados com o veneno total. Assim, foi atribuída à liberação dessa substância a contração do íleo. Dados obtidos posteriormente, ao utilizar a Tityus-toxina (TsTx), demonstraram que a atropina não bloqueia, completamente, a contração causada pelo veneno em íleo de cobaia, e que esta contração é potencializada por fisostigmina (FREIRE-MAIA *et al.*, 1976).

1.3. Homeostase do sistema circulatório – a pressão arterial

O sistema renina-angiotensina

O sistema renina-angiotensina é um elemento importante na regulação, a curto e longo prazo, da pressão sanguínea arterial (HARDMAN *et al.*, 1996). Fatores que reduzem a pressão arterial, como as reduções no volume sanguíneo ou vasodilatação, ativam a liberação de renina pelos rins.

A renina é uma enzima que atua no angiotensinogênio, uma α_2 -globulina sintetizada pelo fígado e que circula em quantidades abundantes no plasma, para catalisar a formação do decapeptídeo angiotensina I (Figura 3).

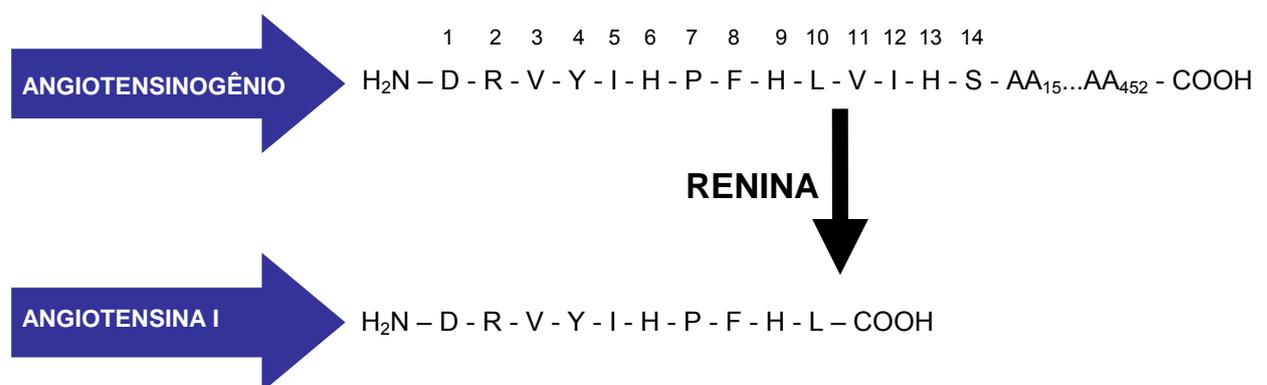


Figura 3 – Formação da angiotensina I

Este decapeptídeo é, então, clivado pela enzima conversora de angiotensina (ECA), produzindo o octapeptídeo angiotensina II (ANG II), que é um potente agente hipertensivo (Figura 4). Quando se liga ao seu receptor (AT₁), localizado nas células glomerulosas, no endotélio vascular e nos neurônios, provoca, respectivamente: **i)** liberação de aldosterona, que aumenta a reabsorção de sódio e água pelos túbulos renais, aumentando o volume plasmático; **ii)** vasoconstrição; **iii)** liberação de noradrenalina, aumentando assim a frequência dos batimentos cardíacos (BREW, 2003).

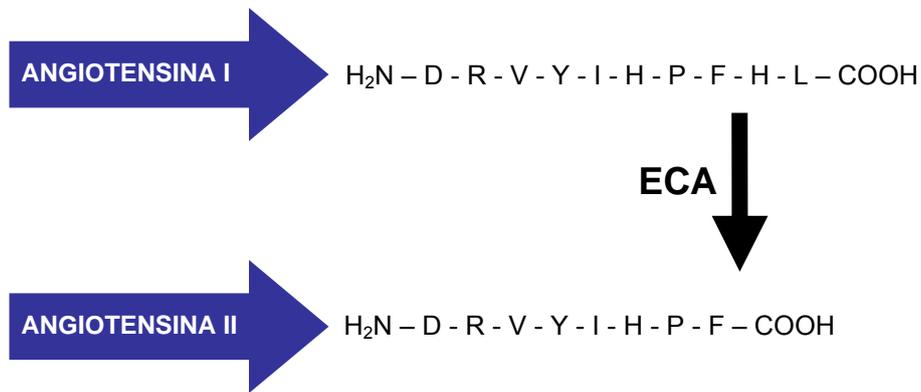


Figura 4 – Formação da angiotensina II

O aumento da pressão sanguínea, promovido pelo aumento da concentração plasmática de angiotensina II, provoca uma retro-alimentação (*feedback*) negativa, diminuindo, desta forma, a liberação de renina e, conseqüentemente, a produção de ANG II (Figura 5).

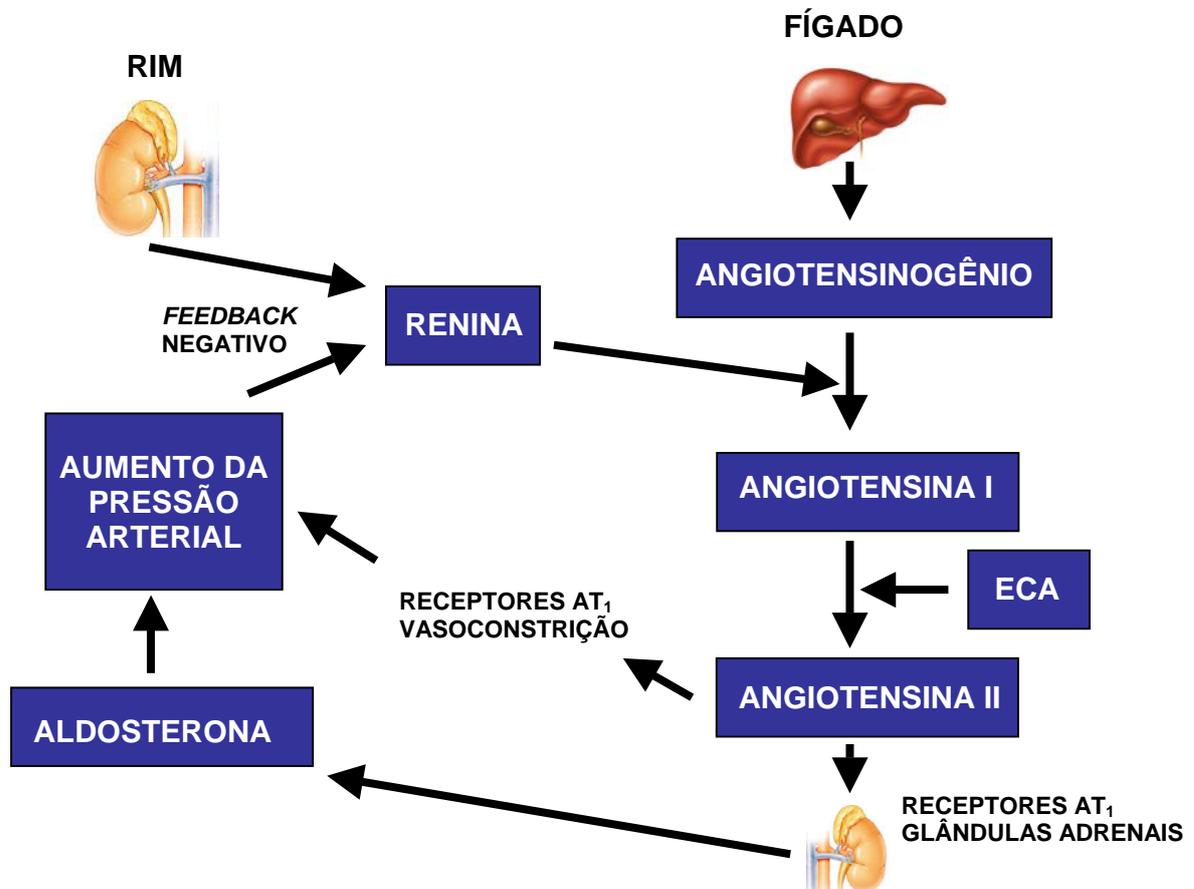


Figura 5 – Resumo do sistema renina - angiotensina.

Enzima conversora de angiotensina (ECA)

A enzima conversora de angiotensina (ECA) cataliza a produção de angiotensina II, a partir de seu precursor inativo, a angiotensina I, além de degradar a bradicinina, um potente agente hipotensor. Conseqüentemente, inibidores desta enzima são amplamente utilizados como terapia para doenças como a hipertensão, doenças cardíacas e nefropatia diabética (BREW, 2003).

A ECA é classificada como uma dipeptidil carboxipeptidase, por catalisar a hidrólise de dois resíduos de aminoácidos da região C-terminal de peptídeos. Os substratos para esta enzima devem apresentar um grupo carboxílico livre (na região C-terminal) e a prolina não deve ser o penúltimo resíduo de aminoácido. É devido à presença de um resíduo de prolina nesta posição que a angiotensina II não é substrato para a ECA (HARDMAN *et al.*, 1996).

Esta enzima apresenta duas isoformas que são derivadas de um único gene por *splicing* alternativo. Ambas isoformas são proteínas de membrana do tipo-1 (N-terminal extracelular), porém diferem quanto ao tecido em que são expressas. A ECA somática (sECA) apresenta dois domínios catalíticos (domínios N- e C-terminal). Apesar de ambos os domínios apresentarem atividade proteolítica, o domínio C-terminal é mais importante para a regulação da pressão arterial. A ECA testicular (tECA) contém apenas um domínio catalítico, o C-terminal (BREW, 2003).

Tanto a sECA quanto a tECA pertencem à família das metaloproteases, pois possuem um íon Zn^{2+} coordenado no sítio ativo. Ambas dependem de íons Cl^- para a proteólise, apesar da atividade do domínio C-terminal depender da concentração deste íon ao contrário do domínio N-terminal (DIVE *et al.*, 1999).

Uma outra isoforma da enzima conversora de angiotensina é a ECA 2 (Figura 6), uma carboxipeptidase (cliva apenas um resíduo de aminoácido da região C-terminal). Seus substratos podem ser a angiotensina I (produzindo a angiotensina 1-

9) ou a angiotensina II (produzindo a angiotensina 1-7) (LI *et al.*, 2003). Segundo TURNER & HOOPER (2002), a atividade enzimática da ECA 2 não é inibida pelos inibidores já descritos da ECA.

Estudos de alinhamento entre a seqüência de aminoácidos da ECA e ECA 2 revelaram que a última apresenta 42% de identidade com a ECA e, na região do sítio catalítico, 61% de similaridade. Utilizando a estrutura resolvida da tECA, GUY *et al.* (2003) fizeram um estudo de modelagem da ECA 2 e descobriram que um impedimento estérico no seu sítio catalítico torna a ECA 2 uma carboxipeptidase, diferentemente da ECA.

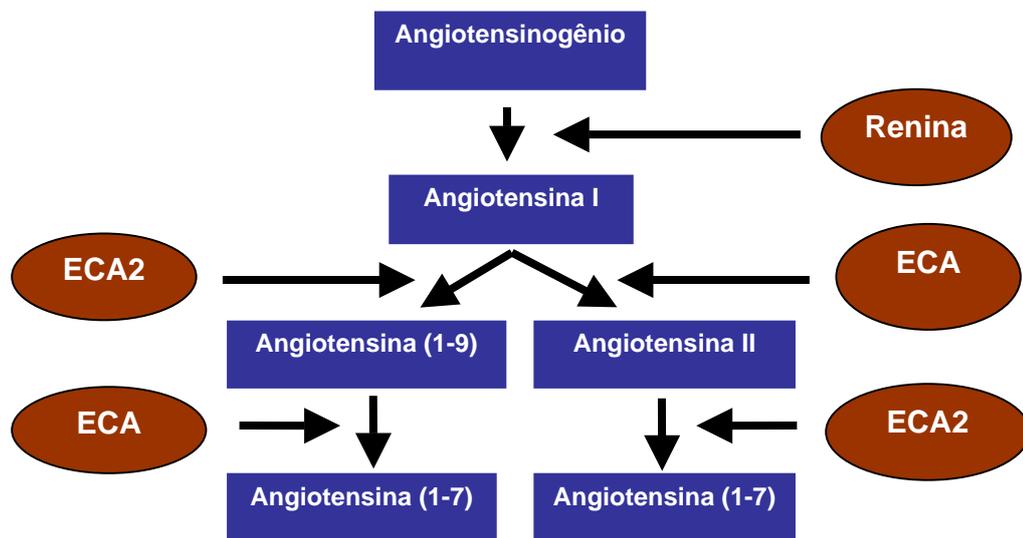


Figura 6 – Vias de síntese do peptídeo Angiotensina (1-7).

A angiotensina I, através respectivamente das enzimas ECA 2 e ECA e a angiotensina II, através da enzima ECA 2, podem ser metabolizadas em angiotensina (1-7).

Ao contrário da angiotensina II, a angiotensina (1-7) não provoca vasoconstrição, liberação de aldosterona, sede e facilitação da neurotransmissão noradrenérgica (HARDMAN *et al.*, 1996).

O sistema calicreína-cininogênio-cinina

Inúmeros fatores, inclusive lesões teciduais, reações alérgicas, infecções virais e outros eventos inflamatórios, ativam uma série de reações proteolíticas que geram bradicinina e calidina nos tecidos (Wachtfogel *et al.*, 1993). Estes peptídeos são autacóides que agem localmente, induzindo dor, vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e síntese de prostaglandinas (HARDMAN *et al.*, 1996).

Histórico

A antiga observação de que a urina, injetada por via intravenosa, reduzia a pressão arterial levou à descoberta das cininas. Nas décadas de 20 e de 30, FREY *et al.* caracterizaram a substância hipotensora e mostraram que materiais semelhantes podiam ser obtidos da saliva, do plasma e de inúmeros tecidos. Como o pâncreas era uma fonte rica, eles batizaram este material de calicreína (do grego: *Kallikréas* = pâncreas) (HARDMAN *et al.*, 1996).

ROCHA E SILVA *et al.* (1949) relataram que a tripsina e certos venenos de serpentes agiam na globulina plasmática para produzirem uma substância que reduzia a pressão arterial e provocava contração intestinal de movimento lento. Devido a esta resposta lenta, denominaram esta substância de bradicinina (do grego: *Bradys* significa “lento”; *Kineina* significa “mover”).

Síntese e metabolismo das cininas

A bradicinina (BK), um nonapeptídeo, e a calidina, um decapeptídeo - apresenta um resíduo de lisina adicionado na porção *N*-terminal - são clivados a partir dos cininogênios (α_2 -globulinas), que são sintetizados pelo fígado.

Tabela 1 – Estrutura dos agonistas e dos antagonistas das cininas.

NOME	SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS	FUNÇÃO
Bradicinina	R-P-P-G-F-S-P-F-R	Agonista, B2 > B1
Calidina	K-R-P-P-G-F-S-P-F-R	Agonista B2 > B1
des-Arg ⁹ -bradicinina	R-P-P-G-F-S-P-F	Agonista, B1
des-Arg ¹⁰ -calidina	K-R-P-P-G-F-S-P-F	Agonista, B1
des-Arg ⁹ -[Leu ⁸]-bradicinina	R-P-P-G-F-S-P-L	Antagonista, B1
[D-Phe ⁷]-bradicinina	R-P-P-G-F-S-[D-F]-F-R	Antagonista, B2 > B1

As calicreínas (enzimas que clivam os cininogênios em calidina e bradicinina) circulam no plasma em um estado inativo e precisam ser ativadas por outras proteases. Existem duas isoformas de calicreínas, a plasmática e a tissular (BHOOLA *et al.*, 1992). A pré-calicreína plasmática é uma proteína de aproximadamente 88 kDa e é ligada ao seu substrato, o cininogênio de alto peso molecular, formando um complexo. Após sua síntese pelos hepatócitos, a pré-calicreína plasmática é clivada e ativada, formando a porção ativa calicreína (36 kDa), pelo fator XIIa, uma protease que é comum tanto às cascatas de coagulação intrínseca quanto das cininas (Figura 7).

Comparada com a calicreína plasmática, a calicreína tissular é uma proteína menor (29 kDa). Esta enzima é sintetizada por numerosos tecidos, como por exemplo, as glândulas salivares, o SNC, e o sistema cardiovascular. Ela age próxima ao seu local de origem. A síntese da pró-calicreína tissular é regulada por inúmeros fatores, como a aldosterona nos rins e glândulas salivares, e também é ativada por clivagem proteolítica (BHOOLA *et al.*, 1992).

O cininogênio de alto peso molecular é clivado pelas calicreínas plasmática e tissular para fornecer bradicinina e calidina, respectivamente. O cininogênio de baixo peso molecular é um substrato apenas para a calicreína tissular e o produto é a calidina (LEE & NAKANISHI, 1987). O decapeptídeo calidina é quase tão ativo quanto o nonapeptídeo bradicinina.

Os receptores de cininas

Segundo VIETINGHOFF *et al.* (2003), os efeitos farmacológicos das cininas são mediados pela ativação de dois subtipos de receptores, B₁ e B₂, que foram divididos desta maneira por REGOLI & BARABÉ (1980). Estes receptores são acoplados a proteína G e são membros da subfamília das *rodopsina-like*, compostas por sete segmentos transmembrana (McEACHERN *et al.*, 1991; NI *et al.*, 1998 e MONSEES *et al.*, 1999; Apud: BLAUKAT, 2003).

Bradicinina e calidina preferencialmente se ligam aos receptores do tipo B₂, enquanto os peptídeos desArg⁹-bradicinina e desArg¹⁰-calidina apresentam alta afinidade pelos B₁. Em contraste ao B₂, que é expresso constitutivamente em muitos tecidos, B₁ é quase indetectável. Sua expressão é regulada por condições fisiopatológicas, como por exemplo, processos inflamatórios e danos teciduais (BLAUKAT, 2003).

Ativação dos receptores

Após sua produção, as cininas interagem com o sítio de ligação de seus receptores – localizado em uma região extracelular formada por um núcleo hidrofóbico - induzindo uma mudança conformacional no receptor que culmina na ativação da proteína G, formada pelas subunidades G α , G β , G γ . A subunidade G α pode ativar a fosfolipase C- β (PLC β), e subsequentemente gerar os segundos mensageiros inositol – 1,4,5 – trifosfato (IP₃), diacilglicerol (DAC), e liberação de cálcio (Ca²⁺) no citoplasma. Este aumento na concentração de Ca²⁺ pode ativar a via do guanosilmonofosfato cíclico (GMPc), mediando, primariamente, um forte efeito hipotensivo (BLAUKAT, 2003).

Posteriormente, DAG e Ca^{2+} ativam várias isoformas de Proteína Cinase C (PKC), que participam de inúmeras vias de sinalização celular, incluindo a via de proliferação celular (NISHIZUKA, 1992).

Os receptores das cininas podem, também, ativar as fosfolipases A_2 (PLA_2) e D (PLD), resultando em um aumento das concentrações do segundo mensageiro ácido araquidônico, que é transformado pelas enzimas ciclooxygenases em prostaglandinas. Este agente inflamatório é, então, secretado pelas células, agindo via seu receptor, e induzindo vasodilatação e edema (BLAUKAT, 2003).

1.4. Hipertensão arterial

A hipertensão é um importante desafio para as autoridades de saúde pública mundial, pela sua alta frequência na sociedade moderna, além dos riscos cardiovasculares e renais. Um estudo recém publicado na revista *The Lancet* realizado por meio de uma compilação de dados coletados entre 1980 e 2002, em diferentes regiões mundiais revelou que aproximadamente 26% da população mundial, ou seja, 972 milhões de pessoas, sofreram de hipertensão em 2000 (KEARNEY *et al.*, 2005). Deste total, 333 milhões de pacientes eram cidadãos de países desenvolvidos e 639 milhões pertenciam aos chamados países em desenvolvimento. Uma prevalência particularmente alta foi registrada nos países da América Latina e Caribe, nos países capitalistas desenvolvidos e nas antigas economias socialistas, contrastando com a prevalência mais baixa, que foi registrada nos países asiáticos (KEARNEY *et al.*, 2005). Uma curiosidade revelada pelo estudo está na incidência relativamente igualitária da doença em relação ao sexo do paciente, muito embora a prevalência de doentes do sexo masculino e feminino tenha variado de acordo com a região, sendo maior para homens nos países da América Latina e Caribe e maior para as mulheres nas antigas economias socialistas (KEARNEY *et al.*, 2005).

Este trabalho revelou um dado ainda mais assustador: em 2025 o número de pacientes com hipertensão deverá crescer 60%, chegando a um índice de 29% da população mundial - cerca de 1,56 bilhões de hipertensos. Levando-se em conta apenas os países em desenvolvimento, o índice de crescimento previsto poderá ser de 80%.

Sabe-se que a hipertensão aumenta os riscos de infarto, acidentes vasculares cerebrais (AVC) e doenças do coração. Mesmo assim pacientes com pressão elevada não são tratados adequadamente. Por seu papel fundamental na

instauração de doenças coronárias e acidentes vasculares cerebrais, a Organização Mundial de Saúde (OMS) e a Sociedade Internacional de Hipertensão (SIH), indicam o controle da hipertensão como o principal desafio das autoridades em saúde pública (Bulletin of the World Health Organization, 1999).

A hipertensão é muito perigosa porque usualmente é assintomática, sendo muitas vezes descoberta tardiamente (OWEN *et al.*, 2003). Segundo o estudo realizado por KEARNEY *et al.* (2005), a prevenção, detecção, tratamento e o controle da doença deveriam ser tratados como prioridade máxima pelos órgãos competentes.

O que é hipertensão?

A pressão sanguínea é medida através das pressões sistólica (pressão arterial observada quando ocorre a sístole ventricular) e diastólica (quando ocorre a diástole ventricular). De acordo com a OMS-SIH, uma pressão ótima está abaixo de 120, pressão sistólica, e 80, pressão diastólica (120/80 mmHg). Uma pressão arterial alta, ou hipertensão é considerada quando estes valores são maiores ou iguais a 140/90 mmHg (Bulletin of the World Health Organization, 1999).

