

Universidade Federal de Minas Gerais

Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia

Instituto de Ciências Biológicas

**Avaliação dos efeitos dos peptídeos ricos em prolina do
veneno da serpente *Bothrops jararaca* Bj-PRO-7a e Bj-PRO-
10c na revascularização de membros posteriores isquêmicos**

Leandro Barbosa do Prado

Belo Horizonte

2013

LEANDRO BARBOSA DO PRADO

**Avaliação dos efeitos dos peptídeos ricos em prolina do veneno da
serpente *Bothrops jararaca* Bj-PRO-7a e Bj-PRO-10c na
revascularização de membros posteriores isquêmicos**

Dissertação apresentada ao Programa de pós-graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia, da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (Fisiologia e Farmacologia).

Área de concentração: Fisiologia

Orientadora: Profa. Dra. Lucíola da Silva Barcelos

(Dep. Fisiologia e Biofísica, UFMG)

Co-orientadora: Dra. Danielle Alves Ianzer

(Dep. Ciências Biológicas, UFOP)

Belo Horizonte / MG

Instituto de Ciências Biológicas

Universidade Federal de Minas Gerais

2013

RESUMO

A angiogênese terapêutica tem sido proposta como uma alternativa para o tratamento de doenças isquêmicas. Inibidores da enzima conversora de angiotensina (iECA) além dos seus efeitos anti-hipertensivos, também são capazes de aumentar a angiogênese induzida por isquemia e melhorar a função de células-tronco angiogênicas derivadas da medula óssea. iECA foram desenvolvidos com base em oligopeptídeos ricos em prolina encontrados no veneno da *Bothrops jararaca* (*Bj*-PRO) - anteriormente conhecidos como peptídeos potenciadores de bradicinina (BPPs). No entanto, o efeito anti-hipertensivo dos recém-descritos *Bj*-PRO-7a e *Bj*-PRO-10c não está relacionado com a sua capacidade em inibir ECA ou potencializar a bradicinina. Neste estudo, avaliamos os efeitos dos peptídeos *Bj*-PRO-7a e *Bj*-PRO-10c sobre a revascularização de músculos isquêmicos de membros posteriores em modelo murino após a oclusão permanente da artéria femoral (OAF). Utilizando um esquema de tratamento diário por 14 dias (iniciado imediatamente após a OAF) com os *Bj*-PRO-7a e *Bj*-PRO-10c na dose de 71nmol/kg (i.p.), observamos estimulação da recuperação do fluxo sanguíneo dos membros afetados e do aumento da densidade capilar, da relação capilar/miócito e da arteriogênese nos músculos isquemiados. Interessantemente, observamos que apenas o *Bj*-PRO-10c, mas não o *Bj*-PRO-7a, aumentou os níveis de moléculas pró-angiogênicas como óxido nítrico (NO) e VEGF no músculo isquemiado e de VEGF na medula óssea, além de estimular diferentes subpopulações de células-tronco angiogênicas na medula óssea e a sua mobilização para a corrente sanguínea. Corroborando um possível papel para o NO como mecanismo pró-angiogênico do *Bj*-PRO-10c, os efeitos desse peptídeo, mas não do *Bj*-PRO-7a, sobre a recuperação do fluxo sanguíneo dos membros afetados e sobre a angiogênese e a arteriogênese nos músculos isquemiados foram parcialmente inibidos na presença do inibidor de óxido nítrico sintase, L-NAME. Além disso, avaliamos o papel do receptor B2 (B2R) de bradicinina como outra possível via angiogênica utilizando animais deficientes na expressão desse receptor (B2R-KO). Não foi observada nenhuma diferença estatística na recuperação do fluxo sanguíneo e nem na angiogênese nos músculos isquemiados entre animais selvagens (WT) e B2R-KO tratados com os peptídeos. Dessa maneira, os nossos dados sugerem que os peptídeos *Bj*-PRO-7a e *Bj*-PRO-10c estimulam a revascularização de membros posteriores isquêmicos de maneira independente da ativação do receptor B2 de bradicinina e, no caso de *Bj*-PRO-10c, dependente da produção de NO. Além disso, o peptídeo *Bj*-PRO-10c, mas não o *Bj*-PRO-7a, aumenta a mobilização de células-tronco angiogênicas da medula óssea após a OAF.

Palavras chaves: Angiogênese, *Bj*-PRO-7a, *Bj*-PRO-10c, isquemia, células progenitoras endoteliais, VEGF, NO, B2R, fluxo sanguíneo.

ABSTRACT

Therapeutic angiogenesis has been proposed as an alternative for treating ischemic diseases. Angiotensin converting enzyme inhibitors (ACEi) beyond its antihypertensive effects are also able of enhancing ischemia-induced angiogenesis and improving function of angiogenic stem cells. ACEi were developed based on proline-rich oligopeptides found in the venom of *Bothrops jararaca* (*Bj*-PRO) - formerly known as bradykinin potentiating peptides (BPP). However, the antihypertensive effect of the newly described *Bj*-PRO-7 and -10c is not related to its ability to inhibit ACE or potentiate bradykinin. In this study, we evaluated whether *Bj*-PRO-7a and -10c, akin to ACEi, would affect hindlimb revascularization after ischemia in a murine model after permanent femoral artery occlusion (FAO). Using a daily treatment schedule for 14 days (started immediately after FAO) with *Bj*-PRO-7a and *Bj*-PRO-10c at 71nmol/kg (i.p.), we observed stimulation of blood flow recovery and the increase in capillary density, capillary/myocyte ratio and arteriogenesis in ischemic muscles. Interestingly, we observed that only the *Bj*-PRO-10c, but not the *Bj*-PRO-7a, increased levels of pro-angiogenic molecules such as nitric oxide (NO) and VEGF in the ischemic muscle and VEGF in bone marrow, besides has stimulated subpopulations of angiogenic stem cells in the bone marrow and their mobilization into the bloodstream. Supporting a possible role for NO as a pro-angiogenic mechanism of the peptides, the simulated limb blood flow recovery, angiogenesis and arteriogenesis in ischemic muscles of animals treated with *Bj*-PRO-10c, but not with *Bj*-PRO-7a, were partly inhibited in the presence of the nitric oxide synthase inhibitor L-NAME. Furthermore, we evaluated the role of the bradykinin B2 receptor (B2R) as another possible mechanism using transgenic animals deficient in the expression of this receptor (B2R-KO). There was no difference in the blood flow recovery, angiogenesis in ischemic muscle of both wild-type (WT) and B2R-KO animals treated with the peptides. Thus, our data suggest that both peptides *Bj*-PRO-7a and *Bj*-PRO-10c are able to stimulate revascularization of ischemic hindlimbs independently of the bradykinin B2 receptor and, in the case of *Bj*-PRO-10c, dependently of NO release. Furthermore, only the peptide *Bj*-PRO-10c is able to increase the mobilization of bone marrow-derived angiogenic stem cells after FAO.

Keywords: Angiogenesis, *Bj*-PRO-7a, *Bj*-PRO-10c, ischemia, endothelial progenitor cells, VEGF, NO, B2R, hindlimb blood flow.

1 Introdução

1.1 Doença arterial periférica

A doença arterial oclusiva periférica (DAP) é caracterizada pelo progressivo estreitamento ou oclusão das artérias dos membros inferiores devido à doença arteriosclerótica e resulta em má perfusão dos músculos e tecidos periféricos (STEHOUSER *et al.*, 2009). Isquemia de braços e outros vasos periféricos são excluídos do conceito de DAP devido ao fato de serem, em geral, consequência de outras condições patológicas como a vasculite ou a doença de Buerger (DORMANDY AND RUTHERFORD, 2000).

As manifestações clínicas da DAP incluem a claudicação intermitente (CI), a isquemia aguda (IA) e a isquemia crônica (crítica) (IC/ICC) de membro inferior, sendo que, dentro de cada um desses grupos de pacientes, a doença pode ter vários graus de severidade (por exemplo, claudicação a distâncias variáveis na CI, localização e extensão da obstrução luminal na IA, presença ou ausência de úlceras ou gangrena na ICC, etc) e diferentes etiologias (em decorrência de trombos ou êmbolos, por exemplo) ou mesmo ser assintomática. A claudicação intermitente é caracterizada pela dor durante exercício físico. A isquemia aguda de membros inferiores é definida pela queda (no caso de embolia) ou piora (no caso de trombose) súbita/repentina na perfusão sanguínea que resulta em potencial ameaça para a viabilidade do membro. A isquemia crônica é caracterizada pela dor de repouso e presença ou não de úlceras e gangrena resultante de oclusão arterial e, em geral, recebem indicação de revascularização cirúrgica dos membros; se a cirurgia não for bem sucedida ou não for aconselhada devido a riscos de morte resultantes de

comorbidades, a chance de amputação do membro afetado eleva-se bastante (DORMANDY AND RUTHERFORD,2000).

Os principais fatores de risco para o desenvolvimento da DAP são: idade, tabagismo, diabetes mellitus, hipertensão e dislipidemia. Por outro lado, a DAP é considerada um dos principais fatores de risco para a amputação de membros inferiores, especialmente em pacientes diabéticos. Além disso, a DAP é um marcador para doença vascular sistêmica envolvendo vasos coronarianos, cerebrais e renais e indivíduos com DAP apresentam risco aumentado de complicações vasculares como infarto agudo do miocárdio, acidente vascular cerebral e ruptura de aneurisma da aorta (NORGREN *et al.* 2007; DORMANDY *et al.*, 1999; NEWMAN *et al.*, 1999).

Os dados de prevalência e incidência mostram que a DAP é mais comum em idosos, especialmente naqueles com mais de 70 anos de idade. Nos Estados Unidos, a DAP afeta de 8 a 10 milhões pessoas sendo que 20% dos atendimentos ambulatoriais são decorrentes dessa patologia (GO *et al.*, 2013; ROGER *et al.*, 2012).

A conduta terapêutica na DAP varia de acordo com o quadro clínico do paciente. Em linhas gerais, se o quadro é assintomático ou o paciente apresenta claudicação, a indicação é pelo tratamento clínico que vai desde a simples mudança de hábitos como, por exemplo, descontinuidade do tabagismo e do sedentarismo, até o controle/tratamento medicamentoso das doenças associadas, tais como: hipertensão arterial, diabetes e hiperlipidemia, através do uso de inibidores da enzima conversora de angiotensina (iECA), agentes antiplaquetários e/ou estatinas. No caso de dor em repouso ou lesões tróficas, a indicação é pelo tratamento

cirúrgico como, por exemplo, pela angioplastia ou enxerto (NIELS *et al.*, 2001). Ainda assim, se os sintomas persistirem e o fluxo continuar obstruído, o próximo passo é a amputação do membro afetado (ADAM *et al.*, 2005).

