Claudiana Lameu

"O SISTEMA NERVOSO CENTRAL COMO ALVO DAS AÇÕES ANTI-HIPERTENSIVAS DE UM PEPTÍDEO RICO EM RESÍDUOS DE PROLINA DO VENENO DA Bothrops jararaca"

Tese apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção de Título de Doutor em Ciências (Bioquímica)

Orientador: Prof. Dr. Henning Ulrich

Co-orientadora: Profa.Dra. Mirian Hayashi

São Paulo

2009

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

Dedico esse trabalho e toda a minha vida aos meus queridos e amados pais ***Alberto*** *(in memorian) e* ***Ana*** *pelo incentivo nos estudos, pelos conselhos e acima de tudo pelo amor e carinho que sempre me deram.*

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

*Aos meus amados irmãos **Neto** e **Leandro**, que apesar de algumas brigas quando éramos crianças e divergências de idéias quando adultos somos grandes amigos e cúmplices. E às respectivas esposas **Viviane** e **Bárbara** que aprendi a amar.*

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

*Às minhas grandes tias **Ana** e **Alice**, pois mais do que tias são na minha vida pessoas que não tenho como adjetivar.*

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

*Ao meu marido e grande amor **Eduardo** que sempre acreditou e acredita no meu sucesso. Espero que ele esteja certo: Oxalá que um dia eu tenha sucesso!!!!*

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

Ao meu filhinho lindo e maravilhoso ***Eduardo*** *(Dudu), porque mesmo sem saber me ajudou muito, por não cobrar tanto a minha ausência, por me fazer esquecer os problemas, por me fazer sorrir quando a minha vontade era chorar e pelo seu amor puro.*

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

Ao meu Deus, por ter me dado amor, saúde, inteligência, paciência e força. Sem Ele não teria nada o que dedicar, nem a quem dedicar e nem o que estudar.

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

Agradecimentos

Ao **Prof. Dr. Henning Ulrich** pela orientação e apoio na realização desse trabalho.

Ao **Prof. Dr. Antonio Carlos Martins de Camargo** por todas as discussões, incentivo e oportunidade, e principalmente por sempre pensar no meu futuro.

À **Prof. Dra. Mirian Hayashi** do Departamento de Farmacologia-UNIFESP pela co-orientação e principalmente pelo "ponta-pé" inicial na minha carreira, foi ela quem me ensinou a amar a pesquisa.

Ao amigo **Dr. Carlos Alberto** pelas discussões e apoio.

À **Dra. Marina Assakura** por escutar meus lamentos e por seus preciosos conselhos.

À **Dra. Marcella Faria** pelas discussões e incentivos.

À **Vera Pontieri** pela ajuda nos ensaios *in vivo* e claro, por sua amizade.

Ao **Dr. Robson Mello** pela síntese dos peptídeos.

Ao **Ms. Clécio F. Klitzke** pelas análises no espectrômetro de massas.

Ao **Ms. Eduardo Fontana** pela ajuda nos ensaios de injeção intracerebroventricular.

A **Aparecida Siqueira, Aparecida das Dores, Neusa e Maria José** pelo apoio e amizade.

A **Dra. Toshie Kawano e Alexande S. de Souza** do Laboratório de Parasitologia do Instituto Butantan pela ajuda na microscopia confocal.

Ao **Prof. Dr. Ruy Campos e a sua aluna Érika** do Departamento Fisiologia-UNIFESP pela ajuda nos experimentos de medida direta do nervo renal.

Ao **Dr. Ivo Lebrun** do Laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan pela quantificação de neurotransmissores aminoácidos.

A **Prof. Dra. Claudia Moreira dos Santos** da Escola de Artes, Ciências e Humanidades da Universidade de São Paulo pela ajuda na implantação crônica de cânula guia no SNC.

A todos meus colegas do CAT/CEPID: **Kátia, Gabriel, Danny, Joyce, Joana, Bruno**.

Ao **quase Dr. Juliano Guerreiro** pela ajuda nos ensaios de cromatografia de afinidade, pela amizade, pelas discussões, pelos cafés, pelas risadas e pelas cantorias. Ah... e por ter me aturado durante todos esses anos (desde a iniciação científica), apesar de achar que ele deveria me agradecer, pois aturá-lo não foi nada fácil!

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

À **FAPESP** pelo apoio financeiro.

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

"Tente penetrar nos segredos da natureza com os meios limitados que possuímos e descobrirá que, por trás de todas as concatenações discerníveis, ainda resta algo sutil, intangível e inexplicável. Venerar essa força que está além de tudo o que nos é compreensível é a minha religião"

Albert Einstein

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

Resumo

Lameu, C/ Gomes, CL. **O sistema nervoso central como alvo das ações anti-hipertensivas de um peptídeo rico em resíduos de prolina do veneno da *Bothrops jararaca***. 2009. 158p. Tese de Doutorado – Programa de Pós Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Os peptídeos potenciadores da bradicinina (BPPs) presentes no veneno da serpente *Bothrops jararaca* são oligopeptídeos ricos em prolinas. Eles foram os primeiros inibidores naturais da enzima conversora de angiotensina (ECA) descritos. As propriedades bioquímicas e farmacológicas desses peptídeos foram essenciais para o desenvolvimento do captopril, o primeiro inibidor sítio-dirigido da ECA, usado para tratar a hipertensão humana. Recentes dados têm sugerido que a atividade farmacológica dos BPPs não pode ser explicada somente pela ação inibitória da atividade da ECA e que os efeitos dos BPPs devem envolver a participação do sistema nervoso central (SNC). Nesse trabalho foi caracterizada a sinalização de Ca^{2+} induzida pelo BPP-10c [<ENWPHPQIPP] em células neuronais obtidas de cultura primária de cérebro de ratos neonatos. As elevações na $[Ca^{2+}]_i$ induzida por várias concentrações de BPP-10c revelaram uma curva dose-resposta atípica. A resposta máxima de transientes de $[Ca^{2+}]_i$ foram medidas na concentração de 1 μM de BPP-10c, enquanto que em concentrações mais elevadas houve um declínio das respostas de $[Ca^{2+}]_i$. Esse efeito foi independente da atividade do receptor de bradicinina (BK) e foi mediado por um receptor acoplado a $G_{i/0}$. A sinalização do BPP-10c levou a um aumento da produção de óxido nítrico (NO) por células neuronais, como decorrência da ativação da NOS, uma enzima Ca^{2+}-dependente e da super-expressão da NO sintase endotelial (eNOS) e da argininosuccicinato sintase (ASS), enzima passo limitante no fornecimento de substrato

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

para a NOS. Além disso, ensaios de afinidade com o BPP-10c revelaram além da ASS, a sinapsina como potencial alvo do BPP-10c no SNC. O fato do BPP-10c interagir com a sinapsina, proteína envolvida com a exocitose, e aumentar a produção de NO por células neuronais pode explicar a sua capacidade de induzir a liberação dos neurotransmissores, GABA e glutamato, ambos com importante papel na regulação da pressão arterial. O NO no SNC também age como neurotransmissor, regulando a atividade simpática e parassimpática. O BPP-10c produz queda da pressão da arterial e da freqüência cardíaca, indicando uma interferência direta na atividade autonômica simpática, parassimpática ou ambas, provocando mudanças no controle barorreflexo da freqüência cardíaca. De fato, esse peptídeo mostrou aumentar a sensibilidade barorreflexa de SHRs que está diminuída nesses animais quando comparados a ratos normotensos. Foi demonstrado também que o efeito do BPP-10c administrado perifericamente foi semelhante ao administrado centralmente, sugerindo que o efeito anti-hipertensivo do BPP-10c deve envolver o SNC. Dessa maneira, apesar do bem caracterizado efeito anti-hipertensivo baseado na inibição da ECA, esse trabalho evidencia a existência de um segundo mecanismo para ação do BPP-10c no controle da pressão arterial. No SNC, o BPP-10c modula a expressão da eNOS e da ASS e induz um aumento na produção de NO e liberação dos neurotransmissores, GABA e glutamato, para controlar a atividade simpática e/ou parassimpática que reflete no aumento da sensibilidade do barorreflexo de SHRs. Sendo assim, as características bioquímicas e farmacológicas do BPP-10c abrem perspectivas para o desenvolvimento de fármacos baseado em um novo alvo terapêutico.

Palavras-chave: Peptídeos potenciadores da bradicinina, óxido nítrico, sinapsina, anti-hipertensivo, sistema nervoso central, barorreflexo.

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

Abstract

Lameu, C/ Gomes, CL. **The central nervous system as target for anti-hypertensive actions of a proline-rich peptide from *Bothrops jararaca* venom.** 2009. 158p. PhD Thesis – Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Pyroglutamyl proline-rich oligopeptides, denominated bradykinin-potentiating peptides (BPPs), present in the venom of the viper *Bothrops jararaca* were the first described naturally occurring angiotensine-converting enzyme (ACE) inhibitors. The biochemical and pharmacological properties of theses peptides were essential for the development of captopril, the first active site-directed inhibitor of ACE, currently used to treat human hypertension. Recent data have suggested that the pharmacological activity of BPPs could not only be explained by their inhibitory action on the ACE activity and that BPP-mediated effects may involve the central nervous system. In this work, we have characterized BPP-10c [<ENWPHPQIPP]-induced calcium signaling in neuronal cells obtained as primary culture from day 1 of postnatal rat brain. Elevations of $[Ca^{2+}]_i$ induced by increasing concentrations of BPP-10c revealed an atypical dose-response curve. Maximal $[Ca^{2+}]_i$ peak values were measured at 1 μM BPP-10c concentration, while further raising BPP-10c concentrations led to a decline of $[Ca^{2+}]_i$ responses. This effect was independent from kinin-B2 receptor activity and was mediated by a yet unknown $G_{i/0}$ protein-coupled receptor. BPP-10c signaling promoted an increase of nitric oxide (NO) production in neuronal cells, as consequence of Ca^{2+}-dependent NO synthase activation and upregulated gene expression of endothelial NO synthase (eNOS) and argininosuccicinato synthase (ASS), a limiting step enzyme in the NO-citrulline cycle. Furthermore, affinity chromatography assays revealed ASS and

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

synapsin as potential binding partners of BPP-10c in the CNS. In view of that BPP-10c interacts with synapsin, a protein involved with exocytosis, and induces NO production in neuronal cells, these data could explain its capacity of inducing release of the neurotransmitters GABA and glutamate with important roles in blood pressure regulation. NO also acts as neurotransmitter in the CNS, thereby regulating sympathetic and parasympathetic activities. The presence of BPP-10c also mediates reduction of arterial pressure and heart rate suggesting direct interference of BPP action with autonomic sympathetic and/or parasympathetic activity and the baroreflex control of the heart rate. In agreement, this peptide led to increased baroreflex sensitivity of spontaneous hypertensive rats. We have also demonstrated that the BPP-10c-mediated anti-hypertensive effect was similar following peripheral or central administration, suggesting the participation of the CNS in this process. The existence of a second mechanism for BPP-10c action on blood pressure control as new therapeutic target which is independent from ACE inhibition shall initiate novel approaches for anti-hypertensive drugs.

Keywords: Bradykinin-potentiating peptides, nitric oxide, synapsin, anti-hypertensive, central nervous system, baroreflex.

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

Lista de Tabelas

TABELA 1. Peptídeos Potenciadores da Bradicinina (*"Bradykinin Potentiating Peptides"* - BPPs) do veneno bruto da *Bothrops jararaca*.....24

TABELA 2. Atividade biológica dos BPPs.....28

TABELA 3: Iniciadores usados para amplificação de fragmentos de cDNA dos genes que codificam para as proteínas nNOS, eNOS, ASS e GAPDH por PCR em tempo real.....67

TABELA 4. Exclusão de receptores acoplados a proteína G como possíveis receptores para o BPP-10c.....89

TABELA 5. Proteínas encefálicas identificadas por espectrometria de massas.....95

Lista de Figuras

FIGURA 1. Ação da ECA sobre o sistema renina-angiotensina e sistema calicreína-cininas e a interferência dos BPPs em ambos sistemas.....27

FIGURA 2. Representação esquemática do sistema reflexo e o envolvimento dos neurotransmissores glutamato e GABA na regulação da pressão arterial.....33

FIGURA 3. Esquema de possíveis vias de sinalização de Ca^{2+} intracelular.....41

FIGURA 4. Representação esquemática das três principais funções da argininosuccinato sintase (ASS) em mamíferos.....45

FIGURA 5. L-arginina como precursor da síntese de poliaminas.....47

FIGURA 6: Curva dose-resposta para elevação da $[Ca^{2+}]_i$ induzida pelo BPP-10c em células Neu-W.....76

FIGURA 7: Relação seqüência e atividade do BPP-10c.....78

FIGURA 8. Caracterização da via de sinalização de Ca^{2+} do BPP-10c e BK em células Neu-W.....80

FIGURA 9. Comparação do aumento da $[Ca^{2+}]_i$ induzido pelo BPP-10c em células neuronais e gliais.....82

FIGURA 10. Avaliação da variação da $[Ca^{2+}]_i$ em células SK-N-AS estimuladas com captopril, BPP-10c ou BK, por microscopia confocal.....84

FIGURA 11. Avaliação da variação da $[Ca^{2+}]_i$ em células Neu-W estimuladas com BPP-10c ou BK, por microscopia confocal.....85

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

FIGURA 12. Respostas de aumento da $[Ca^{2+}]_i$ induzida pelo BPP-10c em células Neu-W não são mediadas por receptor B2 de bradicinina.....86

FIGURA 13. Interferência de antagonistas dos receptores B1 e B2 de cininas, α-2 adrenérgico e NMDA na resposta de Ca^{2+} induzida pelo BPP-10c.....87

FIGURA 14. Efeito do BPP-10c sobre o acúmulo de AMP_c em células Neu-W e C6.....88

FIGURA 15. Análise por SDS-PAGE dos eluatos das cromatografias de afinidade realizada nas colunas HiTrap-BPP-10c.....94

FIGURA 16. Análise por *Western Blot* utilizando anticorpo primário anti-ASS das amostras obtidas por cromatografia de afinidade.....96

FIGURA 17. Concentração de NO em cérebro de ratos Wistar e SHRs tratados com BPP-10c.....98

FIGURA 18. Relação dose-resposta do BPP-10c na produção de NO por células neuronais.....99

FIGURA 19. Produção de NO por células neuronais induzidas pelo BPP-10c.....100

FIGURA 20. Comparação da produção de NO por células de cultura primária do SNC de ratos normotensos e hipertensos induzida pelo BPP-10c.....101

FIGURA 21. Produção de NO total induzida pelo BPP-10c em células Neu-W.....102

FIGURA 22. Ensaio de viabilidade de células Neu-W tratadas com BPP-10c.....103

FIGURA 23. BPP-10c é internalizado por células SK-N-AS.....104

FIGURA 24. Co-localização do Cy3-BPP-10c e da ASS (FITC) em células Neu-W..105

FIGURA 25. Regulação da expressão da ASS, eNOS e nNOS em cérebros de SHRs tratados com BPP-10c.....106

FIGURA 26. Efeito do BPP-10c sobre a liberação de neurotransmissores inibitórios por células neuronais.....108

FIGURA 27. Efeito do BPP-10c sobre a liberação de neurotransmissores excitatórios por células neuronais.....108

FIGURA 28. Sensibilidade do barorreflexo de SHRs tratados com BPP-10c.....110

FIGURA 29. Atividade do nervo simpático renal e da pressão arterial média de SHRs anestesiados tratados BPP-10c.....111

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

FIGURA 30. Parâmetros cardiovasculares de ratos Wistar e SHRs acordados após a injeção central do BPP-10c.....112

FIGURA 31. Sugestão da via de transdução de sinal induzida pelo BPP-10c.....118

FIGURA 32. Estrutura das sinapsinas.....122

FIGURA 33. Mecanismo de ação do BPP-10c no SNC.....137

Lista de abreviaturas

$[Ca^{2+}]_i$ =concentração de cálcio intracelular livre

ASL= argininosuccinato liase

ASS= argininosuccinato sintase

CaM = calmodulina

CICR = liberação de cálcio induzida por cálcio

CNP = peptídeo natriurético tipo C

CVLM = medula ventrolateral caudal

FC = freqüência cardíaca

GPCR = receptores acoplados a proteína G

Neu-W = células de cultura primária de cérebros de ratos neonatos Wistar

NO = óxido nítrico

NOS = óxido nítrico sintase

NTS = núcleo do trato solitário

PAM = pressão arterial média

PLC = fosfolipase C

RFU = unidade relativa de fluorescência

RVLM = medula ventrolateral rostral

SNA = sistema nervoso autônomo

SNC = sistema nervosa central

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

Sumário

1. Introdução.....20
1.1. Hipertensão arterial.....21
1.2. Peptídeos potenciadores da bradicinina (*BPPs – Bradykinin Potentiating Peptides*).....23
1.3. Interferência dos BPPs nos sistemas renina-angiotensina e calicreína-cininas..25
1.4. Dissociação da atividade anti-hipertensiva dos BPPs da inibição da ECA e justificativa para estudar outros mecanismos de ação no SNC.....28
1.5. Bases teóricas.....31
1.5.1. Controle central da hipertensão arterial.....31
1.5.2. Controle barorreflexo da pressão arterial na hipertensão arterial.....35
1.5.3. Sistema nervoso simpático na hipertensão arterial.....36
1.6. Bases experimentais.....37
1.6.1. Sinalização por cálcio.....37
1.6.2. Óxido nítrico – NO.....42
1.6.3. Disponibilidade de substrato para a NOS para a produção de NO.....43
2. Objetivos.....48
2.1. Objetivo geral.....49
2.2. Objetivos específicos.....49
3. Materiais e Métodos.....50
3.1. Síntese, purificação de peptídeos e conjugação do BPP-10c com cianinia 3 (Cy3-BPP-10c).....51
3.2. Preparação da cultura neuronal.....51
3.3. Preparação das culturas de células imortalizadas.....52
3.4. Medidas de variação da concentração de cálcio intracelular livre $[Ca^{2+}]_i$ por microfluorimetria.....53
3.5. Medida de variação da $[Ca^{2+}]_i$ por microscopia confocal.....54
3.6. Medida de geração de AMP_c intracelular.....55
3.7. Teste de ligação utilizando radioligantes e BPP-10c.....56
3.8. Cromatografia de afinidade.....56
3.8.1. Acoplamento do BPP-10c na coluna NHS-activated HP.....56
3.8.2. Preparação dos extratos protéicos de encéfalos de ratos.....57
3.8.3. Ensaio de cromatografia de afinidade.....57
3.8.4. Análise dos eluatos por eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE).....58

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

3.8.5. Tripsinização de proteínas em gel para análise por espectrometria de massas.....58
3.8.6. Identificação de proteínas por espectrometria de massas.....59
3.9. Identificação de proteínas encefálicas com afinidade pelo BPP-10c – confirmação da afinidade do peptídeo pela argininosuccicinato sintase (ASS) por *Western Blot*.....59
3.10. Determinação dos níveis de NO no cérebro de ratos Wistar e SHRs.....60
3.10.1. Aquisição dos parâmetros cardiovasculares de ratos Wistar e SHRs tratados com BPP-10c.....60
3.10.2. Quantificação de NO em cérebro de ratos.....61
3.11. Quantificação de NO em cultura de células.....62
3.12. Ensaio de viabilidade das células tratadas com BPP-10c.....63
3.13. Ensaios de internalização do Cy3-BPP-10c e co-localização com ASS..63
3.14. Quantificação dos níveis de RNA mensageiro em cérebros de ratos.....65
3.14.1. Preparação das amostras.....65
3.14.2. Reações em cadeia da polimerase em tempo real.....65
3.15. Quantificação da liberação de neurotransmissores aminoácidos por células neuronais.....67
3.16. Avaliação da sensibilidade do barorreflexo de SHRs.....68
3.17. Medida direta da atividade do nervo simpático renal.....69
3.17.1. Traqueostomia.....69
3.17.2. Canulação de artéria e veia femorais.....69
3.17.3. Localização e isolamento da artéria e nervo renais.....69
3.17.4. Aquisição dos parâmetros cardiovasculares.....70
3.17.5. Registro da atividade simpática para o nervo renal.....70
3.17.6. Atividade simpática para o nervo renal.....71
3.18. Implantação crônica de cânula guia no SNC para injeção intracerebroventricular do BPP-10c.....71
4. Resultados.....74
4.1. Mobilização de transientes de $[Ca^{2+}]_i$ induzida pelo BPP-10c é dose-dependente e depende da seqüência carboxi-terminal.....75
4.2. Caracterização da transdução de sinal induzida pelo BPP-10c.....78
4.3. Mobilização da $[Ca^{2+}]_i$ induzida pelo BPP-10c em células neuronais.....81

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

4.4. Envolvimento da ativação da proteína $G_{i/o}$ na atividade do BPP-10c em células neuronais.....87
4.5. Proteínas com afinidade pelo BPP-10c.....93
4.5.1. Ensaio de cromatografia de afinidade.....93
4.5.2. Argininosuccinato sintase como proteína ligadora do BPP-10c no SNC.....95
4.6. Produção de NO induzida pelo BPP-10c.....97
4.6.1. Quantificação de NO no cérebro de ratos Wistar e SHRs.....97
4.6.2. Efeito do BPP-10c na produção de NO em cultura de células neuronais.....98
4.6.3. A elevação da $[Ca^{2+}]_i$ e a produção de NO induzido pelo BPP-10c não são neurotóxicos.....102
4.7. Internalização do BPP-10c em células neuronais.....103
4.8. BPP-10c regula a expressão da ASS e eNOS no SNC de SHRs.....105
4.9. BPP-10c induz liberação de transmissores em células neuronais.....107
4.10. Aumento da sensibilidade do barorreflexo induzido pelo BPP-10c.....109
4.11. Medida direta da atividade do nervo simpático renal.....110
4.12. Efeito da injeção central do BPP-10c.....111
5. Discussão.....113
5.1. Mecanismo de indução da sinalização de Ca^{2+} pelo BPP-10c.....114
5.2. Argininosuccinato sintase e sinapsina como alvos putativos do BPP-10c no SNC.....120
5.3. Internalização do BPP-10c em células neuronais e modulação da liberação de NO.....126
5.4. Regulação da expressão da ASS e eNOS em cérebros de SHRs tratados com BPP-10c.....128
5.5. Liberação dos neurotransmissores GABA e glutamato induzida pelo BPP-10c.....129
5.6. Mecanismo de ação do BPP-10c no controle central da pressão arterial.....131
5.6.1. Regulação da atividade simpática renal.....131
5.6.2. Aumento da sensibilidade do barorreflexo induzido pelo BPP-10c.....132
5.6.3. Injeção Central do BPP-10c em ratos acordados.....133
6. Conclusões.....134
7. Referências Bibliográficas.....138
8. Anexos.....153

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

1.INTRODUÇÃO

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

1.1. Hipertensão Arterial

A hipertensão arterial é uma disfunção que atinge um grande número de indivíduos (30% da população brasileira) de diferentes faixas etárias (5% de crianças, 15-20% da população adulta e mais de 50% dos idosos), sexo, etnias, hábitos, dependências químicas, condições psíquicas e ambientais. Apesar do progresso na terapêutica, prevenção, detecção e tratamento, a hipertensão arterial sistêmica, continua sendo um problema grave de saúde pública (informações: IV Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial). No Brasil, as doenças cardiovasculares passaram do patamar de 11,8% na década de 30 para 31,5% da mortalidade geral em 2003. Estão associadas ao aumento de risco de mortalidade e morbidade por derrame, doenças coronárias, insuficiências cardíacas congestiva, doenças renais, causando um impacto negativo na qualidade de vida. Essas doenças são responsáveis por 65% dos óbitos ocorridos, não somente entre os idosos, mas constituindo a segunda causa de morte na faixa etária de 45 a 64 anos e a terceira entre 25 e 44 anos, segundo a Sociedade Brasileira de Hipertensão Arterial.

A hipertensão ainda não pôde ser eliminada porque não há vacinas para prevenir o desenvolvimento, mas pode ser controlada através da adoção de hábitos de vida mais saudáveis ou através de medicamentos. Apesar da disponibilidade no mercado de mais de 75 agentes anti-hipertensivos divididos em 9 classes, incluindo os bloqueadores de aldosterona, β-bloqueadores noradrenérgicos, inibidores de renina, antagonistas do receptor de endotelina e inibidores de peptidases, o controle da pressão arterial de cada paciente esta ainda aquém do desejado (Israili et al., 2007). Por isso, novas classes de drogas anti-hipertensivas e novos compostos têm sido estudados a fim de ampliar a

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

variedade de terapias para o combate à hipertensão arterial nas suas múltiplas expressões.

O setor de desenvolvimento de novas drogas nas indústrias farmacêuticas tem freqüentemente utilizado como ferramenta para busca de novos fármacos, a química combinatória juntamente com a triagem em alta velocidade (*high throughput screening*), que consiste em sintetizar quimicamente milhões de moléculas não-naturais de forma aleatória e selecioná-las através de uma variedade de técnicas pré-estabelecidas dependendo do alvo de interesse, e assim encontrar um fármaco de alto índice terapêutico. Esse processo é conhecido como descoberta de drogas alvo-dirigido (*target-driven drug discovery*) em que o ligante é um xenobiótico (Eliseev, 2004). Entre as inúmeras limitações dessa abordagem, uma das mais importantes, é o reduzido conhecimento de novos alvos putativos (receptores com sete regiões transmembrana com atividade GTPásia - GPCRs, canais iônicos, enzimas, fatores que controlam a expressão gênica, interação proteína-proteína/peptídeo) que poderiam servir para o desenvolvimento de drogas mais eficazes para o tratamento da hipertensão. Um estudo feito recentemente mostrou que muitos dos alvos putativos envolvidos em patologias humanas foram previstos pelos processos “ômicos”, mas ainda não foram efetivamente identificados. Conseqüentemente, são ainda limitados os alvos utilizados para a busca de medicamentos capazes de modular suas ações (Farr-Jones e Downey, 2007). Por outro lado, a natureza, durante todo o processo evolutivo produziu e selecionou uma enorme diversidade de moléculas (endobióticos) com grande potencial de serem utilizadas como modelo estrutural para o desenvolvimento de fármacos por serem altamente seletivas, sendo possível utilizá-las para identificação de novos alvos e conseqüentemente gerar novos fármacos.

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

1.2. Peptídeos potenciadores da bradicinina (*BPPs – Bradykinin Potentiating Peptides*)

Uma boa parte da riqueza molecular natural se encontra nos venenos das serpentes, cujos componentes tem uma altíssima seletividade por proteínas alvos de mamíferos. Apesar das toxinas terem sido geradas para fins como imobilização e/ou digestão de presas tem servido de modelo estrutural para o desenvolvimento de fármacos para o tratamento de várias patologias (Cushman et al., 1987; Scarborough et al., 1993; Nicholson e Graudins, 2002; Koh et al., 2006; Barnett, 2007; Fox e Serrano, 2007).

Além disso, o estudo das toxinas tem contribuído para a validação de novos alvos e conseqüentemente desenvolvimento de drogas/medicamentos, a partir de sua ligação específica, capaz de modular a atividade do alvo. Um exemplo clássico é o captopril, desenvolvido para o tratamento da hipertensão arterial humana, a partir dos peptídeos potenciadores da bradicinina (BPPs - *Bradykinin Potentiating Peptides*), encontrados no veneno da serpente *Bothrops jararaca* (Ferreira et al., 1970a; Ferreira et al., 1970b; Ondetti e Cushman, 1984; Vane, 1999). Os BPPs pertencem a uma classe de oligopeptídeos de cinco a quatorze resíduos de aminoácidos, caracterizados pelo alto conteúdo de prolinas, e invariavelmente, a presença de um resíduo piroglutâmico na extremidade N-terminal e uma prolina na extremidade C-terminal (Ianzer et al., 2004) (Tabela 1). Os BPPs são moléculas capazes de potenciar algumas atividades farmacológicas da bradicinina (BK), como por exemplo, a ação contrátil da musculatura lisa do íleo isolado de cobaia (Ferreira, 1965) e *in vivo* efeitos da BK no sistema nervoso central (SNC), cardiovascular e antinociceptivo (Ferreira, 1965; Camargo e Graeef, 1969; Ribeiro et al., 1971).

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

A primeira explicação apresentada para o efeito de potenciação da BK pelos BPPs foi sugerida quando John Vane e colaboradores identificaram a enzima conversora de angiotensina I (ECA) como alvo para os BPPs (Ferreira et al., 1970a). Os BPPs foram os primeiros inibidores naturais da ECA descritos, apresentando fortes efeitos anti-hipertensivo observados em animais e humanos (Krieger et al., 1971; Gavras et al.,1974). Foi, então, a partir do estudo da estrutura e atividade de um BPP de cinco resíduos de aminoácidos (BPP-5a), que foi desenvolvido o captopril, um inibidor não-peptídico da ECA, terapeuticamente tolerado e passível de administração via oral muito utilizado até hoje no tratamento da hipertensão humana (Ondetti et al., 1977).

TABELA 1. **Peptídeos Potenciadores da Bradicinina (*"Bradykinin Potentiating Peptides"* - BPPs) do veneno bruto da *Bothrops jararaca***. A nomenclatura dos BPPs é baseada no tamanho (número) e na ordem cronológica de descoberta (letras) no veneno das serpentes. <E = ácido piroglutâmico; PM = peso molecular.

Seqüência de aminoácidos	Nome	PM (Da)
<EKWAP	BPP-5a[a,c,d,e]	611,7
<EWPRP	BPP-5b[e]	665,8
<ESWPGP	BPP-6a[a,e]	653,7
<EDGPIPP	BPP-7a[e]	705,8
<EWPRPQIPP	BPP-9a[a,b,e]	1101,3
<ESWPGPNIPP	BPP-10a[a,b,c,e]	1075,2
<ENWPRPQIPP	BPP-10b[b,e]	1215,4
<ENWPHPQIPP	BPP-10c[a,b,c,d,e]	1196,3
<EWPRPTPQIPP	BPP-11a[b,e]	1299,5
<EGRAPGPPIPP	BPP-11b[c,e]	1069,2
<EGRAPHPPIPP	BPP-11c[d]	1149,3
<EGRPPGPPIPP	BPP-11d[e]	1095,3
<EARPPHPPIPP	BPP-11e[d]	1189,4
<EGWAWPRPQIPP	BPP-12a[a,e]	1415,6
<EWGRPPGPPIPP	BPP-12b[d]	1281,5
<EWAQWPRPQIPP	BPP-12c[e]	1485,8
<EGGWPRPGPEIPP	BPP-13a[d,e]	1370,5
<EGGLPRPGPEIPP	BPP-13b[a,b,c,d,e]	1297,5
<EWAQWPRPTPQIPP	BPP-14a[e]	1683,5

a) Ferreira et al. (1970b); b) Ondetti et al. (1971); c) Murayama et al. (1997); d) Hayashi et al. (2003);e) Ianzer et al.(2004).

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

1.3. Interferência dos BPPs nos sistemas renina-angiotensina e calicreína-cininas

A enzima conversora de angiotensina I (ECA) é expressa principalmente no endotélio vascular, em células epiteliais dos tubos proximais dos rins, no cérebro e em células intestinais (Turner e Hooper, 2003). É a enzima responsável pela conversão de angiotensina I em angiotensina II e degradação da BK, portanto pertencente a ambos, sistema renina-angiotensina e sistema calicreína-cininas.

O sistema renina-angiotensina é composto por um conjunto de peptídeos, receptores e enzimas, para controlar o líquido extracelular e a pressão arterial. A formação dos peptídeos efetores desse sistema acontece inicialmente pela ação da renina liberada pelos rins (Kurtz e Wagner, 1999) que age sobre o angiotensinogênio produzido no fígado (Ben-Ari e Garrison, 1988) gerando o decapeptídeo, angiotensina I, que em seguida é clivada pela ECA, formando o octapeptídeo, angiotensina II, potente hipertensor (Ng e Vane, 1967). A angiotensina II tem suas ações mediadas pelos receptores de angiotensina AT_1 e AT_2. A ligação da angiotensina II no receptor AT_1 desencadeia processos celulares produzindo vários efeitos, dentre eles, vasoconstrição, síntese protéica, crescimento celular, regulação da função renal e do equilíbrio hidroeletrolítico (De Gasparo et al., 2000). A angiotensina II também atua como neurotransmissor e neuroregulador modulando o controle central da pressão arterial, a atividade simpática, o apetite pelo sal e a sede (De Gasparo et al., 2000).

O sistema calicreína-cininas representa uma cascata metabólica onde as calicreínas teciduais e plasmática liberam cininas vasoativas a partir de cininogênios de alto e de baixo peso molecular. A BK, um nonapeptídeo, gerado a partir da clivagem do cininogênio de alto peso molecular pela calicreína plasmática é uma das principais cininas do sistema calicreína-cininas.

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

As cininas estão envolvidas em vários processos fisiológicos e patológicos. Devido a capacidade de ativar células endoteliais provocam vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, liberação do ativador do plasminogênio do tipo tecidual (t-PA), produção de óxido nítrico (NO – *nitric oxide*) e metabolização de ácido araquidônico. Sendo assim, participa fisiologicamente da regulação da pressão sanguínea, funções renais e cardíacas e de processos patológicos como a inflamação (Moreau et al., 2005).

As diversas atividades farmacológicas das cininas são mediadas através de ligações com dois tipos de receptores específicos (receptores B_1 e B_2), antes de serem metabolizadas por diversas peptidases (Margolius, 1995). As ações como vasodilatação e hipotensão são mediadas pelo receptor B_2, pela liberação de NO, prostaciclinas e fator hiperpolarizante derivado de endotélio (EDHF). Enquanto as ações mediadas pelos receptores B_1 inclui uma importante função na angiogênese, inflamação e choque séptico. O receptor B_1 diferentemente do receptor B_2 não é expresso constitutivamente, sua expressão é induzida por mediadores da inflamação em condições de injúria. As peptidases (zinco metalopeptidases) são as principais responsáveis pela degradação da BK, incluindo a ECA (Margolius, 1995).

Desde o começo dos anos 90 é conhecido que a ECA somática dispõe de dois sítios ativos homólogos e funcionais, no N-terminal (sítio-N) e no C-terminal (sítio-C) (Wei et al., 1991). Embora, *in vitro*, os dois sítios ativos são altamente eficientes para converter angiotensina I em angiotensina II, e para degradar a BK a BK1-7 e BK1-5 (Jaspard et al., 1993), o sítio-N é várias vezes mais eficiente em hidrolisar outros peptídeos bioativos, assim como o peptídeo AcSDKP, um fator regulatório negativo de diferenciação e proliferação de células troncos hematopoiéticas (Rousseau et al., 1995).

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

Dessa maneira, como inibidores da ECA, o mecanismo de ação anti-hipertensiva dos BPPs envolve a inibição da geração da angiotensina II e potencialização dos efeitos da BK através da inibição da sua degradação. Devido à inibição da ECA pelos BPPs, os efeitos fisiológicos do sistema renina angiotensina estão diminuídos (não há formação de angiotensina II) e os efeitos fisiológicos do sistema calicreína-cininas estão potencializados (inibição da degradação da BK). (Figura 1).

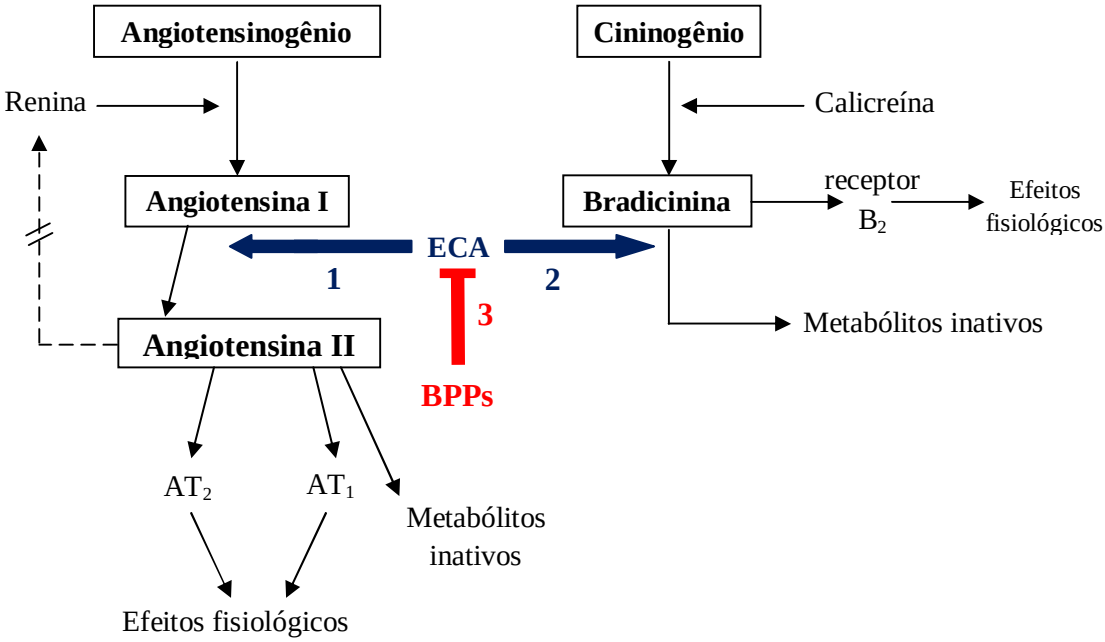

FIGURA 1. Ação da ECA sobre o sistema renina-angiotensina e sistema calicreína-cininas e a interferência dos BPPs em ambos sistemas. **1**) Conversão da angiotensina I em angiotensina II; **2**) Degradação da BK; 3) Inibição da ECA pelos BPPs. Efeitos fisiológicos no sistema renina-angiotensina mediados pelos receptores AT_1 incluem vasoconstrição, retenção de água e sódio, liberação de aldosterona, aumento da atividade nervosa simpática, entre outros; mediados pelos receptores AT_2 incluem diferenciação celular, vasodilatação, entre outros. Os efeitos no sistema calicreína-cininas mediados pelos receptores B_2 de cininas incluem vasodilatação e hipotensão através da liberação de NO, de prostaciclinas e do EDHF. Devido à inibição da ECA pelos BPPs, os efeitos fisiológicos do sistema renina angiotensina estão diminuídos (não há formação de angiotensina II) e os efeitos fisiológicos do sistema calicreína-cininas estão potencializados (inibição da degradação da BK).

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

1.4. Dissociação da atividade anti-hipertensiva dos BPPs da inibição da ECA e justificativa para estudar outros mecanismos de ação no SNC.

Apesar da inibição da ECA ser um mecanismo relevante para explicar a atividade dos BPPs, tem sido sugerido também que a potenciação das ações da BK poderia ser devido a um efeito direto nos receptores de BK (Mueller et al., 2006), pois apesar da alta similaridade da seqüência de aminoácidos, os BPPs mostram uma notável diferença funcional (Tabela 2).

TABELA 2. **Atividade biológica dos BPPs**. Efeito dos BPP-5a, BPP-10c e BPP-11e na potenciação do efeito contrátil BK em íleo isolado de cobaia (*ex vivo*), na inibição dos sítios-N e –C da ECA (*in vitro*), na potenciação do efeito hipotensor da BK em ratos anestesiados (*in vivo*). Os dados são expressos pela média ± erro padrão. (Adaptado de Hayashi e Camargo, 2005).

BPPs	Seqüência de aminoácidos	Potenciação da BK (nmol)	ECA K_i (nM)		Pressão sangüínea sistólica - média de mudança da pressão arterial (% do controle ± SE)
			sítio-N	sítio-C	
BPP-5a	<EWAP	0,36±0,03	400	1280	102±43
BPP-10c	<ENWPHPQIPP	0,48±0,02	200	0,5	195±44
BPP-11e	<EGRAPHPPIPP	2,68±0,20	2000	40	73±19

Por exemplo, o BPP-5a e o BPP-10c, apesar de ambos serem eficientes em potenciar a ação contrátil da BK em íleo isolado de cobaia e a ação hipotensiva em ratos anestesiados, apresentam atividades biológicas diferentes, tanto na potência de inibição como na seletividade pelo sítio ativo da ECA, vale ressaltar que o BPP-5a é menos efetivo como inibidor da ECA que o BPP-10c indicando que essas atividades não estão diretamente relacionadas à inibição da ECA.

Além disso, o BPP-11e, um fraco potenciador do efeito da BK, nem apresenta preferência por algum sítio da ECA, nem está entre os melhores inibidores da enzima, entretanto é tão eficiente quanto o BPP-10c em potenciar a ação hipotensiva da BK em ratos anestesiados. Claramente, os mecanismos, pelos quais os BPPs potenciam a BK,

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

ou em íleo isolado de cobaia ou na pressão arterial de ratos não são os mesmos (Hayashi e Camargo, 2005; Gomes et al., 2007).

Como previamente sugerido (Camargo e Ferreira, 1971; Greene et al., 1972), a atividade de potenciação da BK desses peptídeos não podem ser inteiramente explicadas pela inibição de enzimas que degradam a BK, sugerindo que esses peptídeos interagem com outros alvos.

