UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA

Deisy Yurley Rodríguez Sarmiento

Desenho, síntese e caracterização de novos análogos de Bradicinina

RIBEIRÃO PRETO – SP

2017

Deisy Yurley Rodríguez Sarmiento

Desenho, síntese e caracterização de novos análogos de Bradicinina

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Bioquímica

Orientador: Prof. Dr. Claudio Miguel da Costa-Neto

Co-orientador: Dr. Lucas T. Parreiras e Silva

RIBEIRÃO PRETO – SP

2017

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Rodríguez S., Deisy Yurley

Desenho, síntese e caracterização de novos análogos de Bradicinina. Ribeirão Preto, 2017.

XX p.: il., 30 cm.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção de título de Doutor em Ciências. Área de concentração: Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Claudio Miguel da Costa-Neto
Co-orientador: Dr. Lucas T. Parreiras e Silva

1. Análogos de BK. 2. Receptor B2. 3. Sinalização 4. Agonismo tendencioso

Nome: Rodríguez S., Deisy Yurley

Título: Desenho, síntese e caracterização de novos análogos de Bradicinina.

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de Doutor em
Ciências.

Área de concentração: Bioquímica

Aprovado em: ____ / ____ / ____

BANCA EXAMINADORA

Prof.	Dr.	_____	Instituição:

Julgamento:	_____	Assinatura:

Prof.	Dr.	_____	Instituição:

Julgamento:	_____	Assinatura:

Prof.	Dr.	_____	Instituição:

Julgamento:	_____	Assinatura:

Prof.	Dr.	_____	Instituição:

Julgamento:	_____	Assinatura:

Prof.	Dr.	_____	Instituição:

Julgamento:	_____	Assinatura:

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por estar sempre ao meu lado, mostrando suas bênçãos na minha vida de maneira constante.

Ao meu pai Humberto que me fez prometer para ele que nunca ia parar de estudar e ser uma excelente pessoa e profissional.

À minha mãe Yolanda, que é minha maior motivação para ser sempre o orgulho dela.

Ao meu namorado Sergio, quem sempre esteve ao outro lado do telefone pronto para me escutar e me aconselhar quando precisei.

Ao meu orientador Prof. Dr. Claudio Miguel da Costa-Neto pela oportunidade e os grandes ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Eduardo Brandt de Oliveira pelas discussões científicas e por compartilhar sua sabedoria.

Ao meu co-orientador Dr. Lucas T. Parreiras e Silva, por sua ajuda geral no desenvolvimento deste projeto e por sua amizade.

A todos os técnicos e funcionários do Departamento de Bioquímica e Imunologia, em especial as técnicas Lúcia e Cacilda pela organização do laboratório e auxílio nos experimentos.

Aos companheiros de laboratório: Andrea, André, Diego, Larissa, Ligia e Sarah, pelas discussões, auxílio nos experimentos e amizade.

Aos meus grandes amigos da Colômbia que mesmo na distancia, sempre encontrei em eles o apoio para seguir adiante. Em especial a Adriana que todos os dias estava disponível para me escutar e fazer meus dias felizes.

À FAPESP, CNPq, FAEPA e a CAPES por apoiar financeiramente a realização deste trabalho.

RESUMO

Rodríguez S., D. Y. **Desenho, síntese e caracterização de novos análogos de Bradicinina.** XX Folhas. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Receptores acoplados a proteína G (GPCRs) são proteínas integrais de membrana caracterizados por possuírem sete α -hélices transmembranares e por isso também são chamados de receptores 7TM. Esta superfamília de receptores medeia um grande número de processos fisiológicos e é alvo para aproximadamente 40% de todas as drogas no mercado. O receptor de Bradicinina de tipo 2 (B_2) é o principal mediador do sistema Caliceína-Cinina e é classicamente ativado pelo nonapeptídeo Bradicinina (BK). Trabalhos recentes descreveram agonistas para diferentes GPCRs, que podem ativar seletivamente (ou pelo menos preferencialmente) vias de sinalização dependentes de proteína G ou do acoplamento de β -arrestina, sendo este fenômeno denominado agonismo tendencioso (do inglês “biased agonism”). Neste trabalho estão sendo desenhados e sintetizados uma série de análogos com o objetivo de produzir novos ligantes com distintas propriedades bioquímicas e farmacológicas. Alguns destes análogos já sintetizados apresentaram características interessantes nos perfis de ativação. Estes análogos devem ser utilizados como modelos para a síntese e caracterização de novas gerações de análogos com potenciais propriedades de agonismo tendencioso. Nos acreditamos que o desenho de novos agonistas tendenciosos pode levar ao desenvolvimentos de uma nova geração de drogas, seletivas para ativação não somente de um subtipo de receptor, mas também de uma via de sinalização específica.

Palavras-chave: Análogos de BK. Receptor B_2 . Sinalização. Agonismo tendencioso.

ABSTRACT

Rodríguez S., D. Y. **Design, synthesis and characterization of novel analogs of Bradykinin.** XX Pages. Thesis (Doctoral Program) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

G-protein coupled receptors (GPCRs) are integral membrane proteins characterized by bearing seven transmembrane α -helices, and are therefore also known as 7TM receptors. This receptor superfamily mediates a large number of physiological processes and is subject to approximately 40% of all drugs on the market. The type 2 Bradykinin receptor (B_2) is the primary mediator of the Kallikrein-Kinin System and is classically activated by the nonapeptide Bradykinin (BK). Recent studies have described different GPCRs agonists which can selectively activate (or at least preferably) dependent signaling pathways of G protein or β -arrestin coupling, this phenomenon is called biased agonism. This work are based in design and synthesize a series of analogs with the goal of producing new ligands with different biochemical and pharmacological properties. Some of these synthesized analogs have presented interesting characteristics in activation profiles. These analogs should be used as templates for the synthesis and characterization of novel analogs with properties of biased agonism. We believe that the design of novel agonists can lead to development of a new generation of drugs, not only selective for activation of a receptor subtype but also a specific signaling pathway.

Keywords: Bradykinin analogs. B_2 receptor. Signaling. Biased Agonism.

LISTA DE ABREVIATURAS

7TM - Sete hélices transmembranares

Akt - Proteína quinase B

AngII - Angiotensina II

AT1 - Receptor de angiotensina tipo 1

BK – Bradicinina

B₁ – Receptor de bradicinina tipo 1

B₂ – Receptor de bradicinina tipo 2

Ca²⁺ - Cálcio

cAMP - Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico

CHO - “Chinese hamster ovary”

DABK – Des-Arg⁹-BK

DAG - 1,2-diacilglicerol

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DMEN - “Dubelcco’s modifeid Eagles’s medium”

EC - Extracelular

EC₅₀ - Concentração de agonista na qual se obtém 50% da ativação máxima

ECA - Enzima conversora de angiotensina

E_{máx} - Resposta máxima

ERK - Quinase regulada por sinal extracelular

F_c - do inglês “Factor of change”

F-moc - 9-fluorenilmetoxicarbonilo

GDP - Guanosina difosfato

GPCR - Receptor acoplado à proteína G

GRK - Quinase de receptores acoplados à proteína G

GTP - Guanosina trifosfato

HEK293T - "Human Embryonic Kidney"

HPLC - Cromatografia líquida de alta pressão

IC - Intracelular

IC₅₀ - Concentração de ligante na qual se obtém 50% de inibição da resposta máxima inicial

IP₃ – Inositol-1,4,5-trifosfato

MAPK - Proteína quinase ativada por mitógeno

PIP₂ - Fosfatidil 4,5-bisfosfato

PKA - Proteína quinase A

PKC - Proteína quinase C

RFU - Unidade relativa de fluorescência

SFB - Soro fetal bovino

SRA - Sistema renina-angiotensina

TM - Transmembrana

Tris - Tris-(hidroximetil)-aminoetano

SUMARIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1 Sinalização e regulação de GPCRs ou receptores 7TM	13
1.2 Sistema Calicreínas-Cininas	17
1.3 Classificação farmacológica dos receptores de cininas B ₁ e B ₂	21
1.3.1 Agonistas peptídicos	21
1.3.2 Antagonistas peptídicos	24
1.3.3 Ligantes não peptídicos.....	25
1.4 Aspectos estruturais dos receptores de cininas	26
1.4.1 Modificações pós-traducionais nos receptores de cininas.....	28
1.4.2 Sítios de ligação de agonistas e antagonistas nos receptores de cininas	29
1.5 Aspectos moleculares e celulares da sinalização dos receptores de cininas.....	30
1.5.1 Mecanismos de ativação do receptor dependentes ou independentes de agonista. 30	
1.5.2 Vias de sinalização celular mediadas pelos receptores B ₁ e B ₂	31
1.5.4 Oligomerização dos receptores B ₁ e B ₂	33
1.5.5 Dessensibilização dos receptores B ₁ e B ₂	34
1.6 Agonismo tendencioso.....	35
1.6.1 β -arrestinas.....	36
1.6.2. Agonismo tendencioso no receptor B ₂	37
2. OBJETIVOS	39
2.1 Objetivo geral	39
2.2 Objetivos específicos	39
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
3.1 Desenho dos análogos de BK	40
3.3 Síntese química em fase sólida.....	44
3.4 Cromatografia líquida de alta eficiência - HPLC	45
3.5 Análise de Aminoácidos	45
3.5.1 Hidrólise Ácida dos Peptídeos.....	45
3.5.2. Determinação da Composição de Aminoácidos.....	46
3.6 Cultura e transfeção de células HEK293T	46
3.7 Ensaios de “Binding” com células inteiras	47

3.8 Avaliação da ativação do receptor através de BRET (transferência de energia por ressonância de bioluminescência).....	48
3.8.1 Análise da ativação de proteína G_q e G_{i3} através de BRET	49
3.8.2 Análise do recrutamento de β -arrestinas através de BRET	50
3.9. Cálculo do agonismo tendencioso	52
4. RESULTADOS	54
4.1 Desenho e síntese dos análogos de Bradicinina.....	54
4.2 Caracterização química e purificação dos peptídeos sintetizados	54
4.3 Primeira geração de peptídeos.....	56
4.4 Segunda geração de peptídeos	61
4.5 Terceira geração de análogos	76
4.6 Avaliação da atividade antagonística dos análogos.....	84
4.6 Cálculo do fator de tendência (do Inglês, Bias Factor)	85
5. DISCUSSÃO.....	90
6. CONCLUSÕES	96
7. REFERÊNCIAS.....	97
8. ANEXOS.....	106
8.1 Cromatogramas e espectros obtidos na caracterização dos análogos sintetizados .	106
8.2 Valores de $\Delta\text{LogT}/K_a$ e $\Delta\Delta\text{LogT}/K_a$ para cada um dos análogos respeito a BK em cada uma das vias avaliadas.....	117

1. INTRODUÇÃO

1.1 Sinalização e regulação de GPCRs ou receptores 7TM

Os receptores acoplados à proteína G são caracterizados por possuírem sete domínios transmembranares (TM I – TM VII) com estruturas alfa-helicoidais interligados por três alças extracelulares (EC-1, EC-2 e EC-3) e três intracelulares (IC-1, IC-2 e IC3). Devido às sete alfa-hélices transmembranares, são também chamados de receptores 7TM. Os GPCRs podem mediar a resposta celular após a ligação de uma imensa diversidade de moléculas sinalizadoras como lipídeos, neurotransmissores, peptídeos vasoativos e muitos outros (Rosenbaum *et al.*, 2009). Já foram identificados mais de 800 genes no genoma humano que codificam GPCRs, representando cerca de 2% do total de genes (Foord *et al.*, 2005). Além disso, aproximadamente 40% das drogas comercializadas atualmente possuem como alvo GPCRs (Lagerstrom e Schioth, 2008; Rask-Andersen *et al.*, 2011).

Os GPCRs em vertebrados podem ser divididos em cinco famílias baseando-se na similaridade da sequência de aminoácidos e da estrutura: Rodopsina (Família A), Secretina (Família B), Glutamato (Família C), adesão e “Frizzled/Taste2” (Fredriksson *et al.*, 2003). A família da rodopsina, na qual se encontram os receptores do sistema caliceínas-cininas (SCC), é a maior e mais diversificada dessas famílias e por isso é subdividida em grupos, de acordo com o tipo de ligante (Joost e Methner, 2002).

A sinalização canônica mediada pelos GPCRs envolve a participação da proteína G, uma proteína heterotrimérica composta das subunidades α , β e γ . Esta proteína é encontrada ancorada na face citoplasmática da membrana

celular, e no seu estado inativo, uma molécula de guanosina difosfato (GDP) está ligada à subunidade α . Quando um GPCR é ativado, este receptor sofre uma mudança conformacional que então induz uma mudança de conformação da subunidade α a qual troca GDP por guanosina trifosfato (GTP). Essa troca ativa a subunidade α que se separa das subunidades β e γ e interage com proteínas efetoras intracelulares (Figura 1A). A subunidade α da proteína G possui uma atividade GTPásica intrínseca, sendo capaz de hidrolisar o GTP formando GDP, fazendo com que as três subunidades se reassociem e retornem ao estado inativo (Morris e Malbon, 1999; Maudsley *et al.*, 2005).

A classificação de proteína G é realizada de acordo com o tipo de sua subunidade α . Sendo assim, existem quatro classes principais de proteína G: **G_s** (G_s, G_{olf}), **G_i** (G_{i1}, G_{i2}, G_{i3}, G_o, G_{t-rod}, G_{t-cone}, G_{gust} e G_z), **G_{12/13}** (G₁₂, G₁₃) e **G_q** (G_q, G₁₁, G₁₄, G₁₆) (Mccudden *et al.*, 2005). De maneira resumida, proteínas G_s ativam a adenilato ciclase que catalisa a formação de cAMP (adenosina 3',5'-monofosfato cíclico) e este, por sua vez, ativa a proteína quinase A (PKA) que fosforila proteínas-alvo. As proteínas G_i atuam inibindo adenilato ciclase e podem participar da ativação de canais de potássio e da inibição de canais de cálcio (Ca²⁺) dependentes de voltagem. Proteínas G_{12/13} medeiam o estímulo da GTPase pequenas do tipo Rho, e proteínas G_q ativam a fosfolipase C- β que hidrolisa o fosfolípido de membrana fosfatidil 4,5-bisfosfato (PIP₂) resultando na formação dos segundos mensageiros inositol 1,4,5-trisfosfato (IP₃) e 1,2-diacilglicerol (DAG). O IP₃ se liga a receptores de IP₃ no retículo endoplasmático promovendo a liberação de Ca²⁺, o que acarreta no aumento da concentração citosólica deste íon. O DAG é responsável pela ativação da

proteína quinase C (PKC) ,que também é ativada por Ca^{2+} e que é capaz de fosforilar diversas proteínas-alvo importantes nas respostas fisiológicas.

Figura 1. Regulação de proteínas G, GRKs e β -arrestinas mediada por GPCRs. A) Ativação clássica de proteína G por um GPCR. A subunidade α se dissocia das subunidades β e γ e ativa efetores intracelulares. B) Fosforilação do GPCR mediada por GRKs levando ao recrutamento de β -arrestina. C) β -arrestina medeia a internalização do receptor e ancora quinases como s-Src, ERK1/2 e AKT mediando a sinalização de GPCRs de forma independente da proteína G. (Adaptado de Shukla et al., 2011).

Como um receptor ativado pode sequencialmente acoplar múltiplas proteínas G, as células criaram mecanismos de dessensibilização para

desativar a sinalização dependente de proteína G, evitando efeitos deletérios de uma sinalização sustentada (Benovic *et al.*, 1989; Shukla *et al.*, 2011). A dessensibilização de GPCRs ocorre por um processo de duas etapas (Figura 1B). Na primeira etapa, receptores ligados a agonistas são fosforilados por quinases de GPCRs (GRKs), principalmente em sítios localizados na porção C-terminal dos receptores, mas também nas alças intracelulares (Pitcher *et al.*, 1999). As GRKs (GRK1 a GRK7) fazem parte de uma família de quinases que fosforilam resíduos de serina e treonina (Benovic *et al.*, 1989). GPCRs ativados também são fosforilados por proteínas quinases dependentes de segundos mensageiros como PKA e PKC que também contribuem para a dessensibilização do receptor (Lefkowitz *et al.*, 1990).

A segunda etapa de dessensibilização envolve o recrutamento de proteínas chamadas de arrestinas que interagem com os receptores fosforilados pelas GRKs e impedem estericamente o acoplamento da proteína G com o receptor, impedindo a ativação de proteína G (Lefkowitz, 1998). Existem quatro membros na família das arrestinas, duas expressas exclusivamente nos bastonetes e cones da retina (arrestina 1 e arrestina 4) e duas ubiquamente expressas (arrestina 2 e arrestina 3; também conhecidas como β -arrestina 1 e β -arrestina 2 respectivamente) (Barki-Harrington e Rockman, 2008; Shukla *et al.*, 2011). As β -arrestinas atuam também na internalização do receptor funcionando como proteína adaptadora para vários componentes chaves da maquinaria endocítica (McDonald e Lefkowitz, 2001) (Figura 1C). Entre esses componentes estão a clatrina, a proteína adaptadora AP-2, o fator 6 de ribosilação do ADP (ARF6) e a proteína de fusão sensível à N-etilmaleimida (NSF). Dependendo da estabilidade da interação entre o

receptor internalizado e a β -arrestina, os receptores podem ser classificados como: receptores classe A, onde a interação β -arrestina-receptor é transiente e o receptor é rapidamente reciclado; e receptores classe B onde a interação é significativamente mais estável e a reciclagem é mais lenta. Também existe receptores chamados classe C no qual o receptor é internalizado junto com β -arrestina, porém sendo o complexo mais instável que os receptores classe B (Oakley *et al.*, 2000; Zimmerman *et al.*, 2011). Além do papel das β -arrestinas na dessensibilização e internalização do receptor, durante a última década foi descoberto que β -arrestinas podem ancorar proteínas como c-Src, quinase regulada por sinal extracelular (ERK) e proteína quinase B (AKT), mediando a sinalização de GPCRs de forma independente de proteína G (Figura 1C) (Shukla *et al.*, 2011).

1.2 Sistema Calicreínas-Cininas

O sistema calicreínas-cininas (SCC) tem principalmente quatro componentes: cininogênios precursores, calicreínas (enzimas proteolíticas), as cininas (as quais são produzidas pela clivagem de cininogênios pelas calicreínas) e dois receptores acoplados a proteína G, nomeados B₁ e B₂, que medeiam os efeitos biológicos das cininas (Figura 2).

Figura 2. Representação esquemática do sistema Caliceínas-Cininas. Os receptores B1 e B2 são parte do sistema caliceínas-cininas. As enzimas caliceínas clivam os cininogênios plasmático ou tecidual para gerar as correspondentes cininas, ou seja, Bradicinina e Calidina, que são os ligantes endógenos do receptor B₂. As enzimas CPM e CPN clivam estas cininas gerando suas correspondentes des-Arg⁹-BK e des-Arg¹⁰-KD que são os ligantes endógenos para o receptor B₁. CA, Cininogenio de alto peso molecular; CB, Cininogenio de baixo peso molecular; CP, Caliceína plasmática; CT, Caliceína tecidual; CPM, Carboxipeptidase M; CPN, Carboxipeptidase N. (Adaptado de Marceau and Regoli, 2004).

A história do SCC começa no ano de 1930, quando Werle e Frey descreveram a Caliceína, uma enzima produtora de cininas descoberta no pâncreas (Kraut et al., 1930), e identificaram as ações biológicas da Lys-Bradicinina (Lys-BK) e depois chamada Calidina (KD) (Werle e Grunz, 1939). Na década dos anos 40 foi identificada a Bradicinina por Rocha e Silva e seus

colaboradores (Rocha e Silva et al., 1949). Ao final dos anos 50, a bradicinina foi isolada em quantidade significativa do plasma (Elliott et al., 1959) e finalmente sua estrutura primária foi elucidada. (Boissonnas et al., 1960, Elliott et al., 1960). Além disso, a bradicinina foi o primeiro peptídeo biologicamente ativo a ser sintetizado na nova metodologia de síntese de peptídeos em fase sólida (Merrifield, 1964). Nos anos 60, diversos derivados de cininas foram sintetizados e estudados para analisar seus efeitos biológicos em ensaios *in vitro* e *in vivo*.

Em 1970, Regoli et al. definiram os primeiros pontos de referência na caracterização molecular dos receptores de cininas apontando à existência de dois tipos de receptores de cininas, B₁ e B₂, os quais diferem em seus perfis farmacológicos (Tabela 1) (Regoli *et al.*, 1977; Drouin *et al.*, 1979). A busca dos receptores de cininas terminou em 1990 com a clonagem do cDNA do receptor B₂ de rato feito por Jarnagin e colaboradores (Mceachern *et al.*, 1991). Já em 1994, Menke e colaboradores conseguiram a clonagem do receptor B₁. (Menke *et al.*, 1994).

Tabela 1. Nomenclatura dos receptores B1 e B2 de humanos

Nome IUPHAR*	B₁	B₂
Código IUPHAR	2.1:BK:1:B1:HUMAN:00	2.1:BK:2:B2:HUMAN:00
Composição		
Aminoácidos	353	391
Gene/Cromossomo	BDKBR1/14q32.2	BDKBR2/14q32.2
Agonista Seletivo	DAKD	BK
Antagonista Seletivo	DALBK	HOE140 (Icatibant)
Proteína G acoplada	G _q /G _i	G _q /G _i
Expressão	Induzida	Constitutiva
Sinalização	Dessensibilização limitada	Dessensibilização extensiva

*União Internacional de Farmacologia.