Dessa maneira, terapias baseadas na estimulação do crescimento de novos vasos sanguíneos, como tentativa de melhora na revascularização do tecido isquêmico, representam estratégia terapêutica interessante no tratamento da DAP.

1.2 Processo de formação de novos vasos sanguíneos

O sistema vascular tem uma função de penetrar em órgãos e tecidos para suprir as células locais com nutrientes e oxigênio. Para que isso aconteça, é necessário que haja formação de vasos sanguíneos. Em casos fisiológicos, a ativação da angiogênese, por exemplo, acontece na embriogênese, onde o desenvolvimento do sistema vascular é imprescindível (COULTAS *et al.*, 2005). A estrita regulação do sistema e o funcionamento equilibrado é muito importante para o organismo, pois, tanto excessiva formação de vasos sanguíneos, quanto o seu desenvolvimento insuficiente pode levar a doenças graves. Por exemplo, ativação da angiogênese é uma condição necessária para o desenvolvimento de tumores. Um nódulo de tumor em expansão, como qualquer outro tecido, deve ser fornecida com oxigênio e nutrientes para manter sua atividade vital (KARAMYSHEVA *et al.*, 2007).

Por outro lado, a ineficiência da neovascularização pode ocasionar regiões de isquemia, infarto do miocárdio, acidente vascular encefálico e assim conduzir à perda tecidual. Especificamente, no caso dos membros inferiores, pode resultar em amputação dos mesmos (MONCADA *et al.*, 2006).

Como explicado anteriormente, o desenvolvimento da DAP é caracterizada pelo estreitamento e oclusão dos vasos arteriais. Com isso, o organismo tem uma resposta, através de mecanismos compensatórios locais, que inclui o crescimento de novos capilares (angiogênese) e o desenvolvimento de arteríolas colaterais (arteriogênese), além da formação de novos vasos por células progenitoras endoteliais (vasculogênese), com o intuito de aumentar a perfusão e revascularização nesses locais em hipóxia (HIROTA *et al.*, 2006).

A angiogênese consiste em crescimento capilar com pequenos tubos endoteliais derivados de capilares pré-existentes em resposta a hipóxia local. A hipóxia induz a liberação de citocinas como: fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), angiopoietina, fator de crescimento de transformação (TGF- β), fator de crescimento fibroblástico (FGF) e o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) que é um importante e muito estudado estimulador da angiogênese. Porém, essa estimulação fisiológica do crescimento de novos vasos sanguíneos por angiogênese, apesar da tentativa de contribuição para o restabelecimento da perfusão sanguínea local, não consegue suficientemente compensar a obstrução ocorrida (LAWALL *et al.*, 2010).

O desenvolvimento de vasos colaterais, também chamado de arteriogênese, é definido como o alargamento estrutural de arteríolas devido ao remodelamento de arteríolas pré-existentes ou ao crescimento *de novo* de novas arteríolas a partir daquelas pré-existentes (PHNG *et al.*, 2009). No caso de um crescimento de uma nova arteríola, ocorre o crescimento de arteríolas colaterais a partir de proliferação e migração de células endoteliais e/ou progenitoras endoteliais e da musculatura lisa presentes em arteríolas pré-existentes para formar um novo lúmen (SHAPER, 2012).

Ainda assim, artérias colaterais podem aumentar o seu diâmetro pelo remodelamento de sua parede, aumentando assim a capacidade de transportar sangue para regiões isquêmicas. Esse processo arteriogênico é estimulado pela a força de cisalhamento aumentada nos vasos colaterais à artéria principal ocluída, levando a um aumento na expressão de moléculas de adesão pelas células endoteliais, o que favorece a adesão de monócitos que, posteriormente, se acumulam em volta dos vasos colaterais e secretam fatores de crescimento e citocinas (ex: VEGF, NO, proteína quimiotática de monócitos/MCP-1). Em alguns modelos experimentais, a arteriogênese endógena é capaz restaurar quase totalmente a revascularização no tecido isquêmico induzido pelo estreitamento vascular (HEILMANN *et al.*, 2002).

Além disso, novos vasos sanguíneos podem se desenvolver a partir de células progenitoras endoteliais (CPEs – no adulto) ou angioblastos (no embrião) em um processo denominado vasculogênese, o qual também pode ser estimulado por hipóxia e contribuir na revascularização pós-natal (CARMELIET *et al.*, 2003). A vasculogênese é, portanto, definida como a formação de novos vasos sanguíneos através da diferenciação de células precursoras em células endoteliais (RISAU *et al.*, 1997). Postula-se que essas células progenitoras possam desempenhar um papel importante na reparação vascular endógena após lesão vascular e na manutenção da integridade endotelial. Elas são mobilizadas a partir da medula óssea ou do próprio tecido após, por exemplo, lesão vascular e migram para o local de neovascularização, onde se diferenciam em células endoteliais (ASAHARA *et al.*, 1997). Além disso, Fang e colaboradores, sugeriram recentemente a existência de subpopulações de células tronco/progenitoras altamente angiogênicas que seriam

advindas da camada endotelial dos vasos sanguíneos, e não apenas da medula óssea (FANG *et al*, 2012).

No indivíduo adulto, os vasos sanguíneos são quiescentes e raramente formam novos ramos. No entanto, as células endoteliais mantem uma alta plasticidade para detectar e responder à sinais angiogênicos (JAIN, 2003). Atraídos por sinais pró-angiogênicos, as primeiras células a se separarem da parede do vaso são os pericitos que se libertam da membrana basal por degradação proteolítica mediada por metaloproteinases (MMP`s). Em seguida, as células endoteliais se tornam móveis e invasivas e projetam extensões citoplasmáticas chamadas de filopódios (Figura 1 B) (SCHLINGEMANN *et al.*, 1991). A partir daí, essas células endoteliais guia (denominadas *tip cell*) formam novos brotos em direção ao gradiente dos sinais pró-angiogênicos, seguidas das células endoteliais em migração (denominadas *stalk cell*) que lançam menos filopódios, porém, estabelecem o lúmen via proliferação para suportar o alongamento do broto (Figura 1 C). Células guia se juntam com células vizinhas para formar anastomoses e, então, ampliar a rede vascular local (GRIFFIOEN & MOLEMA, 2000). O processo cessa a partir da diminuição dos sinais pró-angiogênicos e aumento dos sinais anti-angiogênicos quando, então, a quiescência é reestabelecida (FOLKMAN, 2003; CARMELIET, 2003; WAHLBERG, 2003).

Um fator de crescimento muito importante no processo angiogênico é o VEGF. O VEGF é um potente mitógeno para células vasculares endoteliais e sua expressão é potenciada em resposta à hipóxia por oncogenes ativados, e por uma variedade de moléculas como, por exemplo, o NO. Além de estimular a proliferação, o VEGF induz a migração e inibe a apoptose de células endoteliais maduras e

progenitoras. *In vivo*, o VEGF induz a angiogênese, bem como permeabilização dos vasos sanguíneos, e tem um papel importante na regulação da vasculogênese (KROLL *et al*, 1997, ASAHARA *et al*, 1999). A ativação pró-angiogênica efetuada pelo VEGF é mediada pela sinalização óxido nítrico-monofosfato de guanosina cíclica (NO-cGMP), ativando assim a proteína quinase ativadora de mitógenos (MAPK), e pela *up-regulation* de FGF-2 no endotélio. Assim, o NO tem uma ação verdadeiramente efetora na angiogênese por interação com o VEGF (MORBIDELLI *et al.*, 1996, MUROHARA *et al.*, 1998). Além disso, os receptores de VEGF, do tipo 1 e 2, estão presentes não apenas nas células endoteliais, mas também em células progenitoras endoteliais. A presença desses receptores nestas parece ser responsável pela ativação do processo vasculogênico induzido pelo VEGF (ASAHARA, *et al*, 1999).

O NO, por sua vez, é um potente vasodilatador e é um sinal mediador produzido pelo endotélio vascular que tem sido implicado tanto na arteriogênese e na angiogênese quanto na vasculogênese. Estudos com ratos transgênicos deficientes na expressão gênica da isoforma NO sintase endotelial (eNOS) mostraram uma capacidade angiogênica reduzida em vários contextos diferentes. Da mesma forma, foi demonstrado que a inibição de NOS leva a diminuição de remodelamento vascular *in vivo* (JADESKI *et al.*, 1999, TRONC *et al.*, 1996, ZICHE, *et al.* 1997) e da migração e proliferação de células endoteliais *in vitro* (DIMMELER *et al.*, 2000, HOOD and GRAGER, 1998, PAPAPETROPOULOS, 1999).