Recentemente, foi demonstrado por nosso grupo que os efeitos anti-hipertensivos dos BPPs não necessariamente resultam na inibição da hidrólise de angiotensina I em angiotensina II. Foi verificado que esses peptídeos apresentaram uma potente atividade anti-hipertensiva de longa duração, que foi sustentada por mais de seis horas quando administrado via endovenosa a ratos espontaneamente hipertensos (SHR) acordados (Ianzer et al., 2007). O BPP-10c foi alvo do nosso estudo, pois apesar de ser um excelente potenciador dos efeitos da BK *in vitro* e *in vivo* e um potente inibidor da ECA, o efeito anti-hipertensivo do BPP-10c aparenta não envolver somente a inibição da ECA. O efeito anti-hipertensivo produzido pelo BPP-10c apresenta uma resposta tardia, além de ser observado somente em animais espontaneamente hipertensos, indicando que outros mecanismos devem estar envolvidos para explicar a ação desse peptídeo.

As mudanças na pressão arterial média promovida pelo BPP-10c foram associadas com uma significativa redução na freqüência cardíaca, ao invés de um aumento da freqüência cardíaca (Ianzer et al., 2007), como seria esperado pela descarga de barorreceptores devido à hipotensão (Bunag et al., 1975). Estes dados poderiam ser explicados por uma interferência direta na atividade autonômica simpática, parassimpática ou ambas, provocando mudanças no controle barorreflexo da freqüência

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

cardíaca (van Zwieten, 1980; Hayashi et al., 1993; Szabo et al., 2001), requerendo então a ação do BPP-10c no SNC.

Ensaios de biodistribuição do BPP-10c em camundongos revelaram que esse peptídeo após ter sido administrado endovenosamente foi encontrado em vários tecidos, inclusive o cérebro (Silva et al., 2008), mesmo após a saturação dos sítios ativos da ECA, com o inibidor específico, captopril. Estes resultados reforçam a hipótese que o mecanismo de ação do BPP-10c não pode ser explicado somente pela inibição dessa enzima e que uma ação no SNC poderia estar envolvida na atividade anti-hipertensiva desse peptídeo.

O BPP-10c é expresso na glândula de veneno da *Bothrops jararaca*, dentro de uma proteína precursora contendo uma seqüência de sete BPPs e um peptídeo natriurético tipo C – CNP (Murayama et al, 1997). Diferentemente de outros peptídeos natriuréticos, o CNP que é sintetizado no cérebro tem efeito hipotensor independente de ações diuréticas e natriuréticas (Cho et al, 1999).

Ensaios de *Northern blot* mostraram que além do alto nível de expressão na glândula de veneno, a proteína precursora também é expressa em outros tecidos da serpente, como no cérebro (Murayama et al, 1997). Estudos de hibridização *in situ* revelaram a expressão do precursor dos BPPs nas regiões do cérebro da serpente conhecidas por estarem envolvidas no controle neuroendócrino dos fluidos corporais e na regulação cardiovascular, como descrito para o SNC de mamíferos (Hayashi et al, 2003).

Assim, a presença do BPP-10c dentro do mesmo precursor do CNP, a expressão desse precursor em diferentes regiões do cérebro da serpente correlacionadas com funções neuroendócrinas (Hayashi et al., 2003; Hayashi e Camargo, 2005), a biodistribuição desse peptídeo em camundongos (Silva et al., 2008), juntamente com as

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

propriedades bioquímicas e farmacológicas do BPP-10c (Ianzer et al., 2007) sugerem a participação do SNC no mecanismo de ação anti-hipertensiva do BPP-10c.

1.5. Bases teóricas

1.5.1. Controle central da hipertensão arterial

A pressão sangüínea arterial é determinada pelo débito cardíaco e pela resistência ao fluxo de sangue nos vasos. A manutenção das condições adequadas à sobrevivência, mesmo sob fortes variações do meio interno e externo, é conhecida como homeostasia. A rede que controla o organismo, do ponto de vista da homeostasia, é o sistema nervoso autônomo (SNA). Classicamente, o sistema nervoso autônomo é subdividido em dois grandes subsistemas: a divisão simpática e a divisão parassimpática. O SNA dispõe de dois modos de controle do organismo: um modo reflexo e um modo de comando. O "modo reflexo" envolve o recebimento de informações provenientes de cada órgão ou sistema orgânico e a programação e execução de uma resposta apropriada. O "modo de comando" envolve a ativação do SNA por regiões corticais ou subcorticais.

Todas as funções autônomas são mediadas pela liberação de substâncias químicas neurotransmissoras. Estas substâncias podem ser liberadas nos gânglios ou na periferia. Duas substâncias químicas são importantes como transmissores químicos autônomos: a acetilcolina e a noradrenalina. Elas são secretadas pelos neurônios pós-ganglionares e atuam sobre os diferentes órgãos causando efeitos, respectivamente, parassimpáticos ou simpáticos. Portanto, essas substâncias se chamam mediadores colinérgicos e adrenérgicos (Kirstein e Insel, 2004). No entanto, alguns neurotransmissores, além da aceticolina e adrenalina estão envolvidos no controle do sistema autônomo, conhecidos como transmissores não-adrenérgicos não-colinérgicos

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

(NANC – *non-adrenergic non-cholinergic*) (Wiencke et al., 1994; Cartledge et al., 2001).

O sistema simpático aumenta a freqüência cardíaca e a força de contração e o parassismpático lentifica o coração. A estimulação simpática aumenta a pressão sangüínea pelo aumento do débito cardíaco e da resistência periférica (pela constrição de arteríolas pequenas). A estimulação parassimpática tem um efeito pequeno sobre a resistência periférica, embora respostas vasodilatadoras ocorram como, por exemplo, a ruborização. Sob condições de repouso, todos os sistemas de arteríolas são contraídos, pela contínua atividade tônica simpática, em aproximadamente metade de seu diâmetro máximo. Assim uma diminuição no sinal simpático leva a uma vasodilatação e um aumento, a constrição adicional. Sem a contínua atividade tônica do sistema simpático, o sinal simpático poderia apenas aumentar, e assim controlar somente a constrição.

Quando a pressão arterial se eleva acima dos valores basais, potenciais de ação são gerados pela estimulação mecânica dos pressorreceptores (receptores mecanosensitivos) nos nervos depressores aórtico e sinusal, ocorre a exocitose na fenda sináptica de vesículas contendo o aminoácido excitatório glutamato, o qual promove via receptores metabotrópicos e ionotrópicos a excitação do núcleo do trato solitário (NTS) (Chapleau et al., 1995). Uma vez excitado, o NTS irá projetar informações às regiões adjacentes do núcleo dorsal do vago e núcleo ambíguo do vago. Estas regiões contêm os corpos celulares dos neurônios pré-ganglionares do sistema nervoso parassimpático, que desencadeia aumento do tônus vagal sobre o coração. De maneira recíproca, ao se estabelecer o quadro de excitação do NTS, este também enviará informações à região da medula ventrolateral caudal (CVLM) que pela secreção do aminoácido inibitório γ-aminobutírico (GABA) inibe (Gordon e Sved, 2002; Pilowsky e Goodchild, 2002) os neurônios pré-motores simpáticos localizados na medula ventrolateral rostral (RVLM),

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

desencadeando a redução do tônus simpático ao coração e vasos. Como conseqüência de ação conjunta do aumento do tônus vagal e da diminuição do tônus simpático, observa-se a diminuição da freqüência cardíaca, do retorno venoso, do volume sistólico e da resistência vascular periférica e aumento da capacitância venosa. Estas alterações hemodinâmicas reflexas, por sua vez, levam à redução nos níveis de pressão arterial (Michelini, 1999) (Figura 2).

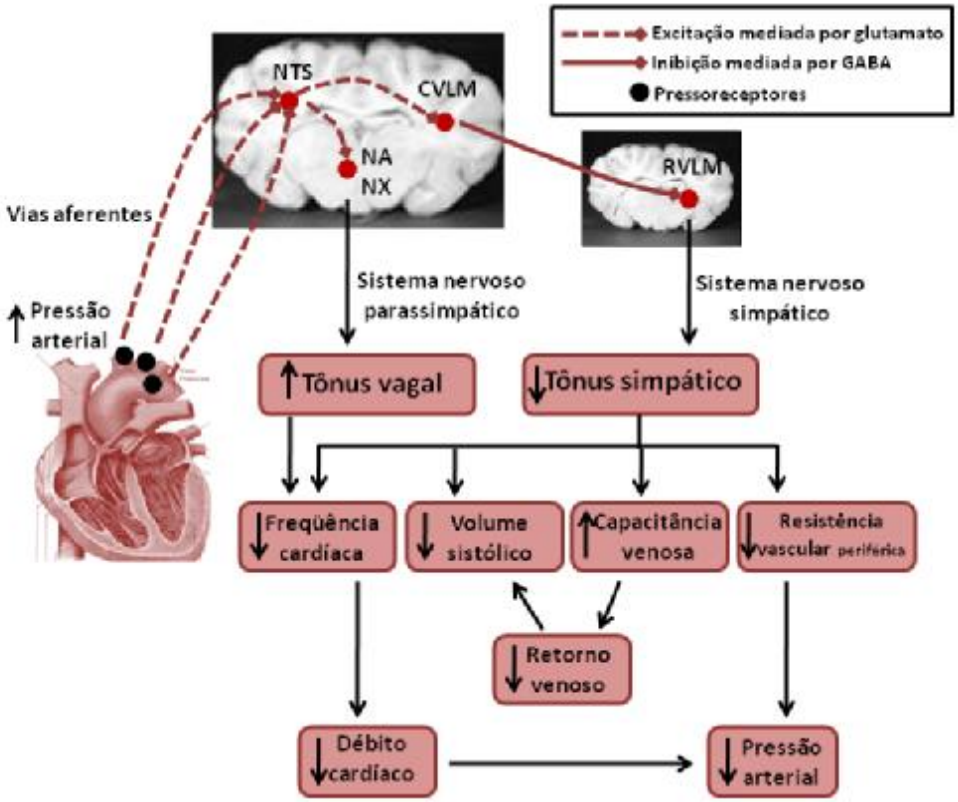

FIGURA 2. Representação esquemática do sistema reflexo e o envolvimento dos neurotransmissores glutamato e GABA na regulação da pressão arterial. O reflexo pressoreceptor participa da homeostase hemodinâmica, por estimulação dos pressoreceptores arteriais há redução reflexa da atividade simpática e aumento da atividade vagal, resultando em dilatação arteriolar, venodilatação, bradicardia e redução da contratibilidade miocárdica. NTS=núcleo da trato solitário; NA=núcleo ambíguo; RVLM=medula ventrolateral rostral do bulbo; CVLM=medula ventrolateral caudal do bulbo. A localização e tamanho dos pressoreceptores, núcleos e áreas são meramente ilustrativos.

Em situação oposta, quando ocorre uma diminuição nos níveis de pressão arterial, os pressorreceptores são menos estimulados e como conseqüência, a atividade

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

do nervo depressor aórtico e sinusal é momentaneamente reduzida, ou até mesmo suprimida. Este fato acarreta em redução ou suspensão da exocitose de vesículas na fenda sináptica contendo o aminoácido glutamato. Com isso, os neurônios do NTS não são devidamente estimulados pelo mediador glutamato e deixam de excitar os neurônios pré-ganglionares localizados no núcleo dorsal motor do vago e núcleo ambíguo do vago, reduzindo assim o tônus vagal sobre o coração. Paralelamente, o NTS também deixa de estimular os neurônios depressores do bulbo ventrolateral rostral e estabelece um quadro de exacerbação simpática. Como conseqüência da diminuição do tônus vagal e do aumento do tônus simpático, observa-se aumento da freqüência cardíaca, do retorno venoso, do volume sistólico e da resistência vascular periférica e diminuição da capacitância venosa que promoverão o aumento da pressão arterial (Michelini, 1999).

A eficiência do controle do barorreflexo arterial em manter os níveis pressóricos dentro de uma faixa mínima da variabilidade, foi visivelmente comprovada pelo estudo clássico realizado pelo professor Krieger em 1964 (Krieger, 1964). Neste estudo, a perda das informações enviadas ao NTS pela denervação sino-aórtica de ratos, aboliu os ajustes autonômicos sobre o sistema cardiovascular provocando como conseqüência uma grande variabilidade da pressão arterial. Dessa forma, fica evidenciado que o controle barorreflexo arterial é um dos principais mecanismos de ação imediata na homeostase hemodinâmica, principalmente por deflagrar uma reposta coordenada entre o tônus simpático e parassimpático sobre o coração e vasos (Krieger, 1964; Chapleau et al., 1995; Michelini, 1999; Chapleau et al., 2001; Lanfranchi e Somers, 2002; Irigoyen et al., 2003; Schlaich et al., 2004).

A capacidade em tamponar as flutuações pressóricas, por meio do controle barorreflexo da freqüência cardíaca e ou do controle do barorreflexo da atividade nervosa simpática tem sido designada na literatura como sensibilidade barorreflexa

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

(Parati et al., 2000). O estudo da sensibilidade barorreflexa tem sido alvo de interesse em diversos laboratórios, os quais passaram a testar a hipótese de que a sua função está associada às doenças cardiovasculares (Grassi et al., 1995; Grassi et al., 2004).

Na hipertensão arterial estabelecida, várias evidências sugerem que alterações no controle barorreflexo arterial e no sistema nervoso simpático estejam envolvidas no desenvolvimento e manutenção da pressão arterial (Chapleau et al., 2001; Lanfranchi e Somers, 2002; Biaggioni, 2003; Schlaich et al., 2004; Smith et al., 2004). Assim, a compreensão da influência do BPP-10c nessas funções autonômicas de manutenção da pressão arterial e seu possível controle, são de grande importância para o esclarecimento do mecanismo de ação central do BPP-10c.

1.5.2. Controle barorreflexo da pressão arterial na hipertensão arterial

Uma particularidade observada nos pressorreceptores é a capacidade deles se adaptarem frente a estímulos crônicos de elevados níveos pressóricos, conseguindo ao longo de poucos dias, deslocar a sua faixa de funcionamento para níveis mais altos de pressão arterial (Krieger, 1989). Em um estudo clássico realizado na década de sessenta, Bristow e colaboradores (Bristow et al., 1969) descreveram, pela primeira vez, que o controle barorreflexo da freqüência cardíaca de pacientes com hipertensão arterial estava significativamente diminuído quando comparado aos indivíduos normotensos. Assim, o processo de adaptação dos pressorreceptores na hipertensão arterial é acompanhado de uma diminuição da sensibilidade barorreflexa.

Décadas após a investigação pioneira de Bristow e colaboradores (Bristow et al., 1969) foi demonstrado que não somente o controle barorreflexo da freqüência cardíaca (Miyajima et al., 1998; Grassi et al., 1998; Matsukawa et al., 1991; Sevre et al., 2001), mas o controle barorreflexo da atividade nervosa simpática muscular também estava diminuído nos pacientes hipertensos quando comparado aos indivíduos normotensos

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

(Miyajima et al., 1998; Matsukawa et al., 1991). Dessa forma, atitudes intervencionistas que busquem a melhora na sensibilidade barorreflexa arterial têm sido vistas como novas estratégias no manejo das doenças cardiovasculares e especialmente da hipertensão arterial (Santos et al., 1995; Krieger et al., 2001; Grassi et al., 2006).

1.5.3. Sistema nervoso simpático na hipertensão arterial

A atividade nervosa simpática é gerada centralmente e modulada por aferências de diferentes reflexos e por substâncias vasopressoras ou vasodepressoras. Devido ao efeito de aumentar o débito cardíaco e a resistência vascular periférica, muitos estudos foram desenvolvidos na tentativa de verificar o papel da ativação simpática na hipertensão arterial (Smith et al., 2004).

Assim, por diferentes métodos de análise, tais como, pela medida dos níveis de noradrenalina plasmática e "*spillover*" de noradrenalina (Schlaich et al., 2004), da atividade simpática muscular (Rondon et al., 2006) e análise espectral da freqüência cardíaca (Guzzetti et al., 1988), a atividade nervosa simpática vem sendo consistentemente demonstrada elevada na presença de hipertensão arterial. A exacerbação simpática contribui para a hipertensão arterial não somente por aumentar o tônus vascular, mas também por alterar a homeostase de sódio e água nos túbulos renais (DiBona, 2002) e por induzir a hipertrofia cardíaca (Iaccarino et al., 2001) e vascular (Schiffrin, 2002).

Algumas evidências têm sugerido a participação do aumento da atividade simpática na patogênese da hipertensão arterial (Schlaich et al., 2004). Infere-se que filhos normotensos de pais hipertensos podem apresentar níveis de pressão arterial e catecolaminas maiores que os dos controles. Em outro estudo que acompanhou durante sete anos, a concentração de noradrenalina plasmática de jovens normotensos com história familiar de hipertensão arterial, demonstrou que níveis de catecolaminas

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

elevados foram fortes preditores de aumento da pressão arterial e do desenvolvimento de hipertensão arterial (Hirose et al., 2003).

Essas comprovações de que a hipertensão arterial está em grande parte associada com a hiperatividade do sistema nervoso simpático e de seus efeitos deletérios, abrem uma janela de oportunidades para a investigação de agentes farmacológicos ou não que promovam diminuição do estado simpatoexcitatório nos pacientes hipertensos.

1.6. Bases experimentais

1.6.1. Sinalização por cálcio

É bem conhecido que o Ca^{2+} é uma importante molécula sinalizadora no SNC. Basicamente, o influxo de Ca^{2+} participa de uma variedade de processos no nível de membrana celular e também no citosol, incluindo liberação de neurotransmissores, controle da expressão gênica, ativação de enzimas e morte celular (revisado por Berridge et al., 2000), por isso estudar a interferência do BPP-10c na mobilização de Ca^{2+} intracelular poderia abrir perspectivas para o entendimento do mecanismo de ação dos BPPs.

O Ca^{2+} é um importante sinalizador intracelular ou segundo mensageiro, que tem a função de transmitir o sinal do receptor da membrana a diversas proteínas, que farão com que esse determinado sinal possa ser sentido pela célula. A concentração de Ca^{2+} intracelular livre ($[Ca^{2+}]_i$) em condições basais é muito reduzida na faixa de nanomolar (10-100 nM) enquanto que a concentração externa está na faixa de milimolar (acima de 1mM). Assim, modificações nas propriedades da membrana plasmática possibilitam um rápido aumento da $[Ca^{2+}]_i$ devido à abertura de canais na membrana citoplasmática. Esses canais podem ser tanto abertos por transmissores (agonistas) como pela diferença de potencial da membrana celular (canais dependentes de voltagem), por estímulos mecânicos (canais mecanosensíveis) ou térmicos (canais TRP). Outra forma de

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

aumentar a $[Ca^{2+}]_i$ é a liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares pela informação do primeiro mensageiro em receptores metabotrópicos, que são ligados a uma proteína de heterotrimérica chamada de proteína G (GPCRs) ou receptores tirosina quinase.

As proteínas G triméricas podem ser divididas nos subtipos G_s, $G_{i/0}$, G_q, G_{12}, e G_{olf} baseado nas semelhanças na seqüência, seletividade de efetores e sensibilidade de inibidores. Elas são compostas por três subunidades protéicas (α, β e γ). A ligação do transmissor ao receptor metabotrópico faz com que a subunidade α, devido a sua atividade GTPásica intrínseca, troque o GDP por GTP, produzindo a dissociação da subunidade α do dímero βγ e transmitindo assim a informação dos receptores para diversos componentes de vias de sinalização.

Inicialmente, acreditava-se que a única função das subunidades βγ era a de regular a subunidade α, que é responsável pela regulação da atividade de enzimas (efetores) como a adenilato ciclase (AC) e fosfolipase C-β (PLC-β). No entanto, as subunidades βγ se mostraram sinalizadores extremamente dinâmicos. Algumas de suas funções são: inibir a calmodulina (CaM), canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem e AC1 e ativar AC2 e PLC-β (Chen et al., 1995).

Uma das principais vias de liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares é a clivagem de fosfatilinositol-4-5-bisfosfato (PIP_2), com a produção de inositol trifosfato (IP_3), que pode se ligar a canais do retículo endoplasmático (receptores de IP_3) liberando Ca^{2+} destes compartimentos, permitindo que um receptor metabotrópico acoplado a proteína G ligado a PLC-β possa elevar a $[Ca^{2+}]_i$ (Putney, 1999). A isoforma PLC–γ pode ser ativada através estimulação de receptores tirosina quinase, receptores que possuem um domínio SH3 que tem a capacidade de se ligar a proteínas e/ou peptídeos ricos em prolina. Há também a ADP ribose cíclica ($ADPR_c$) que tem sido descrita como um novo segundo mensageiro na mobilização da $[Ca^{2+}]_i$ numa ampla variedade de

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

células de mamíferos. A ação desse nucleotídeo de sinalização é completamente independente do IP_3, pois exerce ação nos receptores de rianodina do retículo endoplasmático (Zhang et al., 2006).

Tanto os receptores de IP_3 como os sensíveis a rianodina são regulados por vários fatores, o mais importante deles é o Ca^{2+}, que regula a liberação do próprio Ca^{2+} dos estoques intracelulares, ou pela ação do lado luminal ou citoplasmático do canal. Observa-se, por exemplo, que a elevação dos níveis de Ca^{2+} dentro de lúmem do retículo endoplasmático, aumenta a sensibilidade dos canais de rianodina e de IP_3. Em geral, esses canais têm uma dependência de Ca^{2+} em forma de sino, ou seja, a baixas concentrações de Ca^{2+} são estimulatórias, mas a altas concentrações são inibitórias (Bootman e Lipp, 1999). O mecanismo no qual o Ca^{2+} citoplasmático ativa a liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares através dos receptores de IP_3 e rianodina é conhecido como liberação de Ca^{2+} induzida por Ca^{2+} (CICR - Ca^{2+}-*induced* Ca^{2+} *release*).

A sinalização mediada por Ca^{2+} é bastante complexa na maioria das células. O íon cálcio possui inúmeros efetores intracelulares, como a calmodulina kinase (CaMK), adenilato ciclase (AC), entre outros, sendo que a maioria desses efetores é regulada pela proteína ligadora de Ca^{2+}, denominada calmodulina (CaM), que sofre uma mudança conformacional ao se ligar ao Ca^{2+}, expondo um domínio hidrofófico que pode interagir com vários domínios presentes em proteínas reguladas por Ca^{2+}/CaM.

Além da CaM, há outras numerosas proteínas ligadoras de Ca^{2+} para funções mais específicas, como por exemplo, a sinaptotagmina, que está associada a membrana de vesículas sinápticas e é um sensor de Ca^{2+} para exocitose (Martens et al., 2007).

A habilidade do Ca^{2+} recrutar elementos controles de outras vias de sinalização (por exemplo, AMP_c - AMP cíclico, MAPK - proteínas quinases ativadas por mitogenes

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

e fatores de transcrição) é particularmente evidente no controle da transcrição gênica em neurônios (Finkbeiner e Greenberg 1997). Um esquema com alguns mensageiros intracelulares, Ca^{2+}, IP_3, PLC e seus efetores ativados são apresentados na figura 3.

A função do Ca^{2+} na indução da apoptose é controlar a expressão de componentes da sinalização apoptótica, além disso o Ca^{2+} pode induzir apoptose em resposta a várias condições patológicas e isto freqüentemente depende de uma interação entre a mitocôndria e o retículo endoplasmático (Kass e Orrenius, 1999).

Outra importante função do Ca^{2+} é ativar a NOS para geração de NO, que funciona como um hormônio local para ativar células vizinhas (Bredt e Snyder, 1990; Schmidt et al., 1991). A BK é bem conhecida por seus múltiplos efeitos sobre o sistema cardiovascular, particularmente vasodilatação e extravasamento do plasma. Esses efeitos são mediados pelos receptores de cininas B_1 ou B_2. O receptor B_1 diferentemente do receptor B2 não é expresso constitutivamente, sua expressão é induzida por mediadores da inflamação em condições de injúria. No entanto, ambos são receptores acoplados a proteína $G_{\alpha q}$ que ativam a PLC-β levando a formação de IP_3 e mobilização da $[Ca^{2+}]_i$ dos estoques internos. A estimulação do receptor B_2 pela BK leva a uma dessensitivação funcional, que está associada com fosforilação/desfosforilação e ciclos de re-expressão endocitose/superfície (Simaan et al., 2005). Além disso, BK é um eficaz estimulador da NOS endotelial (eNOS) e produção de NO, através de mecanismos mediado pelo Ca^{2+} (Busse e Fleming, 1995), dessa maneira o Ca^{2+} é um importante mediador da atividade hipotensiva da BK.

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

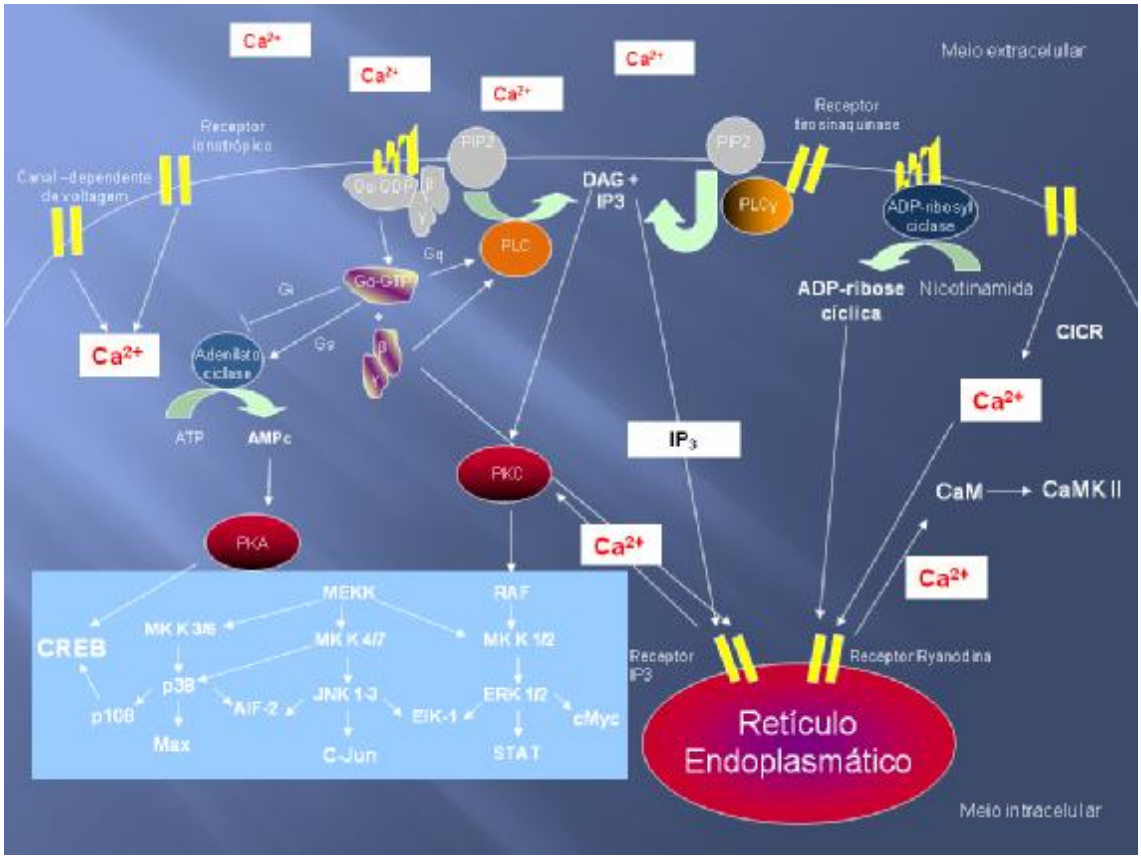

FIGURA 3. Esquema de possíveis vias de sinalização de Ca^{2+} intracelular. As células têm vários caminhos de sinalização intracelular que podem interagir e quando combinados criam sinais de Ca^{2+} de diferentes propriedades. Sinais de mobilização de Ca^{2+} são gerados por estímulo de uma variedade de receptores de superfície celular, incluindo receptores acoplados a proteína G (GPCRs) e receptores tirosina quinase. Os sinais incluem inositoltrifosfato (IP_3) gerados por hidrólise de fosfatilinositol-4-5-bisfosfato (PIP_2) por uma família de fosfolipases (PLC-β e PLC-γ) e ADP-ribse cíclica ($ADPR_c$) gerado pela ADP-ribosil ciclase. Os canais de Ca^{2+} também são caminhos possíveis de mobilização de Ca^{2+} intracelular: canais da membrana plasmática que respondem a transmissores (receptores ionotrópicos) e despolarização da membrana (canal dependente de voltagem) e canais intracelulares (receptor de IP_3 e de rianodina). A liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares pelo influxo de Ca^{2+} através dos receptores de IP_3 e rianodina é conhecida como CICR (Ca^{2+}-*induced* Ca^{2+} *release)*. O Ca^{2+} tem inúmeros efetores: adenilato ciclase, proteínas quinases: fosfoquinase C (PKC), calmodulina quinase (CaMK), entre outras.

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

1.6.2. Óxido Nítrico - NO

O NO é uma molécula gerada a partir de L-arginina pela ação da enzima NO sintase (NOS), tanto a NOS endotelial (eNOS) como a NOS neuronal (nNOS) estão provavelmente inativas em níveis basais de Ca^{2+}, e suas atividades aumentam quando os níveis de Ca^{2+} estão elevados (Bredt e Snyder, 1990; Schmidt et al., 1991), enquanto que a NOS induzível (iNOS), cujo o próprio nome sugere, é induzida por estímulos inflamatórios e sua atividade é independente da concentração de Ca^{2+} (Sears et al., 2004). O NO é uma molécula gasosa com meia vida extremamente curta, sendo rapidamente convertida em outros produtos, como por exemplo: nitrito ou nitrato, ou sendo incorporados às proteínas (nitrosilação).

O NO está principalmente envolvido na regulação da resistência vascular local e sistêmica, no balanço de sódio e, conseqüentemente, no controle da pressão arterial (Umans e Levi, 1995), isso porque é um dos fatores relaxantes da musculatura lisa liberado pelo endotélio, que se difunde até as células adjacentes do músculo liso promovendo a dilatação dos vasos pela ativação direta de canais de K^+ dependente de Ca^{2+} (Bolotina et al.,1994), e canais de K^+ sensíveis a ATP (Murphy e Brayden,1995).

O NO também tem sido descrito como um modulador neuronal, agindo no cérebro como uma molécula sinalizadora no sistema nervoso (Garthwaite e Boulton, 1995). A produção de NO está associada com a função cognitiva e manutenção da plasticidade simpática para o controle do sono, apetite, temperatura corporal e neurosecreção. No sistema nervoso periférico, por exemplo, o NO regula o relaxamento não-colinérgico e não-adrenérgico de células da musculatura lisa. Isto tem conseqüências para vários tecidos, incluindo relaxamento do músculo liso no corpo cavernoso promovendo a ereção peniana. O NO também permite que estômago

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

acomode um largo volume de comida ingerida sem nenhum aumento significante na pressão intraluminal, regula o tônus muscular dos esfíncteres intestinais e tem um importante papel no peristaltismo do trato gastrointestinal.

Estudos têm revelado que o NO, no cérebro, está envolvido na regulação cardiovascular central, através da redução da atividade simpática do SNC (Lin et al., 1999). A primeira evidência do papel do NO na regulação central da pressão arterial, vem do fato que a injeção intravenosa de inibidores da NOS causa um aumento da pressão arterial acompanhado por um aumento da atividade do nervo simpático renal (Sakuma et al., 1992). Tem sido demonstrado que a injeção intracerebroventricular de inibidores não seletivos da NOS em ratos normotensos causa um aumento da pressão arterial, que também é aumentada com a administração central de Rp-9-Br cGMP, um nucleotídeo cíclico que bloqueia a ação do GMP cíclico - GMP_c (o produto efetor da ação do NO na guanilato ciclase). Por outro lado, a injeção de um doador de NO ou cloreto de cálcio (ativador da NOS) dentro do núcleo paraventricular (PVN) induz a queda da PA (Horn et al., 1994; Cabrera e Bohr, 1995).

1.6.3. Disponibilidade de substrato para a NOS para a produção de NO

L-arginina é o único substrato das NOS para a síntese de NO. L-arginina é um aminoácido não-essencial sob condições normais, pode ser derivado da alimentação, da quebra de proteínas ou sintetizado *de novo* a partir de citrulina nos rins. A citrulina nos rins é metabolizada a L-arginina envolvendo as enzimas argininosuccinato sintase (ASS, EC 6.3.4.5) e argininosuccinato liase (ASL, EC 4.3.2.1). A ASS catalisa a condensação reversível da citrulina com o aspartato com consumo de ATP para a formação de argininosuccinato; a ASL catalisa a conversão do argininosuccinato em fumarato e L-arginina, que é liberada na circulação (Figura 4).

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

No fígado, estão presentes enzimas que participam do anabolismo (ASS e ASL), no entanto não há uma produção líquida de L-arginina, pois no fígado também estão presentes enzimas que participam do catabolismo desse aminoácido, a principal delas é a arginase (EC 3.5.3.1). Todas essas enzimas estão dentro de um ciclo conhecido como ciclo da uréia, cujo papel principal é a desintoxicação de amônia, já que a enzima final do ciclo da uréia catalisa a hidrólise de L-arginina em L-ornitina e uréia. A uréia, então é eliminada na urina e a L-ornitina volta no ciclo (Aminlari et al., 2007) (Figura 4).

A reação catalisada pela ASS na via de síntese da uréia e a sua regulação já são bem conhecidas e foram extensivamente estudadas. Contudo, participação da ASS na via de produção de NO ainda é muito recente e pouco explorada. Entretanto, o entendimento da regulação da ASS tem despertado interesse, pois essa enzima vem sendo descrita como passo limitante para a biossíntese de NO em inúmeros tecidos (Xie e Gross, 1997) (Figura 4).

Devido à grande importância fisiológica do NO, muitos estudos tem sido realizados para avaliar o papel de L-arginina exógeno na manutenção da pressão arterial, já que L-arginina é o substrato natural da NOS e desta forma, é reconhecida como molécula fundamental na regulação da produção de NO.

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

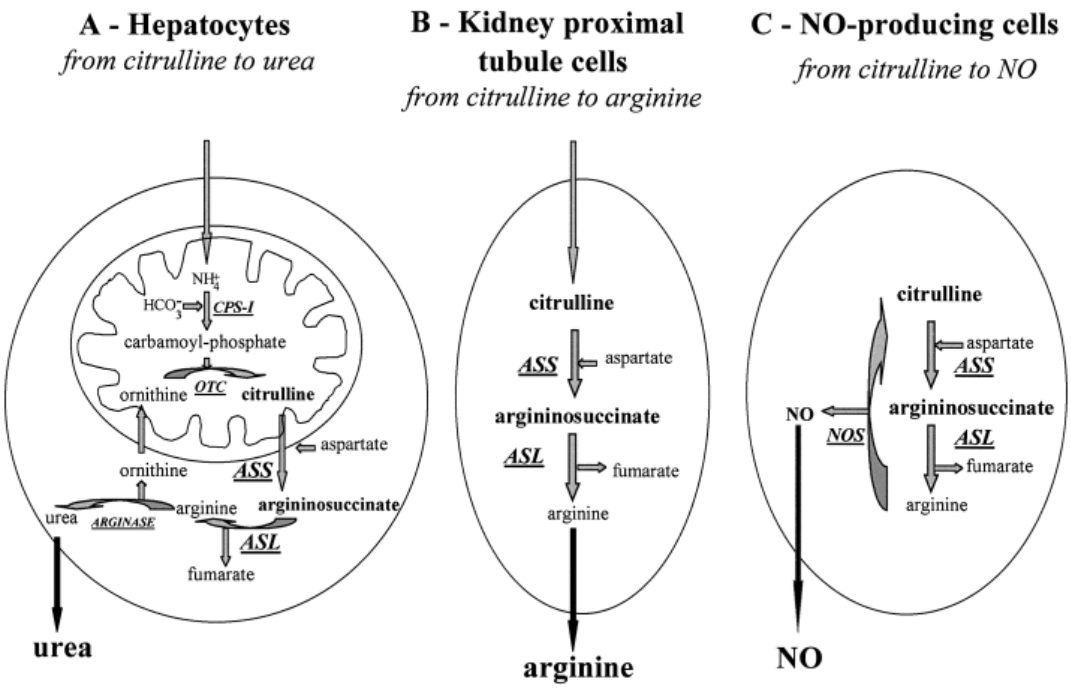

FIGURA 4. Representação esquemática das três principais funções da argininosuccinato sintase (ASS) em mamíferos. As enzimas são: CPS-I (carbamoil fostato sintetase), OTC (ornitina transcarbamilase); ASL (argininosuccinato liase) e NOS (óxido nítrico sintase). (Figura de Husson et al., 2003)

No entanto, a ineficiência de L-arginina ingerida para promover aumento da produção de NO tem sido observada e pode ser explicada pela sua baixa disponibilidade (21-67%), devido ao efeito de primeira passagem, já que a viabilidade de L-arginina como substrato para a NOS deve estar reduzida pela atividade da arginase no fígado. Vários estudos têm demonstrado que a indução ou ativação de arginase pode levar a uma prejudicada produção de NO e disfunção endotelial (revisado por Lameu et al., 2009).

Além disso, a concentração de L-arginina intracelular está bem acima do Km que poderia ser suficiente para saturar a NOS, desse modo, a produção de NO não poderia ser estimulada por L-arginina exógena. Contudo, L-arginina exógeno pode provocar em alguns casos, aumento na produção de NO *in vivo*. Este fenômeno é

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

conhecido como o “paradoxo da arginina” (Nakaki e Hishikawa, 2002), que sugere a existência de um *pool* separado de L-arginina dirigido para a síntese de NO.

O NO é capaz de interagir com muitos alvos intracelulares para engatilhar uma série de vias de transdução de sinal, resultando em sinais estimulatórios e inibitórios. No entanto, o NO torna-se nocivo se produzido em excesso, além disso, se uma célula está em um estado pró-oxidante, o NO por reações de óxido-redução pode formar compostos tóxicos, conhecidos como espécies reativas de nitrogênio (RNS) que causa prejuízo celular. Recentemente, o termo “estresse nitrosativo” tem sido usado para indicar o prejuízo celular que é produzido por excesso de NO e RNS, principalmente peroxinitrito e óxido de nitrogênio III, que tem sido relacionado a patogêneses de desordens neurodegenerativas.

Sendo assim, o NO apresenta desafios e oportunidades para intervir e promover a saúde humana. O uso de drogas, como doadores de NO em humanos não pode ser considerado seguro para algumas desordens, devido aos efeitos complexos desse gás no sistema nervoso, já que altas quantidades de NO podem ser prejudicial para as células levando, por exemplo, a morte celular.

Dessa maneira, o aumento de produção de NO poderia se tornar interessante desde que essa produção fosse de alguma maneira controlada, para que os níveis de NO permanecessem em uma faixa segura e que não houvesse prejuízo para o tecido nervoso.

Sendo assim, um importante mecanismo de controle e manutenção da viabilidade de L-arginina dirigida para a produção de NO poderia ser a regeneração de L-arginina. A citrulina produzida na conversão de L-arginina para NO pela NOS pode ser reciclada novamente a L-arginina (Hecker et al., 1990), pela ASS e ASL, esse ciclo conhecido como ciclo citrulina-NO.

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

Por isso, moléculas que atuem como moduladores da atividade da ASS, aumentando a atividade desta enzima poderia melhorar a produção de NO sem que haja um excesso na sua produção, visto que a L-arginina está locada em um cruzamento de rotas divergentes que produzem metabólitos que podem controlar a produção de NO, garantindo a biodisponibilidade adequada para o bom funcionamento fisiológico no SNC (Figura 5).

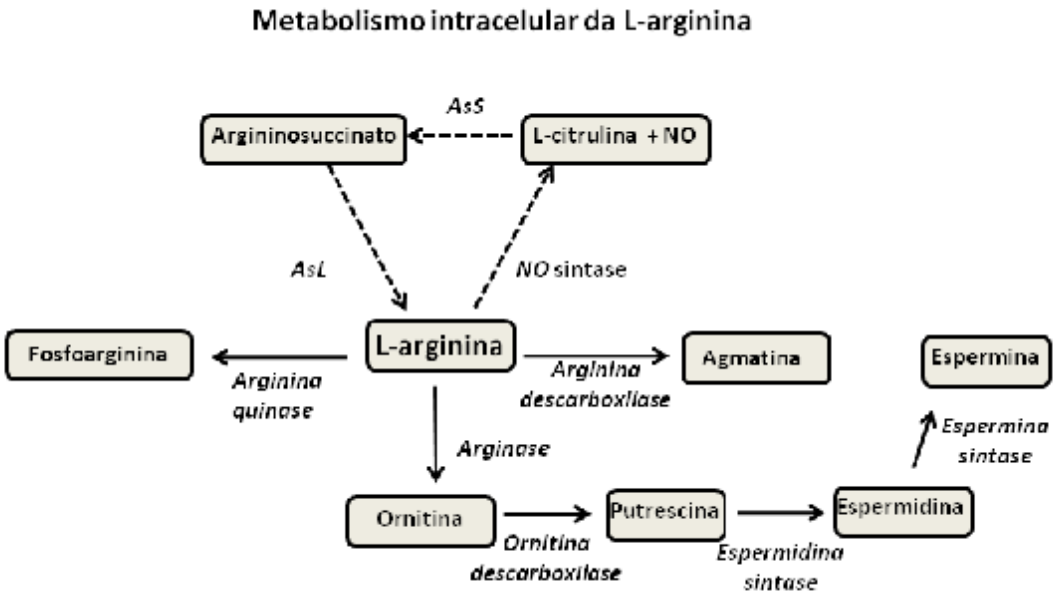

FIGURA 5. L-arginina como precursor da síntese de poliaminas. L-arginina pode funcionar como um precursor da síntese de poliaminas como uma alternativa do ciclo citrulina-NO. Agmatina, putrescina, espermidina, espermina e fosfoarginina são alguns exemplos de metabólitos que pertencem a esta classe de moléculas. (revisado por Lameu et al., 2009)

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

2.OBJETIVOS

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

2.1. Objetivo geral

- Estudar a participação do SNC de ratos na atividade anti-hipertensiva do BPP-10c

Hipótese: Mecanismo do BPP-10c independente da inibição da ECA, agindo sobre sinalização de $[Ca^{2+}]_i$, expressão gênica, produção de NO, liberação de neurotransmissores, controle barorreflexo e atividade simpática.

