SANDRA ALVES BARRETO

**OBTENÇÃO DE PEPTÍDEOS VASOATIVOS
A PARTIR DO PLASMA DE SERPENTES BRASILEIRAS**
(Bothrops jararaca e Crotalus durissus terrificus).

Tese apresentada ao Instituto
de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo
para obtenção do título de
Mestre em Biotecnologia.

SÃO PAULO
2006

SANDRA ALVES BARRETO

**OBTENÇÃO DE PEPTÍDEOS VASOATIVOS
A PARTIR DO PLASMA DE SERPENTES BRASILEIRAS**
(Bothrops jararaca e Crotalus durissus terrificus).

Tese apresentada ao Instituto
de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo
para obtenção do título de
Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia
Orientador: Dr. Ivo Lebrun

SÃO PAULO
2006

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Barreto, Sandra Alves

Obtenção de Peptídeos Vasoativos a partir do Plasma de Serpentes Brasileiras (*Bothrops jararaca* e *Crotalus durissus terrificus*). / Sandra Alves Barreto. – São Paulo, 2006.

Tese (Mestrado) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Departamento de Biotecnologia.

Área de concentração: Bioquímica e Biofísica.

Linha de Pesquisa: Peptídeos Vasoativos.

Versão do título para o inglês: Obtention Vasoactive Peptides from the Plasma of Brazilian Snakes (*Bothrops jararaca* e *Crotalus durissus terrificus*).

Descritores: 1. Peptídeos 2. Plasma 3. Serpentes 4. Vasoativos 5. hipertensão

ICB/SBIB

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato (a): Sandra Alves Barreto

Tese: OBTENÇÃO DE PEPTÍDEOS VASOATIVOS A PARTIR DO PLASMA DE SERPENTES BRASILEIRAS (*Bothrops jararaca* e *Crotalus durissus terrificus*)

Orientador: Dr. Ivo Lebrun

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Mestrado, em sessão pública realizada a/...../.....considerou

()Aprovado(a)

()Reprovado(a)

Examinador(a) Assinatura.....
Nome.....
Instituição.....

Examinador(a) Assinatura.....
Nome.....
Instituição.....

Examinador(a) Assinatura.....
Nome.....
Instituição.....

Examinador(a) Assinatura.....
Nome.....
Instituição.....

Examinador(a) Assinatura.....
Nome.....
Instituição.....

A Deus e a Nossa Senhora,
simplesmente por tudo.

Aos meus pais, Sabino e Silene
A minha irmã Silvia
Ao meu namorado Cleiton
A todos os meus amigos e
pessoas que formaram os alicerces da minha vida...

Crotalus durissus terrificus
www.bioterium.com.br

Agradecimento especial

Ao Dr. Ivo Lebrun pela orientação,
pelo exemplo de cada dia, pela amizade
e convivência, que contribuíram imensamente
para meu crescimento pessoal e profissional.

AGRADECIMENTOS:

- ✓ Ao Dr. Ivo Lebrun, pela paciência de ensinar e acreditar em meu potencial e pelo exemplo de dedicação e amor a pesquisa.
- ✓ Ao Dr. Benedito Carlos Prezoto (Bene) do Laboratório de Farmacologia, pela paciência e dedicação a me ensinar os bioensaios.
- ✓ À Dra. Luziane Chaguri, além da amizade, a enorme paciência nos Bioensaios.
- ✓ À Dra. Elen A. Perpetuo, Patrícia Amorim e o Dr. Carlos Alberto pela a amizade e colaboração nos experimentos.
- ✓ À Patrícia e Valdeli, pela colaboração em todos experimentos e pela a amizade conquistada.
- ✓ À Dra. Solange de Lima Netto, pela síntese dos peptídeos e pela amizade.
- ✓ Ao Dr. Katsuhiro Konno, do laboratório de Espectrometria de Massa do CAT/CEPID do Instituto Butantan, e a Dra. Ana Gisele C. Neves Ferreira do Dep. Fisiologia e Farmacodinâmica FIOCRUZ - RJ pelas análises de seqüenciamento.
- ✓ À todos os colegas do Laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan que aqui fiz e que sempre me fizeram sentir em casa, Janaina, Claine, Paola, Fernanda, Isabel, Simone, Linda, Agostinho, Marcio, Marilza, Kimie, Eliane, Ariana, João Grandão, Seu Manoel, Dona Alice e outros...
- ✓ À todos que contribuíram ao desenvolvimento deste aperfeiçoamento.

- ✓ Ao Instituto Butantan pela a oportunidade concedida e pelos investimentos nas estruturas laboratoriais.

AOS ANIMAIS DE LABORATÓRIO QUE CONTRIBUEM SIGNIFICAMENTE PARA O
DESENVOLVIMENTO DA CIÊNCIA.

ESTE TRABALHO FOI DESENVOLVIDO NO LABORATÓRIO DE BIOQUÍMICA E
BIOFÍSICA DO INSTITUTO BUTANTAN COM O APOIO FINANCEIRO DA FAPESP,
PROCESSO N° 03\09312-3

INDICE

ABREVIATURAS

SÍMBOLO DOS AMINOÁCIDOS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	1
1.2. Determinação de bradicininogênio "IN VITRO"	3
1.3. Classificação dos Receptores	5
1.4. Endotélio vascular e o controle da pressão arterial	6
1.5. Peptídeos Potenciadores de Bradicinina (BPP _s)	9
1.6. Peptidases envolvidas com o SCC	10
1.7. Enzima conversora de endotelina (ECE-I)	10
1.8. Enzima conversora da angiotensina I (ECA)	11
1.9. Captopril	14
1.10. Neprilisina (NEP)	15
1.11. Efeitos da bradicinina	18
2. OBJETIVOS	23
3. MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1. Animais	24
3.2. Métodos Bioquímicos	24
3.2.1. Coleta do Plasma	24
3.2.2. Determinação de bradicininogênio a partir do Plasma das Serpentes	25
3.2.3. Método de Diniz e Carvalho (1963)	25
3.2.4. Método de Uchida e Katori (1977)	26
3.2.5. Dosagem de Proteínas (Método de Bradford)	26
3.2.6. Purificação em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	26

3.2.7. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida	27
3.2.8. Espectrometria de Massa	28
3.2.9. Síntese de peptídeos	28
3.3. Ensaios Biológicos	28
3.3.1. Pressão Arterial Média em serpentes anestesiadas.....	28
3.3.2. Pressão Arterial Média (P.A.M) em ratos anestesiados.....	29
3.3.3. Pressão Arterial Média em ratos SHR não anestesiados (crônicos).....	29
3.3.4. Ensaio em musculatura lisa isolada (íleo de Cobaia).....	30
4. RESULTADOS.....	32
4.1. Determinação de Proteína Totais	32
4.2. Bioensaio de Pressão Arterial Média (P.A.M.) de Ratos Anestesiados normotensos, utilizando o método de D&C	33
4.2.1. Plasma da SBJ	33
4.2.2. Plasma da SCDT.....	35
4.3. Bioensaio de Pressão Arterial Média de Ratos Anestesiados normotensos, utilizando o método U&K.....	38
4.3.1. Plasma SBJ	38
4.3.2. Plasma da SCDT	40
4.4. Comparação do efeito dos Plasmas SBJ e SCDT pelos métodos de determinação de bradicinogênio D&C e U&K	42
4.4.1. Metodologia de Análise de Resultados da TABELA 3.....	44
4.5. (P.A. M.) em ratos SHR não anestesiados (crônicos)	44
4.5.1. Metodologia de Análise de Resultados da TABELA 4.....	49
4.6. Ensaio de Musculatura Lisa (Íleo Isolado de Cobaia).....	50
4.6.1. Ensaio Biológico em Íleo Isolado de Cobaia Curva Dose Efeito da Bradicina (BK).....	50

4.7. Ensaio de íleo isolado de cobaia utilizando o plasma da sBj nas metodologias de determinação de bradicininogênio D&C e U&K	51
4.7.1. Estudo da potenciação dos efeitos da bradicinina (BK) pelo plasma da SBJ tratado pelo método de D&C.....	51
4.7.2. Metodologia de Análise de Resultados da Tabela 7.....	54
4.7.3. Estudo da potenciação dos efeitos da bradicinina (BK) pelo plasma da SBJ tratado pelo método de U&K.....	55
4.7.4. Metodologia de Análise de Resultados da Tabela 10.....	58
4.8. Ensaio de íleo isolado de cobaia utilizando o plasma da serpente SCDT nas metodologias de determinação de bradicininogênio D&C e U&K	59
4.8.1. Estudo da potenciação dos efeitos da bradicinina (BK) pelo plasma da SCDT tratado pelo método de D&C.....	59
4.8.2. Metodologia de Análise de Resultados da Tabela 13	62
4.8.3. Estudo da potenciação dos efeitos da bradicinina (BK) pelo plasma da SCDT tratado pelo método de U&K.....	62
4.8.4. Metodologia de Análise de Resultados da Tabela 16	65
4.9. Análise dos resultados de potenciação do íleo isolado de cobaia.....	66
4.10. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida na presença do Plasma da SBJ tripsinizado corado com Prata.....	68
4.11. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida na presença do Plasma da SCDT tratado pelo método de D&C e corado com Prata.....	70
4.12. Comparação de eletroforese em Gel de Poliacrilamida na presença dos Plasmas das SBJ e SCDT pelos métodos de D&C e U&K.....	72
4.13. Análise dos géis.....	73
4.14. Ensaio da Pressão Arterial Média (P.A.M) da Serpente anestesiada.....	75

4.15. Purificação em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	77
4.15.1. Primeira Etapa da Purificação do Plasma da SBJ (serpentes <i>Bothrops jararaca</i>) tratado pelo Método de D&C.....	78
4.15.2. Pressão Arterial Média da SBJ (Serpente <i>Bothrops jararaca</i>), para análise das frações da primeira etapa de purificação do plasma da SBJ.....	79
4.15.3. Purificação da Fração 9 do Plasma da SBJ (Serpente <i>Bothrops jararaca</i>).....	80
4.15.4. Pressão Arterial Média da SBJ (Serpente <i>Bothrops jararaca</i>), para análise das frações da segunda etapa da purificação da fração 9.....	81
4.15.5. Terceira etapa da Purificação com as Frações 13, 14 e 15 da SBJ.....	82
4.15.6. Análise em espectrometria de massa Q-ToF.....	84
4.15.7. Síntese de Peptídeos.....	85
4.15.8. Perfil cromatográfico da purificação do peptídeo sintético (N-A-L-L-S-D-L-M-K).....	85
4.15.9. Pressão Arterial Média na Serpentes <i>Bothrops jararaca</i> , analisando o peptídeo sintético (N-A-L-L-S-D-L-M-K).....	86
4.15.10. Análise em espectrometria de massa Q-ToF.....	87
4.16. Análise do Plasma de <i>Crotalus durissus terrificus</i>	88
4.16.1. Perfil Cromatográfico da primeira etapa da purificação do plasma da SCDT (Serpente <i>Crotalus durissus terrificus</i>) tratada pelo método de D&C.....	89
4.16.2. Ensaio da P.A.M em Serpente anestesiada.....	89
4.16.3. Perfil da pressão arterial média na SBJ testando o plasma da SCDT tratada pelo método de D&C.....	90
4.16.4. Perfil da pressão arterial média da SCDT testando o plasma da SCDT tratada pelo método de D&C (1963).....	92

4.16.5. Perfil da pressão arterial média da SCDT testando as frações da primeira purificação do plasma da SCDT tratada pelo método de D&C (1963).....	93
4.16.6. Segunda etapa da Purificação da fração 8 do plasma da serpente SCDT.....	94
4.16.7. Segunda etapa da Purificação da fração 9 do plasma da SCDT.....	95
4.16.8. Perfil da pressão arterial média da SCDT testando as frações da segunda etapa de purificação do plasma da SCDT tratada pelo método de D&C (1963).....	96
4.16.9. Perfil Cromatográfico do Pool 8 (5).....	97
4.16.10. Perfil Cromatográfico do Pool 9 (3).....	98
4.16.11. Perfil Cromatográfico do Pool 9 (4).....	98
4.16.12. Análise em espectrômetria de massa Q-TOF.....	99
5. DISCUSSÃO.....	100
6. CONCLUSÃO.....	109
7. APÊNDICE.....	110
8. REFERÊNCIAS.....	124

ABREVIATURAS

BJ: Plasma da SBJ tripsinizado.