Os receptores B_1 e B_2 desempenham um papel importante em muitos processos fisiológicos e patológicos incluindo nocicepção, inflamação e enfermidades cardiovasculares e renais (McClean *et al.*, 2000; Emanuelli e Madeddu, 2001; Calixto *et al.*, 2004; Leeb-Lundberg *et al.*, 2005; Riad *et al.*, 2007). Por exemplo, camundongos *knockout* para B_2 sofrem de hipertensão e aumentos exagerados de pressão arterial induzidos pela Angiotensina II (Ang II) (Madeddu *et al.*, 1997). Além disso, tais camundongos também desenvolvem insuficiência cardíaca relacionada à idade e ao remodelamento do ventrículo esquerdo (Emanuelli *et al.*, 1999). A sinalização mediada pelo receptor B_1 reduziu a pressão arterial em camundongos *knockout* para B_2 , embora os camundongos *knockout* para B_1 não apresentaram alterações na pressão arterial (Kintsurashvili *et al.*, 2001). Em camundongos *knockout* para B_2 , a nefropatia diabética foi mostrada estar aumentada (Kakoki *et al.*, 2004) e o dano renal devido à isquemia/reperfusão foi mais grave em camundongos *knockout* para ambos receptores, B_1 e B_2 , em comparação aos camundongos selvagens (Kakoki *et al.*, 2007). Todos estes dados mostram efeitos benéficos para os receptores B_1 e B_2 de cininas nos sistemas cardiovascular e renal. Em contraste a isso, a ativação exacerbada de B_1 e B_2 pode levar a efeitos prejudiciais como dor e inflamação. Os receptores B_1 e B_2 foram descritos como envolvidos em nocicepção uma vez que a BK induz hiperalgésica térmica em camundongos *knockout* para B_1 e DABK (agonista seletivo para o receptor B_1) induz hiperalgésica em camundongo *knockout* para B_2 .

Além disso, BK injetada em tecidos humanos ou de animais gera os quatro sinais típicos dos processos inflamatórios: rubor, calor, inchaço e dor. A ação das cininas nas células alvo pode ser explicada assim: o rubor e o calor

são determinados por vasodilatação local dependente de endotélio. A estimulação de células endoteliais também oferece um aumento da permeabilidade vascular a qual contribui à exsudação de um fluido rico em proteínas da circulação (inchaço). Neurônios aferentes não mielinados possuem receptores de cininas, o que explica a habilidade deste peptídeo em produzir dor e ativar respostas reflexas pelo sistema nervoso central (Marceau e Regoli, 2004).

A maioria dos efeitos vasculares dos peptídeos tipo BK são determinados pela estimulação de células endoteliais nas quais segundos mensageiros são produzidos após ativação dos receptores de cininas que, por serem acoplados à proteína G_q , levam ao aumento dos níveis intracelulares de Ca^{2+} . BK induz liberação de óxido nítrico (NO) das células endoteliais, junto com um aumento de GMPc nas células de músculo liso vascular. Prostaglandina I_2 (Prostaciclina) é outro mediador secundário que é liberado do endotélio como resultado da ação das cininas o qual determina a produção de AMPc em células de músculo liso. Outro mecanismo de vasodilatação dependente de endotélio se dá pela hiperpolarização das células de músculo liso, sendo este o principal mecanismo envolvido na relaxação induzida por BK de arteríolas coronárias humanas isoladas (Batenburg *et al.*, 2004).

1.3 Classificação farmacológica dos receptores de cininas B_1 e B_2

1.3.1 Agonistas peptídicos

Centenas de análogos peptídicos de cininas têm sido sintetizados e farmacologicamente avaliados. Cininogênios são definidos como proteínas circulantes que contêm BK (RPPGFSPFR) na sua sequência (Figura 2). Após clivagem do cininogênio para produção de BK ou calidina (KD), e subsequente clivagem da para remoção do resíduo Arg C-terminal (des-Arg⁹), os peptídeos gerados agem respectivamente como os ligantes naturais dos dois tipos de receptores humanos de cininas, B₁ e B₂ (Tabela 2). As cininas “nativas” (as que são produzidas pelas calicreínas plasmática e tecidual), ou seja BK e Lys-BK, possuem alta afinidade pelo receptor B₂. Além disso, o determinante estrutural mais importante para a alta afinidade de cininas nos receptores B₁ de mamíferos é a remoção do resíduo Arg do C-terminal, o qual é fundamental para a ligação desses peptídeos no receptor B₂. O receptor B₁ é responsável pela resposta a diferentes metabólitos de cininas, tais como, des-Arg⁹-BK ou Lys-des-Arg⁹-BK, os quais são gerados por arginina-carboxipeptidases como as Carboxipeptidase M e N. Outras cininas formadas, como des-Arg¹-BK (gerada pela aminopeptidase P) ou des(Phe⁸, Arg⁹)-BK (primeiro metabolito formado pela cininase II ou pela enzima convertidora de angiotensina, ECA), não mantêm atividade farmacológica significativa em nenhum dos dois tipos de receptores de cininas (Regoli e Barabé, 1980). Em sistemas biológicos é importante ressaltar que a presença de arginina-carboxipeptidases frequentemente pode alterar a potência estimada da BK ou Lys-BK no receptor B₂, já que esses ligantes são transformados em seus correspondentes des-Arg⁹ metabólitos e levar à ativação do receptor B₁ (Leeb-Lundberg *et al.*, 2005)

Além disso, têm sido estudados muitos análogos de BK para avaliar a importância de cada um dos resíduos presentes. Por exemplo, quando foi

usado L-Ala para substituir Gly⁴ ou Pro⁷ na sequência de BK, houve uma redução drástica da atividade do ligante, sugerindo que a conformação geral deste peptídeo é chave para a interação ligante-receptor (Regoli e Barabe, 1980). Também foi avaliada a importância do caráter aromático nas posições 5 e 8 que na BK estão ocupadas por resíduos de Phe. Testando uma série de análogos modificados nestas posições, Regoli e colaboradores (Regoli e Barabe, 1980) chegaram às seguintes conclusões: a) Compostos contendo resíduos aromáticos [D-Phe, Tyr, Trp, Tyr(Me)] e alifáticos (Cha, Leu) nas posições 5 ou 8 se comportam como agonistas totais, sendo então proposto que Phe⁵ e Phe⁸ estão principalmente envolvidos na ligação da BK ao receptor e que a aromaticidade destes resíduos não é fundamental para a ativação do receptor. Além disso, todos os análogos nos quais foram modificados a posição 5 tiveram uma redução na afinidade, porém mantiveram a atividade, o que sugere que este resíduo está principalmente envolvido na ligação com o receptor. Na posição 8 foi visto que o receptor aceita um grupo de maior tamanho e com uma lipofilicidade maior, como o Tyr(Me), já que o análogo Tyr(Me)⁸-BK teve um aumento na afinidade pelo receptor em comparação à BK. Além das posições 5 e 8, em 2012, Zhang e colaboradores (Zhang *et al.*, 2012) modificaram a BK na posição 9 colocando um resíduo de Lys, reduzindo assim o caráter básico próprio de Arg nativa, o resultado obtido com esta mudança foi a primeira evidência do agonismo tendencioso nos receptores de cininas já que o análogo Lys⁹-BK resultou em ativação tendenciosa da proteína G_q em relação à β -arrestina. A diferença na ativação de Lys⁹-BK em relação a BK pode ser devido a diferenças nas cadeias laterais de Lys e Arg, já que Lys

possui uma cadeia mais flexível permitindo talvez alcançar lugares diferentes no receptor e assim, levar a respostas diferentes.

1.3.2 Antagonistas peptídicos

Os primeiros compostos desenhados para antagonizar o receptor B₁ foram des-Arg⁹-Leu⁸-BK e Lys-des-Arg⁹-Leu⁸-BK e são os peptídeos usados até hoje com o melhor potencial antagonístico (Regoli *et al.*, 1998) (Tabela 2).

Tabela 2. Nome, função e sequência dos principais ligantes do sistema caliceínas-cininas

Nome	Função	Sequência									
Bradicinina – BK	Agonista B ₂		Arg	Pro	Pro	Gly	Phe	Ser	Pro	Phe	Arg
Calidina – KD	Agonista B ₂	Lys	Arg	Pro	Pro	Gly	Phe	Ser	Pro	Phe	Arg
des-Arg ⁹ -BK	Agonista B ₁		Arg	Pro	Pro	Gly	Phe	Ser	Pro	Phe	
des-Arg ⁹ - KD	Agonista B ₁	Lys	Arg	Pro	Pro	Gly	Phe	Ser	Pro	Phe	
[Leu ⁸]des-Arg ⁹ -BK	Antagonista B ₁		Arg	Pro	Pro	Gly	Phe	Ser	Pro	Leu	
Icatibant (HOE-140)	Antagonista B ₂	D-Arg	Arg	Pro	Hyp	Gly	Thi	Ser	D-Tic	Oic	Arg

O receptor B₂ não foi bem caracterizado até 1985, quando a primeira geração de antagonistas baseados em [D-Phe⁷-BK] foi produzida (Vavrek e Stewart, 1985). Nestes tipos de compostos, a transição entre antagonista/agonista parcial foi causada pela rigidez estrutural inserida no *backbone* do peptídeo pela presença da conformação não natural do D-Phe⁷. O análogo D-Phe⁷-BK é um antagonista fraco no receptor B₂ de cobaia (Vavrek e Stewart, 1985) e coelho (Rhaleb *et al.*, 1991). A potência foi aumentada pela adição de um resíduo de D-Arg na posição N-terminal e a substituição da Pro³ por Hyp (Vavrek e Stewart, 1985) uma vez que o análogo Hyp³-BK era um conhecido análogo mais potente que a BK (Maier *et al.*, 1988). Também foram desenvolvidos os análogos D-Arg-[Hyp³, D-Phe⁷]BK e D-Arg-[Hyp³, Thi^{5,8}, D-

Phe⁷]BK, no qual os dois resíduos de Phe nas posições 5 e 8 foram substituídos por um aminoácido não natural, para conferir uma possível resistência à degradação. No análogo D-Arg[Hyp³, D-Phe⁷, Leu⁸]BK (Rhaleb *et al.*, 1991) o resíduo Phe⁸ foi substituído por um resíduo de Leu para remover a aromaticidade do C-Terminal, todos estes análogos desenhados foram caracterizados como baixa potência antagonística.

A rigidez adicionada na posição 7 nos antagonistas tipo Icatibant (HOE140, D-Arg-[Hyp³, Thi⁵, D-Tic⁷-Oic⁸]-BK) (Hock *et al.*, 1991), e NPC17731 (D-Arg[Hyp³, D-HypE(trans-propyl)⁷, Oic⁸]-BK) (Trifilieff *et al.*, 1993) mostrou que a orientação espacial da região C-terminal do peptídeo é fundamental para a atividade antagonística. O icatibant apresenta alta afinidade e baixíssima atividade residual na maioria das espécies de mamíferos analisadas e, além disso, apresenta uma grande resistência a peptidases. A combinação destas propriedades contribui a seu prolongado tempo de ação (várias horas) em modelos animais. Este antagonista tem sido amplamente usado para o estudo do papel de cininas em diferentes modelos patofisiológicos animais e, ocasionalmente em humanos (Groves *et al.*, 1995; Akbary *et al.*, 1996; Dear *et al.*, 1996; Gainer *et al.*, 1998; Squire *et al.*, 2000; Witherow *et al.*, 2001; Hornig *et al.*, 2003)

1.3.3 Ligantes não peptídicos

O desenvolvimento de agonistas e antagonistas não peptídicos apresenta uma grande oportunidade para produção de novos fármacos, já que os peptídeos geralmente têm baixa biodisponibilidade oral e penetração

cerebral. Vários laboratórios conduzem atualmente pesquisas para desenvolver este tipo de ligantes para os receptores B₁ e B₂ de cininas. Um exemplo de agonista não-peptídico para o receptor B₂ é o FR190997, o qual foi uma molécula derivada quimicamente do ligante FR173657, o qual por sua vez é um antagonista para o receptor B₂ (Aramori *et al.*, 1997). Outros exemplos de ligantes para os receptores de cininas possuem ligeiras modificações tais como adição ou remoção de grupos metílenos, que podem levar a passar de agonistas a antagonistas ou vice-versa (Altamura *et al.*, 1999; Heitsch, 2002; Sharma e Al-Dhalmawi, 2003).

1.4 Aspectos estruturais dos receptores de cininas

O receptor B₁ possui alta identidade sequencial com o receptor B₂, ambos possuem 3 sítios similares de N-glicosilação nos domínios extracelulares e acilação, possuindo 36% de identidade na sequência de aminoácidos. A principal diferença entre os receptores B₁ e B₂ é a cauda C-terminal, na qual o receptor B₂ possui sítios para fosforilação enquanto o receptor B₁ é carente destes sítios por possuir uma cauda muito menor (Figura 3).

1.4.1 Modificações pós-traducionais nos receptores de cininas

Os receptores de cininas sofrem diferentes modificações pós-traducionais tais como glicosilação e formação de pontes dissulfeto em seus domínios extracelulares. A maioria destas modificações ocorrem de uma maneira independente do ligante, embora os processos de fosforilação e acilação (palmitoilação) pareçam ser majoritariamente mediados pela ativação do receptor (Leeb-Lundberg *et al.*, 2005)

- Glicosilação – Todos os receptores de cininas conhecidos de diferentes espécies apresentam sítios de glicosilação formados pela sequência Asn-Xaa-Ser/Thr (dois a quatro por receptor) nos seus domínios extracelulares. (Figura 3) (Hess *et al.*, 1992).
- Pontes dissulfeto – A estrutura dos receptores de cininas de mamíferos apresenta quatro resíduos de cisteína localizados nos domínios extracelulares EL-1, EL-2 e EL-3 (Figura 3) (Hess *et al.*, 1992).
- Acilação (Palmitoilação) – Os receptores de cininas podem ter resíduos de cisteína nos quais a porção C-terminal fica exposta no citosol (Figura 3). Estas cisteínas podem ser modificadas por palmitoilação, e devido à inserção de uma cadeia de ácido graxo na membrana, uma alça extra é criada regulando importantes aspectos da funcionalidade destes receptores, tais como acoplamento à proteína G, internalização, ressensibilização e/ou tráfego intracelular destes receptores (Hess *et al.*, 1992).

1.4.2 Sítios de ligação de agonistas e antagonistas nos receptores de cininas

Vários métodos têm sido usados para elucidar os sítios de ligação de agonistas ou antagonistas nos receptores B₁ e B₂, como mutações sítio-dirigidas ou utilização de receptores quiméricos, *cross-linking* do complexo receptor-ligante e utilização de anticorpos contra os domínios extracelulares. Estes estudos realizados têm identificado vários resíduos que parecem estar envolvidos na ligação dos ligantes com os receptores B₁ e B₂.

A energia de ligação da BK parece ser fornecida por interações não-iônicas entre a maioria dos resíduos de BK e do receptor, mas também existe a contribuição de interações iônicas provenientes da cadeia lateral dos resíduos de Arg ou do N-terminal. (Regoli e Barabe, 1980; Tancredi *et al.*, 1997). Estudos computacionais, levaram à identificação dos resíduos Asp²⁶⁶ e Asp²⁸⁴ no receptor humano B₂ que se encontram nas hélices 6 e 7 com as quais os resíduos previamente descritos da BK interagem (Kyle *et al.*, 1994).

Abaixo encontra-se uma tabela com os principais sítios de ligação envolvidos na interação com agonista/antagonista nos receptores B₁ e B₂ de cininas.

Tabela 3. Principais sítios de ligação dos receptores B₁ e B₂ de cininas com seus correspondentes agonistas/antagonistas.

Domínio	Receptor B ₂		Receptor B ₁	
	Agonista	Antagonista	Agonista	Antagonista
	BK	HOE140	DAKD	DALKD
N	Cys ²⁰			
TM – I				
TM – II				
EL – II				
TM – III	Ser ¹¹¹	Ser ¹¹¹	Lys ¹¹⁸	Lys ¹¹⁸
TM – IV	Lys ¹⁷²			
EL – III	Sim*			
TM – V				
TM – VI	Phe ²⁵⁹ , Thr ²⁶³			
EC – IV	Cys ²⁷⁷ , Asp ²⁶⁶ ,			Sim*

TM - VII	Asp ²⁸⁴ Gln ²⁸⁸		Tyr ²⁹⁵	Leu ²⁹⁴ , Phe ³⁰²
----------	--	--	--------------------	---

*Domínio importante, mas os resíduos específicos não foram identificados.

1.5 Aspectos moleculares e celulares da sinalização dos receptores de cininas

1.5.1 Mecanismos de ativação do receptor dependentes ou independentes de agonista

Os receptores B₁ e B₂ estão em constante dinâmica entre seus estados conformacionais ativo e inativo. É possível tornar o receptor B₂ constitutivamente ativo mutando-se alguns resíduos nas hélices transmembranares que participam da estabilização da conformação inativa do receptor. A mutação Asp⁷⁸ → Asn (D78N) foi a primeira modificação que revelou o aumento da atividade independente de agonista (Quitterer *et al.*, 1996). As mutações N113A e W256A Ala também levaram a um aumento significativo na atividade independente de agonista. É importante notar que o antagonista Icatibant (HOE140) comportou-se como agonista inverso nestes mutantes do receptor B₂ (Marie *et al.*, 2001). No estado ativo do receptor, o Trp²⁵⁶ interage com Phe²⁵⁹, sendo Phe²⁵⁹ um resíduo chave para a afinidade da BK (Nardone e Hogan, 1994).

Os epitopos chaves para o acoplamento do receptor com a proteína G, e sua correspondente ativação, encontram-se nos domínios intracelulares dos GPCRs. Alguns estudos têm sido feitos para se identificar tais epitopos nos receptores B₁ e B₂. O truncamento do C-terminal do receptor B₂ de humano, de maneira que a Ser³¹⁶ também foi removida diminuiu o acoplamento do receptor com a proteína G, porém sem inibir completamente. Já um truncamento além desse resíduo (Ser³¹⁶) anula completamente a atividade deste receptor, sugerindo que este resíduo é fundamental para manter a estrutura da “hélice 8”

que favorece o acoplamento do receptor com as proteínas sinalizadoras intracelulares (Prado *et al.*, 1997; Kang e Leeb-Lundberg, 2002). Muitas mutações adicionais foram feitas e sugerem que os resíduos Tyr¹²⁹ e Tyr³²⁰ interagem com o resíduo Tyr¹³⁵, que por sua vez é importante para a ativação da proteína G e internalização do receptor (Prado *et al.*, 1997).

1.5.2 Vias de sinalização celular mediadas pelos receptores B₁ e B₂

O receptor B₂ é descrito ativar principalmente Gα_q (Gutowski *et al.*, 1991; Lamorte *et al.*, 1993; Liao e Homcy, 1993; Wilk-Blaszczak *et al.*, 1994; Jones *et al.*, 1995), apesar de também ser descrita sua interação com outras proteínas G, incluindo Gα_i (Ewald *et al.*, 1989; Linder *et al.*, 1990), Gα_s (Liebmann *et al.*, 1996), e Gα_{12/13} (Gohla *et al.*, 1999). O agonista BK ativa a fosfolipase Cβ mediante ativação de Gα_q levando à hidrólise de PI e um aumento de Ca²⁺ intracelular em diferentes tipos de células (Yano *et al.*, 1985; Derian e Moskowitz, 1986; Tilly *et al.*, 1987; Fasolato *et al.*, 1988). Além disso, translocação mediada por BK da proteína quinase C (isoenzimas α, ε, e ζ) foi mostrada em fibroblastos (Tippmer *et al.*, 1994) e células endoteliais (Ross e Joyner, 1997). O estímulo da fosfolipase A₂ mediada pela BK parece ocorrer mediante mecanismos de ativação da proteína G (Burch e Axelrod, 1987; Yanaga *et al.*, 1991), levando à ativação da isoforma citosólica da fosfolipase A₂ dependente de Ca²⁺ e fosforilação (Xing *et al.*, 1997; Lal *et al.*, 1998), onde também a ativação da fosfolipase D pode ser mediada pelo fluxo de Ca²⁺, ativação de PKC e GTPase RhoA (Pyne e Pyne, 1995; Meacci *et al.*, 1999).

A BK é um estimulante de eNOS e da produção de NO através de mecanismos mediados por Ca²⁺ em células endoteliais (Fleming e Busse,

1995). Neste tipo de células, BK promove a fosforilação de MAPK (Fleming *et al.*, 1995), fosfolipase C γ (Fleming *et al.*, 1996), Hsp90 (Harris *et al.*, 2000) e do próprio receptor B $_2$ (Marrero *et al.*, 1999). Além disso, BK ativa a via de sinalização JAK/STAT associada à caveolae (Ju *et al.*, 2000). Também, dependendo do tipo celular, BK induz respostas proliferativas (Owen e Villereal, 1983; Goldstein e Wall, 1984) ou anti-proliferativas (Patel e Schrey, 1992; Alric *et al.*, 2000). O estímulo de MAPK mediado por BK, que é independente da endocitose do receptor, parece favorecer um acoplamento sinérgico do receptor com as proteínas G α_q e G α_i (Blaukat *et al.*, 2000) levando à ativação de vias dependentes de PKC e mobilização de Ca $^{2+}$ incluindo trans-ativação do receptor EGF. Em células de fibroblastos, BK também pode estimular a fosforilação da FAK que pode levar à regulação de proliferação, adesão, migração e apoptose (Leeb-Lundberg *et al.*, 1994).