A hipertensão pode ser classificada como primária ou secundária. A hipertensão primária, ou essencial, não apresenta uma causa específica, sendo a forma mais comum, ocorrendo em 95% dos pacientes. Fatores genéticos parecem ser uma das principais causas deste tipo de hipertensão (OWEN *et al.*, 2003).

As causas da hipertensão secundária são conhecidas. Gravidez, cirrose e doenças renais podem contribuir para um quadro de hipertensão temporária. Alguns medicamentos, como a cortisona e o estrógeno, também podem aumentar temporariamente a pressão arterial. A utilização prolongada de drogas antiinflamatórias (NSAIDs), como por exemplo a aspirina, podem causar danos

renais e também podem interferir no tratamento de pacientes hipertensos que utilizam drogas anti-hipertensivas como os β -bloqueadores e os diuréticos. Sabe-se que a cocaína causa episódios de hipertensão aguda, apesar de aparentemente não provocar um quadro crônico. Um estudo mostra que aproximadamente 10% dos casos de hipertensão são causados pelo abuso do álcool. A cafeína provoca um aumento temporário da pressão, porém estudos comprovam que o seu uso regular aumenta os riscos de uma doença cardíaca em pacientes saudáveis. Os perigos da cafeína, contudo, não se comparam ao tabagismo, que pode dobrar o risco de óbito por cardiomiopatia e hipertensão. A pressão sanguínea pode ainda aumentar, temporariamente, em consequência do stress ou de atividades físicas (OWEN *et al.*, 2003).

Tratamentos disponíveis

Atualmente, cinco classes de drogas são eficazes no tratamento da hipertensão: diuréticos, β -bloqueadores, inibidores da ECA, antagonistas dos canais de cálcio e antagonistas de angiotensina II.

Os diuréticos provocam o aumento da excreção de sais e água pelos rins, diminuindo o volume do plasma sanguíneo induzindo, conseqüentemente, a queda da pressão arterial. Os inibidores da ECA reduzem a produção de angiotensina II e diminuem a degradação de bradicinina. Os β -bloqueadores inibem o aumento da frequência cardíaca provocada pela ação excitatória da noradrenalina. Os vasodilatadores expandem a luz dos vasos, e os bloqueadores dos canais de cálcio ajudam a diminuir as contrações cardíacas (OWEN *et al.*, 2003).

Todas as drogas utilizadas para o tratamento da hipertensão apresentam algum tipo de efeito colateral, por isso a um grande interesse no desenvolvimento de novas classes de fármacos anti-hipertensivos (BRALET & SCHWARTZ, 2001).

1.5. Peptídeos potenciadores de bradicinina (PPB's)

Entende-se por PPB's, moléculas que apresentam a capacidade de potenciar os efeitos farmacológicos da BK, ou seja, aumentar seu efeito hipotensor e sua capacidade de promover um aumento na amplitude da contração lenta da musculatura lisa do íleo de cobaia.

Os primeiros peptídeos potenciadores de bradicinina foram isolados do veneno de serpentes

A primeira fração potenciadora do efeito hipotensor da bradicinina foi identificada por FERREIRA (1965) no extrato alcoólico do veneno da serpente *Bothrops jararaca*. Posteriormente, nove PPB's foram isolados deste extrato (FERREIRA *et al.*, 1970 e GREENE *et al.*, 1972).

Após a descoberta dos PPB's no veneno de *Bothrops jararaca*, vários destes peptídeos foram encontrados no veneno de outras serpentes (Tabela 2). KATO & SUZUKI (1971) isolaram cinco peptídeos potenciadores de bradicinina do veneno da serpente japonesa *Agkistrodon halys blomhoffii*. Similarmente, três PPB's foram purificados do veneno da serpente chinesa *Agkistrodon halys palls* (CHENG-WU *et al.*, 1982), oito de *Bothrops insularis* (CINTRA *et al.*, 1990) e um de *Bothrops jararacussu* (FERREIRA *et al.*, 1992). As estruturas primárias destes peptídeos demonstraram um alto grau de similaridade. Tais peptídeos apresentam de 5 a 13 resíduos de aminoácidos, com um ácido piroglutâmico (Pyr) como resíduo *N*-terminal e uma prolina como resíduo *C*-terminal (Figura 9). Os PPB's, isolados do veneno das serpentes do gênero *Bothrops*, com mais de sete resíduos apresentam a seqüência Ile-Pro-Pro na porção *C*-terminal (IANZER *et al.*, 2004).

Tabela 2 – Peptídeos potenciadores de bradicinina isolados do veneno de serpentes e depositados no Swiss-Prot (Jan/2005) (<http://www.expasy.org/sprot/>).

Peptídeo	Espécie	Estrutura Primária	Mecanismo de Ação	Número de Acesso no Swiss-Prot
PPB S3, 1	<i>Bothrops insularis</i>	PyrGGWPRPGPEIPP	Inibidor da ECA	P68515
PPB V-9	<i>Bothrops jararaca</i>	PyrGGWPRPGPEIPP	Inibidor da ECA	P68516
PBB S4,3,1	<i>Bothrops insularis</i>	PyrNWPHPQIPP	Inibidor da ECA	P30422
PBB V6-II	<i>Bothrops jararaca</i>	PyrNWPHPQIPP	Inibidor da ECA	P01022
PBB S4,3,2	<i>Bothrops insularis</i>	PyrLGPPRPQIPP	Inibidor da ECA	P30423
PPB S4,1,2	<i>Bothrops insularis</i>	PyrGGPPRPQIPP	Inibidor da ECA	P30424
PPB S5,2	<i>Bothrops insularis</i>	PyrKWAP	Inibidor da ECA	P30425
PPB S5,1	<i>Bothrops insularis</i>	PyrWGQHPNIPP	Inibidor da ECA	P30426
PPB B	<i>Agkistrodon halys blomhoffii</i>	PyrGLPPRPKIPP	Inibidor da ECA	P01021
PPB	<i>Vipera aspis</i>	PyrGWPGPKVPP	Inibidor da ECA	P31351
PPB	<i>Agkistrodon halys palls</i>	PyrGRPPGPPIPP	Inibidor da ECA	P04562

	1	5	10
S3,1	Pyr	GGWP	-RPGPEIPP
V-9	Pyr	GGWP	-RPGPEIPP
S4,3,1	Pyr	N-WP	-HPQ--IPP
V6-II	Pyr	N-WP	-RPQ--IPP
S4,3,2	Pyr	LGPP	-RPQ--IPP
S4,1,2	Pyr	GGPP	-RPQ--IPP
S5,2	Pyr	K-WA	-----P
S5,1	Pyr	WGQ	--HPN--IPP
B	Pyr	-GLPPRPK	--IPP
PPB <i>Vipera aspis</i>	Pyr	-GWPG	-PK--VPP
PPB <i>Agkistrodon halys palls</i>	Pyr	-GRPPGPP	--IPP

Figura 9 – Alinhamento das seqüências de aminoácidos dos PPB's depositados no Swiss-Prot. Resíduos em vermelho: aminoácidos idênticos; Resíduos em azul: aminoácidos recorrentes.

Os peptídeos potenciadores de bradicinina isolados do veneno de artrópodes

PPB's isolados do veneno de aranhas

SOSNINA *et al.* (1990) isolaram dois peptídeos do veneno da aranha viúva negra (*Latrodectus tredecimguttatus*) capazes de inibir a atividade enzimática da ECA e potenciar os efeitos da bradicinina.

FERREIRA *et al.* (1996) também encontraram um peptídeo potenciador de bradicinina (Peptídeo S) no veneno da tarântula *Scaptocosa raptoria*. A estrutura primária deste peptídeo apresenta grande similaridade com a seqüência dos PPB's de serpentes. O Peptídeo S também apresenta um ácido piroglutâmico na região *N*-terminal, além de terminar com duas prolinas na região *C*-terminal. Farmacologicamente, o Peptídeo S potencia a contração do íleo de cobaia causada pela ação em musculatura lisa da bradicinina, além de inibir a enzima conversora de angiotensina.

PPB's isolados do veneno de escorpiões

Poucos peptídeos potenciadores de bradicinina já foram isolados do veneno de escorpiões. ARAÚJO & GOMEZ (1976) foram os primeiros a descrever uma atividade potenciadora de bradicinina no veneno do escorpião *Tityus serrulatus*. Posteriormente, um PPB, contendo 13 resíduos de aminoácidos, foi isolado deste veneno e denominado Peptídeo T (FERREIRA *et al.*, 1993). Observou-se que a adição deste peptídeo em preparação de íleo de cobaia resultava em uma ação potenciadora da atividade contrátil mediada pela bradicinina. Foi observado, ainda, que o Peptídeo T inibia a enzima conversora de angiotensina e aumentava o efeito depressor da bradicinina na pressão arterial de ratos anestesiados.

Observando-se a estrutura primária do Peptídeo T, verifica-se que a seqüência de aminoácidos é muito diferente da observada nos peptídeos potenciadores de bradicinina já estudados, uma vez que não apresenta as duas prolinas na região C-terminal, além de não conter um ácido piroglutâmico na região N-terminal.



Após fracionamento do veneno do escorpião egípcio *Buthus occitanus*, MEKI *et al.* (1995) isolaram o peptídeo K₁₂, caracterizando-o bioquimicamente e farmacologicamente. Este peptídeo é um potente potenciador de bradicinina, potencializando tanto sua atividade hipotensora quanto sua ação em musculatura lisa. O peptídeo K₁₂ apresenta 21 resíduos de aminoácido, apresentando pouca homologia com outros PPB's, exceto pela presença de duas prolinas na região C-terminal.



PIMENTA *et al.* (Pedido de concessão de patente junto ao INPI sob o número PI 0202157-9 e junto ao PCT, sob o numero PCT/BR 03/00073) isolaram quatro peptídeos do veneno do escorpião *Tityus serrulatus*, que formam uma nova família estrutural, identificada pela ausência de resíduos de cisteínas e conseqüentemente pontes dissulfeto. Os peptídeos desta família apresentam uma massa molecular de 2500 a 3000 Da, e uma assinatura Pro-Pro-Ala na região C-terminal. A caracterização estrutural destes peptídeos – realizada por meio de estudos de

dicroísmo circular e ressonância nuclear magnética (dados não publicados) - indicou uma estruturação randômica, do tipo *random-coil* (Figura 10).

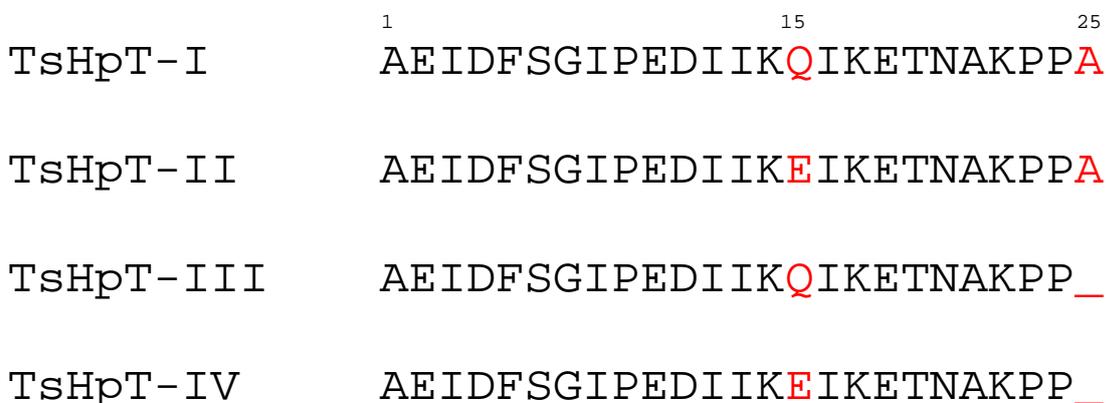


Figura 10 – Seqüência primária dos peptídeos isolados do veneno do escorpião *Tityus serrulatus*. Os resíduos destacados em vermelho formam as diferenças entre as *Tityus serrulatus* Hipotensinas I a IV.

Estudos preliminares, realizados em ratos Wistar anestesiados, indicaram a capacidade do peptídeo TsHpT-I em potencializar o efeito hipotensor da bradicinina injetada por via intravenosa por cerca de 20 minutos (PIMENTA *et al.*, pedido de concessão de patente junto ao INPI sob o número PI 0202157-9 e junto ao PCT, sob o numero PCT/BR 03/00073). Dado o efeito hipotensor observado, estes peptídeos foram denominados *Tityus serrulatus* Hypotensin Peptides (TsHpTP).

Os mecanismos de ação dos PPB's: como eles promovem a potenciação dos efeitos farmacológicos da BK?

Os primeiros trabalhos publicados sobre os PPB's postulavam que estes peptídeos potencializam os efeitos da BK, hipotensor e de contração lenta da musculatura longitudinal do íleo de cobaia, por inibirem a enzima conversora de angiotensina (ECA). Esta inibição levaria a um aumento da concentração plasmática

de bradicinina e uma diminuição da concentração de angiotensina II (FERREIRA *et al.*, 1970; YANG *et al.*, 1970) (Figura 11).

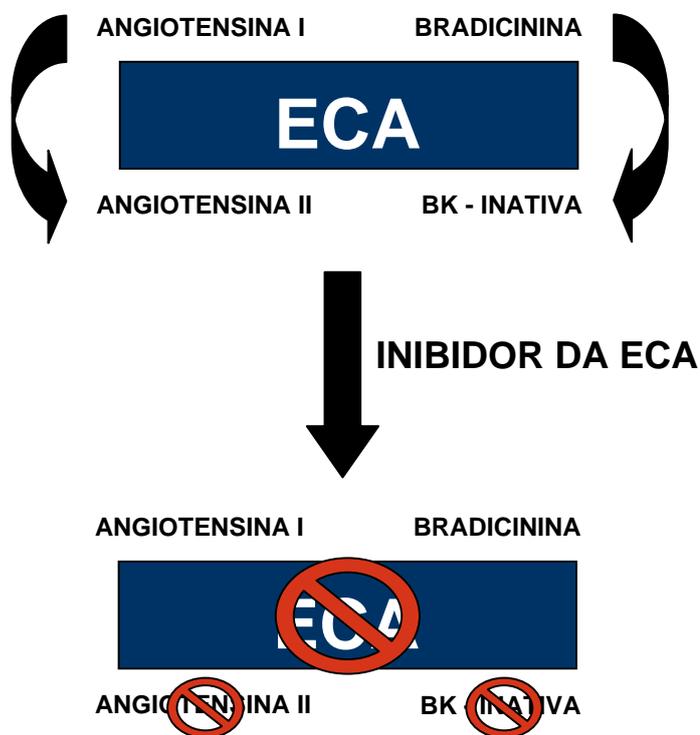


Figura 11 – Mecanismos de ação dos PPB's: Inibição da ECA. A inibição da ECA promove um aumento da concentração plasmática de BK e uma diminuição da produção de ANGII.

Atualmente, um grande número de trabalhos demonstra que os efeitos farmacológicos causados pela administração de inibidores da ECA são mediados por múltiplos mecanismos moleculares, e não apenas pela inibição da atividade enzimática da ECA, bloqueando a degradação da BK (MINSHALL *et al.*, 2000; IGNJATOVIC *et al.*, 2002; ERDÖS *et al.*, 2002).

Segundo ERDÖS *et al.* (2002), os PPB's não se ligam diretamente ao receptor B₂, mas induzem, ao se ligarem à ECA, uma interação (*crosstalking*) entre a ECA e o receptor, resultando em uma modificação alostérica, que aumenta a velocidade de ressensibilização do receptor após este ser dessensibilizado pelo agonista (aumento da velocidade de *turnover* do receptor). Esta mudança conformacional, então, induz uma potenciação da ativação do receptor pelo seu

ligante, a BK, aumentando assim a produção de NO e conseqüente aumento da vasodilatação (Figura 12A).

Um outro mecanismo de ação, independente da interação ECA + receptor, pode ser observado. Segundo IGNJATOVIC *et al.* (2002), trata-se da ativação do receptor B₁ pelos inibidores da ECA (Figura 12B). Estes peptídeos se ligam diretamente ao receptor, em uma alça extracelular, estimulando a síntese e liberação de NO. Este receptor apresenta uma resposta prolongada e constante ou oscilatória. Esta resposta prolongada é diferente da observada nos receptores B₂, que são dessensibilizados rapidamente.

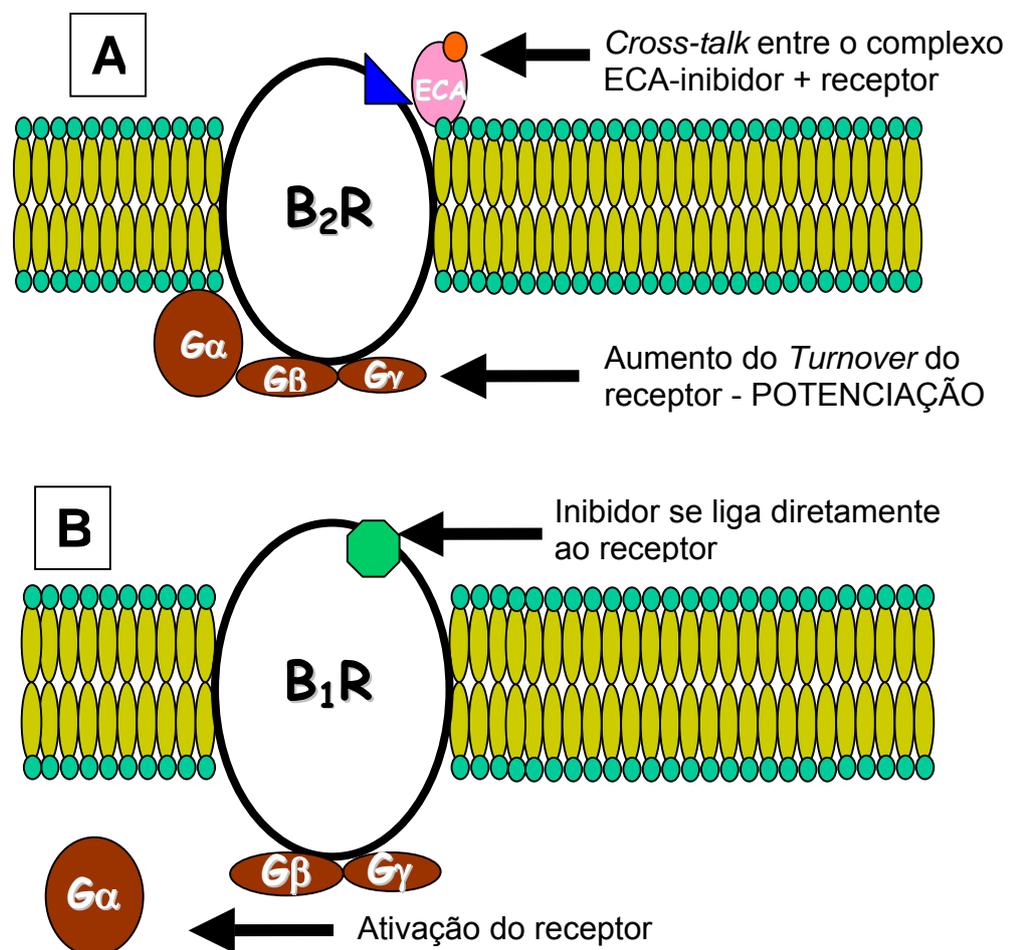


Figura 12 – Mecanismos de ação dos PPB's: Ação direta e indireta nos receptores. A) O complexo ECA-inibidor se aproxima do receptor B₂, formando um heterodímero (ECA-inibidor+B₂) que modifica alostericamente o receptor. Esta mudança conformacional aumenta o *turnover* do receptor, potenciando a sua atividade. **B)** O inibidor da ECA se liga diretamente ao receptor B₁, ativando-o. Este mecanismo é ECA-independente.

1.6. Drogas utilizadas no tratamento da hipertensão: o veneno que cura.

Os inibidores da ECA são efetivos no tratamento da hipertensão e de algumas doenças do coração e rins (MINSHALL *et al.*, 2000). Apesar de serem amplamente utilizados no controle da pressão arterial, estes inibidores podem ser utilizados para outras finalidades. Segundo IGNJATOVIC *et al.* (2002), um estudo com um inibidor da ECA (ramipril) demonstrou que este medicamento, além de controlar a pressão arterial, reduziu os casos de acidente vascular cerebral, infarto, e complicações associadas ao diabetes mellitus.

Dentre estes medicamentos utilizados no tratamento da hipertensão, destaca-se o Captopril[®], primeira droga anti-hipertensiva desenvolvida a partir do peptídeo potenciador de bradicinina isolado e caracterizado por FERREIRA *et al.*(1970) do veneno da serpente *Bothrops jararaca*.

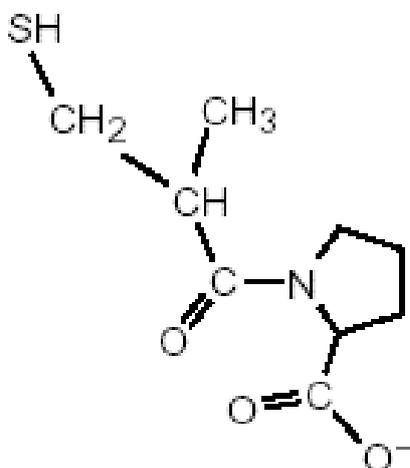


Figura 13 – Estrutura molecular da droga Captopril[®].

Peptídeos: fármacos em potencial?

Muitas companhias farmacêuticas vêm incentivando o uso da biotecnologia para identificar possíveis peptídeos bioativos candidatos a novas drogas. Trata-se de uma nova era, na qual a tecnologia empregada na descoberta de alvos em potencial é amplamente aplicada. A utilização de ferramentas como os estudos do genoma, do transcriptoma e do proteoma estão alterando o paradigma da ciência moderna. Agora procura-se “alvos para os fármacos”, e não mais “fármacos para os alvos” (SZYMKOWSKI, 2004). Com o advento da biotecnologia, vários peptídeos bioativos já foram descobertos. O próximo passo é identificar os possíveis alvos para estes compostos e, desta forma, formular um possível medicamento.