BJV: Veneno da *Bothrops jararaca*.

BK: Bradicinina.

BKG: Bradicininogênio.

BPF: Fator Potenciador da Bradicinina.

BPP: Peptídeos Potenciadores de Bradicinina.

C. atrox: *Crotalus atrox*.

C. durissus terrificus ou *SCDT*: *Crotalus durissus terrificus*.

CDT: Plasma da SCDT tripsinizado.

CGMP: Monofosfato Cíclico de Guanosina.

CP: Cisteíno Peptídase.

Cm: centímetros.

D&C: Método de Diniz e Carvalho (1963).

ECA: Enzima Conversora da Angiotensina.

ECE-I: Enzima Conversora de Endotelina.

FXII: Fator de Hageman.

FXIIa: Fator de Hageman ativado.

HMWK: Cininogênio de alta massa molecular.

HPLC: (High Performance Liquid Chromatography) Cromatografia líquida de alto desempenho.

INOS: forma induzida de Oxido Nítrico.

i.v: intra-venoso.

Kg: kilograma

LMWK: Cininogênio de baixa massa molecular.

Lys-BK: Calidina.

Mg: miligrama

Min: Minutos.

ML: mililitro.

mmHg: milímetros de mercúrio.

NADPH: Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato-hidrogênio.

NEP: Neprilisina.

Ng: Nanogramas.

nm: nanômetros

NO: Oxido Nítrico.

NOS: Oxido Nítrico Síntase.

PAGE: (Polyacrylamide Gel Electroforesis) Eletroforese em gel de poliacrilamida.

P.A.M: Pressão Arterial Média.

PGL2: Prostaglandina 2.

PL: Plasma.

PP: Plasma de Pombo tripsinizado.

PRCP: Prolilendopeptídase.

SBJ: Serpente *Bothrops jararaca*.

SCC: Sistema Calicreína-cinina.

SCDT: Serpente *Crotalus durissus terrificus*.

SDS: (Sodium dodecyl sulphate) Dodecil sulfato de Sódio.

SHR: Ratos espontaneamente hipertensos.

SP: Serino Peptídase.

SRA: Sistema Renina Angiotensina.

T: tripsina.

TFA: (Trifluoroacetic Acid) Ácido trifluoroacético.

Test T: Teste "T" de student.

µg: micrograma.

µL: microlitro

U&K: Método de Uchida e Katori (1977).

UV: Ultra-violeta.

U.P: Unidade Potenciadora.

ABREVIATURAS DOS AMINOÁCIDOS.

Aminoácidos	3 letras	1 letra
ALANINA	Ala	A
ASPARAGINA	Asn	N
ÁCIDO ASPÁRTICO	Asp	D
ÁCIDO HIPÚRICO	Hip	
ARGININA	Arg	R
CISTEINA	Cys	C
FENILALANINA	Phe	F
GLICINA	Gly	G
GLUTAMINA	Gln	Q
ÁCIDO GLUTÂMICO	Glu	E
HISTIDINA	His	H
ISOLEUCINA	Ile	I
LEUCINA	Leu	L
LISINA	Lys	K
METIONINA	Met	M
PROLINA	Pro	P
SERINA	Ser	S
TIROSINA	Tyr	Y
TREONINA	Thr	T
TRIPTOFANO	Trp	W
VALINA	Val	V

RESUMO

A Bradicinina (BK), a mais importante das cininas plasmáticas, foi encontrada pela primeira vez em mamíferos; é um nonapeptídeo com seqüência (Arg - Pro - Pro - Gly - Phe - Ser - Pro - Phe - Arg) descrita inicialmente por Rocha e Silva em 1949. Pouco foi estudado sobre o sistema calicreína-cininas em serpentes, mas o que se sabe é que, provavelmente estes animais são deficientes do Fator XII (Fator Hageman), um ativador da pré-calicreína em mamíferos. Com o objetivo de identificar novos peptídeos, submetemos plasmas das serpentes *Bothrops jararaca* (SBJ) e da *Crotalus durissus terrificus* (SCDT), tratados por duas metodologias simplificadas de determinação de BKG (métodos D&C e U&K), a bioensaios de medida da pressão arterial média em mamíferos e em íleo isolado de cobaia. Nos plasmas das SBJ e da SCDT foi liberado uma substância com efeito semelhante ao da cinina de mamíferos que produziu hipotensão na serpente e no rato; esse efeito foi potencializado com o uso do captopril (0,05/0,010 mg/Kg), que inibe a cininase II. Diante desses resultados diferentes daqueles já descritos, fracionamos esta substância por HPLC, e obtivemos seqüências peptídicas que não apresentaram homologia com a bradicinina, mas com ação semelhante à das cininas já conhecidas ou peptídeos potenciadores da bradicinina (BPPs), que futuramente podem ser usados no estudo de novas moléculas com atividade hipotensora.

SUMMARY

The Bradykinin (BK), most important of the plasmatic kinins, was encountered for the first time in mammals; it is a nonapeptide with the structure (Arg - Pro - Pro - Gly- Phe - Ser - Pro - Phe - Arg), described first by Rocha and Silva in 1949. Little was studied in the kallikrein-kinin system in snakes, but it is known that, it is probably deficient of Factor XII (Hageman Factor), an activator of the daily prekallikrein in mammals. In order to identify new peptides, we submit plasma of the snakes *Bothrops jararaca* (SBJ) and *Crotalus durissus terrificus* (SCDT) in two simplified methodologies for BKG determination (D&C and U&K methods), to analyze in bioassays of average arterial pressure of mammals and isolated ileum of guinea pig. The study with plasma of the SBJ and the SCDT showed that the kinin of mammals released a substance with effect similar to that producing hypotension in snakes and rats; this effect was potentiated with the use of captopril (0,05/0,010 mg/Kg), wich inhibits kininase II, confirming results different from literature's obtained on this subject. With the obtained result, we fractioned this substance in HPLC equipment and obtained peptides sequences with no homologie with the bradykinin, but with similar action with the kinin already known for Bradykinin Potentiating Peptides (BPPs), that in the future can be used for the study of a new molecule with hypotensive activity.

1. INTRODUÇÃO

O Sistema calicreína-cinina (SCC) representa um importante componente na regulação das funções cardiocirculatórias, de forma que suas ações têm sido alvo de uma série de estudos envolvendo a ação de drogas que afetam o coração, os rins e o sistema vascular.

Neste contexto, as cininas vêm sendo estudadas com muita frequência nas áreas de Farmacologia e Medicina. O maior interesse está no papel que estes compostos desempenham tais como na dor, inflamação, doenças inflamatórias crônicas, sistema cardiovascular e reprodução (GOODMAN e GILMAN, 1996).

Rocha e Silva em 1949 relataram, em experiências realizadas "in vitro", que a adição do veneno da *Bothrops jararaca* ou de tripsina ao sangue desfibrinado bovino, gerava uma substância capaz de produzir a contração da musculatura lisa em intestino isolado de cobaia, em intestino isolado de coelho, em útero de rata e provocava hipotensão em cães, gatos e coelhos quando administrada por via endovenosa (ROCHA E SILVA e cols., 1949 a, b), sendo esta nova substância designada como bradicinina (brady= lento e kinesis= movimento).

Esta nova substância derivada do cininogênio produzido pelo fígado é metabolizada pela ação de enzimas denominadas calicreínas (plasmática e tecidual). As calicreínas, um grupo de serino-peptidases são encontradas em diferentes tecidos, células e fluídos biológicos (BHOOLA e cols., 1979; SCHACHTER, 1956).

A calícreína plasmática circula no sangue em sua forma pró-enzimática e é codificada por um único gene; já as calicreínas teciduais são expressas em células endoteliais, em células musculares lisas vasculares e em leucócitos, que são codificadas por vários genes.

O SCC em mamíferos envolve a ativação seqüencial de uma série de enzimas proteolíticas. A ativação do Fator XII da cascata da coagulação sangüínea (fator de Hageman) ou o Fator XI desta mesma cascata no sangue resultam na ativação das pré-caliceínas (REGOLI e BARABÉ, 1980).

A metabolização do cininogênio de alta massa molecular (HMWK) faz-se através da caliceína plasmática que libera a bradicinina (WERLE, 1960; BHOOLA e cols., 1962; MULLER-ESTERL, 1989) ou pela caliceína tecidual que atua sobre o cininogênio de baixa massa molecular (LMWK) liberando a lisil-bradicinina (LBK-calidina) na qual é rapidamente convertida em bradicinina por uma arginina-aminopeptidase, conforme mostra a Figura 1 (GUIMARÃES e cols., 1973).

Estas enzimas apresentam no centro ativo um resíduo de serina orientado de modo a participar do processo catalítico (COLMAN, 1974; SCHACHTER, 1980; KAPLAN, 1987).

A abundância de cininogênio no sangue e na parede vascular sugere que a atividade das cininogenases é o fator limitante no acúmulo de cininas nos tecidos. Por outro lado, a presença de cininogenases e cininogênio em vários compartimentos do coração sugere que neste órgão as cininas estão disponíveis para exercer efeitos biológicos importantes (MARGOLIUS e cols., 1996).

A bradicinina é um nonapeptídeo e possui a seguinte seqüência de aminoácidos: (Arg- Pro- Pro- Gly- Phe- Ser- Pro- Phe- Arg) enquanto a Calidina tem uma lisina adicional na posição N-terminal. Os dois peptídeos são clivados a partir dos precursores de cininogênio na fração α_2 - globulina.

Há cada vez mais evidências da existência dos componentes SCC nos tecidos cardíacos e vasculares, formando as vias dos sistemas caliceína-cininas local e sistêmico, vias essas que envolvem diferentes tipos de células, como células endoteliais, células do músculo liso, vascular (NAKAGAWA, 1989; CAMPBELL e cols., 1993) e

cardiomiócitos (MINSHALL e cols., 1995), podendo contribuir para a regulação do sistema cardiovascular e para os efeitos farmacológicos de compostos com atividade sobre o sistema cardiovascular.

A degradação das cininas ocorre rapidamente (cerca de 15 segundos) pela ação de um grupo de enzimas denominadas cininases. De fato, em uma simples passagem na circulação pulmonar a degradação é de 60 a 90%, principalmente pela ação das carboxipeptidases N e M (cininase I), enzima conversora da angiotensina (ECA) (cininase II) e endopeptidase 24.11 (NEP) (CONLON e cols., 1994).

1.2. DETERMINAÇÃO DE BRADICININOGÊNIO "IN VITRO"

A bradicinina pode ser produzida em ensaio "in vitro" pela incubação do plasma desnaturado com calor e pela ação da tripsina ou através da incubação com calicreínas pancreáticas de porco, usando os métodos para determinação de bradiginogênio (BKG) descritos na literatura DINIZ & CARVALHO (1963) ou UCHIDA & KATORI (1977).

O desenvolvimento de métodos simplificados de determinação de BKG em plasma foi uma etapa essencial para o estudo do SCC.

Fig 1: Representação esquemática do Sistema calicreína-cinina.

HMWK: Cininogênio de alta massa molecular, LMWK: Cininogênio de baixa massa molecular, BK: Bradicinina, Lys-BK: Calidina, F XII: Fator de Hageman, FXIIa: Fator de Hageman ativado, SP: Serino peptidases, CP: Cisteíno peptidase, PRCP: Prolilcarboxipeptidase e ECA: Enzima conversora de angiotensina

1.3. CLASSIFICAÇÃO DOS RECEPTORES

As diferentes ações biológicas das cininas são mediadas por dois tipos de receptores (B_1 e B_2), com sete domínios transmembrânicos acoplados à proteína G (REGOLI e BARABE, 1980).

O receptor B_1 não é expresso em condições fisiológicas, mas é induzido sob certas condições patológicas, tais como injúria tecidual e estresse (MARCEAU e cols., 1998). Sendo assim, atribui-se grande parte dos efeitos biológicos das cininas à ativação dos receptores B_2 , que são expressos constitutivamente e estão presentes em diferentes tipos celulares (WHORTON e cols., 1982; CLARK e cols., 1986; SCHROR, 1992).