A ação de BK ativa múltiplos fatores de transcrição que regulam a expressão de várias citocinas envolvidas nos processos de inflamação e dano ao tecido, como pela ativação do fator NF- κ B que leva à expressão do gene da interleucina (IL)-1 β . Esta ativação foi bloqueada com a toxina pertussis, o que confirma a participação das proteínas G α_i e G $\beta\gamma$. Além disso, a ativação do fator NF- κ B também pode ser mediado pela BK através de G α_q , G $\beta\gamma$ e Akt (Xie *et al.*, 2000). Da mesma forma, BK estimula a expressão de c-fos e formação de AP-1 em células de músculo liso, o que é dependente da ativação de ERK e Elk-1 (El-Dahr *et al.*, 1998).

Os receptores B $_1$ e B $_2$ parecem regular vias de sinalização celular bastante parecidas, mas os padrões de sinalização são diferentes. Em células de músculo liso vascular estímulo do receptor B $_2$ leva a uma mobilização

transiente de Ca^{2+} intracelular, enquanto o receptor B_1 apresenta uma resposta mais sustentada (Bascands *et al.*, 1993). Estes padrões distintos de sinalização são consequências dos diferentes graus de regulação destes receptores, incluindo dessensibilização e internalização.

1.5.4 Oligomerização dos receptores B_1 e B_2

Experimentos realizados com células PC-12, usando *cross-linking* entre o agonista e o receptor, levaram à identificação de monômeros, dímeros e outros possíveis homo-oligômeros na estrutura do receptor B_2 , enquanto o antagonista HOE140 não levou à formação de tais estruturas oligoméricas (Abdalla *et al.*, 1999).

Receptores B_1 e B_2 de humano foram descritos que heterodimerizam espontaneamente quando são co-expressos em células HEK293, utilizando-se experimentos de co-imunoprecipitação e co-localização por imunomicroscopia eletrônica (Kang *et al.*, 2004). Este tipo de heterodimerização gera uma degradação proteolítica específica do receptor B_2 envolvido no complexo. Num processo de dano persistente, este mecanismo regulatório participa na conversão da sinalização de tipo B_2 ao tipo B_1 , o que sugere que os perfis farmacológicos da sinalização de cininas através de cada sub-tipo de receptor mantêm uma constante comunicação entre eles (Barki-Harrington *et al.*, 2003).

Outro importante complexo heterólogo formado pelos receptores de cininas é o complexo formado entre B_2 e o receptor de angiotensina II, AT_1 . Este complexo foi encontrado em células de musculo liso vascular e HEK293 transfectadas com ambos os receptores. A formação deste complexo foi detectada usando *cross-linking* nos dois receptores, cromatografia de afinidade

e observou-se que foi independente de agonista. Também foi observado que a co-expressão destes receptores levou a um aumento na potência e eficácia da AngII enquanto diminuía a potência e eficácia da BK. O aumento da sinalização da AngII foi independente da ligação da BK no receptor B₂ mas dependente do mecanismo de acoplamento entre o B₂ e a proteína G. A existência do complexo heterodimérico B₂-AT₁ pode apresentar implicações no controle da pressão arterial já que estes dois receptores estão envolvidos neste processo de maneiras antagônicas. Além disso, as concentrações plasmáticas desses agonistas são inversamente reguladas pela enzima conversora de angiotensina I (ECA) (Leeb-Lundberg *et al.*, 2005).

1.5.5 Dessensibilização dos receptores B₁ e B₂

O estímulo do receptor B₂ mediado pela BK leva a uma rápida dessensibilização do receptor, como mostrado em estudos que avaliaram a hidrólise de PI e a mobilização de Ca²⁺ em alguns sistemas nativos como células endoteliais vasculares (Smith *et al.*, 1995), células de músculo liso vascular (Mathis *et al.*, 1996) e outros sistemas transfectados com o receptor B₂ (Blaukat *et al.*, 1996; Fathy *et al.*, 1999). Os mecanismos de dessensibilização do receptor incluem a fosforilação de resíduos específicos de serinas e treoninas na calda C-terminal, os quais estão ausentes no receptor B₁; sendo portanto este receptor não rapidamente dessensibilizado (Enquist *et al.*, 2014) (Figura 3). A influência de diferentes isoformas de GRKs na fosforilação do receptor B₂ foi mostra que GRK4_α é provavelmente a principal isoforma envolvida neste processo (Blaukat *et al.*, 2001).

Modificações pós-traducionais como fosforilação e palmitoilação do receptor B₂ são processos dinâmicos que influenciam na eficácia de acoplamento do agonista e subsequente comportamento do receptor após ativação. Mutações com alanina no “cluster” de serinas e treoninas no C-terminal do receptor, que são alvos para a fosforilação mediada por GRKs, levaram a um aumento na atividade do receptor dependente ou independente do agonista em células HEK293 transfectadas (Fathy *et al.*, 1999). Estas observações sugerem que o receptor sofra dessensibilização não somente promovida pelo agonista, mas também em condições basais (Blaukat *et al.*, 2001).

1.6 Agonismo tendencioso

Os GPCRs são os principais alvos da indústria farmacêutica, sendo que cerca de 40% das drogas no mercado agem sobre esses receptores. O fato de que os GPCRs podem sinalizar via β -arrestinas, de maneira independente de proteína G, aliado à descrição de ligantes que estabilizam o receptor em conformações ativas intermediárias, ativando apenas um subgrupo das possíveis vias que o receptor pode ativar, levou à proposição do fenômeno do “agonismo tendencioso”, do inglês “biased agonism” (Lefkowitz, 1998). Este fenômeno sugere que seria possível desenvolver uma nova geração de drogas que, ao se ligar em um GPCR, leve à ativação de vias benéficas para o tratamento de uma patologia, mas não ative vias deletérias, ou ao menos ativando em menor grau.

Um dos primeiros agonistas tendenciosos descritos é um análogo de AngII, conhecido como SII ([Sar¹, Ile⁴, Ile⁸]-AngII). No ano 2003, Wei e

colaboradores mostraram que SII é um ligante tendencioso para a via dependente de β -arrestina, pois ele não levava à ativação de proteína G, mas recrutava β -arrestina2 e ativava a fosforilação de ERK1/2. Esta ativação de ERK foi abolida pela depleção de β -arrestina2, mas não foi afetada pela inibição de PKC (Wei *et al.*, 2003). De fato, algumas moléculas com características tendenciosas encontram-se em fase clínica de testes. Como exemplo, TRV130 é um ligante tendencioso para a via de proteína G_i agindo no receptor μ -opioide, levando assim a uma resposta de diminuição de dor aguda (Viscusi *et al.*, 2016). O TRV130 não induz o recrutamento de β -arrestinas, o qual como foi mostrado em estudos anteriores levar à resistência a anestésicos, depressão respiratória e constipação induzida pela morfina (Bohn *et al.*, 1999). Um outro exemplo é o TRV027, um agonista tendencioso para a via de β -arrestinas através do receptor AT₁, levando a um efeito cardioprotetor em modelos de insuficiência cardíaca (Tran *et al.*, 2016).

1.6.1 β -arrestinas

Classicamente a classificação funcional dos ligantes para GPCRs é baseada na sua eficácia para a ativação das proteínas G. Baseando-se neste parâmetro, os ligantes foram classificados como agonistas totais, agonistas parciais, antagonistas ou agonistas inversos, dependendo de sua habilidade em mediar a resposta do receptor. Não obstante, há evidência de que os GPCRs podem mediar múltiplas respostas, dependentes de ligante, mas independentes de proteína G. Assim, foi descoberto que β -arrestinas que inicialmente foram associadas com dessensibilização do receptor, podem

também levar a processos de sinalização (Shenoy e Lefkowitz, 2005) (Figura 1).

Arrestinas são proteínas citosólicas descobertas originalmente no sistema visual. São descritos quatro tipos de arrestinas: arrestina-1 (também referida como a arrestina visual), arrestina-2 (β -arrestina1), arrestina-3 (β -arrestina2) e arrestina-4 (arrestina do cone) (Shukla *et al.*, 2011; Lefkowitz, 2013). Enquanto arrestinas-1 e -4 estão localizadas nos bastonetes da retina e cones, técnicas de biologia molecular e bioquímica mostraram que as isoformas β -arrestina1 e β -arrestina2 são amplamente expressas na maioria de sistemas (Benovic *et al.*, 1987; Lohse *et al.*, 1990; Sterne-Marr *et al.*, 1993). As arrestinas foram nomeadas baseadas em sua habilidade de “prender” o receptor, hoje são reconhecidos seus papéis na regulação do tráfego de GPCRs e na sinalização independente de proteína G (Figura 1). Recentemente, duas isoformas de arrestinas foram encontradas amplamente expressas em eucariotos, nomeadas de α -arrestinas (ou também proteína vacuolar tipo 26 – Vps26). Sua estrutura terciária é parecida com as arrestinas visuais e as β -arrestinas, embora seu papel fisiológico e na sinalização de GPCRs não tenha sido completamente estudado (Aubry e Klein, 2013; Kang *et al.*, 2014).

1.6.2. Agonismo tendencioso no receptor B₂

Vários peptídeos com atividade agonística ou antagonística para os receptores B₁ e B₂ de cininas (Regoli e Barabe, 1980) já foram desenhados e sintetizados. Recentemente foi produzido um agonista com ação nos dois tipos de receptores de cininas, mas com aparente agonismo tendencioso para as

vias de sinalização dependentes de proteína G quando interagindo com o receptor B₂ (Zhang *et al.*, 2012). Este comportamento é diferente dos peptídeos endógenos BK e KD (Calidina), os quais também ativam as vias de sinalização dependentes de β -arrestina2 quando estimulam o receptor B₂.

Agonistas tendenciosos para a via de β -arrestinas têm sido caracterizados para vários GPCRs, mas ligantes com tal característica ainda não foram identificados para os receptores de cininas. O desenvolvimento de agonistas tendenciosos para este sistema seria interessante, pois traria a possibilidade do desenvolvimento de novos fármacos talvez com menos efeitos colaterais.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Produzir e caracterizar química e farmacologicamente novos análogos de BK com possíveis ações agonísticas tendenciosas ou antagonísticas para o receptor B₂.

2.2 Objetivos específicos

- Realizar o desenho e síntese de análogos de BK;
- Avaliar a afinidade dos análogos pelo receptor B₂ e estudar os resíduos de BK envolvidos na interação e manutenção de alta afinidade pelo receptor;
- Estudar a ativação das proteínas G_q e G_{i3}, recrutamento de β -arrestina1 e β -arrestina2, através de BRET (transferência de energia por ressonância de bioluminescência) após a ativação do receptor com os análogos de interesse, selecionados a partir das análises anteriores;
- Analisar quantitativamente o *fator de tendência* (“biased factor”) para os análogos que apresentaram este fenômeno.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Desenho dos análogos de BK

Para o desenho racional de análogos de BK com potencial agonismo tendencioso, inicialmente foi realizada uma busca na literatura das características importantes para a interação agonista-receptor e suas principais consequências farmacológicas.

Encontrou-se principalmente: i) O caráter positivo do C-terminal da BK é requerido para ligação e talvez para ativação do receptor B₂, já que na ausência de este aminoácido os peptídeos comportam-se como agonistas para o receptor B₁; ii) Phe⁵ parece estar envolvida principalmente no processo de ligação ao receptor porque sua substituição com resíduos aromáticos [Tyr ou Tyr(Me)] ou alifáticos (Leu, Cha) leva a uma diminuição na afinidade sem mudanças na atividade; iii) O núcleo aromático da Phe⁸ é um grupo ativador já que ele pode ser substituído por resíduos aromáticos [Tyr ou Tyr(Me), D-Phe] sem mudar sua atividade (Regoli e Barabe, 1980). Além disso, já como exemplos de ligantes com agonismo tendencioso, Zhang et al. (Zhang *et al.*, 2012) reportou que o peptídeo Lys⁹-BK antes descrito como agonista total (Regoli e Barabe, 1980) não tinha esse comportamento, mas foi um peptídeo que comportou-se com caráter tendencioso na ativação da proteína G_q em relação ao recrutamento de β -arrestina. Dessa forma, foram desenhados uma série de análogos que possuem inserções nas regiões de maior interesse, como descrito acima (Tabela 4).

Sabendo que a aromaticidade na posição 8 favorece a afinidade e a potência, foi substituído o resíduo Phe por outros resíduos aromáticos tais como Trp, Thi e Tyr(Me); também modificou-se por um resíduo alifático (Leu) (Escher *et al.*) para avaliar a possível ação antagonista tanto nos análogos tendo a Arg no C-terminal como nos análogos que contem o resíduo His no C-terminal. Inseriu-se também na posição 8 um resíduo de Ser para avaliar o comportamento do peptídeo com um resíduo alifático e hidrofílico nesta posição. Além da posição 8 na BK, foram também desenhados análogos com modificações na posição 5, que segundo a literatura (Regoli, 1980), possuem um papel relevante para a afinidade do ligante pelo receptor. Finalmente, foi substituído o C-terminal por resíduos Orn e Glu para se avaliar a importância da carga nesta posição. Por fim, foram também sintetizados uma série de análogos baseados em HOE140, o principal antagonista de receptor B₂.

Tabela 4. Gerações de análogos de BK.

Código		Peptídeo	Sequência									
BK		Bradicinina	Arg	Pro	Pro	Gly	Phe	Ser	Pro	Phe	Arg	
HOE140		HOE140	D-Arg	Arg	Pro	Hyp	Gly	Thi	Ser	D-Tic	Oic	Arg
PRIMEIRA GERAÇÃO DE ANÁLOGOS												
BK01	Met ⁰ -BK	Met	Arg	Pro	Pro	Gly	Phe	Ser	Pro	Phe	Arg	
BK02	His ⁹ -BK		Arg	Pro	Pro	Gly	Phe	Ser	Pro	Phe	His	
BK03	Met ⁰ -His ⁹ -BK	Met	Arg	Pro	Pro	Gly	Phe	Ser	Pro	Phe	His	
BK04	D-Ala ⁸ -BK		Arg	Pro	Pro	Gly	Phe	Ser	Pro	D-Ala	Arg	
BK05	Met ⁰ -D-Ala ⁸ -BK	Met	Arg	Pro	Pro	Gly	Phe	Ser	Pro	D-Ala	Arg	
SEGUNDA GERAÇÃO DE ANÁLOGOS												
BK06	Thi ^{5,8} -His ⁹ -BK		Arg	Pro	Pro	Gly	Thi	Ser	Pro	Thi	His	
BK07	Trp ⁸ -His ⁹ -BK		Arg	Pro	Pro	Gly	Phe	Ser	Pro	Trp	His	
BK08	Orn ⁹ -BK		Arg	Pro	Pro	Gly	Phe	Ser	Pro	Phe	Orn	
BK09	Glu ⁹ -BK		Arg	Pro	Pro	Gly	Phe	Ser	Pro	Phe	Glu	
BK10	Trp ⁸ -BK		Arg	Pro	Pro	Gly	Phe	Ser	Pro	Trp	Arg	
BK11	Leu ⁸ -BK		Arg	Pro	Pro	Gly	Phe	Ser	Pro	Leu	Arg	
BK12	Thi ^{5,8} -BK		Arg	Pro	Pro	Gly	Thi	Ser	Pro	Thi	Arg	
BK13	Tyr(Me) ⁸ -BK		Arg	Pro	Pro	Gly	Phe	Ser	Pro	Tyr(Me)	Arg	
BK14	D-Arg-Thi ⁵ -Leu ⁸ -BK	D-Arg	Arg	Pro	Pro	Gly	Thi	Ser	Pro	Leu	Arg	
BK15	D-Arg-Hyp ³ -Thi ^{5,8} -D-Phe ⁷ -BK	D-Arg	Arg	Pro	Hyp	Gly	Thi	Ser	D-Phe	Thi	Arg	
BK16	D-Arg-Hyp ³ -D-Phe ⁷ -BK	D-Arg	Arg	Pro	Hyp	Gly	Phe	Ser	D-Phe	Phe	Arg	
BK17	D-Arg-Hyp ³ -D-Phe ⁷ -Leu ⁸ -BK	D-Arg	Arg	Pro	Hyp	Gly	Phe	Ser	D-Phe	Leu	Arg	
BK18	D-Phe ⁷ -BK		Arg	Pro	Pro	Gly	Phe	Ser	D-Phe	Phe	Arg	

TERCEIRA GERAÇÃO DE ANÁLOGOS											
BK19	Thi ⁸ -BK	Arg	Pro	Pro	Gly	Phe	Ser	Pro	Thi	Arg	
BK20	Thi ⁵ -BK	Arg	Pro	Pro	Gly	Thi	Ser	Pro	Phe	Arg	
BK21	Ser ⁸ -BK	Arg	Pro	Pro	Gly	Phe	Ser	Pro	Ser	Arg	

Peptídeos Sintetizados. Na primeira coluna encontra-se o código dado a cada um dos peptídeos sintetizados. Na segunda coluna é indicado o nome de cada um, e na terceira encontra-se a sequência de aminoácidos.

3.3 Síntese química em fase sólida

A síntese dos peptídeos análogos de BK foi realizada sob a supervisão do Prof. Dr. Eduardo Brandt de Oliveira (Departamento de Bioquímica e Imunologia da FMRP/USP). A síntese dos peptídeos em fase sólida (Merrifield, 1963a; Fields e Noble, 1990a) utilizando a estratégia Fmoc (9-fluorenilmetiloxycarbonil) foi iniciada com a resina Wang-Fmoc-AA, onde AA é o aminoácido C-terminal do peptídeo. Em seguida, foi feito o desbloqueio desse aminoácido com solução de piperidina 20%, solução de DBU/piperidina e exposição à microondas. A eficiência do desbloqueio foi monitorada pelo teste de TNBS (Ácido 2,4,6-Trinitrobenceno sulfônico) e 2-cloroanil no caso do desbloqueio da Prolina. Os aminoácidos subsequentes bloqueados com Fmoc (Fmoc-AA) foram adicionados em excesso sempre depois do desbloqueio do aminoácido anterior. Inicialmente, dissolvia-se esses aminoácidos em DMSO/NMP (dimetilsulfóxido/N-metil pirrolidona), adicionava-se HOBt/HBTU (N-hidroxibenzotriazol/ hexafluorofosfato de O-(Benzotriazol-1-ila)-1,1,3,3-tetrametilurônio) 0,45M para ativação, agitava-se por aproximadamente 2 minutos. A mistura era transferida para o reator onde era adicionado DIPEA (N,N-diisopropiletilamina) 1,2M para acoplamento e aplicado 6 pulsos de microondas de 2 minutos sem N₂. Para o acoplamento de alguns aminoácidos dissolvidos em DMSO/NMP foi adicionado HOBt e após agitação manual foi adicionado DIC (1,3-diisopropilcarbodiimida) seguido de 6 pulsos de microondas de 2 minutos sem N₂. Para clivagem do peptídeo da resina, a mesma foi lavada com metanol, seca a vácuo e tratada com 1mL de 90% de TFA (ácido trifluoroacético), 4% de H₂O, 4% de TIS (trialquil silano) e 2% de

DTT (ditiotretol) por duas horas. A solução do peptídeo foi coletada e filtrada em coluna de 1mL com filtro poroso e lavada três vezes com éter para precipitação. A cada lavagem o éter era removido após centrifugação a 500rpm, 0 °C por 5 minutos. O material precipitado foi seco ao ar e em seguida, o peptídeo foi dissolvido em H₂O. Os peptídeos foram purificados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), caracterizados por espectrometria de massas (MS) e a eficiência da síntese foi avaliada através da análise da composição de aminoácidos.

3.4 Cromatografia líquida de alta eficiência - HPLC

Os peptídeos foram purificados por Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) usando uma coluna de fase reversa C4. As corridas foram feitas com um fluxo de 1.0 mL/min em um gradiente de concentração de acetonitrila de 15-45% (v/v) por 36 minutos em 0.1% (v/v) de TFA (ácido trifluoroacético).

3.5 Análise de Aminoácidos

3.5.1 Hidrólise Ácida dos Peptídeos

As amostras dos peptídeos secos e livres de sal foram hidrolisados em 50µL de ácido metanossulfônico 4N contendo 0.2% de triptamina (livre de cloretos) a 115°C durante 20 horas em microcapilares devidamente selados, de acordo com o método descrito por Liu e Boykins (Liu e Boykins, 1989). Após a remoção dos hidrolisados dos microcapilares eles foram parcialmente neutralizados com 40µL de NaOH 4N, diluídos com tampão citrato de sódio

0.2M, pH=2.2 contendo 15% (v/v) de glicerol e alíquotas de volume adequado foram cromatografadas segundo Moore (Moore *et al.*, 1958), com modificações, em analisador automático equipado com uma coluna (22x0.6cm) empacotada com resina Beckman W-3, sistema de coluna única. A sensibilidade do método é de 1-20nmol/resíduo.

3.5.2. Determinação da Composição de Aminoácidos

A quantidade em nmol de cada aminoácido nos hidrolisados foi determinada pela relação entre as alturas dos picos dos aminoácidos correspondentes (mesmo tempo de retenção pela coluna) em um cromatograma obtido a partir de uma mistura padrão contendo 20nmol de cada aminoácido. A composição em aminoácidos dos peptídeos foi calculada pela relação molar entre os resíduos encontrados nos hidrolisados.

3.6 Cultura e transfeção de células HEK293T

As células HEK293T (Human Embryonic Kidney) foram mantidas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), penicilina 100 U/mL e estreptomicina 100µM e mantidas a 37°C e 5% de CO₂.