Como dito anteriormente, os venenos de animais são uma rica fonte de peptídeos bioativos, resultado de milhares de anos de evolução para o aprimoramento da sua função (predação ou defesa).

Do ponto de vista científico (para o avanço do conhecimento) e tecnológico (para a geração de novos produtos de interesse econômico e social), as caracterizações molecular e funcional das toxinas de origem animal são de enorme interesse, por estas: **i)** interferirem, com alta afinidade, em fenômenos de vital importância; **ii)** possuírem capacidade de atuarem seletivamente e em baixa concentração sobre subtipos específicos de receptores ou alvos moleculares, permitindo a interferência em processos fisiológicos também específicos; **iii)** possuírem, também, capacidade de atuarem seletivamente contra alguns grupos taxonômicos como, por exemplo, microorganismos ou algumas ordens específicas de insetos, o que pode servir de base para novas drogas e/ou estratégias de combate à doenças ou pragas que geram danos à saúde pública, agricultura ou pecuária.

As toxinas podem ser classificadas em quatro diferentes categorias, de acordo com a sua natureza química; seus efeitos farmacológicos e/ou biológicos e seus efeitos em níveis moleculares (Tabela 3).

Tabela 3. Categorias de divisão das toxinas conhecidas.

Categorias de Toxinas	Exemplos
Natureza química	proteínas, glicoproteínas, peptídeos, alcalóides, acil-poliaminas, outras.
Efeitos farmacológicos e/ou biológicos	neurotoxinas, miotoxinas, peptídeos vaso-ativos, hemolíticas, citolíticas, dermo-necróticas, hemorrágicas, anti-inflamatórias, anti-tumorais, analgésicas, anti-microbianas, outras.
Efeitos em níveis moleculares	ativadores/bloqueadores de canais iônicos, agonistas/antagonistas de receptores ionotrópicos ou metabotrópicos, enzimas, inibidores enzimáticos, outros.

A tarefa do toxinologista em descrever novas toxinas deve transpor estes níveis acima descritos. Em seguida, o conhecimento gerado deve servir para determinar se esta nova toxina pode ser classificada como uma nova droga em potencial ou como uma sonda molecular a ser utilizada para descrever novos eventos ou caminhos - bioquímicos ou farmacológicos - sendo determinante para a descoberta de um novo alvo para novas drogas. Recentemente foi chamada a atenção para o fato de que as duas principais classes de alvos moleculares para ações de drogas serem as enzimas - que são o alvo de cerca da metade de novas drogas lançadas no mercado - e os ligantes de receptores (SWINDELLS & OVERINGTON, 2002). Note-se que estes são alvos comuns para as toxinas de origem animal.

Barreiras para o desenvolvimento de peptídeos como drogas terapêuticas

Se, do ponto de vista de afinidade e seletividade, os peptídeos são apresentados com argumentos altamente favoráveis como drogas em potencial, existem, por outro lado, várias barreiras que atrapalham o desenvolvimento de drogas compostas por peptídeos. Dificuldades em controlar a absorção, a biodisponibilidade e a farmacocinética de drogas de natureza protéica são exemplos destas barreiras.

A degradação enzimática talvez seja um dos maiores problemas. Sabemos que no plasma sangüíneo, assim como no trato gastrintestinal, existem várias enzimas proteolíticas, que em pouco tempo clivam as proteínas e peptídeos, tornando-os instáveis dentro do organismo. Esta meia-vida pequena é muito desvantajosa, porque o medicamento teria que ser administrado várias vezes ao dia.

Um outro problema é a resposta do sistema imune do paciente tratado com estas drogas. Os peptídeos naturais são compostos apenas por L-aminoácidos, o que os tornam imunógenos em potencial, podendo assim, ser neutralizados rapidamente pelo organismo (LIEN & LOWMAN, 2003).

A absorção de proteínas e peptídeos pela mucosa gastrintestinal, bem como a transposição dessas moléculas através da barreira hemato-encefálica – necessária no caso das drogas neurotrópicas - são baixas e de pouca eficácia, o que dificulta a utilização destes compostos como fármacos. Várias estratégias vem sendo desenvolvidas na tentativa de minimizar estes problemas, assunto este que será abordado oportunamente.

Vantagens do uso de peptídeos como fármacos

Dados do FDA (*Food and Drug Administration*) demonstram que, nos Estados Unidos, aproximadamente 44 proteínas estão sendo utilizadas como fármacos (SZYMKOWSKI, 2004) (Tabela 4).

Tabela 4 – Peptídeos e proteínas aprovados para terapia nos EUA e Canadá (LIEN & LOWMAN, 2003).

Medicamento	Indicações
Plenaxis™	Câncer de próstata
Apan™ Isegran	Endometriose, Alzheimer, Pneumonia, Diabetes I e II
Exubra®	Diabetes I e II
Insulina Oral	Diabetes I e II
Oratonin™	Osteoporose
Calcitonina Oral	Osteoporose
Oralin™	Diabetes I e II
HER-2	Câncer de mama e ovário
Fuzeon™	AIDS
T-1249	AIDS
Symlin®	Diabetes I e II
Exendin-4	Diabetes II
Lupron depot®	Câncer de próstata

Uma grande vantagem da utilização de peptídeos no tratamento de doenças é o seu baixo custo de produção e facilidade de síntese em larga escala (LADNER, 2004).

Em alguns casos, peptídeos com menos de 12 resíduos de aminoácidos se estruturam de tal maneira, que formam um rígido esqueleto, estável e resistente a ação das proteases (LIEN & LOWMAN, 2003). Além disso, a meia-vida dos peptídeos pode ser estendida através de modificações como: **i)** glicosilações, que dificultam a sua degradação enzimática e aumentam sua solubilidade; **ii)** substituições de L-aminoácido por D-aminoácidos e aminoácidos não naturais, para reduzir sua susceptibilidade a certas proteases e imunogenicidade; **iii)** conjugação com polietilenoglicol (PEG), aumentando sua solubilidade, protegendo-o de proteólises e tornando-o menos imunogênico; **iv)** modelagem e construção dos

peptídeos com motivos de ligação para proteínas plasmáticas, como, por exemplo, a albumina, diminuindo assim a sua filtração pelos rins e conseqüente excreção (LIEN & LOWMAN, 2003). Todas estas modificações podem aumentar a meia-vida, porém estudos devem ser realizados para não afetar sua ação farmacológica.

Métodos não-invasivos para a administração de peptídeos no tratamento da hipertensão

Na pesquisa para se desenvolver um método “sem-agulhas” de administração das drogas protéicas, uma alternativa promissora é a inalação e subsequente absorção dos fármacos pelas mucosas do trato respiratório. Muitas proteínas e peptídeos, com massa molecular menor que 30 kDa, podem rapidamente atravessar o fino epitélio alveolar dos pulmões e entrar na corrente sangüínea, resultando em uma droga com rápida absorção, sem a necessidade de utilizar métodos invasivos (IRNGARTINGER *et al.*, 2004).

Segundo SHEN (2003), uma outra forma interessante de administrar o peptídeo é através da técnica de encapsulação. Como resultado de sua estabilidade no trato gastrintestinal, micropartículas ou nanopartículas parecem exercer melhor esta função do que os conhecidos lipossomos. Contudo, a absorção do peptídeo ainda é um problema que deve ser contornado. Uma forma de aumentar a absorção dos peptídeos pelas células epiteliais é a sua lipidificação, além de aumentar a sua estabilidade contra enzimas digestivas. Uma limitação deste método é que tal modificação pode diminuir sua atividade biológica.

Tabela 5 – Novas técnicas de administração de peptídeos (LIEN & LOWMAN, 2003).

Método	Molécula	Organismo Testado
Adesivo transdermico	Calcein	ND
Aerosol	Budesonide	Humano
Lipossomas	Insulina	Camundongo, Rato, Humano
Oral	Insulina	Rato, Cachorro, Humano



2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Estudar as características bioquímicas e farmacológicas do peptídeo TsHpT-I isolado do veneno do escorpião *Tityus serrulatus*, visando a minimização estrutural e o desenvolvimento de uma estrutura primária otimizada de análogos sintéticos de TsHpT-I, como etapas iniciais para uma possível utilização dos mesmos como droga anti-hipertensiva.

2.2. Objetivos específicos

i) Avaliar componentes estruturais da seqüência primária do peptídeo TsHpT-I, para identificar possíveis regiões na sua seqüência de aminoácidos que apresentem proteções contra degradação proteolítica;

ii) Estudar o efeito hipotensor do peptídeo TsHpT-I, avaliando a sua capacidade de potencializar a BK;

iii) Sintetizar peptídeos análogos ao TsHpT-I, que apresentam a características farmacológicas compatíveis com as observadas para o peptídeo nativo (TsHpT-I);

iv) Avaliar a capacidade potenciadora de BK e atividade anti-hipertensiva dos peptídeos análogos sintetizados;

v) Investigar a atividade hipotensora dos peptídeos, nativo e sintéticos, em ratos hipertensos de diferentes linhagens;

vi) Investigar o(s) possível(is) modo(s) de ação molecular e/ou sistêmica, envolvidos no efeito hipotensor de TsHpT-I e de seus análogos sintéticos.



3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

- Ratos Wistar, pesando 220 a 310g, provenientes do Centro de Bioterismo do ICB-UFMG.
- Ratos SHR (*Spontaneous Hypertensive Rat*), pesando 305 a 355g, provenientes do Biotério de Animais Transgênicos do Laboratório de Hipertensão (ICB-UFMG). Os ratos SHR apresentam um modelo de hipertensão parecido com a hipertensão essencial humana.
- Ratos TGR (linhagem TGR(mREN2)27), pesando 445 a 450g, provenientes do Biotério de Animais Transgênicos do Laboratório de Hipertensão (ICB-UFMG). Os ratos da linhagem TGR(mREN2)27 são animais transgênicos, que apresentam uma superexpressão do gene da enzima renina.

3.2. Drogas e peptídeos

- Bradicinina (BK) foi adquirida da Bachem (Torrance, EUA).
- Os peptídeos sintéticos TsHpT-I (2722,43 Da) e TsHpT₁₇₋₂₅ (953,51 Da) foram adquiridos do *Centre d'Immunologie de Marseille - Luminy* (CIML) (Marselha, França).
- O peptídeo TsHpT_{ac17-25am} (995,57 Da) foi sintetizado conforme descrito na seção 3.6.
- A enzima conversora de angiotensina (ECA) foi adquirida da SIGMA (St. Louis, EUA).
- O éter sulfúrico foi o anestésico inalador usado durante os procedimentos cirúrgicos em ratos.

3.3. Reagentes: síntese e purificação.

Todos os produtos químicos utilizados na síntese de peptídeo foram de grau analítico, salvo especificação contrária.

- Os aminoácidos, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Asn-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Glu(OtBu), o HOBt e a *Rink Amide Resin* foram adquiridos da NovaBiochem (Darmstadt, Alemanha).
- TFA e piperidina foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha).
- DMF para lavagem foi adquirido da VETEC (Rio de Janeiro, Brasil).
- O DMF utilizado no acoplamento foi proveniente da Carlo Erba (Rodano, Itália).
- A acetonitrila (Carlo Erba) e o TFA (Fluka, Buchs, Suíça), reagentes utilizados na purificação do peptídeo sintético, foram de grau HPLC.

3.4. Espectrometria de massas

3.4.1. ESI-Q-TOF/MS

As análises por espectrometria de massas do tipo ESI-Q-TOF foram realizadas utilizando-se um aparelho Q-TOF MicroTM (Micromass, Manchester, Grã Bretanha), equipado com fonte de ionização *electrospray* operada em modo positivo. A voltagem do capilar foi estabelecida em 3-3,5 kV e as voltagens dos *sample cones* foram 30-40 V. A calibração do espectrômetro de massas era feita diariamente utilizando-se NaI, com janela de 100 a 2000 *m/z*. As amostras foram diluídas em água Milli-Q[®]/ TFA 0,1% e introduzidas no aparelho utilizando uma seringa com fluxos entre 5-10 $\mu\text{L}/\text{min}$ (*electrospray*). Os dados obtidos foram analisados utilizando o programa MassLynx[®] 3.5 ou 4.0.

3.4.2. MALDI-TOF/MS

As análises por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF foram realizadas utilizando um aparelho Voyager-DETMRP BioSpectrometer Workstation (Perseptive Biosystems, Framingham, EUA) em modo linear positivo. A solução contendo os peptídeos (0,5 µL da amostra, em concentrações variáveis) foi aplicada nos *spots*, com 0.5 µL de matriz CHCA (α -ciano-ácido 4-hidroxicinâmico em solução de 60% acetonitrila, 0.3% TFA), sendo esta mistura seca em temperatura ambiente. Um laser de nitrogênio (337 nm) foi usado para ionizar a amostra. A calibração do aparelho foi realizada por meio de uma mistura de polipeptídeos (Sequazyme Peptide Mass, Perseptive Biosystems). O processamento dos dados foi feito através do software 386 (Galactic Corp., Salem, EUA).

3.5. Ensaio enzimático com a enzima carboxipeptidase Y (CPY)

O peptídeo TsHpT-I foi incubado com a enzima CPY, com tampão citrato de amônio (30 mM em pH 6,1). Após 30 segundos, 5 minutos, 90 minutos, e 24 horas de incubação, foram retiradas alíquotas e analisadas no espectrômetro de massas MALDI-TOF (veja seção 3.4.2). O sinal do peptídeo foi monitorado, bem como o de seus fragmentos provenientes da proteólise.

3.6. Síntese de peptídeos (estratégia Fmoc)

O peptídeo TsHpT_{ac17-25am} (995,57 Da) foi sintetizado utilizando a estratégia Fmoc/t-butila de síntese manual em suporte sólido (CHAN & WHITE, 2000; MERRIFIELD, 1995). Este peptídeo foi sintetizado com os resíduos N e C-terminais protegidos por acetilação e amidação, respectivamente.

A resina *Rink Amide* foi utilizada como suporte sólido para a síntese. O primeiro passo foi a desproteção do grupo Fmoc que protege o sítio reativo da

resina. Como o grupo Fmoc é base-lábil, a desproteção foi realizada com uma solução de piperidina a 20% em dimetilformamida (DMF).

Posteriormente, foi realizado o acoplamento do primeiro resíduo de Fmoc aminoácido. Esta etapa foi realizada com uma solução de 1,3-diisopropilcarbodimida (DIPC), 1H-hidroxibenzotriazol (HOBt) e o Fmoc aminoácido a ser adicionado, incubando-os por 2 horas sob agitação. Estas duas etapas (desproteção e acoplamento) foram, então, repetidas sucessivamente até a adição e posterior desproteção do último resíduo de aminoácido.

Após cada etapa, a resina era lavada com DMF e MeOH (metanol), repetindo-se este procedimento alternadamente por três vezes.

O teste de Kaiser (ninidrina) era utilizado para detectar a presença de aminas livres na cadeia peptídica. Caso o resultado fosse positivo (azul) após a etapa de desproteção, o grupo protetor Fmoc teria sido removido com sucesso; se o teste fornecesse uma coloração amarela (negativa) após a etapa de acoplamento, a ligação peptídica entre o resíduo adicionado e o *N*-terminal da cadeia em formação teria ocorrido. Porém, em caso do teste de Kaiser negativo na etapa de desproteção, e positivo na etapa de acoplamento, estas etapas deveriam ser repetidas.

A etapa final da síntese foi uma acetilação, alcançada por meio de uma solução anidrido acético:diclorometano (1:1, v:v) por 30 minutos. Para confirmar a acetilação do peptídeo, foram realizados o teste de Kaiser e a análise por espectrometria de massa (ESI-Q-TOF MS e MS/MS).

Após a síntese, o peptídeo foi clivado da resina. A ligação do resíduo C-terminal do peptídeo com a resina é ácido lábil, por isso a desproteção final e a clivagem da resina foram conduzidas em uma solução de TFA:TES:H₂O (95:2,5:2,5; v:v:v). Como a resina utilizada foi a *Rink Amide*, após a clivagem do peptídeo, o resíduo C-terminal ocorre na forma amidada.

Após o término da reação de clivagem entre o peptídeo e a resina, o TFA foi removido, borbulhando-se N₂ dentro do tubo de reação. Feito isso, o peptídeo foi lavado seis vezes com éter diisopropílico gelado, o que, além da precipitação do peptídeo, é responsável pela retirada de excesso de grupamentos protetores e de seqüestradores de carbo-cátions. O peptídeo foi, então, extraído da resina por meio de lavagens com água e água/ACN (1:1), seguidas de filtração, em funil de placa porosa. Esse procedimento foi imediatamente seguido pela liofilização do material obtido.

3.7. Purificação e análise de pureza por cromatografia de fase reversa

Primeiramente, foi realizada uma cromatografia líquida de alta performance – HPLC em sistema ÄKTA Explorer, Amersham-Pharmacia (Upsala, Suécia) – em coluna analítica de fase reversa – PepMap C-18TM (4,6mm X 150mm), Perseptive Biosystems (Connecticut, EUA) – previamente equilibrada com solução A (TFA 0,1% em água Milli-Q[®]). Foi utilizado um gradiente segmentado de solução B (TFA 0,1% em acetonitrila). O primeiro segmento foi de 0 a 10% de solução B, o segundo segmento de 10 a 25% e o último segmento de 25 a 100% de solução B. Foram injetados 200 µg do peptídeo em um volume de 100 µL (2 mg/mL) e o fluxo utilizado foi de 1 mL/min. A eluição foi monitorada por leitura da absorbância a 214 e 280 nm e o eluato coletado em coletor automático – modelo ÄKTA Frac-950, Amersham-Pharmacia (Upsala, Suécia). O monitoramento do eluato foi realizado também por espectrometria de massa (ESI-Q-TOF) para a correta identificação da localização da fração de interesse.

Posteriormente, a coluna semipreparativa – SupelcosilTM LC-18 (25cm X 10mm, 5µm), Supelco (Pensilvânia, EUA) – previamente equilibrada com a solução

A (TFA 0,1% em água Milli-Q®), foi utilizada para purificar o restante do peptídeo (115 mg em 5 mL de água). Foram aplicados 23 mg do peptídeo solubilizado em 1 mL de solução A. Um total de cinco procedimentos cromatográficos foram realizados para que o rendimento total de peptídeo sintético (115 mg) fosse completamente purificado. O fluxo utilizado foi de 6,0 mL/min., utilizando um gradiente segmentado de solução B (TFA 0,1% em acetonitrila). O primeiro segmento foi de 0 a 12,5%, o segundo foi de 12,5 a 15% e o último segmento de 15 a 100% de solução B. O eluato foi monitorado por leitura de absorvância a 214 e 280 nm e coletado automaticamente.

O lote de peptídeo obtido foi analisado no espectômetro de massa (ESI Q-TOF Micro™) para controle de qualidade de sua síntese e purificação.

3.8. Procedimentos cirúrgicos

Os ratos foram anestesiados com éter e submetidos à cirurgia para implantação de cânulas de polietileno nos vasos femurais, 24 horas antes dos experimentos. As cânulas foram confeccionadas com polietileno de dois diâmetros diferentes (PE50 e PE10), fundidos por aquecimento e preenchidas por uma solução de NaCl 0,9% p/v. A cânula da artéria femural destinou-se ao registro da pressão arterial média (PAM), e a da veia femural foi utilizada para administração dos peptídeos a serem testados (BK, TsHpT-I; TsHpT₁₇₋₂₅; TsHpT_{ac17-25am}). As cânulas foram exteriorizadas na região interescapular dos animais (Figura14). Estes procedimentos estão de acordo com as normas do Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG.

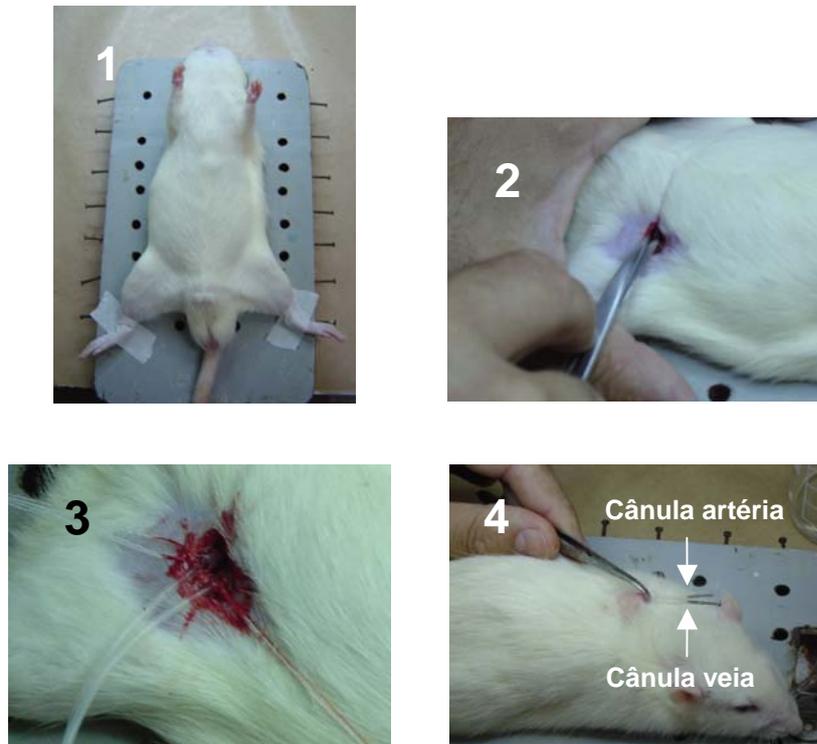


Figura 14 – Etapas da cirurgia. 1) Os animais eram anestesiados com éter sulfúrico e posicionados com a região ventral voltada para o responsável pela cirurgia. 2) Uma incisão era realizada na região da artéria e veia femural (virília do rato). 3) Estes vasos eram dissecados e um pequeno corte era feito, com o auxílio de uma tesoura cirúrgica, para introdução das cânulas. 4) Posteriormente as cânulas eram exteriorizadas na região interescapular dos animais. Todos os cortes eram suturados.