A estimulação dos receptores B_2 localizados no endotélio vascular promove liberação de NO (BHOOLA e cols., 1992; MIURA e cols., 1999), resultando em vasodilatação facilmente observada em preparações vasculares isoladas e hipotensão após injeção intravenosa de BK e agonistas destes receptores (CAMPBELL e cols., 1993).

A transdução dos sinais intracelulares desencadeados por essa estimulação envolve a participação da fosfolipase C e fosfolipase A_2 . A ativação da fosfolipase C resulta em hidrólise de inositoltrifosfato e diacilglicerol, com elevação nas concentrações de cálcio intracelular (ADAMS e cols., 1989), ativação do complexo Ca^{+2} /Calmodulina, ativação da enzima NO sintase (NOS) e aumento da liberação de NO.

A elevação dos níveis de Ca^{+2} intracelular também induz ativação da fosfolipase A_2 , responsável pela hidrólise de fosfolipídeos de membrana e liberação de ácido araquidônico que por ação da ciclooxygenase dá origem a vários metabólitos, entre eles a PGI_2 (MARTIN e WYSOLMERSKI, 1987).

Durante alterações fisiopatológicas como trauma, lesão tecidual ou inflamação, os efeitos do receptor B_1 são bem menos caracterizados do que os mecanismos de sinalização dos receptores B_2 (GOODMAN e GILMAN, 1996).

Além disso, os receptores B_2 são ativados preferencialmente pela BK e calidina e são antagonizados especificamente através da Hoe 140 BK-(D-Arg-[Hyp³-Thr⁵-D-Tic⁷-Oic⁸]), considerando que a BK-des-Arg⁹ e calidina-des-Arg¹⁰ são agonistas seletivos de receptores B_1 , bem como BK-[Leu⁸]-des-Arg⁹ é um antagonista seletivo (REGOLI e cols., 2000).

1.4. ENDOTÉLIO VASCULAR E O CONTROLE DA PRESSÃO ARTERIAL

Os vasos sanguíneos apresentam predominantemente várias características semelhantes. Entretanto, as identificações das diferenças morfológicas e funcionais constituem as bases para a classificação dos vasos em grupos distintos, como as artérias (elásticas e musculares), arteríolas, capilares (sinusoídes, constituídos e fenestrados), vênulas e veias (grandes, pequeno e médio calibre) (BOUGHARIOS e cols., 2004).

De fato três camadas concêntricas distintas de tecidos denominadas túnicas constituem a parede dos vasos sanguíneos. A camada mais interna, túnica íntima é constituída por uma única camada de células pavimentosas (endotélio), que forma um tubo revestindo, a luz do vaso e o tecido conjuntivo subendotelial adjacente.

A túnica média, camada intermediária é constituída por várias células musculares lisas dispostas de forma concêntrica e helicoidal. Já as camadas mais externas, conhecidas como túnica adventícia, revestem a superfície externa dos vasos sendo constituída por tecido conjuntivo fibroelástico longitudinalmente (HAEFLIGER e cols., 2004; BAZZONI DEJANA, 2004).

O endotélio, além de sua função como membrana semipermeável que controla o transporte de moléculas através das paredes das artérias, vênulas e capilares, também é um tecido metabolicamente ativo por sua capacidade de sintetizar e secretar inúmeras substâncias que exercem várias funções fisiológicas (D' USCIO e cols., 2000).

- No metabolismo de substâncias vasoativas, como por exemplo, a presença da ACE convertendo Ang I em Ang II e inativando noradrenalina, serotonina e bradicinina.
- Na hemostasia, por meio da produção de substâncias coagulantes (fator Von Willebrand, inibidor de plasminogênio) e de substâncias anticoagulantes como a prostaciclina (PGI_2) e ativador de plasminogênio, além de conter antitrombina III e trombomodulina na superfície da membrana, e expressar receptores para trombina e fibrinogênio.
- Na produção de antígenos dos grupos A e B, fibronectina, proteoglicanas, interleucinas, eicosanoídes, colágenos do tipo IV, V e VIII, nidogênio e lâminina.
- Na modulação do tônus vascular, por sua capacidade de produzir e liberar fatores relaxantes da musculatura lisa dos vasos, como o NO e PGI_2 , fatores de contração do músculo liso, como as endotelinas e Ang II.

Fig 2: Reação de formação de Óxido Nítrico à partir da L-Arginina (FILHO e cols., 2000).

A Figura 2 indica a formação do NO em que a L-arginina é transformada em um intermediário, a N-hidroxi-L-arginina com a presença da nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato-hidrogênio (NADPH) e Ca^{+2} , sendo necessário mais NADPH e O_2 para formação de L-citrulina e NO (SNYDER e BREDT, 1992).

Muitas células são capazes de sintetizar NO através de hemoproteínas da família citrocromo P450-like, conhecida como NO sintases (NOS). Estas são dependentes de O_2 , NADPH, flavinas e biopetrinas para exercer sua atividade.

Estudos pioneiros de FURCHGOTT em 1984 demonstraram a ação vasoprotetora do NO em endotélio vascular, pois este antagoniza as contrações da musculatura lisa dos vasos, inibe a ativação plaquetária e atua sobre as integrinas modificando a adesividade leucocitária e a diapedese dos neutrófilos. Sendo assim, o NO sintetizado pelo endotélio vascular tem se mostrado muito importante para a regulação do tônus vascular e também no controle da pressão arterial em mamíferos (VALLANCE e cols., 1989).

Estudos posteriores em camundongos e humanos demonstraram indiretamente que as variações na concentração de NO estão relacionadas a doenças cardiovasculares, como a hipertensão (MAWJI e MARSDEN, 2003).

1.5. PEPTÍDEOS POTENCIADORES DE BRADICININA (BPP_s)

Esses potenciadores da atividade da bradicinina foram inicialmente chamados de fatores de potenciação da bradicinina (BPFs), por não saber que se tratavam de peptídeos.

Utilizando métodos cromatográficos, Ferreira e cols. (1970) fracionaram o veneno da *Bothrops jararaca* para o isolamento dos BPFs, que passaram a ser chamados de BPPs. Neste trabalho foram isolados e seqüenciados nove BPPs (II-1-A, III-1-A, IV-1-A, IV-1-B α , IV-1-B β , IV-1-D, V-1-A, V-3-A e V-3-B).

Os BPPs potencializam a ação farmacológica da bradicinina " *in vitro*" , na resposta de muitas preparações de músculos lisos, sendo o intestino de cobaia o mais sensível para ação dos BPPs (FERREIRA, 1965).

Os BPPs também possuem ações " *in vivo*" , demonstradas numa variedade de testes farmacológicos, como a pressão arterial sistêmica (FERREIRA, 1965; AMORIM e cols., 1967), dilatação dos vasos cerebrais, permeabilidade capilar no sistema nervoso central por injeção intraventricular e vasodilatação coronária (ANTONIO, 1967).

Estes peptídeos potencializam especificamente a ação da bradicinina em todos esses sistemas sem alterar os efeitos da acetilcolina e histamina e apresentam, porém, baixo efeito sobre a ação da angiotensina II e ocitocina nas preparações de músculo liso de íleo de cobaia e útero de rata, respectivamente (FERREIRA, 1965).

Os BPPs são oligopeptídeos, isolados dos venenos de serpentes que variam de 5 a 14 resíduos de aminoácidos e possuem em comum o ácido piroglutâmico na posição N-terminal e o resíduo de prolina na posição C-terminal. Muitos desses BPPs, foram purificados à partir da fração de baixa massa molecular do veneno de serpentes e seqüenciados por métodos bioquímicos (FERREIRA & ROCHA E SILVA, 1962;

FERREIRA e cols., 1970; ONDETTI e cols., 1971; CINTRA e cols., 1990; FERREIRA e cols., 1992; FERREIRA e cols., 1998).

A análise da estrutura primária de um número relativamente alto de BPPs, revelam que, além das características estruturais nas extremidades amino e carboxi-terminais, os BPPs são ricos em prolinas e a grande maioria apresenta a seqüência Ile-Pro - Pro no C-terminal. A estrutura primária desses peptídeos permite dividi-los em duas famílias: aquelas relacionadas aos peptídeos menores que 7 resíduos de aminoácidos e aquelas compostas por BPPs maiores que 7 resíduos, com alto grau de homologia entre si (FERREIRA e cols., 1998).

1.6. PEPTIDASES ENVOLVIDAS COM O SCC

Dentre as peptidases mais bem estudadas e caracterizadas estão a enzima conversora da angiotensina (**ECA**) (família M2), as termolisinas símile (família M4), endopeptidases 24.11 (**NEP**) (família M13) e a enzima conversora de endotelina (**ECE-I**) (família M13) (BARRETT e cols., 1998b).

1.7. ENZIMA CONVERSORA DE ENDOTELINA (ECE-I)

A ECE-I é uma proteína integral de membrana (tipo II), apresentando uma cauda N-terminal citoplasmática, um domínio transmembrânico hidrofóbico e um grande domínio extracelular contendo o sítio catalítico e "motif" ligante de zinco (HEALTH). Esta enzima tem sido encontrada nas células endoteliais e também em outros tecidos (BARRETT e cols., 1998e; BARNES e TURNER, 1997). A ECE-I libera endotelina-I, peptídeo vasoconstritor composto por 21 resíduos de aminoácidos que contêm duas ligações dissulfetos intramoleculares (TURNER e TANZAWA, 1997).

1.8. ENZIMA CONVERSORA DA ANGIOTENSINA I (ECA)

A enzima conversora da angiotensina I (ECA, EC 3.4.15.1), também denominada cininase II, dipeptidil carboxipeptidase I, carboxicatepsina, dipeptídeo hidrolase e peptidase P, pertence à família M2 do clã MA das metalopeptidases.

A ECA é uma zinco metalopeptidase que cliva o dipeptídeo C-terminal da angiotensina I para produzir o potente octapeptídeo vasopressor denominado angiotensina II (SKEGGS e cols., 1956) inativando a bradicinina pela remoção do C-terminal (YANG e cols., 1970).

Além desses dois principais substratos fisiológicos que estão envolvidos na regulação da pressão sanguínea e no metabolismo de sal e água (SOFFER, 1976; EHLERS e RIORDAN, 1989), a ECA cliva substratos liberando dipeptídeos C-terminais de vários oligopeptídeos com a carboxila C-terminal livre ou em sua forma amida, com restrições para ausência de um penúltimo resíduo de prolina (CHEUNG E CUSHMAN, 1973; BARRETT e cols., 1998c).

A ECA está ancorada na membrana plasmática com sua estrutura exposta para parte extracelular. Existem três isoformas da ECA: duas de massa molecular menor e a forma somática. A forma de (68 kDa) contém apenas um único sítio ativo correspondente ao domínio N-terminal da forma somática e expressa na membrana plasmática do intestino (DEDDISH e cols., 1994) e a forma de (90-110 kDa), expressa apenas na célula germinal masculina contém um sítio ativo correspondente ao domínio C-terminal da forma somática.

A forma somática (150-180 kDa) é expressa nas células epiteliais, neuroepiteliais e endoteliais (SOFFER, 1976; EHLERS E RIORDAN, 1989), sendo composta por dois domínios altamente homólogos denominados C e N. Cada domínio possui um sítio

catalítico representado pelo "motif" HEMGH (SOUBRIER e cols., 1988; BERSTEIN e cols., 1989; HUBERT e cols., 1991; KUMAR e cols., 1991).

Os possíveis resíduos de ácido glutâmico que funcionam como terceiro ligante do átomo de zinco têm sido indicados como sendo Glu389 e Glu987 para o domínio N e domínio C, respectivamente (BARRETT e cols., 1998c).

O domínio N-terminal metaboliza um hormônio-tetrapeptídeo (Ac-Ser-Asp-Lys-Pro-OH) que está envolvido na regulação negativa da hematopoiese (RIEGER e cols., 1993; ROUSSEAU e cols., 1994; AZIZI e cols., 1996; BARRETT e cols., 1998c).

Além disso, outro substrato específico para o domínio-N é a angiotensina (1-7) (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro), sendo que ao mesmo tempo este peptídeo inibe a hidrólise da angiotensina I feito pelo domínio C (DEDDISH e cols., 1998).

O domínio C-terminal tem duas funções: conversão da angiotensina I em angiotensina II e inativação da bradicinina, atividades que ocorre predominantemente no pulmão produzindo hipertensão arterial (NG e VANE, 1967/1968; RYAN e cols., 1989).