As transfeções de HEK293T com o vetor do receptor humano B₂ foram realizados em placas de cultura de 10cm² para células aderentes estando em aproximadamente 70% de confluência. 10µg de DNA plasmidial foram transfectados usando Polietilendiimino (PEI) como agente transfectante (Hamdan *et al.*, 2007). As células foram incubadas por 48 horas em DMEM suplementado com SFB, penicilina e estreptomicina a 37°C com 5% de CO₂,

depois disto as células foram removidas, contadas e utilizadas para os ensaios de *binding* ou ensaios funcionais.(Lefkowitz, 1991)

3.7 Ensaios de “Binding” com células inteiras

O primeiro ensaio realizado com os peptídeos sintetizados foi o ensaio de “binding” em células HEK293 expressando de forma transiente o receptor humano B₂ para assim pudéssemos fazer um “screening” e avaliar a afinidade dos análogos por esse receptor.

Os ensaios de “binding” em células HEK293T foram realizados 48h após a transfecção com o receptor B₂. As células transfectadas foram transferidas para placas de 24 poços, 24 horas após a transfecção na quantidade de 5 x 10⁴ cels/poço. As placas foram previamente tratadas com uma solução de polilisina (0,1 mg/mL em PBS) e enxaguadas com PBS antes de receberem as células. As placas já contendo as células foram incubadas na estufa até o dia seguinte, e imediatamente antes de ser iniciado o ensaio de “binding” foram lavadas brevemente com tampão de lavagem gelado (Tris-HCl 25mM, pH 7.4, NaCl 140mM, MgCl₂ 5mM, 0.1% (p/v) albumina de soro bovino.)

Os ensaios de “binding” foram realizados em tampão de “binding” gelado (Tris-HCl 25mM, pH 7.4, MgCl₂ 5mM, 0.1% (p/v) albumina de soro bovino e bacitracina 100 µg/mL (Sigma) e iniciados com a adição de 25µL do ligante frio (BK ou análogos) em concentrações gradativamente maiores (10⁻¹² até 10⁻⁶M), logo depois foi adicionado o ligante marcado (³H-BK) diluído no tampão de “binding” para se chegar a um volume final de reação de 525µL. Após a adição de todos os componentes do ensaio, as placas foram deixadas por pelo menos 16 horas a 4°C, depois da incubação os poços foram lavados duas vezes com

o tampão de lavagem gelado, finalmente foi adicionado 200µL de tampão de lise (ureia 48%, NONIDET P-40 2%, diluído em ácido acético 3M), 190µL desta solução foram transferidos aos tubos plásticos de cintilação e 3mL de líquido de cintilação (Fisher Scientific) foram adicionados a cada tubo, e após agitação vigorosa dos mesmos procedeu-se à contagem da radiação em contador β (Packard Tri-Carb 2100TR Liquid Scintillation Analyser).

Os resultados foram normalizados e plotados como porcentagem da ligação máxima da ³H-BK e a traves de cálculos de regressão não-linear realizados com o software GraphPad Prism foram calculados os correspondentes valores de IC₅₀. Os valores de K_i serão calculados utilizando a equação de Cheng-Prusoff (Equação 1) (Cheng e Prusoff, 1973; Deblasi *et al.*, 1989):

$$K_i = \frac{IC_{50}}{\left[1 + \left(\frac{[Radioligante]}{K_D}\right)\right]}$$

Equação 1. Equação de Cheng-Prusoff para o calculo do K_i.

3.8 Avaliação da ativação do receptor através de BRET (transferência de energia por ressonância de bioluminescência)

Nesse trabalho foram utilizadas as configurações BRET_{480-EGFP} e BRET_{400-GFP10}. Para o BRET_{480-EGFP} (chamado de BRET₁), as proteínas estão fusionadas a RlucII (Renilla luciferase com as mutações C124A/M185V) que atua como doador, e a EYFP que atua como acceptor de energia. Para o BRET_{400-GFP10} (chamado de BRET₂), as proteínas estão fusionadas a RlucII e GFP₁₀, que atuam como doador e acceptor de energia respectivamente. As construções G_{αq}-RlucII, G_{i3}-RlucII, G_{β1}, G_{γ1}-GFP₁₀, β-arrestina1-RlucII, β-arrestina2-RlucII foram realizadas pelo grupo do Prof. Michel Bouvier da

Universidade de Montreal e gentilmente cedidas (Gales et al., 2006; Quoyer et al., 2013; Zimmerman et al., 2012). A construção do receptor B₂-EYFP foi realizada pelo grupo do Prof. João Bosco Pesquero da UNIFESP e gentilmente cedido.

3.8.1 Análise da ativação de proteína G_q e G_{i3} através de BRET

Foram utilizados biossensores baseados na técnica de BRET desenvolvidos pelo grupo do Prof. Michel Bouvier para avaliar a ativação de proteína G_q e G_{i3}. Neste caso, a subunidade alfa da proteína G_q/G_{i3} encontra-se fusionada a luciferase II de *Renilla* (RlucII) e a subunidade gama fusionada a GFP₁₀. No estado basal, onde a proteína G se encontra no estado trimérico, existe transferência de energia da luciferase para GFP devido à proximidade entre as subunidades em presença do substrato da luciferase (Figura 4A). Quando o receptor é ativado, ocorre a dissociação entre as subunidades alfa e o dímero beta/gama da proteína G, diminuindo o sinal de BRET (Figura 4B).

Figura 4. Princípio da avaliação da ativação de proteína G_q/G_{i3} através de BRET. Células HEK293T são cotransfectadas com vetores que codificam para o receptor B₂ e as 3 subunidades da proteína G_q/G_{i3}, sendo que a subunidade alfa é fusionada à *Renilla* Luciferase II (RlucII) e a subunidade gama é fusionada à GFP₁₀. Quando o substrato da luciferase,

coelenterazina 400a, é adicionado ao meio, a enzima o oxida com consequente emissão de luz no comprimento de 480 nm. Este é o comprimento de onda de excitação da GFP₁₀, que subsequentemente emite fluorescência a 510 nm. No estado basal (A), o trímero da proteína G está formado e a luciferase se encontra próxima à GFP₁₀, ocorrendo BRET. Quando o receptor é ativado (B), ocorre a dissociação das subunidades alfa e beta/gama, impedindo a ocorrência de BRET. São então quantificadas as intensidades em 480 e 510 nm, e a razão de BRET é calculada dividindo-se os valores de 510 nm por 480 nm

A ativação da proteína G_q/G_{i3} pelo receptor foi avaliada em células HEK293T cotransfectadas com G_{αq}-RlucII / G_{αi3}-RlucII , G_{β1}, G_{γ1}-GFP10 e receptor B₂ (BRET₂). Dois dias depois da transfecção, as células foram lavadas, soltas e ressuspensas em 6mL de PBS em temperatura ambiente. Em seguida, 80μL da suspensão foram distribuídos por poço em placas brancas de 96 poços (Optiplate; PerkinElmer) e tratados com diferentes concentrações de BK ou análogos por 5 min. A coelenterazina 400a foi utilizada como substrato de luciferase gerando luz com pico de emissão máximo em 400nm. As leituras de BRET foram realizadas pelo leitor de placas VICTOR™ X Light Luminescence (PerkinElmer). Os sinais foram calculados pela razão da intensidade da luz emitida pelo acceptor pela intensidade da luz emitida pelo doador (RlucII). Os dados obtidos foram apresentados em curvas concentração-resposta e o EC₅₀ de cada ligante foi calculado a partir da regressão não-linear pelo Programa GraphPad Prism (San Diego, CA).

3.8.2 Análise do recrutamento de β-arrestinas através de BRET

Além de avaliar a capacidade dos análogos de ativar vias de sinalização independentes de proteína G_q/G_i, também foi analisada a ativação de vias dependentes de β-arrestina através da estratégia de BRET, que avalia o recrutamento de β-arrestinas para o receptor ativado. Para tal, a β-arrestina é fusionada a RlucII e o receptor B₂ a YFP (Figura 5A). Quando o receptor é

ativado, ocorre a interação da β -arrestina com a porção citoplasmática do receptor e consequentemente a aproximação da RlucII e da YFP (Figura 5B). Dessa forma, na presença do substrato da luciferase o sinal de BRET aumenta.

Figura 5. Princípio da avaliação do recrutamento de β -arrestina através de BRET. Células HEK293T são cotransfectadas com plasmídeos que codificam para o receptor B2 fusionado a YFP e para β -arrestina fusionada à *Renilla* Luciferase II (RlucII). Quando o substrato da luciferase, celenterazina H, é fornecido, a enzima o oxida gerando a emissão de luz no comprimento de 480 nm. Este é o comprimento de onda de excitação da GFP, que emite fluorescência a 535 nm. No estado basal (A), a β -arrestina se encontra no citoplasma e não interage com o receptor, impedindo a aproximação da luciferase e da YFP e consequente ocorrência de BRET. Quando o receptor é ativado (B), existe a interação entre receptor e β -arrestina e consequente ocorrência de BRET. São então avaliadas as intensidades em 480 e 535 nm, e a razão de BRET é calculada dividindo-se os valores de 535 nm por 480 nm.

Células HEK293T expressando β -arrestina1-RlucII ou β -arrestina2-RlucII e o receptor B₂-EYFP (BRET₁) foram utilizadas para estudar o recrutamento de β -arrestinas. O estímulo com diferentes concentrações de BK e dos análogos foi realizado por 15 min e a coelenterazina h foi utilizada como substrato de luciferase gerando luz com um pico de emissão máximo em 480nm. Os dados obtidos foram apresentados em curvas concentração-resposta e o EC₅₀ de cada ligante foi calculado a partir da regressão não-linear pelo Programa GraphPad Prism (San Diego, CA).

3.9. Cálculo do agonismo tendencioso

Para quantificar o agonismo tendencioso, os efeitos dos agonistas no BRET para ativação das proteínas G_q e G_i e recrutamento de β -arrestina1 e β -arrestina2, serão ajustados ao Modelo Operacional de Agonismo de Black e Leff (Black e Leff, 1983), de acordo com a Equação 2:

$$Resposta = \frac{E_{max} \times \tau^n \times [A]^n}{(K_A + [A]^n) + \tau^n \times K_A^n}$$

Equação 2. Modelo operacional de agonismo

onde, E_{max} representa a resposta máxima possível do sistema, K_A é a constante de dissociação no equilíbrio do complexo agonista-receptor, n é a inclinação de transdução, e τ representa a eficácia operacional do agonista. Foi utilizado o método proposto por Kenakin e colaboradores (Kenakin *et al.*, 2012) que é baseado em comparações de razões τ/K_A entre agonistas. Os valores de $\log(\tau/K_A)$, também denominados de coeficientes de transdução, representam a “força” de um dado agonista em ativar uma via de sinalização em um sistema definido. Esses valores serão calculados através de uma reparametrização da equação (Equação 3) do modelo operacional (Evans *et al.*, 2011):

$$Resposta = basal + \frac{(E_{max} - basal) \times TR^n \times [A]^n}{[A]^n \times TR^n \times \left(1 + \frac{[A]}{K_A}\right)^n}$$

Equação 3. Modelo operacional de Evans

onde TR (do inglês - “transduction ratio”) é a razão τ/K_A . O valor de $\Delta\log(\tau/K_A)$ representa a eficiência do agonista em ativar uma via comparado ao agonista de referência e será calculado de acordo com a Equação 4:

$$\Delta\log(\tau/K_A)_{\text{agonista/referência}} = \log(\tau/K_A)_{\text{agonista}} - \log(\tau/K_A)_{\text{referência}}$$

Equação 4. Cálculo da tendência de um ligante em comparação ao ligante de referência

A partir da subtração dos $\Delta\log(\tau/K_A)$ será obtido o fator de tendência $\Delta\Delta\log(\tau/K_A)$ pela Equação 5:

$$\Delta\Delta\log(\tau/K_A) = \Delta\log(\tau/K_A)_{\text{via de sinalização 1}} - \Delta\log(\tau/K_A)_{\text{via de sinalização 2}}$$

Equação 5. Cálculo da tendência de um ligante comparando-se duas vias de sinalização

4. RESULTADOS

4.1 Desenho e síntese dos análogos de Bradicinina

Na Tabela 4 estão mostrados os análogos desenhados e sintetizados (ver materiais e métodos item 3.1). A síntese foi feita pelo método de fase sólida (Merrifield, 1963b; Fields e Noble, 1990b) (ver materiais e métodos item 3.3).

4.2 Caracterização química e purificação dos peptídeos sintetizados

Os peptídeos sintetizados da primeira geração foram purificados e caracterizados quimicamente mediante Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), Espectrometria de massas (MS) e análise de composição de aminoácidos. Tais análises mostraram que a síntese foi bem sucedida e que os peptídeos encontravam-se com alto grau de pureza. (ver Anexo 1). Os peptídeos da segunda, e terceira gerações foram caracterizados, purificados e quantificados por HPLC. Nas figuras 6, 7 e 8, encontram-se exemplos de cromatogramas e espectros de MS obtidos, nesse caso para a síntese do peptídeo His⁹-BK.

Figura 6. Perfil cromatográfico do peptídeo His⁹-BK. 1) Pico correspondente ao peptídeo sintetizado.

Figura 7. Perfil de análise de aminoácidos do peptídeo His⁹-BK. Cromatograma usado para realizar a quantificação do peptídeo sintetizado e purificado.

Figura 8. Espectro de massas do peptídeo His⁹-BK. O espectro analisado mostrou a fragmentação correta para o peptídeo sintetizado e purificado.

4.3 Primeira geração de peptideos

Para a primeira geração de análogos foram feitas as seguintes modificações na estrutura da BK:

- De acordo com a literatura (Regoli e Barabe, 1980), o análogo Met⁰-KD foi um potente peptídeo na ativação do receptor B₂, apresentando uma potência oito vezes maior que a KD, portanto, decidiu-se adicionar o resíduo Met na posição inicial da BK, buscando obter este aumento na potência do análogo **Met⁰-BK**.
- Tendo como base o carácter básico da Arg e o carácter aromático da Phe do C-terminal da BK, Arg⁹ foi substituída por um resíduo de His, já que este resíduo mantém as duas propriedades anteriormente mencionadas. Ficando o análogo **His⁹-BK**. Além disso, tentamos aliar as duas considerações anteriores, gerando-se o análogo **Met⁰-His⁹-BK**.
- O sitio de clivagem da BK para ECA é entre os resíduos Pro⁷-Phe⁸, portanto foi trocado o resíduo Phe⁸ por D-Ala⁸ para dar uma resistência à degradação enzimática, obtendo-se o análogo **D-Ala⁸-BK**, e também somando-se este racional com as informações da Metionina na posição zero foi gerado o análogo **Met⁰-D-Ala⁸-BK**.

4.3.1 Ensaio de “Binding” e cálculo de afinidade para os análogos da primeira geração

Foram realizados ensaios de “binding” para os análogos em células HEK293T expressando transientemente o receptor B₂. As concentrações testadas dos peptídeos foram desde 10⁻⁵M até 10⁻¹²M e cada ponto foi realizado em duplicata.

Apresentam-se os gráficos individuais de perfil de afinidade de cada um dos análogos tendo a BK como ligante de referência (Figura 9).

Figura 9. Curvas de “binding” em ensaios de competição em células HEK293T transfetadas com o receptor B₂. Os resultados foram normalizados e plotados como porcentagem da ligação máxima da BK radioativa. O radioligante utilizado foi ³H-BK. **A)** BK e Met⁰-BK. **B)** BK e His⁹-BK. **C)** BK e Met⁰-His⁹-BK. **D)** BK e D-Ala⁸-BK. **E)** BK e Met⁰-D-Ala⁸-BK. N=3 experimentos independentes.

Nossos resultados mostraram que o análogo Met⁰-BK apresentou afinidade menor do que a da BK. Os análogos His⁹-BK, Met⁰-His⁹-BK, D-Ala⁸-BK, Met⁰-D-Ala⁸-BK praticamente não ligaram no receptor B₂. Na Tabela 5 são apresentados os valores de afinidades (K_i e pK_i) para os análogos que ligaram.

Tabela 5. Constantes de afinidade (K_i e pK_i) da BK e análogos, obtidas em ensaios de competição pela ligação específica do radioligante ³H-BK. N=2 ou 3 experimentos independentes.

Peptídeo	K _i (nM) ± E.P.M.	F _c	pK _i ± E.P.M.
BK	0,86 ± 0,16	1,0	9,09 ± 0,08
Met⁰-BK	28 ± 4,4	36,8	7,6 ± 0,06
His⁹-BK	NQ	NQ	NQ
Met⁰-His⁹-BK	NQ	NQ	NQ
D-Ala⁸-BK	NQ	NQ	NQ
Met⁰-D-Ala⁸-BK	NQ	NQ	NQ

Os valores de K_i foram calculados através de cálculos de regressão não linear realizados com o programa GraphPad Prism e são apresentados como média ± erro padrão da média (E.P.M.) de 2 ou 3 experimentos independentes. O F_c é a razão do valor de K_i para os análogos em relação ao valor de K_i obtido para BK. NQ. Não Quantificável.

4.3.2 Ativação da proteína G_q pelos análogos da primeira geração

Além de investigarmos a capacidade dos análogos Met⁰-BK, His⁹-BK e Met⁰-His⁹-BK de se ligar ao receptor B₂, foi estudada a capacidade destes ligantes em ativar G_q. Os análogos D-Ala⁸-BK e Met⁰-D-Ala⁸-BK não apresentaram afinidade pelo receptor B₂, fato pelo qual experimentos funcionais não foram realizados com estes análogos. A Figura 10 apresenta os perfis de ativação de cada um dos análogos testados. O análogo Met⁰-BK apresentou um perfil de ativação com um EC₅₀ de 10.1nM, sendo o da BK de 3.1nM. Dessa forma o análogo foi cerca de 3 vezes menos potente que a BK. Os análogos His⁹-BK e Met⁰-His⁹-BK apresentaram potencias muito baixas na ativação da proteína G_q, compatível com as baixas afinidades observadas.

Figura 10. Análise da ativação de proteína G_q através de BRET após a ativação com BK e análogos. Curvas concentração-resposta para ativação de G_q após 5 min de estímulo com os ligantes. **A)** BK e Met⁰-BK. **B)** BK e His⁹-BK. **C)** BK e Met⁰-His⁹-BK. N= 3 experimentos independentes.

4.3.3 Análise do recrutamento de β -arrestina2 pelos análogos da primeira geração.

Além de avaliar a capacidade dos análogos de ativar vias de sinalização dependentes de proteína G_q , também foi avaliada a possível ativação de vias dependentes de β -arrestina2 através da análise do recrutamento de β -arrestina para o receptor.

Figura 11. Análise do recrutamento de β -arrestina2 através de BRET após a ativação com BK e análogos. Curvas concentração-resposta para recrutamento de β -arrestina2 após 15 min de estímulo com os ligantes. **A)** BK e Met⁰-BK. **B)** BK e His⁹-BK. **C)** BK e Met⁰-His⁹-BK. N=3 experimentos independentes

No recrutamento de β -arrestina2 o análogo Met⁰-BK apresentou uma baixa potência de ativação quando comparada àquela obtida na ativação da proteína G_q, sendo no caso do recrutamento de β -arrestina2 a potência cerca de 400 vezes menor que a BK. Os análogos His⁹-BK e Met⁰-His⁹-BK não apresentaram atividade significativa.

A Tabela 6 apresenta os valores obtidos de EC₅₀, pEC₅₀ e E_{máx} para os análogos da primeira geração na ativação de G_q e para o recrutamento de β -arrestina2.

Tabela 6. Potência da BK e dos análogos na ativação da proteína G_q e recrutamento de β -arrestina2

Peptídeo	EC ₅₀ (nM) $\pm$ E.P.M.	F _c	pEC ₅₀ $\pm$ E.P.M.	E _{máx} (%)
Ativação G_q				
BK	3,1 $\pm$ 0,9	1,0	8,6 $\pm$ 0,12	100
Met⁰-BK	10,1 $\pm$ 1,7	3,5	8,0 $\pm$ 0,07	106,8 $\pm$ 3,0
His⁹-BK	NQ	NQ	NQ	NQ
Met⁰-His⁹-BK	NQ	NQ	NQ	NQ
Recrutamento β-Arrestina2				
BK	0,31 $\pm$ 0,04	1,0	9,5 $\pm$ 0,06	100
Met⁰-BK	120 $\pm$ 6	387,7	6,9 $\pm$ 0,03	151,5 $\pm$ 1,27
His⁹-BK	NQ	NQ	NQ	NQ
Met⁰-His⁹-BK	NQ	NQ	NQ	NQ

Os valores de EC_{50} e pEC_{50} são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.) de 3 experimentos. O F_c é a razão dos valores de EC_{50} para os análogos em relação ao valor de EC_{50} obtido para BK. O $E_{m\acute{a}x}$. Foi representado em percentagem, sendo a referência (BK) o 100%. NQ, Não quantificável.

4.4 Segunda geração de peptídeos

Baseados nos resultados obtidos com os análogos da primeira geração e em dados da literatura, foram desenhados e sintetizados uma serie de 13 análogos de BK com o seguinte racional:

- Foi descrito por Dunn e Stewart (Dunn e Stewart, 1971) que o análogo $Thi^{5,8}$ -BK foi o mais potente em contração do útero de rato. Dessa forma foi desenhado o análogo **$Thi^{5,8}$ -His⁹-BK** tentando aumentar a potência do análogo His⁹-BK. O análogo **$Thi^{5,8}$ -BK** também foi sintetizado para analisar sua funcionalidade em paralelo aos novos análogos.
- O análogo **Trp^8 -BK** foi descrito apresentar altíssima afinidade pelo receptor B_2 (para revisão (Regoli e Barabe, 1980). Portanto, foi sintetizado o análogo **Trp^8 -His⁹-BK**, tentando aumentar a afinidade do análogo His⁹-BK.
- Ainda com o objetivo de analisar o papel do resíduo C-terminal da BK na sua afinidade e função, foram desenhados dois novos análogos alterando-se a carga do ultimo aminoácido. Para tanto, foram sintetizados os análogos **Orn^9 -BK** e **Glu^9 -BK**. O aminoácido Ornitina é um análogo de Lys, e apresenta uma carga positiva ao igual à da Arginina, mas sendo menos volumoso, e o aminoácido Glu possui carga negativa.