3.9. Medidas de pressão arterial (P.A.) e frequência cardíaca (FC)

As cânulas arteriais eram conectadas a um transdutor de pressão acoplado a um sistema digital de aquisição de dados. A pressão arterial média (PAM) e pulsátil (PAP), bem como a frequência cardíaca (FC) dos animais foram monitoradas antes e durante os experimentos pelo sistema Biopac – modelo MP 100A-CE, BIOPAC Systems, Inc (Santa Bárbara, EUA) – usando a interface do programa Acknowledge (versão 3.5).

3.10. Experimentos de potenciação do efeito hipotensor da BK

Os peptídeos (TsHpT-I, TsHpT₁₇₋₂₅ e TsHpT_{ac17-25am}) eram diluídos, a partir de uma solução estoque (1 mg/mL), com uma solução de NaCl 0,9% p/v para injeção de 10 µg/animal (aproximadamente 38 µg/Kg de animal) em um volume final de 200 µL de solução.

A PAM dos ratos era monitorada conforme descrito anteriormente, na seção 3.10. Primeiramente, injetava-se 1 µg de BK em um volume final de 100 µL. Posteriormente, injetava-se 2 µg de BK, com o mesmo volume final, e o ΔPAM era novamente calculado. Os peptídeos (TsHpT-I, TsHpT₁₇₋₂₅ ou TsHpT_{ac17-25am}) eram, então, administrados i.v. (via intravenoso) e a nova variação da PAM, era calculada. A variação da PAM (ΔPAM) era calculada por meio da seguinte fórmula:

$$\Delta PAM = PAM_{\text{final}} - PAM_{\text{inicial}}$$

Depois da administração do peptídeo, injetava-se novamente BK 1 µg (num intervalo de 10 em 10 minutos durante 120 minutos) e a ΔPAM calculado para avaliar se esta variação se aproximava ao controle de BK (1 ou 2 µg) (Figura 15).

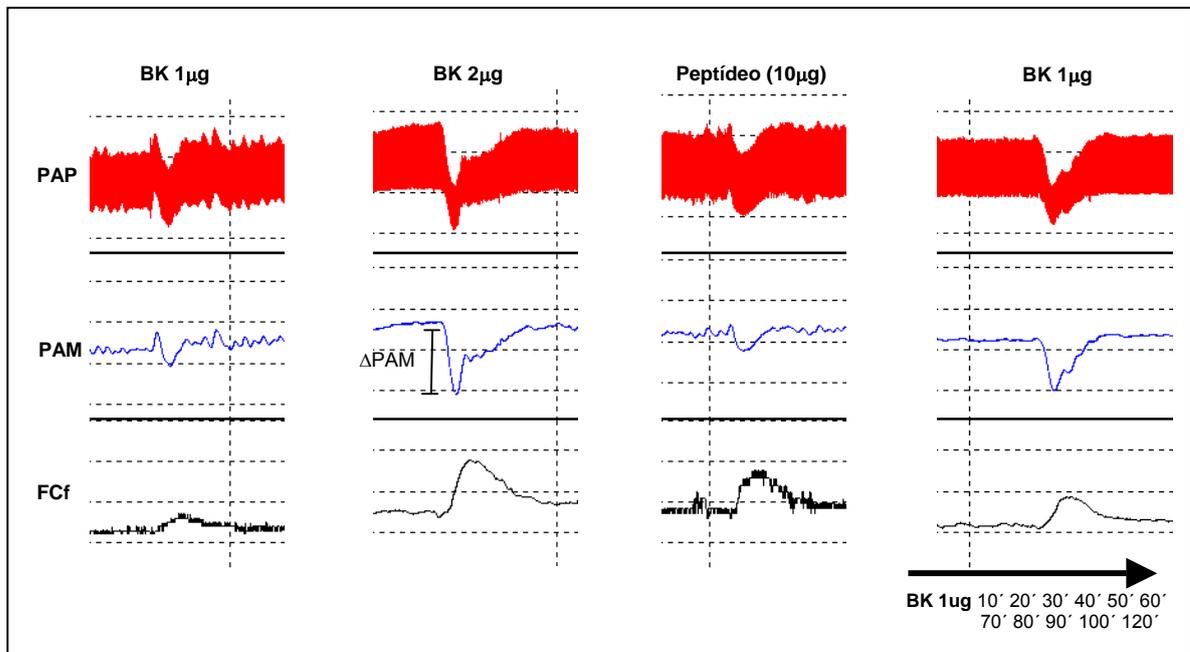


Figura 15 – Protocolo padrão do ensaio de potenciação de BK. PAP (pressão arterial pulsátil); PAM (pressão arterial média); FCf (frequência cardíaca filtrada).

3.11. Experimentos para avaliar o efeito hipotensor do peptídeo TsHpT₁₇₋₂₅ em ratos hipertensos (SHR e TGR)

Como condição controle, a PAM e a FC do animal eram observadas e anotadas, a cada 2 minutos, em um intervalo de 1 hora. Caso os valores de PAM fossem inferiores a 150 mmHg, o animal não era considerado hipertenso e o experimento interrompido. Se os valores da PAM fossem iguais ou superiores a 150 mmHg, o peptídeo TsHpT₁₇₋₂₅ (100 µg/rato) era administrado i.v. e o perfil da PAM e da FC do animal era monitorada por 6 horas com anotações a cada 2 minutos dos valores da PAM e da FC.

3.12. Experimentos de inibição da ECA

3.12.1. Método qualitativo

Este método qualitativo foi desenvolvido visando uma triagem inicial por possíveis peptídeos candidatos a inibidores da ECA. Este método consistiu na incubação da ECA com seu substrato (BK) e com possíveis inibidores. Em um determinado intervalo de tempo (0, 8, 20, 40 minutos e 18 horas), alíquotas eram retiradas das incubações e analisadas no espectômetro de massas ESI Q-TOF.

Foram realizadas incubações (37°C, tampão bicarbonato de amônio, 25mM, pH 8,0) das seguintes misturas: **i)** ECA + BK (controle positivo); **ii)** ECA + TsHpT-I + BK; **iii)** ECA + TsHpT_{ac17-25am} + BK. Alternativamente, a bradicinina era adicionada à mistura inicial (ECA + peptídeos de interesse) 10 minutos após o início da incubação. Utilizou-se a ECA na concentração de 0,13 nM e os peptídeos nas seguintes concentrações: BK (0,02 nM); TsHpT-I (0,2 nM); TsHpT_{ac17-25am} (0,2 nM).

3.12.2. Método quantitativo

A atividade da ECA (Sigma) foi mensurada através do método fluorimétrico, usando Hip-His-Leu (*trans*-4-hidróxi-prolina – histidina – leucina) como substrato. As etapas do ensaio constituíram em:

- Incubação de alíquotas, em duplicata, contendo o substrato Hip-His-Leu (1 mM), o peptídeo TsHpT-I (0,08 mM) e a ECA (3,3 mM), utilizando o tampão borato de sódio 0,4 M (pH 8,3), contendo 0,9 M de NaCl, durante 20 minutos, a 37°C. A ECA e o peptídeo foram adicionados simultaneamente.
- A reação foi interrompida pela adição de 1,2 mL de NaOH (0,34 M); foram adicionados 10 0 μ L de orto-ftaldeído (o-ftaldeído) (20 mg/mL em metanol) e, após 10 minutos em temperatura ambiente e protegidos da luz, 200 μ L de HCl 3 N.

- Esta solução, fluorescente, foi analisada por um espectrofluorímetro, utilizando os seguintes comprimentos de onda: 365 nm para excitação e 495 nm para emissão.
- Controles (brancos) corresponderam à repetição das etapas, porém, com inversão da ordem de adição do peptídeo + ECA e NaOH.
- Uma curva padrão de 3,905 a 125 mmol de His-Leu foi usada para o ensaio.
- A atividade da ECA foi calculada em mM de His-Leu/min/mL utilizando a seguinte equação:

$$\text{ECA}(\text{mmoles/mL/min.}) = \frac{\text{Fa} \times \text{Fc}}{t}$$

Fa – intensidade da fluorescência da amostra menos a intensidade da fluorescência do branco da amostra.

Fc – média dos fatores de calibração obtidos para cada concentração padrão:

$$\text{Fc} = \text{fc}_1 + \text{fc}_2 = \text{fc}_n$$

$$\text{Fc} = \text{P}/2 : \text{Fp}$$

P/2 – nmoles de His-Leu/500 μ L (Solução Padrão)

Fp – intensidade de fluorescência do padrão menos a intensidade de fluorescência do branco do padrão.

t – tempo de reação.

3.13. Microscopia Confocal

3.13.1. Produção de NO em células CHO B₂

Para avaliar se o peptídeo TsHpT-I e seus análogos sintéticos TsHpT₁₇₋₂₅ e TsHpT_{ac17-25am} induzem a produção de NO via os receptores das cininas (subtipo B₂), utilizou-se células de ovário de hamster (CHO) transfectadas com este subtipo de receptor. Estas células foram pré-incubadas, por 20 minutos, com 1 mL da sonda fluorescente DAF-FM diacetato (2,5 µM). Posteriormente o DAF-FM diacetato foi aspirado e adicionou-se 1mL de HBS. Após 20 minutos, o HBS foi aspirado e os peptídeos incubados durante 30 minutos. As condições testadas foram: **1)** HBS (controle negativo); **2)** BK [10⁻⁶ M] e **3)** BK [10⁻⁸ M] (controles positivos); **4)** TsHpT-I [10⁻⁶ M]; **5)** BK [10⁻⁶ M] + TsHpT-I [10⁻⁶ M]; **6)** TsHpT_{ac17-25am} [10⁻⁶ M]; **7)** TsHpT₁₇₋₂₅ [10⁻⁶ M]; **8)** BK [10⁻⁶ M] + TsHpT₁₇₋₂₅ [10⁻⁶ M]. Passado o tempo de incubação, o sobrenadante foi aspirado e as células lavadas com HBS (processo repetido 2 vezes). Terminada as etapas acima, as lâminas foram montadas para análise por microscopia confocal.

As lâminas eram, então, analisadas em microscópio confocal (FITC 488 nm, filtro LP505) – modelo Axiovert 200M, Zeiss (Gera, Alemanha) – para verificar a emissão de fluorescência pelas células tratadas. A ativação do receptor B₂ induz a produção de NO. Desta forma, utilizou-se o reagente fluorescente DAF-FM diacetato, que se liga ao NO intracelular, tornando o citoplasma fluorescente. Assim, quanto maior a intensidade desta fluorescência, maior a produção de NO. Eram armazenadas as imagens de três células por amostra, para posterior análise. Desta forma, cada amostra era testada em triplicata.

As imagens adquiridas, utilizando o programa Zeiss LSM Image Examiner (Gera, Alemanha) eram, transferidas para o programa Scion Image (Frederick, EUA), que mede a intensidade da fluorescência em pixels por área.

3.14. Análise estatística

A comparação das variações da pressão arterial média foi feita através do teste *One-Way ANOVA* seguido do teste *Kruskal-Wallis*.

Para verificar se as diferenças dos valores obtidos no experimento de produção de NO em células CHO B₂ eram estatisticamente significativos, utilizou-se também o teste *One-Way ANOVA* seguido do teste *Kruskal-Wallis*.

As diferenças eram consideradas significativas quando $p < 0,05$.



4. RESULTADOS

4.1. Efeito das injeções (i.v.) do peptídeo TsHpT-I sobre a ação hipotensora de BK.

O peptídeo TsHpT-I foi injetado em ratos normotensos (Wistar, sexo masculino), pesando entre 255 e 310 g. Foi utilizada inicialmente uma dose de 200 μg de peptídeo por rato (707 $\mu\text{g}/\text{Kg}$). Como esta dose apresentou ação potenciadora do efeito hipotensor de BK (dados não mostrados), utilizou-se, a partir de então, uma dose 20 vezes menor (35 $\mu\text{g}/\text{Kg}$).

Além da dosagem superior, os primeiros ensaios foram realizados por períodos de 1 hora (dados não mostrados). Como o peptídeo TsHpT-I foi capaz de potenciar a resposta da BK até o último ponto de observação (60 minutos), o período de análise foi ampliado para 120 minutos.

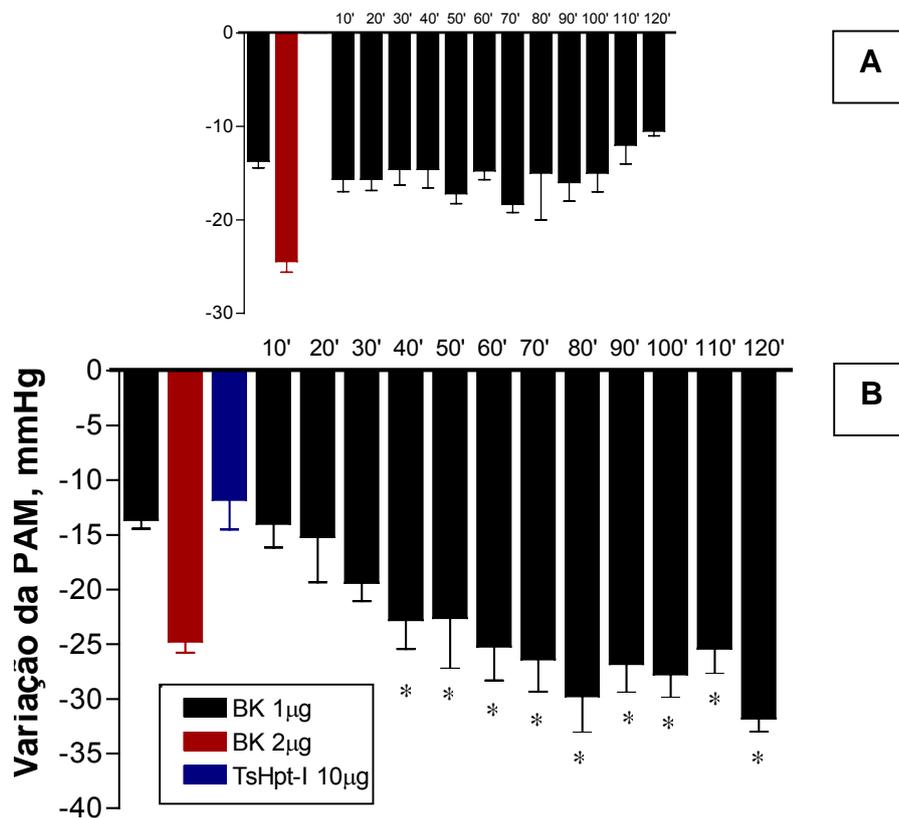


Figura 16 – Experimento de potenciação de BK com o peptídeo TsHpT-I. A) Controle do experimento. Efeito da injeção de solução salina (i.v.). **B)** Efeito da injeção (i.v.) de TsHpT-I (35 µg/Kg) sobre o efeito hipotensor de BK em ratos Wistar acordados (n = 5). Note que o peptídeo TsHpT-I, quando injetado sozinho (barra azul), apresenta uma média da variação da pressão arterial média (Δ PAM) de aproximadamente -13 mmHg, semelhante ao Δ PAM produzido pela injeção de BK (1µg). *Estatisticamente significativo ($p < 0.05$).

Analisando os resultados da figura 16B, verifica-se que o peptídeo TsHpT-I foi capaz de transformar o efeito hipotensor de uma dose simples de BK (1µg), no efeito de uma dose dupla (2µg) após 40 minutos de sua administração. É interessante notar que este peptídeo foi capaz de promover uma hipotensão nos ratos independente da administração de BK (barra azul). Vale ressaltar que esta queda da pressão arterial foi rapidamente revertida.

4.2. Ensaio enzimático: cinética de degradação do peptídeo TsHpT-I pela enzima carboxipeptidase Y (CPY)

O peptídeo TsHpT-I (2722,43 Da) foi incubado com a enzima CPY, que catalisa a hidrólise seqüencial da ligação peptídica do último resíduo da região C-terminal. A figura 17 mostra a cinética de degradação do peptídeo pela CPY.

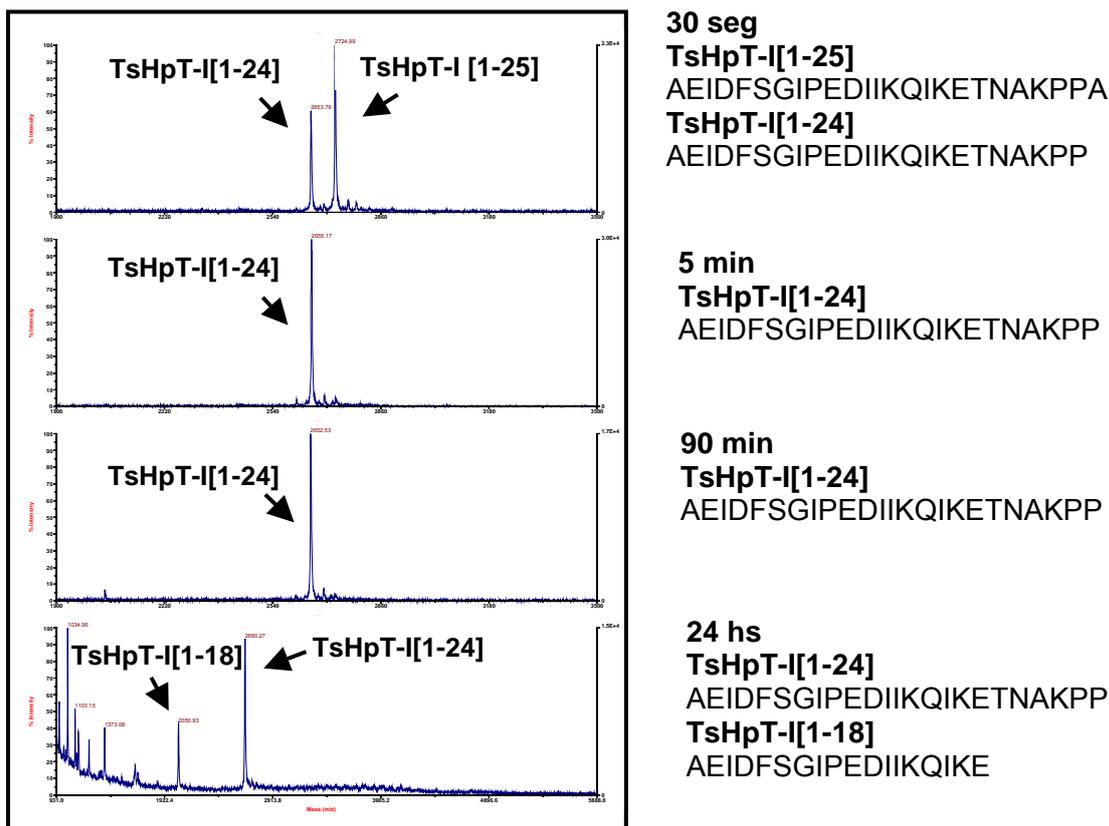


Figura 17 – Ensaio de degradação enzimática de TsHpT-I pela CPY. Espectro (m/z) obtido por espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF, mostrando os sinais observados após incubação de TsHpT-I com CPY por 30 s., 5 min, 90 min, e 18 h. Pode-se relacionar a massa molecular observada com a seqüência de aminoácidos (lado direito da figura).

A análise do espectro (figura 17) revela que, após 30 segundo de incubação, o resíduo de Ala na posição C-terminal é removido. Após 5 minutos de incubação, o espectro apresenta apenas um sinal predominante, que corresponde ao peptídeo nativo sem a o resíduo de Ala C-terminal (TsHpT-I[1-24]), e ainda exclusivamente

visualizado com 90 minutos, o que mostra uma grande dificuldade da CPY em catalisar a hidrólise da ligação peptídica entre os dois resíduos de Pro C-terminais. Apenas após 24 horas de incubação, dois sinais principais podem ser visualizados, correspondendo ao acúmulo dos peptídeos TsHpT-I[1-24] e TsHpT-I[1-18]. Este último apresenta resíduos de Lys e Glu na região C-terminal - com cargas positiva e negativa, respectivamente -, e que parecem dificultar a ação da CPY. Outros picos podem ser observados, correspondentes aos fragmentos menores do peptídeo.

Desta forma, parece que os resíduos Pro-Pro (posições 23 e 24) e Lys-Glu (posições 17 e 18) conferem ao peptídeo uma proteção estrutural contra a hidrólise promovida pela CPY. Tais proteções estariam relacionadas com impedimentos estéricos – no caso do dipeptídeo Pro-Pro – e possivelmente eletrostáticos, no caso dos resíduos Lys-Glu, carregados, respectivamente, com cargas positiva e negativa.

4.3. Síntese dos peptídeos TsHpT₁₇₋₂₅ e TsHpT_{ac17-25am}

Após analisar os resultados obtidos pela ação enzimática de CPY em TsHpT-I (seção anterior), optou-se pela síntese de dois peptídeos denominados TsHpT₁₇₋₂₅ e o TsHpT_{ac17-25am}, este último sintetizado com grupos químicos protetores (acetil e amida) em ambas as extremidades.



Figura 18: Seqüência de aminoácidos dos peptídeos sintéticos.

Para a síntese dos peptídeos TsHpT₁₇₋₂₅ (953,51 Da) e TsHpT_{ac17-25am} (995,57 Da), foram mantidos os resíduos P₂₄ e P₂₃ na região C-terminal, bem como os resíduos K₁₇ e E₁₈ na região N-terminal, produzindo, desta forma, peptídeos que apresentam uma provável proteção contra enzimas proteolíticas. Além destas proteções naturais, o peptídeo TsHpT_{ac17-25am} teve seu resíduo N-terminal (Lys) acetilado e seu resíduo C-terminal (Ala) amidado, na tentativa de aumentar sua estabilidade e meia vida no plasma sangüíneo (Figura 18). Após a síntese, o peptídeo de interesse foi purificado e analisado quanto ao seu grau de pureza (figura 19).

Como citado anteriormente, na seção 3.2, os peptídeos sintéticos TsHpT-I e TsHpT₁₇₋₂₅ foram adquiridos da CIML (Marselha, França).