Figura 3: Mecanismo de ação da ECA: 1) Conversão da angiotensina I em angiotensina II e 2) degradação da bradicinina. *Efeitos fisiológicos no sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS) que incluem vasoconstrição, retenção de sódio, aumento dos níveis de aldosterona, aumento do crescimento celular e aumento da atividade nervosa simpática (BURNETT JR, 1999).

Além de participar na regulação da pressão sanguínea, a ECA está relacionada a outros processos fisiológicos como imunidade, reprodução e regulação de neuropeptídeos, podendo também atuar como uma endopeptidase sobre substratos contendo a extremidades C-terminal bloqueado ou como uma tripeptidil carboxipeptidase sobre determinados substratos.

A ECA necessita do ânion cloreto para catalisar a hidrólise da angiotensina I, contudo, o ânion não é essencial para a atividade catalítica da enzima sobre a bradicinina, que é hidrolisada na ausência de cloreto.

A interação com cloreto altera a conformação do sítio ativo, facilitando a ligação do substrato com a enzima. A dependência de cloreto é diferente para os dois sítios ativos da ECA.

O domínio C apresenta dependência mais marcante e, portanto, condições diferentes de Cl^- e pH podem alterar as atividades relativas dos dois sítios da ECA, bem como a determinação de substratos específicos para cada um deles (BARRETT e cols., 1998c).

1.9. CAPTOPRIL

O captopril (figura 4) é designado quimicamente como 1-[(2S)-3-mercapto-2-metilpropanil]-L-prolina. Bloqueia a ação da enzima conversora da angiotensina (ECA), com menor formação de angiotensina II, potente vasoconstrictor e estimulador da aldosterona.

Do modelo hipotético do sítio de atividade da enzima de conversão da angiotensina, usado no desenvolvimento do captopril, estabeleceu-se a base para desenvolver novos tipos de inibidores específicos desta enzima biologicamente tão importante. O captopril é um potente inibidor do efeito contrátil da angiotensina I no músculo liso "*in vitro*", muito usado no tratamento da hipertensão grave, a dose inicial utilizada em adultos é de 25mg três vezes ao dia (SILVA e cols., 1968).

Fig 4: Estrutura química do captopril.

1.10. NEPRILISINA (NEP)

A neprilisina (EC 3.4.24.11), conhecida também como NEP, encefalinase e endopeptidase 24.11 pertence à família M13 do clã MA das metalopeptidases. A NEP é uma proteína integral de membrana plasmática (tipo II), presente como uma ectoenzima com quase todo o volume da proteína incluindo o sítio ativo, voltado para o espaço extracelular (BARRETT e cols., 1998d).

Esta enzima apresenta cerca de 27 resíduos de aminoácidos da porção N-terminal no citoplasma, seguida de um domínio transmembrânico composto por 23 resíduos e o restante da molécula localizado na região extracelular (Li e HERSH, 1995). A NEP é abundante no intestino, rim e placenta e é também encontrada nas células reticulares do sistema imune. Está presente em menor concentração em muitos outros tecidos e tipos de célula, incluindo o cérebro, onde se localiza nas células neuronais (BARRETT e cols., 1998d).

A neprilisina apresenta o "motif" HEITH típico de zinco peptidases. As histidinas no "motif", His583 e His587 (numeração da sequência de aminoácidos de acordo com a NEP de coelho) constituem os dois ligantes do átomo de zinco. O terceiro ligante do átomo de zinco é o ácido glutâmico e está localizado na posição 646 do lado C-terminal da molécula (BARRETT e cols., 1998d).

A NEP é uma enzima de mamífero com especificidade para a hidrólise de substratos com resíduos de aminoácidos básicos ou hidrofóbicos na posição P' 1 da sequência peptídica (ALMENOFF e ORLOWSKI, 1984). Normalmente atua como uma endopeptidase e hidrolisa peptídeos contendo 40 resíduos de aminoácidos, contudo a eficiência de hidrólise diminui com o aumento do tamanho do peptídeo.

Os principais substratos "*in vivo*" da NEP são os hormônios natriuréticos e as endotelinas, como também a angiotensina I convertida em angiotensina (1-7), a bradicinina e a substância P (BARRETT e cols., 1998d).

Fig 5: Mecanismo de ação da NEP: 1) Conversão da angiotensina I em angiotensina (1-7); 2) degradação da bradicinina (BURNETT Jr, 1999).

A figura 6 indica os sítios de hidrólise na bradicinina, obtidos pela ação enzimática da ECA, NEP e ECE.

Figura 6: Algumas das enzimas que metabolizam a bradicinina com seus respectivos locais de clivagem na molécula (CAMPBELL, 2000).

Estas enzimas estão diretamente ligadas a vários estudos envolvendo peptídeos potenciadores da bradicinina, os Bpps, incluindo nosso trabalho que, além de pesquisar novos peptídeos vasoativos com ação semelhante à bradicinina, também busca analisar se estes peptídeos potencializam os efeitos produzidos pela bradicinina em mamíferos.

1.11. EFEITOS DA BRADICININA

Três cininas foram identificadas em mamíferos: a BK, a lisil-BK ou calidina e a metionil-lisil BK. Vale a pena salientar que os efeitos biológicos atribuídos as cininas devem estar diretamente relacionados à BK, pois até hoje pouco se sabe a respeito das outras cininas. Tais efeitos são:

- ✓ Diminuição rápida de pressão sanguínea de duração muito curta, por vasodilatação arterial, quando injetadas intravenosamente (SILVA e cols., 1949).
- ✓ Dor, pelo estímulo de aferentes nociceptivos na pele e vísceras (FERREIRA, 1972).
- ✓ Aumento da permeabilidade vascular na inflamação e mediação da hiperemia reativa (BHOOLA e cols., 1960; MAJNO e cols., 1969; REIS e cols., 1971).
- ✓ Contração da Musculatura Lisa intestinal e uterina (BERALDO e cols., 1966).
- ✓ Estímulo da absorção celular de glicose (NEEDLEMAN e cols., 1975).
- ✓ Diurese e natriurese e alteração da resistência vascular renal.

A bradiginina do plasma de mamíferos administrada intravenosamente em mamíferos produz uma queda rápida reversível da pressão sanguínea que surge da vasodilatação e diminuição da resistência arteríola e periférica, esta resposta é mediada principalmente pelo receptor B_2 , que envolve a liberação de óxido nítrico e prostaciclina (D'ORLEANS - JUSTE e VANE, 1989) e (BERGUES e cols., 1993), ação sobre o coração isolado de mamíferos, diminuição do fluxo sanguíneo e aumento da permeabilidade vascular (capilar), além de excitação da secreção renal, liberação de

citocinas, possíveis efeitos mitogenéticos e liberação de catecolaminas (REVISÃO DE BHOOLA e cols.,1992; MARGOLIUS e cols., 1996; GEPPETTI e cols., 1993).

Além destes, a BK produz também efeitos sobre a musculatura lisa como contração do íleo de cobaia e íleo de gato, em bioensaios clássicos que usam a caracterização original do peptídeo mediado por interações com receptores B₂ (REGOLI e BARABÉ, 1980).

No rato, porém, causa contrações da musculatura lisa como do útero de rata, estômago de rato e relaxamento do duodeno de rato, mediadas por receptores B₁, na qual a BK causa um relaxamento seguido por contração.

Antagonistas de receptores B₁ e B₂ exibem respostas em certas preparações de musculatura lisa de mamíferos em geral como íleo de cobaia e traquéia de ovelha, que conduzem à hipótese de que estes tecidos podem conter um receptor tipo B₃ (FARMER e cols., 1994; HESS JF e cols.,1994).

Após a descoberta do sistema calicreína-cinina em mamíferos, iniciaram-se estudos buscando melhor compreender este sistema, principalmente os análogos à bradicinina ou potenciadores da bradicinina em varias espécies animais; entre estas podemos citar os répteis como o jacaré (*Alligator mississippiensis*), a tartaruga vermelha (*pseudemys scripta*), os largatos (*Varanus Grayi*) e (*Heloderma suspectum*), e algumas serpentes como (*Python*), (*Colubridae*), (*Natrix rhombifera*), (*Waglerophis merremii*), (*Crotalus durissus*) e (*Bothrops jararaca*) (SEKI e cols., 1973).

Pouco se conhece sobre o sistema calicreína-cinina em serpentes, mas o que se sabe é que provavelmente são deficientes do Fator XII (Fator Hageman), mas o tratamento do plasma com proteases exógenas como a calicreína pancreática de porco ou tripsina, origina uma cinina com substituições em alguns aminoácidos, por ex: BK de *Python* (Ala¹, Thr⁶), BK de serpente *colubridae* (Val¹, Thr⁶).

A metodologia aplicada para o estudo das seqüências dessas cininas foi à purificação em cromatografia líquida de alta performance (HPLC), utilizando colunas semipreparativas C_{18} , em que foram purificadas em várias frações e posteriormente analisadas em bioensaios de pressão arterial média das próprias serpentes, conforme descritos em trabalhos recentes de CONLON e cols (1994, 2000 e 2004).

O sistema calicreína-cinina de serpentes, especialmente da *Bothrops jararaca* (SBJ), tem sido objeto de vários estudos. Entre os principais resultados obtidos até o momento, podemos citar:

- Uma substância semelhante a cinina de mamífero é obtida após a incubação do plasma desnaturado da SBJ com tripsina.
- Esta cinina mostrou-se inativa em preparações clássicas de bioensaio para cinina de mamíferos (útero de rata, pressão arterial de ratos), provoca hipotensão na pressão arterial da própria serpente anestesiada e provoca contrações na musculatura lisa isolada da serpente.
- Uma intensa atividade foi encontrada na cinina do plasma da SBJ, cerca de duas vezes maior que aquela encontrada no plasma de cobra, sendo aparentemente mais ativa que as cininas de mamíferos (CONLON e cols., 1994).

Estudos de frações isoladas do plasma da SBJ, contendo globulinas e liberado com a cininogenase do veneno da SBJ, revelou que esta substância é inativa em pressão arterial média do rato. Após o seu tratamento para inativar as atividades cininásicas e cininogenásicas, não foi encontrada nenhuma evidência de que o plasma continha fator de Hageman ativo, calicreína ou cininogênio que pudesse interagir com componentes do plasma de mamíferos.

Estes resultados sugerem que as serpentes possam ter desenvolvido seu próprio sistema calicreína-cinina com a estrutura e a bioatividade diferente dos mamíferos,

por não causar efeitos em mamíferos. Em vista do conteúdo de cininogenase do veneno botrópico essa deficiência do sistema plasmático calicreína-cinina poderia ser correlacionada com um mecanismo de defesa para a sobrevivência dessa espécie animal (LAVRAS e cols., 1977).

Devido ao interesse em entender as correlações existentes entre os componentes do sistema calicreína-cinina de serpentes e de mamíferos, foi estudada por CONLON e cols. (2004) uma serpente da família *Viperidae*, espécie *C. atrox* da América do Norte, na qual se investigou os efeitos de injeções intra-arteriais do peptídeo sintético isolado da *C. atrox* na circulação pulmonar de diferentes serpentes das Américas, como *C. durissus terrificus* e *C. atrox*.

O peptídeo [Val¹, Thr⁶] BK, gerado a partir do plasma da serpente *C. atrox* causou vasodilatação sistêmica e taquicardia na serpente *C. durissus terrificus*, mas não causou efeitos na circulação pulmonar. O pré-tratamento com propanolol atenuou a vasodilatação sistêmica abolindo a taquicardia, indicando que proporção considerável das respostas cardiovasculares da BK são respostas adrenérgicas que estimulam receptores β -adrenérgico. Em adição, o pré-tratamento com L-NAME atenuou a vasodilatação sistêmica, indicando a diminuição da síntese de NO (GALLI e cols., 2004).

O peptídeo obtido da *Crotalus atrox* é idêntico ao peptídeo obtido da serpente *colubrídea*, mas com apenas uma substituição de aminoácido de Ala¹ para Val em comparação com o peptídeo da *Python reticulata*. As estruturas primárias de várias espécies do grupo dos répteis são encontradas na revisão de CONLON e cols., 1999. Na *Crotalus atrox*, o NO contribui consideravelmente para a circulação sistêmica (GALLI e cols., 2004).