2.2. Objetivos específicos

- Estudar o mecanismo da mobilização da $[Ca^{2+}]_i$ pelo BPP-10c em células neuronais e gliais;

- Identificar a seqüência do BPP-10c necessária para indução transientes da $[Ca^{2+}]_i$;

- Estudar a via de sinalização do BPP-10c em células neuronais;

- Identificar potenciais alvos do BPP-10c no SNC de ratos;

- Caracterização do mecanismo de ação do BPP-10c *in vitro*:

  - analisar a internalização do BPP-10c em células neuronais;
  - avaliar a produção de NO induzida pelo BPP-10c em células neuronais;
  - avaliar a liberação de neurotransmissores em células estimuladas com BPP-10c.

- Caracterização do mecanismo de ação do BPP-10c *in vivo*:

  - estudar a regulação da expressão gênica pelo BPP-10c em SHRs;
  - avaliar a sensibilidade barorreflexa de SHRs tratados com BPP-10c;
  - avaliar a atividade do nevo simpático renal de SHRs tratados com BPP-10c.
  - avaliar o efeito da injeção central do BPP-10c em ratos Wistar e SHRs.

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

3.MATERIAIS E MÉTODOS

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

3.1. Síntese, purificação de peptídeos e conjugação do BPP-10c com cianinia 3 (Cy3-BPP-10c)

Os peptídeos foram sintetizados como previamente descrito em Gomes et al., 2007. Brevemente, a síntese do BPP-10c [<ENWPHPQIPP] e de suas seqüências análogas foram realizadas em um sintetizador de peptídeos automático PSSM-8, seguindo o método de síntese em fase-sólida usando *N*-9-fluorenilmethoxicarbonil (Fmoc) (Novabiochem-EMD Chemicals Inc., San Diego, CA, EU). A clivagem do peptídeo da resina foi realizada com uma mistura de ácido tricloroacético (TFA)/1,2-etanoditiol/etil metil sulfito por 2 h a temperatura ambiente. Após a remoção da resina por filtração e duas lavagens com TFA, o peptídeo sintético bruto foi purificado por cromatografia líquida de alta eficiência preparativa fase reversa (RP-HPLC)(Shimadzu Corp.) em uma coluna YMC-Pack ODS (20 mm x 150 mm) (YMC Co. Ltd., Shimogyo-ku, Kyoto, Japão) usando um gradiente linear de 3-20% de acetonitrila em 0,1% de TFA a um fluxo de 7ml/min. Tanto a homogeneidade e a seqüência de cada peptídeo foram confirmadas por HPLC analítico e espectrometria de massas MALDI-TOF (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia). O BPP-10c marcado com grupamento fluorescente foi preparado pela conjugação covalente do BPP-10c, sintetizado com o grupo amino N-terminal livre [ENWPHPQIPP] e o marcador fluorescente, Cianina 3 (Cy3), usando o marcador reativo fluorolink Cy3 (GE Healthcare) de acordo com as instruções do fabricante. Cy3-BPP-10c foi purificado por RP-HPLC e analisado por espectrometria de massas MALDI-TOF.

3.2. Preparação de cultura neuronal

A cultura primária de células neuronais foi preparada, a partir de cérebros de ratos machos neonatos Wistar (Neu-W) ou SHRs. A eutanásia foi realizada de acordo com as orientações recomendadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

(COBEA) e aprovada pelo Comitê de Ética do Instituto Butantan. No fluxo laminar, os cérebros de ratos neonatos (1-3 dias de idade) foram dissecados. A pia-máter e os vasos sangüíneos foram cuidadosamente removidos, o tecido foi picado e as células foram dissociadas com tripsina 0,25% em tampão PBSA (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 1,4 mM KH_2PO_4 e 8,0 mM Na_2HPO_4, pH 7,2) por 15 min a 37ºC. Cuidadosamente, a solução de tripsina foi removida e então, as células foram lavadas 2X com 5ml de PBSA por 5 min a temperatura ambiente. As células foram ressuspendidas em Dulbecco Modified Medium (DMEM) suplementado com 10% de soro de cavalo e gentilmente dissociadas com uma pipeta Pauster. A densidade das células foi determinada usando hemocitômetro. E então, $3X10^6$ células foram cultivadas em placas (diâmetro=35-mm) pré-tratadas com poli-*D*-lisina em DMEM contendo 10% de soro de cavalo. As células foram mantidas em cultura a 37°C em atmosfera de 5% de gás carbônico (CO_2) e 95% de umidade. Após 3 dias em cultura o meio foi trocado por DMEM contendo 10% de soro de cavalo mais 10µM de arabinoside citosina para inibir a multiplicação de células divisíveis, predominantemente células gliais. Após 48h o meio foi trocado por DMEM contendo 10% de soro de cavalo, 100 mg/ml de penicilina/estreptomicina e 2 mM de L-glutamina e mantidas em cultura por 10-15 dias antes do uso nos experimentos. Essa cultura foi previamente caracterizada por Raizada, 1983 e apresenta mais de 80% de neurônios.

3.3. Preparação das culturas de células imortalizadas

SK-N-AS [ATCC no. CRL-2137] são células de uma linhagem de neuroblastoma humano derivado de metástase da medula óssea. Essas células foram mantidas em DMEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de aminoácidos não-essenciais, 100mg/ml de penicilina/estreptomicina e 2mM de L-glutamina e mantidas

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

em placas de 25cm^2 a 37°C em atmosfera de 5% de CO_2 e 95% de umidade até atingir 80% de confluência.

C6 [ATCC no. CCL-107] são células de uma linhagem glial, clonada de tumor de glias de rato (Benda et al., 1968). Essas células foram cultivadas em DMEM suplementado com 10% de soro bovino fetal, 100mg/ml de penicilina/estreptomicina e 2mM de L-glutamina, e mantidas em placas de 25cm^2 a 37°C em atmosfera de 5% CO_2 e 95% de umidade até atingir 80% de confluência.

3.4. Medidas de variação da $[Ca^{2+}]_i$ por microfluorimetria

Para monitoramento de mudanças na $[Ca^{2+}]_i$ por microfluorimetria usando FlexStation 3 (Molecular Devices, CA), as células Neu-W, SK-N-AS e C6 cultivadas como descrito anteriormente, foram repassadas para placas de paredes pretas e fundo transparente de 96 poços (Costar, UK) pré-tratadas com poli-*D*-lisina para células Neu-W e sem pré-tratamento para células SK-N-AS e C6, a uma densidade de 5X10^4 células por poço em 100 µl de meio apropriado para cada tipo celular, não suplementado com soro. As células foram incubadas a 37ºC por 60 min com o FlexStation Calcium Kit e 2,5mM de probenecide em um volume final de 200µl por poço seguindo as instruções do fabricante (Molecular Devices, CA). A placa de células foi colocada no monitor de fluorescência FlexStation 3 (Molecular Devices, CA). A fluorescência das amostras foi excitada a 485nm e a emissão de fluorescência foi detectada a 525nm. As amostras foram monitoradas a intervalos de 1,52s por 120s com um total de 79 leituras por poço. Seguindo 20s de monitoramento de intensidade de fluorescência basal para níveis de $[Ca^{2+}]_i$ de células não estimuladas, os peptídeos agonistas foram injetados para atingir concentrações finais pré-estabelecidas e então, os transientes de $[Ca^{2+}]_i$ foram monitorados por mais 100s. Respostas a injeção do agonista foram calculadas como pico de fluorescência menos a intensidade de fluorescência basal (unidade relativa de

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

fluorescência, RFU - *relative fluorescence units*) no software SoftMax®Pro (Molecular Devices, CA). Os dados são expressos como a média dos valores ± desvios padrão.

3.5. Medida de variação da $[Ca^{2+}]_i$ por microscopia confocal

Medidas de variação da $[Ca^{2+}]_i$ em células Neu-W e SK-N-AS foram realizadas usando um microscópio confocal LSM 510 (Zeiss, Jena, Germany), como descrito em Martins et al., 2005. Cerca de $5X10^4$ células foram semeadas e distribuídas em placas de 60mm, 24h antes das medidas. As células foram tratadas com 4 μM fluo-3 AM (acetoximetil éster de fluo-3) em 0,5% DMSO e 0,1% de ácido plurônico surfactante não-iônico F-127 por 30 min a 37ºC, e posteriormente lavadas com DMEM contento 10% soro fetal bovino, e então transferidas para o meio definido (5 μg/ml insulina, 30 μg/ml transferrina, 20 μM etanolamina, 30 nM selenito de sódio, 1 μM piruvato de sódio, 1% de aminoácidos não-essenciais, 1 mM glutamina, 100 U/ml penicilina, 100 μg/ml de estreptomicina, 10 mM HEPES pH 7,4 em DMEM). O fluo-3 é um indicador fluorescente de Ca^{2+} intracelular, que é carregado para dentro das células por incubação com o penta-acetoxi metil éster de fluo-3 (Fluo-3 AM), quando o estér é hidrolisado intracelularmente produz o fluo-3 capaz de indicar mudanças na $[Ca^{2+}]_i$ induzida pelo agonista (Kao et al., 1989). Fluo-3 foi excitado a 488 nm e a emissão de fluorescência foi medida a 526 nm. A variação de $[Ca^{2+}]_i$ em células não estimuladas foi medida por aproximadamente 10s. Após essa medida, foi adicionado ao meio BPP-10c ou BK ou captopril. Então, as mudanças na fluorescência foram monitoradas por 2min. As imagens foram coletadas a cada 1,5 segundos. Ao final de cada experimento, 5 μM ionóforo (Br-A23187) seguido por 10 mM EGTA e 20 μM digitonina foram usados para determinar a fluorescência máxima (F_{max}) e mínima (F_{min}), respectivamente.

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

As concentrações de Ca^{2+} intracelular livre ($[Ca^{2+}]_i$) relativas aos valores de fluorescência (F) obtidos após a adição dos agonistas foram calculadas usando a seguinte equação: $\mathbf{[Ca^{2+}]_i = K_d\ (F-F_{min})/(F_{max}-F)}$, assumindo K_d= 450 nM para ligação fluo-3 AM ao Ca^{2+} (Martins et al., 2005).

3.6. Medida de geração de AMP_c intracelular

As células Neu-W e C6 foram cultivadas como descrito anteriormente e $5X10^4$ células foram transferidas para placas de 96 poços um dia antes das medidas de AMP_c intracelular utilizando um sistema de imunoensaio, Biotrak (Amersham Biosciences, UK). No dia do experimento as células Neu-W e C6 foram lavadas e incubadas por 10 min na ausência ou presença de 1μM de BPP-10c em DMEM sem soro de cavalo ou bovino fetal, respectivamente. Então, 50μM de forskolina foi adicionado e as células foram incubadas por mais 60min. O meio de cultura foi descartado e as células foram lisadas por 10min com reagentes do kit Biotrak (Amersham Biosciences, UK). O lisado celular foi transferido para uma placa de 96 poços sensibilizada com anticorpo de coelho anti-IgG e incubado juntamente com anticorpo de coelho anti-AMP_c por 2 h a 4ºC. Então AMP_c conjugado com peroxidase foi adicionado para competir com o AMP_c da amostra e incubado por mais 60 min a 4ºC. O sobrenadante foi descartado e os poços lavados 4 vezes com o tampão de lavagem. O substrato da enzima peroxidase foi adicionado em todos os poços e incubado por 60 min a temperatura ambiente. Para parar a reação foi adicionado ácido sulfúrico 1M, e então a absorbância foi determinada a 450 nm. Para determinação da concentração de AMP_c das amostras, os valores de absorbância foram comparados aos valores de absorbância de amostras padrão de AMP_c que variou de 12,5 a 3200 fmol/poço. Os ensaios foram realizados de acordo com as instruções do fabricante (Amersham Biosciences, UK).

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

3.7. Teste de ligação utilizando radioligantes e BPP-10c

O teste de ligação do receptor do BPP-10c foi realizado em um painel disponível comercialmente de 105 ensaios de ligação de radioligantes (MDS Pharma Services, Pharmacology Laboratories, Peitou, Taiwan, Japan). Esses ensaios caracterizam possíveis interações do sítio de ligação do ligante com uma grande variedade de receptores acoplados a proteína G (GPCRs). O experimento é baseado em um ensaio de competição, onde o BPP-10c (10 μM) compete com agonistas ou inibidores radiomarcados conhecidos de GPCRs pela ligação do receptor. Todos os ensaios de ligação de radioligantes foram caracterizados e validados pela ligação do ligante ao respectivo receptor. A lista específica dos ensaios realizados na presença de 10 μM BPP-10c está documentada no item Resultados e mais detalhes da metodologia para cada ensaio pode ser encontrada na seguinte URL: http://www.mdsps.com/. Os dados relatados são resultados obtidos de experimentos realizados em duplicata.

3.8. Cromatografia de afinidade

3.8.1. Acoplamento do BPP-10c na coluna NHS-activated HP

Para a preparação da coluna de afinidade BPP-10c, uma coluna HiTrap NHS-activated HP, pré-empacotada com sefarose NHS ativada de alta performance para acoplamento de ligantes via aminas primárias a pH aproximadamente neutro (GE Healthcare) foi lavada três vezes com 2ml de HCl 1mM antes do BPP-10c (5mg em 1ml de 0,2 M $NaHCO_3$; 0,5 M NaCl; pH 8,3) ser adicionado. Após 30 min de incubação a temperatura ambiente, a coluna foi inativada com tampão A (0,5M etanolamina; 0,5M NaCl; pH 8,3), e lavadas três vezes com 5 volumes de 0,2 M $NaHCO_3$; 0,5 M NaCl; pH 8,3, e estocada a 4ºC em 50 mM Na_2HPO_4; 0,1% NaN_3; pH 7,0. Esta coluna foi nomeada HiTrap-BPP-10c, e uma coluna controle foi preparada incubando a coluna HiTrap NHS-activated HP com tampão A (HiTrap-controle).

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

3.8.2. Preparação dos extratos protéicos de encéfalos de ratos

Ratos espontaneamente hipertensos (SHRs) machos de 280-300g foram anestesiados 10% ketamina e 2% xilazina (1:1), e submetidos a perfusão intra-cardíaca com 20 ml de 0,15 M NaCl; 0,01% de heparina sódica sob um fluxo de 4ml/min. Os encéfalos foram imediatamente removidos, pesados e uma solução contendo 10 mM Tris-HCl; 25 mM sacarose; 1 mM EDTA e 1 mM PMSF (fluoreto de fenil metil-sulfonila), pH 7,5 (1ml/g) foi adicionada. Os encéfalos foram triturados e homogeneinados (Polytron PT MR 3000, Kinematic AG) e centrifugados a 100.000g por 35 min a 4ºC. Em seguida, o sobrenadante foi coletado e reservado (Fração Protéica Citosólica), enquanto que o precipitado foi ressuspendido em uma solução contendo 0,2% Triton X-100; 10 mM Tris-HCl; 25 mM sacarose; 1 mM EDTA e 1 mM PMSF; pH 7,5), que foi novamente centrifugado a 100.000g por 35 min a 4ºC e o sobrenadante coletado (Fração Protéica de Membrana). As frações protéicas foram estocadas a -20ºC até o uso. Esse experimento foi realizado de acordo com as orientações recomendadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovado pelo Comitê de Ética do Instituto Butantan.

3.8.3. Ensaio de cromatografia de afinidade

A coluna HiTrap-BPP10c foi equilibrada com 3ml do tampão 20 mM Tris-HCl, pH 8,0. A fração citosólica ou de membrana de encéfalo de rato (100 mg/ml de proteína) foi aplicada a coluna sob fluxo de 1ml/min, e a coluna foi lavada com 10 volumes do tampão 20 mM Tris-HCl, pH 8,0 para eluição das proteínas não retidas pela afinidade com o peptídeo. As proteínas que se ligaram ao BPP-10c foram eluídas com 20ml da solução contendo 100mM glicina; 0,5M NaCl; pH 3,0, ou alternativamente por competição com 20 ml de 5mg/ml BPP-10c. Os eluatos foram dialisados em 10mM

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

NH_4HCO_3; pH 8,0 por 12h a 4ºC e concentrados a 100µl volume final usando um concentrador a vácuo.

3.8.4. Análise dos eluatos por eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE)

As concentrações das proteínas foram determinadas pelo método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando o reagente Protein Assay (Bio Rad), albumina bovina foi usada como padrão. As amostras foram analisadas por eletroforose em gel 12,5% SDS-poliacrilamida de acordo com Laemmli (1970). O gel 12,5% SDS-poliacrilamida foi preparado em 0,38 M Tris-HCl, pH 8,8; 0,1% SDS (dodecil sulfato de sódio), 10% acrilamida; 0.1% TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamino); 10% persulfato de amônio. As amostras foram previamente desnaturadas e reduzidas em tampão 0,125 M Tris-HCl, pH 6,8; 2% 2-mercaptoetanol; 2% SDS. As eletroforeses foram realizadas em tampão 0,025M Tris-HCl, pH 8,3; 0,18M glicina; 1% SDS sob voltagem constante de 100 Volts por aproximadamente 2h a temperatura ambiente. Os padrões de massas moleculares utilizados foram: soro albumina (68kDa), IgG (cadeia pesada 50kDa e cadeia leve 23,5kDa), ovo albumina (43kDa) e ribonuclease (13,7kDa).

3.8.5. Tripsinização de proteínas em gel para análise por espectrometria de massas

As bandas de proteínas visualizadas no gel foram excisadas e descoradas com 75mM NH_4HCO_3 em 40% etanol por 60 min a temperatura ambiente e digeridas em gel com 40µg/ml tripsina em 50mM NH_4HCO_3 por 45 min no gelo, seguido de 16h incubação a 30ºC. Os peptídeos trípticos foram extraídos do gel por 10min de incubação em banho de ultra-som. A mistura peptídica foi liofilizada e armazenada a -20°C, até serem analisadas por espectrometria de massas.

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

3.8.6. Identificação de proteínas por espectrometria de massas

Para análise por espectrometria de massas das proteínas ligantes do BPP-10c, os peptídeos gerados pela digestão tríptica. Foram liofilizados, dissolvidos em 0,1% de ácido trifluroacético e submetido a ZipTip C18 (Millipore Co.). O eluente foi introduzido no espectrômetro de massas MALDI-TOF/Pro (GE Healthcare) misturado com o mesmo volume de uma solução saturada de ácido ciano-4-hidroxicinâmico (Sigma) em 50% acetonitrila/0,1% ácido trifluroacético). A identidade dos fragmentos peptídicos foi analisada por busca em banco de dados utilizando-se o algorítimo MASCOT (disponível no sítio www.matrixscience.com). Os espectros de MS/MS obtidos por espectrometria de massas foram comparados com os obtidos pela digestão teórica por tripsina das proteínas contidas no banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBInr). Foi selecionada a carbamidometilação das cisteínas como modificação fixa, oxidação das metioninas como modificação variável.

3.9. Identificação de proteínas encefálicas com afinidade pelo BPP-10c – confirmação da afinidade do peptídeo pela argininosuccicinato sintase (ASS) por *Western Blot*

Um importante mecanismo para a produção de NO é o controle e manutenção da viabilidade de L-arginina pela ASS que é a enzima passo limitante para biossíntese de NO. Considerando que a ASS é uma enzima ubíqua presente em muitos tecidos, inclusive o cérebro, investigamos se essa enzima poderia ser um alvo para o BPP-10c no SNC.

Para identificação da argininosuccicinato sintase (ASS), os eluatos obtidos da cromatografia de afinidade foram submetidos à SDS-PAGE como descrito anteriormente. Após a eletroforese, as amostras foram eletro-transferidas para uma membrana de nitrocelulose, utilizando tampão de transferência (0,38M Tris-HCl, 0,18M

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

glicina, 20%metanol), sob voltagem constante de aproximadamente 30 Volts, durante 12h. Após a transferência, a membrana foi incubada em solução de 5% BSA (soro abumina bovina) em TBS-T (Tris-HCl 20mM, pH 7,4; NaCl 0,15M e Tween 0,05%), em agitador orbital, por 2h a temperatura ambiente. Após descartar a solução de BSA, adicionou-se o anticorpo primário anti-ASS (BD Transduction Laboratories) diluído em tampão TBS-T (recomendação do fabricante 1:2500) e incubou-se por mais 2h a temperatura ambiente. Em seguida, a solução foi removida e a membrana foi lavada com a solução TBS-T por 3 vezes durante 5min cada a temperatura ambiente. Em seguida, o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com fosfatase alcalina (Promega), diluído 1:7500 em tampão TBS-T foi adicionado e incubado sob agitação por 1h a temperatura ambiente. A membrana foi novamente lavada 3 vezes em tampão TBS-T por 5min. As bandas foram reveladas usando solução AP (5M NaCl; 1M Tris-HCl, pH 9,5; 1M $MgCl_2$) contendo 115 mM BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato) e 60 mM NBT (nitro blue tetrazolium) como substrato.

3.10. Determinação dos níveis de NO no cérebro de ratos Wistar e SHRs

3.10.1. Aquisição dos parâmetros cardiovasculares de ratos Wistar e SHRs tratados com BPP-10c

Foram utilizados ratos machos da linhagem SHR de 270 - 350g fornecidos pelo biotério da Escola Paulista de Medicina (BIREME) e Wistar de 270 - 350g fornecidos pelo Biotério Central do Instituto Butantan. Os animais foram mantidos com acesso livre à alimentação e água e mantidos sob fotoperíodo a um ciclo luz-escuro (12h cada) em estante ventilada com exaustão (ALESCO) no Biotério de experimentação convencional de Mamíferos do Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada do

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

Instituto Butantan, de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo colégio Brasileiro (COBEA).

Os animais foram anestesiados com tribromoetanol (250mg/kg) intraperitonial 22h antes do experimento para a implantação crônica de cânulas (TYGON Flexible Plastic Tubing – Saint-Gobain PPL Corp) na artéria e veia femoral. As cânulas, via subcutânea, foram exteriorizadas e fixadas na porção superior do dorso do animal. No dia do experimento, com o animal acordado, a cânula arterial foi conectada a um transdutor de pressão para medir a pressão arterial média (PAM) e freqüência cardíaca (FC) acoplado ao sistema de aquisição de dados da BIOPAC Systems. Após 60 min de medida contínua da PAM e FC basal, 71nmol/kg BPP-10c ou salina foram administrados aos animais via endovenosa e então estes parâmetros foram monitorados até 6h após a injeção do peptídeo.

3.10.2. Quantificação de NO em cérebro de ratos

Para o determinação da quantidade de NO no cérebro de ratos tratados com o BPP-10c ou salina, foi avaliado o acúmulo de nitrato e nitrito no extrato total de proteínas. Após o monitoramento dos parâmetros cardiovasculares por 6h, os animais foram anestesiados com 10% ketamina e 2% xilazina (1:1), e submetidos a perfusão intra-cardíaca com 20 ml de 0,15 M NaCl; 0,01% de heparina sódica sob um fluxo de 4ml/min. Os cérebros foram coletados, pesados e homogeneizados (Polytron PT MR 3000, Kinematic AG) em tampão RIPA [50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 150 mM NaCl; 1% NP-40 (Nonidet P-40); 0,5% deoxicolato de sódio; 0,1% SDS; 10mM N-etilmaleimida; 1mM DTPA (Dietilenotriaminopentacético)]. Então, o homogenato foi injetado no analisador de NO (NOA 280i – Sievers). Embora o NO gasoso possa ser detectado de maneira direta, o NO formado em sistemas biológicos são rapidamente oxidados a nitrato e nitrito (NO_x). Para a determinação de NO por quimiluminescência em fase

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

gasosa, nitrato e nitrito foram reduzidos a NO por solução saturada de cloreto de vanádio (VCl_3) em HCl 1M a 90ºC e solução I_2 e NaI em ácido acético glacial a 60ºC, respectivamente. O NO reagiu com ozônio (O_3) para formar dióxido de nitrogênio, em um estado excitado (NO_2^*). Como o dióxido de nitrogênio volta ao estado de menor energia (NO_2) a luz foi emitida (*hv*). (Tarpey e Fridovich, 2001).

$$\mathbf{O_3 + NO \longrightarrow O_2 + NO_2^* \longrightarrow NO_2 + \boldsymbol{hv}}$$

As áreas dos picos integrados foram comparadas a curva padrão de nitrato e nitrito de sódio para calcular a quantidade de NO_x presente em cada amostra utilizando BAG program software 2.2 (Sievers Instruments Inc.).

3.11. Quantificação de NO em cultura de células

A quantificação da produção de NO por células em cultura, através da concentração de nitrito e nitrato intra e extracelular foi realizada utilizando o Nitric Oxide Analyzer (NOA 280i – Sievers) de acordo com Feelisch et al. 2002. Cerca de $1X10^6$ células foram semeadas e distribuídas em placas de 60mm diâmetro, 24h antes das medidas. Então, as células foram tratadas com BPP-10c por 24h na ausência ou presença de inibidores da via de sinalização de Ca^{2+} ou antagonistas de receptores. Após a incubação, 1 ml do meio de cultura foi removido e adicionado N-etilmaleimida para atingir a concentração final de 10 mM. Em seguida a mistura foi centrifugada a 200 g para eliminar possíveis fragmentos celulares. O sobrenadante foi coletado (meio extracelular). As células foram lavadas com PBS (20 mM Na_3PO_4, 0,15M NaCl, pH 8,0) e lisadas com o tampão RIPA. Em seguida, o lisado celular foi coletado e incubado no gelo por 20 min e centrifugado a 200 g por 5 min. O sobrenadante foi coletado (meio intracelular). O meio intra e extracelular foi injetado no analisador de NO.

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

3.12. Ensaio de viabilidade das células tratadas com BPP-10c

O ensaio de viabilidade celular foi realizado utilizando os reagentes do Kit Live-Dead para células de mamíferos (Invitrogen). Esse ensaio simultaneamente determina o número de células vivas e mortas. As células vivas têm esterases intracelular, que convertem acetoximetil éster de calceína (calcein AM) célula permeável não fluorescente, em calceína intensamente fluorescente (excitação 485nm, emissão 530nm). As células mortas têm membranas prejudicadas; o homodímero-1 de etídeo (EthD-1) entra em células prejudicadas e é fluorescente quando ligado a ácidos nucléicos, emitindo luz fluorescente vermelha em células prejudicas ou células mortas (excitação 530nm, emissão 645nm). Cerca de $5X10^4$ células (Neu-W) foram transferidas para placas de 96 poços de paredes pretas e fundo transparente (Costar, UK) e as células foram incubadas por 24h na ausência ou presença de 1μM BPP-10c em DMEM sem soro de cavalo a 37ºC, em atmosfera de 5% CO_2. Então, as células foram incubadas com calcein AM e EthD-1 por 30min a temperatura ambiente. A fluorescência foi determinada usando sistema FlexStation 3. As quantidades de células vivas e mortas foram calculadas no sotware SoftMax®Pro (Molecular Devices, CA) a partir dos padrões com conhecidos números de células vivas (não tratadas) e mortas (tratadas com 0,1-0,5% digitonina por 10min)

3.13. Ensaios de internalização do Cy3-BPP-10c e co-localização com ASS

As células foram mantidas sobre uma lamínula numa densidade de aproximadamente $5x10^5$ células/100 mm, dentro de placas contendo meio apropriado, por 12h a 37ºC, em atmosfera de 5% de CO_2. As células foram lavadas com tampão PBS, e incubadas com DMEM sem soro, contendo 1 μM Cy3-BPP-10c por 30min a 37ºC. Após incubação, as células foram novamente lavadas com tampão PBS e, então, fixadas com 4% paraformaldeído por 15 min e lavadas com água estéril. As células

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

foram incubadas com reagente “anti-fading” (responsável pela manutenção da fluorescência do Cy3) e visualizadas em microscópio de fluorescência (Axiocam, Zeiss, Jena, Germany). A fluorescência do Cy3 foi excitada a 550nm e a fluorescência emitida captada a 570nm. O ganho fotomultiplicador e o laser foram mantidos constantes durante todo experimento.

Para os ensaios de co-localização com ASS, as células Neu-W tratadas com Cy3-BPP-10c, seguiram o mesmo procedimento descrito acima até serem fixadas com 4% paraformaldeído por 15 min, a seguir foram permeabilizadas com 0,1% Triton X-100 em TBS-T por 10 min. Foram lavadas duas vezes com TBS-T e incubadas com 5% albumina por 30 min. A seguir, foram incubadas com o anticorpo primário anti-ASS purificado de camundongo (BD Transduction Laboratories) diluído em tampão TBS-T (1:500) por 2h a temperatura ambiente e novamente lavadas. As células foram, então, incubadas com o anti-IgG de camundongo conjugado com fluoresceína (FITC, Jackson Immunoresearch) por 1h. Finalmente, após três lavagens com TBS-T e uma lavagem com água milli-Q, as células foram incubadas com reagente “anti-fading” (responsável pela manutenção da fluorescência do Cy3 e do FITC) e visualizadas em microscópio de fluorescência (Axiocam, Zeiss Jena, Germany). O Cy3 e o FITC foram excitados a 550nm e 450nm, e a fluorescências emitidas captadas a 570nm e 515nm, respectivamente. O ganho fotomultiplicador foi mantido constante durante todo experimento. Após a captura das imagens independentes de marcação do Cy3 e FITC, as imagens foram sobrepostas utilizando o software AxioVision 4.1 (Zeiss Jena, Germany) para observação da localização da ASS e do BPP-10c.

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

3.14. Quantificação dos níveis de RNA mensageiro em cérebros de ratos

3.14.1. Preparação das amostras

Após o monitoramento dos parâmetros cardiovasculares de SHRs tratados com 71 nmol/kg BPP-10c ou salina, os animais foram anestesiados 10% ketamina e 2% xilazina (1:1), e submetidos à perfusão intra-cardíaca com 20 ml de 0,15 M NaCl; 0,01% de heparina sódica sob um fluxo de 4ml/min. Os cérebros foram coletados, mantidos em Trizol (Invitrogen) e estocados a -80ºC até momento da extração do RNA. Os tubos contendo as amostras em Trizol foram descongelados em banho de gelo e homogeneizados no Polytron PT MR 3000 (Kinematic AG, Littau) durante aproximadamente 30s. Em seguida, as amostras foram incubadas por 5min a temperatura ambiente para permitir a dissociação dos complexos nucleoprotéicos. A extração do RNA total teve início com adição de clorofórmio, seguida por agitação vigorosa da mistura durante aproximadamente 15s e centrifugação a 12.000 g por 15min a 4ºC. A fase aquosa foi coletada e transferida para um novo tubo, e a precipitação do RNA total foi realizada com adição de isopropanol seguido de incubação por 10min a temperatura ambiente. A mistura foi novamente centrifugada a 12.000 g por 15min a 4ºC e o precipitado contendo o RNA total foi lavado com etanol 75%. Em seguida, o material foi seco a temperatura ambiente e solubilizado em 100µl de água livre de contaminação por RNAse. O RNA total foi quantificado em espectrofotômetro (GeneQuant) utilizando os comprimentos de onda de 260nm e 280nm. A concentração de RNA total foi obtida a partir da leitura da absorbância a 260nm (A_{260nm}). A razão de A_{260nm}/A_{280nm} foi determinada para analisar a pureza do RNA extraído.

3.14.2. Reações em cadeia da polimerase em tempo real

A análise quantitativa da argininosuccinato sintase (ASS), da eNOs e da nNOS no cérebro de SHRs foi realizada pela técnica de reações em cadeia da polimerase (PCR

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

- *Polymerase Chain Reaction*) em tempo real. A partir do RNA total extraído de cérebros de SHRs foram construídas as fita de cDNA utilizando o Kit *cDNA cycle kit for RT-PCR* (Invitrogen), seguindo as recomendações do fabricante. Para a formação da dupla fita de cDNA foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores específicos para a ASS, eNOS e nNOS (Tabela 3). O cDNA foi amplificado usando o ABI 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). A dupla fita do DNA específico foi marcada com SYBR Green I fornecido no Platinum SYBER Green (Invitrogen), para permitir a detecção quantitativa do produto do PCR em um volume de reação de 25µl. A temperatura de reação foi de 95ºC por 10min, 40 ciclos de desnaturação 95ºC por 15s / 60ºC por 30s aumentando até 72ºC por 30s. O nível de expressão gênica de GAPDH (Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) foi usado para normalizar as diferenças no isolamento e degradação do RNA. Os resultados foram analisados por quantificação relativa entre grupos: tratado e controle utilizando o método $2^{-\Delta\Delta C_T}$. (Livak e Schmittgen, 2001).

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

TABELA 3: Iniciadores usados para amplificação de fragmentos de cDNA dos genes que codificam para as proteínas nNOS, eNOS, ASS e GAPDH por PCR em tempo real. pb = pares de base.

Gene	Número de acesso NCBI	Iniciador	Seqüências (5'-3')	Tamanho (pb)
nNOS	NM_052799.1	senso	CCAATGTTCACAAAAAACGAGTCT	77
		anti-senso	TCGCCTGGACTTAGGGCTTT	
eNOS	NM_021838.2	senso	GACTTTTAAGGAAGTAGCCAATGCA	93
		anti-senso	CCATACAGGATAAGTCGCCTTCAC	
ASS	NC_005102.2	senso	TGCACTCTATGAGGACCGCTATC	49
		anti-senso	CTAGGCACCTCTCTCGCCAGGCCT	
GAPDH	NC_005103.2	senso	TGGCCTCCAAGGAGTAAGAAAC	69
		anti-senso	GGCCTCTCTCTTCCTCTCAGTATC	

3.15. Quantificação da liberação de neurotransmissores aminoácidos por células neuronais

A quantificação da liberação de GABA, glutamato, aspartato e glicina por células Neu-W estimuladas com BPP-10c foi realizada como previamente descrito em Takei et al., 1989. Cerca de $3X10^6$ células Neu-W foram mantidas em DMEM sem soro por 2-5h. Então, as células foram lavadas três vezes com tampão HKR (HEPES-buffered Krebs-Ringer) contendo 130mM NaCl; 5,4mM KCl; 1,8mM $CaCl_2$; 0,8mM $MgSO_4$; 5,5mM glicose; 50mM tampão HEPES. BPP-10c a concentração final de 1µM foi adicionado às células em tampão HKR. O tampão de ensaio foi coletado após 3min em tubos no gelo e filtrados com membranas de 0,22µm (Milipore) para a remoção dos fragmentos celulares. Os aminoácidos em tampão HKR foram derivatizados com reagente fenilisotiocianato (75% etanol; 12,5% trietilamina; 12,5% fenilisotiocianato) para detecção em HPLC, usando uma coluna analítica fase reversa C18 (Merck). Foram

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

realizadas corridas cromatográficas padrão de GABA, glutamato, aspartato e glicina. A corrida cromatográfica controle foi realizada com reagente fenilisotiocianato. As áreas dos picos integrados foram comparadas aos padrões para calcular a quantidade de neurotransmissores aminoácidos liberados pelas células.

3.16. Avaliação da sensibilidade do barorreflexo de SHRs

Para avaliação da sensibilidade do barorreflexo de SHRs, os animais foram anestesiados com tribromoetanol (250mg/kg) intraperitonial 22h antes do experimento para a implantação crônica de cânulas (TYGON Flexible Plastic Tubing – Saint-Gobain PPL Corp) na artéria e veia femoral. As cânulas, via subcutânea, foram exteriorizadas e fixadas na porção superior do dorso do animal. No dia do experimento, com o animal acordado, a cânula arterial foi conectada a um transdutor de pressão para medir a PAM e FC acoplado ao sistema de aquisição de dados da BIOPAC Systems.

Medidas controle da PAM e FC foram realizadas por repetidas estimulação dos pressoreceptores com a injeção endovenosa de 0,1 ml em bôlus de doses graduais de fenilefrina (0,1 a 6,4 μg/kg) e nitroprussiato de sódio (0,2 a 12,8 μg/kg). Após o retorno dos valores de PAM e HR a níveis basais, foi administrado endovenosamente 71nmol/kg do BPP-10c. A estimulação dos pressoreceptores com fenilefrina e nitroprussiato de sódio foi repetida 1h e 4h após a administração do peptídeo para avaliação do barorreflexo. O pico de aumento ou redução da PAM após a injeção de cada dose de fenilefrina ou nitroprussiato foi correlacionado com o pico de mudança reflexa na FC. A sensibilidade do barorreflexo foi analisada por regressão linear obtida por pontos relacionando mudanças na FC (batimentos por minuto) e PAM (mmHg) (Irigoyen et al., 2000).

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

3.17. Medida direta da atividade do nervo simpático renal

Para a realização dos procedimentos cirúrgicos e durante todo procedimento experimental os animais foram mantidos anestesiados com Uretana (SIGMA) na dose de 1,2 g/Kg de peso, administrado intraperitonealmente.

3.17.1. Traqueostomia

Na superfície ventral do pescoço, próximo ao manúbrio esternal, o animal recebeu uma pequena incisão em sua pele. Foram divulsionadas e rebatidas as estruturas musculares, e após a localização da traquéia, foi realizado um pequeno orifício entre dois anéis cartilaginosos para a inserção de uma cânula (JELCO Plus - n° 14G 7068 – Johnson & Johnson MEDICAL). Dessa forma, permite-se aspiração endotraqueal quando necessário e a manutenção das vias aéreas pérvias.

3.17.2. Canulação de artéria e veia femorais

Os ratos foram posicionados em decúbito dorsal e receberam uma incisão na região inguinal unilateral para dissecação do feixe vásculo-nervoso femoral. Cânulas de polietileno PE-50 (15cm) soldados a PE-10 (2cm para veia e 4cm para artéria) foram implantadas e fixadas por amarraduras. À extremidade livre da cânula arterial foi conectado um transdutor de pressão para aquisição dos valores de PAM e FC, e a cânula venosa foi utilizada para injeção de drogas.

3.17.3. Localização e isolamento da artéria e nervo renais

Os animais tiveram um flanco lateral tricotomizado. Uma área delimitada entre a última costela e a pata traseira foi demarcada com caneta dermatográfica e exposta pela retirada da pele. Em seguida, foi divulsionada a musculatura paravertebral da região retroperitoneal até a localização do rim. Foram fixadas a um campo operatório as extremidades da abertura cirúrgica para visualização e acesso a aorta abdominal, nervo e artéria renais. Com o auxílio de uma lupa (Opto sm, 2002), nervo e artéria renais

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

foram cuidadosamente localizados e dissecados. O nervo renal foi posicionado sobre um par de eletrodos de prata acoplados a um micromanipulador, e conectados ao sistema de aquisição e registro da atividade simpática do nervo renal (RSNA). Dentro do campo cirúrgico foi adicionado, durante todo o experimento, óleo mineral (Nujol – Schering-Plough) a ± 37,5°C, para evitar ressecamento e isolar o nervo renal de ruídos externos. Toda essa preparação permaneceu em observação por cerca de 30min ou até estabilização dessas medidas para que se iniciassem os procedimentos experimentais.

3.17.4. Aquisição dos parâmetros cardiovasculares

A cânula inserida na artéria foi acoplada a um transdutor de pressão (strain-Gauge – DT-XX Viggo-spectramed) ligado a um amplificador e a um sistema de conversão analógico-digital para aquisição de dados (Power Lab 4/20 - ADInstruments). Através de um software (Chart 5 for Windows) as oscilações de pressão captadas permitiram calcular a PAM e FC.

3.17.5. Registro da atividade simpática para o nervo renal

Os *bursts* de atividade simpática do nervo renal captados pelo eletrodo foram filtrados (100Hz a 1000Hz), amplificados e enviados simultaneamente a um amplificador de som e a um osciloscópio (Tektronix 546B) para visualização e identificação da freqüência de descarga que caracterizam a atividade simpática. Além disso, a atividade simpática captada foi conduzida a uma placa analógico-digital e a um sistema de aquisição de dados (Power Lab 4/20 – ADInstruments). Através de um software (Chart 5 for Windows), o sinal captado foi registrado como sinal bruto, medido por unidades arbitrárias, e simultaneamente convertido em sinal integrado de RSNA que permitiu sua quantificação em Volts/segundo.

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

3.17.6. Atividade simpática para o nervo renal

O registro analisado foi a RSNA integral. O ruído residual de sistema de registro de RSNA, obtido após o procedimento de sacrifício, foi subtraído de todos os valores de atividade simpática obtidos durante os experimentos. O resultado foi considerado o valor absoluto. A média obtida dos valores inteiros dos 5 min anteriores à primeira microinjeção é 100%. As variações vistas após os procedimentos experimentais foram consideradas como a variação da porcentagem (100%) anteriormente citada. Adicionalmente, através do uso do aplicativo '*Spike Histogram*' contido no software Chart, o número de *spikes* captados em função das despolarizações do nervo renal foi contado para a comparação entre os *spikes* obtidos antes e após a injeção endovenosa de 71 nmol/Kg do BPP-10c. Estes experimentos foram realizados em colaboração com o Prof. Dr. Ruy Ribeiro Campos Jr. do Departamento Fisiologia Laboratório de Fisiologia Cardiovascular e Respiratória da Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina.