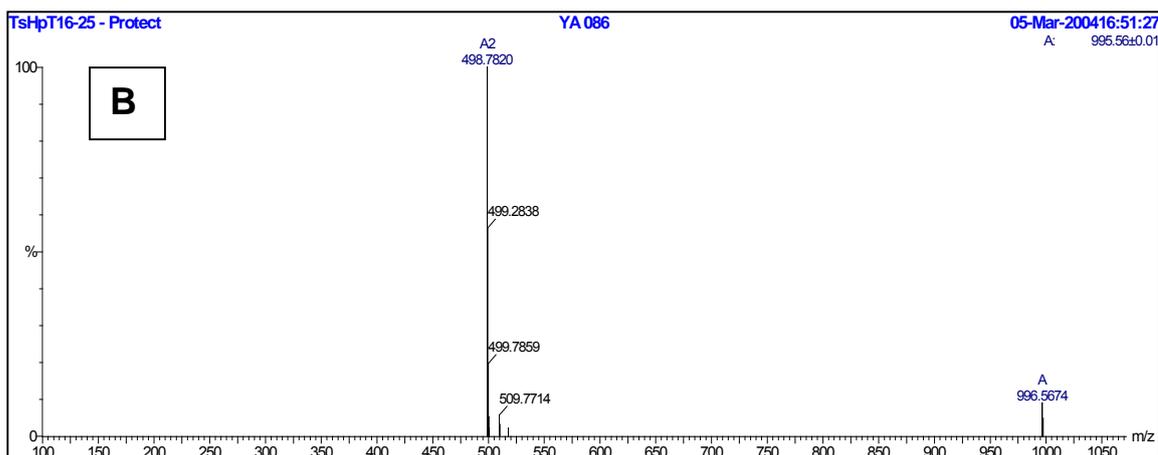
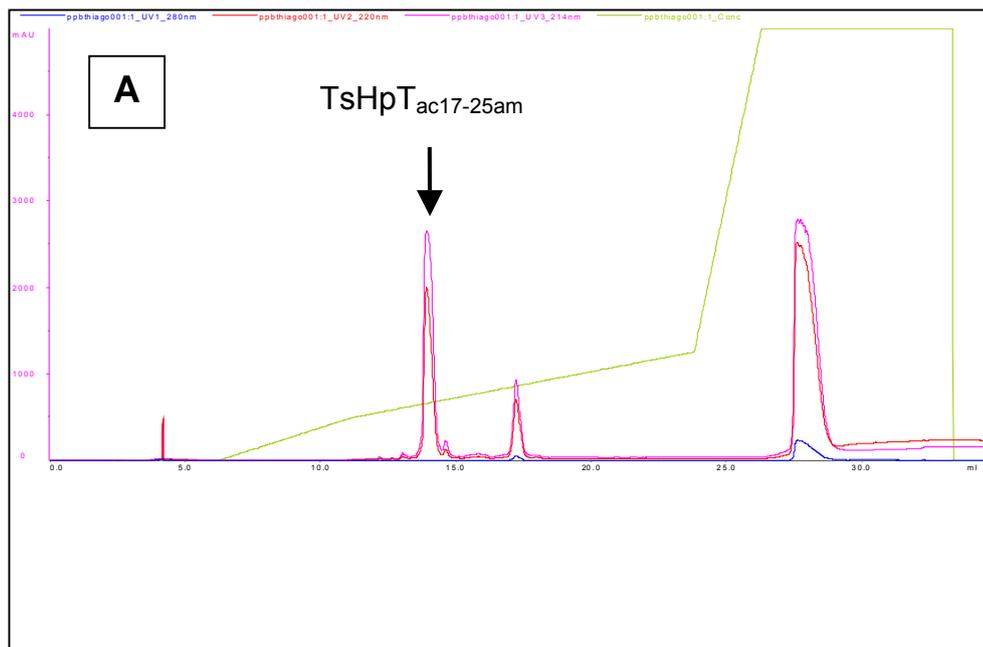


Figura 19 – Controle de qualidade da síntese do peptídeo TsHpT_{ac17-25am}. Após a síntese, o peptídeo (995,57 Da) foi purificado **(A)** e injetado no ESI-Q-TOF/MS **(B)**. **A)** HPLC de fase reversa: foram injetados 200 μg de peptídeo em um volume de 100 μL . Coluna analítica PepMap C18 (4,6mm X 150mm) Fluxo 1 mL/min; solução A (TFA 0,1% em água Milli-QTM) e solução B (TFA 0,1% em ACN). **B)** Espectro de massa (m/z) observado após purificação de TsHpT_{ac17-25am}. Apenas os sinais com relação $m/z = 996,57$, que corresponde ao peptídeo mono-protonado ($z=1$) e $m/z = 498,78$, que corresponde ao peptídeo di-protonado ($z = 2$) podem ser observados. Analisando a figura B, pode-se observar que o peptídeo TsHpT_{ac17-25am} apresenta alto grau de pureza.

4.4. Efeito das injeções (i.v.) dos peptídeos sintéticos TsHpT₁₇₋₂₅ e TsHpT_{ac-17-25am} sobre o efeito hipotensor de BK.

Os peptídeos TsHpT₁₇₋₂₅ (37 μ g/Kg) e TsHpT_{ac17-25am} (43 μ g/Kg) foram injetados em ratos machos normotensos (Wistar), pesando entre 245-300g e 220-245g respectivamente. Estas doses foram capazes de transformar o efeito de uma dose simples de BK (1 μ g) no efeito equivalente ao de uma dose duplicada de BK (2 μ g) (Figuras 20 e 21).

A figura 20 mostra que, com apenas 10 minutos após a administração do peptídeo TsHpT₁₇₋₂₅, o efeito hipotensor de uma dose simples de BK equiparou-se ao efeito de uma dose dupla. Somente no intervalo de 30 minutos este efeito não pôde ser observado.

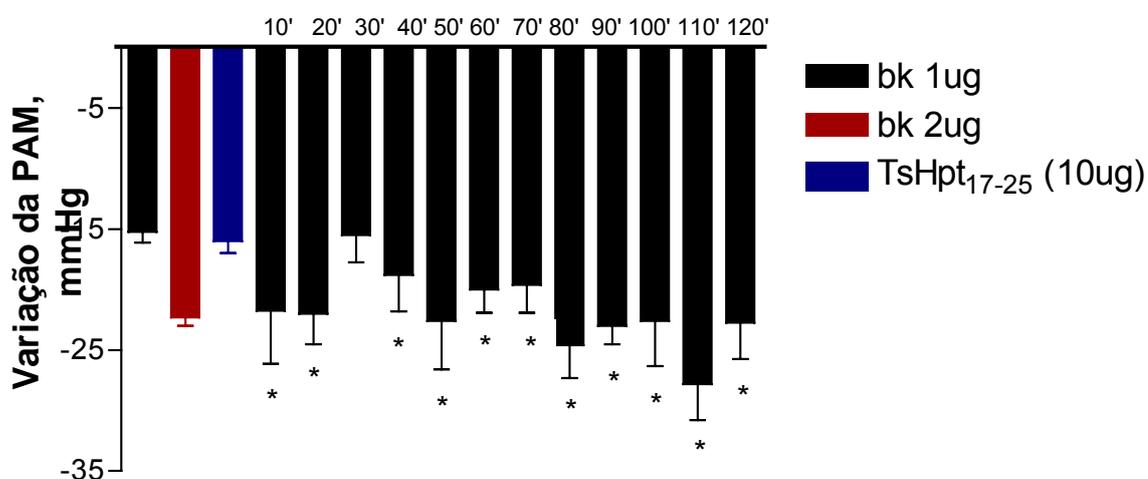


Figura 20 – Experimento de potenciação de BK com o peptídeo TsHpT₁₇₋₂₅. O gráfico de barras mostra o efeito de injeções (i.v.) de TsHpT₁₇₋₂₅ (37 μ g/Kg) sobre o efeito hipotensor de BK em ratos Wistar acordados (n = 5). Note que o peptídeo, quando injetado sozinho (barra azul), apresenta uma média da variação da pressão arterial média (Δ PAM) de aproximadamente -15 mmHg, semelhante ao Δ PAM produzido pela injeção de BK (1 μ g). *Estatisticamente significativo (p<0.05).

O peptídeo TsHpT_{ac17-25am}, por sua vez, foi capaz de potencializar o efeito hipotensor de BK após 20 minutos de sua administração, sendo que este efeito persistiu até o final do experimento (Figura 21).

Vale ressaltar que ambos os peptídeos foram capazes de manter a atividade hipotensora independente da administração de BK (barras azuis nas figuras 20 e 21).

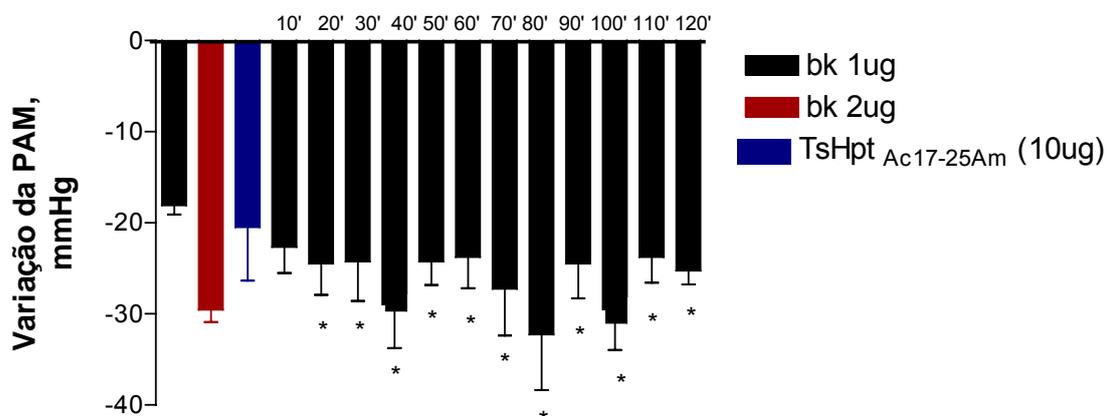


Figura 21 – Experimento de potenciação de BK com o peptídeo TsHpT_{ac17-25am}. O gráfico de barras mostra o efeito de injeções (i.v.) de TsHpT_{ac17-25am} (43µg/Kg) sobre o efeito hipotensor de BK em ratos Wistar acordados (n = 4). Note que o peptídeo, quando injetado sozinho (barra azul), apresenta uma média da variação da pressão arterial média (Δ PAM) de aproximadamente -20 mmHg, semelhante ao Δ PAM produzido pela injeção de BK (1µg). * Estatisticamente significativo (p<0.05).

4.5. Ação do peptídeo TsHpT₁₇₋₂₅ sobre a pressão arterial e frequência cardíaca de ratos hipertensos

O peptídeo TsHpT₁₇₋₂₅ foi injetado em ratos machos hipertensos, pertencentes à duas linhagens diferenciadas que apresentam dois modelos distintos de hipertensão, na tentativa de avaliar a sua capacidade hipotensora. Para tal, a pressão arterial e a frequência cardíaca foram monitoradas continuamente.

4.5.1. Ratos espontaneamente hipertensos (SHR)

O peptídeo TsHpT₁₇₋₂₅ (303µg/Kg) foi injetado (i.v.) em ratos da linhagem SHR (*Spontaneous Hypertensive Rats*), que apresentam um modelo semelhante ao da hipertensão essencial humana. A análise dos gráficos da figura 22 mostra que, logo após a administração de TsHpT₁₇₋₂₅, foi observada uma queda da PAM e da FC, seguida por uma elevação de ambos os parâmetros. Aproximadamente 40 minutos após a administração do peptídeo, foi novamente observada uma queda da PAM e da FC. A amplitude da queda da PAM aumentou consideravelmente após 180 minutos, persistindo até o final do experimento (6 horas).

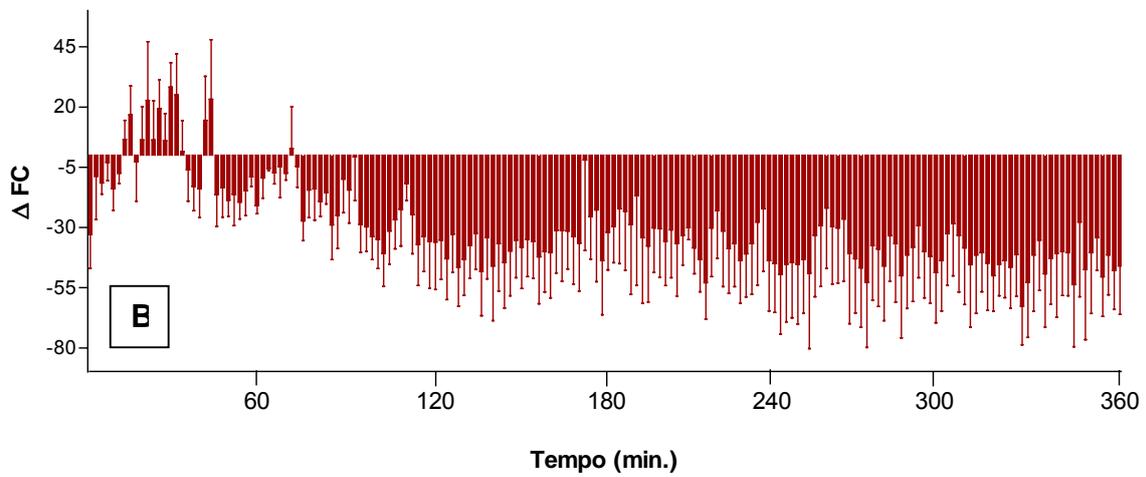
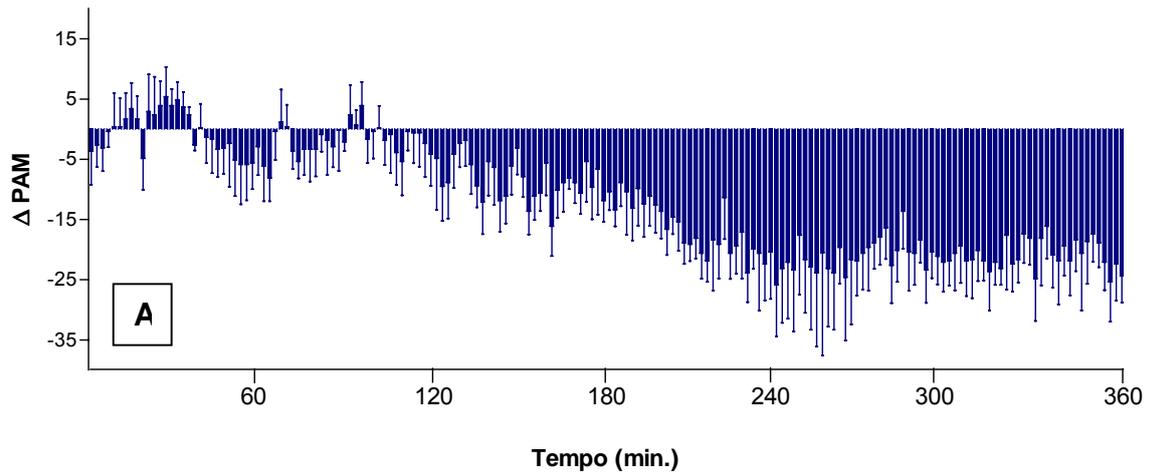


Figura 22 – Ensaio da atividade hipotensiva do peptídeo TsHpT₁₇₋₂₅ em ratos SHR. Ação de TsHpT₁₇₋₂₅ sobre a PAM e FC de ratos hipertensos SHR (n = 4). Perfis das variações da PAM (A) e da FC (B) após injeção (i.v.) de 100 µg do peptídeo TsHpT₁₇₋₂₅ (303 µg/Kg).

4.5.2. Ratos transgênicos (TGR)

O peptídeo TsHpT₁₇₋₂₅ (223 µg/Kg) foi injetado (i.v.) em ratos da linhagem TGR (*Transgenic Hypertensive Rats*), que apresentam uma superexpressão do gene da enzima renina. Em seguida à injeção de TsHpT₁₇₋₂₅, foi verificado um breve aumento da PAM e a ocorrência de taquicardia, seguido por uma queda da PAM, com a FC permanecendo elevada, e por um novo aumento da PAM. Passados cerca de 24 minutos são observadas uma nova queda da PAM e a ocorrência de bradicardia, com súbitos aumentos da PAM e da FC. Apesar de apresentar um perfil oscilatório, houve uma significativa queda da pressão arterial média dos animais, persistindo até o final dos experimentos. A maior amplitude de hipotensão induzida pelo peptídeo, nesta linhagem de rato, foi observada entre 60 e 120 minutos (Figura 23).

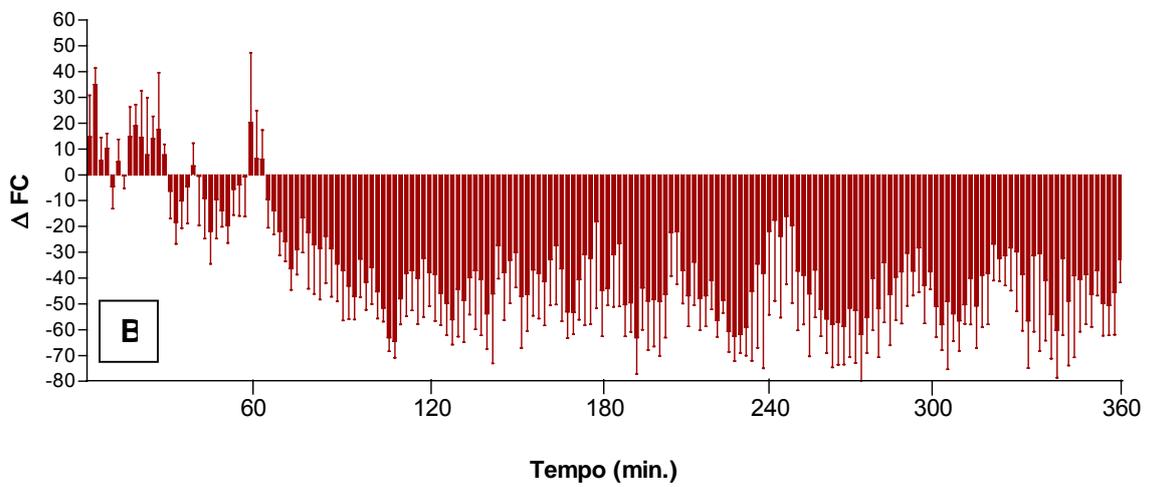
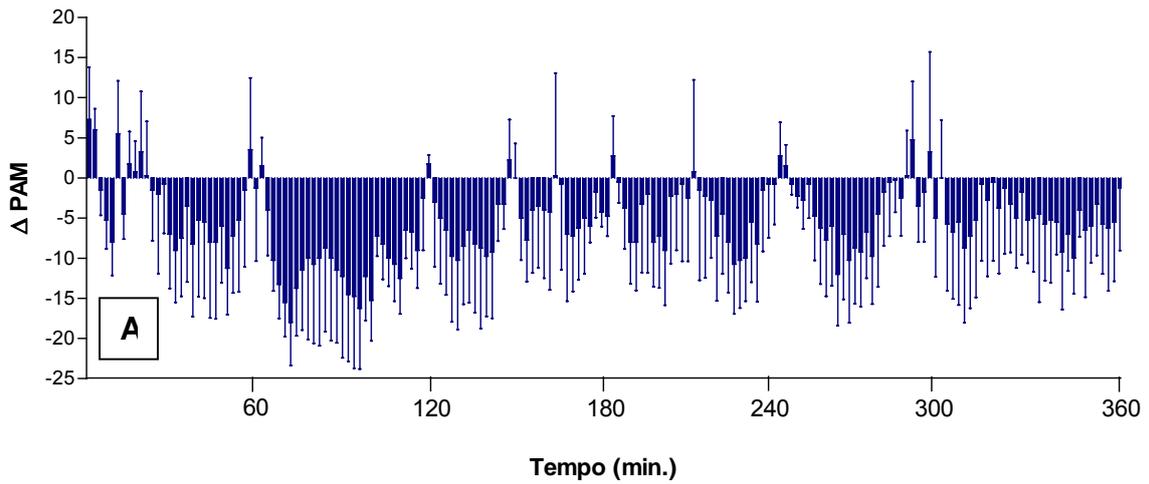


Figura 23 – Ensaio da atividade hipotensiva do peptídeo TsHpT₁₇₋₂₅ em ratos TGR. Ação de TsHpT₁₇₋₂₅ sobre a variação da PAM e da FC de ratos hipertensos TGR (n = 4). Perfis das variações da PAM (A) e da FC (B) após injeção (i.v.) de 100 µg do peptídeo (223 µg/Kg).

4.6. Avaliação da atividade inibitória da ECA

4.6.1. Método qualitativo

Para a verificação da inibição da ECA pelos peptídeos hipotensivos, uma triagem foi realizada por meio de análises por espectrometria de massa do complexo enzima-substrato-produto. A figura 24 mostra o controle para o experimento, que foi realizado pela incubação da ECA com seu substrato BK. No primeiro momento ($t = 0$), pode-se observar os sinais referentes à BK (1059,93 Da), sendo de menor intensidade, que possui carga igual a 1 ($m/z = 1060,93$) e outro, de maior intensidade com carga 2 ($m/z = 530,95$). Após 8 minutos de incubação, observa-se o surgimento de um novo sinal de $m/z = 322,29$, referente ao di-peptídeo Phe-Arg, hidrolisado a partir da região C-terminal da BK. Após 18h de incubação, os picos correspondentes a BK não podem mais ser detectados, sendo visível apenas os seus fragmentos, isto é, o dipeptídeo Phe-Arg e a BK sem os resíduos Ser-Pro e Phe-Arg ($m/z = 573,36$).

A figura 25 corresponde ao espectro produzido pela incubação de TsHpT-I (2722,43 Da) e BK (1059,93 Da) juntamente com a ECA. No início do experimento ($t = 0$), pode-se observar o sinal de BK com cargas 1 ($m/z = 1060,95$) e 2 ($m/z = 530,9620$), além dos sinais referentes ao TsHpT-I, com cargas 4 ($m/z = 682,34$) e 3 ($m/z = 909,46$). Após 40 min de incubação, o sinal referente ao di-peptídeo Phe-Arg pode ser visualizado e 18h após o início da incubação, o sinal de BK não pôde mais ser detectado. Após 18h de incubação, os picos referentes ao peptídeo TsHpT-I podem ser detectados e não há sinal algum detectável de degradação da molécula de TsHpT-I.