A purificação e caracterização da substância liberada do sistema calicreína-cinina do plasma da *Bothrops jararaca* e da *Crotalus durissus terrificus* citadas neste

trabalho, ajudará a entender melhor a especificidade do sistema calicreína-cinina destas espécies animais.

Devido ao pouco conhecimento do sistema calicreína-cinina das serpentes, pouco se sabe sobre sua possível importância para a geração de novas moléculas anti-hipertensivas, muito utilizados atualmente por várias indústrias farmacêuticas para o tratamento da hipertensão em humanos.

O campo de estudo de tais agentes ampliou-se pela verificação da ocorrência de polipeptídeos análogos ou idênticos a cinina especialmente a "**Bradicinina**", em animais afastados da escala zoológica. Isso tem levado ao esclarecimento da constituição química de tais princípios endógenos permitindo a obtenção de novos produtos de grande atividade hipotensora, estimulante da musculatura lisa e dilatadora dos vasos coronários, o que permite prever aplicações terapêuticas promissoras.

2.OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL:

- ❑ Buscar no plasma das serpentes Brasileiras *Bothrops jararaca* e *Crotalus durissus terrificus* peptídeos análogos a cininas ou outros peptídeos vasoativos.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- ❑ Analisar os efeitos dos peptídeos obtidos do plasma das serpentes em ensaio de pressão arterial média de ratos anestesiados e não anestesiados, para observação dos efeitos hipotensores e potenciadores de bradicinina em mamíferos.
- ❑ Analisar os efeitos dos peptídeos obtidos do plasma das serpentes em ensaio de íleo isolado de cobaia.
- ❑ Verificar, através de dois métodos de determinação de bradicininogênio (Método de Diniz e Carvalho (1963) e o (Método de Uchida e Katori (1977)), a possibilidade da existência de potenciadores de BK no plasma das serpentes estudadas.
- ❑ Purificar, isolar e caracterizar a fração onde ocorre o efeito biológico para posteriormente seqüenciá-los e sintetizá-los para futuros estudos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS

Serpentes SBJ (*Bothrops jararaca* Serpentes, *Viperidae*, *Crotalinae*) e SCDT (*Crotalus durissus terrificus*) adultos, masculino ou feminino, pesando (150 - 600 g) que foram retiradas da natureza e mantidas no Biotério de serpentes do Laboratório de Farmacologia do Instituto Butantan.

Ratos wistar (*Rattus norvegicus*), machos pesando (200 - 250 g) e cobaias (*Cavia porcellus*), fêmeas pesando (160 - 180 g) provenientes do Biotério Central do Instituto Butantan.

Ratos SHR (spontaneous hypertensive rats), machos pesando (200 - 400 g) que foram doados do Biotério Central da UNIFESP.

Os ratos e as cobaias foram mantidos em Biotério com ciclo claro-escuro 12/12 hs e água e alimento fornecidos "ad libitum".

Os protocolos do projeto foram aprovados pela Comissão de Ética em Uso de Animais do Instituto Butantan, protocolo nº 094/2002.

3.2. MÉTODOS BIOQUÍMICOS

3.2.1. COLETA DO PLASMA

O sangue foi coletado das serpentes através de decapitação e transferidos para tubos de polietileno contendo citrato de sódio (3,8 mg/mL de sangue) como anticoagulante e imediatamente centrifugados em 9.772 g por 15 min, à temperatura de 20°C.

3.2.2. DETERMINAÇÃO DE BRADICININOGÊNIO A PARTIR DO PLASMA DAS SERPENTES

A determinação de bradigininogênio para a obtenção dos peptídeos se baseia da incubação do Plasma das serpentes *Bothrops jararaca* e da *Crotalus durissus terrificus* pela ação da tripsina, segundo as metodologias descritas e nomeadas como Diniz & Carvalho (1963) e Uchida & Katori (1977), na qual será detalhada posteriormente. Após o tratamento do plasma com estas metodologias, as frações foram liofilizadas para posterior diluição em 0,9% de NaCl.

3.2.3. MÉTODO DE DINIZ E CARVALHO (1963)

Utilizamos 0,2 mL de plasma em 1,8 mL de ácido acético (0,2% v/v) e colocamos em banho com água em ebulição por 30 minutos. Após este tratamento as amostras foram estocadas em congelador (-20°C) para posterior dosagem.

Neutralizamos com 0,06 mL de NaOH (1N), e após a neutralização adicionamos 0,5 mL de Tampão Tris (0,2 M, pH= 7,8) , 0,1 mL de Tripsina (2 mg/mL) equivalente à 200 µg e incubamos as amostras em banho-maria à 37°C por 30 minutos.

Para parar a reação, adicionamos 5 mL de álcool absoluto em cada tubo e foram mantidos durante 10 minutos em banho-maria à 70°C.

3.2.4. MÉTODO DE UCHIDA E KATORI (1977)

Utilizamos 0,2 mL de plasma em 1,8mL de ácido acético (0,2% v/v) e 0,03 de solução de 1N HCL e as amostras foram incubadas em banho-maria à 37°C por 30 minutos.

Neutralizamos com 0,05 mL de 1N NaOH e 0,5mL de Tampão Tris (0,2M pH= 7,8) , adicionamos na incubação 200 µg de tripsina, para posteriormente serem incubadas à 37°C por 30 minutos.

3.2.5. DOSAGEM DE PROTEÍNAS (MÉTODO DE BRADFORD)

O método está fundamentado na coloração apresentada pelo Comassie Brilliant Blue G-250, que pode ser vermelho ou azul. A forma vermelha é convertida para a forma azul quando o Comassie reage com proteína. Esta reação ocorre em aproximadamente 2 minutos e permanece estável por cerca de 1 hora. Podendo ser lido em comprimento de onda de 595 nm no espectrofotômetro e deduzida a concentração por comparação com uma curva de calibração feita normalmente com albumina bovina comercial (Metodologia descrita no apêndice (Item 7.1.1.)).

3.2.6. PURIFICAÇÃO EM CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE).

Após o plasma tripsinizado e liofilizado diluímos em 10 mL de NaCL a (0,9%) e ultrafiltramos parcialmente em filtros de corte molecular Ultrafree 15 (Millipore) (>5000 Da), para serem novamente liofilizados.

Posteriormente todo o material liofilizado ressuspendemos em 2 mL de água mili-Q, purificamos em um filtro de seringa e então purificamos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Na primeira etapa da purificação utilizamos um aparelho de HPLC, Merk Hitachi L-6000, equipado com uma coluna de fase reversa C_{18} (4,6 mm X 250 mm), com um fluxo de 1 mL/min, monitorado através de um detector UV variável a 214 nm. O gradiente utilizado foi de 5 a 95% de Fase B (Acetonitrila 90%) e Fase A (H_2O + TFA 0,1%) com tempo de 45 min.

Da purificação separamos frações que foram analisadas em bioensaio de pressão arterial das serpentes SBJ e SCDT. Este ensaio serviu como controle para determinação das frações biologicamente vasoativas (efeito hipotensor).

Na segunda etapa, a fração com o efeito hipotensor foi novamente purificada, desta vez utilizando um gradiente de 20 a 50% de Fase B (Acetonitrila 90%) e Fase A (H_2O + TFA 0,1%), com um fluxo de 1 mL/min, monitorado através de um detector UV variável a 214 nm, com tempo de 40 min, buscando isolar um pico que representa um possível peptídeo hipotensor.

3.2.7. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA

A corrida foi realizada em um gel de Poliacrilamida 12,5%, com pente de 10 dentes. Como padrão de massa molecular utilizamos um "Kit" (Pharmacia, Upsalla).

As corridas foram realizadas com voltagem constante de 100 V por cerca de 90 minutos, até a linha de frente do corante azul de bromofenol chegar ao final do gel. Os géis foram fixados com metanol a 50% e corados com Prata.

Realizamos géis com o plasma da SBJ e da SCDT utilizando as duas metodologias Diniz & Carvalho (1963) e Uchida & Katori (1977) para fim de comparações, com a identificação dos HMWK e LMWK (Metodologia descrita no apêndice Itens 7.1.2. e 7.1.3.).

3.2.8. ESPECTROMETRIA DE MASSA

A espectrometria de massa foi utilizada para caracterizar os peptídeos finais obtidos. O equipamento usado foi o PSQ-23A da Shimadzu (Kyoto, Japão), que seqüência automaticamente peptídeos através da química de Edman (Metodologia descrita no apêndice (Item 7.1.4.)).

3.2.9. SÍNTESE DE PEPTÍDEOS

Os peptídeos foram sintetizados em fase sólida em um sintetizador automático, Shimadzu múltiplo de oito canais, modelo PSSM-8 empregando a estratégia Fmoc (HIRATA e cols., 1991). (Metodologia descrita no apêndice (Item 7.1.5.)).

3.3. ENSAIOS BIOLÓGICOS

3.3.1. PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA EM SERPENTES ANESTESIADAS

Todas as serpentes utilizadas neste trabalho foram anestesiadas com injeções de pentobarbital sódico sub-escamal (30 mg/kg). Depois de anestesiadas, sua artéria carótida foi canulada com um segmento de polietileno (PE50) e conectamos a um transdutor fisiológico de pressão e os experimentos registrados em um polígrafo TSE Systems.

A administração das drogas foi através de um cateter de polietileno (PE10) introduzido na veia renal da serpente.

Após a cirurgia administramos doses de 0,1 mL/i.v de captopril (0,1 mg/Kg), para total inibição das cininases II, seguida das doses do plasma tripsinizado. Este experimento permitiu analisar a fração ativa dos plasmas (Metodologia descrita no apêndice (Item 7.2.1.)).

3.3.2. PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA (P.A.M) EM RATOS ANESTESIADOS

Foram utilizados ratos para a medida da P.A.M, com as cininas liberadas a partir do plasma tripsinizado das serpentes, para verificar um possível efeito hipotensor em mamíferos.

A artéria carótida foi canulada com um segmento de polietileno (PE50) a um transdutor fisiológico de pressão e o experimento registrado em polígrafo TSE Systems (Metodologia descrita no apêndice (Item 7.2.2.)). O protocolo das doses empregadas está descrito no apêndice (Item 7.2.2.1.).

3.3.3. PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA EM RATOS SHR NÃO ANESTESIADOS (CRÔNICOS)

Os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (70 mg/Kg), sua cirurgia seguiu os mesmos padrões da pressão arterial em ratos anestesiados, descrita anteriormente, na qual a artéria e a veia carótida são canuladas com um segmento de polietileno (PE 10).

A diferença deste método se dá porque a cânula foi exteriorizada na região dorsal do animal com o auxílio de um trocater e após um dia de recuperação os animais foram utilizados para pressão arterial média sem o auxílio do anestésico. O protocolo das doses empregadas está descrito no apêndice (Item 7.2.2.2.).

3.3.4. ENSAIO EM MUSCULATURA LISA ISOLADA (ÍLEO DE COBAIA)

As cobaias foram sacrificadas por concussão, cortamos os vasos e a coluna cervical das mesmas. A cavidade abdominal foi aberta para a exposição das vísceras. Identificamos a porção distal do intestino delgado, ao nível do ceco e retiramos um fragmento de cerca de 15 cm de comprimento. O fragmento do íleo foi colocado em uma placa de Petri contendo a solução de Tyrode Padrão, e com o uso de uma pipeta a parte interna do segmento intestinal foi lavada com solução Tyrode Padrão.

Após a lavagem, separamos um fragmento original de 2,5 a 3,0 cm que foi fixado por uma das extremidades na cubeta do banho (15 mL) para órgãos isolados, conforme preconizou Dale (1912/1913).

A outra extremidade amarramos a um transdutor de tensão isométrico, previamente calibrado, acoplado a um amplificador e a um registrador potenciométrico. Antes da adição das drogas a preparação foi pré-tensionada à 1gr e estabilizada durante 40 a 50 minutos.

As contrações registramos pela deflexão da pena no papel, podendo ser medido em centímetros. Nas tabelas a seguir (tabelas 1 e 2), mostra as composições do líquido nutriente Tyrode I e II, utilizadas para fazer a solução Padrão utilizada no ensaio.

Oxigenação: ar (bomba de aquário)

Líquido Nutriente: Solução de Tyrode I e II à Temperatura a 37°C.