- Para avaliar o caráter aromático da posição 8, foram sintetizados dois análogos mudando-se esta característica. Baseados no análogo **Tyr(Me)⁸-BK**, que possui um caráter altamente hidrofóbico e que já foi descrito possuir uma potência maior que a BK, sintetizamos o peptídeo **Leu⁸-BK**, no qual o resíduo Phe⁸ foi substituído por um aminoácido alifático, para assim avaliar a importância da aromaticidade nesta posição.
- No ano de 1998, Regoli e colaboradores (Regoli *et al.*, 1998) descreveram uma série de análogos com uma modificação específica, a qual era substituir a Pro⁷, por um resíduo D-Phe a qual gerava análogos com propriedades antagonísticas. Eles descreveram os análogos **D-Phe⁷-BK**, **D-Arg⁰-Hyp³-Thi^{5,8}-D-Phe⁷-BK**, **D-Arg⁰-Hyp³-D-Phe⁷-BK**, e **D-Arg⁰-Hyp³-D-Phe⁷-Leu⁸-BK** como antagonistas fracos. Estes peptídeos foram sintetizados e testados funcionalmente para avaliarmos se ainda poderiam possuir alguma atividade quanto a via de β -arrestinas, como já foi mostrado para outros compostos que foram originalmente descritos como antagonistas.
- Por fim, foi desenhado um peptídeo onde a Pro⁷ foi restaurada no lugar da modificação por D-Phe para testar-se a hipótese de que esta poderia ser a substituição crítica para se gerar o caráter de antagonista sugerida por Regoli (Regoli *et al.*, 1998). Foi sintetizado o análogo **D-Arg⁰-Thi⁵-Leu⁸-BK**.

4.4.1 Ensaio de “binding” e cálculo de afinidade para os análogos da segunda geração

Da mesma maneira que para os análogos da primeira geração, foram realizados ensaios de “binding” para os análogos da segunda geração. Os perfis de afinidade de cada um deles são apresentados na Figura 12.

Figura 12. Curvas de “binding” em ensaios de competição em células HEK293T transfetadas com o receptor B₂. Os resultados foram normalizados e plotados como porcentagem da ligação máxima da BK radioativa. O radioligante utilizado foi ^3H -BK. **A)** BK e Thi^{5,8}-His⁹-BK. **B)** BK e Trp⁸-His⁹-BK. **C)** BK e Orn⁹-BK. **D)** BK e Glu⁹-BK. **E)** BK e Trp⁸-BK. **F)** BK e Leu⁸-BK. **G)** BK e Thi^{5,8}-BK. **H)** BK e Tyr(Me)⁸-BK. **I)** BK e D-Arg⁰-Thi⁵-Leu⁸-BK. **J)** BK e D-Arg⁰-Hyp³-Thi^{5,8}-D-Phe⁷-BK. **K)** BK e D-Arg⁰-Hyp³-D-Phe⁷-BK. **L)** BK e D-Arg⁰-Hyp³-D-Phe⁷-Leu⁸-BK. **M)** BK e D-Phe⁷-BK. N=2 ou 3 experimentos.

Os análogos contendo Histidina na posição 9 mantiveram seus perfis de baixa afinidade como pode ser observado nas figuras 12A e 12B. Os análogos Orn⁹-BK e Glu⁹-BK apresentaram uma baixíssima afinidade, quase nula pelo receptor B₂ (Figuras 12C e 12D). Os análogos Trp⁸-BK e Leu⁸-BK, D-Arg⁰-Thi⁵-Leu⁸-BK, D-Arg⁰-Thi⁵-Leu⁸-BK, D-Arg⁰-Hyp³-Thi^{5,8}-D-Phe⁷-BK, D-Arg⁰-Hyp³-D-Phe⁷-BK, D-Arg⁰-Hyp³-D-Phe⁷-Leu⁸-BK e D-Phe⁷-BK apresentaram perfis de baixa afinidade, sendo cerca de 400 vezes menores que a da BK (Tabela 7). Já o análogos Thi^{5,8}-BK apresentou afinidade semelhante a BK, e o análogo

Tyr(Me)⁸-BK apresentou um aumento significativo de afinidade pelo receptor, sendo cerca de 150 vezes maior que a da BK.

A tabela 7 apresenta os valores de K_i e pK_i obtidos para os análogos desta geração.

Tabela 7. Constantes de afinidade (K_i e pK_i) da BK e análogos, obtidas em ensaios de competição pela ligação específica do radioligante ³H-BK. N=2 ou 3 experimentos independentes.

Peptídeo	K _i (nM) ± E.P.M.	F _c	pK _i ± E.P.M.
BK	0,86 ± 0,16	1,0	9,09 ± 0,08
Thi^{5,8}-His⁹-BK	NQ	NQ	NQ
Trp⁸-His⁹-BK	NQ	NQ	NQ
Orn⁹-BK	NQ	NQ	NQ
Glu⁹-BK	NQ	NQ	NQ
Trp⁸-BK	262,5 ± 133	344,2	6,64 ± 0,24
Leu⁸-BK	387,1 ± 272	507,6	6,56 ± 0,38
Thi^{5,8}-BK	0,26 ± 0,02	0,3	9,57 ± 0,04
Tyr(Me)⁸-BK	0,006±0,001	0,007	11,23 ± 0,13
D-Arg⁰-Thi⁵-Leu⁸-BK	278,5 ± 178	365,3	6,67 ± 0,33
D-Arg⁰-Hyp³-Thi^{5,8}-D-Phe⁷-BK	196,3 ± 61	257,4	6,72 ± 0,14
D-Arg⁰-Hyp³-D-Phe⁷-BK	179,6 ± 61	235,62	6,77 ± 0,15
D-Arg⁰-Hyp³-D-Phe⁷-Leu⁸-BK	137,9 ± 61	180,9	6,90 ± 0,20
D-Phe⁷-BK	555,9 ± 179	729,1	6,27 ± 0,14

Os valores de K_i foram calculados através de cálculos de regressão não linear realizados com o programa GraphPad Prism e são apresentados como média ± erro padrão da média (E.P.M.) de 2 ou 3 experimentos independentes. O F_c é a razão do valor de K_i para os análogos em relação ao valor de K_i obtido para BK.

4.4.2 Análise da ativação de G_q e G_{i3} pelos análogos da segunda geração

Além de investigar a capacidade dos análogos de se ligarem ao receptor B₂, foi estudada a capacidade de ativarem G_q e G_{i3}.

- Ativação da proteína G_q mediada pelos análogos da segunda geração

A figura 13 mostra os perfis de cada um dos análogos da segunda geração na ativação da proteína G_q .

Figura 13. Análise da ativação de proteína G_q através de BRET após a ativação com BK e análogos. Curvas concentração-resposta para ativação de G_q após 5 min de estímulo com os ligantes. **A)** BK e Trp⁸-BK. **B)** BK e Leu⁸-BK. **C)** BK e Thi^{5,8}-BK. **D)** BK e Tyr(Me)⁸-BK. **E)** BK e D-Arg⁰-Thi⁵-Leu⁸-BK. **F)** BK e D-Arg⁰-Hyp³-Thi^{5,8}-D-Phe⁷-BK. **G)** BK e D-Arg⁰-Hyp³-D-Phe⁷-BK. **H)** BK e D-Arg⁰-Hyp³-D-Phe⁷-Leu⁸-BK. **I)** BK e D-Phe⁷-BK. N=3 experimentos independentes.

Os análogos Thi^{5,8}-His⁹-BK, Trp⁸-His⁹-BK, Orn⁹-BK e Glu⁹-BK não foram avaliados na ativação de proteínas G (G_q e G_{i3}) devido a sua baixíssima afinidade pelo receptor. Com relação à ativação de G_q pelos análogos testados, o análogo Leu⁸-BK apresentou uma potência semelhante à BK. Os análogos Thi^{5,8}-BK e Tyr(Me)⁸-BK, apresentaram potências maiores em comparação com a BK. O análogo D-Arg⁰-Thi⁵-Leu⁸-BK apresentou uma potência menor, mas sua eficácia ($E_{máx}$) foi igual à da BK. Os análogos D-Arg⁰-Hyp³-Thi^{5,8}-D-Phe⁷-BK, D-Arg⁰-Hyp³-D-Phe⁷-BK, D-Arg⁰-Hyp³-D-Phe⁷-Leu⁸-BK e D-Phe⁷-BK apresentaram atividades muito baixas (Tabela 8).

- **Ativação da proteína G_{i3} mediada pelos análogos da segunda geração**

A figura 14 mostra os perfis dos análogos da segunda geração na ativação da proteína G_{i3} .

Figura 14. Análise da ativação de proteína G_{i3} através de BRET após a ativação com BK e análogos. Curvas concentração-resposta para ativação de G_q após 5 min de estímulo com os ligantes. **A)** BK e Trp⁸-BK. **B)** BK e Leu⁸-BK. **C)** BK e Thi^{5,8}-BK. **D)** BK e Tyr(Me)⁸-BK. **E)** BK e D-Arg⁰-Thi⁵-Leu⁸-BK. **F)** BK e D-Arg⁰-Hyp³-Thi^{5,8}-D-Phe⁷-BK. **G)** BK e D-Arg⁰-Hyp³-D-Phe⁷-BK. **H)** BK e D-Arg⁰-Hyp³-D-Phe⁷-Leu⁸-BK. **I)** BK e D-Phe⁷-BK. N= 2 ou 3 experimentos independentes.

O comportamento dos análogos na ativação de proteína G_{i3} foi similar ao observado na ativação de G_q , com exceção do análogo Trp⁸-BK o qual apresentou ativação de G_q em altas concentrações, porém não levou à ativação de G_{i3} em nenhuma concentração testada (Figura 14A).

Na Tabela 8 se apresentam os valores de EC_{50} , pEC_{50} e $E_{máx}$ como medidas da potência e eficácia dos análogos testados da segunda geração na ativação de proteína G_q e G_{i3} .

Tabela 8. Potência e eficácia dos análogos na ativação de proteína G_q e G_{i3}.

Peptídeo	Ativação G _q				Ativação G _{i3}			
	EC ₅₀ (nM) ± E.P.M.	F _c	pEC ₅₀ (nM) ± E.P.M.	E _{máx} (%)	EC ₅₀ (nM) ± E.P.M.	F _c	pEC ₅₀ (nM) ± E.P.M.	E _{máx} (%)
BK	3,1 ± 0,9	1,0	3,1 ± 0,9	100	19,1 ± 3,6	1,0	7,7 ± 0,09	100
Trp⁸-BK	165,6 ± 25,1	56,8	165,6 ± 25,1	100 ± 4,0	NQ	NQ	NQ	NQ
Leu⁸-BK	10,4 ± 4,5	3,56	10,4 ± 4,5	86,9 ± 7,0	NQ	NQ	NQ	NQ
Thi^{5,8}-BK	0,8 ± 0,1	0,26	0,8 ± 0,1	102,9 ± 4,7	957 ± 221,3	50,2	6,0 ± 0,10	156,4 ± 18,0
Tyr(Me)⁸-BK	0,3 ± 0,1	0,11	0,3 ± 0,1	95,4 ± 3,8	329 ± 175,5	17,3	6,6 ± 0,26	73,4 ± 4,8
D-Arg⁰-Thi⁵-Leu⁸-BK	88,2 ± 23,9	30,24	88,2 ± 23,9	89,9 ± 8,9	415 ± 34,5	21,8	6,4 ± 0,03	75,3 ± 2,6
D-Arg⁰-Hyp³-Thi^{5,8}-D-Phe⁷-BK	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ
D-Arg⁰-Hyp³-D-Phe⁷-BK	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ
D-Arg⁰-Hyp³-D-Phe⁷-Leu⁸-BK	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ
D-Phe⁷-BK	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ

Os valores de EC₅₀ e pEC₅₀ são apresentados como média ± erro padrão da média (E.P.M.) de 3 experimentos independentes. O F_c é a razão dos valores de EC₅₀ para os análogos em relação ao valor de EC₅₀ obtido para BK. O E_{máx}. Foi representado em percentagem, sendo a referência (BK) o 100%. NQ. Não Quantificável.

4.4.3 Análise do recrutamento β -arrestinas para o receptor B_2 pelos análogos da segunda geração

Também foi avaliada a capacidade dos análogos de ativar vias de sinalização dependentes de proteína G_q e proteína G_{i3} . Foi analisado o recrutamento de β -arrestinas para o receptor através da estratégia de BRET. Foram avaliadas as proteínas β -arrestina1 e β -arrestina2.

- Análise do recrutamento de β -arrestina1 pelos análogos da segunda geração

A figura 15 mostra os perfis individuais dos análogos da segunda geração para recrutamento de β -arrestina1.

Figura 15. Análise do recrutamento de β -arrestina1 através de BRET após a ativação com BK e análogos. Curvas concentração-resposta para recrutamento de β -arrestina1 após 15 min de estímulo com os ligantes. **A)** BK e Trp⁸-BK. **B)** BK e Leu⁸-BK. **C)** BK e Thi^{5,8}-BK. **D)** BK e Tyr(Me)⁸-BK. **E)** BK e D-Arg⁰-Thi⁵-Leu⁸-BK. **F)** BK e D-Arg⁰-Hyp³-Thi^{5,8}-D-Phe⁷-BK. **G)** BK e D-Arg⁰-Hyp³-D-Phe⁷-BK. **H)** BK e D-Arg⁰-Hyp³-D-Phe⁷-Leu⁸-BK. **I)** BK e D-Phe⁷-BK. N= 2 ou 3 experimentos independentes.

Quanto ao recrutamento de β -arrestina1, os análogos Thi^{5,8}-BK, Tyr(Me)⁸-BK, e D-Arg⁰-Thi⁵-Leu⁸-BK apresentaram potências e eficácias semelhantes às da BK. O análogo Trp⁸-BK apresentou perfil de recrutamento baixo, já que apresentou uma potência de 913,5nM e uma eficácia de um 46.4% em relação à BK (Figure 15A). O análogo Leu⁸-BK apresentou um valor de potência (EC₅₀) de 95,2nM, sendo 10 vezes menor que a BK, e sua eficácia (E_{máx.}) foi de 62,9%. Os análogos D-Arg⁰-Hyp³-Thi^{5,8}-D-Phe⁷-BK e D-Arg⁰-Hyp³-D-Phe⁷-BK

apresentaram atividade nula no recrutamento de β -arrestina1, já os análogos D-Arg⁰-Hyp³-D-Phe⁷-Leu⁸-BK e D-Phe⁷-BK apresentaram leve recrutamento, apenas observado em altas concentrações (10⁻⁵M).

- **Análise do recrutamento de β -arrestina2 para o receptor B2 pelos análogos da segunda geração**

A figura 16 mostra os perfis individuais dos análogos da segunda geração para recrutamento de β -arrestina2.

Figura 16. Análise do recrutamento de β -arrestina2 através de BRET após a ativação com BK e análogos. Curvas concentração-resposta para recrutamento de β -arrestina2 após 15 min de estímulo com os ligantes. **A)** BK e Trp⁸-BK. **B)** BK e Leu⁸-BK. **C)** BK e Thi^{5,8}-BK. **D)** BK e Tyr(Me)⁸-BK. **E)** BK e D-Arg⁰-Thi⁵-Leu⁸-BK. **F)** BK e D-Arg⁰-Hyp³-Thi^{5,8}-D-Phe⁷-BK. **G)** BK e D-Arg⁰-Hyp³-D-Phe⁷-BK. **H)** BK e D-Arg⁰-Hyp³-D-Phe⁷-Leu⁸-BK. **I)** BK e D-Phe⁷-BK. N=3 experimentos independentes.

O comportamento observado dos análogos da segunda geração no recrutamento de β -arrestina2 foi similar ao observado em β -arrestina1, com exceção do peptídeo Trp⁸-BK. O análogo Trp⁸-BK apresentou uma baixa potência, mas conseguiu igualar o efeito máximo da BK. Na Tabela 9 são apresentados os valores de EC₅₀, pEC₅₀ e E_{máx} dos análogos para o recrutamento de β -arrestinas.

Tabela 9. Potência e eficácia dos análogos no recrutamento de β -arrestinas.

Peptídeo	Recrutamento β -arrestina1				Recrutamento β -arrestina2			
	EC ₅₀ (nM) $\pm$ E.P.M.	F _c	pEC ₅₀ (nM) $\pm$ E.P.M.	E _{máx} (%)	EC ₅₀ (nM) $\pm$ E.P.M.	F _c	pEC ₅₀ (nM) $\pm$ E.P.M.	E _{máx} (%)
BK	10,3 $\pm$ 0,7	1,0	7,9 $\pm$ 0,03	100	0,31 $\pm$ 0,04	1,0	9,5 $\pm$ 0,06	100
Trp⁸-BK	913,5 $\pm$ 519,7	88,5	6,2 $\pm$ 0,30	46,4 $\pm$ 7,0	NQ	NQ	NQ	NQ
Leu⁸-BK	95,2 $\pm$ 30,9	9,2	6,6 $\pm$ 0,50	62,9 $\pm$ 4,1	338 $\pm$ 92,8	1092,1	6,5 $\pm$ 0,11	108,1 $\pm$ 3,1
Thi^{5,8}-BK	31,9 $\pm$ 2,1	3,1	7,5 $\pm$ 0,02	113,3 $\pm$ 3,5	0,13 $\pm$ 0,05	0,4	9,9 $\pm$ 0,20	99,7 $\pm$ 2,3
Tyr(Me)⁸-BK	17,0 $\pm$ 13,8	1,7	8,1 $\pm$ 0,40	111,9 $\pm$ 8,6	0,65 $\pm$ 0,12	2,1	9,2 $\pm$ 0,08	122,8 $\pm$ 3,2
D-Arg⁰-Thi⁵-Leu⁸-BK	320 $\pm$ 43,27	31,0	6,5 $\pm$ 0,06	117,9 $\pm$ 16,1	885 $\pm$ 107	2861,6	6,1 $\pm$ 0,05	112,2 $\pm$ 1,2
D-Arg⁰-Hyp³-Thi^{5,8}-D-Phe⁷-BK	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ
D-Arg⁰-Hyp³-D-Phe⁷-BK	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ
D-Arg⁰-Hyp³-D-Phe⁷-Leu⁸-BK	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ
D-Phe⁷-BK	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ

Os valores de EC₅₀ e pEC₅₀ são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.) de 3 experimentos independentes. O F_c é a razão dos valores de EC₅₀ para os análogos em relação ao valor de EC₅₀ obtido para BK. O E_{máx} Foi representado em porcentagem, sendo a referência (BK) equivalente a 100%. NQ. Não Quantificável.

4.5 Terceira geração de análogos

Após avaliação dos resultados obtidos com a segunda geração de análogos, foi desenhada e sintetizada uma nova geração com os seguintes aspectos de racional:

- Na BK, as posições 5 e 8 são ocupadas por um resíduo aromático e hidrofóbico (Phe); no análogo Thi^{5,8}-BK estas posições foram ocupadas por resíduos aromáticos e hidrofílicos. Portanto, decidiu-se testar a combinação destas propriedades, voltando-se o resíduo Phe para a posição 5 e mandendo-se o resíduo aromático e hidrofílico Thi na posição 8, sendo este o análogo **Thi⁸-BK**.
- O análogo Thi⁸-BK possui na posição 5 um aminoacido hidrofóbico (Phe), e na posição 8 um hidrofílico. Foi então desenhado o análogo **Thi⁵-BK**, resultando em um análogo com características opostas nas posições mencionadas, com o intuito de avaliar a ordem específica destas características dentro da sequência da BK.
- Em todas as posições modificadas para os análogos de BK, foi sempre substituído a posição 8 com aminoácidos aromático-hidrofóbicos, aromático-hidrofílico, alifático-hidrofóbico, faltando assim uma modificação com um resíduo alifático-hidrofílico para se completar os estudos de estrutura e função. Por tanto, foi desenhado o análogo **Ser⁸-BK** para ser analisado o efeito desta alteração na afinidade e funcionalidade.

4.5.1 Ensaios de “binding” e cálculo de afinidade para os análogos da terceira geração

Foram realizados experimentos de “binding” para os três novos análogos sintetizados. Na Figura 17 são apresentados os perfis de afinidade de cada um destes análogos.

Figura 17. Curvas de “binding” em ensaios de competição em células HEK293T transfetadas com o receptor B₂. Os resultados foram normalizados e plotados como porcentagem da ligação máxima da BK radioativa. O radioligante utilizado foi ³H-BK. **A)** BK e Thi⁸-BK. **B)** BK e Thi⁵-BK. **C)** Ser⁸-BK. n=2 ou 3 experimentos independentes.

O análogo Thi⁸-BK apresentou comportamento similar a BK. A modificação feita no análogo Thi⁵-BK, onde foi avaliado ter um aminoácido hidrofílico na posição 5 sem modificar o aminoácido endógeno hidrofóbico (Phe) na estrutura da BK, gerou um composto de afinidade similar à BK. Por outro lado, a modificação Ser⁸-BK, a qual possui a troca de caráter aromático e hidrofóbico da BK por uma caracterisitca alifática e hidrofílica, resultou na perda de afinidade pelo receptor de cerca de 60 vezes.