3.18. Implantação crônica de cânula guia no SNC para injeção intracerebroventricular do BPP-10c

Para realizar a micro-injeção no ventrículo lateral esquerdo (VLE) ou direito (VLD), os animais foram anestesiados com ketamina (185mg/kg) e Xilasina (9,2 mg/kg) i.p. Após a anestesia, o pêlo do dorso da cabeça foi cortado, e os animais fixados ao estereotáxico (Staelting) pelas barras auriculares e pela peça bucal.

A pele do dorso do crânio foi secionada longitudinalmente, o periósteo da região foi afastado com auxílio de espátula, expondo os ossos da calota craniana. As coordenadas estereotáxicas foram utilizadas para o posicionamento da cânula guia logo acima do ventrículo lateral esquerdo (VLE) ou ventrículo lateral direito (VLD) e foram

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

definidas com auxílio do Atlas de coordenadas estereotáxicas (Paxinos e Watson, 1982). A escolha do lado para colocação da cânula guia é aleatória: VLE, antero-posterior (AP) - 1,0mm, ML +1,5mm e dorso-ventral (DV) -3,0mm; VLD, AP – 1,0mm, médio-lateral (ML) –1,5mm e DV –3,0mm, sendo o parâmetro AP determinado. Tomando-se o bregma como zero, o parâmetro ML teve a sutura sagital como zero e para o parâmetro DV o zero foi determinado em relação ao osso parietal.

Com o auxílio de uma broca acoplada a um motor de uso odontológico (Beltec LB-100), o crânio foi perfurado, permitindo a passagem da cânula guia que ao ser introduzida rompeu a dura-máter, e foi posicionada nas coordenadas previstas para cada ponto. Para sustentação desta cânula na posição prevista, foi preparada uma base de cimento odontológico fixada por um parafuso preso ao osso parietal do lado oposto ao lado da cânula.

Estes parâmetros permitem que a cânula guia fique posicionada e fixada a cima do ventrículo lateral (VL) e somente no dia do experimento, uma agulha mizzi 1mm mais longa que a cânula guia, atinge o VL por onde são feitas as injeções. Desta forma se evita a perda de líquor do VL durante o período de recuperação do animal. Após a cirurgia, o animal ficou sob observação, até a recuperação da anestesia, quando então foi mantido no biotério setorial até a realização dos experimentos.

Cinco dias após a cirurgia, a injeção de 10µl BPP-10c em diferentes doses ou salina estéril no mesmo volume foi feita manualmente, durante aproximadamente 1 min, utilizando-se uma agulha mizzi conectada a uma micro-seringa de 100µl (Hamilton®). Depois de cada micro-injeção, a cânula permaneceu no ponto por mais 3 min, a fim de evitar refluxo do líquido injetado. A seguir, a cânula foi retirada lentamente. Durante este procedimento, o animal foi monitorado para medida da PAM e FC por pelo menos 6h. Para realização desses experimentos foi imprescindível a colaboração do aluno de

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

mestrado Eduardo Fontana, além da colaboração e experiência da técnica Vera Pontieri e da Prof. Dra. Claudia Moreira dos Santos da Escola de Artes, Ciências e Humanidades da Universidade de São Paulo.

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

4. RESULTADOS

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

4.1. Mobilização de transientes de $[Ca^{2+}]_i$ induzida pelo BPP-10c é dose-dependente e depende da seqüência carboxi-terminal

A estimulação do receptor B_2 de cininas pela BK leva a um aumento da $[Ca^{2+}]_i$. Essa elevação de transientes de Ca^{2+} induzida pela BK ativa a NOS para gerar NO que funciona como um hormônio para regular processos celulares de células vizinhas (Busse e Fleming, 1995). Por exemplo, no músculo liso, o NO ativa a guanilato ciclase para produzir GMP_c e relaxamento dos vasos, caracterizando o Ca^{2+} como um importante mediador da atividade hipotensiva da BK (Busse e Fleming, 1995).

BPP-10c induz elevações transientes na $[Ca^{2+}]_i$, em células de cultura primária de cérebro de ratos neonatos (Neu-W). Nesse experimento foram utilizadas concentrações crescentes do BPP-10c (0,1-10μM). A análise da relação dose-resposta para elevações de $[Ca^{2+}]_i$ induzida pelo BPP-10c em células Neu-W revelou uma curva atípica, em que a resposta máxima foi medida na concentração em torno de 1μM de BPP-10c e apresentou ser cerca de quatro vezes maior a resposta medida na concentração de 0,1 μM do peptídeo, enquanto que um aumento das concentrações do peptídeo levou a um declínio da resposta de $[Ca^{2+}]_i$, caracterizado por uma curva dose-resposta em forma de sino (Figura 6). O aumento da $[Ca^{2+}]_i$ foi instantâneo e transiente, ou seja, imediatamente (2s) após a aplicação do BPP-10c o pico de resposta alcançou a $[Ca^{2+}]_i$ máxima de aproximadamente 800 nM em células Neu-W, e então rapidamente $[Ca^{2+}]_i$ diminuiu e alcançou níveis basais, 20 segundos após o pico máximo de resposta (Figura 11).

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

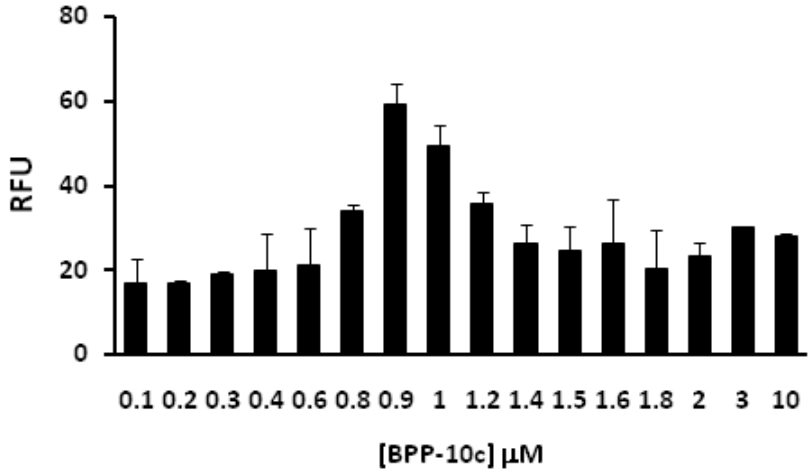

FIGURA 6: Curva dose-resposta para elevação da $[Ca^{2+}]_i$ induzida pelo BPP-10c em células Neu-W. As células foram ensaidas com o "FlexStation Calcium Assay Kit". As mudanças no pico de $[Ca^{2+}]_i$ transientes induzido por vários concentrações de BPP-10c (0.1-10 µM) foram medidas por microfluorimetria usando FlexStation 3. Os dados mostrados representam a média dos valores ± desvio padrão de cinco experimentos independentes. RFU = unidade relativa de fluorescência.

Muitos BPPs isolados do veneno das serpentes apresentam um motivo C-terminal canônico Pro-X-Ile-Pro-Pro, onde X poderia ser qualquer resíduo de aminoácido (Ianzer et al., 2004). Por um longo tempo, acreditava-se que a seqüência C-terminal dos BPPs era importante para a atividade farmacológica desses peptídeos (Ondetti e Cushamn, 1984). Em vista disso, nós empregamos o método de substituição de cada um dos resíduos deste motivo canônico por uma alanina *"alanina scan"* (Magdesian et al., 2005) para verificar se esses resíduos de aminoácidos eram cruciais para as respostas de $[Ca^{2+}]_i$ induzidas pelo BPP-10c. Análogos do BPP-10c foram sintetizados com a substituição de um único resíduo de aminoácido, Ile ou Pro, nas posições 4, 6, 7, 9 ou 10 por Ala, gerando peptídeos modificados, denominados de Ala1, Ala2, Ala3, Ala4 e Ala5, respectivamente. Os resultados demonstraram que todos esses peptídeos foram menos eficientes que o peptídeo padrão (BPP-10c) não modificado na indução de transientes $[Ca^{2+}]_i$, apresentando cerca de 50% da atividade observada para o BPP-10c

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

(**Ala1** = 56,6±7,3%; **Ala2** = 56,3±15,6%; **Ala3** = 51,8±14,6%, **Ala4** = 52,97±1,7%; **Ala5** = 47,9±5,7%).

Além disso, uma seqüência embaralhada contendo os cinco aminoácidos amino-terminal em ordem alterada (N5-embaralhado) revelou a mesma atividade que o BPP-10c (**N5-embaralhado** = 106,8±37,1%), indicando que essa parte da seqüência não deve ser importante para sua atividade biológica. A seqüência truncada do BPP-10c sem os três resíduos de aminoácidos no N-terminal (sem <ENW) também não revelou nenhuma diferença na indução de transientes da $[Ca^{2+}]_i$ (**sem <ENW** = 93±11%) quando comparado ao efeito observado na presença da mesma concentração do BPP-10c. No entanto quando todos os resíduos de aminoácidos foram sintetizados em ordem invertida do C-terminal para o N-terminal (BPP-10c invertido) a resposta foi abolida (**BPP-10c invertido** = 3,1±1,3%), revelando a importância da seqüência do BPP-10c para atividade de mobilização da $[Ca^{2+}]_i$ (Figura 7).

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

A

Nome	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
BPP-10c	<E	N	W	P	H	P	Q	I	P	P
Ala1	<E	N	W	**A**	H	P	Q	I	P	P
Ala2	<E	N	W	P	H	**A**	Q	I	P	P
Ala3	<E	N	W	P	H	P	Q	**A**	P	P
Ala4	<E	N	W	P	H	P	Q	I	**A**	P
Ala5	<E	N	W	P	H	P	Q	I	P	**A**
N5-embaralhado	**P**	**H**	**N**	**W**	**Q**	P	Q	I	P	P
sem <ENW				P	H	P	Q	I	P	P
BPP-10c invertido	**P**	**P**	**I**	**Q**	**P**	**H**	**P**	**W**	**N**	**E**

B

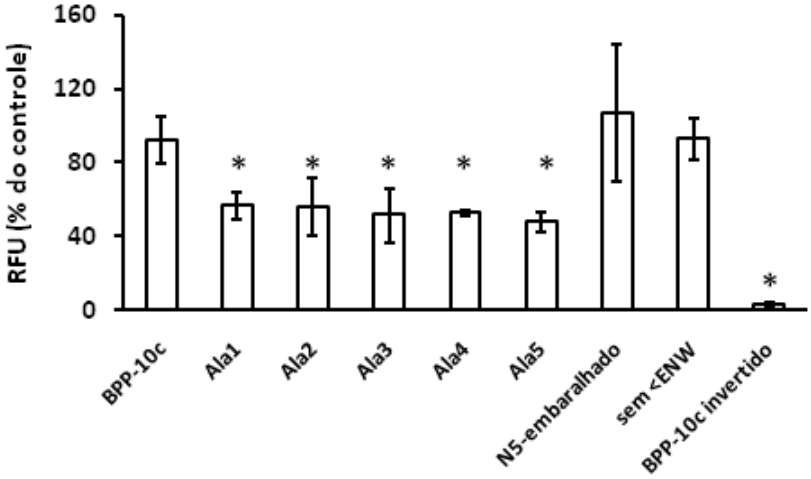

FIGURA 7: Relação seqüência e atividade do BPP-10c. Análogos do BPP-10c foram usados para definir se os resíduos de Ile ou Pro nas posições 4, 6, 8, 9 e 10 eram relevantes para o efeito de indução da resposta de Ca^{2+} pelo BPP-10c (1μM). Um peptídeo apresentando a mesma seqüência do BPP-10c, mas com os cinco primeiros resíduos de aminoácidos aleatoriamente embaralhados e o BPP-10c truncado sem os três resíduos amino-terminal foram sintetizados para avaliar a importância do N-terminal para atividade na mobilização da $[Ca^{2+}]_i$ desse peptídeo. Os dados mostrados representam a média dos valores ± desvio padrão de quatro experimentos independentes. RFU = unidade relativa de fluorescência. Análise de variância (ANOVA) seguido do teste Student-Newman-Keuls *=p<0,01.

4.2. Caracterização da transdução de sinal induzida pelo BPP-10c

A BK, que tem conhecida ação hipotensiva, atua pela ligação com o receptor B2 e o processo de transdução de sinal é bem caracterizado. Por esse motivo, esse neuropeptídeo foi usado como referência nas medidas de variação da $[Ca^{2+}]_i$, na ausência ou presença de inibidores de diversas vias de sinalização intracelular. BK é

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

conhecido ativar PLC-β e induzir liberação de Ca^{2+} de uma reserva intracelular sensível a inositoltrifosfato (IP_3) (Fleming e Busse, 1997).

A depleção dos estoques de Ca^{2+} intracelular pela pré-incubação com tapsigargina, um inibidor da Ca^{2+}-ATPase do retículo endoplasmático (Thastrup et al., 1989), resultou numa quase completa perda da resposta de aumento da $[Ca^{2+}]_i$ induzida pelo BPP-10c e BK. No entanto, a resposta induzida pela BK não foi afetada pela ausência de Ca^{2+} no meio extracelular, enquanto que o aumento da $[Ca^{2+}]_i$ induzido pelo BPP-10c foi significativamente reduzido na ausência de Ca^{2+} extracelular (Figura 8). Dessa maneira, o transiente da $[Ca^{2+}]_i$ induzido pelo BPP-10c envolve o influxo de Ca^{2+} extracelular bem como a liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares. Esses resultados sugerem a ativação de um mecanismo conhecido como CICR – *calcium-induced calcium release* (Endo, 1977). De fato, a pré-incubação das células Neu-W com 50 μM de rianodina, um inibidor da CICR (Zhang et al., 2006), diminuiu significativamente a resposta de $[Ca^{2+}]_i$ induzida pelo BPP-10c.

U-73122, um inibidor específico da atividade da PLC-β (Bleasdale et al., 1990) foi utilizado para determinar se a atividade da PLC-β participaria da via de sinalização do BPP-10c. Diferentemente das respostas de Ca^{2+} induzida pela BK, o aumento de $[Ca^{2+}]_i$ induzido pelo BPP-10c não foi afetado pela incubação com o inibidor da PLC-β descartando a participação de IP_3 gerada pela PLC-β. Entretanto, a ativação do receptor de IP_3 dos estoques intracelulares na mobilização da $[Ca^{2+}]_i$ induzida pelo BPP-10c não pode ser descartada visto que esses receptores além de serem ativados por IP_3 são também ativados por Ca^{2+}, pelo mecanismo CICR (revisado por Berridge et al., 2000).

A pré-incubação das células Neu-W por 30min com 100ng/ml de toxina pertussis, um inibidor da ativação de receptores metabotrópicos acoplados a proteína G_i ou G_o

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

(proteína com atividade GTPásia inibitória) (Neer e Clapham, 1988), também resultou em uma redução significativa dos transientes de $[Ca^{2+}]_i$ induzido pelo BPP-10c, enquanto que a atividade do receptor B2 de cininas não foi afetada na presença de toxina pertussis, qual é sabidamente mediado por G_q (Fleming e Busse, 1997).

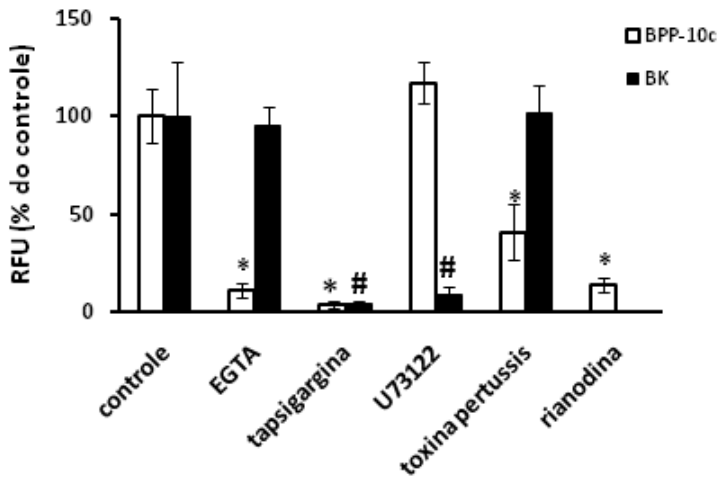

FIGURA 8. Caracterização da via de sinalização de Ca^{2+} do BPP-10c e BK em células Neu-W. Os valores arbitrários de fluorescência que corresponde ao nível da $[Ca^{2+}]_i$ induzido por 1 μM de BPP-10c ou de BK foram obtidos na ausência (controle) ou seguido da pré-incubação com vários inibidores da via de transdução de sinal de Ca^{2+} utilizando FlexStation 3. O influxo de Ca^{2+} e a liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares foram inibidos por pré-incubação das células com 10 mM EGTA ou 200 ng/ml tapsigargina por 5 ou 30 min, respectivamente. A participação dos estoques de Ca^{2+} sensíveis a IP_3 e rianodina nas respostas de $[Ca^{2+}]_i$ induzida pelo BPP-10c foi estudada seguindo a pré-incubação por 30min com 20 μM de inibidor de PLC-β, U73122 ou com 50 μM rianodina. As células foram pré-incubadas com 100 ng/ml toxina pertussis por 30 min para inibição das respostas de receptores mediados por proteínas $G_{i/o}$. Os experimentos controle, exceto para inibição dos estoques de Ca^{2+} sensíveis a rianodina, foram realizados na presença de BK cuja transdução de sinal é bem caracterizada. Os dados mostrados representam a média dos valores ± desvio padrão de cinco experimentos independentes. RFU = unidade relativa de fluorescência. Análise de variância (ANOVA) seguido do teste Student-Newman-Keuls * = $p<0.001$, comparando com a estimulação com BPP-10c na ausência de inibidores; # = $p<0.001$, comparando com a estimulação com BK na ausência de inibidores.

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

4.3. Mobilização da $[Ca^{2+}]_i$ induzida pelo BPP-10c em células neuronais

A cultura primária de cérebro de ratos neonatos tem sido frequentemente utilizada para o estudo do efeito biológico de moléculas com atividade no SNC. Essa preparação de célula é composta de uma mistura de fenótipos neuronal e glial, refletindo condições *in vivo* (Raizada et al., 1995; Lu e Raizada, 1995; Jin et al., 2007), não permitindo, portanto, diferenciar os receptores expressos em neurônio e glia. A cultura, nomeada nesse trabalho como Neu-W contém cerca de 80% de neurônios como determinado por imunohistoquímica (marcação neuronal específica) e por estudos de eletrofisiologia (Raizada, 1983; Puro e Agardh, 1984; Boyd et al., 1985). Sabendo que a pia-máter e os vasos sangüíneos foram removidos antes da dissociação das células, os outros 20% dessa cultura é constituída por células gliais (Raizada, 1983).

Para avaliar distintamente os efeitos induzidos pelo BPP-10c em neurônios ou células gliais, linhagens celulares homogêneas e estáveis, neuroblastoma humano (SK-N-AS) e glioma de rato (C6) foram utilizadas para as medidas de variação da $[Ca^{2+}]_i$. A estimulação com 1 μM do BPP-10c resultou em um aumento de transientes da $[Ca^{2+}]_i$ em células SK-N-AS, assim como em células Neu-W, enquanto que em células C6 nenhum aumento significativo da $[Ca^{2+}]_i$ foi observado (Figura 9).

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

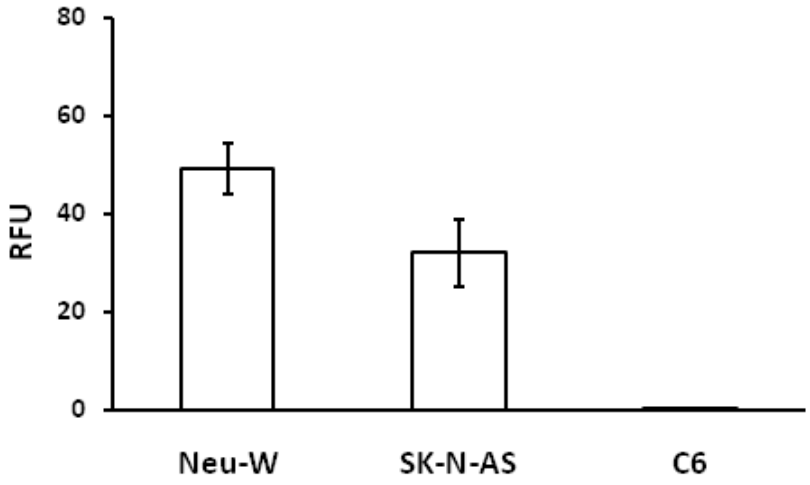

FIGURA 9. Comparação do aumento da $[Ca^{2+}]_i$ induzido pelo BPP-10c em células neuronais e gliais. O aumento da $[Ca^{2+}]_i$ induzido por 1μM de BPP-10c foram determinados por microfluorimetria usando FlexStation 3. Neu-W: células de cérebro de ratos neonatos; SK-N-AS: células de neuroblastoma humano e C6: células de glioma de rato. Os dados mostrados representam a média dos valores ± desvio padrão de cinco experimentos independentes. RFU = unidade relativa de fluorescência.

Embora o BPP-10c seja um inibidor da ECA, essa propriedade não está envolvida nos aumentos transientes da $[Ca^{2+}]_i$ induzidos por este peptídeo, já que 1 μM do captopril, inibidor da ECA, mesmo quando utilizado em concentração acima da constante de inibição para a atividade da ECA ($K_{i\ sítio\text{-}N}$ = 0.5 nM e $K_{i\ sítio\text{-}C}$ = 8.3 nM de acordo com Cotton et al., 2002), não provocou nenhuma mudança da $[Ca^{2+}]_i$ em células de neuroblastoma (Figura 10). Além disso, repetidas aplicações do BPP-10c em células SK-N-AS, em intervalos de 2 min, levou à dessensitivação da resposta induzida por esse peptídeo (Figura 11), mas não inibiu os transientes da $[Ca^{2+}]_i$ mediado pelo receptor B2. Corroborando com esses dados, a pré-incubação das células Neu-W, por 1 ou 5 min com 1 μM de BPP-10c, não interferiu nos transiente de $[Ca^{2+}]_i$ induzidos por 1 μM BK (Figura 12). Da mesma forma, em células SK-N-AS nenhuma interferência do BPP-10c sobre a atividade do receptor da BK foi observada (Figura 10). Para confirmar que não há participação dos receptores de cininas no aumento da $[Ca^{2+}]_i$ induzida pelo BPP-10c,

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

a atividade do BPP-10c foi testada na presença de antagonistas dos receptores B1 e B2 de cininas. Ambos inibidores, HOE-140, um antagonista do receptor B2, e o des-Arg^9-[Leu^8]-BK (DALBK), um antagonista do receptor B1, não interferiram significativamente nas respostas induzidas pelo BPP-10c (Figura 13). Os receptores muscarínicos, de glutamato e α-2 adrenérgico são alguns dos receptores envolvidos com a produção de NO e controle da pressão arterial no SNC (Garthwaite e Boulton, 1995; Padley et al., 2005; Kanagy, 2005), por isso o aumento da $[Ca^{2+}]_i$ induzido pelo BPP-10c foi avaliado na presença de antagonistas desses receptores. MK-801, antagonista de receptores de glutamato; yohimbine, do receptor α-2 adrenérgico e atropina, antagonista dos receptores muscarínicos. No entanto, aumentos transientes da $[Ca^{2+}]_i$ induzidos por 1μM do BPP-10c não foram afetados por nenhum desses antagonistas (Figura 13).

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

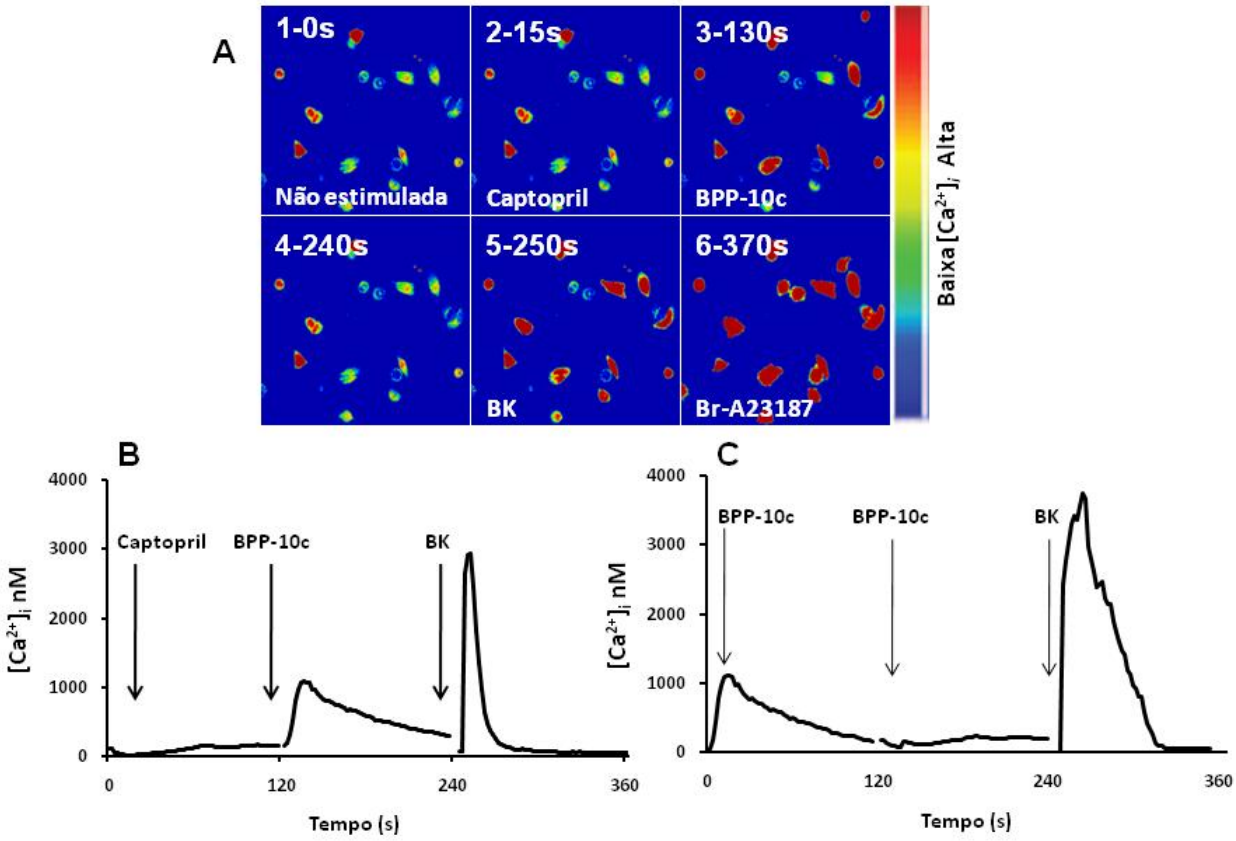

FIGURA 10. Avaliação da variação da $[Ca^{2+}]_i$ em células SK-N-AS estimuladas com captopril, BPP-10c ou BK, por microscopia confocal. A. (1): imagens de células SK-N-AS não estimuladas. (2) Células estimuladas com 1 µM de captopril e (3) com 1 µM de BPP-10c. (4) Níveis da $[Ca^{2+}]_i$ após recuperação das células após a estimulação com agonista. (5) Células estimuladas com 1 µM BK e (6) 5µM de ionóforo de Ca^{2+} Br-A23187 para verificar as células viáveis e a resposta máxima. **B**. Gráfico representativo de transientes da $[Ca^{2+}]_i$ após aplicação de captopril, BPP-10c e BK, respectivamente. **C**. Respostas da $[Ca^{2+}]_i$ induzida por 1µM de BPP-10c, seguida por uma aplicação de BPP-10c após 2 min e finalmente por adição de 1µM BK. As setas indicam o tempo de aplicação do ligante (**B** e **C**).

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

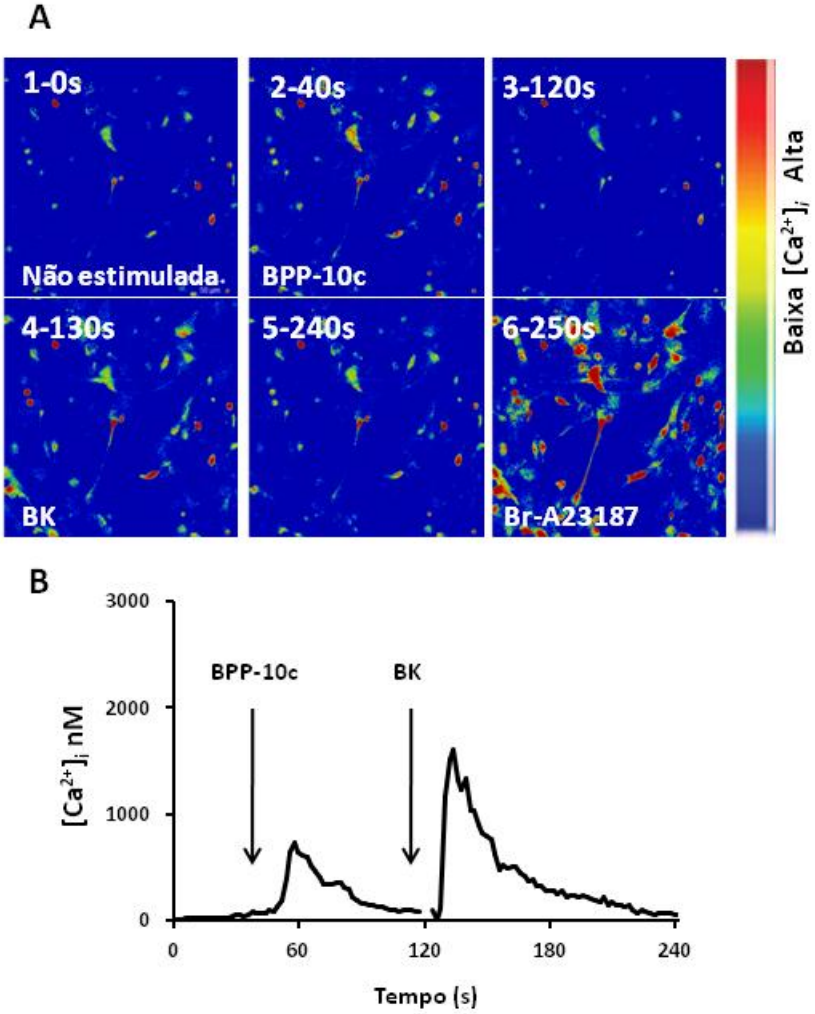

FIGURA 11. Avaliação da variação da $[Ca^{2+}]_i$ em células Neu-W estimuladas com BPP-10c ou BK, por microscopia confocal. A. (1): Imagens de células Neu-W não estimuladas. (2) Células estimuladas com 1 µM de BPP-10c. (3) Níveis da $[Ca^{2+}]_i$ após recuperação das células após estimulação com o agonista. (4) Células estimuladas com 1 µM BK. (5) Níveis da $[Ca^{2+}]_i$ após recuperação das células após estimulação com o agonista e (6) 5µM de ionóforo de Ca^{2+} Br-A23187. **B**. Gráfico representativo de transientes da $[Ca^{2+}]_i$ após aplicação de BPP-10c e BK, respectivamente. As setas indicam o tempo de aplicação do ligante.

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

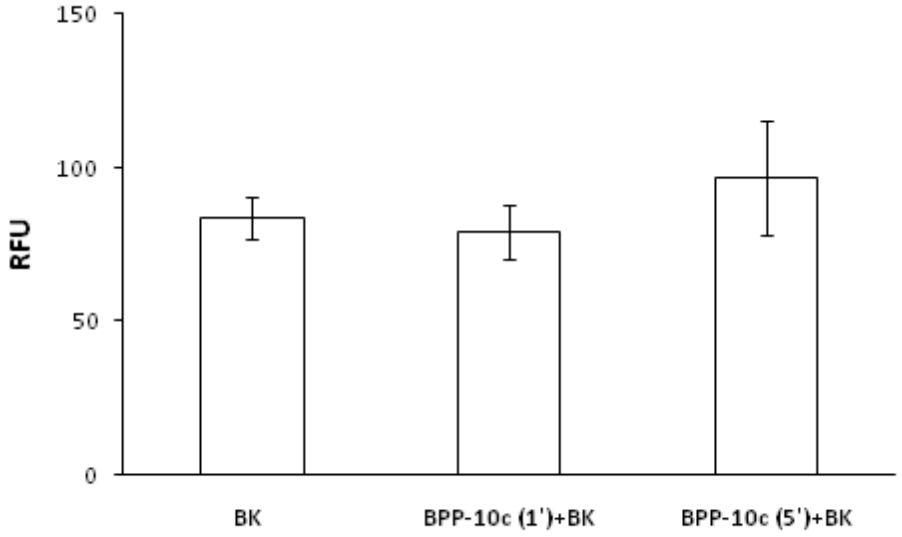

FIGURA 12. Respostas de aumento da $[Ca^{2+}]_i$ induzida pelo BPP-10c em células Neu-W não são mediadas por receptor B2 de bradicinina. Nesse experimento foi verificado se a pré-incubação com BPP-10c dessensibilizaria a resposta da $[Ca^{2+}]_i$ ou potencializaria os efeitos promovidos pela BK. Por isso, o aumento da $[Ca^{2+}]_i$ induzido por 1μM BK após a pré-incubação com 1 μM de BPP-10c por 1 ou 5 min foram determinados por microfluorimetria usando FlexStation 3. Os dados mostrados (média dos valores ± S.D.) representam os resultados de três experimentos independentes. RFU = unidade relativa de fluorescência.

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

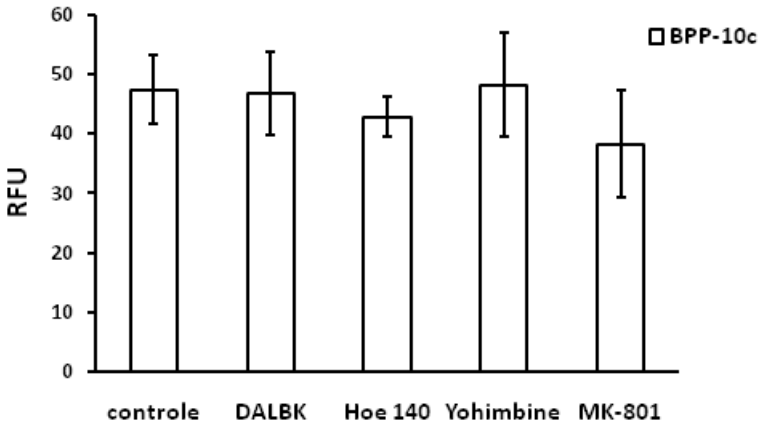

FIGURA 13. Interferência de antagonistas dos receptores B1 e B2 de cininas, a-**2 adrenérgico e NMDA na resposta de Ca^{2+} induzida pelo BPP-10c.** O valores da $[Ca^{2+}]_i$ após a estimulação das células com 1 μM BPP-10c foram obtidos na ausência (controle) ou seguido da pré-incubação por 30min com alguns antagonistas. Antagonista do receptor B1: 1μM des-Arg^9-[Leu^8]-BK (DALBK), antagonista do receptor B2: 1 μM Hoe 140, antagonista do receptor α-2 adrenérgico: 250nM yohimbine e antagonista do receptor NMDA e nicotínico de acetilcolina: 10μM MK-801. Os dados mostrados representam a média dos valores ± desvio padrão de quatro experimentos independentes. RFU = unidade relativa de fluorescência.

4.4. Envolvimento da ativação da proteína $G_{i/o}$ na atividade do BPP-10c em células neuronais

A inibição da resposta de aumento da $[Ca^{2+}]_i$ induzida pelo BPP-10c na presença de toxina pertussis (Figura 8) indica o envolvimento da ativação de proteína $G_{i/o}$ na via de sinalização desse peptídeo. Outra evidência da participação da proteína $G_{i/o}$, foi observada pela inibição do acúmulo de AMP_c induzido por 50 μM de forskolina em células Neu-W na presença de 1 μM de BPP-10c. No entanto, o acúmulo de AMP_c induzido por forskolina em células C6 não foi significativamente inibido na presença de BPP-10c (Figura 14). Esses resultados corroboram com os dados obtidos nas medidas da $[Ca^{2+}]_i$, indicando que apenas os neurônios são sensíveis a estimulação pelo BPP-10c (Figura 9). Considerando o envolvimento da ativação de proteína $G_{i/o}$ e visando a

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

identificação do receptor putativo, o BPP-10c foi usado como ligante em ensaios de ligação contra 105 receptores acoplados a proteína G, incluindo o receptor B2 de cininas, no entanto, nenhuma ligação específica com esses receptores testados foi observada (Tabela 4).

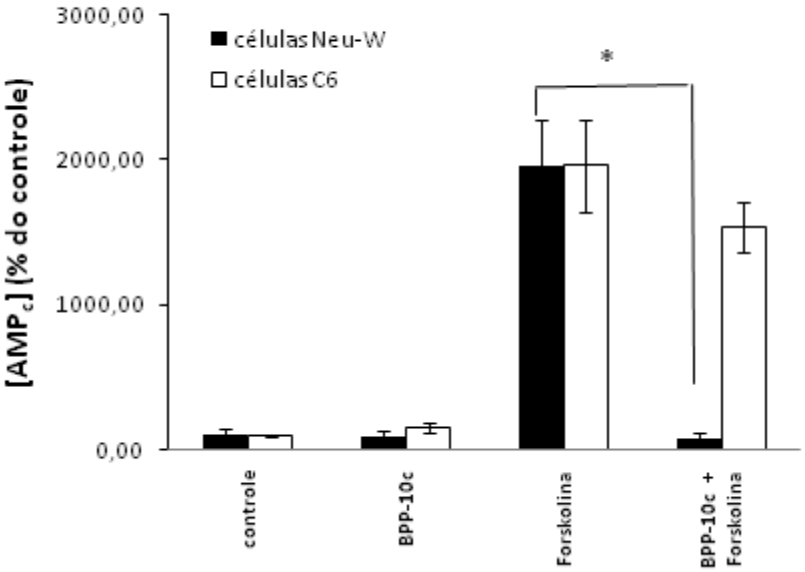

FIGURA 14. Efeito do BPP-10c sobre o acúmulo de AMP_c em células Neu-W e C6. Células Neu-W (cultura primária de cérebro de ratos neonatos) e C6 (glioma humana) foram pré-incubadas por 10 min na ausência (controle) ou presença de 1μM de BPP-10c. Quando indicado, 50 μM de forskolina foi adicionado e as células foram incubadas por 1 hora. Os dados foram comparados com aqueles obtidos em medidas controle na ausência de qualquer droga (normalizado para 100%). Os dados (média dos valores ± S.D.) representam os resultados de três experimentos independentes. Análise de variância (ANOVA) seguido do teste Student-Newman-Keuls *= $p < 0.05$, comparação dos níveis de AMP_c em células tratadas com forskolina + BPP-10c.

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

TABELA 4. Exclusão de receptores acoplados a proteína G como possíveis receptores para o BPP-10c. Radioligantes de receptores foram utilizados para ensaios de seleção (*screening*) com o BPP-10c contra 105 receptores acoplados a proteína G humanos caracterizados. Os ensaios foram realizados pela MDS Pharma Services conforme detalhado na seção de Materiais e Métodos. K_d = constante de dissociação dos radioligantes.