Tabela 1: Composição do líquido nutriente tyrode I, utilizado para o preparo da solução tyrode padrão de ensaio de óleo isolado de cabaia.

<u>Composição</u>	<u>Quantidade</u>
<u>Na₂HPO₄2H₂O</u>	<u>3,65gr</u>
<u>NaHCO₃</u>	<u>50,00gr</u>
<u>H₂O destilada</u>	<u>1000mL</u>

Tabela 2: Composição do líquido nutriente tyrode II, utilizado para o preparo da solução tyrode padrão de ensaio de óleo isolado de cabaia.

<u>Composição</u>	<u>Quantidade</u>
<u>NaCL</u>	<u>200gr</u>
<u>MgCL₂6H₂O</u>	<u>2,50gr</u>
<u>KLC</u>	<u>5,0gr</u>
<u>CaCl₂2H₂O</u>	<u>6,6gr</u>
<u>H₂O destilada</u>	<u>1000mL</u>

A preparação da Solução Tyrode Padrão está descrito detalhadamente no Apêndice (Item 7.2.3.).

4. RESULTADOS

O sangue das serpentes SBJ e SCDT foi centrifugado a 9.722 g por 15 minutos, contendo citrato de sódio (3,8 mg/mL de sangue) como anticoagulante. O volume resultante de plasma foi submetido às metodologias de Diniz & Carvalho., 1963 (D&C) e Uchida & Katori., 1977 (U&K).

Nessas metodologias os plasmas foram tratados com ácido acético e tripsina, porém em diferentes temperaturas, verificando-se a liberação de uma substância com efeito hipotensor e potenciador do efeito da bradicinina em bioensaios de pressão arterial média de ratos anestesiados normotensos, ratos não anestesiados hipertensos (ensaios "in vivo") e íleo isolado de cobaia (ensaio "in vitro").

Os dados da pressão arterial média de ratos foram calculados em queda da pressão em mmHg (milímetros de mercúrio) e duração do efeito observado em min (minutos). Os dados do íleo isolado de cobaia foram calculados pela amplitude das contrações em cm (centímetros).

4.1. DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS.

Utilizamos 0,2 mL de plasma das SBJ e SCDT tratado pela metodologia de D&C, que após liofilizados foram diluídos em 1 mL de água miliQ e submetidos a análise de proteína pelo método de Bradford.

Verificamos que o plasma da SBJ, continha aproximadamente 500 µg proteína por mL de plasma tratado e no plasma da SCDT, havia em torno de 300 µg de proteína por mL de plasma tratado.

As concentrações foram determinadas comparando-se com uma curva padrão de albumina bovina (100 µg/mL).

4.2. BIOENSAIO DE PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA (P.A.M.) DE RATOS ANESTESIADOS NORMOTENSOS, UTILIZANDO O MÉTODO DE D&C

Todos esses ensaios preliminares de Pressão Arterial Média de ratos normotensos foram realizados com os plasmas das serpentes SBJ e SCDT tratados com os métodos de determinação de bradicininogênio D&C e U&K sem purificação (somente material Bruto). (BK = Bradicinina sintética, BJ = Plasma da SBJ e CDT = Plasma da SCDT)

4.2.1. PLASMA DA SBJ

Foram realizados ensaios utilizando grupos com 9 (nove) ratos para cada material, nos quais analisamos possíveis efeitos hipotensores e potenciadores da bradicinina (2.0 µg/Kg).

Com o primeiro grupo de ratos anestesiados, analisamos o plasma da SBJ tratado pelo método de D&C, com o protocolo de 0,2 mL de plasma que após liofilizado foi diluído em 2 mL de NaCl 0,9%, ficando portanto a substância com uma concentração de 250 µg/mL de material.

Após a cirurgia com o rato anestesiado, injetamos na veia carótida a bradicinina sintética nas concentrações (0,5 µg) e de plasma da SBJ.

Primeiramente injetamos 0,5 µg BK e 1,0 µg BK para posteriormente injetar 25 µg BJ, 50 µg BJ. Após a estabilização da pressão arterial novamente injetamos o padrão de BK (0,5 µg), seguida de 50 µg BJ e finalizamos com 0,5 µg BK (descrito detalhadamente no apêndice 7.2.2 e 7.2.2.1). Com essas doses verificamos que o plasma apresentou efeito hipotensor e potenciador da BK muito potente sugerindo a presença de peptídeos vasoativos, conforme descrito na figura 7 e 8.

Figura 7: Efeito Médio das doses em mmHg (Teste "t" de Student) em ratos anestesiados (N= 9), tratados com plasma da SBJ pelo método D&C (250 $\mu\text{g/mL}$) e bradicinina sintética (2.0 $\mu\text{g/Kg}$) (* Potenciação significativa da BK).

Figura 8: Efeito Médio das doses em min (Teste "t" de Student) em ratos anestesiados (N= 9), tratados com plasma da SBJ pelo método de D&C (250 $\mu\text{g/mL}$) e bradicinina sintética (2.0 $\mu\text{g/Kg}$) (* Potenciação significativa da BK).

4.2.2. PLASMA DA SCDT

Em um segundo experimento com um grupo de 9 (nove) ratos anestesiados, analisamos o plasma da SCDT tratado pelo método de D&C, com o protocolo de 0,2 mL de plasma que após liofilizado foi diluído em 2 mL de NaCL 0,9%, ficando portanto a substância com uma concentração de 150 µg/mL de material.

Após a cirurgia com o rato anestesiado, injetamos na veia carótida as seguintes concentrações de bradicinina sintética e de plasma da SCDT.

Primeiramente injetamos 0,5 µg BK e 1,0 µg BK para posteriormente injetar 15 µg CDT, 30 µg CDT, esperamos estabilizar a pressão arterial e injetamos novamente 0,5 µg BK seguida de 30 µg CDT e 0,5 µg BK (descrito detalhadamente no apêndice 7.2.2 e 7.2.2.1).

Com essas doses verificamos que o plasma da SCDT, tratado com o método de D&C, também continha possíveis peptídeos hipotensores eficazes em mamíferos e potenciadores da BK, com efeitos similares ao do plasma da SBJ pelo método de D&C, conforme a figura 9 e 10.

Figura 9: Efeito Médio das doses em mmHg (Teste "t" de Student) em ratos anestesiados, (N= 9) tratados com plasma da SCDT pelo método de D&C (150 µg/mL) e bradicinina sintética (2.0 µg/Kg) (* Potenciação significativa da BK).

Figura 10: Efeito Médio das doses em min (Teste "t" de Student) em ratos anestesiados, (N= 9) tratados com plasma da SCDT pelo método de D&C (150 µg/mL) e bradicinina sintética (2.0 µg/Kg) (* Potenciação significativa da BK).

Uma substância semelhante à bradicinina sintética, um possível peptídeo foi obtido após a incubação do plasma das SBJ e da SCDT pelo método de D&C.

O plasma da SBJ (25 µg) pelo método de D&C, causou uma hipotensão média de -30,4 mmHg com uma duração em torno de 1,6 minutos.

Esta substância também causou efeito significativo na potenciação da bradicinina sintética de mamíferos, confirmando ser um potenciador eficaz da bradicinina de mamíferos em mamíferos. A hipotensão média causada pela BK (0,5 µg) antes da utilização do plasma foi de -25,7 mmHg com uma duração de 0,7 minutos e após a utilização do plasma da SBJ, seguida da BK seu efeito hipotensor foi para -34,5 mmHg com uma duração de 1,4 minutos.

O plasma da SCDT (15 µg) pelo método de D&C, causou uma hipotensão média de -31,6 mmHg com uma duração média de 0,9 minutos.

Esta substância também potenciou a bradicinina sintética de mamíferos, confirmando também obter um possível potenciador da bradicinina sintética de mamíferos em mamíferos.

Seu efeito foi mais eficaz em mmHg (queda da pressão em milímetros de mercúrio) e menos eficaz na duração do efeito (calculado em min), comparando com o da SBJ, sendo que a média de hipotensão causada pela BK (0,5 µg) antes da utilização do plasma foi de -22 mmHg com uma duração de 0,8 minutos e após a utilização do plasma da SCDT, seguida da BK (0,5 µg) seu efeito hipotensor foi para -37,3 mmHg com uma duração de 1,2 minutos.

4.3. BIOENSAIO DE PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA DE RATOS ANESTESIADOS NORMOTENSOS, UTILIZANDO O MÉTODO U&K

O procedimento foi igual ao ensaio anterior, utilizado pela metodologia de D&C, na qual analisamos um grupo de 9 (nove) ratos machos para cada material liberado dos plasmas das SBJ e da SCDT tratado com o método de U&K.

4.3.1. PLASMA SBJ

Após a cirurgia com o rato anestesiado, injetamos na veia carótida através da cânula, as seguintes concentrações de bradicinina sintética e de plasma da SBJ.

Primeiramente injetamos 0,5 µg BK e 1,0 µg BK para posteriormente injetar 25 µg BJ, 50 µg BJ, esperamos estabilizar a pressão arterial e injetamos novamente 0,5 µg BK seguida de 50 µg BJ e finalmente 0,5 µg BK (descrito detalhadamente no apêndice 7.2.2 e 7.2.2.1).

Com essas doses verificamos que o plasma da serpente SBJ tratado com o método de U&K também liberou possíveis peptídeos hipotensores em mamíferos e potenciadores da bradicinina, conforme a figura 11 e 12.

Figura 11: Efeito Médio das doses em mmHg (Teste "t" de Student) em ratos anestesiados, (N=9) tratados com plasma da SBJ pelo método de U&K (250 μ g/mL) e bradicinina sintética (2.0 μ g/Kg) (* Potenciação significativa da BK).

Figura 12: Efeito Médio das doses em min (Teste "t" de Student) em ratos anestesiados, (N= 9) tratados com plasma da SBJ pelo método de U&K (250 μ g/mL) e bradicinina sintética (2.0 μ g/Kg) (* Potenciação significativa da BK).

4.3.2. PLASMA DA SCDT

Em um segundo experimento com um grupo de 9 (nove) ratos anestesiados, analisamos o plasma da SCDT tratado pelo método de U&K, com o protocolo de 0,2 mL de plasma que após liofilizado foi diluído em 2 mL de NaCL 0,9%, ficando portanto a substância com uma concentração de 150 µg/mL de material.

Neste segundo experimento, utilizamos os mesmos padrões da análise com o plasma da SBJ.

Após a cirurgia com o rato anestesiado, injetamos na veia carótida através da cânula, as seguintes concentrações de bradicinina sintética e de plasma da SCDT.

Primeiramente injetamos 0,5 µg BK e 1,0 µg BK para posteriormente injetar 15 µg CDT, 30 µg CDT, esperamos estabilizar a pressão arterial e injetamos novamente 0,5 µg BK seguida de 30 µg CDT e 0,5 µg BK (descrito detalhadamente no apêndice 7.2.2 e 7.2.2.1).

Com essas doses também verificamos que o plasma da serpente SCDT tratado com o método de U&K, liberou possíveis peptídeos hipotensores em mamíferos e potenciadores da bradicinina, conforme a figura 13 e 14.

Figura 13: Efeito Médio das doses em mmHg (Teste "t" de Student) em ratos anestesiados, (N= 9) tratados com plasma da SCDT pelo método de U&K (150 μ g/mL) e bradicinina sintética (2.0 μ g/Kg) (* Potenciação significativa da BK).

Figura 14: Efeito Médio das doses em min (Teste "t" de Student) em ratos anestesiados, (N=9) tratados com plasma da SCDT pelo método de U&K (150 μ g/mL) e bradicinina sintética (2.0 μ g/Kg) (* Potenciação significativa da BK).

O método de U&K foi utilizado para o plasma das serpentes SBJ e SCDT, que posteriormente foram empregadas em análises de bioensaio na pressão arterial média de ratos normotensos, na qual se verificou a ocorrência de uma substância, um possível peptídeo com efeito hipotensor e potenciador eficaz sobre os efeitos da bradicinina em mamíferos.

O plasma da SBJ (25 µg) com o método de U&K, revelou ter um efeito de hipotensão menor que o obtido com o método de D&C, causando um efeito de - 11,3 mmHg com duração de 0,9 minutos.