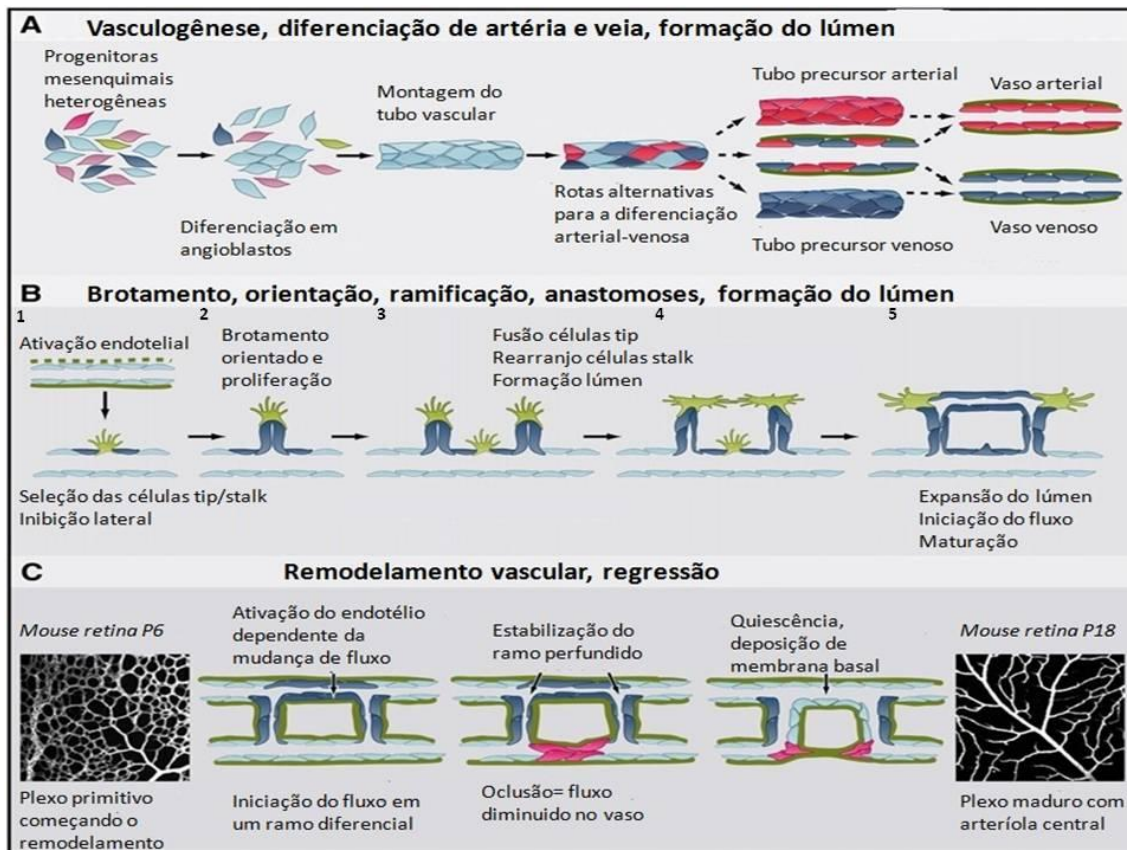


Figura 1 – Características da formação de vasos sanguíneos. (A) Angioblastos se diferenciam em células endoteliais (ECs) que formam os tubos, adquirem o lúmen e são pré-especificado em fenótipos arterial ou venoso. (B) – Etapas de brotamento de um vaso: (1) seleção das células *tip/stalk*; (2) orientação pela célula *tip* e proliferação das células *stalk*; (3) orientação da ramificação; (4) alongamento das células *stalk*, fusão das células *tip* e formação do lúmen; (5) perfusão e maturação dos vasos. (C) – Etapas sequenciais de remodelamento vascular de uma fase primitiva pra a fase de maturação da rede vascular (da esquerda para direita), incluindo a deposição da membrana basal, envoltório composto de pericitos e regressão de ramo. Adaptado de Potente, 2011.

1.3 Angiogênese terapêutica

As implicações terapêuticas dos fatores de crescimento angiogênicos foram inicialmente sugeridos nos estudos pioneiros de Judah Folkman, considerado o fundador da pesquisa em angiogênese (FOLKMAN, 1971, FOLKMAN and

HAUDENSCHILD, 1980). O termo *angiogênese terapêutica* vem sendo usado desde 1993 para designar uma potencial modalidade terapêutica baseada na indução da formação de novos vasos para fornecer suprimento sanguíneo a tecidos isquêmicos (DI ESTEFANO *et al.* 2004, ISNER *et al.* 1999). A angiogênese terapêutica, ainda em fase de testes pré-clínicos e clínicos, tem, portanto, como objetivo final, no caso da DAP, a recuperação do membro afetado através da estimulação da revascularização do mesmo (COLLINSON & DONNELLY, 2004), representando uma nova abordagem de estudo para o tratamento de doenças vasculares isquêmicas.

Existem, basicamente, três modalidades da angiogênese terapêutica: a terapia celular, a gênica e a farmacológica (BARANDON, 2004, LUYT, 2003). A terapia celular se baseia no transplante de células tronco. Por exemplo, o transplante de células-tronco angiogênicas da medula óssea, pode atuar através da formação direta de vasos ou, de forma indireta, por meio da secreção parácrina de fatores pró-angiogênicos, promovendo, assim, a neovascularização reparadora. Vários estudos vêm demonstrando de forma cada vez mais consistente que células originadas na medula óssea participam intensamente da regeneração de várias estruturas do sistema cardiovascular. O número de células endoteliais progenitoras circulantes aumenta em resposta à isquemia e são atraídas para os sítios de lesão em isquemia de membro inferior e miocárdio (MADEDDU, 2005, COLLINSON & DONNELLY, 2004). Já a terapia gênica se baseia na incrementação da produção de fatores de crescimento localmente da seguinte maneira: um gene que expressa o fator é introduzido em um DNA de origem bacteriana (plasmídeo) ou viral (geralmente adenovirus), o qual é introduzido e se incorpora ao DNA nas células dos tecidos isquêmicos, as quais, então, passam a produzir o fator de crescimento de

forma sustentada. Esses fatores de crescimento predominantemente agem nas células endoteliais para promover proliferação e migração dessas células (BOBEK *et al.*, 2006, HERTTUALA *et al.*, 2003, SILVA, 2004).

A terapia farmacológica, por outro lado, se baseia na administração local ou sistêmica de fatores de crescimentos ou de substâncias que induzam a liberação desses fatores de crescimentos pró-angiogênicos, sendo que seu objetivo primário é favorecer a indução de formação de novos vasos para suprimirem os tecidos isquêmicos. Várias substâncias têm sido sugeridas como importantes agentes na indução e ou manutenção da angiogênese, tais como: o Fator de Crescimento Endotelial (VEGF), o Fator de Crescimento do Fibroblasto (FGF), o Fator de Crescimento da Insulina (IGF-1) e o Fator de Necrose Tumoral (TNF) (CARMELIET and TESSIER-LAVIGNE, 2005, TROIDL *et al.*, 2010).

Além disso, estudos recentes sugerem que a angiotensina II e inibidores da enzima conversora de angiotensina (iECAs) estimulam a angiogênese e a melhora da revascularização do tecido isquêmico (LI *et al.*, 2008, SILVESTRE *et al.*, 2012, FALLAHZADEH *et al.*, 2011). Corroborando esse efeito terapêutico, vários trabalhos sugerem o possível envolvimento dos receptores B1 e B2 de bradicinina sobre a estimulação da produção de citocinas pró-angiogênicas (como VEGF e NO), aumento da densidade capilar local e proliferação de células endoteliais como possíveis mecanismos angiogênicos dos iECA (GOHLKE *et al.*, 1997, , FABRE *et al.*, 1999, MARGOLIUS, 1995, MORBIDELLI *et al.*, 1998).

1.4 Oligopeptídeos ricos em prolina derivados do veneno da *Bothrops jararaca* (Bj-PROs)

A função principal dos venenos das serpentes é a de imobilizar suas presas para garantir a sua alimentação. O estudo dos mecanismos fisiopatológicos do envenenamento e a caracterização molecular de toxinas do veneno da serpente *Bothrops jararaca* (Bj) resultou em muitas contribuições científicas de grande relevância, dentre elas destacam-se: a descoberta da bradicinina (Bk) (ROCHA E SILVA *et al.*, 1949) e o isolamento dos primeiros peptídeos potenciadores de bradicinina (BPPs – do inglês *bradykinin potentiating peptides*) produzidos na glândula de veneno (FERREIRA, 1970), cuja ação sinérgica é capaz de promover uma acentuada queda na pressão arterial das presas.

Além de potencializar os efeitos da Bk (FERREIRA *et al.*, 1970), os primeiros BPPs identificados foram capazes de inibir a ação catalítica da ECA (FERREIRA *et al.*, 1970b; STEWART *et al.*, 1971). Basicamente, a atividade da ECA resulta na conversão da angiotensina I em angiotensina II (vasoconstritor), bem como, na degradação da Bk (vasodilatador), peptídeos de ações antagônicas que desempenham papel fundamental no controle da pressão da arterial. A ação inibitória dos BPPs sobre a ECA, despertou grande interesse clínico-farmacêutico que culminou na publicação de centenas de artigos científicos e no desenvolvimento de um inibidor sítio dirigido da ECA. O Captopril, primeiro inibidor sintético da ECA, foi desenvolvido baseado na estrutura dos BPPs sendo largamente utilizado no tratamento da hipertensão arterial humana desde o início da década de 80 (ONDETTI *et al.*, 1981).

Os BPPs ou oligopeptídeos ricos em prolina (PROs – do inglês *proline rich oligopeptides*), como recentemente passaram a ser chamados, são moléculas peptídicas compostas de 5 a 17 resíduos de aminoácidos. Especificamente, as características estruturais comuns dos PROs descritos para a *Bj* incluem: i) a presença dos aminoácidos ácido piroglutâmico e prolina nas posições N- e C-terminais, respectivamente; ii) a maioria dos *Bj*-PROs apresentam a sequência tripeptídica isoleucina-prolina-prolina na porção C-terminal e iii) alto conteúdo de prolina (FERREIRA *et al.*, 1970; IANZER *et al.*, 2004; ZELANIS *et al.*, 2010).

A identificação de novas seqüências de *Bj*-PROs no veneno bruto (IANZER *et al.*, 2004) e nos cDNAs que codificam a proteína precursora do peptídeo natriurético tipo C na glândula de veneno e no cérebro da *Bj* (MURAYAMA *et al.*, 1997; HAYASHI *et al.*, 2003) renovou o interesse por esta família de moléculas. Até o momento, foram identificados 30 seqüências de *Bj*-PROs para serpente *B. jararaca* (Tabela 1).

A ação anti-hipertensiva dos *Bj*-PROs demonstrada na década de 70, foi atribuída à sua capacidade de inibir a atividade catalítica da ECA. No entanto, a capacidade de alguns *Bj*-PROs em potencializar o efeito da Bk, tanto em experimentos *ex vivo* como *in vivo*, não é diretamente proporcional à eficiência para inibir a ECA *in vitro* (COTTON *et al.*, 2002; HAYASHI *et al.*, 2003; IANZER *et al.*, 2007; IANZER *et al.*, 2011).

Tabela 1: Sequência de aminoácidos dos *Bj*-PROs descritos para *Bothrops jararaca*. (N-t)=N-terminal e (C-t)=C-terminal, <E=ácido piroglutâmico.