	Receptor	Radioligante	K_d (nM)
1	Adenosine A_1	[H^3] DPCPX	1,4
2	Adenosine A_{2a}	[H^3] CGS-21680	64
3	Adenosine A_3	[I^{125}] AB-MECA	5,9
4	Adrenergic α_{1D}	[H^3] Prazosin	0,58
5	Adrenergic α_{2A}	[H^3] MK-912	0,6
6	Adrenérgico α_{2B}	[H^3] Rauwolscine	2,1
7	Adrenérgico α_{2C}	[H^3] MK-912	0,17
8	Adrenérgico β_1	[I^{125}] Cyanopindolol	0,041
9	Adrenérgico β_2	[H^3] CGP-12177	0,44
10	Adrenérgico β_3	[I^{125}] Cyanopindolol	1,5
11	Adrenomodulilin AM_1	[I^{125}] Adrenomedullin (13-52)	0,045
12	Adrenomodulilin AM_2	[I^{125}] Adrenomedullin (13-52)	0,018
13	Angiotensina AT_1	[I^{125}] (Sar^1,Ile^8)-AngiotensinaII	0,17
14	Angiotensina AT_2	[I^{125}] CGP-42112A	0,012
15	APJ	[I^{125}] (Pyr^1)-Apelina-13	0,16
16	Bombesina BB1	[I^{125}] (Tyr^4)-Bombesina	0,0045
17	Bombesina BB2	[I^{125}] (Tyr^4)-Bombesina	0,062
18	Bombesina BB3	[I^{125}] (D-Tyr^6,β-Ala^{11}, Phe^{13},Nle^{14})-BN (6-14)	0,21
19	Bradicinina B_1	[H^3] (Des-Arg^{10})-Kallidin	0,17
20	Bradicinina B_2	[H^3] Bradicinina	0,29
21	Calcitonina	[I^{125}] Calcitonina	0,05
22	CGRP1	[I^{125}] CGPRP (humano)	0,008
23	Cannabinóide CB_1	[H^3] CP-55,940	1,3
24	Cannabinóide CB_2	[H^3] WIN-55,212-2	4,9
25	Chemokine CCR1	[I^{125}] MIP-1α	0,017
26	Chemokine CCR2B	[I^{125}] MCP-1	0,063
27	Chemokine CCR4	[I^{125}] TARC	0,11
28	Chemokine CCR5	[I^{125}] MIP-1β	0,34
29	Chemokine CX3CR1	[I^{125}] Fractalkine	0,07

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

continuação TABELA 4

	Receptor	Radioligante	K_d (nM)
30	ChemokineCXCR1/2 (IL-8, não seletivo)	[I^{125}] IL-8	1,2
31	ChemokineCXCR2	[I^{125}] IL-8	0,035
32	Cholecystikinin CCK1	[H^3] Devazepide (I-364,718)	0,2
33	Cholecystikinin CCK2	[I^{125}] CCK-8	0,1
34	Corticotropin Releasing Factor CRF1	[I^{125}] (Tyr^0)-CRF	0,47
35	Dopamine D_1	[H^3] SCH-23390	1,4
36	Dopamine D_{2L}	[H^3] Spiperone	0,08
37	Dopamine D_{2S}	[H^3] Spiperone	0,09
38	Dopamine D_3	[H^3] Spiperone	0,36
39	Dopamine $D_{4.2}$	[H^3] Spiperone	0,32
40	Dopamine $D_{4.4}$	[H^3] Spiperone	0,46
41	Dopamine $D_{4.7}$	[H^3] Spiperone	0,48
42	Dopamine D_5	[H^3] SCH-23390	0,73
43	Endotelina ET_A	[I^{125}] Endotelina-1	0,048
44	Endotelina ET_B	[I^{125}] Endotelina-1	0,085
45	G protein-coupled Receptor GPR103	[I^{125}] QRFP-43	0,13
46	G protein-coupled Receptor GPR8	[I^{125}] NPW-23	0,085
47	GABA $_{B1A}$	[H^3] CGP-54626	3,3
48	GABA $_{B1B}$	[H^3] CGP-54626	3,6
49	Galanin GAL 1	[I^{125}] Galanin	0,022
50	Galanin GAL 2	[I^{125}] Galanin	0,13
51	Growth Hormone Secretagogue (GHS, Grelina)	[I^{125}] Grelina	0,038
52	Histamina H_1	[H^3] Pyrilamine	1,1
53	Histamina H_2	[I^{125}] Aminopotentidine	0,45
54	Histamina H_3	[H^3] R(-)-α-Metilhistamina	2,4
55	Histamina H_4	[H^3] Histamina	5,7
56	Leukotriene, BLT (LTB_4)	[H^3] LTBA	0,068
57	Leukotriene,Cysteinyl $CysLT_1$	[H^3] LTD4	0,21
58	Leukotriene,Cysteinyl $CysLT_2$	[H^3] LTC4	1,3
59	Melanocortina MC $_1$	[I^{125}] NDP-α-MSH	0,037
60	Melanocortina MC $_3$	[I^{125}] NDP-α-MSH	0,24
61	Melanocortina MC $_4$	[I^{125}] NDP-α-MSH	0,5
62	Melanocortina MC $_5$	[I^{125}] NDP-α-MSH	0,53
63	Melatonina MT $_1$	[I^{125}] 2-Iodomelatonina	0,054

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

continuação TABELA 4

	Receptor	Radioligante	K_d (nM)
64	Melatonina MT_2	[I^{125}] 2-Iodomelatonina	0,054
65	Motilin	[I^{125}] Motilin	0,1
66	Muscarínico M_1	[H^3] N-Metilscopolamine	0,26
67	Muscarínico M_2	[H^3] N-Metilscopolamine	0,58
68	Muscarínico M_3	[H^3] N-Metilscopolamine	0,75
69	Muscarínico M_4	[H^3] N-Metilscopolamine	0,22
70	Muscarínico M_5	[H^3] N-Metilscopolamine	1,3
71	N-Formyl peptide Receptor FPR1	[H^3] fMLF	0,26
72	N-Formyl peptide Receptor-like FPR1	[I^{125}] WKYMVm	0,01
73	Neuromedin U NMU_1	[I^{125}] Neuromedin U-25	0,14
74	Neuromedin U NMU_2	[I^{125}] Neuromedin U-25	0,072
75	Neuropeptídeo YY_1	[I^{125}] Peptídeo YY	0,24
76	Neuropeptídeo YY_2	[I^{125}] Peptídeo YY	0,012
77	Neurotensina NT_1	[I^{125}] Neurotensina	0,082
78	Opiate σ (OP 1,DOP)	[H^3] Naltrindole	0,49
79	Opiate k (OP 2, KOP)	[H^3] Diprenorphine	0,4
80	Opiate μ (OP 3, MOP)	[H^3] Diprenorphine	0,41
81	Orphanin ORL_1	[H^3] Nociceptin	1
82	Platelet Activating Factor (PAF)	[H^3] PAF	0,13
83	Prostanoid CRTH2	[H^3] Prostaglandina D_2 (PGD_2)	4,1
84	Prostanoid DP	[H^3] Prostaglandina D_2 (PGD_2)	2,3
85	Prostanoid EP_2	[H^3] Prostaglandina ED_2 (PGE_2)	3,1
86	Prostanoid EP_4	[H^3] Prostaglandina ED_2 (PGE_2)	0,31
87	Prostanoid, Troboxano A_2 (TP)	[H^3] SQ-29548	9,4
88	Serotonina $5\text{-}HT_{1A}$	[H^3] 8-OH-DPAT	2
89	Serotonina $5\text{-}HT_{2B}$	[H^3] Lysergic acid diethilamide (LSD)	2,1
90	Serotonina $5\text{-}HT_{2C}$	[H^3]Mesulergine	1,1
91	Serotonina $5\text{-}HT_{5A}$	[H^3] Lysergic acid diethilamide (LSD)	1,8
92	Serotonina $5\text{-}HT_6$	[H^3] Lysergic acid diethilamide (LSD)	1,3
93	Somatostatina sst1	[I^{125}] Somatostatina-14	0,48
94	Somatostatina sst2	[I^{125}] Somatostatina-14	0,034
95	Somatostatina sst3	[I^{125}] Somatostatina-14	0,052

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

continuação TABELA 4

	Receptor	Radioligante	K_d (nM)
96	Somatostatina sst4	[I^{125}] Somatostatina-14	1,4
97	Somatostatina sst5	[I^{125}] Somatostatina-14	0,5
98	Tachykinin NK_1	[H^3] SR-140333	0,3
99	Tachykinin NK_2	[H^3] SR-48968	0,25
100	Tachykinin NK_3	[I^{125}] $MePhe^7$-Neurokinin B	0,28
101	Urotensina II	[I^{125}] Urotensina II	0,2
102	Vasoactive Instestinal Peptide VIP_1	[I^{125}] VIP	0,024
103	Vasopressina V_{1A}	[I^{125}] PhenylacetylTyr(Me)PheGlnAsnArgProArgTyr	0,0022
104	Vasopressina V_{1B}	[H^3] (Arg^8)-Vasopressina	0,21
105	Vasopressina V_2	[H^3] (Arg^8)-Vasopressina	3,2

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

4.5. Proteínas com afinidade pelo BPP-10c

4.5.1. Ensaio de cromatografia de afinidade

Foi visto anteriormente que não foi possível identificar o receptor do BPP-10c. Por esse motivo procuramos identificar proteínas encefálicas com afinidade pelo BPP-10c utilizando cromatografias de afinidade, no qual o extrato citosólico e membranar de cérebro de rato adulto foram aplicados. O peptídeo foi acoplado a uma resina ativada (NHS-activated HP) de uma coluna HiTrap, com 95% de eficiência de incorporação. As análises das proteínas das frações de membrana e citosol retidas na coluna por ligação com o BPP-10c e em seguida, eluídas tanto por abaixamento de pH como por competição com o BPP-10c foram realizadas inicialmente por eletroforese em SDS-PAGE.

O perfil eletroforético dos eluatos indicou a presença de uma proteína majoritária com massa molecular em torno de 75 KDa, além de quatro proteínas de massas moleculares aproximadas de 70, 60, 45 e 35 kDa (Figura 15). Essas proteínas foram analisadas por espectrometria de massas (LC-MS/MS) após tripsinização de cada uma das bandas de proteína. A proteína de 75 KDa de ambas frações foi identificada como sendo a sinapsina isoforma Ia. Os peptídeos ionizados no espectrômetro de massas provenientes dessa proteína cobriram 57% e 43% na fração citosólica da seqüência total dessa proteína eluídas por competição e abaixamento de pH, respectivamente, e 24% na fração de membrana eluída por abaixamento de pH. As proteínas de 70 e 60 KDa foram identificadas como sendo sinapsina isoforma IIb, com 9% de cobertura e actina citoplasmática, com 23% de cobertura da seqüência total, respectivamente (Tabela 5). Os componentes protéicos menos abundantes nas frações de membrana e citosol não foram identificados por espectrometria de massas apesar de estarem presentes no gel de SDS. Confirmando a especificidade de ligação ao BPP-10c,

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

um similar perfil de eluição foi obtido quando as proteínas das frações citosólicas e de membrana solubilizadas foram pré-cromatografadas na coluna HiTrap-controle seguida por cromatografia em HiTrap-BPP-10c e eluída com tampão de eluição (dados não apresentados).

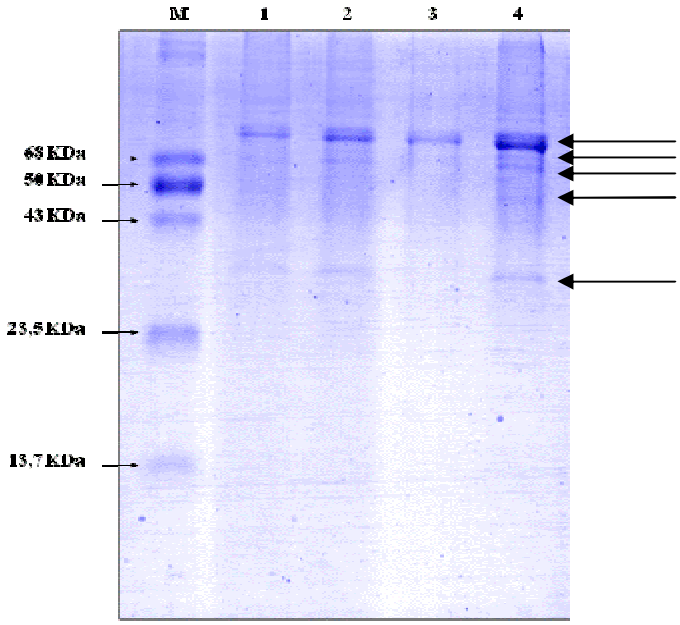

FIGURA 15. Análise por SDS-PAGE dos eluatos das cromatografias de afinidade realizada nas colunas HiTrap-BPP-10c. Gel de poliacrilamida 12,5%: **Linha M** – padrão de massas moleculares; **linha 1** – proteínas da fração citosólica de encéfalos de ratos eluídas com tampão contendo 5 mg de BPP-10c; **linha 2** – proteínas da fração citosólica de encéfalos de ratos eluídas com tampão contendo glicina 100 mM e NaCl 0,5 M pH 3,0; **linha 3** – proteínas da fração de membrana de encéfalos de ratos eluídas com tampão contendo 5 mg de BPP-10c; **linha 4** – proteínas da fração de membrana de encéfalos de ratos eluídas com tampão contendo glicina 100 mM e NaCl 0,5 M pH 3,0.

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

TABELA 5. Proteínas encefálicas identificadas por espectrometria de massas

Linha	Fração proteica	Eluição	Proteína	Número de acesso	Espécie originária	Massa molecular (Da)	Cobertura (%)
1	Citosol	Competição	**Sinapsina Ia**	gi 9507159	*Rattus norvegicus*	74114	43
2	Citosol	Abaixamento de pH	**Sinapsina Ia**	gi 9507159	*Rattus norvegicus*	74114	57
4	Menbrana	Abaixamento de pH	**Sinapsina Ia**	gi 9507159	*Rattus norvegicus*	74114	24
2	Citosol	Abaixamento de pH	**Sinapsina IIb**	gi 112350	*Rattus norvegicus*	70038	10
4	Membrana	Abaixamento de pH	**Actina**	gi 109492380	*Rattus norvegicus*	59163	14

4.5.2. Argininosuccinato sintase como proteína ligadora do BPP-10c no SNC

Recentemente, a argininosuccinato sintase (ASS) foi caracterizada por nosso grupo como alvo renal do BPP-10c (Guerreiro et al., 2009). A ASS participa do ciclo citrulina-NO para a produção de NO em muitos tecidos. Além disto, o NO, no cérebro, está envolvido na regulação cardiovascular central (Lin et al., 1999). Não foi possível identificar a ASS entre as proteínas do encéfalo isoladas por cromatografia de afinidade utilizando uma coluna imobilizada com o BPP-10c, assim como ocorreu para os extratos renais (Guerreiro et al., 2009). Entretanto, utilizando a técnica de *Western blot*, foi possível observar a presença dessa enzima nos eluatos do encéfalo, tanto no eluato da fração citosólica como de membrana, como revelado pelo anticorpo específico anti-ASS (Figura 16). Essa discrepância pode ser explicada devido à diferença nos níveis de expressão da enzima ASS nos diferentes tecidos, já que a expressão da ASS é significativamente menor no cérebro de ratos adultos que nos rins (Husson et al., 2003). Entretanto, este fato não diminui a importância da interação do BPP-10c com essa enzima no SNC.

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

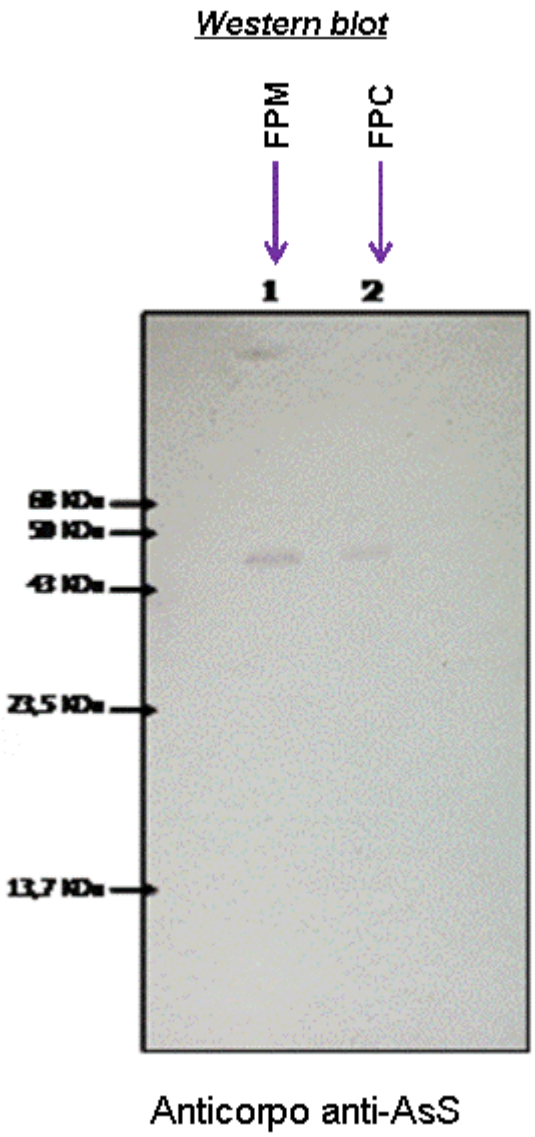

FIGURA 16. Análise por *Western Blot* utilizando anticorpo primário anti-ASS das amostras obtidas por cromatografia de afinidade. Foram aplicados 5 µg do eluatos da cromatografia de afinidade da FPM e da FPC de encéfalos de ratos na coluna HiTrap-BPP-10c e eluídos com tampão contendo glicina 100 mM e NaCl 0,5 M. **Linha M** – marcador de peso molecular; l**inha 1** – FPM e **linha 2** – FPC. (FPC – fração protéica citosólica; FPM – fração protéica de membrana).

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

4.6. Produção de NO induzida pelo BPP-10c

4.6.1. Quantificação de NO no cérebro de ratos Wistar e SHRs

A ASS é a enzima passo limitante de reações acopladas para o fornecimento de L-arginina para a NO sintase (NOS). O BPP-10c modula positivamente a atividade da ASS *in vitro* e *in vivo*, o que reflete em um aumento na concentração de L-arginina para o consumo da NOS e conseqüentemente levando a um aumento na produção de NO (Guerreiro et al., 2009).

Para validar a interação *in vivo* do BPP-10c com a ASS no SNC foi avaliada a produção de NO em cérebro total de SHRs e ratos Wistar tratados com salina ou 71nmol/Kg de BPP-10c. Nesse experimento, os ratos Wistar foram utilizados como controle, visto que o BPP-10c não tem efeito anti-hipertensivo em ratos normotensos. Os parâmetros cardiovasculares dos SHRs foram monitorados por 6h e somente os animais que tiveram queda significativa na pressão arterial média (PAM) (Δ PAM > -15 mmHg) foram sacrificados para coleta dos cérebros para medida de NO.

Os cérebros de todos os animais analisados apresentaram as mesmas quantidades de NO por grama de tecido. Não se observou diferença na produção de NO entre ratos Wistar tratados com salina ou com BPP-10c, entre os SHRs tratados com salina ou com BPP-10c, nem diferença entre ratos Wistar e SHR (Figura 17). Os valores são expressos pela concentração de NO_x (nitrato mais nitrito) por grama de tecido analisado e o teste estatístico foi realizado por análise de variância (ANOVA).

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

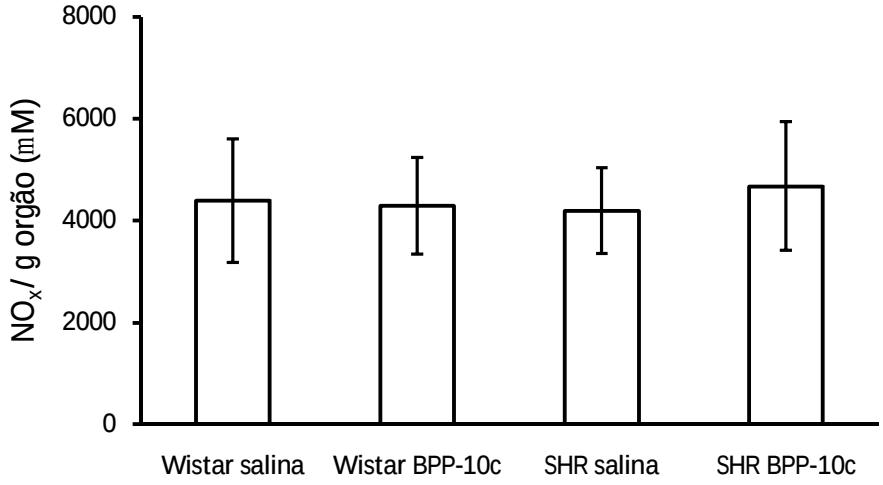

FIGURA 17. Concentração de NO em cérebro de ratos Wistar e SHRs tratados com BPP-10c. Os cérebros de ratos Wistar e SHRs foram coletados 6 h após a injeção endovenosa de 71 nmol/kg de BPP-10c. A concentração de nitrato e nitrito (NO_x) foi determinada no cérebro dos animais tratados e controle normalizada por grama de tecido (n=3).

4.6.2. Efeito do BPP-10c na produção de NO em cultura de células neuronais

Para validar a ação do BPP-10c na produção de NO em células do SNC, avaliamos a produção de NO induzida por esse peptídeo em cultura de células primárias de neurônios (Neu-W) e de células de neuroblastoma humano (SK-N-AS).

Os testes foram realizados incubando concentrações crescentes de BPP-10c na cultura de SK-N-AS (10^6células/poço) por 24 h. Estes testes demonstraram que o BPP-10c pode induzir um aumento na produção de NO, observado através das medidas de concentração de nitrito e nitrato intracelular e extracelular. Quando as células SK-N-AS foram tratadas com 0,01-100 μM de BPP-10c, a concentração de NO intracelular e extracelular mostrou um aumento dose dependente, cujo pico máximo foi entre 0,1-1 μM BPP-10c (Figura 18). O tratamento concomitante de células SK-N-AS com 1μM de BPP-10c e 1mM de N(omega)-nitro-L-arginina metil éster, (L-NAME), um inibidor da NOS (Petrović et al.,2008), ou 1mM de α-metil-DL-ácido aspártico (MDLA), um inibidor específico da ASS (Shen et al.,2005), completamente aboliu o efeito do BPP-

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

10c na produção de NO, além disso o BPP-10c-invertido, sintetizado do C- para o N-terminal não interferiu na produção de NO por essas células (Figura 19).

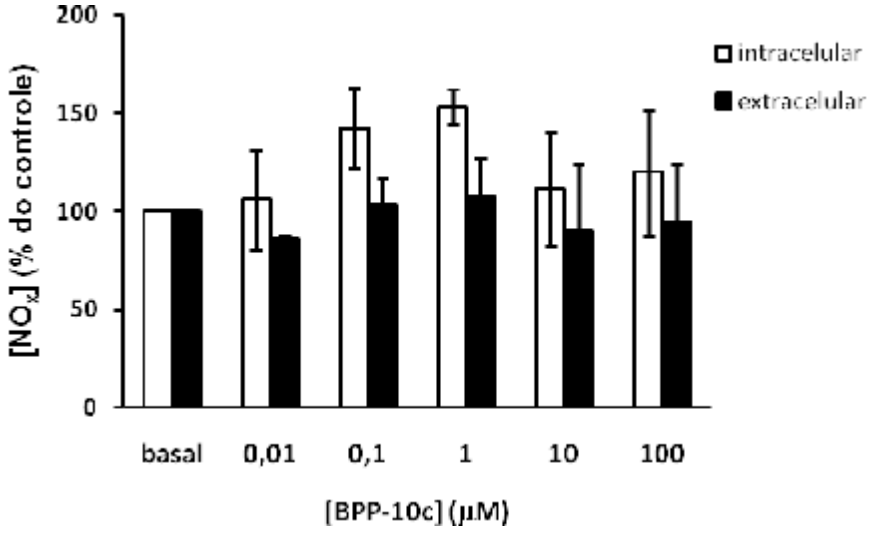

FIGURA 18. Relação dose-resposta do BPP-10c na produção de NO por células neuronais. A produção de NO em células SK-N-AS foi medida na presença de concentrações crescentes do BPP-10c incubado por 24h. Os valores obtidos foram normalizados em relação à produção de NO basal das células SK-N-AS. Os dados mostrados (média ± desvio padrão) são representativos de quatro experimentos.

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

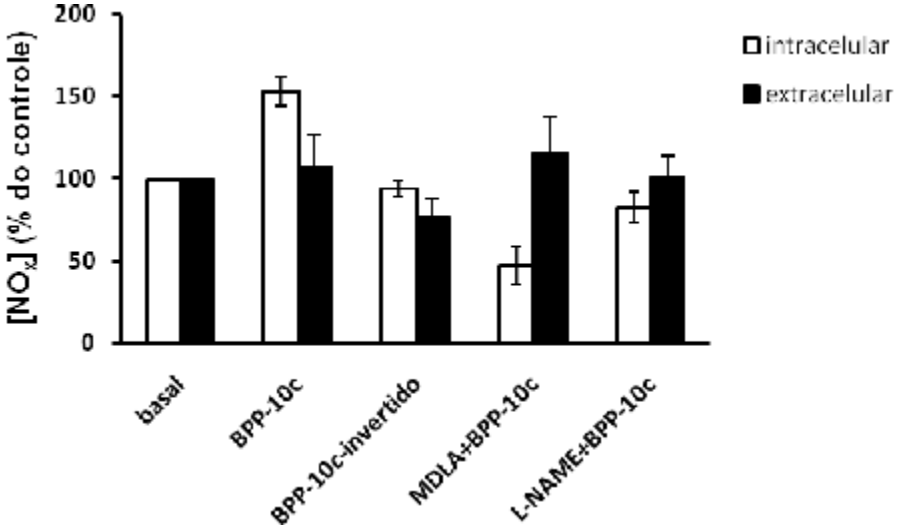

FIGURA 19. Produção de NO por células neuronais induzidas pelo BPP-10c. A produção de NO em células SK-N-AS foi medida na ausência de qualquer composto (**basal**) na presença de 1µM do BPP-10c (**BPP-10c**), 1µM do BPP-10c-invertido (**BPP-10c-invertido**), 1mM de MDLA + 1µM de BPP-10c (**MDLA+BPP-10c**) ou 1mM de L-NAME + 1 µM de BPP-10c (**L-NAME + BPP-10c**) incubado por 24h. Os valores obtidos foram normalizados em relação à produção de NO basal das células SK-N-AS. Os dados mostrados (média ± S.D) são representativos de quatro experimentos.

Foram realizados ainda experimentos com o intuito de avaliar a produção de NO induzida pelo BPP-10c em células de cultura primária de cérebro total de ratos Wistar e SHRs. Para isso, as células foram incubadas com 1µM de BPP-10c por 24 h. Os resultados mostraram que a produção de NO apresentou um aumento de aproximadamente 100% na presença do BPP-10c, tanto nas células do SNC de ratos normotensos como dos hipertensos (Figura 20).

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

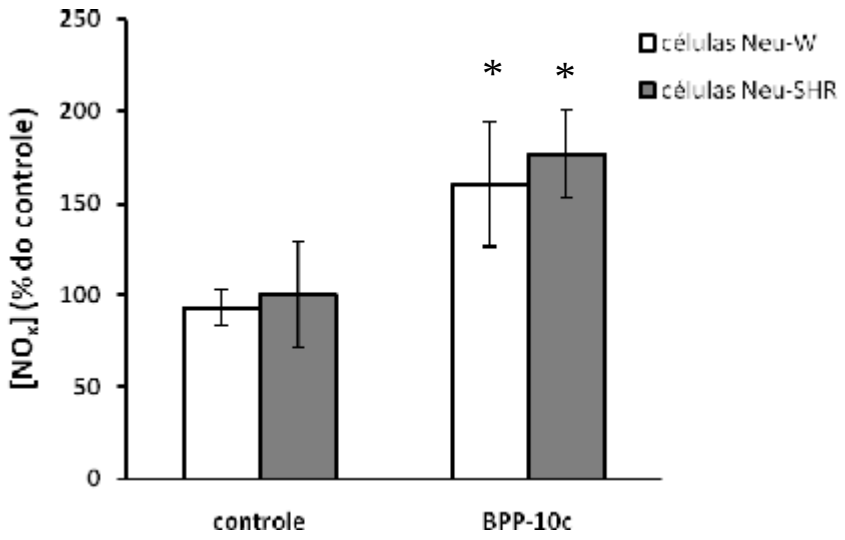

FIGURA 20. Comparação da produção de NO por células de cultura primária do SNC de ratos normotensos e hipertensos induzida pelo BPP-10c. Cerca de $1X10^6$ células de cultura primária de neurônios e glias de ratos neonatos Wistar (Neu-W) e SHRs (Neu-SHR) foram incubadas por 24h em DMEM sem soro na presença ou ausência de 1μM de BPP-10c. A concentração de NO_x foi determinada no meio intracelular e extracelular. Os valores correspondem a medidas de NO_x total de células controle (ausência de BPP-10c) normalizados para 100%. Os dados mostrados (média ± desvio padrão) são representativos de quatro experimentos. Análise de variância (ANOVA) seguido do teste Student-Newman-Keuls *=p<0,01 em relação ao controle.

Através de medidas de NO_x total produzido por células Neu-W na presença de quelante de Ca^{2+} extracelular (EGTA) ou intracelular (BAPTA) foi verificado que tanto o Ca^{2+} extracelular como o Ca^{2+} dos estoques intracelulares são importantes para a produção de NO induzida pelo BPP-10c, indicando a participação das NOS Ca^{2+}-dependente constitutivas nesse metabolismo (Figura 21). O aumento da produção de NO pelo BPP-10c, assim como as elevações nos transientes da $[Ca^{2+}]_i$ induzida por esse peptídeo, não deve envolver a ativação do receptor B2 de cininas nem receptor α-2 adrenérgico, visto que o antagonistas desses receptores HOE-140 e yohimbine, respectivamente não interferiram na produção de NO induzida pelo BPP-10c (Figura 21).

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

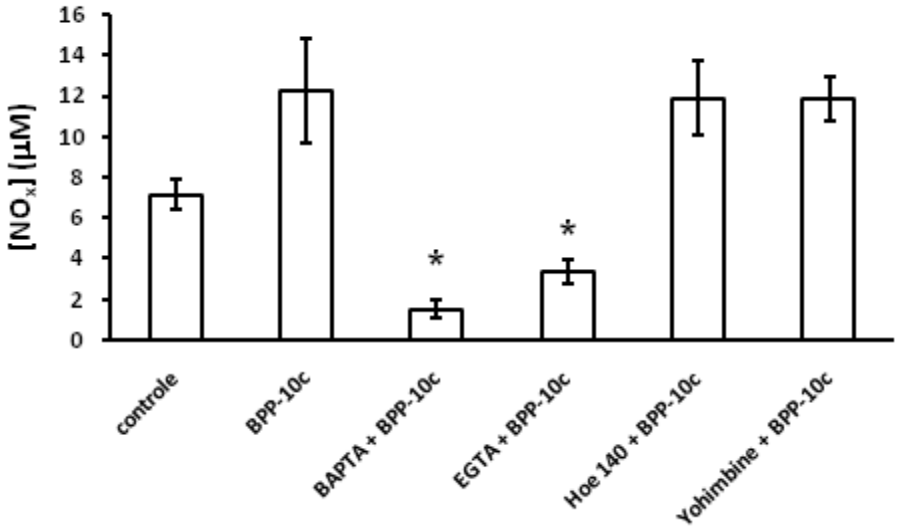

FIGURA 21. Produção de NO total induzida pelo BPP-10c em células Neu-W. A produção de NO induzida por 1 uM de BPP-10c foi inibida pela pré-incubação com 10µM de BAPTA (quelante de Ca^{2+} intracelular) ou 5mM de EGTA (quelante de Ca^{2+} extracelular) por 30 ou 5 min, respectivamente. A participação do receptor B2 de bradicinica e α-2 adrenérgico foi estudada por pré-incubação das células por 30min com 1µM Hoe-140 e 250nM yohimbine, respectivamente. Os dados mostrados (média ± desvio padrão) são representativos de cinco experimentos. Análise de variância (ANOVA) seguido do teste Student-Newman-Keuls *=p<0,01 em relação ao controle.

4.6.3. A elevação da $[Ca^{2+}]_i$ e a produção de NO induzida pelo BPP-10c não são neurotóxicos

O Ca^{2+} é um segundo mensageiro envolvido em vários processos celulares, inclusive na indução da apoptose (Kass e Orrenius, 1999). Além disso, o NO quando produzido em excesso também pode se tornar nocivo, se a célula está num estado pró-oxidante, pode sofrer reações de oxi-redução para formar compostos tóxicos (por exemplo, peroxinitrito) que causam dano celular (Calabrese et al., 2007). Como o BPP-10c é capaz de mobilizar a $[Ca^{2+}]_i$ e aumentar a produção de NO, a viabilidade das células neuronais tratadas com BPP-10c foi avaliada. Os experimentos de avaliação da viabilidade celular na presença de 1 µM de BPP-10c foram realizados por incubação das células Neu-W por 24 h em meio com ou sem soro. Em ambas condições, as células

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

Neu-W permaneceram viáveis, 87 ± 7% e 95,3 ± 4,3% comparadas com células não tratadas em meio sem soro e com soro, respectivamente (Figura 22).

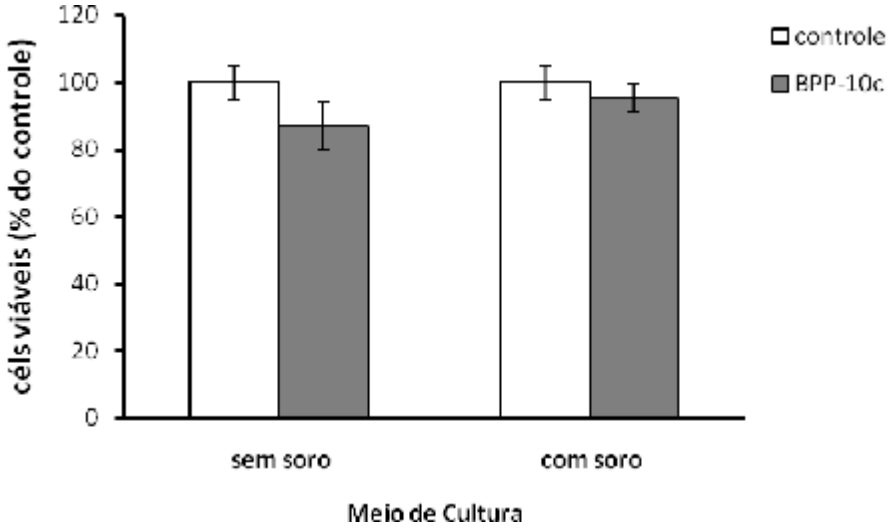

FIGURA 22. Ensaio de viabilidade de células Neu-W tratadas com BPP-10c. A determinação da percentagem de células viáveis por microfluorimetria foi realizada após a incubação das células Neu-W por 24 h na presença ou ausência de BPP-10c em meio com ou sem soro. Os dados representam a porcentagem da média em relação aos controles e os respectivos desvios padrão de oito experimentos independentes.

4.7. Internalização do BPP-10c em células neuronais

Tanto a ASS como a sinapsina, que são proteínas que apresentam afinidade pelo BPP-10c *in vitro*, são proteínas intracelulares. Para que o BPP-10c possa se ligar a essas moléculas no SNC e modular suas atividades, é necessário que esse peptídeo seja internalizado nas células neuronais. A internalização do BPP-10c conjugado com Cy3, grupamento fluorescente, foi monitorado *ex vivo* por microscopia de fluorescência para observar a localização do peptídeo no interior de células Neu-W e SK-N-AS.

A presença do BPP-10c conjugado ao Cy3 foi observado no interior das células SK-N-AS (Figura 23) e Neu-W (Figura 24), enquanto essa fluorescência citoplasmática não foi verificada nas células tratadas somente com o Cy3 livre. Após a adição do BPP-10c conjugado com Cy3 à cultura, a fluorescência pôde ser visualizada no citoplasma

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

das células das duas linhagens testadas, não apresentando qualquer localização específica em organelas. O perfil de distribuição e localização do peptídeo nas duas células foi semelhante, sendo que particularmente nas células SK-N-AS, além da internalização evidente do peptídeo marcado, parte do BPP-10c conjugado com o Cy3 se manteve ligado à membrana plasmática da célula mesmo após exaustivas trocas do meio, indicando sua a ligação com um receptor de membrana (Figura 23).

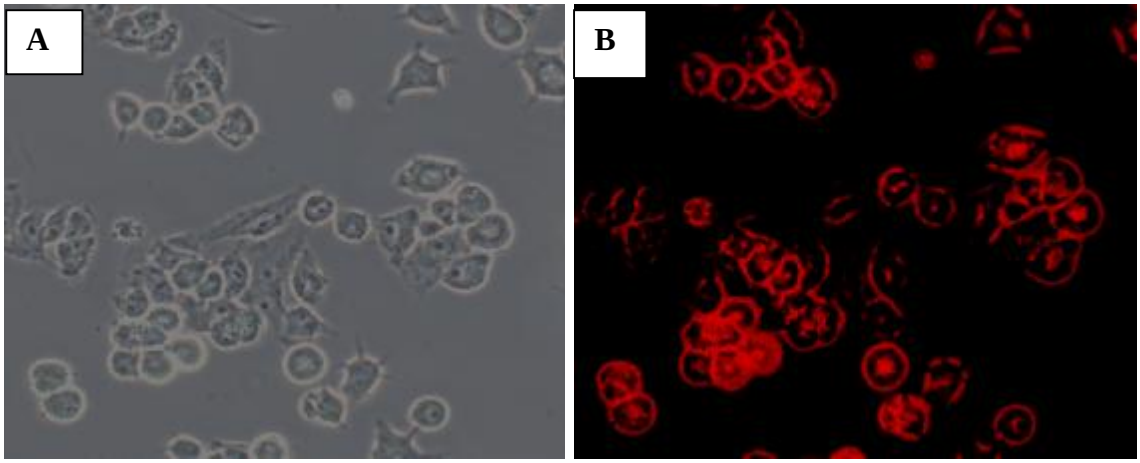

FIGURA 23. BPP-10c é internalizado por células SK-N-AS. As células foram incubadas com 1 μM de Cy3-BPP-10c por 30 min a 37ºC e analizadas por microscopia de fluorescência. As figuras são representativas de 3 experimentos independentes. **A.** Contraste de fase de células SK-N-AS tratadas com Cy3-BPP-10c. **B**. Fluorescência do Cy3-BPP-10c.

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

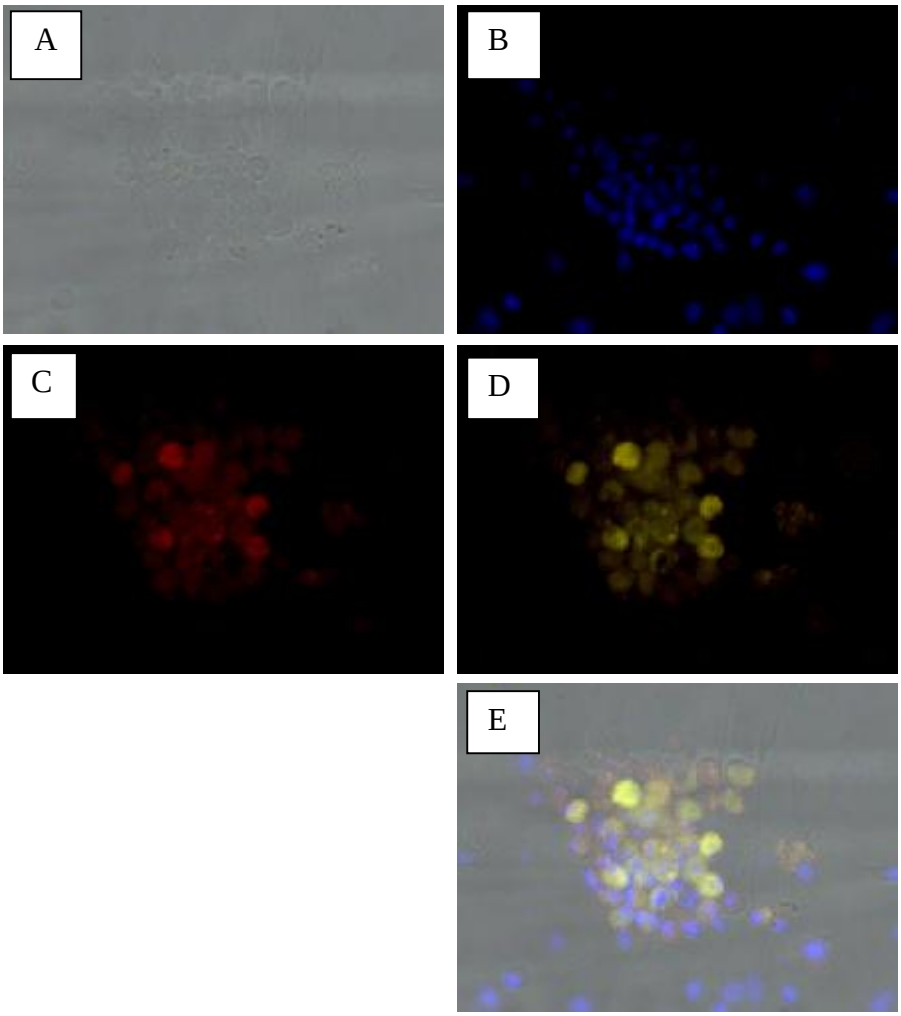

FIGURA 24. Co-localização do Cy3-BPP-10c e da ASS (FITC) em células Neu-W
A. Contraste de fase de células Neu-W tratadas com Cy3-BPP-10c. **B**. Fluorescência do DAPI - marcação nuclear. **C**. Fluorescência do Cy3-BPP-10c. **D**. Fluorescência do FITC (anti-ASS). **E**. Sobreposição das imagens dos quadros A, B, C e D.

4.8. BPP-10c regula a expressão da ASS e eNOS no SNC de SHRs

Os BPPs produzem uma queda na PAM somente em SHR adultos, com característica bifásica, isto é, na primeira hora após a injeção há uma redução moderada (efeito agudo), e após duas a três uma maior e prolongada queda na pressão arterial média (efeito tardio) (Ianzer et al., 2007) indicando o envolvimento da regulação gênica na resposta tardia.

Por isso, foram analisados os níveis de expressão da ASS, eNOS e nNOS de cérebros de SHRs tratados endovenosamente, com salina (controle) ou BPP-10c. A

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

quantificação dos transcritos por PCR em tempo real utilizando oligonucleotídeos específicos para cada gene revelou que o BPP-10c influencia na expressão gênica de proteínas que estão envolvidas na produção de NO. O BPP-10c induziu o aumento da expressão de ASS e eNOS nos cérebros de SHRs de 2,23±0,78 e 1,89±0,34 vezes, respectivamente, em relação aos cérebros dos animais controle, enquanto que os níveis da expressão gênica de nNOS no cérebro de SHRs tratados não foram significativamente diferentes comparado com o grupo controle (Figura 25).