Esta substância potenciou a bradicinina sintética de mamíferos, confirmando também a presença de um possível potenciador da bradicinina. A média de hipotensão causada pela BK (0,5 µg) antes da utilização do plasma foi de -14,9 mmHg com uma duração de 0,6 min e após a utilização do plasma da SBJ, seguida da BK seu efeito hipotensor foi para -23,7 mmHg com uma duração de 0,8 min.

O plasma da SCDT (15 µg) com o método de U&K, revelou ter um efeito de hipotensão maior que o obtido com o método de D&C, na qual causou uma hipotensão média de -39,3 mmHg com duração média de 1,8 minutos.

Esta substância causou uma potenciação muito significativa da bradicinina sintética. A média de hipotensão causada pela BK (0,5 µg) antes da utilização do plasma foi de -28,6 mmHg com uma duração de 0,4 min e após a utilização do plasma da SCDT, seguida da BK seu efeito hipotensor foi para -55,3 mmHg com uma duração de 1,1 min.

4.4. COMPARAÇÃO DO EFEITO DOS PLASMAS SBJ E SCDT PELOS MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DE BRADICININOGÊNIO D&C E U&K

Os resultados obtidos do ensaio de pressão arterial média de ratos normotensos indicam que os plasmas após o tratamento com os métodos de determinação de

bradicininogênio liberam uma substância que possivelmente seja um peptídeo hipotensor, que por sua vez também causa efeitos de potenciação da bradicinina sintética de mamíferos.

Analisando o método de D&C, concluímos que os plasmas das serpentes SBJ e SCDT, causaram efeitos similares em mmHg e em min. Tendo em vista que o plasma da SCDT tenha menos material por mL, podemos concluir que o plasma da SCDT libera uma substância com concentrações inferiores, mas que causa efeitos iguais ao da SBJ com concentrações bem superiores, confirmando este ser mais ativo na pressão arterial média de mamíferos.

Com o método de U&K, podemos observar que o plasma da SCDT, mesmo com concentração bem inferior ao da SBJ, também causou um efeito três vezes mais ativo que o da SBJ tanto em mmHg, como em min.

Para fins de potenciação da bradicinina sintética de mamíferos, o plasma da SBJ revelou ser mais ativo utilizando o método de D&C e o plasma da SCDT revelou ser mais ativo com o método de U&K, conforme descrito na Tabela 3.

Tabela 3: Porcentagem média da Potenciação da bradicinina de mamífero, após a utilização dos plasmas de SBJ e da SCDT. Obtidos através dos métodos de D&C e U&K.

	<u>DINIZ E CARVALHO</u>		<u>UCHIDA E KATORI</u>	
<u>PLASMA</u>	mmHg	min	mmHg	min
<u>BJ</u>	34%	100%	59%	33%
<u>CDT</u>	69%	50%	93%	75%

4.4.1. METODOLOGIA DE ANÁLISE DE RESULTADOS DA TABELA 3

Baseado na média de hipotensão inicial de BK (mmHg e min), foi considerado o efeito padrão de BK igual a 100%, calculamos a média de hipotensão da BK após o uso do plasma e realizamos uma regra de três simples.

$$\begin{array}{l} \text{Efeito médio BK} \\ \text{Efeito médio de} \\ \text{BK após o plasma} \end{array} \begin{array}{c} \diagup \quad \diagdown \\ \diagdown \quad \diagup \end{array} \begin{array}{l} 100\% \\ \\ X = \text{Valor total.} \end{array}$$

Obs: Deste valor total, subtrairmos por 100, resultando o valor da porcentagem da potenciação.

4.5. (P.A. M.) EM RATOS SHR NÃO ANESTESIADOS (CRÔNICOS)

Ensaio realizado com ratos cedidos pela Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).

Os ensaios ditos crônicos são realizados com a finalidade de se observar o efeito da droga sem que haja a interferência de anestésico na resposta hipotensora. Realizamos dois ensaios, nas quais em um dos ensaios, utilizamos o captopril (0,1 mg/Kg), um inibidor da enzima conversora (ECA), um medicamento eficaz comercialmente utilizado por pacientes hipertensos, para fins de comparação.

Após um dia da cirurgia, com o rato bem recuperado conectamos a cânula da artéria carótida, exposta via exteriorizada pelo dorso ao segmento de polietileno (PE50) a um transdutor fisiológico de pressão e o experimento foi registrado em um polígrafo TSE Systems.

A administração das drogas foi através de um cateter de polietileno (PE10) introduzido dentro da veia carótida.

Primeiramente injetamos 0,5 µg BK e 1,0 µg BK para posteriormente injetar 25 µg BJ, 50 µg BJ, esperamos estabilizar a pressão arterial e injetamos novamente 0,5 µg BK seguida de 50 µg BJ e 0,5 µg BK, os resultados obtidos estão descrito nas figuras 15 e 16 (descrito detalhadamente no apêndice 7.2.2.1).

Em um outro ensaio de pressão arterial média com os ratos hipertensos (SHR) crônicos, foi administrado captopril antes e após a administração do plasma da SBJ para analisar possíveis efeitos comparativos, conforme resultados descritos nos gráficos 17 e 18.

Neste ensaio a administração das drogas foi através de um cateter de polietileno (PE10) introduzido dentro da veia carótida.

Primeiramente injetamos 0,5 µg BK e 1,0 µg BK para posteriormente injetar 25 µg BJ, 50 µg BJ, esperamos estabilizar a pressão arterial e injetamos uma dose de 0,1 mg/Kg de captopril e em seguida novamente doses de 25 µg BJ e 50 µg BJ (descrito detalhadamente no apêndice 7.2.2.2).

Figura 15: Efeito Médio (Teste "t" de Student) das doses da BK em ratos hipertensos SHR (N=6), após o tratamento do plasma da SBJ pelo método de D&C (250 μ g/mL) (*Potenciação significativa da bradicinina).

Figura 16: Efeito Médio (Teste "t" de Student) das doses da BK em ratos hipertensos SHR (N=6), após o tratamento do plasma da SBJ pelo método de D&C (250 μ g/mL) (*Potenciação significativa da bradicinina).

Figura 17: Efeito Médio (Teste "t" de Student) das doses da BK em ratos hipertensos SHR (N=4) tratados com captopril (0,1 mg/Kg) e com o plasma da SBJ pelo método de D&C (250 μ g/mL) (* Potenciação significativa do plasma da SBJ).

Figura 18: Efeito Médio (Teste "t" de Student) das doses da BK em ratos hipertensos SHR (N=4) tratados com captopril (0,1 mg/Kg) e com o plasma da SBJ pelo método de D&C (250 μ g/mL) (* Potenciação significativa do plasma da SBJ).

No ensaio usando os ratos SHR (figura 15 e 16), analisamos o efeito do plasma da SBJ tratado pelo método de D&C, com o objetivo de observar efeitos hipotensores e efeitos potenciadores da bradicinina de mamíferos.

O plasma da SBJ (25 µg) causou uma hipotensão média de -5 mmHg com uma duração de 0,2 minutos.

No estudo do efeito da potenciação da bradicinina sintética em mamíferos, a média de hipotensão causada pela bradicinina (0,5 µg) antes da utilização do plasma era de -14 mmHg com uma duração de 0,2 minutos e após a utilização do plasma da SBJ, seguida da mesma dosagem de bradicinina (0,5 µg) seu efeito foi para -16 mmHg com uma duração de 0,3 minutos.

O ensaio da figura 17 e 18 para analisar o efeito do plasma da SBJ tratado pelo método de D&C, uma vez que este mesmo ensaio utilizamos a administração do captopril (0,1 mg/Kg), um eficaz inibidor da enzima conversora da bradicinina (ECA), em ratos hipertensos crônicos. O efeito médio do plasma da SBJ (25 µg) antes da administração do captopril foi de -6 mmHg com uma duração de 0,1 minutos e após a administração do captopril causou uma hipotensão média de -8 mmHg com uma duração de 0,3 minutos, mostrando uma leve potenciação devido à inibição da ECA (Veja detalhes das porcentagens de potenciação na tabela 4).

Nestes ensaios crônicos analisamos o efeito do plasma da SBJ tratado pelo método de D&C, sem a interferência do anestésico, uma vez que ele pode interferir positivamente nos efeitos, uma vez que os resultados obtidos resultou em um efeito bem menor, devido aos reflexos cardiopressores do animal.

Tabela 4: Média da potenciação da bradicinina de mamífero (BK), antes e após a utilização do plasma da SBJ e a média de potenciação do plasma da SBJ antes e após a administração do captopril. Obtidos através dos métodos de D&C em ratos SHR.

	ANTES DA BJ		APÓS A BJ (% POTENCIAÇÃO)	
	mmHg	min	mmHg	min
<u>BK</u>	17,75	0,23	18,66 (5%)	0,35 (52%)

	ANTES DO CAPTOPRIL		APÓS O CAPTOPRIL (%)	
	mmHg	min	mmHg	min
<u>SBJ</u>	7	0,25	12,8 (82%)	0,42(68%)

4.5.1. METODOLOGIA DE ANÁLISE DE RESULTADOS DA TABELA 4

Baseado na média de hipotensão inicial de BK e SBJ (mmHg e min), na qual foi considerado o efeito padrão (100%), calculamos a média de hipotensão da BK e da SBJ após o uso do plasma da SBJ e captopril, na qual realizamos uma regra de três simples.

$$\begin{array}{lcl}
 \text{Efeito médio BK} & \begin{array}{c} \diagup \quad \diagdown \\ \times \end{array} & 100\% \\
 \text{Efeito médio de} & & \\
 \text{BK após o plasma} & & \times = \text{Valor total}
 \end{array}$$

Obs: Deste valor total, subtrairmos por 100, resultando o valor da porcentagem da potenciação.

4.6. ENSAIO DE MUSCULATURA LISA (ÍLEO ISOLADO DE COBAIA)

O íleo isolado da cobaia presta-se admiravelmente para o estudo quantitativo da ação de drogas pela sensibilidade com que reage aos seus estimulantes específicos.

4.6.1. ENSAIO BIOLÓGICO EM ÍLEO ISOLADO DE COBAIA CURVA DOSE EFEITO DA BRADICININA (BK)

A adição de BK ao Íleo Isolado de Cobaia determinou respostas dose-dependente. As curvas dose-efeito para BK foram obtidas conforme o delineamento apresentado na Figura 19 (BJ: Plasmas e BK: Bradicinina).

As médias das respostas e as diferentes doses de BK (1 $\mu\text{g/mL}$), empregadas são apresentadas nas tabelas.

Figura 19: : Ilustrativo para demonstração das doses empregadas.

4.7. ENSAIO DE ÍLEO ISOLADO DE COBAIA UTILIZANDO O PLASMA DA SBJ NAS METODOLOGIAS DE DETERMINAÇÃO DE BRADICININOGÊNIO D&C E U&K

Este ensaio foi realizado com o objetivo de analisar o efeito do plasma utilizando os métodos de determinação de bradiginogênio D&C e U&K, para analisar possíveis efeitos de potenciação da bradicinina sintética de mamíferos, uma vez que o próprio plasma não causou nenhum efeito de contração significativa.

Após a montagem do íleo isolado de cobaia (descrito detalhadamente em material e métodos e apêndice 7.2.3).

O protocolo nestes ensaios iniciou-se com uma curva dose crescente da bradicinina sintética de mamíferos ($1 \mu\text{g/mL}$), para posteriormente aplicar uma curva com doses duplas de $80 \mu\text{L}$ e $160 \mu\text{L}$ de plasma, na qual foi calculado sua concentração em ng de acordo com o valor da contração causada por estas no íleo (tabelas 7 e 10) e logo após aplicamos novamente outra curva dose crescente de bradicinina (BK).

Para finalizar os ensaios utilizamos doses alternadas de BK e de plasma e outra curva de doses crescente de BK, na qual analisaremos os efeitos nas próximas figuras.

4.7.1. ESTUDO DA POTENCIAÇÃO DOS EFEITOS DA BRADICININA (BK) PELO PLASMA DA SBJ TRATADO PELO MÉTODO DE D&C.

Figura 20: Dose-efeito da contração (cm) do íleo de cobaia, (N=6) antes e após da incubação do plasma da S BJ (250 µg/mL) pelo método de D&C (Média das contrações em cm).

Tabela 5: Curva dose-efeito da BK em íleo de cobaia antes da adição do material da SBJ (250 µg/mL) pelo método de D&C (Teste T-student) (EPM: Erro padrão médio).