Sequência de aminoácidos	Nomenclatura	PM (Da)
<EKWAP	<i>Bj</i> -PRO-5a ^{a, c, d, e}	611.7
<EWPRP	<i>Bj</i> -PRO-5b ^e	665.8
<ESWPGP	<i>Bj</i> -PRO-6a ^{a, e}	653.7
<ENWPRP	<i>Bj</i> -PRO-10b cleaved ^f	779.4
<ENWPRP	<i>Bj</i> -PRO-10c cleaved ^f	760.3
<EDGPIPP	<i>Bj</i> -PRO-7a ^e	705.8
<EWPRPTP	<i>Bj</i> -PRO-11a cleaved ^f	863.4
<EWPRPQIPP	<i>Bj</i> -PRO-9a ^{a, b, e}	1101.3
<ESWPGPNIPP	<i>Bj</i> -PRO-10a ^{a, b, c, e, g}	1075.2
<ENWPRPQIPP	<i>Bj</i> -PRO-10b ^{b, e, g}	1215.4
<ENWPHPQIPP	<i>Bj</i> -PRO-10c ^{a, b, c, d, e}	1196.3
<EQWAQNWPHPQIPP	<i>Bj</i> -PRO-10c +<EQWA(N-t) ^g	1709.5
<EWPRPTPQIPP	<i>Bj</i> -PRO-11a ^{b, e}	1299.5
<EGRAPGPIPP	<i>Bj</i> -PRO-11b ^{c, e}	1069.2
<EGRAPHPIPP	<i>Bj</i> -PRO-11c ^c	1149.3
<EGRPPGPIPP	<i>Bj</i> -PRO-11d ^e	1025.3
<EARPPHPPIPP	<i>Bj</i> -PRO-11e ^d	1189.4
<EARPPHPPIAP	<i>Bj</i> -PRO-11e +AP(C-t) ^g	1357.7
<EARPPHPPIAPL	<i>Bj</i> -PRO-11e +APL(C-t) ^g	1470.6
<EQWAQARPPHPPIPPAP	<i>Bj</i> -PRO-11e +<EQWA(N-t).AP(C-	1870.5
<EGHAWPRPQIPP	<i>Bj</i> -PRO-12a ^{a, e}	1415.6
<EWGRPPGPIPP	<i>Bj</i> -PRO-12b ^d	1281.5
<EWAQWPRPQIPP	<i>Bj</i> -PRO-12c ^{e, g}	1485.8
<ELGPPPRPQIPP	<i>Bj</i> -PRO-12d ^g	1279.8
<EGGWPRPGPEIPP	<i>Bj</i> -PRO-13a ^{d, e, g}	1370.5
<EGWPRPGPEIPP	<i>Bj</i> -PRO-13a -<EG(N-t) ^g	1202.6
<EWAQGGWPRPGPEIPP	<i>Bj</i> -PRO-13a +<EWA(N-t) ^g	1756.6
<EQWAQGGWPRPGPEIPP	<i>Bj</i> -PRO-13a +<EQWA(N-t) ^g	1884.5
<EGGLPRPGPEIPP	<i>Bj</i> -PRO-13b ^{a, b, c, d, e}	1297.5
<EWAQWPRPTPQIPP	<i>Bj</i> -PRO-14a ^{e, f}	1683.8

^a (Ferreira *et al.*, 1970); ^b (Ondetti *et al.*, 1971); ^c (Murayama *et al.*, 1997); ^d (Hayashi *et al.*, (2003); ^e (Ilanzer *et al.*, 2004); ^f (Pimenta *et al.*, 2007); ^g (Zelanis *et al.*, 2010).

Dentre esses, podemos citar os peptídeos *Bj*-PRO-7a e *Bj*-PRO-10c, os quais foram selecionados para utilização neste trabalho. O *Bj*-PRO-7a é um fraco inibidor de ECA *in vitro* e fraco potenciador da Bk *ex vivo*, porém, provocou queda significativa na pressão arterial de ratos espontaneamente hipertensos (SHRs) (IANZER *et al.*, 2007), sugerindo que a sua ação anti-hipertensiva não esteja relacionada com a inibição de ECA (CAMARGO and FERREIRA, 1971). Estudo recente sugere que o *Bj*-PRO-7a é agonista no receptor muscarínico M1 *in vitro* (NEGRAES *et al.*, 2011).

Apesar do peptídeo *Bj*-PRO-10c inibir seletivamente o sítio C-terminal da ECA *in vitro* (HAYASHI *et al.*, 2003), o efeito anti-hipertensivo em SHRs foi observado em doses inferiores às necessárias à inibição da ECA (IANZER *et al.*, 2007). Outra demonstração de que o mecanismo de ação do *Bj*-PRO-10c é independente da inibição da ECA foi obtida em estudos de biodistribuição e biotransformação. O *Bj*-PRO-10c tem uma lenta absorção e seu acúmulo foi observado principalmente nos rins, mesmo quando co-administrado com doses elevadas de captopril, sugerindo que este peptídeo possui um alvo renal não relacionado à ECA (SILVA *et al.*, 2008). Recentemente, GUERREIRO *et al.* (2009) mostraram que o *Bj*-PRO-10c interage fortemente com a enzima argininosuccinato sintetase (AsS) nos rins, ativando-a e, conseqüentemente, estimulando um aumento da produção de NO. A AsS é a enzima passo limitante no ciclo arginina-citrulina, sendo responsável pela reciclagem da L-arginina, substrato para produção de óxido nítrico (NO) (SOLOMONSON *et al.*, 2003) (Figura 2) que, por sua vez, é uma importante molécula pró-angiogênica (ZICHE, 2000).

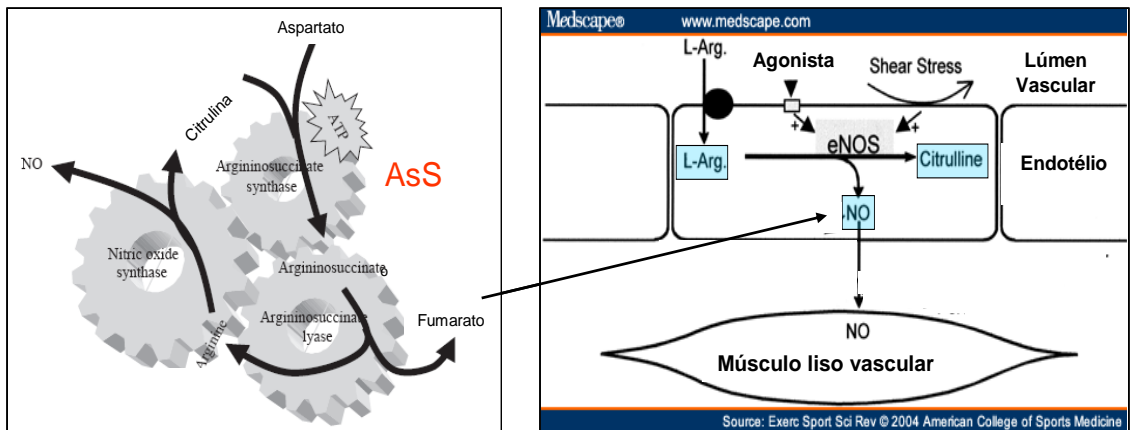


Figura 2 – Figura esquemática do processo de reciclagem da citrulina, que na presença da enzima AsS aumenta a disponibilidade de arginina e consequentemente aumento na produção de NO. Adaptada de Guerreiro, 2009.

2 Justificativa

A Doença Arterial Periférica (DAP) é uma doença crônica que progressivamente dificulta a circulação arterial dos membros. Este distúrbio afeta 8-12 milhões de pessoas nos EUA e está cada vez mais prevalente na Europa e na Ásia (BREVETTI, 2004, CRIQUI, 2005, HAYOZ, 2005). A isquemia crítica de membro inferior é uma manifestação clínica grave da DAP e é definida pela apresentação de dor isquêmica de repouso, com presença ou não de úlceras e gangrena, resultante de oclusão arterial. Pacientes com isquemia de membros inferiores que não respondem à terapia medicamentosa padrão ou não possuem indicação para procedimentos endovasculares ou cirúrgicos de reperfusão podem sofrer amputação dos membros afetados (O'HARE, *et al.*, 2006). Conseqüentemente, a exploração de novas estratégias terapêuticas para a revascularização de tecidos isquêmicos é de grande importância.

Sabe-se que inibidores da enzima conversora de angiotensina I (ECA), amplamente utilizados como agentes anti-hipertensivos, como, por exemplo, o Captopril, desenvolvido com base na estrutura dos *Bj*-PROs (ONDETTI *et al.*, 1981), não apenas convertem angiotensina I em angiotensina II como também bloqueiam a degradação da bradicinina em fragmentos inativos (LINZ *et al.*, 1995). A bradicinina, ao se ligar ao receptor B2, por sua vez, é um importante mediador na regulação da angiogênese, via liberação de NO, sendo capaz de estimular a proliferação de células endoteliais (MORBIDELLI *et al.*, 1998) bem como estimular a angiogênese em modelo de implante de esponjas (HU, 1993) e na isquemia de membros posteriores em camundongos (KRANKEL *et al.*, 2008).

Drogas anti-hipertensivas exercem diversos efeitos sobre a vasculatura que vão além da redução da pressão sanguínea (FERRONI *et al.*, 2012), representando uma classe de fármacos que potencialmente podem estimular a angiogênese. No presente estudo foram utilizados os *Bj*-PROs, oligopeptídeos presentes no veneno da *B. jararaca*. A escolha dessas moléculas foi baseada no fato de terem sido os primeiros inibidores da ECA descritos (FERREIRA *et al.*, 1971), sendo utilizados como protótipos para o desenvolvimento do Captopril (VANE, 1999). Entretanto, estudos recentes mostraram que os *Bj*-PROs, em doses baixas, reduzem a pressão arterial sem afetar a atividade catalítica da ECA (IANZER *et al.*, 2007; IANZER *et al.*, 2011). Especificamente, o efeito anti-hipertensivo evocado pelo *Bj*-PRO-10c é em parte devido ao aumento da liberação de NO (CAMARGO *et al.*, 2012), um importante estimulador da angiogênese (ZICHE, 2000).

A angiogênese terapêutica tem sido proposta como uma alternativa para o tratamento de doenças isquêmicas. Devido aos potentes efeitos anti-hipertensivos observados *in vivo* e a identificação de novos alvos de atuação dos *Bj*-PROs, que não apenas a inibição da ECA (IANZER *et al.*, 2007; GUERREIRO *et al.*, 2009), bem como devido ao fato de moléculas similares, tais como os inibidores de ECA idealizados a partir dos primeiros *Bj*-PROs descobertos, serem estimuladores da angiogênese (FABRE *et al.*, 1999), a nossa hipótese é, portanto, de que esses *Bj*-PROs recentemente descritos, em especial o *Bj*-PRO-7a e o *Bj*-PRO-10c, possam ser possíveis moléculas que promovam uma maior atividade angiogênica e, conseqüentemente, estimulem a revascularização do tecido isquêmico.