Tabela 10. Constantes de afinidade (K_i e pK_i) para BK e análogos, obtidas em ensaios de competição com uso do radioligante ³H-BK. N=2 ou 3 experimentos independentes.

Peptídeo	K_i (nM) $\pm$ E.P.M.	F_c	$pK_i \pm$ E.P.M.
BK	$0,86 \pm 0,16$	1,0	$9,09 \pm 0,08$
Thi ⁸ -BK	$1,3 \pm 0,30$	1,5	$8,91 \pm 0,11$
Thi ⁵ -BK	$0,42 \pm 0,02$	0,5	$9,37 \pm 0,02$
Ser ⁸ -BK	$49,6 \pm 5,45$	57,7	$7,32 \pm 0,06$

Os valores de K_i foram calculados através de cálculos de regressão não linear realizados com o programa GraphPad Prism e são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.) de 2 ou 3 experimentos independentes. O F_c é a razão do valor de K_i para os análogos em relação ao valor de K_i obtido para BK

4.4.2 Análise da ativação de G_q e G_{i3} pelos análogos da terceira geração

Com os análogos da terceira geração, também foi avaliada a ativação das proteínas G_q e G_{i3} , para assim permitir uma análise comparativa sobre a relação estrutura-atividade.

- **Ativação da proteína G_q mediada pelos análogos da terceira geração**

A Figura 18 mostra os perfis de cada um dos análogos da terceira geração na ativação da proteína G_q .

Figura 18. Análise da ativação de proteína G_q através de BRET após a ativação com BK e análogos. Curvas concentração-resposta para ativação de G_q após 5 min de estímulo com BK

e os análogos. **A)** BK e Thi⁸-BK. **B)** BK e Thi⁵-BK. **C)** BK e Ser⁸-BK. N=3 experimentos independentes

O análogo Thi⁸-BK apresentou um perfil de ativação de proteína G_q similar à BK. O análogo Thi⁵-BK apresentou uma potência similar à BK, mas sua eficácia diminuiu um 30%. Por outro lado, o peptídeo Ser⁸-BK apresentou uma baixa potência e eficácia próxima a 100% (Tabela 11).

- **Ativação da proteína G_{i3} mediada pelos análogos da terceira geração**

A figura 19 mostra os perfis dos análogos da terceira geração para a ativação da proteína G_{i3}.

Figura 19. Análise da ativação de proteína G_{i3} através de BRET após a ativação com BK e análogos. Curvas concentração-resposta para ativação de G_q após 5 min de estímulo com os ligantes. **A)** BK e Thi⁸-BK. **B)** BK e Thi⁵-BK. **C)** BK e Ser⁸-BK. N= 3 experimentos independentes.

A figura 19 apresenta os perfis de ativação dos análogos da terceira geração na ativação da proteína G_{i3} . Foi observado que os três análogos sintetizados apresentaram perfis de ativação baixos tanto para potência quanto em eficácia (ver Tabela 11).

4.4.3 Análise de recrutamento de β -arrestinas para o receptor B_2 pelos análogos da terceira geração

- Análise do recrutamento de β -arrestina1 pelos análogos da terceira geração

A figura 20 mostra os perfis individuais dos análogos da terceira geração para recrutamento de β -arrestina1.

Figura 20. Análise do recrutamento de β -arrestina1 através de BRET após a ativação com BK e análogos. Curvas concentração-resposta para recrutamento de β -arrestina1 após 15 min de estímulo com os ligantes. **A)** BK e Thi⁸-BK. **B)** BK e Thi⁵-BK. **C)** BK e Ser⁸-BK. N= 3 experimentos independentes.

No recrutamento de β -arrestina1, o análogo Thi^8 -BK apresentou um comportamento similar ao da BK. A potência obtida pelo análogo Thi^5 -BK (14.2 nM) foi similar à de BK (10.3 nM), tendo sido sua eficácia um pouco maior (aprox. 20% maior). O análogo Ser^8 -BK apresentou uma potência baixa (1040.5 nM) mas uma eficácia que superou cerca de 15% a ativação máxima da BK.

- **Análise do recrutamento de β -arrestina2 pelos análogos da terceira geração**

Na figura 21 estão apresentados os perfis de recrutamento de β -arrestina2 pelos análogos sintetizados nesta geração.

Figura 21. Análise do recrutamento de β -arrestina2 através de BRET após a ativação com BK e análogos. Curvas concentração-resposta para recrutamento de β -arrestina2 após 15 min de estímulo com os ligantes. **A)** BK e Thi^8 -BK. **B)** BK e Thi^5 -BK. **C)** BK e Ser^8 -BK. N=3 experimentos independentes

Os análogos apresentaram perfis de recrutamento de β -arrestina2 similares aos perfis obtidos no recrutamento de β -arrestina1. Ou seja, os análogos Thi⁸-BK e Thi⁵-BK apresentaram perfis de recrutamento de β -arrestinas semelhantes à BK. As respostas obtidas pelos análogos da terceira geração no recrutamento de β -arrestina2 foram similares às obtidas no recrutamento de β -arrestina1, sendo o análogo Thi⁵-BK similar à BK, e o análogo Ser⁸-BK com baixa potência.

Nas tabelas 11 e 12 são apresentados os valores de potência e eficácia de cada um dos análogos desta geração na ativação de proteínas G e recrutamento de β -arrestinas.

Tabela 11. Potência e eficácia dos análogos na ativação da proteína G_q e G_{i3}.

Peptídeo	Ativação G _q				Ativação G _{i3}			
	EC ₅₀ (nM) ± E.P.M.	F _c	pEC ₅₀ (nM) ± E.P.M.	E _{máx} (%)	EC ₅₀ (nM) ± E.P.M.	F _c	pEC ₅₀ (nM) ± E.P.M.	E _{máx} (%)
BK	3,1 ± 0,9	1,0	3,1 ± 0,9	100	19,1 ± 3,6	1,0	7,7 ± 0,09	100
Thi⁸-BK	0,4 ± 0,1	0,12	9,5 ± 0,14	86,7 ± 0,8	71,9 ± 20,1	3,7	6,8 ± 0,34	59,6 ± 11,1
Thi⁵-BK	0,6 ± 0,2	0,21	9,3 ± 0,15	71,1 ± 1,5	78,5 ± 10,7	4,1	7,1 ± 0,05	46,8 ± 2,4
Ser⁸-BK	391 ± 56,7	2,91	6,4 ± 0,06	145,3 ± 4,4	NQ	NQ	NQ	NQ

Os valores de EC₅₀ e pEC₅₀ são apresentados como média ± erro padrão da média (E.P.M.) de 3 experimentos independentes. O F_c é a razão dos valores de EC₅₀ para os análogos em relação ao valor de EC₅₀ obtido para BK. O E_{máx}. Foi representado em porcentagem, sendo a referência (BK) normalizada para 100%. NQ. Não Quantificável.

Tabela 12. Potência e eficácia dos análogos no recrutamento de β-arrestinas.

Peptídeo	Recrutamento β-arrestina1				Recrutamento β-arrestina2			
	EC ₅₀ (nM) ± E.P.M.	F _c	pEC ₅₀ (nM) ± E.P.M.	E _{máx} (%)	EC ₅₀ (nM) ± E.P.M.	F _c	pEC ₅₀ (nM) ± E.P.M.	E _{máx} (%)
BK	10,3 ± 0,7	1,0	7,9 ± 0,03	100	0,31 ± 0,04	1,0	9,5 ± 0,06	100
Thi⁸-BK	26,9 ± 13,4	2,6	7,7 ± 0,19	96,9 ± 5,4	0,84 ± 0,15	2,7	9,1 ± 0,09	113 ± 1,9
Thi⁵-BK	14,2 ± 2,4	0,9	7,9 ± 0,03	119,6 ± 8,5	0,67 ± 0,06	2,2	9,2 ± 0,04	111,3 ± 1,1
Ser⁸-BK	1040,5 ± 244,5	100,8	6,0 ± 0,10	114,7 ± 9,4	1231 ± 158	3979,5	5,9 ± 0,05	90,6 ± 3,3

Os valores de EC₅₀ e pEC₅₀ são apresentados como média ± erro padrão da média (E.P.M.) de 3 experimentos independentes. O F_c é a razão dos valores de EC₅₀ para os análogos em relação ao valor de EC₅₀ obtido para BK. O E_{máx}. Foi representado em porcentagem, sendo a referência (BK) normalizada para 100%. NQ. Não Quantificável.

4.6 Avaliação da atividade antagonística dos análogos

Uma vez que os análogos D-Arg⁰-Hyp³-Thi^{5,8}-D-Phe⁷-BK, D-Arg⁰-Hyp³-D-Phe⁷-BK, D-Arg⁰-Hyp³-D-Phe⁷-Leu⁸-BK, D-Phe⁷-BK não apresentaram atividade agonística significativa no receptor B₂ nos ensaios feitos anteriormente, sugerindo que eles possam estabilizar o estado inativo do receptor, decidiu-se avaliar a possível atividade antagonística desses análogos. Para isto, foram realizados experimentos de BRET para a ativação da proteína G_q e recrutamento de β-arrestina2 induzidos por BK em uma condição onde diferentes análogos foram pré-incubados na concentração de 1*10⁻⁴M (Figura 22).

- Ativação da proteína G_q

A

- Recrutamento de β -arrestina2

Figura 22. Avaliação da atividade antagonística dos análogos D-Arg⁰-Hyp³-Thi^{5,8}-D-Phe⁷-BK, D-Arg⁰-Hyp³-D-Phe⁷-BK, D-Arg⁰-Hyp³-D-Phe⁷-Leu⁸-BK, D-Phe⁷-BK. A) Ativação de proteína G_q e B) Recrutamento de β -arrestina2, em condição de estímulo ou não com BK após de 30 minutos de pré-incubação com os análogos indicados. O HOE140 foi usado como o controle.

Nossos resultados mostraram que os análogos previamente descritos por Regoli (Regoli *et al.*, 1998) como antagonistas fracos conseguiram bloquear moderadamente o efeito da BK, mas não totalmente como foi o caso do antagonista de referencia (HOE140). Portanto pode-se classificar estes análogos como agonistas parciais.

4.6 Cálculo do fator de tendência (do Inglês, Bias Factor)

Para quantitativamente avaliarmos o agonismo tendencioso, utilizamos o método proposto por Kenakin e colaboradores (Kenakin *et al.*, 2012). Os análogos que apresentaram curvas de concentração-resposta favoráveis, foram avaliados em seis grupos de comparação diferentes, como descritos abaixo, e os resultados são apresentados graficamente na Figura 23.

- Via β -arrestina2 vs. Via G_q
- Via β -arrestina1 vs. Via G_q
- Via G_i vs. Via G_q
- Via β -arrestina2 vs. Via G_i
- Via β -arrestina1 vs. Via G_i
- Via β -arrestina2 vs. Via β -arrestina1

B

C

Figura 23. Análise do agonismo tendencioso dos análogos sintetizados que apresentaram atividade relevante. Os análogos foram comparados com o seu valor do $\Delta\text{Log } \tau/K_a$ em comparação ao peptídeo de referência (BK). Ao final na comparação dos análogos em duas vias diferentes foi obtido o valor de $\Delta\Delta\text{Log } \tau/K_a$. **A)** Via β -arrestina2 vs. Via G_q **B)** β -arrestina1 vs. Via G_q **C)** Via G_i vs. Via G_q **D)** Via β -arrestina2 vs. Via G_i **E)** Via β -arrestina1 vs. Via G_i **F)** Via β -arrestina2 vs. Via β -arrestina1. Os dados obtidos estão nas tabelas 1 e 2 no material anexo (ANEXO 2).

5. DISCUSSÃO

A seletividade funcional é relativamente um novo conceito, e seu grande potencial terapêutico está a cada dia tendo mais relevância (Rominger *et al.*, 2014). Agonismo tendencioso é a capacidade de determinados ligantes de estabilizar distintas conformações do receptor, que por sua vez irá permitir a interação com diferentes efetores ou interações diferenciadas, refletindo-se em um dado padrão de ativação de vias de sinalização. O objetivo deste estudo foi, a partir do desenho racional, identificar ligantes tendenciosos para o receptor B₂ e associar às características estruturais da BK que levaram a esta funcionalidade seletiva. Um melhor entendimento dos mecanismos que levam ao reconhecimento de diferentes estados receptor-efector por ligantes tendenciosos pode levar ao desenvolvimento de melhores terapias com menores efeitos secundários.

A ativação do sistema caliceína-cinina leva a uma sinalização é mediada pelos receptores B₁ e B₂, GPCRs que regulam uma grande variedade de processos fisiológicos e patológicos como vasodilatação, função renal, inflamação e dor (Zhang *et al.*, 2012). Neste estudo, 21 análogos de BK foram sintetizados e avaliados quanto à sua funcionalidade no receptor B₂ em 4 vias de sinalização diferentes. As vias de sinalização avaliadas foram ativação de G_q, ativação de G_{i3}, recrutamento de β-arrestina1, e recrutamento de β-arrestina2.

Antes de avaliarmos a funcionalidade dos análogos, a primeira propriedade farmacológica caracterizada foi a afinidade pelo receptor B₂, que foi calculada através de experimentos de “binding”. A energia de ligação da BK e peptídeos similares no receptor B₂ parece ser fornecida por interações não-

ionicas que ocorrem pelos resíduos localizados na estrutura do peptídeo. Também se apresentam interações iônicas pela cadeia lateral dos resíduos de Arginina, localizados nos extremos da sequência de BK.

Corroborando o modelo mais atual para explicar a ligação da BK ao receptor B₂, o qual propõe que o resíduo C-terminal da BK (Arg) interage com as alças extracelulares do receptor (Leeb-Lundberg *et al.*, 2005), os peptídeos com modificações que mantiveram certas características da Arg⁹ apresentaram afinidades similares à de BK e análogos com modificações que mudaram tais propriedades apresentaram perdas de afinidade, sendo que alguns deles apresentaram perda total de afinidade como foi o caso do análogo Glu⁹-BK (Figura 12).

Além disso, baseados nos dados mostrados por Kyle e colaboradores (Kyle *et al.*, 1994), que sugerem que os resíduos Ser¹¹¹(TM-III), Thr²⁶³(TM-VI), Asp²⁶⁶(EC-IV) e Asp²⁸⁴(EC-IV) do receptor humano B₂ são os principais resíduos para interação com o C-terminal do ligante, concluímos que manter a carga positiva no C-terminal do ligante é importante para a ligação com o receptor, já que os análogos Thi^{5,8}-His⁹-BK, Trp⁸-His⁹-BK e Glu⁹-BK, nos quais foi substituído o resíduo de Arg por um aminoácido sem carga ou carga negativa, apresentaram grandes perdas de afinidade em relação a BK. Embora Orn⁹-BK tenha mantido a carga positiva no C-terminal, este análogo também apresentou baixa afinidade, o que pode ser devido ao seu menor tamanho em relação à arginina, uma vez que o resíduo Ornitina possui apenas 3 carbonos na cadeia lateral e uma única amina primária, não permitindo alcançar os devidos sítios para interação com os quais a Arginina interage. Além da importância da posição 9 da BK para a afinidade pelo receptor B₂, foi

observado que alterações na Phe⁸ também influenciam a ligação de BK com o receptor. É possível que seu caráter aromático tenha papel importante, já que os análogos apresentando um resíduo alifático na posição 8, como Leu⁸-BK e Ser⁸-BK (Figura 12 e Figura 17), apresentaram baixa afinidade; e os análogos D-Ala⁸-BK e Met⁰-D-Ala⁸-BK não tem afinidade pelo receptor (Figura 9). Além da aromaticidade, a flexibilidade na cadeia lateral da posição 8 também parece ser importante para uma ligação favorável com o receptor, já que o análogo Tyr(Me)⁸-BK, o qual é aromático e flexível, resultou em uma afinidade 100 vezes maior quando comparado com a BK (Tabela 7). Esta hipótese é corroborada quando observamos que o análogo Trp⁸-BK, pois esse apresenta menor afinidade e um anel duplo e rígido na sua cadeia lateral. É possível que tal rigidez impeça a aproximação do ligante com os resíduos do receptor envolvidos no processo de ligação. Também foi observado que, além de manter a flexibilidade na posição 8, manter a rigidez na posição 7 (Pro) também é importante para a ligação, uma vez que os análogos que possuem o resíduo D-Phe⁷, que por sua vez é mais flexível do que Pro, apresentaram perdas de afinidades significativas. São eles: D-Arg⁰-Hyp³-Thi^{5,8}-D-Phe⁷-BK, D-Arg⁰-Hyp³-D-Phe⁷-BK, D-Arg⁰-Hyp³-D-Phe⁷-Leu⁸-BK, e D-Phe⁷-BK.

Na primeira geração de peptídeos sintetizados, foi mostrado que a adição do resíduo Met⁰ na estrutura da BK não interferiu na ativação de G_q mas levou a uma diminuição no recrutamento de β-arrestina2 (Figura 10 e Figura 11), dessa forma resultando em análogos com agonismo tendencioso para a via de G_q (Figura 28A). Os análogos His⁹-BK e Met⁰-His⁹-BK apresentaram comportamento de agonistas parciais, já que em comparação a BK eles apresentaram potências e eficácias baixas em todas as vias avaliadas

(ativação G_q e recrutamento β -arrestina2), o que pode ser observado nas figuras 10 e 11. Como foi discutido anteriormente, a troca de Arg da BK no C-terminal por um resíduo His levou a uma baixa afinidade pelo receptor, também resultando em uma baixa ativação do receptor quando estimulado por estes análogos.

Já nos análogos da segunda geração, o análogo Trp^8 -BK apresentou menor potência e eficácia similar à de BK na ativação da proteína G_q , um resultado interessante quando somado àquele que mostra a não ativação de proteína G_{i3} , sugerindo que Trp^8 -BK estabilize uma conformação do receptor B_2 capaz de discriminar entre diferentes isoformas de proteína G. Também é interessante notar que este análogo é capaz de recrutar eficientemente β -arrestina1 (EC_{50} 0,9 μ M) enquanto que fracamente β -arrestina2. Esses dados mostram que este ligante estabiliza o receptor em conformações diferentes, que por sua vez permitem o reconhecimento de efetores diferentes. Os análogos Leu^8 -BK e $\text{D-Arg}^0\text{-Thi}^5\text{-Leu}^8$ -BK apresentaram de maneira geral baixa atividade em todas as vias de sinalização avaliadas, o que pode ser explicado pela baixa afinidade apresentada por eles, em decorrência da ausência de um resíduo aromático na posição 8, que como discutido anteriormente é uma característica fundamental para a interação com o receptor. O análogo $\text{Thi}^{5,8}$ -BK apresentou um perfil bastante similar ao da BK nas vias avaliadas, o que foi confirmado com o cálculo do fator de tendência onde este análogo foi classificado como um agonista balanceado. Já o análogo Tyr(Me)^8 -BK, que apresentou altíssima afinidade pelo receptor B_2 ($K_i = 0.006\text{nM}$), apresentou potências na ativação de proteínas G e de recrutamento de β -arrestinas similares à BK, sugerindo que mesmo com altíssima afinidade, este análogo

estabiliza conformações do receptor semelhantes às aquelas estabilizadas pela BK.

Os últimos análogos avaliados na segunda geração foram D-Arg⁰-Hyp³-Thi^{5,8}-D-Phe⁷-BK, D-Arg⁰-Hyp³-D-Phe⁷-BK, D-Arg⁰-Hyp³-D-Phe⁷-Leu⁸-BK, D-Phe⁷-BK, descritos anteriormente por Regoli e colaboradores (Regoli *et al.*, 1998) como antagonistas fracos. Nossos experimentos permitiram observar que eles se comportam na verdade como agonistas parciais, uma vez que em altas concentrações eles conseguem levar à ativação de proteína G_q e ao recrutamento de β -arrestina2.

Na terceira geração de peptídeos foi avaliada a importância da hidrofobicidade/hidrofilicidade nas posições 5 e 8 da BK, uma vez que os resultados com os análogos Trp⁸-BK e Tyr(Me)⁸-BK sugeriram que tais características devam ser importantes para a funcionalidade de BK. Mostramos que o análogo Thi⁸-BK, que apresenta na posição 5 um resíduo hidrofóbico e na posição 8 um resíduo hidrofílico, apresentou um comportamento de agonista balanceado, já que sua atividade nas vias avaliadas foi similar à BK.

O análogo Thi⁵-BK, apresentou diminuição na ativação da proteína G_q e aumento no recrutamento de β -arrestina2, mostrando que ao ter um aminoácido hidrofílico na posição 5 possivelmente é favorecido um perfil funcional tendencioso ao recrutamento de β -arrestinas (Figura 18 e Figura 21). Provavelmente, a diminuição da ativação de G_q não tenha sido tão pronunciada neste caso, devido à baixa hidrofobicidade do resíduo Phe em comparação aos resíduos Trp e Tyr(Me) na posição 8. Além disso, o análogo Ser⁸-BK reforçou essa hipótese, já que sem ter o resíduo aromático na posição 8 (o que diminuiu sua afinidade pelo receptor), não levou a um maior de recrutamento de β -

arrestinas, apresentando comportamento de agonista balanceado com baixa potência. (Figura 18 e Figura 21)

Os resultados qualitativos discutidos acima foram confirmados quantitativamente com o cálculo do fator de tendência pelo modelo proposto por Kenakin e colaboradores (Kenakin *et al.*, 2012), o qual utiliza o $\Delta\Delta\text{LogT}/K_A$ para as vias de interesse. Estes cálculos evidenciam que o análogo $\text{Thi}^{5,8}$ -BK apresentou um perfil de agonista balanceado, os análogos Met^0 -BK, His^9 -BK, Met^0 - His^9 -BK, Thi^5 -BK, Thi^8 -BK, Trp^8 -BK, $\text{Tyr}(\text{Me})^8$ -BK, Leu^8 -BK, Ser^8 -BK, D-Arg^0 - Thi^5 - Leu^8 -BK como agonistas tendenciosos para a via de G_q . (Figura 23).