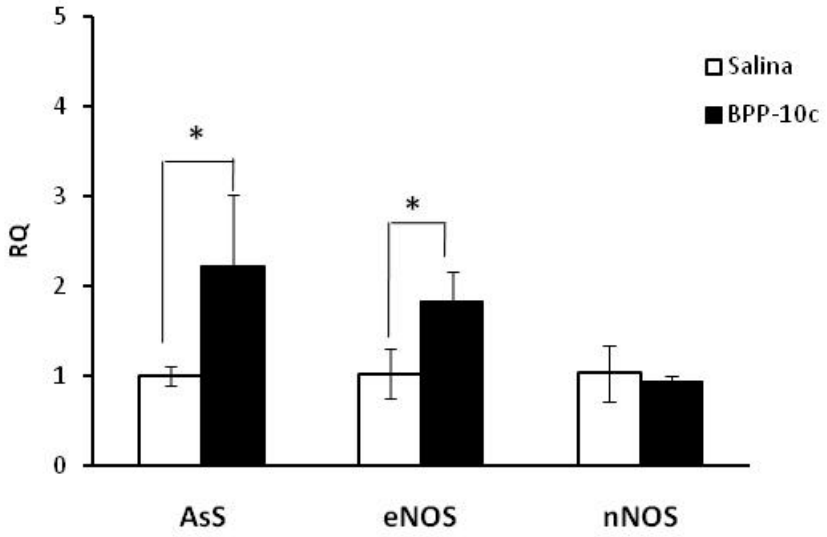

FIGURA 25. Regulação da expressão da ASS, eNOS e nNOS em cérebros de SHRs tratados com BPP-10c. Os cérebros de SHRs foram coletados 6 h após a injeção endovenosa de 71 nmol/kg de BPP-10c. O nível de expressão da ASS, eNOS e nNOS nos cérebros de SHRs tratados com BPP-10c foi determinado por qunatificação dos transcristos por PCR em tempo real utilizando o método de quantificação relativa (RQ) ao nível de expressão nos cérebros de SHRs controle (tratados com salina). Os dados representam a média ± desvio padrão (n=4). Análise de variância (ANOVA) seguido do teste Student-Newman-Keuls *=p<0,01.

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

4.9. BPP-10c induz liberação de transmissores em células neuronais

O Ca^{2+}, como segundo mensageiro universal, além de participar da ativação de enzimas, controle da expressão gênica, também está envolvido no processo de exocitose para a liberação de neurotransmissores. A identificação da sinapsina (fosfoproteína associada a vesículas pré-sinápticas, envolvida na formação das sinapses e regulação da liberação de neurotransmissores) (Greengard et al., 1993; Jovanovic et al., 1996) como proteína ligante do BPP-10c, sugere que esse peptídeo possa estar envolvido na liberação de neurotransmissores. Por isso, a liberação de neurotransmissores aminoácidos excitatórios, aspartato e glutamato; e inibitórios, glicina e GABA foi avaliada em células Neu-W. Cerca de $3X10^6$ células foram cultivadas em placas de 60 mm de diâmetro e incubadas por 3 min a 37ºC na ausência (basal) ou presença de 1µM BPP-10c. Conforme mostrado na figura 26, a presença de BPP-10c não aumentou a liberação de glicina pelas células Neu-W (122,26 ± 6,11 nmol/placa) comparado com a liberação basal (117,70 ± 5,85 nmol/placa). Entretanto, aumentou significativamente a liberação de GABA, de 24,52 ± 1,23 nmol/placa para 65,00 ± 3,25 nmol/placa. Além disso, observamos que o BPP-10c induziu a liberação de glutamato de 1,84 ± 0,09 nmol/placa para 2,67 ± 0,65 nmol/placa. Nesse experimento não foi possível detectatar a liberação de aspartato, nem por estimulação com BPP-10c (Figura 27) nem por despolarização das células com altas concentrações (50mM) de K^+ (dados não apresentados).

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

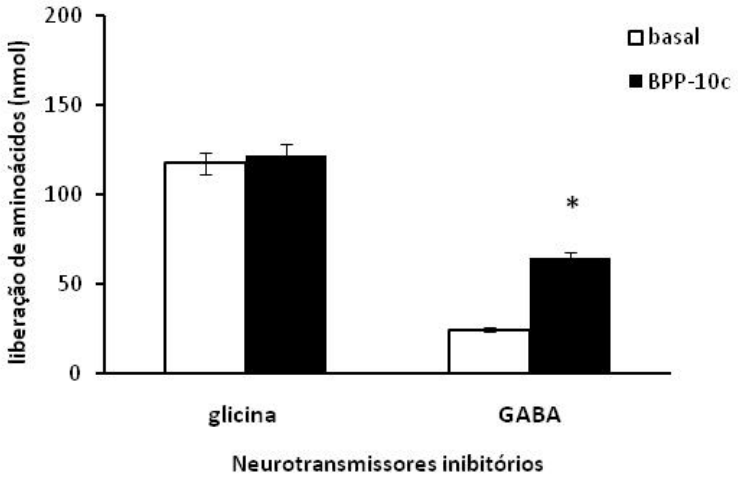

FIGURA 26. Efeito do BPP-10c sobre a liberação de neurotransmissores inibitórios por células neuronais. O ensaio de liberação de neurotransmissores aminoácidos (glicina e GABA) foram realizados usando $3X10^6$ células de cérebro de ratos Wistar neonatos (Neu-W) depois de 10-15 dias em cultura. A quantidade basal de glicina e GABA liberadas pelas células Neu-W e após adição de 1µM de BPP-10c por 3min foram determinadas por HPLC conforme descrito na seção de Materiais e Métodos. Os dados representam a média ± desvio padrão (n=2). Análise estatística foi realizada pelo teste *t* de Student. p<0,01* em relação ao basal.

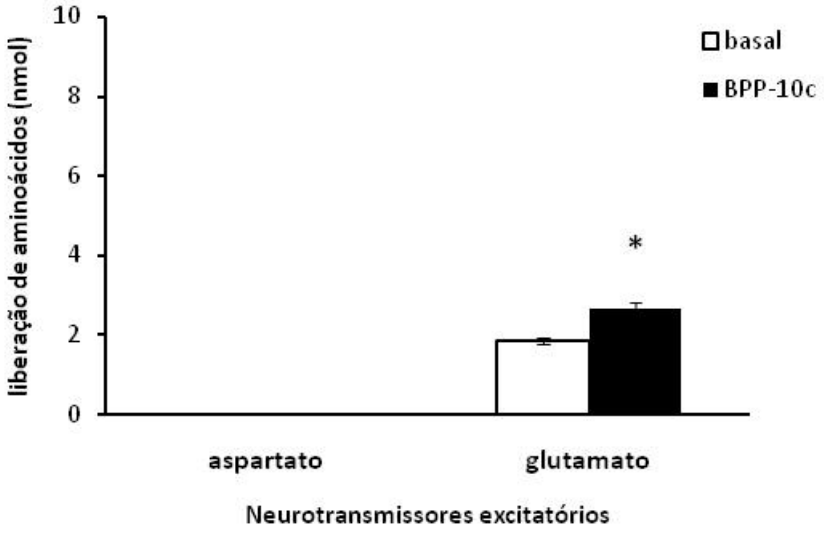

FIGURA 27. Efeito do BPP-10c sobre a liberação de neurotransmissores excitatórios por células neuronais. O ensaio de liberação de neurotransmissores aminoácidos (aspartato e glutamato) foram realizados usando $3X10^6$ células de cérebro de ratos Wistar neonatos (Neu-W) depois de 10-15 dias em cultura. A quantidade basal de aspartato e glutamato liberadas pelas células Neu-W e após adição de 1µM de BPP-10c por 3min foram determinadas por HPLC conforme descrito na seção de Materiais e Métodos. Os dados representam a média ± desvio padrão (n=4). Análise estatística foi realizada pelo teste *t* de Student. p<0,05* em relação ao basal.

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

4.10. Aumento da sensibilidade do barorreflexo induzido pelo BPP-10c

A super-expressão de eNOS, em cérebros de ratos hipertensos leva a um aumento da sensibilidade do barorreflexo, seguido de redução da pressão arterial média e diminuição da freqüência cardíaca que deve ser devido a participação da liberação de GABA induzida pelo NO (Kishi et al., 2001; Kishi et al., 2003). Considerando que as mudanças na pressão arterial média promovida pelo BPP-10c em SHRs são seguidas de uma significativa redução na freqüência cardíaca (Ianzer et al.,2007) e que, além disso, há um aumento significativo da expressão da eNOS em cérebros de SHRs tratados com BPP-10c e aumento da liberação de GABA por células neuronais tratadas com esse peptídeo, a sensibilidade barorreflexa desses animais foi avaliada.

A sensibilidade do barorreflexo de SHRs foi avaliada em três momentos, tempo:0, 1 e 4h após da administração endovenosa do BPP-10c. Em acordo com a literatura a sensibilidade barorreflexa do SHR sem tratamento (tempo = 0) foi de -0,54±0,01 bpm/mmHg (Krieger et al., 2001). Após 1 e 4h do tratamento do BPP-10c, a sensibilidade barorreflexa dos SHRs aumentou significativamente para -0,73±0,03 e -0,90±0,03 bpm/mmHg, respectivamente (Figura 28).

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

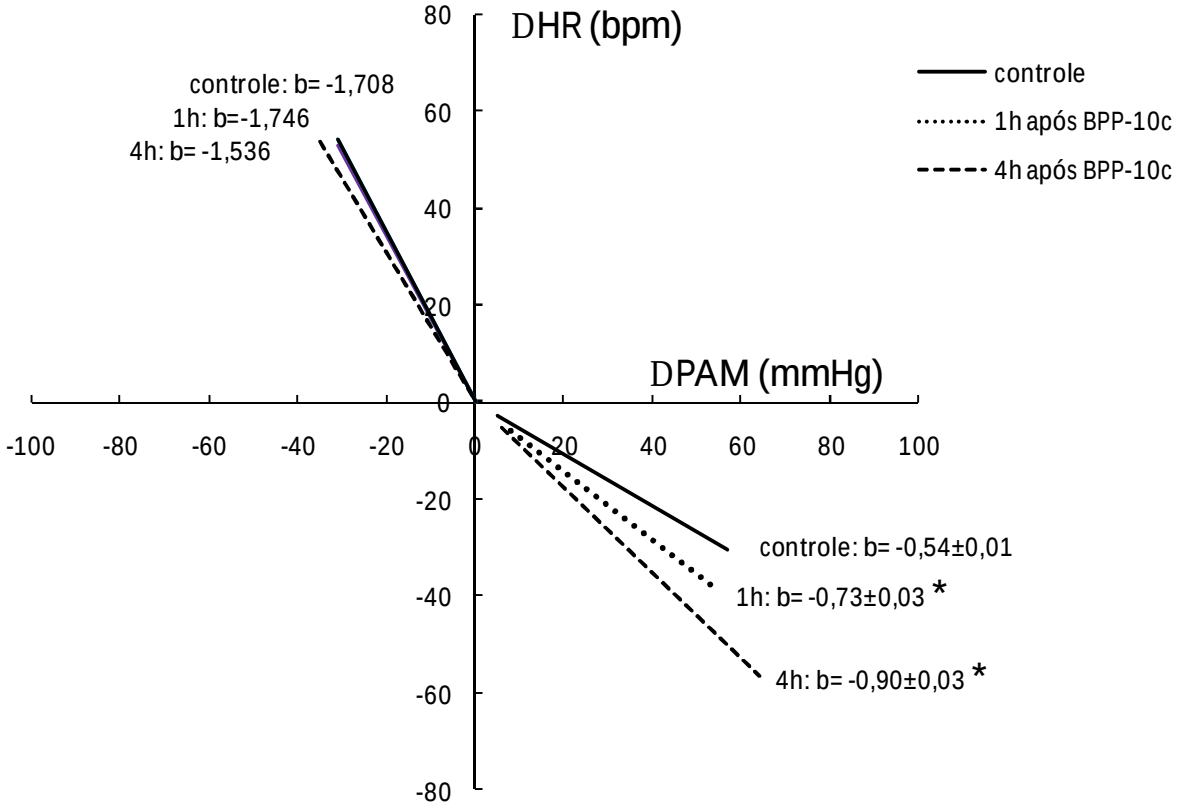

FIGURA 28. Sensibilidade do barorreflexo de SHRs tratados com BPP-10c. A curva controle representa a sensibilidade barorreflexa basal de SHRs, a curva 1h e 4h após BPP-10c representa a sensibilidade barorreflexa de SHRs após 1h e 4h da administração endovenosa de 71nmol/kg de BPP-10c. Os coeficientes angulares para a freqüência cardíaca durante a diminuição da pressão arterial média (PAM) induzida por diferentes doses de nitroprussiato de sódio permaneceram inalterados mesmo após o tratamento com BPP-10c e foram significativamente reduzidos comparados com a sensibilidade basal durante o aumento da PAM induzido por diferentes doses de fenilefrina (n=5). Análise de variância (ANOVA) seguido do teste Student-Newman-Keuls *=p<0,01.

4.11. Medida direta da atividade do nervo simpático renal

Sabemos que o BPP-10c, além de inibir eficientemente a atividade enzimática da ECA, é capaz ainda de mobilizar o Ca^{2+} intracelular e de aumentar a produção de NO em células Neu-W. O NO no SNC está envolvido com a regulação vascular que tem sido atribuída a sua capacidade de inibir a atividade do sistema nervoso autônomo

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

simpático (Patel et al., 2001). Dessa maneira, realizamos medidas diretas de descarga do nervo simpático renal de SHRs anestesiados, para avaliação da atividade autônoma simpática desses animais tratados com BPP-10c. Os resultados mostraram que o BPP-10c não produziu efeito nem na pressão arterial nem na atividade do nervo simpático renal em SHRs anestesiados (Figura 29), indicando uma possível interferência da anestesia na atividade do BPP-10c.

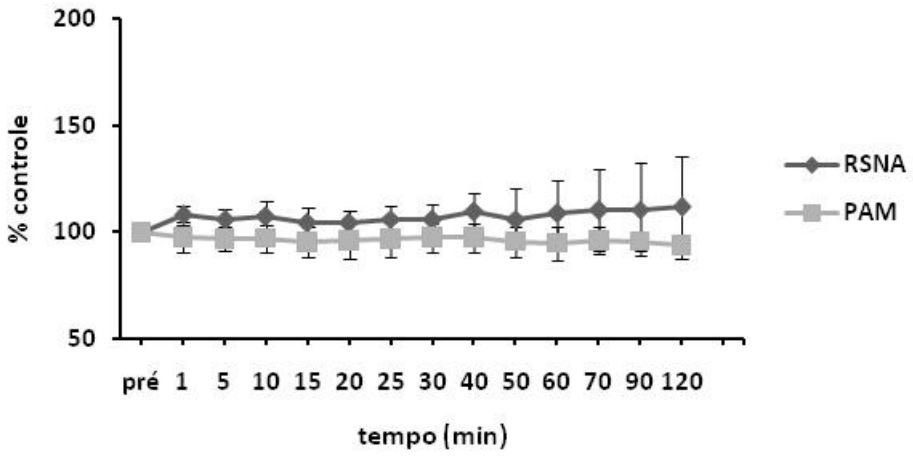

FIGURA 29. Atividade do nervo simpático renal e da pressão arterial média de SHRs anestesiados tratados BPP-10c. Atividade do nervo simpático renal (RSNA) e a pressão arterial média (PAM) foram avaliadas em SHRs anestesiados com uretana, antes (basal) e após a administração endovenosa de 71nmol/kg de BPP-10c. Os dados foram comparados com RSNA e PAM basal de cada animal em cinco experimentos independentes. Os dados representam a média ± desvio padrão.

4.12. Efeito da injeção central do BPP-10c

Seguindo a sugestão que o BPP-10c pode ter um efeito central, os parâmetros cardiovasculares (PAM e FC) foram registrados após injeções do BPP-10c no ventrículo lateral direito ou esquerdo de ratos Wistar e SHR. Nesses ensaios, as doses de 140, 1,4, 0,7 nmol/Kg de BPP-10c em SHRs, e a dose de 140nmol/kg em ratos Wistar foram utilizadas. A injeção do mesmo volume de salina foi utilizada nos animais controle (Wistar e SHR).

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

Os resultados mostraram que a administração intracerebroventricular do BPP-10c produziu efeito na pressão arterial somente de SHRs, similarmente ao efeito observado para a administração endovenosa, no entanto a queda da freqüência cardíaca ocorreu em todos os grupos: ratos Wistar e SHRs, controles ou tratados com BPP-10c. Além disso, em SHRs foi observada uma resposta tardia que se iniciou aproximadamente 3 h após a administração *icv* do BPP-10c. A dose de 0,7 nmol/kg produziu o melhor efeito na PAM e FC (Figura 30).

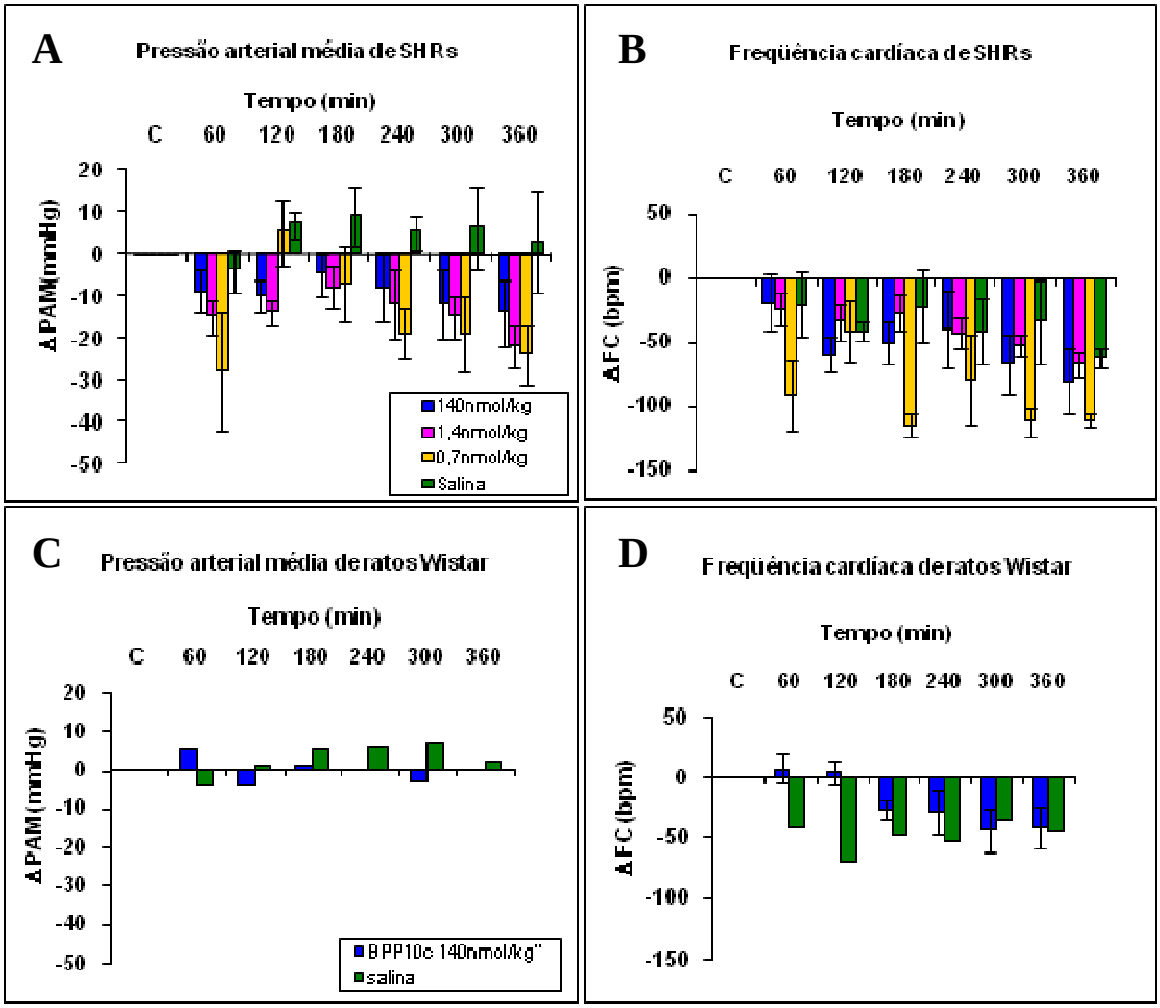

FIGURA 30. Parâmetros cardiovasculares de ratos Wistar e SHRs acordados após a injeção central do BPP-10c. A e B. Pressão arterial média (PAM) e freqüência cardíaca (FC) de SHRs, respectivamente, após injeção central de 140, 1,4 e 0,7 nmol/kg ou salina. **C e D.** Pressão arterial média (PAM) e freqüência cardíaca (FC) de ratos Wistar, respectivamente, após injeção central de 140 nmol/kg de BPP-10c ou salina (n=5).

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

5.DISCUSSÃO

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

5.1. Mecanismo de indução da sinalização de Ca^{2+} pelo BPP-10c

O trabalho de Ianzer et al., 2007 tornou evidente que a ação anti-hipertensiva do BPP-10c exercida em SHR não poderia ser explicada pela inibição da ECA, conforme sugerido e amplamente aceito a partir da descoberta dos peptídeos ricos em resíduos de prolina da *Bothrops jararaca* (Ferreira et al;. 1970a). Recentemente demonstramos que a ASS, enzima passo limitante na biossíntese de L-arginina, participa ativamente das ações cardiovasculares do BPP-10c, fornecendo o substrato para a liberação de NO pelo endotélio vascular (Guerreiro et al., 2009). Entretanto, a ação anti-hipertensiva desse peptídeo parecia também envolver um controle por mecanismos centrais e o trabalho aqui apresentado confirma essa sugestão.

Baseado nessa hipótese, células de cultura primária de cérebros de ratos (células Neu-W) foram utilizadas como modelo *in vitro* para avaliar os efeitos do BPP-10c sobre a $[Ca^{2+}]_{i.}$ O Ca^{2+} é um importante segundo mensageiro no SNC, controlando quase todos os processos celulares, incluindo regulação da expressão gênica, transmissão de sinal e liberação de neurotransmissores. Os dados apresentados nesse trabalho indicam que o BPP-10c é capaz de induzir elevações transientes na $[Ca^{2+}]_i$ em células neuronais, mas não em células gliais. A análise dos picos de resposta de $[Ca^{2+}]_i$ induzida por várias concentrações de BPP-10c revelou uma curva dose-resposta em forma de sino, possivelmente causada por uma imediata dessensitivação de seu receptor a altas concentrações do agonista (Bernadini et al., 1989; Tateyama e Kubo, 2006), há ainda a possibilidade de outros mecanismos de regulação intrínseca estarem envolvidos na resposta do BPP-10c, como por exemplo, a regulação dos canais de Ca^{2+} dos estoques intracelulares (canais ativados por IP_3 e sensíveis a rianodina) pelo o influxo primário de Ca^{2+} promovido pelo BPP-10c, que envolve também canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem presentes na membrana plasmática (Bootman e Lipp, 1999).

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

Os BPPs de serpentes são caracterizados pelo alto conteúdo de resíduos de prolina e um resíduo piroglutâmico na porção N-terminal do peptídeo. Além disso, o motivo Pro-X-Ile-Pro-Pro está sempre presente na porção C-terminal dos BPPs compostos por mais de oito resíduos de aminoácidos (Ianzer et al., 2004; Gomes et al. , 2007; Menin et al., 2008). No entanto, recentes evidências indicaram que não há uma clara relação seqüência X atividade definindo a atividade biológica dos BPPs, já que um resíduo piroglutâmico na porção N-terminal e o alto conteúdo de resíduos de Pro na seqüência dos BPPs não foram suficientes para correlacionar a atividade de potenciação do efeito da BK com suas seqüências de aminoácidos. Alguns peptídeos com características estruturais de BPPs não foram capazes de potenciar o efeito contrátil da BK em músculo liso de íleo isolado de cobaia, nem potenciar o efeito hipotensivo da BK em ratos anestesiados (Gomes et al., 2007). Mostramos que todos os resíduos de aminoácidos que formam esse motivo são relevantes para eficiência do BPP-10c na indução de transientes de $[Ca^{2+}]_i$, visto que foi observada uma perda significativa (cerca de 50%) da sua atividade biológica na indução de fluxos de Ca^{2+} quando os resíduos Ile ou Pro do peptídeo foram substituídos por alanina. Além disso, a atividade do BPP-10c depende da seqüência de seus aminoácidos, e não somente da sua composição, pois o peptídeo invertido com a mesma composição de aminoácidos, sintetizados em ordem invertida, não apresentou nenhum efeito da mobilização da $[Ca^{2+}]_i$ em células Neu-W. No entanto, o peptídeo truncado faltando os três primeiros aminoácidos na porção N-terminal, bem como o peptídeo embaralhado com os cinco resíduos amino-terminal fora de ordem, não revelou nenhuma redução da atividade biológica quando comparados ao BPP-10c, sugerindo que a capacidade do BPP-10c [<ENWPHPQIPP] em induzir respostas de $[Ca^{2+}]_i$ não deve depender da seqüência N-terminal do peptídeo.

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

Ficou evidente, portanto, que a seqüência [P-X-P-X-I-P-P] é fundamental para o efeito de mobilização de Ca^{2+} intracelular. Curiosamente, há na literatura numerosos trabalhos relacionando a seqüência [I-P-P] ao efeito anti-hipertensivo, que tem sido relacionado à atividade inibitória da ECA. Muitos desses trabalhos foram derivados de estudos da hidrólise da caseína ou fermentação do leite e deram origem a numerosas publicações (Hirota et al.,2007; Engberink et al., 2008), cujas informações foram protegidas por patentes (WO2000/42066; WO2004/098309; WO2006/084573). No entanto, nosso grupo demonstrou que o efeito anti-hipertensivo dos BPPs é independente da ação inibitória sobre e ECA (Ianzer et al., 2007) e sugere um novo mecanismo de ação para esses peptídeos ainda não explorado pela indústria farmacêutica. A descrição do(s) novo(s) alvo(s) e das possíveis aplicações terapêuticas está protegida na patente WO2007/079558. Apesar disso, esse trabalho teve como objetivo detalhar algumas das informações contidas nessa patente para o melhor entendimento do mecanismo de ação central do BPP-10c.

Sabendo que o BPP-10c induz a mobilização de Ca^{2+} intracelular, verificamos que o aumento da $[Ca^{2+}]_i$ induzido por esse peptídeo foi mediado pelo influxo de Ca^{2+} extracelular, seguido pela liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares sensíveis a rianodina, mecanismo conhecido como CICR, no qual o Ca^{2+} citoplasmático ativa a liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares através da abertura de canais presentes na membrana de organelas de reserva de Ca^{2+}. O mecanismo de CICR pode ser proposto para o BPP-10c, visto que, a inibição da PLC-β não interferiu no aumento da $[Ca^{2+}]_i$ induzido por esse peptídeo, indicando que a formação de IP_3 não deve participar da via de sinalização do BPP-10c, similarmente ao mecanismo observado para elevações transientes de $[Ca^{2+}]_i$ mediadas por receptor nicotínico de acetilcolina em células P19 diferenciadas a neurônios (Resende et al., 2008). Apesar disso, o BPP-10c parece ainda

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

depender de um receptor acoplado a proteína $G_{i/o}$ para promover o influxo de Ca^{2+} primário, pois sua atividade é significativamente reduzida na presença de toxina pertussis.

Vários mecanismos envolvendo proteínas G heterodiméricas na modulação de fluxo de Ca^{2+} em células de origem neuronal e neuroendócrina têm sido descritos. Em muitos casos, a ativação da proteína $G_{i/o}$ foi associada à inibição da atividade de canais de Ca^{2+} (Hescheler e Schultz, 1994). No entanto, nossos resultados indicam que a transdução de sinal induzida pelo BPP-10c em células neuronais levou a uma ativação de canais de Ca^{2+} mediada por proteínas $G_{i/o}$ que promoveu influxo de Ca^{2+} primário ativando canais das reservas intracelulares, caracterizando o CICR para elevação na $[Ca^{2+}]_i$. Embora a atividade da proteína $G_{i/o}$ seja geralmente conhecida diminuir a atividade de canais de Ca^{2+} (Strock e Diversé-Pierluissi, 2004), a regulação positiva da atividade de canais de Ca^{2+} também tem sido sugerida por outros receptores metabotrópicos, assim como o receptor do fator de crescimento encefálico "*head-activator*" em células duplo híbrido de neuroblastoma e glioma, o receptor órfão recombinante GPR 37 em células COS-7 e o receptor do hormônio liberador de tirotropina (TRH) em células pituitárias (Gollasch et al., 1993; Ulrich et al., 1996; Rezgaoui et al., 2006).

Como conseqüência, a ativação da proteína $G_{i/o}$ resulta em inibição da atividade da adenilato ciclase e redução da concentração de AMP_c intracelular. A transdução de sinal induzida pelo BPP-10c, que é possivelmente mediada por um receptor com sete porções transmembrana acoplado a proteína G sensível a toxina pertussis envolveu além de um aumento da $[Ca^{2+}]_i$, a inibição da produção de AMP_c. Essa atividade inibitória do BPP-10c sobre o acúmulo de AMP_c promovido pela forskolina corrobora com a hipótese do receptor para o BPP-10c ser acoplado a uma proteína $G_{i/o}$ (Simonds et al.,

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

1989). Dessa maneira, os dados obtidos das medidas de mudanças na $[Ca^{2+}]_i$ e produção de AMP_c na presença de BPP-10c sugere como mecanismo de transdução de sinal, a estimulação de um receptor metabotrópico acoplado a proteína $G_{i/0}$ que ativa um canal de Ca^{2+} na membrana plasmática seguido por uma CICR (Figura 31).

Nossos resultados mostraram que o BPP-10c deve agir seletivamente em células neuronais. As elevações da $[Ca^{2+}]_i$ após a estimulação com BPP-10c observadas em cultura de células Neu-W, composta majoritariamente de neurônios, mas ainda com presença de glia, também foram observadas em células de neuroblastoma (SK-N-AS), no entanto, não foram observadas em células de origem glial (C6). Resultados similares foram obtidos em ensaios de ELISA por determinação da concentração de AMP_c intracelular, no qual uma significativa inibição pelo BPP-10c na produção de AMP_c induzida pela forskolina ocorreu somente em células Neu-W, indicando a que a sinalização intracelular induzida pelo BPP-10c deve ocorrer preferencialmente em neurônios.

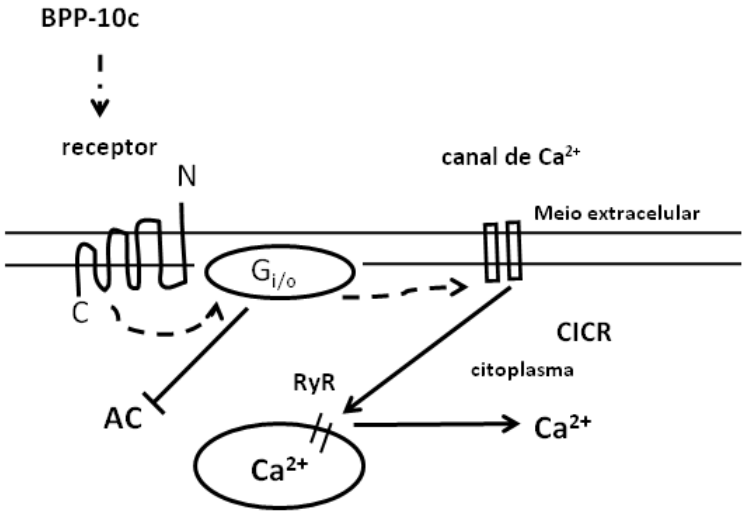

FIGURA 31. Sugestão da via de transdução de sinal induzida pelo BPP-10c. O BPP-10c ativa um receptor transmembrânico acoplado a proteína $G_{i/o}$, resultando na inibição da adenilato ciclase (AC) e na ativação de um canal de Ca^{2+} presente na membrana plasmática. O influxo de Ca^{2+} promove a liberação de Ca^{2+} induzido por Ca^{2+} (CICR) por ativação de estoques de Ca^{2+} sensíveis a rianodina.

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

Apesar do BPP-10c ser um excelente inibidor da ECA, sabe-se que a atividade de potenciação do efeito hipotensivo da BK pelos BPPs não pode ser inteiramente explicada pela inibição dessa enzima (Ianzer et al.,2007). Mueller e colaboradores sugeriram que a potenciação das ações da BK poderia ser devido a um efeito direto nos receptores de cininas (Mueller et al., 2006). Nossos resultados indicam que a sinalização de Ca^{2+} induzida pelo BPP-10c é independente tanto do receptor B2 como do receptor B1 de cininas. Os agonistas desses receptores, assim como a BK e des-Arg^9-BK, mobilizam Ca^{2+} dos estoques intracelulares por ativação da PLC-β, resultando na produção de IP_3 e liberação de Ca^{2+} das reservas intracelulares (Tiwari et al., 2005). No entanto, o BPP-10c induz fluxos de Ca^{2+} por um mecanismo diferente dos transientes de $[Ca^{2+}]_i$ induzidos pela BK, já que não envolve a ativação de PLC-β, mas a participação do influxo de Ca^{2+}. Embora o BPP-10c seja um peptídeo potenciador de algumas ações farmacológicas da BK, como conseqüência da inibição da ECA, nossos resultados mostraram claramente que esse peptídeo tem uma ação farmacológica intrínseca através do influxo e mobilização intracelular de Ca^{2+} não induzida pela BK em células neuronais, indicando que a indução da via de sinalização do BPP-10c também é independente da inibição da ECA. Corrobora essa afirmação o fato do captopril não afetar os níveis de $[Ca^{2+}]_i$ dessas células.

Com o objetivo de identificar um receptor putativo que o BPP-10c interage, resolvemos avaliar a capacidade desse peptídeo em aumentar $[Ca^{2+}]_i$ na presença de antagonistas de receptores metabotrópicos, na tentativa de relacionar os resultados *in vitro* com o efeito anti-hipertensivo observado *in vivo*. Nestes testes, utilizamos antagonistas dos receptores B1 e B2 de cininas, α2-adrenérgico e de glutamato, pois são receptores sabidamente envolvidos no controle da pressão arterial, vasodilatação e produção de NO (Mathis et al., 1996; Gordon e Sved, 2002; Kanagy, 2005). Foi

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

observado que mesmo na presença desses inibidores o BPP-10c continuou promovendo elevações da $[Ca^{2+}]_i$ sem alteração significativa quando comparada com o controle (Figura 13). Além disso, foram testados muitos outros GPCRs com possibilidades de ser o receptor do BPP-10c, por estarem envolvidos no controle da hipertensão, produção de NO e vasodilatação. No entanto, o BPP-10c não foi capaz de se ligar especificamente no sítio de ligação de agonistas de nenhum dos receptores testados.

Com esses resultados, podemos pensar em duas hipóteses para explicar a capacidade do BPP-10c promover o aumento da $[Ca^{2+}]_i$ através da ativação de um GPCR. A primeira delas seria que o BPP-10c interage em um sítio alostérico de um receptor putativo, ou seja, esse peptídeo interage com uma região distinta do sítio de interação do agonista endógeno, podendo explicar sua atividade de mobilização de $[Ca^{2+}]_i$, apesar do teste com radioligantes serem negativos para todos os receptores testados. E a segunda hipótese seria que o BPP-10c teria como alvo um receptor desconhecido, simplesmente porque entre os conhecidos ainda não foi testado ou por se tratar de um receptor órfão. É descrito na literatura que uma grande quantidade GPCRs identificados por técnicas de Biologia Molecular baseado nas seqüências gênicas, que não possuem um ligante funcional conhecido, por isso são chamados de receptores órfãos (Pierce et al., 2002; Minami e Uezono, 2006). Os receptores órfãos têm se tornado um importante alvo de estudo devido ao grande potencial terapêutico.

5.2. Argininosuccinato sintase e sinapsina como alvos putativos do BPP-10c no SNC

A argininosuccinato sintase (ASS) é uma enzima passo limitante de reações acopladas para o fornecimento de L-arginina para a NO sintase (NOS) e subseqüente produção de NO, e foi caracterizada como alvo renal do BPP-10c (Guerreiro et al., 2009). Essa enzima foi também identificada nos homogenatos protéicos de encéfalo

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

após cromatografia de afinidade para o BPP-10c imobilizado. Nossos experimentos mostraram que a ASS não foi identificada como uma proteína majoritária com afinidade pelo BPP-10c, assim como ocorreu para os extratos renais (Guerreiro et al, 2009). Essa identificação somente foi possível através do uso de anticorpos específicos anti-ASS por técnicas de *Western blot*. Possivelmente, a ASS não foi identificada como a proteína majoritária do encéfalo com afinidade pelo BPP-10c, assim como ocorreu para os extratos renais (Guerreiro et al., 2009), devido a diferença nos níveis de expressão dessa enzima nos diferentes tecidos, já que no cérebro de ratos adultos a expressão da ASS é significativamente menor que a expressão nos rins (Husson et al., 2003), o que não diminui a importância da interação do BPP-10c com essa enzima no SNC.

A ASS é amplamente distribuída por todo o cérebro e aparenta estar presente em interneurônios indicando sua participação no sistema neuromodulatório (Nakamura et al., 1991). Além disso, a ASS participa de processos inflamatórios e da resposta a estresse oxidativo, essa enzima é super expressa, por exemplo, em células gliais ativadas por citocinas ou agentes oxidantes (Röhl et al., 2008). Na doença de Alzheimer, as placas amilóides dentro do cérebro são rodeadas por células gliais ativadas, algumas evidências sugerem que a placa amilóide está criticamente envolvida na indução da resposta inflamatória, envolvendo a super expressão da ASS e da NOS em neurônios e glias, como é observado em pacientes portadores da doença de Alzheimer comparado a indivíduos normais (Haas et al., 2002), para a remoção dessas placas, caracterizando a participação da ASS também na neuroproteção (Chaudhuri et al., 1994).

Por outro lado, a análise por espectrometria de massas das proteínas do SNC com afinidade pelo BPP-10c revelou a sinapsina como potencial proteína ligante do BPP-10c no SNC (Figura 15 e Tabela 5). As sinapsinas são fosfoproteínas associadas a

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

vesículas pré-sinápticas, envolvida na formação das sinapses e regulação da liberação de neurotransmissores. Constituem uma família de pelo menos cinco proteínas homólogas (sinapsinas Ia, Ib, IIa, IIb, e IIIa). Todas as isoformas das sinapsinas exibem um alto grau de homologia de seqüência nas regiões amino-terminal (Figura 32).

Visto que, tanto isoforma I como a isoforma II da sinapsina tiveram afinidade pelo BPP-10c, pode-se sugerir que a interação do BPP-10c com a sinapsina ocorra em domínios conservados do N-terminal dessa proteína. O fato da isoforma III não ter sido identificada entre as proteínas com afinidade pelo BPP-10c não contraria essa hipótese já que isoformas I e II representam 98% de todas as sinapsinas (Fernandez-Chacon e Sudhof, 1999).

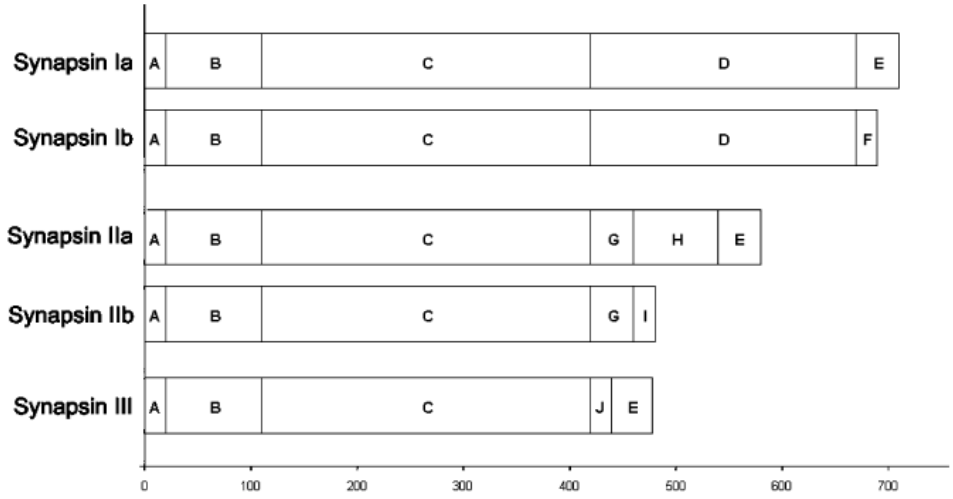

FIGURA 32. Estrutura das sinapsinas. Os domínios conservados das cinco isoformas da sinapsina são compostos pelos domínios A-C. Na região C-terminal variável, domínio D rico em prolinas e glicinas é conservado para sinapsina Ia e Ib, o domínio G rico em prolinas é conservado para as sinapsinas IIa e IIb, e o domínio E C-terminal está presente na sinapsina Ia, IIa, e III. (John et al., 2007).