Dessa forma, frente à necessidade de desenvolvimento de novas estratégias de tratamento para a DAP, os *Bj*-PROs poderão servir como ferramentas para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da DAP.

3 Objetivos

3.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos dos peptídeos ricos em prolina da *Bothrops jararaca* Bj-PRO-7a e Bj-PRO-10c sobre a revascularização de músculos isquêmicos de membros posteriores em modelo murino.

3.2 Objetivos específicos

Especificamente, avaliamos os efeitos da administração sistêmica dos peptídeos Bj-PRO-7a e Bj-PRO-10c sobre:

1. O fluxo sanguíneo de membros posteriores isquêmicos de animais submetidos à cirurgia de oclusão da artéria femoral (OAF);
2. A pressão arterial sistólica de animais submetidos à OAF;
3. A angiogênese e a arteriogênese em músculos de membros posteriores isquêmicos de animais submetidos à OAF;
4. O conteúdo de células progenitoras de endotélio na medula óssea e no sangue de animais submetidos à OAF;
5. A produção de VEGF (fator de crescimento do endotélio vascular) e de NO (óxido nítrico) nos músculos de membros posteriores isquêmicos e na medula óssea desses animais;

6. O fluxo sanguíneo de membros posteriores isquêmicos de animais deficientes na expressão do receptor B2 de Bradicinina (B2R-KO);
7. A angiogênese e a arteriogênese em músculos de membros posteriores isquêmicos de animais B2R-KO;
8. O fluxo sanguíneo de membros posteriores isquêmicos de animais tratados com o inibidor de óxido nítrico sintase L-NAME;
9. A angiogênese e a arteriogênese em músculos de membros posteriores isquêmicos de animais tratados com L-NAME.

7 CONCLUSÃO

Os dados apresentados nesse trabalho sugerem que:

- O tratamento sistêmico diário com ambos os peptídeos *Bj-PRO-7a* e *Bj-PRO-10c* estimula a recuperação do fluxo sanguíneo de membros posteriores isquemiados após a OAF em camundongos;
- Ambos os peptídeos *Bj-PRO-7a* e *Bj-PRO-10c* estimulam a angiogênese e a arteriogênese em músculos de membros posteriores isquemiados após a OAF em camundongos;
- Apenas o peptídeo *Bj-PRO-10c*, mas não o *Bj-PRO-7a*, estimula a produção das moléculas pró-angiogênicas NO e VEGF em músculos de membros posteriores isquemiados após a OAF em camundongos;
- Apenas o peptídeo *Bj-PRO-10c*, mas não o *Bj-PRO-7a*, estimula a mobilização de células-tronco angiogênicas da medula óssea após a OAF em camundongos;
- Os efeitos estimulatórios dos peptídeos *Bj-PRO-7a* e *Bj-PRO-10c* sobre a revascularização dos membros isquemiados parecem não ser dependentes da ativação do receptor B2 de Bradicinina;
- Os efeitos estimulatórios do peptídeo *Bj-PRO-10c*, mas não do *Bj-PRO-7a*, sobre a revascularização dos membros isquemiados é, pelo menos parcialmente, dependente da estimulação da produção de NO.

- Como **conclusão geral**, pode-se sugerir que os peptídeos *Bj*-PRO-7a e *Bj*-PRO-10c apresentam potentes efeitos pró-angiogênicos em modelo de isquemia induzida por OAF em camundongos de maneira independente da ativação de receptores B2 de Bradicinina. Além disso, o efeito estimulatório do peptídeo *Bj*-PRO-10c, mas não o *Bj*-PRO-7a, sobre a revascularização de membros isquêmicos parece ser dependente da estimulação da produção de NO.

8 Referências Bibliográficas

1. Adam DJ, Beard JD, Cleveland T, Bell J, Bradbury AW, Forbes JF, *et al.*. Bypass versus angioplasty in severe ischaemia of the leg (BASIL): multicentre, randomised controlled trial. *Lancet* 2005;366:1925-34
2. Adams RH, Alitalo K. Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007
3. Ahluwalia A, Perretti M B1 receptors as a new inflammatory target. Could this be the 1? *Trends Pharmacol Sci.* 1999;20:100–104
4. Aronow Wilbert S. Office Management of Peripheral Arterial Disease. *The American Journal of medicine* (2010).
5. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schattman G, Isner JM: Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997; 275: 964–967
6. Asahara, T., T. Takahashi, H. Masuda, C. Kalka, D. Chen, H. Iwaguro, Y. Inai, M. Silver, and J. M. Isner. 1999. VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *EMBO J.* **18**: 3964–3972.
7. Bailey AS, Jiang S, Afentoulis M, Baumann CI, *et al.*. Transplanted adult hematopoietic stem cells differentiate into functional endothelial cells. *Blood* 2004; 103 (1):13-9
8. Barandon L, Leroux L, Dufourcq P, Plagnol P, Deville C, Duplaa C, Couffinhal T. Gene therapy for chronic peripheral arterial disease: what role for the vascular surgeon ? *Ann Vasc Surg.* 2004;18(6):758-65.
9. Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, Kasahara H, Rota M, Musso E, Urbanek K, Leri A, Kajstura J, Nadal-Ginard B, Anversa P. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell.* 2003 Sep 19;114(6):763-76.

10. Bernátová I, Púzserová A, Kopincová J: Time- and dose-dependent modulation of nitric oxide production with L-NAME in borderline hypertensive rats. *Physiol Res*, 2010, 59, 2P–3P
11. Bobek V, Taltynov O, Pinterova D, Kolostova K. Gene therapy of the ischemic lower limb--Therapeutic angiogenesis. *Vascul Pharmacol*. 2006 Jun;44(6):395-405. Epub 2006 May 15.
12. Camargo AC, and Ferreira SH (1971) Action of bradykinin potentiating factor (BPF) and dimercaprol (BAL) on the responses to bradykinin of isolated preparations of rat intestines. *Br J Pharmacol* 42:305–307. 5091164
13. Camargo AC, lanzer D, Guerreiro JR, Serrano SM. Bradykinin-potentiating peptides: beyond captopril. *Toxicon*. 2012 Mar 15;59(4):516-23. doi: 10.1016/j.toxicon.2011.07.013. Epub 2011 Aug 2.
14. Carmeliet P, Tessier-Lavigne M. Common mechanisms of nerve and blood vessel wiring. *Nature*. 2005 Jul 14;436(7048):193-200.
15. Carmeliet, P. Angiogenesis in health and disease. *Nature Med*. 9, 653–660 (2003). Swift, M. R. & Weinstein, B. M. Arterial–venous specification during..
16. Christopher B. Patillo *et al.*. Inorganic nitrite and chronic tissue ischaemia: a novel therapeutic modality for peripheral vascular diseases. *Cardiovascular Research*, 2010.
17. Cogle CR, Scott EW. The Hemangioblast: crade to clinic. *Exp Hematol* 2004;32 (10): 885-90.
18. Collinson D. J., Donnelly R. Therapeutic Angiogenesis in Pheripheral Arterial disease: Can biotechnology produce an effective collateral circulation. *Eur J. Vascular Surg*, 2004;9-23.
19. Cotton J, Hayashi MA, Cuniasse P, Vazeux G, lanzer D, de Camargo AC, and Dive V (2002) Selective inhibition of the C-domain of angiotensin I converting enzyme by bradykinin potentiating peptides. *Biochemistry* 41:6065–6071.1199400.

20. Coultas, L., Chawengsaksophak, K., and Rossant, J. (2005) *Nature*. 438. 937-945
21. Criqui MH, Fronek A, Barrett-Connor E, Klauber MR, Gabriel S, Goodman D. The prevalence of peripheral arterial disease in a defined population. *Circulation*. 1985;71:510-515
22. D. Hayoz, H. Bounameaux, C.R. Canova Swiss Atherothrombosis Survey: a field report on the occurrence of symptomatic and asymptomatic peripheral arterial disease *J Intern Med*, 258 (2005), pp. 238–243
23. Di Stefano R, Limbruno U, Barone D, Balbarini A. Angiogenesi terapeutica nell'ischemia critica degli arti inferiori. Revisione della letteratura e prospettive della ricerca sulle cellule staminali. *Ital Heart J Suppl*. 2004;5(1):1-13.
24. Diehm C; Schuster A, Allenberg JR, *et al.*. High prevalence of peripheral arterial disease and co-morbidity in 6880 primary patients: Cross-sectional study. *Atherosclerosis* 2004.
25. Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, and Zeiher AM. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 399:601–605, 1999.
26. Dormandy J, Heeck L, Vig S. The natural history of claudication: risk to life and limb. *Semin Vasc Surg*. 1999.
27. Dormandy JA, Rutherford RB. Management of peripheral arterial disease (PAD). TASC Working Group. TransAtlantic Inter-Society Consensus (TASC). *J Vasc Surg*. 2000 Jan;31(1 Pt 2):S1-S296.
28. Ebrahimian TG, Tamarat R, Clergue M, Duriez M, Levy BI, Silvestre JS. Dual effect of angiotensin-converting enzyme inhibition on angiogenesis in type 1 diabetic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005 Jan;25(1):65-70. Epub 2004 Nov 4.
29. Fabre JE, Rivard A, Magner M, Silver M, Isner JM. Tissue inhibition of angiotensin-converting

- enzyme activity stimulates angiogenesis in vivo. *Circulation*. 1999 Jun 15;99(23):3043-9.
30. Fahmy RG, Dass CR, Sun LQ, *et al.* Transcription factor Egr-1 supports FGF-dependent angiogenesis during neovascularization and tumor growth. *Nat Med*. 2003;9:1026–1032.
31. Fallahzadeh AR, Khazaei M, Sharifi MR. Restoration of angiogenesis by enalapril in diabetic hindlimb ischemic rats. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2011 Jun;155(2):137-42.
32. Fang S, Wei J, Pentimikko N, Leinonen H, Salven P. Generation of functional blood vessels from a single c-kit+ adult vascular endothelial stem cell. *PLoS Biol*. 2012;10(10):e1001407. doi: 10.1371/journal.pbio.1001407. Epub 2012 Oct 16.
33. Ferrara, N. & Alitalo, K. Clinical applications of angiogenic growth factors and their inhibitors. *Nature Med*. 5, 1359–1364 (1999)
34. Ferrara, N. VEGF-A: a critical regulator of blood vessel growth. *Eur. Cytokine Netw*. 20, 158–163 (2009).
35. Ferreira SH, Barteld DC, Greene LJ. Isolation of bradykinin potentiating peptides from Bothrops jararaca venom. *Biochemistry* 1970;9(13):2583–93.
36. Ferroni P, Della-Morte D, Palmirotta R, Rundek T, Guadagni F, Roselli M. Angiogenesis and hypertension: the dual role of anti-hypertensive and anti-angiogenic therapies. *Curr Vasc Pharmacol*. 2012 Jul;10(4):479-93.
37. Folkman J. Fundamental concepts of the angiogenic process. *Curr Mol Med*. 2003 Nov.
38. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med*. 1971 Nov 18;285(21):1182-6.
39. Folkman, J. and HAUDENSCHILD, C. (1980) Angiogenesis *in vitro*. *Nature* 288:551-556.`