Resumindo, o objetivo de nosso trabalho foi avaliar a contribuição das posições 0, 5, 7, 8 e 9 na estrutura da BK para a ativação das diferentes vias de sinalização do receptor B_2 , e observar se tais diferenças moleculares poderiam gerar algum tipo de seletividade funcional com impacto em alterações fisiológicas. Este objetivo foi plenamente alcançado, uma vez que obtivemos ligantes que ativam preferencialmente algumas vias de sinalização em detrimento de outras. Acreditamos que o desenvolvimento e estudo de ligantes tendenciosos, como os apresentados neste estudo, tanto para as vias de proteínas G como para as vias de β -arrestinas, contribuem para a melhor compreensão da contribuição de diferentes vias de sinalização em situações fisiopatológicas, e assim contribuem para o futuro desenvolvimento de medicamentos “inteligentes” e com menos efeitos colaterais.

6. CONCLUSÕES

Em resumo, foram identificadas diferentes propriedades importantes para a ligação dos diferentes peptídeos ao receptor B₂ do sistema caliceína-cinina e os resíduos importantes e suas características para o favorecimento de diferentes vias de sinalização. As principais conclusões obtidas neste trabalho foram:

- Na posição 9 dos ligantes de B₂, é importante manter o seguinte conjunto de propriedades para se aumentar a afinidade dos compostos: caráter básico, carga positiva e o correspondente tamanho para a interação com os resíduos do receptor.
- Extensões no N-terminal não influenciam de maneira geral a ligação dos análogos ao receptor.
- Na posição 8 do peptídeo devem-se posicionar resíduos aromáticos e hidrofóbicos para se obter maiores respostas na ativação do receptor , tanto para proteínas G quanto para o recrutamento de β -arrestinas.
- O resíduo Pro⁷ é fundamental tanto para a ligação dos peptídeos ao receptor, assim como para sua funcionalidade sobre diferentes vias de sinalização, já que todos os peptídeos onde este resíduo foi modificado apresentaram baixa afinidade e atividade.
- Os dados gerados durante o presente estudo servirão de base para o processo de desenvolvimento de novos fármacos direcionados à modulação dos receptores do sistema caliceínas-cininas.

7. REFERÊNCIAS

- ABDALLA, S. et al. Involvement of the amino terminus of the B(2) receptor in agonist-induced receptor dimerization. **J Biol Chem**, v. 274, n. 37, p. 26079-84, Sep 10 1999. ISSN 0021-9258 (Print)
- AKBARY, A. M.; WIRTH, K. J.; SCHOLKENS, B. A. Efficacy and tolerability of Icatibant (Hoe 140) in patients with moderately severe chronic bronchial asthma. **Immunopharmacology**, v. 33, n. 1-3, p. 238-42, Jun 1996. ISSN 0162-3109 (Print)
- ALRIC, C. et al. Bradykinin-induced inhibition of cell proliferation and tyrosine kinase activity in rat mesangial cells. **International journal of molecular medicine**, v. 5, n. 1, p. 85-93, Jan 2000. ISSN 1107-3756 (Print)
- ALTAMURA, M. et al. Nonpeptide antagonists for kinin receptors. **Regul Pept**, v. 80, n. 1-2, p. 13-26, Mar 17 1999. ISSN 0167-0115 (Print)
- ARAMORI, I. et al. Nonpeptide mimic of bradykinin with long-acting properties at the bradykinin B2 receptor. **Mol Pharmacol**, v. 52, n. 1, p. 16-20, Jul 1997. ISSN 0026-895X (Print)
- AUBRY, L.; KLEIN, G. True arrestins and arrestin-fold proteins: a structure-based appraisal. **Progress in molecular biology and translational science**, v. 118, p. 21-56, 2013. ISSN 1878-0814 (Electronic)
- BARKI-HARRINGTON, L. et al. Requirement for direct cross-talk between B1 and B2 kinin receptors for the proliferation of androgen-insensitive prostate cancer PC3 cells. **The Biochemical journal**, v. 371, n. Pt 2, p. 581-7, Apr 15 2003. ISSN 0264-6021 (Print)
- BARKI-HARRINGTON, L.; ROCKMAN, H. A. Beta-arrestins: multifunctional cellular mediators. **Physiology (Bethesda)**, v. 23, p. 17-22, Feb 2008. ISSN 1548-9213 (Print)
- BASCANDS, J. L. et al. Evidence for existence of two distinct bradykinin receptors on rat mesangial cells. **The American journal of physiology**, v. 264, n. 3 Pt 2, p. F548-56, Mar 1993. ISSN 0002-9513 (Print)
- BATENBURG, W. W. et al. Mediators of bradykinin-induced vasorelaxation in human coronary microarteries. **Hypertension**, v. 43, n. 2, p. 488-92, Feb 2004. ISSN 1524-4563 (Electronic)
- BENOVIC, J. L. et al. Beta-adrenergic receptor kinase: primary structure delineates a multigene family. **Science**, v. 246, n. 4927, p. 235-40, Oct 13 1989. ISSN 0036-8075 (Print)
- BENOVIC, J. L. et al. Functional desensitization of the isolated beta-adrenergic receptor by the beta-adrenergic receptor kinase: potential role of an analog of the retinal protein arrestin (48-kDa protein). **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 84, n. 24, p. 8879-82, Dec 1987. ISSN 0027-8424 (Print)
- BLACK, J. W.; LEFF, P. Operational models of pharmacological agonism. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 220, n. 1219, p. 141-62, Dec 22 1983. ISSN 0950-1193 (Print)
- BLAUKAT, A. et al. Ligand-induced phosphorylation/dephosphorylation of the endogenous bradykinin B2 receptor from human fibroblasts. **J Biol Chem**, v. 271, n. 50, p. 32366-74, Dec 13 1996. ISSN 0021-9258 (Print)
- BLAUKAT, A. et al. G protein-coupled receptor-mediated mitogen-activated protein kinase activation through cooperation of G alpha(q), and G alpha(i) signals. **Mol Cell Biol**, v. 20, n. 18, p. 6837-6848, Sep 2000. ISSN 0270-7306. Disponível em: <Go to ISI>://000088979100021 >.
- BLAUKAT, A. et al. Determination of bradykinin B2 receptor in vivo phosphorylation sites and their role in receptor function. **J Biol Chem**, v. 276, n. 44, p. 40431-40, Nov 2 2001. ISSN 0021-9258 (Print)

BOHN, L. M. et al. Enhanced morphine analgesia in mice lacking beta-arrestin 2. **Science**, v. 286, n. 5449, p. 2495-8, Dec 24 1999. ISSN 0036-8075 (Print)

BURCH, R. M.; AXELROD, J. Dissociation of bradykinin-induced prostaglandin formation from phosphatidylinositol turnover in Swiss 3T3 fibroblasts: evidence for G protein regulation of phospholipase A2. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 84, n. 18, p. 6374-8, Sep 1987. ISSN 0027-8424 (Print)

CALIXTO, J. B. et al. Kinin B1 receptors: key G-protein-coupled receptors and their role in inflammatory and painful processes. **Br J Pharmacol**, v. 143, n. 7, p. 803-18, Dec 2004. ISSN 0007-1188 (Print)

CHENG, Y.; PRUSOFF, W. H. Relationship between the inhibition constant (K₁) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I₅₀) of an enzymatic reaction. **Biochemical pharmacology**, v. 22, n. 23, p. 3099-108, Dec 1 1973. ISSN 0006-2952 (Print)

DEAR, J. W. et al. Characterization of the bradykinin receptor in the human nasal airway using the binding of [¹²⁵I]-Hoe 140. **Br J Pharmacol**, v. 119, n. 5, p. 1054-62, Nov 1996. ISSN 0007-1188 (Print)

DEBLASI, A.; O'REILLY, K.; MOTULSKY, H. J. Calculating receptor number from binding experiments using same compound as radioligand and competitor. **Trends Pharmacol Sci**, v. 10, n. 6, p. 227-9, Jun 1989. ISSN 0165-6147 (Print)

DERIAN, C. K.; MOSKOWITZ, M. A. Polyphosphoinositide hydrolysis in endothelial cells and carotid artery segments. Bradykinin-2 receptor stimulation is calcium-independent. **J Biol Chem**, v. 261, n. 8, p. 3831-7, Mar 15 1986. ISSN 0021-9258 (Print)

DROUIN, J. N.; ST-PIERRE, S. A.; REGOLI, D. Receptors for bradykinin and kallidin. **Can J Physiol Pharmacol**, v. 57, n. 4, p. 375-9, Apr 1979. ISSN 0008-4212 (Print)

DUNN, F. W.; STEWART, J. M. Analogs of bradykinin containing -2-thienyl-L-alanine. **J Med Chem**, v. 14, n. 9, p. 779-81, Sep 1971. ISSN 0022-2623 (Print)

EL-DAHR, S. S.; DIPP, S.; BARICOS, W. H. Bradykinin stimulates the ERK-->Elk-1-->Fos/AP-1 pathway in mesangial cells. **The American journal of physiology**, v. 275, n. 3 Pt 2, p. F343-52, Sep 1998. ISSN 0002-9513 (Print)

EMANUELI, C.; MADEDDU, P. Targeting kinin receptors for the treatment of tissue ischaemia. **Trends Pharmacol Sci**, v. 22, n. 9, p. 478-84, Sep 2001. ISSN 0165-6147 (Print)

EMANUELI, C. et al. Dilated and failing cardiomyopathy in bradykinin B(2) receptor knockout mice. **Circulation**, v. 100, n. 23, p. 2359-65, Dec 7 1999. ISSN 0009-7322 (Print)

ENQUIST, J. et al. Kinin-stimulated B1 receptor signaling depends on receptor endocytosis whereas B2 receptor signaling does not. **Neurochem Res**, v. 39, n. 6, p. 1037-47, Jun 2014. ISSN 1573-6903 (Electronic)

ESCHER, E. et al. Pharmacological properties of two analogues of angiotensin II containing carboranylalanine (Car). **Eur J Pharmacol**, v. 66, n. 4, p. 267-72, Sep 5 1980. ISSN 0014-2999 (Print)

EVANS, B. A. et al. Quantification of functional selectivity at the human alpha(1A)-adrenoceptor. **Mol Pharmacol**, v. 79, n. 2, p. 298-307, Feb 2011. ISSN 1521-0111 (Electronic)

EWALD, D. A. et al. Differential G protein-mediated coupling of neurotransmitter receptors to Ca²⁺ channels in rat dorsal root ganglion neurons in vitro. **Neuron**, v. 2, n. 2, p. 1185-93, Feb 1989. ISSN 0896-6273 (Print)

FASOLATO, C. et al. Generation of inositol phosphates, cytosolic Ca²⁺, and ionic fluxes in PC12 cells treated with bradykinin. **J Biol Chem**, v. 263, n. 33, p. 17350-9, Nov 25 1988. ISSN 0021-9258 (Print)

FATHY, D. B. et al. Spontaneous human B2 bradykinin receptor activity determines the action of partial agonists as agonists or inverse agonists. Effect of basal desensitization. **J Biol Chem**, v. 274, n. 42, p. 29603-6, Oct 15 1999. ISSN 0021-9258 (Print)

FIELDS, G. B.; NOBLE, R. L. Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids. **Int J Pept Protein Res**, v. 35, n. 3, p. 161-214, Mar 1990a. ISSN 0367-8377 (Print)

_____. Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids. **International journal of peptide and protein research**, v. 35, n. 3, p. 161-214, Mar 1990b. ISSN 0367-8377 (Print)

FLEMING, I.; BUSSE, R. Control and consequences of endothelial nitric oxide formation. **Adv Pharmacol**, v. 34, p. 187-206, 1995. ISSN 1054-3589 (Print)

FLEMING, I.; FISSLTHALER, B.; BUSSE, R. Calcium signaling in endothelial cells involves activation of tyrosine kinases and leads to activation of mitogen-activated protein kinases. **Circ Res**, v. 76, n. 4, p. 522-9, Apr 1995. ISSN 0009-7330 (Print)

_____. Interdependence of calcium signaling and protein tyrosine phosphorylation in human endothelial cells. **J Biol Chem**, v. 271, n. 18, p. 11009-15, May 3 1996. ISSN 0021-9258 (Print)

FOORD, S. M. et al. International Union of Pharmacology. XLVI. G protein-coupled receptor list. **Pharmacol Rev**, v. 57, n. 2, p. 279-88, Jun 2005. ISSN 0031-6997 (Print)

FREDRIKSSON, R. et al. The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. **Mol Pharmacol**, v. 63, n. 6, p. 1256-72, Jun 2003. ISSN 0026-895X (Print)

GAINER, J. V. et al. Effect of bradykinin-receptor blockade on the response to angiotensin-converting-enzyme inhibitor in normotensive and hypertensive subjects. **N Engl J Med**, v. 339, n. 18, p. 1285-92, Oct 29 1998. ISSN 0028-4793 (Print)

GOHLA, A. et al. Differential involvement of Galpha12 and Galpha13 in receptor-mediated stress fiber formation. **J Biol Chem**, v. 274, n. 25, p. 17901-7, Jun 18 1999. ISSN 0021-9258 (Print)

GOLDSTEIN, R. H.; WALL, M. Activation of protein formation and cell division by bradykinin and des-Arg9-bradykinin. **J Biol Chem**, v. 259, n. 14, p. 9263-8, Jul 25 1984. ISSN 0021-9258 (Print)

GROVES, P. et al. Role of endogenous bradykinin in human coronary vasomotor control. **Circulation**, v. 92, n. 12, p. 3424-30, Dec 15 1995. ISSN 0009-7322 (Print)

GUTOWSKI, S. et al. Antibodies to the alpha q subfamily of guanine nucleotide-binding regulatory protein alpha subunits attenuate activation of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate hydrolysis by hormones. **J Biol Chem**, v. 266, n. 30, p. 20519-24, Oct 25 1991. ISSN 0021-9258 (Print)

HAMDAN, F. F. et al. Unraveling G protein-coupled receptor endocytosis pathways using real-time monitoring of agonist-promoted interaction between beta-arrestins and AP-2. **J Biol Chem**, v. 282, n. 40, p. 29089-100, Oct 5 2007. ISSN 0021-9258 (Print)

HARRIS, M. B. et al. Role of heat shock protein 90 in bradykinin-stimulated endothelial nitric oxide release. **General pharmacology**, v. 35, n. 3, p. 165-70, Sep 2000. ISSN 0306-3623 (Print)

HEITSCH, H. Non-peptide antagonists and agonists of the bradykinin B(2) receptor. **Current medicinal chemistry**, v. 9, n. 9, p. 913-28, May 2002. ISSN 0929-8673 (Print)

HESS, J. F. et al. Cloning and pharmacological characterization of a human bradykinin (BK-2) receptor. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 184, n. 1, p. 260-8, Apr 15 1992. ISSN 0006-291X (Print)

HOCK, F. J. et al. Hoe 140 a new potent and long acting bradykinin-antagonist: in vitro studies. **Br J Pharmacol**, v. 102, n. 3, p. 769-73, Mar 1991. ISSN 0007-1188 (Print)

HORNIG, B. et al. AT1-receptor antagonism improves endothelial function in coronary artery disease by a bradykinin/B2-receptor-dependent mechanism. **Hypertension**, v. 41, n. 5, p. 1092-5, May 2003. ISSN 1524-4563 (Electronic)

JONES, S. et al. Bradykinin excites rat sympathetic neurons by inhibition of M current through a mechanism involving B2 receptors and G alpha q/11. **Neuron**, v. 14, n. 2, p. 399-405, Feb 1995. ISSN 0896-6273 (Print)

JOOST, P.; METHNER, A. Phylogenetic analysis of 277 human G-protein-coupled receptors as a tool for the prediction of orphan receptor ligands. **Genome Biol**, v. 3, n. 11, p. RESEARCH0063, Oct 17 2002. ISSN 1474-760X (Electronic)

JU, H. et al. Bradykinin activates the Janus-activated kinase/signal transducers and activators of transcription (JAK/STAT) pathway in vascular endothelial cells: localization of JAK/STAT signalling proteins in plasmalemmal caveolae. **The Biochemical journal**, v. 351, n. Pt 1, p. 257-64, Oct 1 2000. ISSN 0264-6021 (Print)

KAKOKI, M. et al. Bradykinin B1 and B2 receptors both have protective roles in renal ischemia/reperfusion injury. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 18, p. 7576-81, May 1 2007. ISSN 0027-8424 (Print)

KAKOKI, M. et al. Diabetic nephropathy is markedly enhanced in mice lacking the bradykinin B2 receptor. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 36, p. 13302-5, Sep 7 2004. ISSN 0027-8424 (Print)

KANG, D. S.; LEEB-LUNDBERG, L. M. Negative and positive regulatory epitopes in the C-terminal domains of the human B1 and B2 bradykinin receptor subtypes determine receptor coupling efficacy to G(q/11)-mediated [correction of G(9/11)-mediated] phospholipase Cbeta activity. **Mol Pharmacol**, v. 62, n. 2, p. 281-8, Aug 2002. ISSN 0026-895X (Print)

KANG, D. S. et al. Spontaneous formation of a proteolytic B1 and B2 bradykinin receptor complex with enhanced signaling capacity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 21, p. 22102-22107, May 21 2004. ISSN 0021-9258. Disponível em: <Go to ISI>://000221417100052 >.

KANG, D. S.; TIAN, X.; BENOVIĆ, J. L. Role of beta-arrestins and arrestin domain-containing proteins in G protein-coupled receptor trafficking. **Curr Opin Cell Biol**, v. 27, p. 63-71, Apr 2014. ISSN 1879-0410 (Electronic)

KENAKIN, T. et al. A simple method for quantifying functional selectivity and agonist bias. **ACS chemical neuroscience**, v. 3, n. 3, p. 193-203, Mar 21 2012. ISSN 1948-7193 (Electronic)

KINTSURASHVILI, E. et al. Effects of ANG II on bradykinin receptor gene expression in cardiomyocytes and vascular smooth muscle cells. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 281, n. 4, p. H1778-83, Oct 2001. ISSN 0363-6135 (Print)

KYLE, D. J. et al. A proposed model of bradykinin bound to the rat B2 receptor and its utility for drug design. **J Med Chem**, v. 37, n. 9, p. 1347-54, Apr 29 1994. ISSN 0022-2623 (Print)

LAGERSTROM, M. C.; SCHIOTH, H. B. Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery. **Nat Rev Drug Discov**, v. 7, n. 4, p. 339-57, Apr 2008. ISSN 1474-1784 (Electronic)

LAL, M. A.; PROULX, P. R.; HEBERT, R. L. A role for PKC epsilon and MAP kinase in bradykinin-induced arachidonic acid release in rabbit CCD cells. **The American journal of physiology**, v. 274, n. 4 Pt 2, p. F728-35, Apr 1998. ISSN 0002-9513 (Print)

LAMORTE, V. J. et al. Mediation of growth factor induced DNA synthesis and calcium mobilization by Gq and Gi2. **J Cell Biol**, v. 121, n. 1, p. 91-9, Apr 1993. ISSN 0021-9525 (Print)

LEEB-LUNDBERG, L. M. et al. International union of pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences. **Pharmacol Rev**, v. 57, n. 1, p. 27-77, Mar 2005. ISSN 0031-6997 (Print)

LEEB-LUNDBERG, L. M.; SONG, X. H.; MATHIS, S. A. Focal adhesion-associated proteins p125FAK and paxillin are substrates for bradykinin-stimulated tyrosine phosphorylation in Swiss 3T3 cells. **J Biol Chem**, v. 269, n. 39, p. 24328-34, Sep 30 1994. ISSN 0021-9258 (Print)

LEFKOWITZ, R. J. Thrombin receptor. Variations on a theme. **Nature**, v. 351, n. 6325, p. 353-4, May 30 1991. ISSN 0028-0836 (Print)

_____. G protein-coupled receptors. III. New roles for receptor kinases and beta-arrestins in receptor signaling and desensitization. **J Biol Chem**, v. 273, n. 30, p. 18677-80, Jul 24 1998. ISSN 0021-9258 (Print)

_____. Arrestins come of age: a personal historical perspective. **Progress in molecular biology and translational science**, v. 118, p. 3-18, 2013. ISSN 1878-0814 (Electronic)

LEFKOWITZ, R. J.; HAUSDORFF, W. P.; CARON, M. G. Role of phosphorylation in desensitization of the beta-adrenoceptor. **Trends Pharmacol Sci**, v. 11, n. 5, p. 190-4, May 1990. ISSN 0165-6147 (Print)

LIAO, J. K.; HOMCY, C. J. The G proteins of the G alpha i and G alpha q family couple the bradykinin receptor to the release of endothelium-derived relaxing factor. **J Clin Invest**, v. 92, n. 5, p. 2168-72, Nov 1993. ISSN 0021-9738 (Print)

LIEBMANN, C. et al. Dual bradykinin B2 receptor signalling in A431 human epidermoid carcinoma cells: activation of protein kinase C is counteracted by a GS-mediated stimulation of the cyclic AMP pathway. **The Biochemical journal**, v. 313 (Pt 1), p. 109-18, Jan 1 1996. ISSN 0264-6021 (Print)