As sinapsinas são capazes de interagir com as vesículas pré-sinápticas e o citoesqueleto, através da actina (Greengard et al., 1987; Benfenati et al., 1992). Tanto a actina como proteínas associadas às vesículas pré-sinápticas ligadas a actina,

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

principalmente as sinapsinas, são críticas para o acúmulo de vesículas pré-sinápticas bem como para a regulação do tráfego e viabilidade da exocitose em neurônios (Landis et al. 1988; Hirokawa et al 1989; Bernstein e Bamburg 1989). A interação entre sinapsinas e monômeros/filamentos de actina são mediadas predominantemente pelo domínio C altamente conservado das sinapsinas que são modulados por fosforilações sítio-específicas da AMP_c-dependente (PKA) e proteína quinase Ca^{2+}/calmodulina-dependente II (CaMPK-II) (Greengard et al., 1993; Jovanovic et al., 2000). A fosforilação da sinapsina diminui a sua interação com vesículas pré-sinápticas e/ou actina e promove a dissociação e transição das vesículas pré-sinápticas do pool de reserva para o pool de liberação (Onofri et al., 2007), então regulando a eficiência de liberação de neurotransmissores e plasticidade sináptica (Greengard et al 1993, Jovanovic et al., 1996).

Além da sinapsina, a actina também foi identificada entre as proteínas retidas na coluna HiTrap-BPP-10c. É necessário ressaltar que isto não significa necessariamente que o BPP-10c se ligue diretamente a actina, pois devemos lembrar que, em neurônios, a sinapsina se liga a essa proteína. Portanto, é possível que após a interação da sinapsina com o BPP-10c, os monômeros de actina presentes nos homogenatos protéicos do encéfalo não tenham se dissociado da sinapsina e dessa forma tenham sido co-eluídos.

Além de interagir com actina, a sinapsina I interage com domínios SH3 da tirosina quinase c-Src em vesículas pré-sinápticas. Os domínios SH3 são módulos multifuncionais, não catalíticos, que regulam uma variedade de processos celulares por meio da formação e dissociação de interações específicas intra- e intermolecular proteína-proteína. Esses domínios consistem de aproximadamente 60 resíduos de aminoácidos que apesar de diferenças na estrutura primária, exibem a mesma topologia

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

tridimensional e ligam com alta afinidade a seqüências de proteínas ricas em prolinas cuja seqüência consenso [X-Pro-X-X-Pro], lembra o motivo molecular do BPP-10c.

A ligação da região C-terminal rica em prolina da sinapsina I ao domínio SH3 das tirosinas quinases c-Src (McPherson et al., 1994; Onofri et al., 2000) leva a estimulação da atividade c-Src associadas a vesículas pré-sinápticas. A demonstração que vesículas pré-sinápticas depletadas de sinapsina I tem uma marcante depressão da atividade tirosina quinase endógena indicam que o nível de fosforilações de tirosinas depende da associação da sinapsina I com a membrana de vesículas pré-sinápticas. Como a fosforilação da sinapsina I pela CAMPK-II promove a sua dissociação das vesículas pré-sinápticas, a possibilidade existe que em concentrações basais de Ca^{2+}, a sinapsina I esteja ligada a vesículas pré-sinápticas e estimula atividade Src endógena, enquanto que em altas concentrações Ca^{2+} intracelular, a atividade Src associada à vesículas pré-sinápticas esteja deprimida como conseqüência da perda da sinapsina (Torri Tarelli et al 1992; Pieribone et al., 1995). O envolvimento de tirosinas quinases na modulação da liberação de neurotransmissores tem sido sugerido, visto que inibidores de tirosina quinase aumentam a liberação de neurotransmissores Ca^{2+}-dependente. Embora o papel preciso da fosforilação de tirosinas na regulação da exocitose ainda não esteja esclarecido, sugere-se que o efeito inibitório das tirosinas quinases da família c-Src na liberação de neurotransmissores de células neuronais, deva-se a regulação da dinâmica da actina do citoesqueleto. Assim como inibidores de tirosinas quinases da família Src, os inibidores da polimerização de actina aumentam a liberação de neurotransmissores (Turner et al., 1999).

A sinapsina pode também formar um complexo ternário com a NOS e CAPON (*Carboxy-terminal PDZ ligand of nNOS*). A especificidade de reações do NO com alvos neurais é determinado em parte pela localização precisa da NOS dentro da célula. O

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

direcionamento da NOS para núcleos discretos de neurônios é mediado por proteínas adaptadoras. CAPON é uma proteína adaptadora da NOS que interage com sinapsinas I, II e III através da interação com o domínio N-terminal (fosfotirosina), que leva a formação desse complexo ternário. O possível papel desse complexo é demonstrado por mudanças na localização subcelular da NOS em camundongos com deleções nos genes da sinapsina I e II, que sugere um mecanismo para ações específicas do NO nos sítios pré-sinápticos (Jaffrey et al., 2001).

Vários papéis da sinapsina têm sido comparados àqueles da NOS no SNC. Assim como a sinapsina, o NO tem sido localizado em terminais pré-sinápticos no citoesqueleto pré-sináptico, incluindo actina e microtúbulos (Loesch et al., 1994), bem como vesículas sinápticas (Loesch et al., 1994). O NO tem múltiplas funções dentro dos neurônios, assim influenciando na liberação de neurotransmissores das vesículas pré-sinápticas (Hirsch et al., 1993; Montague et al., 1994; Meffert et al.,1994). Adicionalmente, camundongos com deleção do gene da NOS apresenta um defeito na arborização dendrítica (Inglis et al., 1998) que são similares aos defeitos encontrados em camundongos com deleção do gene da sinapsina I. Especula-se que os defeitos na morfologia dendrítica ou liberação de neurotransmissores em camundongos com deleção do gene da sinapsina I reflete o diminuído acesso da NOS aos sítios sinápticos (Jaffrey et al., 2001).

Durante a última década, tem sido demonstrado por vários autores que o NO produzido centralmente participa da regulação do tônus simpático para a periferia (Haüser et al., 2005). A atividade do nervo simpático é aumentada pelo bloqueio da produção de NO central ou diminuída pela aplicação local de doadores de NO em núcleos discretos do cérebro (Vincent e Kimura, 1992). O aumento da atividade do

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

nervo simpático é freqüentemente associado com a hipertensão e deve contribuir para a patogênese e manutenção da hipertensão (Judy et al., 1976; Anderson et al.,1989).

5.3. Internalização do BPP-10c em células neuronais e modulação da liberação de NO

O BPP-10c é internalizado em células Neu-W e células de neuroblastoma humano (SK-N-AS), onde pode então interagir tanto com a sinapsina como a ASS, que são proteínas intracelulares apresentando afinidade ou capacidade de interação com esse peptídeo.

A ASS é uma enzima que participa da via de reciclagem de L-arginina para consumo da enzima NOS. Esta via envolve a participação de três enzimas: a ASS, a argininosuccinato liase (ASL) e a NOS. A atividade da ASS é considerada o passo limitante da via de produção de NO, pois a velocidade de produção de NO (NO - produto da NOS) é determinada pela velocidade de catálise da reciclagem de L-arginina (substrato da NOS) (Solomonson et al., 2003).

Ensaios enzimáticos *in vitro* revelaram que o BPP-10c modula positivamente a atividade catalítica da ASS (Guerreiro et al., 2009). O aumento da produção de NO pelo BPP-10c em células Neu-W e SK-N-AS é indicativo que o BPP-10c modula a atividade dessa enzima *in vivo*, aumentando o fornecimento de L-arginina para o consumo da NOS.

São conhecidas pelo menos três isoformas da NOS, eNOS e nNOS, que são constitutivamente expressas e são ativadas pelo aumento da $[Ca^{2+}]_i$, a iNOS, que como o próprio nome sugere, é induzida por estímulos inflamatórios e cuja atividade é independente da concentração de Ca^{2+} intracelular (Sears et al., 2004). Tanto a eNOS como a nNOS estão provavelmente inativas em níveis basais de $[Ca^{2+}]_i$, e suas atividades aumentam quando os níveis de Ca^{2+} são elevados (Bredt e Snyder, 1990).

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

Tanto a eNOS como a nNOS são enzimas compostas por um domínio redutase e um domínio oxigenase. A ligação da $Ca^{2+/}$calmodulina a NOS estimula a transferência seqüencial de elétrons. Primeiramente ocorre a transferência de elétrons do NADPH para as flavinas do domínio redutase, e então os elétrons das flavinas são transferidos para o domínio oxigenase. Desse modo a NOS torna-se ativada para produzir NO a partir do substrato L-arginina ou superóxido, na ausência de substrato (Abu-Soud et al., 1994).

Dessa maneira, o BPP-10c além modular a atividade da ASS em células neuronais, poderia ativar a NOS pelo aumento da $[Ca^{2+}]_{i.}$ A utilização de inibidores da via de sinalização intracelular induzida pelo BPP-10c, assim como o BAPTA e EGTA, revelaram a participação das NOS Ca^{2+}-dependente constitutiva nesse metabolismo, já que a produção de NO induzida pelo BPP-10c foi significativamente reduzida quando não há mobilização de Ca^{2+} intracelular.

Foi verificado também, que a produção de NO induzida pelo BPP-10c não deve envolver os receptores B2 de cininas e α-2 adrenérgico, visto que o pré-tratamento das células neuronais com antagonistas desses receptores não interferiu na resposta desse peptídeo. A relevância de testar o receptor B2 de cininas se deve ao fato do BPP-10c ser um inibidor da enzima conversora e conseqüentemente poderia aumentar os níveis de BK na cultura celular que estaria disponível para se ligar ao receptor B2 e ativar a NOS. Além disso, sabe-se que a ativação da ASS pelo BPP-10c leva a um aumento dos níveis de L-arginina (Guerreiro et al., 2009). Esse aminoácido além de ser substrato da NOS é também agonista do receptor α-2 adrenérgico e induz a produção de NO por ativação desse receptor (Joshi et al., 2007). Nesse contexto, testamos a participação do receptor α-2 adrenérgico na resposta induzida pelo BPP-10c. Foi verificado que o bloqueio desse receptor por seu antagonista não interferiu na produção de NO induzida pelo BPP-10c.

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

Apesar do BPP-10c produzir efeito anti-hipertensivo somente em SHRs, a produção de NO induzida por esse peptídeo foi semelhante em cérebros de ratos Wistar e SHRs tratados com BPP-10c e animais controle. Esses dados sugerem, então, que os níveis de NO devem estar aumentados em regiões específicas do cérebro de SHRs após tratamento com BPP-10c e a quantidade basal de NO produzida no cérebro de SHRs poderia mascarar o aumento produzido pelo BPP-10c. O NO no SNC é produzido em núcleos discretos de neurônios em todos os níveis do eixo neural. Tem sido demonstrado que o NO produzido centralmente participa da regulação do tônus simpático para a periferia. A aplicação local de doadores de NO em núcleos discretos do cérebro diminui a atividade simpática em múltiplos sítios no cérebro (Häuser et al., 2005). No entanto, a produção de NO por células Neu-W e SK-N-AS foi claramente aumentada na presença do BPP-10c indicando que a produção de NO induzida pelo BPP-10c ocorre em núcleos específicos. Além disso, mostramos a especificidade do BPP-10c na indução da produção de NO, visto que o peptídeo com a seqüência invertida (BPP-10c-invertido) não produz o mesmo efeito em células de origem neuronal.

5.4. Regulação da expressão da ASS e eNOS em cérebros de SHRs tratados com BPP-10c

A ação anti-hipertensiva do BPP-10c se caracteriza pela diminuição da pressão arterial somente de SHRs, acompanhada de significativa diminuição da freqüência cardíaca. A resposta desencadeada pelo BPP-10c não é imediata, e inicia-se cerca de duas a três horas após a administração endovenosa do peptídeo (Ianzer et al.,2007), sugerindo que a ativação da expressão gênica para a produção de NO possa estar envolvida no seu mecanismo de ação.

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

De fato, o BPP-10c além de aumentar a $[Ca^{2+}]_i$ e a produção de NO em células neuronais, também aumenta a expressão de enzimas envolvidas no metabolismo de NO no cérebro de SHRs tratados com BPP-10c, entre elas, a ASS e a eNOS, no entanto, não foi observado diferença significativa no nível de expressão da nNOS. Kishi e colaboradores demonstraram que a super-expressão da eNOS na medula ventrolateral rostral (RVLM) e no núcleo do trato solitário (NTS) de ratos Wistar e SHRs diminuem a pressão arterial sistólica e freqüência cardíaca de ambos, entretanto a magnitude do efeito de queda da pressão arterial em SHRs é maior que em ratos normotensos (Wistar) (Kishi et al., 2001). Esses dados sugerem que o mecanismo hipertensivo de SHRs envolve alguma anormalidade no ciclo citrulina-NO no SNC (Hirooka et al., 2003).

No entanto, a nNOS está presente em altas concentrações no SNC principalmente no NTS e RVLM, mas os níveis de expressão dessa isoforma da NOS em ratos normotensos e hipertensos não são diferentes (Hirooka et al., 2003). Dessa maneira, outros mecanismos compensatórios devem existir para redução da pressão arterial por inibição da atividade do nervo simpático que tem sido atribuído a efeitos sobre a eNOS para a produção de NO (Ye et al., 1997) e no caso do mecanismo de ação do BPP-10c além de envolver a super-expressão da eNOS também envolveria o aumento do nível de expressão da ASS para sustentar o fornecimento de L-arginina, substrato da NOS.

5.5. Liberação dos neurotransmissores GABA e glutamato induzida pelo BPP-10c

O BPP-10c induz a liberação de GABA e glutamato em células neuronais, no entanto, ainda não é possível afirmar se o mecanismo de liberação de neurotransmissores induzida por esse peptídeo é dependente da produção de NO, da sua interação com a sinapsina ou ambos.

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

A interação do BPP-10c com a sinapsina sugere que o BPP-10c participa do controle da liberação desses neurotransmissores, ou regulando a interação entre sinapsina e actina do citoesqueleto ou até mesmo participando da modulação da atividade de c-Src associadas à vesículas pré-sinápticas, caracterizando assim um efeito sinérgico, que explicaria o efeito promovido por baixas doses de BPP-10c (Ianzer et al.,2007).

Sabendo que a sinapsina pode também formar um complexo ternário com a NOS e CAPON, outra possibilidade seria a formação de um complexo quaternário após a ligação do BPP-10c à sinapsina. A formação desse complexo direcionaria as reações do NO a alvos neurais, que seria determinado em parte pela localização desse complexo e direcionamento da NOS para sítios específicos dos neurônios. O aumento da produção de NO estimula a liberação de GABA e glutamato no SNC e diminui pressão arterial média, freqüência cardíaca e excreção urinária de norepinefrina (Kishi et al., 2001).

O aminoácido glutamato é um importante neurotransmissor no SNC de mamíferos, similarmente, GABA é o principal mediador de correntes simpáticas inibitórias. Ambos glutamato e GABA desempenham papel essencial para o controle da função cardiovascular no SNC (Gordon e Sved, 2002).

Geralmente, neurotransmissores aminoácidos excitatório, assim como glutamato e aspartato, causam resposta pressora e taquicardia, enquanto que neurotransmissores aminoácidos inibitórios, assim como GABA e glicina causa resposta depressora e bradicardia (Kishi et al., 2001).

Está bem estabelecido que o aminoácido excitatório, L-glutamato, é considerado o principal neurotransmissor de fibras aferentes primária dos pressoreceptores para o NTS (Lawrence e Jarrott, 1996; Ohta e Talman, 1996). Além disso, uma projeção excitatória do NTS para a medula ventrolateral caudal (CVLM) é parte essencial do

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

circuito de controle barorreflexo. O CVLM envia informações a medula ventrolateral rostarl (RVLM) pela secreção de GABA. Apesar da inibição GABAérgica do RVLM ter recebido considerável atenção, entradas de aminoácidos excitatórios também tem um importante papel na regulação cardiovascular (Ito e Sved, 1997). Dessa maneira, a liberação facilitada de glutamato e GABA no SNC como efeito do aumento da produção de NO induzida BPP-10c e/ou interação com a sinapsina deve contribuir para a atividade anti-hipertensiva desse peptídeo no SNC.

5.6. Mecanismo de ação do BPP-10c no controle central da pressão arterial

5.6.1. Regulação da atividade simpática renal

O NO está envolvido na regulação da resistência vascular local e sistêmica, no balanço de sódio e, conseqüentemente, no controle da pressão arterial (Umans e Levi, 1995). O NO também tem sido descrito como um modulador neuronal, agindo no cérebro como uma molécula sinalizadora no SNC (Garthwaite e Boulton, 1995). Estudos têm revelado que o NO, no cérebro, está envolvido na regulação cardiovascular central, através da redução do tônus simpático para a periferia (Lin et al., 1999; Haüser et al., 2005).

Apesar do BPP-10c não interferir na atividade simpática renal de SHRs anestesiados, a hipótese da produção de NO induzida pelo BPP-10c não pode ser descartada, mesmo por que nenhuma variação da pressão arterial média foi observada quando os ratos estavam sob anestesia.

Recentemente observamos em nosso laboratório, que o efeito do BPP-10c em SHRs é bloqueado por anestésicos. Os experimentos que foram possíveis observar o efeito anti-hipertensivo do BPP-10c sempre foram realizados em animais acordados. Os SHRs, primeiramente são anestesiados para canulação da veia e artéria (conforme descrito em materiais e métodos seção 3.10.1.) e após 22h de recuperação da anestesia,

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

os experimentos são realizados. No entanto, quando os animais são anestesiados com pentobarbital, mesmo após a recuperação da anestesia quando os animais já estão acordados, esse anestésico ainda interfere na atividade do BPP-10c. Há na literatura muitos trabalhos alertando para o uso do pentobarbital como anestésico, no estudo de parâmetros cardiovasculares, isso porque a anestesia com pentobarbital interfere nos efeitos cardiovasculares interessantemente bloqueando o sistema nervoso simpático (Haüser et al.,1995), corroborando com a hipótese que o aumento da produção de NO em células do SNC de ratos pelo BPP-10c deva controlar a atividade simpática.

5.6.2. Aumento da sensibilidade do barorreflexo induzido pelo BPP-10c

Está bem estabelecido que o SNC tem um papel importante no controle da função barorreflexa arterial (Guyenet,1990; Dampney, 1994). A principal via do reflexo barorreceptor está no tronco cerebral, NTS, CVLM e a RVLM (Guyenet,1990; Dampney, 1994). O NTS é o sítio de terminação de fibras aferentes primárias de muitos receptores cardiovasculares (Kumada et al., 1990) e o RVLM contém neurônios pré-motores simpáticos responsáveis por manter a excitação tônica de neurônios pré-ganglionares envolvidos na regulação e na integridade funcional do RVLM que é essencial para a manutenção do tônus vasomotor basal. (Kishi et al., 2001).

O controle reflexo do barorreceptor da freqüência cardíaca está prejudicado em vários modelos de hipertensão (Luft et al., 1980; Howe et al., 1989; Chapleau e Abboud, 1993; Kumagai et al., 1993; Matsumura et al., 1998; Pontieri et al., 1998). O ganho máximo do controle barorreflexo de SHRs é significativamente diminuído comparados a ratos Wistar. Além disso, SHRs, um modelo de hipertensão crônica tem excitabilidade de neurônios pré-simpáticos aumentada (Kishi et al., 2003). A redução da sensibilidade do barorreceptor arterial tem sido mostrada ser responsável por essa prejudicada função reflexa (Luft et al., 1980; Howe et al., 1989; Chapleau e Abboud,

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

1993; Kumagai et al., 1993; Matsumura et al., 1998). Há alguns estudos na literatura relatando que o ganho reflexo do barorreceptor foi aumentado pelo NO em animais acordados (Liu et al., 1996; Murakami et al., 1998). A sugestão de que o NO, produzido centralmente, deve estar envolvido no mecanismo de ação do BPP-10c, explicaria as mudanças na sensibilidade barorreflexa observadas em SHRs tratados com BPP-10c.

5.6.3. Injeção central do BPP-10c em ratos acordados

A clonidina e a alfa-metildopa são protótipos de drogas que agem centralmente via receptor α2-adrenérgico, diminuindo o tônus simpático periférico provocando queda da pressão arterial e bradicardia (van Zwieten, 1980). Apesar do BPP-10c produzir queda da pressão arterial e freqüência cardíaca, sugere-se que o BPP-10c deva provocar seu efeito anti-hipertensivo independentemente do receptor α2-adrenérgico, já que nem a resposta de aumento de $[Ca^{2+}]_i$ nem a produção de NO induzida pelo BPP-10c tiveram interferência pelo bloqueio desse receptor com seu antagonista.

Além disso, não é possível explicar a atividade anti-hipertensiva do BPP-10c pela sua capacidade de inibição da atividade enzimática da ECA, visto que, o captopril, inibidor da ECA, produz queda da pressão arterial, mas não produz efeito na freqüência cardíaca (Quadri et al., 1992; Wang et al., 2006). No entanto, em doses maiores (2mg/kg) injetada endovenosamente, o captopril provoca queda da pressão arterial e bradicardia. Além disso, quando administrado por via intracisternal a redução da freqüência cardíaca é significativamente maior que a observada por injeção endovenosa (Takeda et al., 1987), sugerindo um efeito central para o captopril dependente de dose e local de administração.

No caso do BPP-10c, a administração intracerebroventricular em doses menores produziu efeitos semelhantes aos efeitos da administração endovenosa corroborando com a sugestão da participação do SNC no mecanismo de ação do BPP-10c.

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

6.CONCLUSÕES

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

O BPP-10c é uma molécula peptídica dotada de atividade anti-hipertensiva, com característica bifásica, isto é, na primeira hora após a injeção há uma redução moderada (efeito agudo), e após duas a três horas uma maior e prolongada queda na pressão arterial média (efeito tardio). Nesse trabalho foram apresentados alguns resultados que sugerem o envolvimento do SNC no mecanismo de ação desse peptídeo, que não poderiam ser explicados pelos efeitos inibitórios sobre a ECA.

Devido ao fato do Ca^{2+} ser um segundo mensageiro que participa de muitos processos celulares, incluindo a ativação de enzimas, controle da expressão gênica e liberação de neurotransmissores, iniciamos nossos estudos mostrando que o BPP-10c induz a mobilização de $[Ca^{2+}]_i$ em células neuronais, mas não em células gliais. Esse efeito foi independente do receptor de B2 de cininas e α-2 adrenérgico, que é um receptor de protótipos de drogas anti-hipertensivas que agem centralmente, assim como α-metildopa e clonidina. Sugerimos que o mecanismo de sinalização de Ca^{2+} induzida pelo BPP-10c deve envolver a estimulação de um ainda desconhecido receptor acoplado a proteína $G_{i/0}$ que ativa um canal de Ca^{2+} na membrana plasmática seguido por uma CICR. Em busca da molécula receptora do BPP-10c no SNC identificamos que esse peptídeo interage com sinapsina *in vitro* e com a ASS *in vitro* e *in vivo*.

Foi demonstrado também que o BPP-10c participa da ativação da NOS, uma enzima Ca^{2+}-dependente, aumentando a produção de NO; regula positivamente a expressão gênica da ASS e eNOS em cérebros de animais tratados; e facilita a liberação dos neurotransmissores, GABA e glutamato por células neuronais.

O NO está envolvido na regulação da liberação de neurotransmissores, tais como o GABA e o glutamato, aminoácidos que desempenham papel essencial para o controle da função cardiovascular no SNC. O NO como neurotransmissor no SNC regula vasodilatação não-adrenérgica e não-colinérgica por diminuição da atividade simpática.

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

Nossos dados capacitaram-nos a interpretar o papel do NO na regulação cardiovascular em regiões restritas do SNC, já que o aumento da produção de NO não pôde ser observado no cérebro total de SHRs.

Todos esses resultados podem explicar os efeitos farmacológicos do BPP-10c sobre a pressão arterial e freqüência cardíaca de SHRs. O aumento da sensibilidade do barorreflexo de SHRs acordados tratados com BPP-10c poderia ser a comprovação *in vivo* do efeito central do BPP-10c, sugerindo a modulação da atividade simpática e/ou parassimpática principalmente no efeito tardio do BPP-10c. O efeito do BPP-10c observado após administração intracerebroventricular sugere fortemente a participação do SNC no mecanismo de ação desse peptídeo.

Em conclusão, mostramos que o aumento de NO causado pelo aumento da expressão da ASS e da eNOS no SNC de SHRs acordados tratados e a interação do BPP-10c com a sinapsina facilita a liberação de GABA e glutamato para regulação da sensibilidade do barorreflexo (Figura 33).

Esses dados abrem perspectivas para um melhor conhecimento dos processos de controle central da pressão arterial de mamíferos e da gênese da hipertensão, assim como para a identificação de novas vias e alvos para o tratamento e controle de estados hipertensivos. O fato do BPP-10c interagir com um alvo ainda pouco explorado na regulação da pressão arterial, poderia levar à caracterização de processos ou mecanismos importantes no SNC e até mesmo o desenvolvimento de um novo fármaco para tratamento da hipertensão humana pertencente a uma nova classe terapêutica.

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

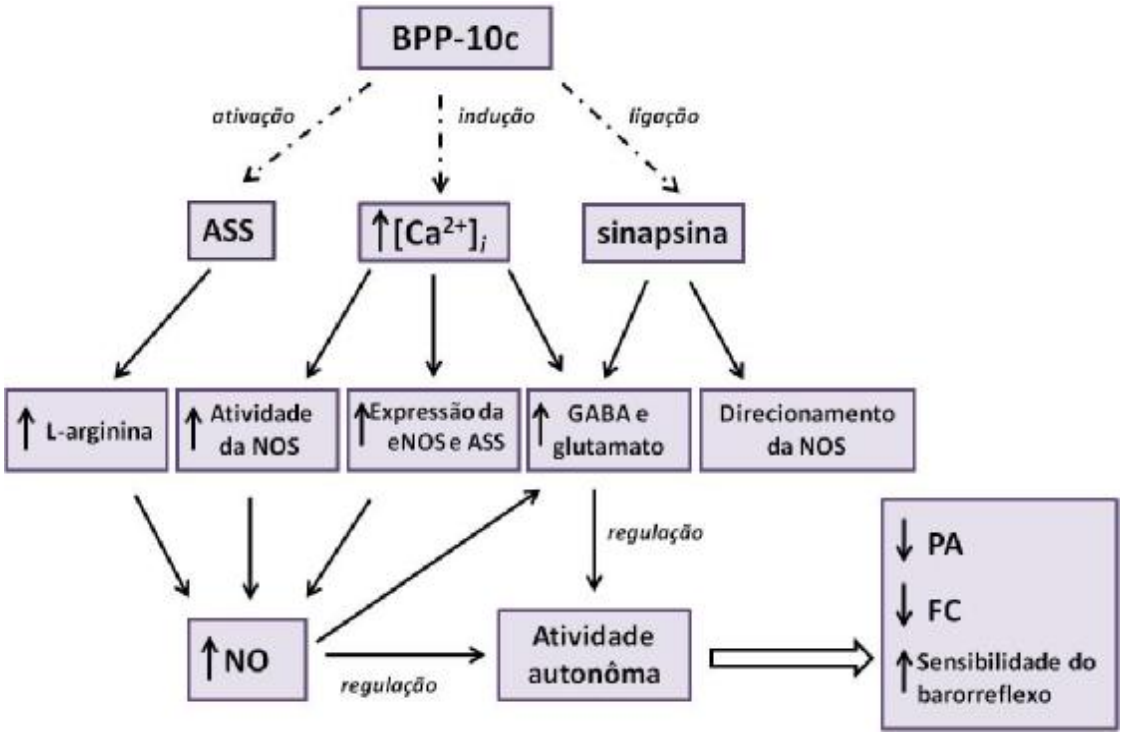

FIGURA 33. Mecanismo de ação do BPP-10c no SNC. Baseados na investigação desse trabalho, propomos um mecanismo de ação do BPP-10c no SNC para explicar seu efeito sobre a PA (pressão arterial) e freqüência cardíaca (FC) em ratos espontaneamente hipertensos (SHRs). Primeiramente, o BPP-10c deve induzir elevações da $[Ca^{2+}]_i$ e ativar vias de transdução de sinal responsável pelo aumento da atividade da óxido nítrico sintase (NOS), da expressão das enzimas: NOS endotelial (eNOS) e argininosuccinato sintase (ASS) e pela liberação dos neurotransmissores GABA e glutamato. Após ser internalizado por células do SNC, o BPP-10c se liga a sinapsina para controlar a liberação de GABA e glutamato, bem como para direcionar a NOS para núcleos discretos de neurônios. Além disso, o BPP-10c pode ativar a ASS para aumentar os níveis de L-arginina. A produção de NO decorrente do aumento da concentração de L-arginina, ativação da NOS e aumento da expressão da eNOS e ASS deve contribuir tanto para a liberação de neurotransmissores quanto para a regulação da atividade autônoma. Da mesma forma GABA e glutamato levam a diminuição da PA e FC e aumentam a sensibilidade do barorreflexo de SHRs.

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

1. Abu-Soud HM ,Yoho LL, Stuehr DJ. Calmodulin controls neuronal nitric-oxide synthase by a dual mechanism. Activation of intra- and interdomain electron transfer. J Biol Chem 1994;269(51):32047-50.

2. Aminlari M, Shahbazkia HR, Esfandiari A. Distribution of arginase in tissues of cat (Felis catus). J Feline Med Surg 2007;9(2):133-9.

3. Anderson EA, Sinkey CA, Lawton WJ, Mark AL. Elevated sympathetic nerve activity in borderline hypertensive humans. Evidence from direct intraneural recordings. Hypertension 1989;14:177–183.

4. Barnett A. Exenatide. Expert Opin Pharmacother 2007;15:2593-2608.

5. Ben-Ari ET, Garrison JC. Regulation of angiotensinogen mRNA accumulation in rat hepatocytes. Am J Physiol 1988;255(1):E70-9.

6. Benda P, Lightbody J, Sato G, Levine L, Sweet W. Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. Science 1968;161(839):370-1.

7. Benfenati F, Valtorta F, Chieregatti E, Greengard P. Interaction of free and synaptic vesicle-bound synapsin I with F-actin. Neuron 1992;8(2):377-386.

8. Bernardini R, Calogero AE, Ehrlich YH, Brucke T, Chrousos GP, Gold PW. The alkyl-ether phospolipid platelet-activating factor is a stimulator of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the rat. Endocrinology 1989;125:1067-1073.

9. Bernstein BW, Bamburg JR. Cycling of actin assembly in synaptosomes and neurotransmitter release. Neuron 1989;3(2):257-65.

10. Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. The versatility and universality of calcium signalling. Nat Rev Mol Cell Biol 2000;1(1):11-21.

11. Biaggioni I. Sympathetic control of the circulation in hypertension: lessons from autonomic disorders. Curr Opin Nephrol Hypertens 2003;12(2):175-80.

12. Bleasdale JE, Thakur NR, Gremban RS, Bundy GL, Fitzpatrick FA, Smith RJ, Bunting S. Selective inhibition of receptor-coupled phospholipase C-dependent processes in human platelets and polymorphonuclear neutrophils. J Pharmacol Exp Ther 1990; 255:756-768.

13. Bolotina VM, Najibi S, Palacino JJ, Pagano PJ, Cohen RA. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. Nature 1994;368(6474):850-853.

14. Bootman MD, Lipp P. Ringing changes to the 'bell-shaped curve'. Curr Biol 1999;9(23):R876-8.

15. Boyd FT Jr, Clarke DW, Muther TF, Raizada MK. Insulin receptors and insulin modulation of norepinephrine uptake in neuronal cultures from rat brain. J Biol Chem 1985;260(29):15880-4.

16. Bradford, MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976; 72: 248 - 254.

17. Bredt DS, Snyder SH. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. Proc Natl Acad Sci U S A 1990;87(2):682-5.

18. Bristow JD, Honour AJ, Pickering GW, Sleight P, Smyth HS. Diminished baroreflex sensitivity in high blood pressure. Circulation 1969;39(1):48-54.

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

19. Bunag RD, Walaszek EJ, Mueting N. Sex differences in reflex tachycardia induced by hypotensive drugs in unanesthetized rats. Am J Physiol 1975;229(3):652-6.

20. Busse R, Fleming I. Regulation and functional consequences of endothelial nitric oxide formation. Ann Med 1995;27(3):331-40.

21. Cabrera C, Bohr D: The role of nitric oxide in the central control of blood pressure. Biochem Biophys Res Commun 1995;206:77-81.

22. Calabrese V, Mancuso C, Calvani M, Rizzarelli E, Butterfield DA, Stella AM. Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. Nat Rev Neurosci 2007;8(10):766-75.

23. Camargo A, Ianzer, Silva C, Gomes C, Guerreiro J. Proline-rich peptides, pharmaceutical composition, use of one or more peptides and method of treatment. WO2007/079558. 2007/07/19.

24. Camargo AC, Graeff FG. Subcellular distribution and properties of the bradykinin inactivation system in rabbit brain homogenates. Biochem Pharmacol 1969;18(2):548-9.

25. Camargo ACM, Ferreira SH. Action of bradykinin potentiating factor (BPF) and dimercaptrol (BAL) on the response to bradykinin of isolated preparations of rat intestines. Br. J. Pharmacol 1971; 42: 305–307.

26. Cartledge J, Minhas S, Eardley I.The role of nitric oxide in penile erection. Expert Opin Pharmacother 2001 Jan;2(1):95-107. Review.

27. Chapleau MW, Abboud FM. Mechanism of adaptation and resetting of the baroreceptor reflex. In: Hainworth R, Mark AL, eds. Cardiovascular Reflex Control in Health and Disease. London, UK: WB Saunders Co; 1993: 165–193.

28. Chapleau MW, Cunningham JT, Sullivan MJ, Wachtel RE, Abboud FM. Structural versus functional modulation of the arterial baroreflex. Hypertension 1995;26(2):341-7.

29. Chapleau MW, Li Z, Meyrelles SS, Ma X, Abboud FM. Mechanisms determining sensitivity of baroreceptor afferents in health and disease. Ann N Y Acad Sci 2001;940:1-19.

30. Chaudhuri A, ZbrzeznaV, Polyakova J, Pogo AO, Hesselgesser J, Horuk R. Expression of the Duffy Antigen in K562 Cells: Evidence that it is the Chemokine Receptor. J Biol Chem 1994; 269: 7835-7838.

31. Chen J, DeVivo M, Dingus J, Harry A, Li J, Sui J, Carty DJ, Blank JL, Exton JH, Stoffel RH, et al. A region of adenylyl cyclase 2 critical for regulation by G protein beta gamma subunits. Science 1995;268(5214):1166-9.

32. Cho Y; Somer BGE, Amatya A. Natriuretic peptides and their therapeutic potential. Heart Dis 1999;1: 305 – 328.

33. Cotton J, Hayashi MA, Cuniasse P, Vazeux G, Ianzer D,Camargo ACM, Dive V. Selective inhibition of the Cdomainof angiotensin I converting enzyme by bradykinin potentiating peptides. Biochemistry 2002; 41: 6065–6071.

34. Cushman DW, Ondetti MA, Gordon EM, Natarajan S, Karanewsky DS, Krapcho J, Petrillo EW Jr. Rational design and biochemical utility of specific inhibitors of angiotensin-converting enzyme. J Cardiovasc Pharmacol 1987;10:17-30.

35. Dampney RAL. Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system. Physiol Rev 1994; 74: 323–364.

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

36. De Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger T. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. Pharmacol Rev 2000; 52(3):415-72.

37. DiBona GF. Sympathetic nervous system and the kidney in hypertension. Curr Opin Nephrol Hypertens 2002;11(2):197-200.

38. Eliseev AV. Target driven chemistry in drug discovery. Drug Discov Today 2004;9(8):348-9.

39. Endo M. Calcium release from the sarcoplasmic reticulum. Physiol Rev 1977; 57:71–108.

40. Engberink MF, Schouten EG, Kok FJ, van Mierlo LA, Brouwer IA, Geleijnse JM. Lactotripeptides show no effect on human blood pressure: results from a double-blind randomized controlled trial. Hypertension 2008 ;51(2):399-405.

41. Farr-Jones S, Downey W. GPCRs: New Strategies for an Old Target Class. DDW Drug Discovery World 2007; 8(4): 79-86.

42. Feelisch M, Rassaf T, Mnaimneh S, Singh N, Bryan NS, Jourd'Heuil D, Kelm M. Concomitant S-, N-, and heme-nitros(yl)ation in biological tissues and fluids: implications for the fate of NO in vivo. FASEB J 2002;16(13):1775-85.

43. Fernández-Chacón R, Südhof TC. Genetics of synaptic vesicle function: toward the complete functional anatomy of an organelle. Annu Rev Physiol 1999;61:753-76.

44. Ferreira SH, Bartelt DC, Greene LJ. Isolation of bradykinin-potentiating peptides from Bothrops jararaca venom. Biochemistry 1970b;23:2583-2593.

45. Ferreira SH, Greene LH, Alabaster VA, Bakhle YS, Vane JR. Activity of various fractions of bradykinin potentiating factor against angiotensin I converting enzyme. Nature 1970a;225:379-380.

46. Ferreira SH. A bradykinin-potentiating factor (bpf) present in the venom of *Bothrops jararaca.* British Journal of Pharmacology 1965; 24: 163-9.

47. Finkbeiner S, Greenberg ME. Spatial features of calcium-regulated gene expression. Bioessays 1997;19(8):657-60.

48. Fleming I, Busse R. Tyrosine phosphorylation and bradykinin-induced signaling in endothelial cells. Am J Cardiol 1997;80(3A):102A-109ª.

49. Fox JW, Serrano SM. Approaching the golden age of natural product pharmaceuticals from venom libraries: an overview of toxins and toxin-derivatives currently involved in therapeutic or diagnostic applications. Curr Pharm Des 2007; 13: 2927-2934.

50. Garthwaite J, Boulton CL. Nitric oxide signaling in the central nervous system. Annu Rev Physiol 1995;57:683-706.

51. Gavras H, Brunner HR, Laragh JH, Searley SE,Gavras I, Vukovich RA. An angiotensin converting enzyme inhibitor to identify and treat vasocontrictor and volume factors in hypertensive patients. N Engl J Med 1974; 291: 817–821.

52. Gollasch M, Kleuss C, Hescheler J, Wittig B, Schultz G. Gi2 and protein kinase C are required for thyrotropin-releasing hormone-induced stimulation of voltage-dependent Ca2+ channels in rat pituitary GH3 cells. Proc Natl Acad Sci U S A 1993; 90: 6265-6269.

53. Gomes CL, Konno K, Conceicao IM, Ianzer D, Yamanouye N, Prezoto BC, Assakura MT, Rádis-Baptista G, Yamane T, Santos RA, de Camargo AC, Hayashi MA.

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

Identification of novel bradykinin-potentiating peptides (BPPs) in the venom gland of a rattlesnake allowed the evaluation of the structure-function relationship of BPPs. Biochem Pharmacol 2007; 74: 1350-1360.

54. Gordon FJ, Sved AF. Neurotransmitters in central cardiovascular regulation: glutamate and GABA. Clin Exp Pharmacol Physiol 2002;29(5-6):522-4.

55. Grassi G, Cattaneo BM, Seravalle G, Lanfranchi A, Mancia G. Baroreflex control of sympathetic nerve activity in essential and secondary hypertension. Hypertension 1998;31(1):68-72.

56. Grassi G, Seravalle G, Cattaneo BM, Lanfranchi A, Vailati S, Giannattasio C, Del Bo A, Sala C, Bolla GB, Pozzi M. Sympathetic activation and loss of reflex sympathetic control in mild congestive heart failure. Circulation 1995;92(11):3206-11.

57. Grassi G, Seravalle G, Dell'Oro R, Facchini A, Ilardo V, Mancia G. Sympathetic and baroreflex function in hypertensive or heart failure patients with ventricular arrhythmias. J Hypertens 2004;22(9):1747-53.

58. Grassi G, Trevano FQ, Seravalle G, Scopelliti F, Mancia G. Baroreflex function in hypertension: consequences for antihypertensive therapy. Prog Cardiovasc Dis 2006;48(6):407-15.

59. Greene LJ, Camargo ACM, Krieger EM, Stewart JM, Ferreira SH. Inhibition of the conversion of angiotensina I to II, and potentiation of bradykinin by small peptides present in the Bothrops jararaca venom. Circ Res 1972; 31 (Suppl II): II-62–II-71.

60. Greengard P, Browning MD, McGuinness TL, Llinas R.Synapsin I, a phosphoprotein associated with synaptic vesicles: possible role in regulation of neurotransmitter release. Adv Exp Med Biol 1987;221:135-53.

61. Greengard P, Valtorta F, Czernik AJ, Benfenati F. Synaptic vesicle phosphoproteins and regulation of synaptic function. Science 1993;259(5096):780-5.

62. Guerreiro JR, Lameu C, Oliveira EF, Linares E, Augusto O, Lebrun I, Serrano SMT, Camargo ACM. Argininosuccninate synthase (AsS) is a novel target for a snake venom anti-hypertensive oligopeptide. J Biol Chem *accept*

63. Guyenet PG. Role of the ventral medulla oblongata in blood pressure regulation. In: Loewy AD, Spyer KM, eds. Central Regulation of Autonomic Functions. New York: Oxford University Press; 1990: 145–167.

64. Guzzetti S, Piccaluga E, Casati R, Cerutti S, Lombardi F, Pagani M, Malliani A.Sympathetic predominance in essential hypertension: a study employing spectral analysis of heart rate variability. J Hypertens 1988;6(9):711-7.

65. Haas J, Storch-Hagenlocher B, Biessmann A, Wildemann B. Inducible nitric oxide synthase and argininosuccinate synthetase: co-induction in brain tissue of patients with Alzheimer's dementia and following stimulation with beta-amyloid 1-42 in vitro. Neurosci Lett. 2002; 322(2):121-5.

66. Hauser GJ, Dayao EK, Zukowska-Grojec Z. Effect of pentobarbital anesthesia on the pressor response to agonists in vivo in normal and endotoxemic rats. Res Commun Mol Pathol Pharmacol 1995;90(2):289-300.