40. Fukumura Dai, Takeshi Gohongi, Ananth Kadambi, Yotaro Izumi, Jennifer Ang, Chae-Ok Yun, Donald G. Buerk, Paul L. Huang, and Rakesh K. Jain: Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability. Feb 2000.
41. G. Brevetti, G. Oliva, A. Silvestro, F. Scopacasa, M. Chiariello Prevalence, risk factors and cardiovascular comorbidity of symptomatic peripheral arterial disease in Italy.
42. Gale NW, Yancopoulos GD. Growth factors acting via endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases: VEGFs, angiopoietins, and ephrins in vascular development. *Genes Dev.* 1999 May 1;13(9):1055-66.
43. Gerber, H.-P. *et al.*. Vascular endothelial growth factor regulates haematopoietic stem cell survival by an internal autocrine loop mechanism. *Nature* 417, 954–958 (2002).
44. Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, Benjamin EJ, Berry JD, Borden WB, Bravata DM, Dai S, Ford ES, Fox CS, Franco S, Fullerton HJ, Gillespie C, Hailpern SM, Heit JA, Howard VJ, Huffman MD, Kissela BM, Kittner SJ, Lackland DT, Lichtman JH, Lisabeth LD, Magid D, Marcus GM, Marelli A, Matchar DB, McGuire DK, Mohler ER, Moy CS, Mussolino ME, Nichol G, Paynter NP, Schreiner PJ, Sorlie PD, Stein J, Turan TN, Virani SS, Wong ND, Woo D, Turner MB; American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart disease and stroke statistics--2013 update: a report from the American Heart Association. *Circulation.* 2013 Jan 1;127(1):e6-e245. doi: 10.1161/CIR.0b013e31828124ad. Epub 2012 Dec 12.
45. Gohlke P, Tschöpe C, Unger T. Bradykinin and cardiac protection. *Adv Exp Med Biol.* 1997;432:159-72
46. Griffioen AW, Molema G. Angiogenesis: potentials for pharmacologic intervention in the treatment of cancer, cardiovascular diseases, and chronic inflammation. *Pharmacol Rev.* 2000.

47. Guerreiro J.R, Claudiana Lameu, Eduardo F. Oliveira, Clécio F. Klitzke, Robson L. Melo, Edlaine Linares, Ohara Augusto, Jay W. Fox, Ivo Lebrun, Solange M. T. Serrano and Antonio C. M. Camargo. Argininosuccinate Synthetase Is a Functional Target for a Snake Venom Anti-hypertensive Peptide. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY VOL. 284, NO. 30, pp. 20022–20033, July 24, 2009.
48. Guerreiro JR, Lameu C, Oliveira EF, Klitzke CF, Melo RL, Linares E, Augusto O, Fox JW, Lebrun I, Serrano SM, Camargo AC. Argininosuccinate synthetase is a functional target for a snake venom anti-hypertensive peptide: role in arginine and nitric oxide production. J Biol Chem. 2009 Jul 24;284(30):20022-33. doi: 10.1074/jbc.M109.021089. Epub 2009 Jun 2.
49. Hattori, K. *et al.*. Placental growth factor reconstitutes hematopoiesis by recruiting VEGFR1+ stem cells from bone-marrow microenvironment. *Nature Med.* 8, 841–849 (2002).
50. Hayashi MA, Murbach AF, Ianzer D, Portaro FC, Prezoto BC, Fernandes BL, Silveira PF, Silva CA, Pires RS, Britto LR, Dive V, Camargo AC. The C-type natriuretic peptide precursor of snake brain contains highly specific inhibitors of the angiotensin-converting enzyme. J Neurochem. 2003 May;85(4):969-77.
51. Heilmann C, Beyersdorf F, Lutter G. Collateral growth: cells arrive at the construction site. *Cardiovasc Surg* 2002; 10: 570–578.
52. Hertzuala S, Markkanen JE, Rissanen TT. Gene therapy for ischemic cardiovascular diseases: some lessons learned from the first clinical trials. *Trends Cardiovasc Med.* 2004 Nov;14(8):295-300.
53. Hiatt WR, Marshall JA, Baxter J, Sandoval R, Hildebrandt W, Kahn LR, Hamman RF. Diagnostic methods for peripheral arterial disease in the San Luis Valley Diabetes Study. *J Clin Epidemiol.* 1990;43:597-606
54. Hirota K, Semenza GL. Regulation of angiogenesis by hypoxia-inducible factor 1. *Crit Rev Oncol Hematol* 2006; 59: 15–26.

55. lanzer D, Santos RA, Etelvino GM, Xavier CH, Santos JA, Mendes EP, Machado IT, Prezoto BC, Dive V, Camargo ACM. (2007) Do the cardiovascular effects of ace involve ace-independent mechanisms? New insights from proline-rich peptides of bothrops jararaca. *J pharmacol exp ther.*, 322:795-805.
56. lanzer D, Konno K, Marques-Porto R, Vieira Portaro FC, Stöcklin R, Martins de Camargo AC, Pimenta DC. Identification of five new bradykinin potentiating peptides (BPPs) from Bothrops jararaca crude venom by using electrospray ionization tandem mass spectrometry after a two-step liquid chromatography. *Peptides*. 2004 Jul;25(7):1085-92.
57. lanzer D, Xavier CH, Fraga FC, Lautner RQ, Guerreiro JR, Machado LT, Mendes EP, de Camargo AC, Santos RA. BPP-5a produces a potent and long-lasting NO-dependent antihypertensive effect. *Ther Adv Cardiovasc Dis*. 2011 Dec;5(6):281-95. doi: 10.1177/1753944711427318. Epub 2011 Oct 27.
58. Isner JM, Asahara T. Angiogenesis and vasculogenesis as therapeutic strategies for postnatal neovascularization. *J Clin Invest*. 1999;103(9):1231-6.
59. Jadeski LC and Lala PK. Nitric oxide synthase inhibition by NG-nitro-L-arginine methyl ester inhibits tumor-induced angiogenesis in mammary tumors. *Am J Pathol* 155: 1381–1390, 1999.
60. Jain RK. Tumor angiogenesis and accessibility: role of vascular endothelial growth factor. *Semin Oncol*. 2002 Dec;29.
61. Karamysheva A. F. , Mechanisms of Angiogenesis, Institute of Carcinogenesis, Blokhin Cancer Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Kashirskoe Shosse 24 (2007),
62. Kim, K. J. *et al.*. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumor growth *in vivo*. *Nature* 362, 841–844 (1993.)

63. Kränkel N, Katare RG, Siragusa M, Barcelos LS, Campagnolo P, Mangialardi G, Fortunato O, Spinetti G, Tran N, Zacharowski K, Wojakowski W, Mroz I, Herman A, Manning Fox JE, MacDonald PE, Schanstra JP, Bascands JL, Ascione R, Angelini G, Emanuelli C, Madeddu P. Role of kinin B2 receptor signaling in the recruitment of circulating progenitor cells with neovascularization potential. *Circ Res*. 2008 Nov 21;103(11):1335-43. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.108.179952. Epub 2008 Oct 16.
64. Kroll J, Waltenberger J. The vascular endothelial growth factor receptor KDR activates multiple signal transduction pathways in porcine aortic endothelial cells. *J Biol Chem*. 1997 Dec 19;272(51):32521-7.
- Kwon O, Miller S, Li N, Khan A, Kadry Z, Uemura T. Bone marrow-derived endothelial progenitor cells and endothelial cells may contribute to endothelial repair in the kidney immediately after ischemia-reperfusion. *J Histochem Cytochem*. 2010 Aug;58(8):687-94. doi: 10.1369/jhc.2010.956011. Epub 2010 Mar 30
65. Lamas S, Michel T, Collins T, Brenner BM, Mardsen PA: Nitric oxide synthesis in endothelial cells: evidence for a pathway inducible by TNF- α . *Am J Physiol* 1991, 261:C634-C641
66. Lameu C, Pontieri V, Guerreiro JR, Oliveira EF, da Silva CA, Giglio JM, Melo RL, Campos RR, de Camargo AC, Ulrich H. Brain nitric oxide production by a proline-rich decapeptide from *Bothrops jararaca* venom improves baroreflex sensitivity of spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res*. 2010 Dec;33(12):1283-8
67. Lawall H, Bramlage P, Amann B: Treatment of peripheral arterial disease using stem and progenitor cell therapy. *J Vasc Surg*. 2011 Feb;53(2):445-53
68. Linz W, Wiemer G, Gohlke P, Unger T, Schölkens BA. Contribution of kinins to the cardiovascular actions of angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Pharmacol Rev*. 1995 Mar;47(1):25-49.