LINDER, M. E. et al. Purification and characterization of Go alpha and three types of Gi alpha after expression in Escherichia coli. **J Biol Chem**, v. 265, n. 14, p. 8243-51, May 15 1990. ISSN 0021-9258 (Print)

LIU, T. Y.; BOYKINS, R. A. Hydrolysis of proteins and peptides in a hermetically sealed microcapillary tube: high recovery of labile amino acids. **Anal Biochem**, v. 182, n. 2, p. 383-7, Nov 1 1989. ISSN 0003-2697 (Print)

LOHSE, M. J. et al. beta-Arrestin: a protein that regulates beta-adrenergic receptor function. **Science**, v. 248, n. 4962, p. 1547-50, Jun 22 1990. ISSN 0036-8075 (Print)

MADEDDU, P. et al. Cardiovascular phenotype of a mouse strain with disruption of bradykinin B2-receptor gene. **Circulation**, v. 96, n. 10, p. 3570-8, Nov 18 1997. ISSN 0009-7322 (Print)

MAIER, M. et al. Identification of [hydroxyproline³]-lysyl-bradykinin released from human kininogens by human urinary kallikrein. **FEBS Lett**, v. 232, n. 2, p. 395-8, May 23 1988. ISSN 0014-5793 (Print)

MARCEAU, F.; REGOLI, D. Bradykinin receptor ligands: therapeutic perspectives. **Nat Rev Drug Discov**, v. 3, n. 10, p. 845-52, Oct 2004. ISSN 1474-1776 (Print)

MARIE, J. et al. Control of conformational equilibria in the human B2 bradykinin receptor. Modeling of nonpeptidic ligand action and comparison to the rhodopsin structure. **J Biol Chem**, v. 276, n. 44, p. 41100-11, Nov 2 2001. ISSN 0021-9258 (Print)

MARRERO, M. B. et al. Endothelial nitric oxide synthase interactions with G-protein-coupled receptors. **The Biochemical journal**, v. 343 Pt 2, p. 335-40, Oct 15 1999. ISSN 0264-6021 (Print)

MATHIS, S. A.; CRISCIMAGNA, N. L.; LEEB-LUNDBERG, L. M. B1 and B2 kinin receptors mediate distinct patterns of intracellular Ca²⁺ signaling in single cultured vascular smooth muscle cells. **Mol Pharmacol**, v. 50, n. 1, p. 128-39, Jul 1996. ISSN 0026-895X (Print)

MAUDSLEY, S.; MARTIN, B.; LUTTRELL, L. M. The origins of diversity and specificity in G protein-coupled receptor signaling. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 314, n. 2, p. 485-94, Aug 2005. ISSN 0022-3565 (Print)

MCCUDDEN, C. R. et al. G-protein signaling: back to the future. **Cell Mol Life Sci**, v. 62, n. 5, p. 551-77, Mar 2005. ISSN 1420-682X (Print)

MCDONALD, P. H.; LEFKOWITZ, R. J. Beta-Arrestins: new roles in regulating heptahelical receptors' functions. **Cell Signal**, v. 13, n. 10, p. 683-9, Oct 2001. ISSN 0898-6568 (Print)

MCEACHERN, A. E. et al. Expression cloning of a rat B2 bradykinin receptor. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 88, n. 17, p. 7724-8, Sep 1 1991. ISSN 0027-8424 (Print)

MCLEAN, P. G.; AHLUWALIA, A.; PERRETTI, M. Association between kinin B(1) receptor expression and leukocyte trafficking across mouse mesenteric postcapillary venules. **J Exp Med**, v. 192, n. 3, p. 367-80, Aug 7 2000. ISSN 0022-1007 (Print)

MEACCI, E. et al. Effect of Rho and ADP-ribosylation factor GTPases on phospholipase D activity in intact human adenocarcinoma A549 cells. **J Biol Chem**, v. 274, n. 26, p. 18605-12, Jun 25 1999. ISSN 0021-9258 (Print)

MENKE, J. G. et al. Expression Cloning of a Human B-1 Bradykinin Receptor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 34, p. 21583-21586, Aug 26 1994. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <Go to ISI>://A1994PK97300032 >.

MERRIFIELD, R. B. Solid Phase Peptide Synthesis .1. Synthesis of a Tetrapeptide. **Journal of the American Chemical Society**, v. 85, n. 14, p. 2149-&, 1963a. ISSN 0002-7863. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A19633101B00025 >.

_____. Solid Phase Peptide Synthesis .1. Synthesis of a Tetrapeptide. **J Am Chem Soc**, v. 85, n. 14, p. 2149-&, 1963b. ISSN 0002-7863. Disponível em: < <Go to ISI>://A19633101B00025 >.

MOORE, S.; SPACKMAN, D. H.; STEIN, W. H. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. **Fed Proc**, v. 17, n. 4, p. 1107-15, Dec 1958. ISSN 0014-9446 (Print)

MORRIS, A. J.; MALBON, C. C. Physiological regulation of G protein-linked signaling. **Physiol Rev**, v. 79, n. 4, p. 1373-430, Oct 1999. ISSN 0031-9333 (Print)

NARDONE, J.; HOGAN, P. G. Delineation of a region in the B2 bradykinin receptor that is essential for high-affinity agonist binding. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 91, n. 10, p. 4417-21, May 10 1994. ISSN 0027-8424 (Print)

OAKLEY, R. H. et al. Differential affinities of visual arrestin, beta arrestin1, and beta arrestin2 for G protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors. **J Biol Chem**, v. 275, n. 22, p. 17201-10, Jun 2 2000. ISSN 0021-9258 (Print)

OWEN, N. E.; VILLEREAL, M. L. Lys-bradykinin stimulates Na⁺ influx and DNA synthesis in cultured human fibroblasts. **Cell**, v. 32, n. 3, p. 979-85, Mar 1983. ISSN 0092-8674 (Print)

PATEL, K. V.; SCHREY, M. P. Inhibition of DNA synthesis and growth in human breast stromal cells by bradykinin: evidence for independent roles of B1 and B2 receptors in the respective

control of cell growth and phospholipid hydrolysis. **Cancer Res**, v. 52, n. 2, p. 334-40, Jan 15 1992. ISSN 0008-5472 (Print)

PITCHER, J. A. et al. Feedback inhibition of G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) activity by extracellular signal-regulated kinases. **J Biol Chem**, v. 274, n. 49, p. 34531-4, Dec 3 1999. ISSN 0021-9258 (Print)

PRADO, G. N.; TAYLOR, L.; POLGAR, P. Effects of intracellular tyrosine residue mutation and carboxyl terminus truncation on signal transduction and internalization of the rat bradykinin B2 receptor. **J Biol Chem**, v. 272, n. 23, p. 14638-42, Jun 6 1997. ISSN 0021-9258 (Print)

PYNE, S.; PYNE, N. J. Phospholipase D regulation involves extracellular calcium as a conditional requirement for subsequent stimulation by protein kinase C. **Biochem Soc Trans**, v. 23, n. 2, p. 199S, May 1995. ISSN 0300-5127 (Print)

QUITTERER, U. et al. Na⁺ ions binding to the bradykinin B2 receptor suppress agonist-independent receptor activation. **Biochemistry**, v. 35, n. 41, p. 13368-77, Oct 15 1996. ISSN 0006-2960 (Print)

RASK-ANDERSEN, M.; ALMEN, M. S.; SCHIOTH, H. B. Trends in the exploitation of novel drug targets. **Nat Rev Drug Discov**, v. 10, n. 8, p. 579-90, Aug 2011. ISSN 1474-1784 (Electronic)

REGOLI, D.; BARABE, J. Pharmacology of bradykinin and related kinins. **Pharmacol Rev**, v. 32, n. 1, p. 1-46, Mar 1980. ISSN 0031-6997 (Print)

REGOLI, D.; BARABE, J.; PARK, W. K. Receptors for bradykinin in rabbit aortae. **Can J Physiol Pharmacol**, v. 55, n. 4, p. 855-67, Aug 1977. ISSN 0008-4212 (Print)

REGOLI, D. et al. Bradykinin receptors and their antagonists. **Eur J Pharmacol**, v. 348, n. 1, p. 1-10, May 1 1998. ISSN 0014-2999 (Print)

RHALEB, N. E. et al. Characterization of bradykinin receptors in peripheral organs. **Can J Physiol Pharmacol**, v. 69, n. 7, p. 938-43, Jul 1991. ISSN 0008-4212 (Print)

RIAD, A. et al. The role of the renal kallikrein-kinin system in diabetic nephropathy. **Curr Opin Nephrol Hypertens**, v. 16, n. 1, p. 22-6, Jan 2007. ISSN 1062-4821 (Print)

ROMINGER, D. H. et al. Biased ligands: pathway validation for novel GPCR therapeutics. **Current opinion in pharmacology**, v. 16, p. 108-15, Jun 2014. ISSN 1471-4973 (Electronic)

ROSENBAUM, D. M.; RASMUSSEN, S. G.; KOBILKA, B. K. The structure and function of G-protein-coupled receptors. **Nature**, v. 459, n. 7245, p. 356-63, May 21 2009. ISSN 1476-4687 (Electronic)

ROSS, D.; JOYNER, W. L. Resting distribution and stimulated translocation of protein kinase C isoforms alpha, epsilon and zeta in response to bradykinin and TNF in human endothelial cells. **Endothelium : journal of endothelial cell research**, v. 5, n. 4, p. 321-32, 1997. ISSN 1062-3329 (Print)

SHARMA, J. N.; AL-DHALMAWI, G. S. Bradykinin receptor antagonists: therapeutic implications. **IDrugs : the investigational drugs journal**, v. 6, n. 6, p. 581-6, Jun 2003. ISSN 1369-7056 (Print)

SHENOY, S. K.; LEFKOWITZ, R. J. Seven-transmembrane receptor signaling through beta-arrestin. **Science's STKE : signal transduction knowledge environment**, v. 2005, n. 308, p. cm10, Nov 1 2005. ISSN 1525-8882 (Electronic)

SHUKLA, A. K.; XIAO, K.; LEFKOWITZ, R. J. Emerging paradigms of beta-arrestin-dependent seven transmembrane receptor signaling. **Trends Biochem Sci**, v. 36, n. 9, p. 457-69, Sep 2011. ISSN 0968-0004 (Print)

SMITH, J. A. et al. Signal transduction pathways for B1 and B2 bradykinin receptors in bovine pulmonary artery endothelial cells. **Mol Pharmacol**, v. 47, n. 3, p. 525-34, Mar 1995. ISSN 0026-895X (Print)

SQUIRE, I. B. et al. Bradykinin B(2) receptor antagonism attenuates blood pressure response to acute angiotensin-converting enzyme inhibition in normal men. **Hypertension**, v. 36, n. 1, p. 132-6, Jul 2000. ISSN 0194-911X (Print)

STERNE-MARR, R. et al. Polypeptide variants of beta-arrestin and arrestin3. **J Biol Chem**, v. 268, n. 21, p. 15640-8, Jul 25 1993. ISSN 0021-9258 (Print)

TANCREDI, M. et al. Synthesis and biological activity of new bradykinin pseudopeptide B-1 receptor agonists containing alkyl spacers. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 7, n. 20, p. 2661-2664, Oct 21 1997. ISSN 0960-894X. Disponível em: <<Go to ISI>://A1997YF10500021 >.

TILLY, B. C. et al. Inositol phosphate metabolism in bradykinin-stimulated human A431 carcinoma cells. Relationship to calcium signalling. **The Biochemical journal**, v. 244, n. 1, p. 129-35, May 15 1987. ISSN 0264-6021 (Print)

TIPPMER, S. et al. Bradykinin induces translocation of the protein kinase C isoforms alpha, epsilon, and zeta. **Eur J Biochem**, v. 225, n. 1, p. 297-304, Oct 1 1994. ISSN 0014-2956 (Print)

TRAN, H. A.; LIN, F.; GREENBERG, B. H. Potential new drug treatments for congestive heart failure. **Expert Opin Investig Drugs**, v. 25, n. 7, p. 811-26, Jul 2016. ISSN 1744-7658 (Electronic)

TRIFILIEFF, A. et al. Comparative action of new highly potent bradykinin receptor antagonists in the guinea-pig trachea. **Eur J Pharmacol**, v. 239, n. 1-3, p. 227-9, Aug 3 1993. ISSN 0014-2999 (Print)

VAVREK, R. J.; STEWART, J. M. Competitive antagonists of bradykinin. **Peptides**, v. 6, n. 2, p. 161-4, Mar-Apr 1985. ISSN 0196-9781 (Print)

VISCUSI, E. R. et al. A randomized, phase 2 study investigating TRV130, a biased ligand of the mu-opioid receptor, for the intravenous treatment of acute pain. **Pain**, v. 157, n. 1, p. 264-72, Jan 2016. ISSN 1872-6623 (Electronic)

WEI, H. et al. Independent beta-arrestin 2 and G protein-mediated pathways for angiotensin II activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 19, p. 10782-7, Sep 16 2003. ISSN 0027-8424 (Print)

WILK-BLASZCZAK, M. A. et al. The G protein G13 mediates inhibition of voltage-dependent calcium current by bradykinin. **Neuron**, v. 13, n. 5, p. 1215-24, Nov 1994. ISSN 0896-6273 (Print)

WITHEROW, F. N. et al. Bradykinin contributes to the vasodilator effects of chronic angiotensin-converting enzyme inhibition in patients with heart failure. **Circulation**, v. 104, n. 18, p. 2177-81, Oct 30 2001. ISSN 1524-4539 (Electronic)

XIE, P. et al. Activation of NF-kappa B by bradykinin through a Galpha(q)- and Gbeta gamma-dependent pathway that involves phosphoinositide 3-kinase and Akt. **J Biol Chem**, v. 275, n. 32, p. 24907-14, Aug 11 2000. ISSN 0021-9258 (Print)

XING, M.; TAO, L.; INSEL, P. A. Role of extracellular signal-regulated kinase and PKC alpha in cytosolic PLA2 activation by bradykinin in MDCK-D1 cells. **The American journal of physiology**, v. 272, n. 4 Pt 1, p. C1380-7, Apr 1997. ISSN 0002-9513 (Print)

YANAGA, F.; HIRATA, M.; KOGA, T. Evidence for coupling of bradykinin receptors to a guanine-nucleotide binding protein to stimulate arachidonate liberation in the osteoblast-like cell line, MC3T3-E1. **Biochim Biophys Acta**, v. 1094, n. 2, p. 139-46, Sep 3 1991. ISSN 0006-3002 (Print)

YANO, K. et al. Bradykinin-induced transient accumulation of inositol trisphosphate in neuron-like cell line NG108-15 cells. **FEBS Lett**, v. 181, n. 2, p. 403-6, Feb 25 1985. ISSN 0014-5793 (Print)

ZHANG, X. et al. Characterization of dual agonists for kinin B1 and B2 receptors and their biased activation of B2 receptors. **Cell Signal**, v. 24, n. 8, p. 1619-31, Aug 2012. ISSN 1873-3913 (Electronic)

ZIMMERMAN, B. et al. Role of ssarrestins in bradykinin B2 receptor-mediated signalling. **Cell Signal**, v. 23, n. 4, p. 648-59, Apr 2011. ISSN 1873-3913 (Electronic)

8. ANEXOS

8.1 Cromatogramas e espectros obtidos na caracterização dos análogos sintetizados

- Met⁰-BK

Perfil cromatográfico do análogo.

Perfil obtido do análise de aminoácidos do análogo.

- His9-BK

Perfil cromatográfico do análogo.

Perfil obtido no análise de aminoácidos do análogo.

Espectro de massas do análogo

- **Met⁰-His⁹-BK**

Perfil cromatografico do análogo.

Perfil obtido do analise de aminoácidos do análogo.

Espectro de massas do análogo.

- D-Ala⁸-BK

Perfil cromatográfico do análogo.

Perfil obtido do análise de aminoácidos do análogo.

- **Met⁰-D-Ala⁸-BK**

Perfil Cromatografico do análogo.

Perfil obtido do analise de aminoácidos do análogo.

Espectro de masas do análogo.

- **Thi^{5,8}-His⁹-BK**

Perfil cromatográfico do análogo.

- **Trp⁸-His⁹-BK**

Perfil cromatográfico do análogo.

- **Orn⁹-BK**

Perfil cromatográfico do análogo.

- **Glu⁹-BK**

Perfil cromatográfico do análogo.

- **Trp⁸-BK**

Perfil cromatográfico do análogo.

- **Leu⁸-BK**

Perfil cromatográfico do análogo.

- **Thi^{5,8}-BK**

Perfil cromatográfico do análogo.

- **Tyr(Me)⁸-BK**

Perfil cromatográfico do análogo.

- **D-Arg-Thi⁵-Leu⁸-BK**

Perfil cromatográfico do análogo.

- **D-Arg-Hyp³-Thi^{5,8}-D-Phe⁷-BK**

- **D-Arg-Hyp³-D-Phe⁷-BK**

Perfil cromatografico do analogo.

- **D-Arg-Hyp³-D-Phe⁷-Leu⁸-BK**

Perfil cromatografico do analogo.

- **D-Phe⁷-BK**

Perfil cromatografico do analogo.

- **Thi⁸-BK**

Perfil cromatografico do peptideo purificado.

- **Thi⁵-BK**

Perfil cromatografico do peptideo purificado.

- **Ser⁸-BK**

Perfil cromatografico do peptideo purificado.

8.2 Valores de $\Delta\text{Log}\tau/K_a$ e $\Delta\Delta\text{Log}\tau/K_a$ para cada um dos análogos respeito a BK em cada uma das vias avaliadas.

Tabela 1. Valores de $\Delta\text{Log}\tau/K_a$ de cada um dos análogos respeito a BK em cada uma das vias avaliadas.

Análogo	$\Delta\text{Log}\tau/K_a$			
	Proteína G_q	Proteína G_{i3}	β -arrestina1	β -arrestina2
Met ⁰ -BK	-0.72 ± 0.22	-	-	-2.17 ± 0.18
Trp ⁸ -BK	-2.01 ± 0.27	*	-2.14 ± 0.25	*
Leu ⁸ -BK	-0.9 ± 0.21	*	-1.17 ± 0.19	*
Thi ^{5,8} -BK	0.86 ± 0.2	-1.02 ± 0.2	-0.32 ± 0.13	0.47 ± 0.16
Tyr(Me) ⁸ -BK	0.79 ± 0.19	-1.04 ± 0.25	0.61 ± 0.51	-0.08 ± 0.16
D-Arg ⁰ -Thi ⁵ -Leu ⁸ -BK	-1.71 ± 0.33	-1.23 ± 0.25	-1.32 ± 0.14	-3.31 ± 0.14
Thi ⁸ -BK	0.98 ± 0.22	-1.3 ± 0.26	-0.34 ± 0.14	-0.33 ± 0.15
Thi ⁵ -BK	0.58 ± 0.25	-1.09 ± 0.27	0.04 ± 0.15	-0.27 ± 0.14
Ser ⁸ -BK	-1.85 ± 0.2	*	-1.67 ± 0.14	*

Os análogos foram comparados com o seu valor do $\Delta\text{Log}\tau/K_a$ em comparação ao peptídeo de referência (BK). * Análogos donde não foi quantificável o valor de $\Delta\text{Log}\tau/K_a$.

Tabela 2. Valores de $\Delta\Delta\text{Log}\tau/K_a$ de cada um dos análogos respeito a BK e em comparação em duas vias diferentes.

Análogo	$\Delta\Delta\text{Log}\tau/K_a$					
	$\beta\text{-arr2 vs. } G_q$	$\beta\text{-arr1 vs. } G_q$	$G_{i3} \text{ vs. } G_q$	$\beta\text{-arr2 vs. } G_{i3}$	$\beta\text{-arr1 vs. } G_{i3}$	$\beta\text{-arr2 vs. } \beta\text{-arr1}$
Met⁰-BK	-1.45 ± 0.28	-	-	-	-	-
Trp⁸-BK	-2.01 ± 0.50	-0.13 ± 0.37	*	*	*	-1.88 ± 0.49
Leu⁸-BK	-2.23 ± 0.29	-0.27 ± 0.28	*	*	*	-1.96 ± 0.28
Thi^{5,8}-BK	-0.39 ± 0.28	-1.18 ± 0.24	-1.88 ± 0.28	1.49 ± 0.27	0.7 ± 0.24	0.79 ± 0.21
Tyr(Me)⁸-BK	-0.87 ± 0.25	-0.18 ± 0.54	-1.83 ± 0.31	0.96 ± 0.29	1.65 ± 0.57	-0.69 ± 0.53
D-Arg⁰-Thi⁵-Leu⁸-BK	-1.6 ± 0.35	0.39 ± 0.36	0.48 ± 0.41	-2.08 ± 0.28	-0.09 ± 0.28	-1.99 ± 0.19
Thi⁸-BK	-1.31 ± 0.26	-1.32 ± 0.25	-2.28 ± 0.33	0.97 ± 0.29	0.96 ± 0.29	0.01 ± 0.20
Thi⁵-BK	-0.85 ± 0.28	-0.54 ± 0.29	-1.67 ± 0.37	0.82 ± 0.31	1.13 ± 0.31	-0.31 ± 0.21
Ser⁸-BK	-1.08 ± 0.25	0.18 ± 0.25	*	*	*	-1.26 ± 0.20

Os análogos foram comparados com o seu valor do $\Delta\text{Log } \tau/K_a$ em comparação ao peptídeo de referência (BK). * Análogos donde não foi quantificável o valor de $\Delta\text{Log } \tau/K_a$.