A figura 26 é referente à incubação da ECA e da BK na presença do peptídeo TsHpT_{ac17-25am}. Somente após 18 horas de incubação podemos observar os fragmentos originados a partir da hidrólise C-terminal da BK. Ainda, em 18 horas não

foi mais possível à visualização do sinal referente à BK, sugerindo sua total degradação pela ECA. Assim como o peptídeo TsHpT-I, o peptídeo TsHpT_{ac17-25am} não foi degradado pela ECA, uma vez que os picos referentes a ele podem ser visualizados e não foram detectados os picos referentes a hidrólise C-terminal deste peptídeo.

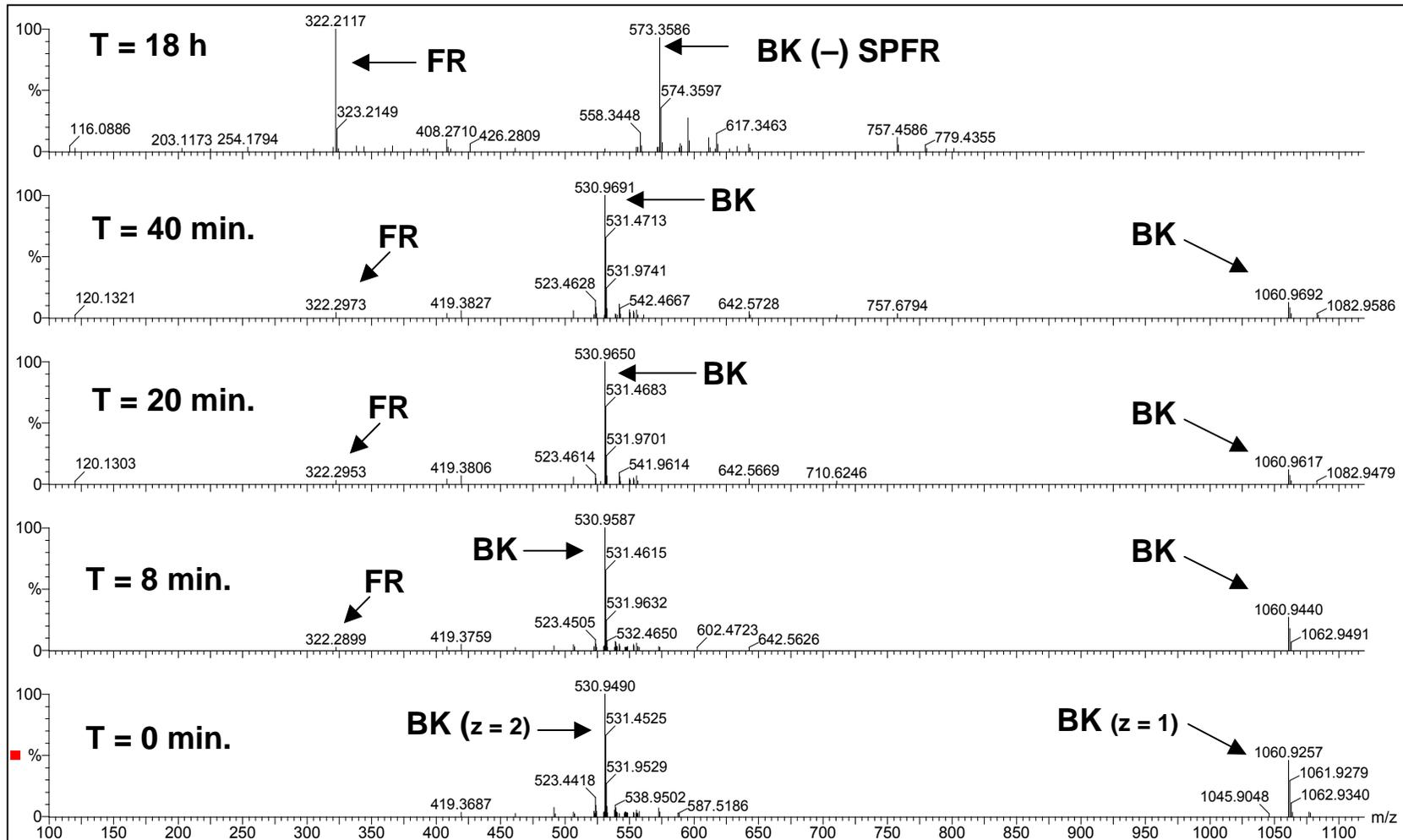


Figura 24 – Ensaio qualitativo para avaliar a inibição da ECA. Experimento controle: BK (1059,93 Da) foi incubada com ECA e aplicada no ESI-Q-TOF/MS com os tempos 0, 8, 20 e 40 minutos e 18 horas. Após 8 min de incubação, pode-se visualizar o sinal m/z = 322,29 correspondente à degradação de BK (Phe-Arg). Os sinais referentes à BK, mono-protonada (m/z = 1060,93) e di-protonada (m/z = 530,95), desaparecem após 18h de incubação.

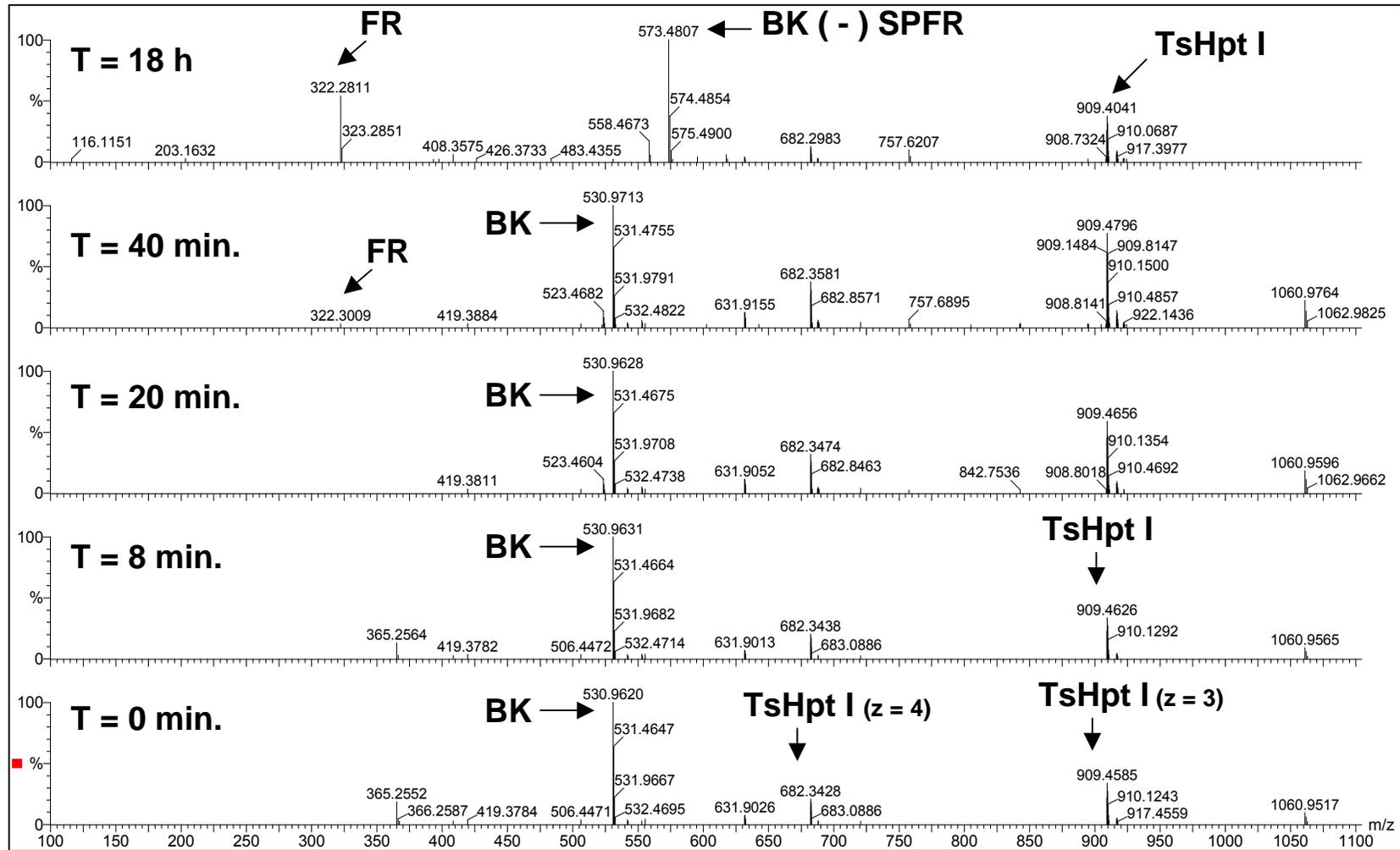


Figura 25 – Ensaio qualitativo para avaliar a inibição da ECA pelo peptídeo TsHpt-I. O complexo BK-ECA foi incubado com peptídeo TsHpt-I (2726,41 Da). Após 40 min, pode-se visualizar o sinal $m/z = 322,30$, correspondente à degradação de BK (Phe-Arg). Os picos referentes à BK, mono-protonada ($m/z = 1060,95$) e di-protonada ($m/z = 530,96$), desaparecem após 18h de incubação. Não são observados sinais de degradação do peptídeo TsHpt-I.

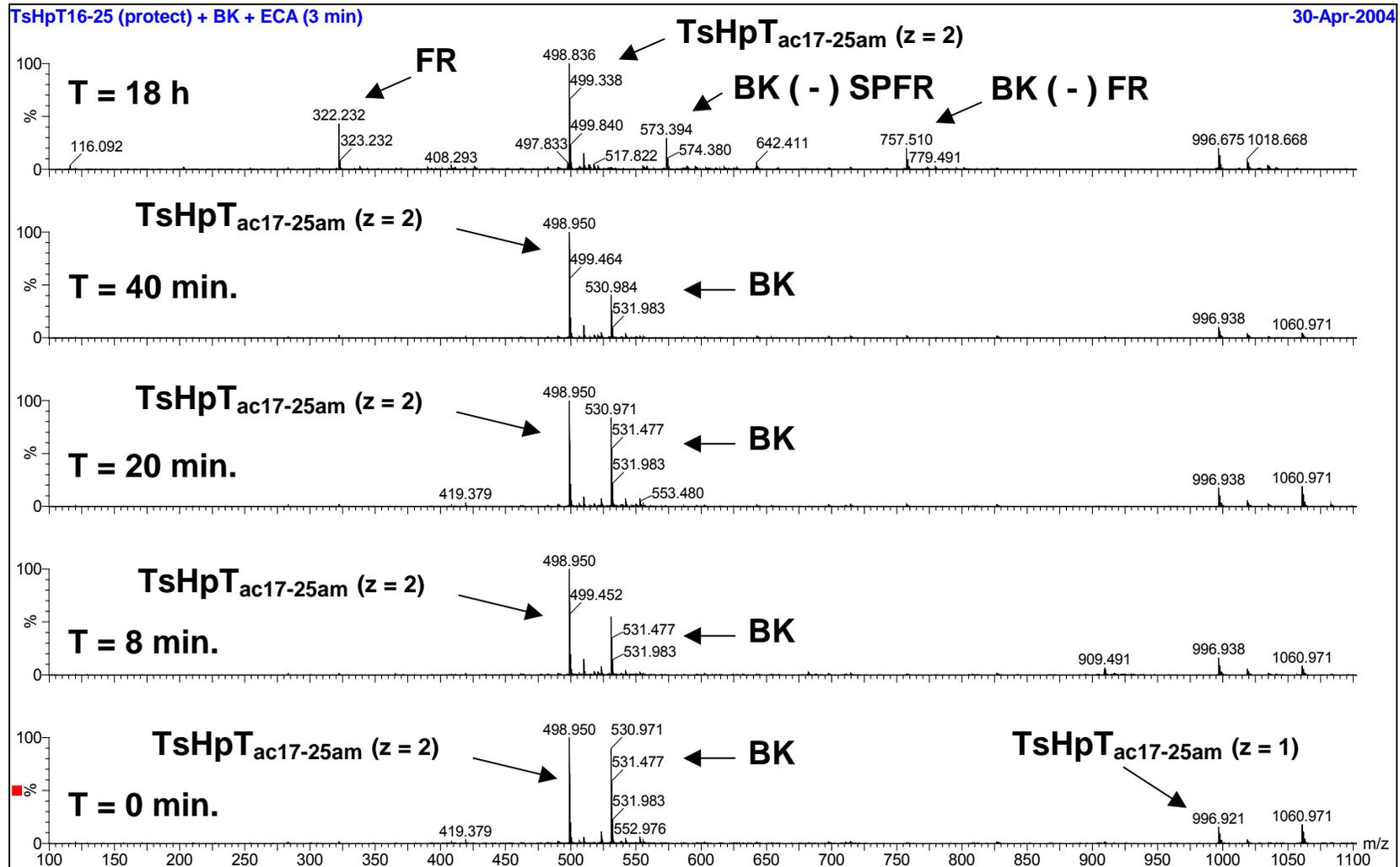


Figura 26 – Ensaio qualitativo para avaliar a inibição da ECA pelo peptídeo TsHpT-I_{ac17-25am}. O complexo BK-ECA foi incubado com peptídeo TsHpT-I_{ac17-25am} (995,57 Da). Após 40 min, pode-se visualizar o sinal $m/z = 322,30$, correspondente à degradação de BK (Phe-Arg). Os picos referentes à BK, mono-protonada ($m/z = 1060,95$) e di-protonada ($m/z = 530,96$), desaparecem após 18h de incubação. Não são observados sinais de degradação do peptídeo TsHpT-I_{ac17-25am}.

4.6.2. Método quantitativo

A tabela 6 mostra os resultados obtidos com a incubação do complexo ECA-substrato (Hip-His-Leu) com o peptídeo TsHpT-I, produzindo 0,4025 mM/min de His-Leu, enquanto a incubação do complexo ECA/Hip-His-Leu produziu 0,2912mM/min de His-Leu.

Tabela 6 – Ensaio quantitativo para avaliar a inibição da ECA pelo peptídeo TsHpT-I. O complexo ECA/Hip-His-Leu (3,3 nM/1,0 mM) foi testado na presença e ausência do peptídeo TsHpT-I (0,08mM), por 20 minutos a 37° C. Tampão borato de sódio 0,4 M contendo 0,9 M NaCl (pH8,3).

ECA [mM]	Substrato (HIP-HIS-LEU) [mM]	TsHpT-I [mM]	Produto (His-Leu) [mM/min]
0,0033	1,0	0,08	0,4025
0,0033	1,0	-	0,2912

4.7. Produção de NO em células CHO B₂ – Os peptídeos TsHpT-I, TsHpT₁₇₋₂₅ e TsHpT_{ac17-25am} induzem a síntese de NO?

A figura 27 mostra as imagens obtidas por microscopia confocal, após o ensaio de produção de NO (células CHO B₂) pelo peptídeo TsHpT-I e por seus análogos sintéticos. Para controle do experimento, utilizou-se HBS – controle negativo – e BK nas concentrações: 10⁻⁶ e 10⁻⁸ M – controles positivos.

Cada ensaio apresenta duas fotos (A e B), adquiridas através do programa Zeiss LSM Image Examiner (Gera, Alemanha). As imagens “A” representam as células no modo DIC (imagem sem a captação da fluorescência), para melhor visualização das estruturas celulares, demonstrando, assim, que a célula está intacta. As fotos “B” representam as células com a captação da fluorescência.

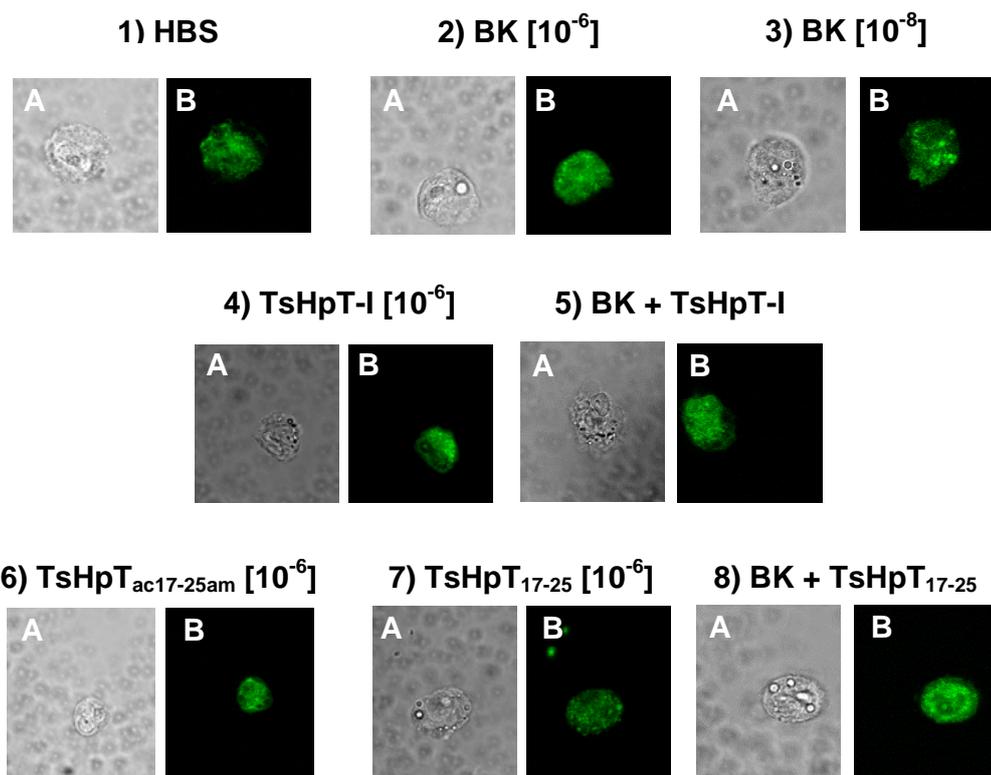


Figura 27 – Ensaio de produção de NO. (Células CHO B₂). **A)** Imagem DIC. **B)** Imagem com captação da fluorescência. **1)** Controle negativo (HBS). **2)** Controle positivo (BK 10⁻⁶ M). **3)** Controle positivo (BK 10⁻⁸ M). **4)** TsHpT-I (10⁻⁶ M). **5)** BK (10⁻⁶ M) + TsHpT-I (10⁻⁶ M). **6)** TsHpT_{ac17-25am} (10⁻⁶ M). **7)** BK (10⁻⁶ M) + TsHpT₁₇₋₂₅ (10⁻⁶ M). **8)** BK (10⁻⁶ M) + TsHpT₁₇₋₂₅ (10⁻⁶ M).

As fotos acima foram utilizadas para construir o gráfico abaixo. No eixo das ordenadas (Y) estão plotados os valores referentes à intensidade da fluorescência (número de pixels por área) e no eixo das abscissas (X) estão as amostras testadas.

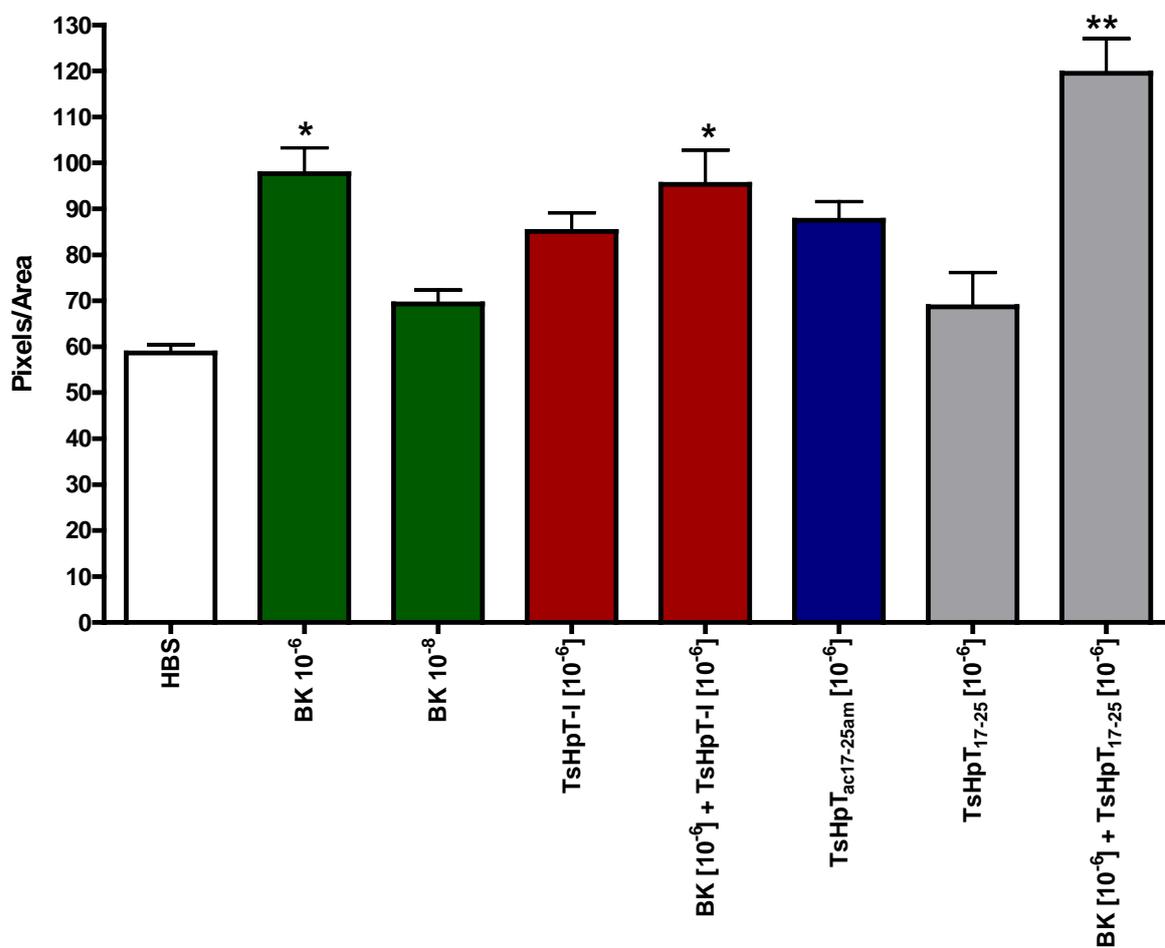


Figura 28 – Ensaio de produção de NO. O gráfico de barras mostra a intensidade da fluorescência emitida pelas células CHO (transfectadas com receptores B₂) após serem tratadas com: **1)** HBS; **2)** BK (10^{-6} M); **3)** BK (10^{-8} M); **4)** TsHpT-I (10^{-6} M); **5)** BK (10^{-6} M) + TsHpT-I (10^{-6} M); **6)** TsHpT_{ac17-25am} (10^{-6} M); **7)** TsHpT₁₇₋₂₅ (10^{-6} M); **8)** BK (10^{-6} M) + TsHpT₁₇₋₂₅ (10^{-6} M). * Estatisticamente significativo em relação ao controle negativo (HBS). ** Estatisticamente significativo em relação aos controles negativo (HBS) e positivo (BK 10^{-6} M) ($p < 0.05$).



5. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

5.1. Estudo do efeito farmacológico do peptídeo TsHpT-I e de seus análogos sintéticos.

Após a descoberta dos primeiros PPB's, em 1970 por FERREIRA *et al.*, uma corrida à procura de novos peptídeos que apresentassem tal atividade foi iniciada, acarretando no descobrimento de várias novas moléculas. Algumas destas foram utilizadas como moldes para o desenvolvimento de novas drogas anti-hipertensivas, sendo o Captopril[®] um exemplo clássico (FERREIRA *et al.*, 1970; KATO & SUZUKI, 1971; GREENE *et al.*, 1972; CHENG-WU *et al.*, 1982; CINTRA *et al.*, 1990; SOSNINA *et al.*, 1990; FERREIRA *et al.*, 1992; FERREIRA *et al.*, 1993; MEKI *et al.*, 1995; FERREIRA *et al.*, 1996; IANZER *et al.*, 2004; PIMENTA *et al.*, pedido de concessão de patente junto ao INPI sob o número PI 0202157-9 e junto ao PCT, sob o número PCT/BR 03/00073).

As estruturas primárias destes peptídeos apresentam, em sua grande maioria, uma assinatura molecular contendo Ile-Pro-Pro na região C-terminal e um ácido piroglutâmico (Pyr) na região N-terminal (IANZER *et al.*, 2004). O peptídeo TsHpT-I, isolado do veneno do escorpião *Tityus serrulatus* (PIMENTA *et al.*, pedido de concessão de patente junto ao INPI sob o número PI 0202157-9 e junto ao PCT, sob o número PCT/BR 03/00073) apresenta uma seqüência de aminoácidos um pouco diferente do consenso das PPB's. Juntamente com o peptídeo K₁₂, isolado do veneno do escorpião africano *Buthus occitanus* por MEKI *et al.* (1995), apresenta uma seqüência C-terminal terminada nos resíduos Pro-Pro-Ala, diferentemente da assinatura das PPB's isoladas do veneno de serpentes e que são amplamente estudadas. Em relação ao peptídeo K₁₂, TsHpT-I apresenta uma diferença marcante; o resíduo que antecede a seqüência Pro-Pro-Ala é uma Lys (que apresenta carga positiva), e não um resíduo de Gly (resíduo neutro). Esta diferença pode estar associada à possível diferença no modo de ação destes peptídeos (assunto que

será abordado oportunamente). Além destas diferenças na região C-terminal, estes dois peptídeos não apresentam o resíduo modificado Pyr na região N-terminal.

O peptídeo TsHpT-I é um potenciador do efeito hipotensor da BK, o que pode ser observado nos resultados exibidos na figura 16B. Uma dose de 35 µg/kg de rato foi capaz de transformar o efeito de uma dose simples de BK (1µg) no de uma dose dupla (2µg). O efeito hipotensor de TsHpT-I *in vivo* foi bastante duradouro, uma vez que foi observada a potenciação do efeito da BK por até 120 minutos após a sua administração. Esta observação pode indicar que este peptídeo apresenta uma grande estabilidade no plasma sangüíneo, estando protegido da ação de várias enzimas proteolíticas encontradas no plasma, como por exemplo, a enzima conversora de angiotensina (ECA), as carboxipeptidases Y e N (CPY e CPN), a endopeptidase N (EPN) e a enzima conversora de angiotensina 2 (ECA 2). Vale ressaltar que a resistência às ações das enzimas ECA e CPY foram comprovadas experimentalmente neste trabalho (Figuras 17, 25 e 26). A avaliação do tempo máximo observável deste efeito potenciador *in vivo* não foi possível, uma vez que injeções sucessivas de BK são extremamente prejudiciais ao animal, pelo fato da BK ser um potente agente pró-inflamatório e indutor de dor (HARDMAN *et al.*, 1996).

Os peptídeos sintéticos TsHpT₁₇₋₂₅ e TsHpT_{ac17-25am}, que representam uma minimização da estrutura primária de TsHpT-I, foram capazes de manter a mesma atividade potenciadora de BK observada para o peptídeo nativo TsHpT-I, como mostrada pelos experimentos da seção 4.4 (Figuras 20 e 21). Este resultado é muito relevante no estudo de estrutura/função do peptídeo nativo TsHpT-I, uma vez que após a redução do tamanho de sua cadeia peptídica, de 25 para apenas 9 resíduos, a ação farmacológica avaliada foi mantida, apesar do comportamento cinético destes três peptídeos, ao que tudo indica, serem diferenciados. Os peptídeos sintéticos parecem manter a estabilidade no plasma sangüíneo, uma vez que também

potenciaram BK por até 120 minutos. Estudos de cinética de degradação *in vivo* e *in vitro* destes peptídeos serão conduzidos em etapas posteriores a este estudo.

Como mencionado anteriormente, apesar de manterem a ação potenciadora da BK, os análogos sintéticos do peptídeo TsHpT-I parecem não manter a mesma cinética de ativação. TsHpT₁₇₋₂₅ foi capaz de transformar o efeito hipotensor de uma dose simples de BK nos efeitos de uma dose dupla com apenas 10 minutos após a sua administração, efeito este que só pôde ser observado após 20 e 40 minutos, quando os peptídeos administrados eram TsHpT_{ac17-25am} e TsHpT-I, respectivamente. O entendimento sobre esta ativação precoce, que ocorre em relação às outras formas do peptídeo, deve ser aprofundado, uma vez que uma maior eficiência e rapidez nos efeitos hipotensores desta droga podem ser desejáveis. Uma possível explicação para a observação dos diferentes tempos de ativação dos peptídeos TsHpT-I, TsHpT₁₇₋₂₅ e TsHpT_{ac-17-25am} talvez possa estar no fato de que estes peptídeos devam ser, primariamente processados enzimaticamente, agindo como uma pró-droga e liberando, posteriormente, a forma ativa que pode ser de menor estrutura. Neste caso, a região *N*-terminal deve ser processada, restando apenas parte da região *C*-terminal, responsável pelo efeito hipotensor. No caso do peptídeo nativo (TsHpT-I) - com 25 resíduos de aminoácidos - e do peptídeo sintético TsHpT_{ac-17-25am} - protegido por uma acetilação do resíduo de Lys *N*-terminal - a remoção da porção *N*-terminal deve ser mais lenta, o que explicaria a diferença de cerca de 10 minutos para sua ativação com relação ao peptídeo TsHpT₁₇₋₂₅. Experimentos preliminares fornecem subsídios para esta proposição (dados não mostrados).

É importante ressaltar que a minimização da estrutura primária do peptídeo nativo TsHpT-I é extremamente importante, uma vez que a redução da massa molecular é vital para uma futura formulação de medicamentos, pois peptídeos com

baixa massa molecular são absorvidos com mais eficiência pela mucosa gastrointestinal.

Ao analisar os resultados obtidos nos experimentos de potenciação de BK, um outro fato interessante é observado. A injeção dos peptídeos, TsHpT-I, TsHpT₁₇₋₂₅ e TsHpT_{ac-17-25am}, é capaz de induzir, por si, uma diminuição imediata da pressão arterial média dos animais, o que sugere que estes peptídeos apresentam uma ação hipotensora independente da administração da BK.

Para avaliar a ação hipotensora e independente da administração de BK, o peptídeo TsHpT₁₇₋₂₅ foi administrado em ratos hipertensos de duas linhagens, *Spontaneous Hypertensive Rats* (SHR) e *Transgenic Hypertensive Rats* (TGR) (Figuras 22 e 23).

Analisando os resultados obtidos na linhagem SHR, pelo menos três momentos podem ser observados: um primeiro momento, logo após a administração do peptídeo, no qual ocorre um abaixamento da PAM e da FC; um segundo momento com uma rápida taquicardia e aumento da pressão arterial e um terceiro momento, persistente e relativamente contínuo, com a queda da PAM e da FC.

Os resultados obtidos com a administração do peptídeo em ratos TGR (Figura 23) apresentaram um perfil da pressão arterial média e da frequência cardíaca um pouco diferentes dos obtidos em ratos SHR. Podem ser observadas de três a quatro fases após a administração do peptídeo. Logo após a injeção do peptídeo, ocorre um rápido aumento da PAM e FC. Em seguida, ocorre uma abrupta e temporária hipotensão (cerca de 6 minutos de duração), com a FC permanecendo elevada, seguida por um rápido aumento da PAM. Após este perfil inicial, que dura aproximadamente 22 minutos, uma persistente e oscilatória hipotensão e bradicardia podem ser observadas até o final do experimento (6 horas).

Desta forma, podemos concluir que o peptídeo TsHpT₁₇₋₂₅ é um potente agente indutor de hipotensão, apresentando efeito duradouro. É possível que a hipotensão persistente observada, em ambas as linhagens, tenha como causa a bradicardia, que pode ter sido induzida pela administração do peptídeo. Vale ressaltar que nos minutos iniciais, logo após a injeção do peptídeo, as diferenças de comportamento da PAM e da FC nas linhagens SHR e TGR talvez se devam ao fato de as causas que levam à hipertensão nestas duas linhagens serem diferentes. A hipertensão que ocorre na linhagem TGR é causada por uma superexpressão da enzima renina, gerando um aumento do substrato da ECA (ANG I), e conseqüente aumento da concentração de ANG II circulante. Na linhagem SHR, a causa é desconhecida, e trata-se de um modelo parecido à hipertensão essencial humana.

5.2. Mecanismos de ação do peptídeo TsHpT-I e de seus análogos sintéticos.

Na tentativa de elucidar o mecanismo de ação dos peptídeos TsHpT-I, TsHpT₁₇₋₂₅ e TsHpT_{ac17-25am}, experimentos de inibição da ECA foram realizados. Sabe-se que vários PPB's descritos na literatura agem como inibidores desta enzima (FERREIRA *et al.*, 1965; FERREIRA *et al.*, 1970; KATO & SUZUKI, 1971; GREENE *et al.*, 1972; CHENG-WU *et al.*, 1982; CINTRA *et al.*, 1990; SOSNINA *et al.*, 1990; FERREIRA *et al.*, 1992; FERREIRA *et al.*, 1993; MEKI *et al.*, 1995; FERREIRA *et al.*, 1996; IANZER *et al.*, 2004).

Os inibidores da ECA potencializam os efeitos da BK porque inibem a síntese de ANG II e a degradação da BK (FERREIRA *et al.*, 1970; YANG *et al.*, 1970) e, principalmente, pela interação do complexo ECA-inibidor com o receptor B₂, gerando um *cross-talk* entre eles, que aumenta a velocidade de ressensibilização do receptor (*turnover*), podendo ser ativado por mais moléculas de BK, aumentando a produção de NO e conseqüente vasodilatação - efeito de potenciação da BK (ERDÖS *et al.*, 2002). Vale ressaltar que este mecanismo de ação não exclui a possibilidade do inibidor ligar-se diretamente ao receptor das cininas (ERDÖS, *et al.*, 1999). Uma outra forma de ação é a interação direta do inibidor com o receptor B₁, ativando a síntese de NO e conseqüente vasodilatação.

Analisando a estrutura primária de TsHpT-I, TsHpT₁₇₋₂₅ e TsHpT_{ac17-25am}, (Figura 18) verifica-se que a região C-terminal destes peptídeos apresentam um resíduo de Pro na penúltima posição, sendo este, exatamente o resíduo que a ECA não consegue hidrolisar (HARDMAN *et al.*, 1996). Além disso, os três últimos resíduos são Pro-Pro-Ala, a mesma seqüência observada no peptídeo K₁₂, um conhecido inibidor da ECA (MEKI *et al.*, 1995). Diante destas evidências, os peptídeos TsHpT-I e TsHpT_{ac17-25am} foram utilizados nos experimentos de inibição

desta enzima. Um primeiro experimento, denominado qualitativo, foi desenvolvido na tentativa de se criar um experimento para rápida avaliação de candidatos a inibidores da ECA. Os resultados demonstraram que ambos os peptídeos testados (TsHpT-I e TsHpT_{ac17-25am}) foram capazes de inibir, parcialmente, a atividade proteolítica da ECA (Figuras 24, 25 e 26). No experimento controle (Figura 24), onde somente a enzima e o seu substrato (BK) foram incubados, em 8 minutos de incubação já se pode observar um sinal de 322,29 *m/z*, referente ao dipeptídeo Phe-Arg, originado a partir da hidrólise da BK, e com 18 horas todo o substrato foi degradado. Quando o peptídeo TsHpT-I foi incubado com a ECA e a BK (Figura 25), apenas após 40 minutos de incubação pode-se verificar a presença destes fragmentos, e com 18 horas toda a BK também está hidrolisada. No caso da incubação do peptídeo TsHpT_{ac17-25am} (Figura 26), apenas com 18 horas podemos observar os fragmentos da hidrólise da BK e a sua completa degradação.

Estes resultados devem, entretanto, ser vistos com ressalvas, uma vez que o tampão utilizado foi o bicarbonato de amônio, sem a adição de NaCl, uma vez que este sal dificulta a análise dos dados obtidos pelo espectrômetro de massas do tipo ES-Q-TOF, e por isso deve ser evitado. Em contrapartida, sabe-se que a ECA necessita de íons Cl⁻ para sua atividade catalítica (DIVE *et al.*, 1999), portanto as condições utilizadas para realizar os experimentos não foram ideais para a atividade enzimática. A ausência de íons cloro do meio pode explicar, ao menos em parte, a demora na degradação completa da BK, que ocorreu em cerca de 18 horas. Vale ressaltar que, apesar das condições utilizadas para o experimento não serem as ideais, a enzima estava funcional e ativa, mesmo que apresentasse uma baixa eficiência catalítica.

Um outro ponto que deve ser avaliado é o fenômeno da supressão de sinais. Sabe-se que os sinais que apresentam uma alta intensidade suprimem sinais com

baixa intensidade. Talvez por isso o sinal correspondente ao fragmento Phe-Arg da hidrólise da BK, que pode ser observado, com uma baixa intensidade, a partir de 8 minutos de incubação no experimento controle, só pode ser observado com 40 minutos e 18 horas de incubação, nos experimentos com os peptídeos TsHpT-I e TsHpT_{ac17-25am}, respectivamente. Com a adição dos peptídeos, um novo sinal aparece no espectro, correspondente ao peptídeo e que não estava presente no experimento controle. Este sinal, que apresenta uma alta intensidade, pode estar suprimindo o sinal referente ao fragmento Phe-Arg, sendo assim, este pico pode estar presente nos experimentos com os peptídeos, mas não possa ser facilmente visualizado, aparecendo somente quando sua intensidade aumenta.

Um dado importante retirado destes experimentos é que os peptídeos testados (TsHpT-I e TsHpT_{ac17-25am}) não são substratos para a ECA, uma vez que após 18 horas de incubação pode-se observar o sinal destes peptídeos e nenhum fragmento originado da hidrólise C-terminal pode ser detectado. Ainda, dados não mostrados revelam que estes peptídeos permaneceram intactos após sete dias de incubação.

Para que este tipo de experimento possa se tornar conclusivo, e desta forma poder ser utilizado como um método relativamente rápido para avaliar possíveis candidatos a inibidores da ECA, faz-se necessário à utilização de um método adicional para quantificar os produtos da hidrólise da BK. A utilização de um passo de purificação em coluna de fase reversa, após a incubação e antes da análise dos produtos por ESI-Q-TOF/MS, pode ser o método de escolha. Dessa forma, os fragmentos originados pela proteólise podem ser quantificados, além da possibilidade de se utilizar um tampão contendo NaCl, uma vez que este sal seria separado da amostra na purificação (MEKI, *et al.*, 1995).

Como os experimentos quantitativos não foram conclusivos, não respondendo se os peptídeos seriam inibidores da ECA, optou-se por realizar um protocolo que utilizava condições ideais para a atividade enzimática da ECA. Desta forma, o peptídeo TsHpT-I foi incubado com a ECA, tampão borato de sódio 0,4 M contendo NaCl 0,9 M (pH 8,3), e foi utilizado o substrato Hip-His-Leu (seção 3.13.2). Utilizando-se a fórmula para calcular a produção de His-Leu (produto) por minuto (seção 3.13.2), verificou-se que no experimento controle a produção de His-Leu foi de 0,2912 mmoles/min. Quando o peptídeo foi incubado com a enzima e o substrato, a produção de His-Leu foi de 0,4025 mmoles/min, sendo, desta forma, produzido mais His-Leu quando o peptídeo foi incubado (Tabela 6). Este experimento foi repetido, permanecendo esta relação: produção de mais His-Leu no experimento com TsHpT-I em relação ao controle. Portanto, o peptídeo não foi capaz de inibir a ação enzimática desta carboxidipeptidase, não podendo ser considerado um inibidor da ECA.

A análise da seqüência de aminoácidos do peptídeo TsHpT-I mostra que, apesar de apresentar um seqüência C-terminal muito parecida com a de outro peptídeo potenciador de BK, o Peptídeo K₁₂ - que é um inibidor da ECA (MEKI *et al.*, 1995) -, verifica-se que eles apresentam uma diferença marcante no resíduo anterior a seqüência Pro-Pro-Ala, demonstrada na seqüência abaixo em verde (em vermelho estão representados os resíduos idênticos).

K ₁₂	LRDYANRVINGGPVEAAGPPA
TsHpT-I	AEIDFSGIPEDIKQIKETNAKPPA

Observa-se que este resíduo no peptídeo K₁₂ é uma Gly, aminoácido neutro e pouco volumoso, e no peptídeo TsHpT-I, este resíduo é uma Lys, carregada

positivamente em pH fisiológico e com uma cadeia lateral mais volumosa. Analisando também a estrutura primária dos PPB's isolados do veneno das serpentes, conhecidos pela capacidade de inibir a ECA e por apresentarem uma seqüência C-terminal consenso Ile-Pro-Pro (FERREIRA *et al.*, 1970; KATO & SUZUKI, 1971; GREENE *et al.*, 1972; CHENG-WU *et al.*, 1982; CINTRA *et al.*, 1990; FERREIRA *et al.*, 1992; IANZER *et al.*, 2004), verifica-se que estes peptídeos apresentam um resíduo neutro, hidrofóbico e volumoso, a Ile, antecedendo os dois resíduos de Pro.

É possível que a carga positiva no resíduo que antecede as duas Pro seja a responsável por tornar o peptídeo TsHpT-I, e provavelmente os peptídeos TsHpT₁₇₋₂₅ e TsHpT_{ac17-25am}, potenciadores de bradicinina que não atuam inibindo a enzima conversora de angiotensina.

Mas então, qual é o mecanismo responsável por tornar esta família de peptídeos agentes potenciadores do efeito hipotensor da bradicinina, já que não inibem a ECA? Uma outra hipótese foi elaborada analisando os experimentos com ratos hipertensos (seção 4.5). Quando o peptídeo TsHpT₁₇₋₂₅ foi administrado i.v. em ratos SHR ou TGR, verificou-se que os valores da PAM destes animais abaixaram, juntamente com os valores da FC. Então, provavelmente o peptídeo promoveu uma bradicardia nestes animais, culminando na queda da pressão arterial. Sabe-se que o cálcio (Ca^{2+}) é fundamental para a contração muscular. Um impulso nervoso promove a liberação deste íon do retículo sarcoplasmático, aumentando assim a concentração de Ca^{2+} intracelular, desencadeando, dentre outras coisas, a contração muscular (NELSON & COX, 2000). Além deste papel, os canais de cálcio presentes no coração são importantes para a modulação do ritmo-cardíaco via nodo-sinoatrial (TRIGGLE, 1998). Desta forma, o peptídeo TsHpT₁₇₋₂₅ poderia estar

interferindo na liberação de cálcio, diminuindo assim a contração muscular e conseqüente diminuição dos batimentos cardíacos.

A capacidade do peptídeo TsHpT₁₇₋₂₅ inibir correntes de cálcio foi testada. Para isto, foram utilizadas células GH3 em experimentos de eletrofisiologia. Sabe-se que estas células apresentam canais de cálcio do tipo T e L, sendo que este último é encontrado também no músculo cardíaco (CRUZ, J.S.; comunicação pessoal). Os resultados indicaram que o peptídeo não foi capaz de modificar o perfil das correntes de Ca²⁺ (dados não mostrados), indicando que este não é um mecanismo de ação do peptídeo.

Desta forma, a pergunta sobre o modo de ação dos peptídeos TsHpT-I, TsHpT₁₇₋₂₅ e TsHpT_{ac17-25am} permaneceu. Ao se analisar os resultados de potenciação da BK (figuras 16B, 20 e 21), pode ser observado que os peptídeos apresentam a capacidade de causar uma hipotensão imediata e independente da administração de BK. Este efeito, quase instantâneo, indica que estes peptídeos podem se ligar a algum receptor, culminando no efeito farmacológico observado. Desta forma, foi feita a opção de testar se o peptídeo TsHpT-I, e seus análogos sintéticos, apresentavam a capacidade de induzir a síntese de NO em células CHO transfectadas com o receptor B₂ das cininas, alvo molecular da BK e subtipo expresso constitutivamente em vários tecidos - diferentemente do receptor B₁ que apresenta a desArg⁹-bradicinina como ligante e é expresso apenas em condições fisiopatológicas (BLAUKAT, 2003). Estudos preliminares revelaram um interessante resultado (figura 28). Apesar de, aparentemente, os peptídeos TsHpT-I e TsHpT_{ac17-25am} serem capazes de estimular a síntese de NO, não há uma diferença estatisticamente significativa entre a intensidade da fluorescência induzida por estes peptídeos e a induzida pelo controle negativo (HBS). O peptídeo TsHpT₁₇₋₂₅ também

não foi capaz de estimular a produção de NO. Entretanto, a incubação dos peptídeos TsHpT-I e TsHpT₁₇₋₂₅ com a BK foi capaz de estimular a produção de NO.