69. Luttun, A. *et al.*. Revascularization of ischemic tissues by PIGF treatment, and inhibition of tumor angiogenesis, arthritis and atherosclerosis by anti-Flt1. *Nature Med.* 8, 831–840 (2002.)
70. Luyt CE, Meddahi-Pellé A, Ho-Tin-Noe B, Collic-Jouault S, Guezennec J, Louedec L, Prats H, Jacob MP, Osborne-Pellegrin M, Letourneur D, Michel JB. Low-molecular-weight fucoidan promotes therapeutic revascularization in a rat model of critical hindlimb ischemia. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003;305:24-35.
71. MADEDDU P, EMANUELI C, SPILLMANN F, MELONI M, BOUBY N, RICHER C, ALHENC-GELAS F, VAN WEEL V, EEFTING D, QUAX PH, HU Y, XU Q, HEMDAHL AL, VAN GOLDE J, HUIJBERTS M, DE LUSSANET Q, STRUIJKER BOUDIER H, COUFFINHAL T, DUPLAA C, CHIMENTI S, STASZEWSKY L, LATINI R, BAUMANS V, LEVY BI. Murine models of myocardial and limb ischemia: diagnostic end-points and relevance to clinical problems. *Vascular Pharmacology.* Nov;45(5):281-301. 2006.
72. Madeddu P. Therapeutic angiogenesis and vasculogenesis for tissue regeneration. Exp Physiol. 2005 May;90(3):315-26. Epub 2005 Mar 18.
73. Marina Ziche, Lucia Morbidelli, Emanuela Masini, Sandra Amerini, Harris J. Granger, Carlo Alberto Maggi, Pierangelo Geppetti, and Fabrizio Ledda. Nitric Oxide Mediates Angiogenesis In Vivo and Endothelial Cell Growth and Migration In Vitro Promoted by Substance P. *J Clin Invest.* 1994 Nov;94(5):2036-44
74. McDermott MM, Greenland P, Liu K, *et al.*. The ankle brachial index is associated with leg function and physical activity: the Walking and Leg Circulation Study. *Ann Intern Med* 2002; 136: 873-83
75. Mehrabi MR, Ekmekcioglu C, Stanek B, Thalhammer T, Tamaddon F, Pacher R, Steiner GE, Wild T, Grimm M, Spieckermann PG, Mall G, Glogar HD. Angiogenesis stimulation in explanted hearts from patients pré-

- treated with intravenous prostaglandin E (1). *J Heart Lung Transplantation*. 2001;20(4):465-73.
76. Mehrabi MR, Serbecic N, Tamaddon F, Kaun C, Huber K, Pacher R, Wild T, Mall G, Wojta J, Glogar HD. Clinical and experimental evidence of prostaglandin E1-induced angiogenesis in the myocardium of patients with ischemic heart disease. *Cardiovasc Res*. 2002;56(2):214-24.
77. Moncada S, Higgs EA. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. *Br J Clin Pharmacol* 2006;147 Suppl 1:S193–201
78. Morais K.L.P., M.A.F. Hayashi, F.M. Bruni, M. Lopes-Ferreira, A.C.M. Camargo, H. Ulrich, C. Lameu, *Bj-PRO-5a*, a natural angiotensin-converting enzyme inhibitor, promotes vasodilatation mediated by both bradykinin B2 and M1 muscarinic acetylcholine receptors, *Biochemical Pharmacology* 2010; 736–742.
79. Morbidelli, L., Chang, CH, Douglas JG, Granger HJ, Ledda F, Ziche M. Nitric oxide mediates mitogenic effect of VEGF on coronary venular endothelium. *Am J Physiol*. 1996 Jan;270(1 Pt 2):H411-5.
80. Murayama N, Hayashi MA, Ohi H, Ferreira LA, Fernandes BL, Yamane T, and Camargo ACM (1997) Cloning and sequence of a *Bothrops jararaca* cDNA encoding a precursor of seven bradykinin-potentiating peptides and a C-type natriuretic peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:1189–1193. 9037028.
81. Murohara T, Asahara T, Silver M, Bauters C, Masuda H, Kalka C, Kearney M, Chen D, Symes JF, Fishman MC, Huang PL, Isner JM. Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia. *J Clin Invest*. 1998;101:2567-78
82. Namba T, Koike H, Murakami K, Aoki M, Makino H, Hashiya N, Ogihara T, Kaneda Y, Kohno M, Morishita R. Angiogenesis induced by endothelial nitric oxide synthase gene through vascular endothelial growth factor expression in a rat hindlimb ischemia model. *Circulation*. 2003;108:2250-7.

83. Negraes PD, Lameu C, Hayashi MA, Melo RL, Camargo AC, Ulrich H. The snake venom peptide Bj-PRO-7a is a M1 muscarinic acetylcholine receptor agonist. *Cytometry A*. 2011 Jan;79(1):77-83. doi: 10.1002/cyto.a.20963.
84. Newman AB, Shemanki L, Manolio TA, *et al.*. Ankle-arm index as a predictor of cardiovascular disease and mortality in the Cardiovascular health Study. The Cardiovascular Health Study Group. *Arterioscler Tromb Vasc Biol* 1999;19:538-45`
85. Niels van Royen *et al.*. Stimulation of arteriogenesis; a new concept for the treatment of arterial occlusive disease. *Cardiovascular Research*, 2001; 543-553.
86. Norgren L, Hiatt WR, Dormandy JA, Nehler MR, Harris KA, Fowkes FG; TASC II Working Group. Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II). *J Vasc Surg*. 2007 Jan;45 Suppl S:S5-67.
87. O'Hare AM, Katz R, Shlipak MG, Cushman M, Newman AB. Mortality and cardiovascular risk across the ankle-arm index spectrum: results from the Cardiovascular Health Study. *Circulation*. 2006 Jan 24;113(3):388-93.
88. Ondetti MA, Cushman DW. Inhibition of the renin-angiotensin system. A new approach to the therapy of hypertension. *J Med Chem* 1981;24(4):355–61.
89. Palmer RMJ, Moncada S: A novel citrulline-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1989, 158, 348–352.
90. Papapetropoulos A, Garcia-Cardena G, Madri JA, and Sessa WC. Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. *J Clin Invest* 100: 3131–3139, 1997
91. Phng, L. K. & Gerhardt, H. Angiogenesis: a team effort coordinated by Notch. *Dev. Cell* 16, 196–208 (2009).

92. Pipili-Synetos B, Sakkoula B, Maragoudakis ME: Nitric oxide is involved in the regulation of angiogenesis. *Br J Pharmacol* 108: 855–857, 1993
93. Rafii S, Meeus S, Dias S, Hattori K, Heissig B, Shmelkov S, Rafii D, Lyden D. Contribution of marrow-derived progenitors to vascular and cardiac regeneration. *Semin Cell Dev Biol.* 2002 Feb;13(1):61-7.
94. Risau W: Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 1997; 386: 671–674
95. Rocha e Silva, M., Beraldo, W.T., Rosenfeld, G., 1949. Bradykinin hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulins by snake venoms and by trypsin. *Am. J. Physiol.* 156, 261–273.
96. Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM, Benjamin EJ, Berry JD, Borden WB, Bravata DM, Dai S, Ford ES, Fox CS, Fullerton HJ, Gillespie C, Hailpern SM, Heit JA, Howard VJ, Kissela BM, Kittner SJ, Lackland DT, Lichtman JH, Lisabeth LD, Makuc DM, Marcus GM, Marelli A, Matchar DB, Moy CS, Mozaffarian D, Mussolino ME, Nichol G, Paynter NP, Soliman EZ, Sorlie PD, Sotoodehnia N, Turan TN, Virani SS, Wong ND, Woo D, Turner MB; American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Executive summary: heart disease and stroke statistics--2012 update: a report from the American Heart Association. *Circulation.* 2012 Jan 3;125(1):188-97. doi: 10.1161/CIR.0b013e3182456d46.
97. Schaper W, Troidl K. Arteriogenesis versus angiogenesis in peripheral artery disease. *Diabetes Metab Res Rev* 2012
98. Schlingemann RO, Rietveld FJ, Kwaspens F, van de Kerkhof PC, de Waal RM, Ruiten DJ. Differential expression of markers for endothelial cells, pericytes, and basal lamina in the microvasculature of tumors and granulation tissue. *Am J Pathol.* 1991.
99. Schmidt HH, Walter U. (1994) NO at work. *Cell.*; 78: 919–25.
100. Schroll M, Munck O. Estimation of peripheral arterio sclerotic disease by ankle blood pressure measurements in a population of 60 year old men and women. *J Chron Dis* 1981; 34: 261-9.

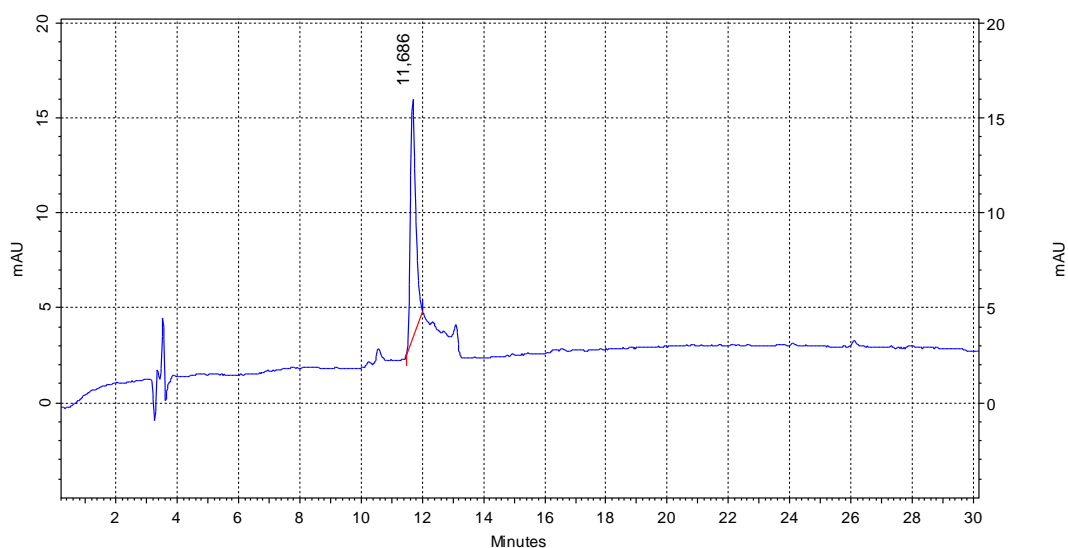
101. Silva CA, Portaro FCV, Fernandes BL, Ianzer DA, Guerreiro JR, Gomes CL, Konno K, Serrano SMT, Nascimento N, Camargo ACM. (2008) Tissue distribution in mice of bpp 10c, a potent proline-rich anti-hypertensive peptide of bothrops jararaca. *Toxicon* 51:515-23.
102. Silvestre JS, Bergaya S, Tamarat R, Duriez M, Boulanger CM, Levy BI. Proangiogenic effect of angiotensin-converting enzyme inhibition is mediated by the bradykinin B(2) receptor pathway. *Circ Res.* 2001 Oct 12;89(8):678-83.
103. Silvestre JS, Lévy BI. The renin-angiotensin system and post-ischemic angiogenesis. *Bull Acad Natl Med.* 2004;188(4):649-59; discussion 659.
104. Simons, M. Angiogenesis: where do we stand now? *Circulation* 111, 1556–1566 (2005)
105. Solomonson LP, Flam BR, Pendleton LC, Goodwin BL, Eichler DC. The caveolar nitric oxide synthase/arginine regeneration system for NO production in endothelial cells. *J Exp Biol.* 2003 Jun;206(Pt 12):2083-7
106. Spinetti G, Fortunato O, Cordella D, Portararo P, Kränkel N, Katare R, Sala-Newby GB, Richer C, Vincent MP, Alhenc-Gelas F, Tonolo G, Cherchi S, Emanuelli C, Madeddu P. Tissue kallikrein is essential for invasive capacity of circulating proangiogenic cells. *Circ Res.* 2011 Feb 4;108(3):284-93. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.236786. Epub 2010 Dec 16.
107. Stehouwer CD, Clement D, Davidson C, Diehm C, Elte JW, Lambert M *et al.* Peripheral arterial disease: a growing problem for the internist. *Eur J Intern Med* 2009.
108. Stewart JM, Ferreira SH, Greene LJ. Bradykinin potentiating peptide PCA-Lys-Trp-Ala-Pro: an inhibitor of the pulmonary inactivation of bradykinin and conversion of angiotensin I to II. *Biochem Pharmacol* 1971;20:1557–67.