67. Hauser W, Sassmann A, Qadri F, Johren O, Dominiak P. Expression of nitric oxide synthase isoforms in hypothalamo-pituitary-adrenal axis during the development of spontaneous hypertension in rats. Brain Res Mol Brain Res 2005;138(2):198-204.

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

68. Hayashi J, Takeda K, Kuwabara T, Takesako T, Itoh H, Hirata M, et al. Clonidine improves central attenuation og the baroreflex in spontaneously hypertensive rats. Jpn Heart J 1993; 333-339.

69. Hayashi MA, Camargo AC. The Bradykinin-potentiating peptides from venom gland and brain of Bothrops jararaca contain highly site specific inhibitors of the somatic angiotensin-converting enzyme. Toxicon 2005;45(8):1163-70.

70. Hayashi MA, Murbach AF, Ianzer D, Portaro FC, Prezoto BC, Fernandes BL, Silveira PF, Silva CA, Pires RS, Britto LR, Dive V, Camargo AC. The C-type natriuretic peptide precursor of snake brain contains highly specific inhibitors of the angiotensin-converting enzyme. J Neurochem 2003;85(4):969-77.

71. Hecker M, Sessa WC, Harris HJ, Anggard EE, Vane JR The metabolism of L-arginine and its significance for the biosynthesis of endothelium-derived relaxing factor: cultured endothelial cells recycle L-citruline to L-arginine. Proc Natl Acad Sci U S A 1990; 87: 8612-8616.

72. Hescheler J, Schultz G. Heterotrimeric G proteins involved in the modulation of voltage-dependent calcium channels of neuroendocrine cells. Ann N Y Acad Sci 1994; 733:306-312.

73. Hirokawa N, Sobue K, Kanda K, Harada A, Yorifuji H. The cytoskeletal architecture of the presynaptic terminal and molecular structure of synapsin 1. J Cell Biol 1989;108(1):111-26.

74. Hirooka Y, Sakai K, Kishi T, Ito K, Shimokawa H, Takeshita A. Enhanced depressor response to endothelial nitric oxide synthase gene transfer into the nucleus tractus solitarii of spontaneously hypertensive rats. Hypertens Res 2003;26(4):325-31.

75. Hirose H, Saito I, Kawabe H, Saruta T.Insulin resistance and hypertension: seven-year follow-up study in middle-aged Japanese men (the KEIO study). Hypertens Res 2003;26(10):795-800.

76. Hirota T, Ohki K, Kawagishi R, Kajimoto Y, Mizuno S, Nakamura Y, Kitakaze M.Casein hydrolysate containing the antihypertensive tripeptides Val-Pro-Pro and Ile-Pro-Pro improves vascular endothelial function independent of blood pressure-lowering effects: contribution of the inhibitory action of angiotensin-converting enzyme. Hypertens Res 2007;30(6):489-96.

77. Hirsch DB, Steiner JP, Dawson TM, Mammen A, Hayek E, Snyder SH. Neurotransmitter release regulated by nitric oxide in PC-12 cells and brain synaptosomes. Curr Biol 1993;3(11):749-54.

78. Horn TP, Smith PM, McLaughlin BE, Bauce L, Marks GS, Pittman QJ, Ferguson AV. Nitric oxide actions in paraventricular nucleus: cardiovascular and neurochemical implications. Am J Physiol. 1994;266: R306–R313.

79. Howe PR, Rogers PF, Head GA. Limited baroreflex control of heart rate in young stroke-prone spontaneously hypertensive rats. J Hypertens 1989;7: 69–75.

80. Husson A, Brasse-Lagnel C, Fairand A, Renouf S, Lavoinne A. Argininosuccinate synthetase from the urea cycle to the citrulline-NO cycle. Eur J Biochem 2003; 270: 1987-1999.

81. Iaccarino G, Barbato E, Cipoletta E, Fiorillo A, Trimarco B. Role of the sympathetic nervous system in cardiac remodeling in hypertension. Clin Exp Hypertens 2001;23(1-2):35-43.

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

82. Ianzer D, Konno K, Marques-Porto R, Portaro FCV, Stöcklin R, Camargo ACM, et al. Identification of five new bradykinin potentiating peptides (BPPs) from Bothrops jararaca crude venom by using electrospray ionization tandem mass spectrometry after a two-step liquid chromatography. Peptides 2004;25:1085-92.

83. Ianzer D, Santos RA, Etelvino GM, Xavier CH, de Almeida Santos J, Mendes EP, Machado LT, Prezoto BC, Dive V, de Camargo AC. Do the cardiovascular effects of angiotensin-converting enzyme (ACE) I involve ACE-independent mechanisms? new insights from proline-rich peptides of Bothrops jararaca. J Pharmacol Exp Ther 2007;322(2):795-805.

84. Inglis FM, Furia F, Zuckerman KE, Strittmatter SM, Kalb RG. The role of nitric oxide and NMDA receptors in the development of motor neuron dendrites. J Neurosci 1998;18(24):10493-501.

85. Irigoyen MC, Lacchini S, De Angelis K, Michelini LC. Fisiopatologia da hipertensão: O que avançamos? Ver Soc Cardiol Estado de São Paulo. 2003, 1: 20-45.

86. Irigoyen MC, Moreira ED, Werner A, Ida F, Pires MD, Cestari IA, Krieger EM. Aging and baroreflex control of RSNA and heart rate in rats. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2000;279(5):R1865-71.

87. Israili ZH, Hernandez-Hernandez R, Valasco M. The future of antihypertensive treatment. Am J Ther 2007;14(2):121-34.

88. Ito S, Sved AF. Tonic glutamate-mediated control of rostral ventrolateral medulla and sympathetic vasomotor tone. Am J Physiol 1997;273(2 Pt 2):R487-94.

89. IV Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial. Hipertensão 2002; (5):126-163.

90. Jaffrey SR, Erdjument-Bromage H, Ferris CD, Tempst P, Snyder SH. Protein S-nitrosylation: a physiological signal for neuronal nitric oxide. Nat Cell Biol 2001;3(2):193-7.

91. Jaspard E, Wei L, Alhenc-Gelas F. Differences in the properties and enzymatic specificities of the two active sites of angiotensin I-converting enzyme (kininase II). Studies with bradykinin and other natural peptides. J Biol Chem 1993; 268: 9496–9503.

92. Jin Y, Wu H, Cohen EM, Wei J, Jin H, Prentice H, Wu JY. Genistein and daidzein induce neurotoxicity at high concentrations in primary rat neuronal cultures. J Biomed Sci 2007;14: 275-284.

93. John JP, Chen WQ, Pollak A, Lubec G. Mass spectrometric studies on mouse hippocampal synapsins Ia, IIa, and IIb and identification of a novel phosphorylation site at serine-546. J Proteome Res 2007;6(7):2695-710.

94. Joshi MS, Ferguson TB Jr, Johnson FK, Johnson RA, Parthasarathy S, Lancaster JR Jr.Receptor-mediated activation of nitric oxide synthesis by arginine in endothelial cells.Proc Natl Acad Sci U S A 2007;104(24):9982-7.

95. Jovanovic JN, Benfenati F, Siow YL, Sihra TS, Sanghera JS, Pelech SL, Greengard P, Czernik AJ. Neurotrophins stimulate phosphorylation of synapsin I by MAP kinase and regulate synapsin I-actin interactions. Proc Natl Acad Sci U S A 1996;93(8):3679-83.

96. Jovanovic JN, Czernik AJ, Fienberg AA, Greengard P, Sihra TS. Synapsins as mediators of BDNF-enhanced neurotransmitter release. Nat Neurosci 2000;3(4):323-9.

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

97. Judy WV, Watanabe AM, Henry DP, Besch HR Jr, Murphy WR, Hockel GM. Sympathetic nerve activity: role in regulation of blood pressure in the spontanenously hypertensive rat. Circ Res 1976; 38: 21–29.

98. Kanagy NL. Alpha(2)-adrenergic receptor signalling in hypertension. Clin Sci (Lond) 2005;109(5):431-7

99. Kao JP, Harootunian AT, Tsien RY. Photochemically generated cytosolic calcium pulses and their detection by fluo-3. J Biol Chem 1989;264(14):8179-84.

100. Kass GE, Orrenius S. Calcium signaling and cytotoxicity. Environ Health Perspect 1999;107 Suppl 1:25-35.

101. Kirstein SL, Insel PA. Autonomic nervous system pharmacogenomics: a progress report. Pharmacol Rev 2004;56(1):31-52.

102. Kishi T, Hirooka Y, Kimura Y, Sakai K, Ito K, Shimokawa H, Takeshita A. Overexpression of eNOS in RVLM improves impaired baroreflex control of heart rate in SHRSP. Rostral ventrolateral medulla. Stroke-prone spontaneously hypertensive rats. Hypertension 2003;41(2):255-60.

103. Kishi T, Hirooka Y, Sakai K, Shigematsu H, Shimokawa H, Takeshita A. Overexpression of eNOS in the RVLM causes hypotension and bradycardia via GABA release. Hypertension 2001;38(4):896-901.

104. Kitamura S, Ueyama T. Purifying whey containing angiotensin-converting enzyme inhibitor peptides useful for reducing blood pressure, by electrodialysis of latctic acid fermentate using na anion exchange membrane. WO200042066. 2001/07/20.

105. Koh DC, Armugam A, Jeyaseelan K. Snake venom components and their applications in biomedicine. Cell Mol Life Sci 2006; 63:3030-3041.

106. Krieger EM, Da Silva GJ, Negrão CE.Effects of exercise training on baroreflex control of the cardiovascular system. Ann N Y Acad Sci 2001;940:338-47.

107. Krieger EM, Salgado HC, Assan CJ, Greene LJ, Ferreira SH. Potential screening test for detection of overreactivity of renin-angiotensin system. Lancet 1971; 1: 269–271.

108. Krieger EM. Neurogenic hypertension in the rat. Circ Res 1964;15:511-21.

109. Krieger EM.Arterial baroreceptor resetting in hypertension (the J. W. McCubbin memorial lecture). Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl 1989;15:3-17.

110. Kumada M, Terui N, Kuwaki T: Arterial baroreceptor reflex: its central action and peripheral neural mechanisms. Prog Neurobiol 1990; 35: 331-361.

111. Kumagai H, Averill DB, Khosla MC, Ferrario CM. Role of nitric oxide and angiotensin II in the regulation of sympathetic nerve activity in spontaneously hypertensive rats. Hypertension 1993; 21: 476–484.

112. Kurtz A, Wagner C. Cellular control of renin secretion. J Exp Biol 1999; 202(3): 219-25.

113. Laemmli, UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970; 227: 680 - 685.

114. Lameu C, Camargo ACM, Faria M. L-arginine signalling potential in the brain: the peripheric gets central. Recent Patents on CNS Drug Discovery *in press*

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

115. Landis DM, Hall AK, Weinstein LA, Reese TS. The organization of cytoplasm at the presynaptic active zone of a central nervous system synapse. Neuron 1988;1(3):201-9.

116. Lanfranchi PA, Somers VK. Arterial baroreflex function and cardiovascular variability: interactions and implications. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2002;283(4):R815-26.

117. Lawrence AJ, Jarrott B: Neurochemical modulation of cardiovascular control in the nucleus tractus solitarius. Prog Neurobiol 1996; 48: 21-53.

118. Lin HC, Wan FJ, Cheng KK, Tseng CJ. Nitric oxide signaling pathway mediates the L-arginine-induced cardiovascular effects in the nucleus tractus solitarii of rats. Life Sci 1999;65(23):2439-51.

119. Liu JL, Murakami H, Zucker IH. Effects of NO on baroreflex control of heart rate and renal nerve activity in conscious rabbits. Am J Physiol 1996; 270: R1361–R1370.

120. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method Methods 2001;25(4):402-8.

121. Loesch A, Belai A, Burnstock G.An ultrastructural study of NADPH-diaphorase and nitric oxide synthase in the perivascular nerves and vascular endothelium of the rat basilar artery. J Neurocytol 1994;23(1):49-59.

122. Lu D, Raizada MK. Delivery of angiotensin II type 1 receptor antisense inhibits angiotensin action in neurons from hypertensive rat brain. Proc Natl Acad Sci U S A 1995; 92: 2914-2918.

123. Luft FC, Demmert G Rohmeiss P, Unger T. Baroreceptor reflex effect on sympathetic nerve activity in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. J Auton Nerv Syst 1980; 17: 199–209.

124. Magdesian MH, Nery AA, Martins AH, Juliano MA, Juliano L, Ulrich H, et al. Peptide blockers of the inhibition of neuronal nicotinic acetylcholine receptors by amyloid beta. J Biol Chem 2005;280(35):31085-90.

125. Margolius HS. Theodore Cooper Memorial Lecture. Kallikreins and kinins. Some unanswered questions about system characteristics and roles in human disease. Hypertension 1995; 26(2):221-9.

126. Martens S, Kozlov MM, McMahon HT How synaptotagmin promotes membrane fusion. Science 2007;316(5828):1205-8.

127. Martins AH, Resende RR, Majumder P, Faria M, Casarini DE, Tárnok A, Colli W, Pesquero JB, Ulrich H. Neuronal differentiation of P19 embryonal carcinoma cells modulates kinin B2 receptor gene expression and function. J Biol Chem 2005; 280:19576-19586.

128. Mathis SA, Criscimagna NL, Leeb-Lundberg LM. B1 and B2 kinin receptors mediate distinct patterns of intracellular Ca2+ signaling in single cultured vascular smooth muscle cells. Mol Pharmacol 1996;50(1):128-39.

129. Matsukawa T, Gotoh E, Hasegawa O, Shionoiri H, Tochikubo O, Ishii M. Reduced baroreflex changes in muscle sympathetic nerve activity during blood pressure elevation in essential hypertension. J Hypertens 1991;9(6):537-42.

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

130. Matsumura K, Averill DB, Ferrario CM. Angiotensin II acts at AT_1 receptors in the nucleus of the solitary tract to attenuate the baroreceptor reflex. Am J Physiol 1998; 275: R1611–R161.

131. McPherson PS, Czernik AJ, Chilcote TJ, Onofri F, Benfenati F, Greengard P, Schlessinger J, De Camilli P. Interaction of Grb2 via its Src homology 3 domains with synaptic proteins including synapsin I. Proc Natl Acad Sci U S A 1994;91(14):6486-90.

132. Meffert MK, Premack BA, Schulman H.Nitric oxide stimulates Ca(2+)-independent synaptic vesicle release. Neuron 1994;12(6):1235-44.

133. Menin L, Perchuć A, Favreau P, Perret F, Michalet S, Schöni R, Wilmer M, Stöcklin R. High throughput screening of bradykinin-potentiating peptides in Bothrops moojeni snake venom using precursor ion mass spectrometry. Toxicon 2008; 51: 1288-1302.

134. Michelini LC. Regulação neuro-humoral da pressão arterial. In: Ayres MM. Fisiologia. Rio de Janeiro: Ghuanabar Kogan; 1999 473-488.

135. Minami K, Uezono Y. Gq protein-coupled receptors as targets for anesthetics. Curr Pharm Des 2006;12(15):1931-7.

136. Miyajima E, Yamada Y, Matsukawa T, Tochikubo O, Ishii M, Kaneko Y. Neurogenic abnormalities in young borderline hypertensives. Clin Exp Hypertens A 1988;10(1):209-23.

137. Montague PR, Gancayco CD, Winn MJ, Marchase RB, Friedlander MJ. Role of NO production in NMDA receptor-mediated neurotransmitter release in cerebral cortex. Science 1994;263(5149):973-7.

138. Moreau ME, Garbacki N, Molinaro G, Brown NJ, Marceau F, Adam A. The kallikrein-kinin system: current and future pharmacological targets. J Pharmacol Sci 2005; 99(1):6-38.

139. Mueller S, Paegelow I, Reissmann S. Hypothesized and found mechanismsfor potentiation of bradykinin actions. Signal Transduct 2006;6:5–18.

140. Murakami H, Liu JL, Yoneyama H, Nishida Y, Okada K, Kosaka H, Morita H, Zucker IH. Blockade of neuronal nitric oxide synthase alters the baroreflex control of heart rate in the rabbit. Am J Physiol 1998; 274: R181–R186.

141. Murayama N, Hayashi MA, Ohi H, Ferreira LA, Hermann VV, Saito H, Fujita Y, Higuchi S, Fernandes BL, Yamane T, de Camargo AC. Cloning and sequence analysis of a Bothrops jararaca cDNA encoding a precursor of seven bradykinin-potentiating peptides and a C-type natriuretic peptide. Proc Natl Acad Sci U S A 1997;94(4):1189-93.

142. Murphy ME, Brayden JE. Nitric oxide hyperpolarizes rabbit mesenteric arteries via ATP-sensitive potassium channels. J Physiol 1995;486 (Pt 1):47-58.

143. Nakaki T, Hishikawa K. [The arginine paradox] Nippon Yakurigaku Zasshi 2002;119(1):7-14.

144. Nakamura H, Saheki T, Ichiki H, Nakata K, Nakagawa S. Immunocytochemical localization of argininosuccinate synthetase in the rat brain. J Comp Neurol 1991;312(4):652-79.

145. Neer EJ, Clapham DE. Roles of G protein subunits in transmembrane signalling. Nature 1988;333(6169):129-34

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

146. Ng KKF, Vane JR. Conversion of Angiotensin I to Angiotensin II. Nature 1967; 216: 762-6.

147. Nicholson G.M. and Graudins A. Spiders of medical importance in the Asia-Pacific: atracotoxin, latrotoxin and related spider neurotoxins. Clin Exp Pharmacol Physiol 2002;29:785-794.

148. Ohta H, Talman W: Release of glutamate in the nucleus tractus solitarii in response to barorefelex activation in rats. Neuroscience 1996; 74: 29-37.

149. Ondetti MA, Cushman DW. Angiotensin-converting enzyme inhibitors: biochemical properties and biological actions. CRC Crit Rev Biochem 1984;16: 381-411.

150. Ondetti MA, Rubin B, Cushman DW. Design of specific inhibitors of angiotensin-converting enzyme: new class of orally active antihypertensive agents. Science 1977;196(4288):441-4.

151. Ondetti MA, Williams NJ, Sabo EF, Pluscec J, Weaver ER, Kocy O. Angiotensin-converting enzyme inhibitors from the venom of *Bothrops jararaca*. Isolation, elucidation of structure, and synthesis. Biochemistry 1971;10:4033–9.

152. Onofri F, Giovedi S, Kao HT, Valtorta F, Bongiorno Borbone L, De Camilli P, Greengard P, Benfenati F. Specificity of the binding of synapsin I to Src homology 3 domains. J Biol Chem 2000;275(38):29857-67.

153. Onofri F, Messa M, Matafora V, Bonanno G, Corradi A, Bachi A, Valtorta F, Benfenati F. Synapsin phosphorylation by SRC tyrosine kinase enhances SRC activity in synaptic vesicles. J Biol Chem 2007;282(21):15754-67.

154. Padley JR, Overstreet DH, Pilowsky PM, Goodchild AK. Impaired cardiac and sympathetic autonomic control in rats differing in acetylcholine receptor sensitivity. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2005;289(5):H1985-92.

155. Parati G, DiRienzo M, Mancia G. How to measure baroreflex sensitivity: from the cardiovascular laboratory to daily life. J Hypertension 2000; 18: 7-19.

156. Patel KP, Li YF, Hirooka Y. Role of nitric oxide in central sympathetic outflow. Exp Biol Med (Maywood) 2001;226(9):814-24.

157. Paxinos G., Watson C.The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. New York: Academic Press, 1982. 2ª Ed

158. Petrović V, Korać A, Buzadzić B, Vasilijević A, Janković A, Mićunović K, Korać B.Nitric oxide regulates mitochondrial re-modelling in interscapular brown adipose tissue: ultrastructural and morphometric-stereologic studies. J Microsc 2008;232(3):542-8.

159. Pierce KL, Premont RT, Lefkowitz RJ. Seven-transmembrane receptors. Nat Rev Mol Cell Biol 2002;3(9):639-50.

160. Pieribone VA , Shupliakov O, Brodin L, Hilfiker-Rothenfluh S, Czernik AJ, Greengard P. Distinct pools of synaptic vesicles in neurotransmitter release. Nature 1995;375(6531):493-7.

161. Pilowsky PM, Goodchild AK. Baroreceptor reflex pathways and neurotransmitters: 10 years on. J Hypertens 2002;20(9):1675-88.

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

162. Pontieri V, Venezuela MK, Scavone C, Michelini LC. Role of endogenous nitric oxide in the nucleus tractus solitarii on baroreflex control of heart rate in spontaneously hypertensive rats. J Hypertens 1998; 16: 1993–1999.

163. Puro DG, Agardh E. Insulin-mediated regulation of neuronal maturation. Science 1984;225(4667):1170-2.

164. Putney JW Jr. "Kissin' cousins": intimate plasma membrane-ER interactions underlie capacitative calcium entry. Cell 1999;99(1):5-8.

165. Quadri R, Papotti GM, La Grotta A, Maule S, Zanone M, Valentini M, Fonzo D, Chiandussi L. ACE inhibitors and vagal activity: the effect of captopril and lisinopril on cardiovascular reflexes. Ann Ital Med Int 1992;7(3):148-52.

166. Raizada MK, Lu D, Sumners C. AT1 receptors and angiotensin actions in the brain and neuronal cultures of normotensive and hypertensive rats. Adv Exp Med Biol 1995; 377: 331-348.

167. Raizada MK. Localization of insulin-like immunoreactivity in the neurons from primary cultures of rat brain. Exp Cell Res 1983;143(2):351-7.

168. Resende RR, Alves AS, Britto LR, Ulrich H. Role of acetylcholine receptors in proliferation and differentiation of P19 embryonal carcinoma cells. Exp Cell Res 2008; 314 1429-1443.

169. Rezgaoui M, Süsens U, Ignatov A, Gelderblom M, Glassmeier G, Franke I, Urny J, Imai Y, Takahashi R, Schaller HC. The neuropeptide head activator is a high-affinity ligand for the orphan G-protein-coupled receptor GPR37. J Cell Sci 2006; 119: 542-549. Erratum in: J Cell Sci. 119, 970.

170. Ribeiro SA, Corrado AP, Graeff FG. Antinociceptive action of intraventricular bradykinin. Neuropharmacology 1971;10(6):725-31.

171. Röhl C, Armbrust E, Kolbe K, Lucius R, Maser E, Venz S, Gülden M. Activated microglia modulate astroglial enzymes involved in oxidative and inflammatory stress and increase the resistance of astrocytes to oxidative stress in vitro. Glia. 2008;56(10):1114-26

172. Rondon MU, Laterza MC, de Matos LD, Trombetta IC, Braga AM, Roveda F, Alves MJ, Krieger EM, Negrão CE.Abnormal muscle metaboreflex control of sympathetic activity in never-treated hypertensive subjects. Am J Hypertens 2006;19(9):951-7.

173. Rousseau A, Michaud A, Chauvet MT, Lenfant M, Corvol P. The haemoregulatory peptide N-acetyl-Ser-Asp-Lys-Pro is a natural and specific substrate of the N-terminal active site of human angiotesin-converting enzyme. J Biol Chem 1995; 270: 3656–3661.

174. Sakuma I, Togashi H, Yoshioka M, Saito H, Yanagida M, Tamura M, Kobayashi T, Yasuda H, Gross SS, Levi R. *N*G-Methyl-L-arginine, an inhibitor of L-arginine– derived nitric oxide synthesis, stimulates renal sympathetic nerve activity in vivo: a role for nitric oxide in the central regulation of sympathetic tone? Circ Res 1992;70:607– 611.

175. Santos CM, Pontieri V, Leomil Neto M, Michelini LC. Losartan improves baroreflex control of heart rate of coarcted hypertensive rats. Am J Physiol 1995;269(3 Pt 2):H812-8.

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

176. Scarborough RM, Naughton MA, Teng W, Rose JW, Phillips DR, Nannizzi L, Arfsten A, Campbell AM, Charo IF. Design of potent and specific integrin antagonists. Peptide antagonists with high specificity for glycoprotein IIb-IIIa. J Biol Chem 1993; 268: 1066-1073.

177. Schiffrin EL. Vascular smooth muscle growth and extracellular matrix deposition: is there a role for the sympathetic nervous system? J Hypertension 2002; 20: 179-81.

178. Schlaich MP, Lambert E, Kaye DM, Krozowski Z, Campbell DJ, Lambert G, Hastings J, Aggarwal A, Esler MD. Sympathetic augmentation in hypertension: role of nerve firing, norepinephrine reuptake, and Angiotensin neuromodulation. Hypertension 2004 ;43(2):169-75.

179. Schmidt HH, Pollock JS, Nakane M, Gorsky LD, Forstermann U, Murad F. Purification of a soluble isoform of guanylyl cyclase-activating-factor synthase. Proc Natl Acad Sci U S A 1991;88(2):365-9.

180. Sears CE, Ashley EA, Casadei B. Nitric oxide control of cardiac function: is neuronal nitric oxide synthase a key component? Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 2004;359(1446):1021-44.

181. Sevre K, Lefrandt JD, Nordby G, Os I, Mulder M, Gans RO, Rostrup M, Smit AJ. Autonomic function in hypertensive and normotensive subjects: the importance of gender. Hypertension 2001;37(6):1351-6.

182. Shen LJ, Beloussow K, Shen WC. Accessibility of endothelial and inducible nitric oxide synthase to the intracellular citrulline-arginine regeneration pathway. Biochem Pharmacol 2005;69(1):97-104.

183. Silva CA, Portaro FC, Fernandes BL, Ianzer DA, Guerreiro JR, Gomes CL, Konno K, Serrano SM, Nascimento N, Camargo AC. Tissue distribution in mice of BPP 10c, a potent proline-rich anti-hypertensive peptide of Bothrops jararaca. Toxicon 2008; 51: 515-523.

184. Simaan M, Bédard-Goulet S, Fessart D, Gratton JP, Laporte SA. Dissociation of beta-arrestin from internalized bradykinin B2 receptor is necessary for receptor recycling and resensitization. Cell Signal 2005; 17: 1074-1083.

185. Simonds WF, Goldsmith PK, Codina J, Unson CG, Spiegel AM. Gi2 mediates alpha 2-adrenergic inhibition of adenylyl cyclase in platelet membranes: in situ identification with G alpha C-terminal antibodies. Proc Natl Acad Sci U S A 1989; 86: 7809–7813.

186. Smith PA, Graham LN, Mackintosh AF, Stoker JB, Mary DA. Relationship between central sympathetic activity and stages of human hypertension. Am J Hypertens 2004;17(3):217-22.

187. Sociedade Brasileira de Hipertensão Arterial [homepage]. São Paulo: São Paulo, 2008. [citado em 29/Nov/2008]. Dísponível em http://www.sbh.org.br.

188. Solomonson LP, Flam B R, Pendleton LC, Goodwin BL, Eichler DC. The caveolar nitric oxide synthase/arginine regeneration system for NO production in endothelial cells. J Exp Biol 2003; 206: 2083-2087.

189. Strock J, Diversé-Pierluissi MA. Ca2+ channels as integrators of G protein-mediated signaling in neurons. Mol Pharmacol 2004; 66: 1071-1076.

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

190. Szabo B, Fritz T, Wedzony K. Effects of imidazoline antihypertensive drugs on sympathetic tone and noradrenaline release in the prefrontal cortex. Br J Pharmacol , 2001; 295-304.

191. Takeda K, Okajima H, Hayashi J, Kawasaki S, Oguro M, Nakamura Y, Inoue A, Sasaki S, Nakagawa M, Ijichi H.Central effect of captopril on baroreflex. Clin Exp Hypertens A 1987;9(2-3):329-35.

192. Takei N, Tsukui H, Hatanaka H. Intracellular storage and evoked release of acetylcholine from postnatal rat basal forebrain cholinergic neurons in culture with nerve growth factor. J Neurochem 1989 ;53(5):1405-10.

193. Tarpey MM, Fridovich I. Methods of detection of vascular reactive species: nitric oxide, superoxide, hydrogen peroxide, and peroxynitrite. Circ Res 2001;89(3):224-36.

194. Tateyama M, Kubo Y. Dual signaling is differentially activated by different active states of the metabotropic glutamate receptor 1alpha. Proc Natl Acad Sci U S A 2006;103: 1124-1128.

195. Thastrup O, Dawson AP, Scharff O, Foder B, Cullen PJ, Drobak BK, Bjerrum PJ, Christensen SB, Hanley MR. Thapsigargin, a novel molecular probe for studying intracellular calcium release and storage. Agents Actions 1989; 27: 17-23.

196. Tiwari MM, Prather PL, Mayeux PR. Mechanism of bradykinin-induced Ca2+ mobilization in murine proximal tubule epithelial cells. J Pharmacol Exp Ther 2005; 313: 798-805.

197. Torri Tarelli F, Bossi M, Fesce R, Greengard P, Valtorta F. Synapsin I partially dissociates from synaptic vesicles during exocytosis induced by electrical stimulation. Neuron 1992;9(6):1143-53.

198. Turner AJ, Hooper NM.The angiotensin-converting enzyme gene family: genomics and pharmacology. Trends Pharmacol 2003; 23 (4): 177–183.

199. Turner KM, Burgoyne RD, Morgan A. Protein phosphorylation and the regulation of synaptic membrane traffic. Trends Neurosci 1999;22(10):459-64.

200. Ulrich H, Tárnok A, Schaller HC. Head-activator induced mitosis of NH15-CA2 cells requires calcium influx and hyperpolarization. J Physiol Paris 1996;90: 85-94.

201. Umans JG, Levi R. Nitric oxide in the regulation of blood flow and arterial pressure. Annu Rev Physiol 1995;57:771-90. Review.

202. Van Benthum WAJ, Schalk J. Food products comprising hydrolysed milk solids with improved taste.WO2006/084573. 2006/01/24.

203. Van der Burg-Koorevaar MCD, Draaisma RB, Schalk J.Hydrolysed casein product comprising tripeptides IPP and/ or VPP. WO2004/098309. 2004/11/18.

204. van Zwieten P. Pharmacology of centrally acting hypotensive drugs. Br J Clin Pharmacol 1980; 13S-20S.

205. Vane JR. The history of inhibitors of angiotensin converting enzyme. J Physiol Pharmacol 1999; 50: 489-498.

206. Vincent SR, Kimura H. Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. Neuroscience 1992;46:755–784.

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

207. Wang J, Shen FM, Zhang XF, Wang MW, Su DF.Functional arterial baroreflex attenuates the effects of antihypertensive drugs in conscious rats. J Pharmacol Sci 2006;100(4):271-7.

208. Wei L, Alhenc-Gelas F, Corvol P, Clauser E. The two homologous domains of human angiotensin I-converting enzyme are both catalytically active. J Biol Chem 1991; 266 (14): 9002–9008.

209. Wiencke AK, Nilsson H, Nielsen PJ, Nyborg NC. Nonadrenergic noncholinergic vasodilation in bovine ciliary artery involves CGRP and neurogenic nitric oxide. Invest Ophthalmol Vis Sci 1994;35(8):3268-77

210. Xie LE, Gross SS. Argininosuccinate synthetase overexpression in vascular smooth muscle cells potentiates immunostimulant-induced NO production. J. Biol. Chem 1997; 272: 16624-16630.

211. Ye S, Nosrati S, Campese VM.Nitric oxide (NO) modulates the neurogenic control of blood pressure in rats with chronic renal failure (CRF).J Clin Invest 1997;99(3):540-8.

212. Zhang G, Teggatz EG, Zhang AY, Koeberl MJ, Yi F, Chen L, Li PL. Cyclic ADP ribose-mediated Ca2+ signaling in mediating endothelial nitric oxide production in bovine coronary arteries. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2006; 290(3):H1172-81.

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

8. ANEXOS

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

Anexo A - Súmula Curricular

DADOS PESSOAIS

Nome: Claudiana Lameu

Local e data de nascimento: São Paulo – 05/10/1979

EDUCAÇÃO

- Fundação Instituto Tecnológico de Osasco – Osasco – 1998

Ênfase em Ciências Biológicas

- Universidade de São Paulo – São Paulo – 2004

Graduação em Farmácia e Bioquímica

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

- Gestão de Projetos segundo o PMBOK. Project Management Institute, Brasil – 2009.
- Como otimizar a Expressão de Proteínas Recombinantes em *E. coli*. MERCK S.A. São Paulo, Brasil
- - Treinamento sobre o equipamento FlexStation 3. Molecular Devices Corporation, Califórnia, U.S.A. – 2007.
- Extensão universitária em Bioquímica dos Venenos Animais – Universidade de São Paulo, Brasil – 2006
- Propriedade Intelectual e Desenvolvimento Farmacêutico. Agência de Gestão da Inovação Farmacêutica, AGIF, Brasil – 2006
- Boas Práticas de Laboratório - BPL. SGB Consultoria Química Ltda, SGB, Brasil – 2005
- Inovação Farmacêutica e Propriedade Intelectual. Agência de Gestão da Inovação Farmacêutica, AGIF, Brasil – 2004
- Extensão universitária em Biologia Molecular no Estudo de Toxinas. Instituto Butantan, IBU, Brasil – 2001
- Atualização em Legislação Farmacêutica. Universidade de São Paulo, USP, Brasil - 2000

OCUPAÇÃO

Bolsista de Doutorado. Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP. 2004-2009.

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

PUBLICAÇÕES

- Artigos

1. **Lameu C**, Guerreiro JR, Oliveira EF, Morais KLP, Hayashi MAF, Camargo ACM and. Ulrich AH. Mechanism of induction of calcium signaling by a proline-rich oligopeptide from the pit viper Bothrops jararaca (*em preparação*)

2. Fernanda D. Nojimoto, Renata D. Piffer, Luiz Ricardo Kiguti, **Claudiana Lameu**, Antônio C.M. de Camargo, Oduvaldo C. M. Pereira & André S. Pupo. Multiple Effects of Sibutramine on Vas Deferens and Seminal Vesicle Contractility and its Relationship with Abnormal Ejaculation: Molecular Mechanisms of Action. British Journal of Pharmacology 2009 (*submetido*)

3. **Lameu C**, Camargo ACM, Faria M. L-arginine signalling potential in the brain: the peripheric gets central. Recent Patents on CNS Drug Discovery (*in press*).

4. Guerreiro JR, **Lameu C**, Oliveira EF, Linares E, Augusto O, Lebrun I, Serrano SMT, Camargo ACM. Argininosuccninate synthase (AsS) is a novel target for a snake venom anti-hypertensive oligopeptide. J Biol Chem (*aceito*)

5. Nery AA, Trujillo CA, **Lameu C**, Konno K, Oliveira V, Camargo AC, Ulrich H, Hayashi MA.A novel physiological property of snake bradykinin-potentiating peptides-reversion of MK-801 inhibition of nicotinic acetylcholine receptors. Peptides 2008;29(10):1708-15.

6. **Gomes CL**, Konno K, Conceicao IM, Ianzer D, Yamanouye N, Prezoto BC, Assakura MT, Radis-Baptista G, Yamane T, Santos RA, de Camargo AC, Hayashi MA. Identification of novel bradykinin-potentiating peptides (BPPs) in the venom gland of a rattlesnake allowed the evaluation of the structure-function relationship of BPPs. Biochem Pharmacol 2007;74(9):1350-60.

7. Silva CA, Portaro FC, Fernandes BL, Ianzer DA, Guerreiro JR, **Gomes CL**, Konno K, Serrano SM, Nascimento N, Camargo AC. Tissue distribution in mice of BPP 10c, a potent proline-rich anti-hypertensive peptide of Bothrops jararaca. Toxicon 2008;51(4):515-23.

- Patentes

- Camargo ACM, Guerreiro J, Silva CA, Ianzer D, **Lameu C**, Melo R, Augusto O, Hayashi M, Serrano SM. Peptídeo rico em prolina,composição farmacêutica, uso de um ou mais peptídeos. 2006. Patent application number PI 0600331-1(Brazil).

- Silva CA, Camargo ACM, Ianzer D, Guerreiro J, **Lameu C**, Hayashi M. Proline-rich peptides, pharmaceutical composition, use of one or more peptides and methods of treatment. Patent application Number PCT/BR2007/000003.

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

- Congressos, Simpósios e Reuniões

- Benedetti G, Morais KLP, Oliveira EF, Clissa PB, Guerreiro JR, **Lameu C**. Evaluation of the PRO-10c (proline-rich oligopeptide-10c) effects on the endothelial parameters involved in the physiopathology of the preeclampsia. 2008 X Reunião Científica Annual do Instituto Butantan

- **Lameu C**, Guerreiro JR, Oliveira EF, Morais KLP, Hayashi MAF, Campos RR, Camargo ACM, Ulrich H. Discovery of a novel mechanism for anti-hypertensive actions of the proline-rich peptide (BPP-10c). 2008 X Reunião Científica Annual do Instituto Butantan

- Morais KLP, Benedetti G, Oliveira EF, **Lameu C**, Guerreiro JR. Effects of proline-rich oligopeptides (PROs) in Bothrops jararaca venom on argininosuccinate synthetase. 2008 X Reunião Científica Annual do Instituto Butantan

Nery AA, Trujillo CA, **Lameu C**, Konno K, Camargo ACM, Ulrich H, Hayashi MA. A Novel Physiological Property of the snake bradykinin-potentiating peptides on nicotinic acetylcholine receptors through binding to the cocaine allosteric site. 2008 IX São Paulo Research Conferences.

- Oliveira EF, Guerreiro JR, **Gomes CL**, Fernandes BL, Camargo ACM, Silva CA. Identification of the molecular targets of bradykinin potentiating peptide 10c in the central nervous system. 2007 IX Reunião Científica Annual do Instituto Butantan.

- **Lameu C**, Konno K, Conceição IM, Ianzer D, Yamanouye N, Prezoto BC, Assakura MT, Rádis-Baptista G, Yamane T, Santos RA, Camargo ACM, Hayashi MAF. Identification of Novel Bradykinin-potentiating peptides (BPPs) in the venom gland od a rattlesnake allowed the evaluation of the structure function relationship of BPPs. 2008 VII Internacional Sympsium Vasoactive peptides

- Nery AA, Trujillo CA, **Lameu C**, Martins AHB, Konno K, Camargo ACM, Ulrich H, Hayashi MAF. A Novel Physiological Property of the snake bradykinin-potentiating peptides as allosteric protectors of nicotinic acetylcholine receptor activity. 2006 XXXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

- Guerreiro, JR, **Gomes CL**, Ianzer D, Linares E, Silva CA, Augusto O, Serrano SMT, Camargo ACM. Proline-rich oligopeptides exert blood pressure down regulation independently on angiotensin and bradykinin. 2006 XXXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq

- **Lameu C**, Konno K, Rádis-Baptista G, Netto SL, Yamanouye N, Conceição IM, Yamane T, Camargo ACM, Hayashi MAF. Identification of BPPs in BPP precursor from Crotalinae snakes and structural requirements for the biological activity. 2005 VI Reunião Científica Annual do Instituto Butantan

- Hayashi MAF, **Lameu C**, Prezoto BC, Pires RS, Britto LRG, Dive V, Camargo ACM. Molecular biology and distribution of highly specific natural inhibitors of the angiotensin-converting enzyme . 2003 I São Paulo Research Conference

- Queiroz GP, **Lameu C**, Rádis-Baptista G, Assakura MT, Costa EC, Yamane T, Camargo ACM, Hayashi MAF. Molecular Analysis of the composition of the Bothrops jararacussu venom. 2003 V Reunião Científica Annual do Instituto Butantan

- **Lameu C**, Assakura MAT, Camargo ACM, Hayashi MAF. Non-coding RNA from Bothrops jararaca. 2003 V Reunião Científica Annual do Instituto Butantan

- **Lameu C**, Konno K, Rádis-Baptista G, Serrano SMT, Yamanouye N, Conceição IM, Yamane T, Camargo ACM, Hayashi MAF. BPPs precursor from the venom of Crotalus durissus terrificus. 2003 V Reunião Científica Annual do Instituto Butantan

- **Lameu C**, Rádis-Baptista G, Barbosa SR, Yamane T, Camargo ACM, Hayashi MAF. Bradykinin-Potentiating Peptides Precursor from Crotalus durissus terrificus. 2002 VII Simpósio da Sociedade Brasileira de Toxinologia

- Lameu C, Murbach AF, Portaro FC, Hayashi MAF, Camargo ACM. Expressão da proteína precursora dos peptídeos potenciadores da bradicinina (BPPs) recombinante. 2001 Reunião Científica do Instituto Butantan

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

PREMIAÇÕES

- Premiação da IX São Paulo Research Conference - 2008. Poster intitulado: **"A novel physiological property of the snake bradykini-potentiating peptides on nicotinic acetylcholine receptors through binding to the cocaine allosteric site"**,

- Prêmio Santander de Ciência e Inovação, na categoria Biotecnologia – 2007. Projeto intitulado: "**Avaliação dos efeitos de peptídeos anti-hipertensivos da *Bothrops jararaca* sobre parâmetros endoteliais envolvidos na fisiopatologia da pré-eclâmpsia"**.

- Prêmio da XXXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq) – 2006. Trabalho intitulado: **"Proline-Rich oligopeptides exert Blood Pressure Down Regulation Independently on Angiotensin and Bradykinin"**.

- Menção Honrosa na Reunião Científica Anual do Instituto Butantan – 2001. Trabalho intitulado: "**Expressão da proteína precursora dos peptídeos potenciadores de bradicinina (BPPs) recombinante**".

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com