Vale ressaltar que estes resultados foram adquiridos em um experimento único e preliminar. Novos ensaios deverão ser realizados para a comprovação dos dados obtidos.

Apesar do indício de que estes peptídeos estimulem a síntese de NO, provavelmente este não é o único mecanismo de ação. Analisando novamente os resultados obtidos nos experimentos com ratos hipertensos (figuras 22 e 23), verifica-se a presença de mais de uma fase na ação do peptídeo TsHpT₁₇₋₂₅.

Observando o efeito do peptídeo na PAM e FC de ratos TGR, observa-se uma breve hipotensão e taquicardia logo após a sua administração, com um posterior aumento da PAM, seguido de uma hipotensão e bradicardia persistente. O comportamento de hipotensão e taquicardia, observadas no primeiro instante parece confirmar os resultados obtidos nos experimentos de potenciação da BK (figuras 16B, 20 e 21), nos quais a administração dos peptídeos TsHpT-I, TsHpT₁₇₋₂₅ e TsHpT_{ac17-25am} promovem uma diminuição da PAM e aumento da FC (dados não mostrados) independentes da administração de BK. Este comportamento inicial é muito parecido com o verificado após a injeção i.v. de bradicinina, que induz uma vasodilatação, originando uma queda na pressão arterial. Esta alteração na corrente sanguínea ativa barorreceptores, que estimulam a liberação de noradrenalina, aumentando a frequência cardíaca e, desta forma, compensando a queda na pressão arterial (WIDDOP *et al.*, 1999). É possível que este quadro inicial induzido pelos peptídeos seja causado pela ligação nos receptores B₂, induzindo o aumento da síntese de NO e gerando uma vasodilatação.

Segundo ERDÖS *et al.* (2002), alguns PPB's se ligam à ECA, induzindo uma interação (*cross-talk*) entre a ECA e o receptor B₂, culminando na potenciação da

BK. Este mecanismo, entretanto, não pode ser utilizado para explicar a indução da síntese de NO pelos peptídeos, uma vez que as células utilizadas para a realização do experimento não expressam a ECA. É possível no entanto, que os peptídeos possam se ligar no receptor, provocando modificações conformacionais que facilitem a ligação da BK.

5.3. Sumário e conclusões

Em resumo, os principais resultados obtidos neste estudo foram:

- Estudos confirmaram que o peptídeo TsHpT-I é capaz de potenciar o efeito hipotensor da bradicinina *in vivo* (ratos normotensos), além de apresentar um efeito hipotensor independente da injeção de BK;
- Ensaio enzimático, utilizando a enzima CPY, sugere que os resíduos P₂₃P₂₄ e K₁₇E₁₈, na região *C-terminal* do peptídeo TsHpT-I, protegem este peptídeo da clivagem proteolítica promovida pela CPY.
- Os peptídeos TsHpT₁₇₋₂₅ e TsHpT_{ac17-25am}, construídos baseados em dados bioquímicos referentes à região *C-terminal* do peptídeo TsHpT-I, foram capazes de mimetizar os efeitos do peptídeo nativo (TsHpT-I), potenciando a atividade hipotensora da BK, além de também apresentarem um efeito hipotensor independente da injeção de BK. Estes dados sugerem que a atividade hipotensora do peptídeo TsHpT-I está localizada na sua porção *C-terminal*;
- O peptídeo TsHpT₁₇₋₂₅ foi capaz de induzir, em ratos hipertensos de duas linhagens diferentes (SHR e TGR) uma hipotensão forte e duradoura. A frequência cardíaca destes animais também foi

alterada (bradicardia). Provavelmente a queda da PAM é causada pela bradicardia induzida pela administração do peptídeo;

- A minimização da estrutura primária do peptídeo TsHpT-I foi eficiente, uma vez que os seus efeitos farmacológicos foram mantidos. Faz-se necessário à construção de peptídeos menores para chegarmos à estrutura mínima que ainda mantém estas atividades;
- Os peptídeos parecem induzir um aumento da síntese de NO, porém esta não deve ser a única via de ação.
- O mecanismo de ação destes peptídeos ainda não foi elucidado. Provavelmente trata-se de um complexo modo de ação, composto por mais de um mecanismo.

5.4. Perspectivas

- Sintetizar novos análogos do peptídeo nativo TsHpT-I para descobrir a seqüência mínima que mantém a atividade farmacológica;
- Elucidar o(s) mecanismo(s) de ação destes peptídeos;
- Avaliar a estabilidade dos peptídeos no plasma sanguíneo;
- Estudar uma possível formulação para estes peptídeos a fim de desenvolver uma nova droga.



6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAUJO, R.L.; GOMEZ, M.V. **Potentiation of bradykinin action on smooth muscle by a scorpion venom extract.** *Gen. Pharmacol.*; 7: 123-26, 1976.
- ARMSTRONG, C.M. & BENZANILLA, F. **Inactivation of sodium channel II. Gating current experiments.** *Journal of General Physiol.*; 70: 567-90, 1997.
- BHOOLA, K.D.; FIGUEROA, C.D.; WORTHY, K. **Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininase.** *Pharmacol.*; 44: 1-80, 1992.
- BLAUKAT, A. **Structure and signalling pathways of kinin receptors.** *Andrologia*; 35: 17-23, 2003.
- BRALET, J.; SCHWARTZ, J.C. **Vasopeptidase inhibitors: an emerging class of cardiovascular drugs.** *Trends Pharmacol. Sci.*; 22(3): 106-09, 2001.
- BREW, K. **Structure of human ACE gives new insights into inhibitor binding and design.** *TRENDS in Pharmacol. Sci.*; 24(8) 391-4, 2003.
- BULLETIN OF THE WORLD HEALTH ORGANIZATION. *The International Journal of Public Health*; 77(3): 209-98, 1999.
- CARBONE, E.; WANKE, E.; PRESTIPINO, G.; POSSANI, L.D.; MAELICKE, A. **Selective blockage of voltage-dependent K⁺ channels by a novel scorpion toxin.** *Nature.*; 296(5852): 90-1, 1982.
- CARDOSO, J.L.; FAN, W.H.R.; ARAUJO, A.A.; SANTALUCIA, M.; LOPES, J.M. **Óbitos por escorpionismo no Brasil (1990-1993).** *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 28: 10, 1995.
- CHAN, W.C & WHITE, P.D. **Fmoc solid-phase peptide synthesis. A practical approach.** *Oxford University Press*; 2000.
- CHENG-WU, C.; MAO-YING, W.; SHAN-SHAN, L.; TING-HWO, C. **Structure-function studies on the bradykinin-potentiating peptide from Chinese snake venom (*Agkistrodon halys palls*).** *Agents Actions*; 9: 283-88, 1982.

- CINTRA, A.C.O.; VICIRA, C.A.; GIGLIO, J.R. **Primary structure and biological activity of bradykinin-potentiating peptides from *Bothrops insularis* snake venom.** *J. Protein Chem.*; 9: 221-227, 1990.
- De LIMA, M.E.; MARTIN-EAUCLAIRE, M.F. **The toxins purified from *Tityus serrulatus* (LUTZ & MELLO) venom.** *J. Toxicol.-Toxin Reviews*; 14(3): 457-481, 1995.
- DINIZ, C.R.; GOMEZ, M.V.; ANTONIO, A.; CORRADO, A.P. **Chemical properties and biological activity of *Tityus* venom.** *Mem Inst Butantan*; 33(2): 453-6, 1966.
- DINIZ, C.R. & GONÇALVES, J.M. **Separation of biologically active components from scorpion venoms by zone electrophoresis.** *Biochim. Biophys. Acta*; 41: 470-77, 1960.
- DIVE, V.; COTTON, J.; YOTAKIS, A.; MICHAUD, A.; VASSILIOU, S.; JIRACCK, J.; VAZEUX, G.; CHAUVET, M.T.; CUNIASSE, P; CORVOL, P. **RXP 407, a phosphinic peptide, is a potent inhibitor of angiotensin converting enzyme able to differentiate between its two active site.** *Proceed. of the Nat. Acad. of Sci. USA.*; 96(8): 4330-35, 1999.
- ERDÖS, E.G.; JACKMAN, H.L.; BROVKOVYNCH, V.; TAN, F.; DEDDISH, P.A. **Products of angiotensin I hydrolysis by human cardiac enzymes potentiate bradykinin.** *J. Mol. Cell Cardiol.*; 34: 1569-76, 2002.
- ERDÖS, E.G.; DEDDISH, P.A.; MARCIC B.M. **Potentiation of bradykinin actions by ACE inhibitors.** *TEM.*; 10(6): 223-29, 1999.
- FERREIRA, L.A.F; ALVES, W.E; LUCAS, M.S.; HABERMEHL, G.G. **Isolation and characterization of a bradykinin potentiating peptide (BPP-S) isolated from *Scaptocosa raptor* venom.** *Toxicon.* 34(5): 599-603, 1996.

- FERREIRA, L.A.F.; ALVES, E.W.; HENRIQUES, O.B. **Peptide T, a novel bradykinin potentiator isolated from *Tityus serrulatus* scorpion venom.** *Toxicon*.; 31(8): 941-7, 1993.
- FERREIRA, L.A.F.; HENRIQUES, O.B.; LEBRUN, I. **A new bradykinin-potentiating peptide (peptide P) isolated from the venom of *Bothrops jararacussu* (Jararaçu tapete urutu Dourado).** *Toxicon* 30: 33-40, 1992.
- FERREIRA, S.H. **A bradykinin-potentiating factor (BPF) present in the venom of *Bothrops jararaca*.** *Br. J. Pharmacol.* 24: 163-69, 1965.
- FERREIRA, S.H.; BARTELT D.C.; GREENE, L.J. **Isolation of bradykinin-potentiating peptides from *Bothrops jararaca* venom.** *Biochemistry* 9: 2583-93, 1970.
- FERREIRA, S.H.; GREENE, L.J.; ALBASTER, V.A.; BAKHLE, Y.S., VANE, J.R. **Activity of various fractions of bradykinin potentiating factor against angiotensin I converting enzyme.** *Nature* 225: 379-81, 1970.
- FET, V.; GANTENBEIN, B.; GROMOV, A.V.; LOWE, G.; LOURENÇO, W.R. **The first molecular phylogeny of Buthidae (Scorpiones).** *Euscorpius*; 4: 1-9,2003
- FREIRE-MAIA, L.; CUNHA-MELO, J.R.; FUTURO-NETO, H.A.; AZEVEDO, A.D.; WEINBERG, J. **Cholinergic and adrenergic effects of tityustoxin.** *Gen. Pharmacol.*; 7(2-3): 115-21, 1976.
- FUKUHARA, Y.D.M.; DELLALIBERA-JOVILIANO, R.; CUNHA, F.Q.C; REIS, M.L.; DONADI, E.A. **The kinin system in the envenomation caused by the *Tityus serrulatus* scorpion sting.** *Toxicol. and Applied Pharmacol.*; 196: 390-95, 2004.
- GARCIA, M.L.; GARCIA-CALVO, M.; HIDALGO, P.; LEE, A.; MACKINNON, R. **Purification and characterization of three inhibitors of voltage-dependent k⁺ channels from *Leiurus quinquestriatus* var. *hebraeus* venom.** *Biochemistry*; 33 (22): 6834-39, 1994.

HARDMAN, J.G.; GOODMAN GILMAN; A.; LIMBIRD, L.E. **Goodman & Gilman's: The pharmacological basis of therapeutics**, 9th ed. Chapters 25 and 31, 1996. McGraw-Hill Company

IANZER, D.; KONNO, K.; MARQUES-PORTO, R.; PORTARO, F.C.V; STÖCKLIN, R.; CAMARGO, A.C.M.; PIMENTA, D.C. **Identification of five new bradykinin potentiating peptides (BPPs) from *Bothrops jararaca* crude venom by using electrospray ionization tandem mass spectrometry after two-step liquid chromatography.** *Peptides*; 25: 1085-92, 2004.

IGNJATOVIC, T.; TAN, F.; BROVKOVYCH, V.; SKIDGEL, R.A.; ERDÖS, E.G. **Activation of bradykinin B₁ receptor by ACE inhibitors.** *Inter. Immunopharmacol.*; 2: 1787-93, 2002.

IRNGARTINGER, M.; DAMM, V.C.M.; GOEDE, J.; FRIJLINK, H.W. **Pulmonary delivery of therapeutics peptides via dry powder inhalation: effects of micronisation and manufacturing.** *European J.Pharm. Biopharm.*; 58: 7-14, 2004.

KATO, H.; SUZUKI, T. **Bradykinin-potentiating peptides from the venom of *Agkistrodon halys blomhoffii*. Isolation of five bradykinin-potentiating and amino acid sequences of two of them, potentiators B and C.** *Biochemistry*, 10: 972-80, 1971.

KEARNEY, P.M.; WHELTON, M.; REYNOLDS, K.; MUNTNER, P.; WHELTON, P.K.; HE, J. **Global burden of hypertension: analysis worldwide data.** *Lancet*; 365: 217-23, 2005.

KUOPPALA, A.; LINDSTEDT, K.A.; SAARINEN, J.; KOVANEN, P.T.; KOKKONEN, J.O. **Inactivation of bradykinin by angiotensin-converting enzyme and by carboxypeptidase N in human plasma.** *Am. J. Physiol. Heart Circ Physiol.*; 278: 1069-74, 2000.

- LADNER, R.C.; SATO, A.K.; GORZELANY, J.; De SOUZA, M. **Phage display-derived peptides as therapeutics alternatives to antibodies.** *DDT*; 9(12): 525-29, 2004.
- LEE, S.B.; NAKANISHI, H. **Cell renormalization study of biased self-avoiding walls.** *J. Phys. A.: Math. Gen.*; 20: 457-64, 1987.
- LEGROS, C.; MARTIN-EAUCLAIRE, M.F. **Evidence for a new class of scorpion toxins active against K⁺ channels.** *FEBS Lett.*; 431(3): 375-80, 1998.
- LI, W.; MOORE, M.J.; VASILIEVA, N.; SUI, J.; WONG, S.K.; BERNE, M.A.; SOMASUNDARAN, M.; SULLIVAN, J.L.; LUZURIAGA, K. ; GREENOUGH, T.C. ; CHOE, H. ; FARZAN, M. **Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus.** *Nature* ; 426: 450-54, 2003.
- LIEN, S. ; LOWMAN, H.B. **Therapeutics peptides.** *TRENDS in Biotech.*; 21(12): 556-62, 2003.
- LOURENÇO, W.R. **Scorpions of Brazil.** 2002. Les Éditions de l'If.
- LOURENÇO, W.R & CLOUDSLEY-THOMPSON, J.L. **Discovery of a sexual population of *Tityus serrulatus*, one of the morphs within the complex *Tityus stigmurus* (Scorpiones, Buthidae).** *The journal of Arachnol.*; 27: 154-58, 1999.
- LOURENÇO, W.R. **Diversity and endemism in tropical versus temperate scorpion communities.** *Biogeographica*; 70: 155-160, 1994.
- MAGALHÃES, O. ; TUPYNAMBÁ, A. **Escorpionismo.** *Brasil Médico*; 29: 28-29, 1938.
- MEKI, A.R.M.A; NASSAR, A.Y.; ROCHAT, H. **A bradykinin-potentiating peptide (Peptide K₁₂) isolated from the venom of egyptian scorpion *Buthus occitanus*.** *Peptides*; 16(8): 1359-65, 1995.

- MERRIFIELD, B. **Solid-phase peptide synthesis. Peptides: synthesis, structures, and applications;** 93-169, 1995.
- MINSHALL, R.D; NEDUMGOTTIL, S.J.; IGIĆ, R.; ERDÖS, E.G; RABITO, S.F. **Potential of the effects of bradykinin on its receptor in the isolated guinea pig ileum.** *Peptides*; 24: 1257-64, 2000.
- NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger: principles of biochemistry.** 3rd ed. Chapter 7, 2000. Worth Publishers.
- NISHIZUKA, Y. **Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C.** *Science*; 258: 607-14, 1992.
- OWEN, N.L.; WOOD, S.G. **Antihypertensive compound from *Caesalpinia brasiliensis*.** *USPTO Patent. N° da Patente: 6,569,891*; 2003.
- PIMENTA, A.M.C. & De LIMA, M.E. **Estudo do proteoma de veneno de artrópodes.** *Bioscience Journal*, 2005 No Prelo..
- PIMENTA, A.M.; De MARCO ALMEIDA, F; De LIMA, M.E.; MARTIN-EAUCCLAIRE, M.F.; BOUGIS, P.E. **Individual variability in *Tityus serrulatus* (Scorpiones, Buthidae) venom elicited by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry.** *Rapid Commun. Mass Spectrom.*; 17(5): 413-18, 2003.
- PIMENTA, A.M.; MANSUELLE, P.; DINIZ, C.R.; MARTIN-EAUCCLAIRE, M.F. **Covalent structure and some pharmacological features of native and cleaved alpha-KTx12-1, a four disulfide-bridged toxin from *Tityus serrulatus*.** *J. Pept. Sci.*; 9(2): 132-40, 2003.
- PIMENTA, A.M.; LEGROS, C.; ALMEIDA, F.M.; MANSUELLE, P.; De LIMA, M.E.; BOUGIS, P.E.; MARTIN-EAUCCLAIRE, M.F. **Novel structural class of four disulfide-bridged peptide from *Tityus serrulatus* venom.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.*; 301(4): 1086-92, 2003.

- PIMENTA, A.M.; De LIMA, M.E.; DINIZ, C.R.; SANTOS, R.A.S.; BOUGIS, P.E.; MARTIN-EAUCCLAIRE, M.F. **Pedido de concessão de patente junto ao INPI sob o número PI 0202157-9 e junto ao PCT, sob o número PCT/BR 03/00073.**
- POSSANI, L.D.; MERINO, E.; CORONA, M.; BOLIVAR, F.; BECERRIL, B. **Peptides and genes coding for scorpion toxins that affect ion-channels.** *Biochimie*; 82(9-10): 861-68, 2000.
- 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.** *Am. J. Physiol.*; 156: 261-73, 1949
- ROCHAT, H.; KHARRAT, R.; SABATIER J.M. ; MANSUELLE, P. ; CREST, M. ; MARTIN-EAUCCLAIRE, M.F. ; SAMPIERI, F. ; OUGHIDENI, R. ; MABROUK, K. ; JACQUET, G. ; VAN RIETSCHOTEN, J. ; EL AYEB, M. **Maurotoxin, a four disulfide bridges scorpion toxin acting on K⁺ channels.** *Toxicon*; 36(11): 1609-11, 1998.
- SHEN, W.C. **Oral peptide and protein delivery: unfulfilled promises?** *DDT*; 8(14): 607-8, 2003.
- SRINIVASAN, K.N.; GOPALAKRISHNAKONE, P.; TAN, P.T.; CHEW, K.C.; CHENG, B.; KINI, R.M.; KOH, J.L.; SEAH, S.H.; BRUSIC, V. **Scorpion, a molecular database of scorpion toxins.** *Toxicon*.; 40(1): 23-31, 2002.
- SOSINA, N.A.A; GOLUBENCO, Z.; AKHUNOV, A.A.; KUGAEVSKAYA, E.V.; ELISEEVA,; YU, E.; OREKHOVICH, V.N. **Bradykinin-potentiating peptides of the spider *Latrodectus tredecimguttatus* inhibitors of carboxicathepsin and a preparation of karakurt spider venom kininase.** *Dokl. Akad. Nauk.*, 315: 281-84, 1990.
- STRONG, P.N. **Potassium channel toxins.** *Pharmacol. Ther*; 46(1): 137-62, 1990.
- SWINDELLS, M.B.; OVERINGTON, J.P. **Prioritizing the proteome: identifying pharmaceutically relevant targets.** *DDT*; 7(9): 516-21, 2002.

- SZYMKOWSKI, D.E. **Rational optimization of proteins as drugs: a new era of 'medicinal biology'**. *DDT*; 9(9): 381-3, 2004.
- TRIGGLE, D.J. **The physiological and pharmacological significance of cardiovascular T-type, voltage-gated calcium channels**. *American Journal of Hipertension*; 11: 80S-7S, 1998.
- TURNER, A.J.; HOOPER, N.M. **The angiotensin-converting enzyme gene family: genomics and pharmacology**. *Trends in Pharmacol. Sci.*; 23(4): 177-83, 2002.
- VIETINGHOFF, G.; HILSCHER, E.; PAEGELOW, I.; REISSMANN, S. **Effect of bradykinin analogues on the B₁ receptor rat ileum**. *Peptides*; 24: 931-35, 2003.
- WACHTFOGEL, Y.T.; DeLa CADENA, R.A.; COLMAM, R.W. **Structural biology, cellular interactions and pathophysiology of the contact system**. *Thrombosis*; 72: 1-21, 1993.
- WIDDOP, R.E.; SAMPEY, D.B.; JARROTT, B. **Cardiovascular effects of angiotensin-(1-7) in consciuos spontaneously hypertensive rats**. *Hypertension*; 34(2): 964-68, 1999.
- YANG, H.Y.T; ERDÖS, E.G.; LEVIN, Y. **A dipeptidyl carboxypeptidase that converts angiotensin I and inactivates bradykinin**. *Biochim. Biophys. Acta*; 214: 374-6, 1970.
- ZLOTIKIN, E.; MIRANDA, F.; LISSITZKY, S. **Proteins in scorpion venoms toxic to mammals and insects**. *Toxicon*; 10(3): 207-9, 1972.