109. Surovi Hazarika, Ayotunde O. Dokun, Yongjun Li, Aleksander S. Popel, Christopher D. Kontos,* Brian H. Annex. Impaired Angiogenesis After Hindlimb Ischemia in Type 2 Diabetes Mellitus Differential Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1 and Soluble Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1
110. Swift MR, Weinstein BM: Arterial-venous specification during development. *Circ Res.* 2009 Mar 13;104(5):576-88
111. Thompson WD, Li WW, Maragoudakis M. The clinical manipulation of angiogenesis: pathology, side-effects, surprises, and opportunities with novel human therapies. *J Pathol.* 2000;190:330-7.
112. Troidl K, Tribulova S, et al. Effects of endogenous NO and of DETA NONOate in Arteriogenesis. *J Cardiovasc Pharmacol* 2010; 55(2): 153–160.
113. Tronc F, Wassef M, Esposito B, Henrion D, Glagov S, and Tedgui A. Role of NO in flow-induced remodeling of the rabbit common carotid artery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16: 1256–1262, 1996.
114. Vane JR. The history of inhibitors of angiotensin converting enzyme. *J Physiol Pharmacol.* 1999 Dec;50(4):489-9
115. Wahlberg E. Angiogenesis and arteriogenesis in limb ischemia. *J Vasc Surg.* 2003 Jul.
116. Zelanis A, Tashima AK, Rocha MM, Furtado MF, Camargo AC, Ho PL, Serrano SM. Analysis of the ontogenetic variation in the venom proteome/peptidome of *Bothrops jararaca* reveals different strategies to deal with prey. *J Proteome Res.* 2010 May 7;9(5):2278-91. doi: 10.1021/pr901027r.
117. Ziche M and Lucia Morbidelli. Nitric oxide and angiogenesis. *Journal of Neuro-Oncology* 50: 139–148, 2000.
118. Ziche M, Morbidelli L, Choudhuri R, Zhang HT, Donnini S, Granger HJ, and Bicknell R. Nitric oxide synthase lies downstream from vascular

endothelial growth factor-induced but not basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis. *J Clin Invest* 99: 2625–2634, 1997.

ANEXOS

A?



B?

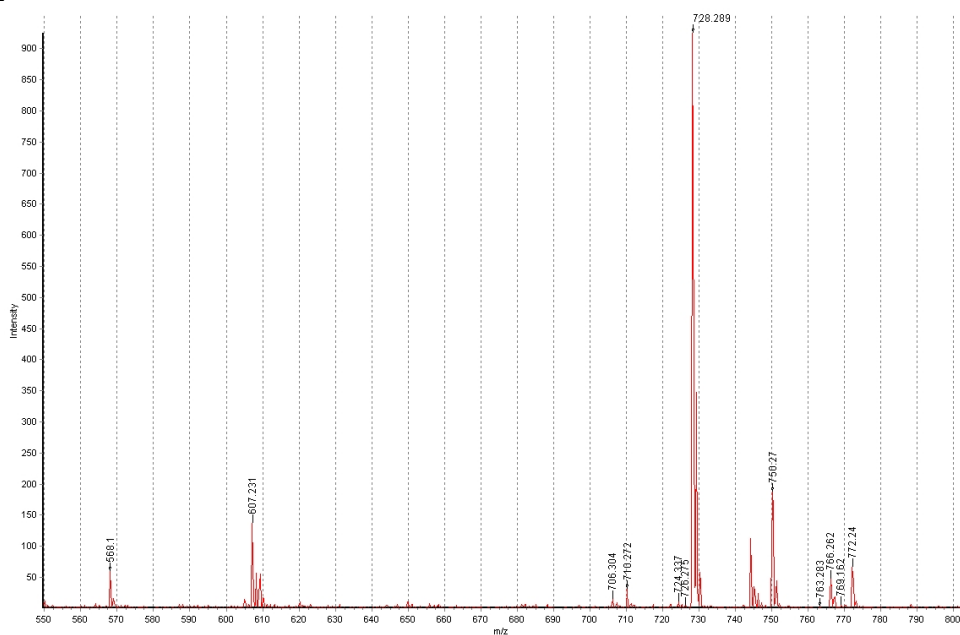
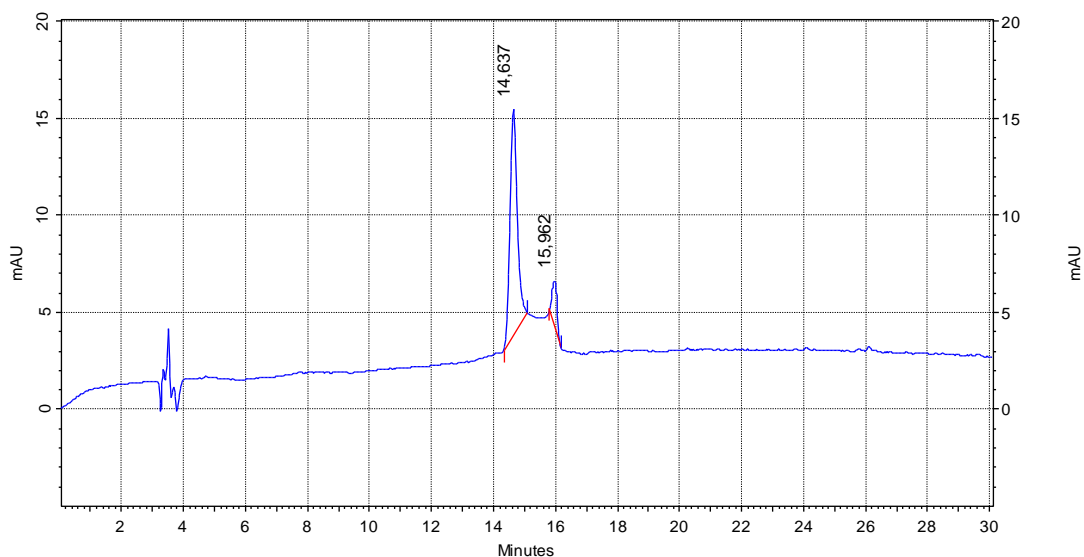


Figura 1 – Caracterização do peptídeo sintético *Bj*-PRO-7a. A: Perfil cromatográfico. O pico de eluição majoritário com tempo de retenção de 11,686 min, seguido de segundo pico com partes sobrepostas é comum para peptídeos que contém várias prolínas, não caracterizando impureza ou degradação. **B: Análise por espectrometria de massa.** A pureza do peptídeo foi confirmada através onde foi observado sinal intenso no valor de m/z correspondente ao *Bj*-PRO-7a de 705Da + 23Da (MM + Na⁺). Outros sinais de menor intensidade também foram detectados na leitura do padrão.

A



B

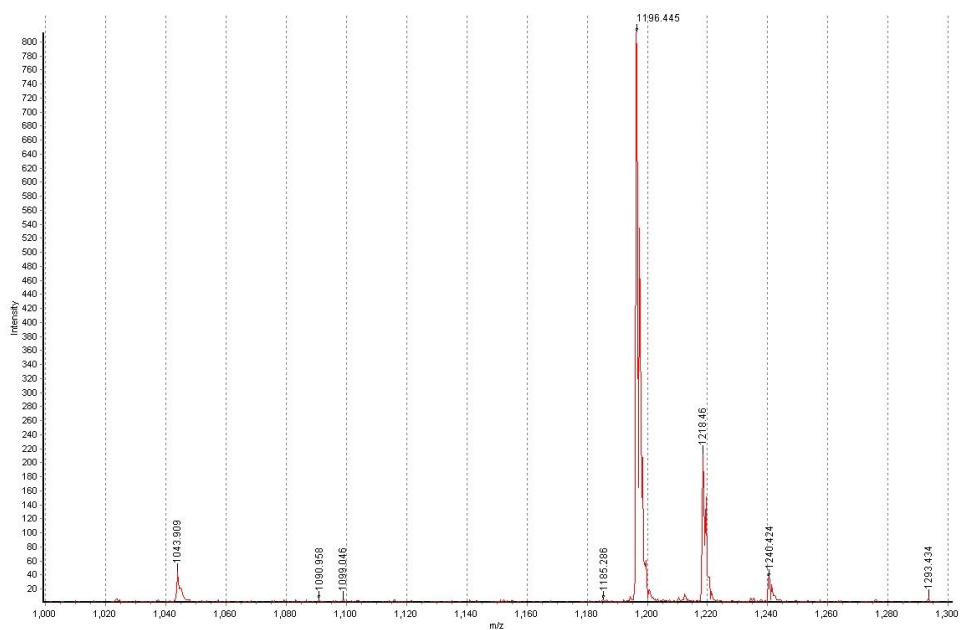


Figura 2 – Caracterização do peptídeo sintético *Bj*-PRO-10c. A: Perfil cromatográfico. O pico de eluição majoritário com tempo de retenção de 14,637 min, seguido de segundo pico sobreposto de retenção de 15,962 min é comum para peptídeos que contém várias prolínas, não caracterizando impureza ou degradação. **B: Análise por espectrometria de massa.** A pureza do peptídeo foi confirmada através onde foi observado sinal intenso no valor de m/z correspondente ao *Bj*-PRO-10c de 1196Da (MM). Outros sinais de menor intensidade também foram detectados na leitura do padrão.