Dose (ng)	Média do Efeito (cm)	Desvio	EPM
20	4,11	1,599	0,652
40	6,25	2,499	1,020
80	9,6	2,839	1,159
160	13,28	4,885	1,994

Tabela 6: Curva dose-efeito da BK em íleo de cobaia após a adição do material da SBJ (250 µg/mL) pelo método de D&C (Teste T-student) (EPM: Erro padrão médio).

Dose (ng)	Média do Efeito (cm)	Desvio	EPM
20	4,95	2,313	0,944
40	8,23	2,968	1,212
80	11,23	4,086	1,668
160	13,38	5,004	2,043

O pré-tratamento do íleo de cobaia com o plasma da SBJ tratado pelo método de D&C durante 1 minuto, seguido da adição de BK revelou uma potenciação significativa em algumas doses do ensaio dos efeitos da BK em relação ao controle efetuado, sendo a média de potenciação de 21% em um controle de 6 (seis) experimentos, conforme descrito na tabela 7 a seguir.

O ensaio em íleo de cobaia permitiu determinar a Unidade Potenciadora (U. P.), ou Fator de Potenciação, que é definida como sendo a "quantidade de peptídeo potenciador que quando adicionada à preparação, faz com que uma dose padrão de BK tenha sua resposta correspondente àquela normalmente produzida pelo dobro da dose de BK na ausência do potenciador" (Ferreira e cols., 1970).

A atividade potenciadora máxima foi determinada através de uma curva log da dose X resposta (altura da contração em cm) com as doses utilizadas na curva padrão de BK (Figura 20).

Através da curva log da dose X resposta, calcula-se o número de vezes que a BK foi potenciada pela amostra (plasma).

Tabela 7: Efeito potenciador do plasma em íleo isolado de cobaia após adição de dose padrão de BK (80 ng/80ul e 160 ng/160ul) usando o plasma da SBJ em D&C.

N. do experimento.	μL de plasma (PL)	Extensão de Contração (cm) do plasma (PL)	Valor do PL Equivalente de BK (Padrão 80ng e 160ng) antes.	Valor Médio de BK em cm (antes do peptídeo incubado do PI da SBJ)	Valor Médio de BK em cm (após o peptídeo incubado do PL da SBJ)	Fator de Potenciação (P)	% potenciação
1	80	1,2	11,29ng	8,5cm	8,1cm	0,95	-
	160	2,15	34,4ng	10,0cm	8,0cm	0,8	-
2	80	0,3	4,36ng	5,5cm	6,2cm	1,12	12%
	160	0,35	8,48ng	6,6cm	7,3cm	1,10	10%
3	80	0,35	2,00ng	14,0cm	16,7cm	1,19	19%
	160	2,5	22,98ng	17,4cm	17,2cm	0,98	-
4	80	1,6	13,33ng	9,6cm	10,5cm	1,09	9%
	160	2,35	27,44ng	13,7cm	13,5cm	0,98	-
5	80	2,45	17,5ng	11,2cm	15,4cm	1,37	37%
	160	3,85	30,8ng	20,0cm	20,0cm	-	-
6	80	1,7	15,11ng	9,0cm	10,5cm	1,16	16%
	160	1,3	17,33ng	12,0cm	14,3cm	1,19	19%

4.7.2. METODOLOGIA DE ANÁLISE DE RESULTADOS DA TABELA 7

N. do experimento: Total de análises realizadas, as quais foram numeradas de 1 a 6.

μL de Plasma: Quantidade de material aplicado direto no íleo, 80 μL e 160 μL.

Extensão da contração (cm) do plasma: Valor medido em cm das contrações causadas pelo plasma.

4.7.3. ESTUDO DA POTENCIAÇÃO DOS EFEITOS DA BRADICININA (BK) PELO PLASMA DA SBJ TRATADO PELO MÉTODO DE U&K

Figura 21: Dose-efeito da contração (cm) do íleo de cobaia (N=6) antes e após da incubação pelo plasma tratado da SBJ (250 µg/mL) pelo método de U&K (Média da contração em cm).

Tabela 8: Curva dose-efeito da BK em íleo de cobaia antes da adição do material da SBJ (250 µg/mL) pelo método de U&K (Teste T-student) (EPM: Erro padrão médio).

Dose (ng)	Média do Efeito (cm)	Desvio	EPM
20	5,9	2,494	1,018
40	8,71	2,068	0,844
80	10,58	2,718	1,109
160	12,51	2,724	1,112

Tabela 9: Curva dose-efeito da BK em íleo de cobaia após a adição do material da SBJ (250 µg/mL) pelo método de U&K (Teste T-student) (EPM: Erro padrão médio).

Dose (ng)	Média do Efeito (cm)	Desvio	EPM
20	6,78	3,507	1,432
40	9,71	3,857	1,575
80	11,66	3,038	1,240
160	13,10	2,480	1,012

O pré-tratamento do íleo de cobaia com o plasma da SBJ tratado pelo método de U&K durante 1 minuto, seguido da adição de BK revelou uma potenciação de 23% do valor médio produzido pela BK num total de 6 (seis) experimentos, conforme descrito na tabela 10 a seguir.

O ensaio em íleo de cobaia permitiu determinar a unidade potenciadora (U. P.) ou Fator de Potenciação.

A atividade potenciadora máxima foi determinada através de uma curva log da dose X resposta (altura da contração) com as doses utilizadas na curva padrão de BK (Figura 21).

Através desta curva calcula-se o número de vezes que a BK foi potenciada pela amostra (plasma).

Em estudo comparativo com o plasma da SBJ tripsinizado, o método que forneceu para o plasma a maior atividade potenciadora em íleo isolado de cobaia foi o método de determinação de bradicininogênio U&K.

Tabela 10: Efeito potenciador do plasma em íleo isolado de cobaia após adição de dose padrão de BK (40 ng/40 ul e 80 ng/80 ul) usando o plasma da SBJ (250 µg/mL) em Método de U&K.

N. do experimento.	µL de plasma (PL)	Extensão de Contração (cm) do plasma (PL)	Valor do PL equivalente de BK (Padrão 80ng e 160ng) antes.	Valor Médio de BK em cm (antes do peptídeo incubado do PI da SBJ)	Valor Médio de BK em cm (após o peptídeo incubado do PL da SBJ)	Fator de Potenciação (P)	% potenciação
1	40	0,85	3,61ng	9,4cm	10,7cm	1.13	13%
	80	1,25	8,92ng	11,2cm	13,5cm	1.20	20%
2	40	1,85	6,98ng	10,6cm	15,8cm	1.49	49%
	80	2,4	12,97ng	14,8cm	15,8cm	1.06	6%
3	40	0,65	5,02ng	5,0cm	4,4cm	0.88	-
	80	0,4	4,26ng	7,5cm	6,8cm	0.90	-
4	40	0,35	1,60ng	8,7cm	8,7cm	1	-
	80	0,5	4,87ng	8,2cm	11,3cm	1.37	37%
5	40	2,15	8,19ng	10,5cm	11,2cm	1.06	6%
	80	2,4	15,73ng	12,2cm	12,2cm	1	-
6	40	0,35	1,72ng	8,1cm	7,5cm	0.92	-
	80	0,75	6,25ng	9,6cm	10,4cm	1.08	8%

4.7.4. METODOLOGIA DE ANÁLISE DE RESULTADOS DA TABELA 10

A Metodologia de análise de resultados foi a mesma utilizada na tabela 7.

4.8. ENSAIO DE ÍLEO ISOLADO DE COBAIA UTILIZANDO O PLASMA DA SERPENTE SCDT NAS METODOLOGIAS DE DETERMINAÇÃO DE BRADICININOGÊNIO D&C E U&K

Este ensaio foi realizado com o objetivo de analisar o efeito do plasma utilizando os métodos de determinação de bradiginogênio D&C e U&K, para analisar possíveis efeitos de potenciação da bradiginina sintética de mamíferos, uma vez que o próprio plasma não causou nenhum efeito de contração significativa.

Após a montagem do íleo isolado de cobraia (descrito detalhadamente em material e métodos e apêndice 7.2.3).

O protocolo nestes ensaios iniciou-se com uma curva dose crescente da bradiginina sintética de mamíferos (BK), para posteriormente uma curva com doses duplas de 80 μ L e 160 μ L de plasma, na qual foi calculada sua concentração em ng de acordo com o valor da contração causada por estas no íleo (tabelas 13 e 16) e logo após outra curva dose crescente de bradiginina (BK).

Para finalizar os ensaios aplicamos doses alternadas de BK e de plasma e outra curva de doses crescente de BK, na qual analisaremos os efeitos nas próximas figuras.

4.8.1. ESTUDO DA POTENCIAÇÃO DOS EFEITOS DA BRADICININA (BK) PELO PLASMA DA SCDT TRATADO PELO MÉTODO DE D&C

Figura 22: Dose-efeito da contração (cm) do íleo de cobaia, (N=7) antes e após da incubação pelo plasma da SCDT (150 µg/mL) pelo método de D&C (Média de contração em cm).

Tabela 11: Curva dose-efeito da BK em íleo de cobaia antes da adição do material da SCDT (150 µg/mL) pelo método de D&C (Teste T-student) (EPM: Erro padrão médio).

<u>Dose (ng)</u>	<u>Média do Efeito (cm)</u>	<u>Desvio</u>	<u>EPM</u>
20	3,51	1,650	0,623
40	5,38	2,435	0,920
80	7,31	2,642	0,998
160	9,92	4,002	1,513

Tabela 12: Curva dose-efeito da BK em íleo de cobaia após a adição do material da SCDT (150 µg/mL) pelo método de D&C (Teste T-student) (EPM: Erro padrão médio).

<u>Dose (ng)</u>	<u>Média do Efeito (cm)</u>	<u>Desvio</u>	<u>EPM</u>
20	3,25	1,101	0,416
40	4,51	0,997	0,377
80	7,15	1,979	0,748
160	10,05	4,028	1,522

O pré-tratamento do íleo de cobaia com o plasma da SCDT tratado pelo método de D&C durante 1 minuto, seguido da adição de BK revelou uma potenciação significativa de 11,5% em relação à BK controle em 7 (sete) experimentos, conforme descrito na tabela 13 a seguir.

O ensaio em íleo de cobaia permitiu determinar a unidade potenciadora (U. P.) ou Fator de Potenciação.

A atividade potenciadora máxima foi determinada através de uma curva log da dose X resposta (altura da contração) com as doses utilizadas na curva padrão de BK (Figura 22).

Através desta curva calcula-se o número de vezes que a BK foi potenciada pela amostra (plasma).

Tabela 13: Efeito potenciador do plasma em íleo isolado de cobaia após adição de dose padrão de BK (80 ng/80ul e 160 ng/160ul) usando o plasma da SCDT (150 µg/ml) em Método de D&C.

N. do experimento.	µL de plasma (PL)	Extensão de Contração (cm) do plasma (PL)	Valor do PL equivalente de BK (Padrão 80ng e 160ng) antes.	Valor Médio de BK em cm (antes do peptídeo incubado do PI da SCDT)	Valor Médio de BK em cm (após o peptídeo incubado do PL da SCDT)	Fator de Potenciação (P)	% potenciação
1	80	0,2	3,47ng	4,6cm	5,8cm	1.26	26%
	160	0,3	8,27ng	5,8cm	6,8cm	1.17	17%
2	80	0,5	6,25ng	6,4cm	6,4cm	1	-
	160	0,85	18,88ng	7,2cm	6,7cm	0.93	-
3	80	0,5	5,33ng	7,5cm	7,8cm	1.04	4%
	160	0,85	13,33ng	10,2cm	11,5cm	1.12	12%
4	80	1,15	8,51ng	10,8cm	10,5cm	0.97	-
	160	1,35	12,48ng	17,3cm	16,9cm	0.97	-
5	80	0,3	3,07ng	7,8cm	7,0cm	0.89	-
	160	0,3	4,24ng	11,3cm	12,4cm	1.09	9%
6	80	0,45	9,47ng	3,8cm	4,3cm	1.13	13%
	160	0,7	8,88ng	6,3cm	5,5cm	0.87	-
7	80	0,2	1,55ng	10,3cm	8,3cm	0.80	-
	160	0,8	11,22ng	11,4cm	10,6cm	0.92	-

4.8.2. METODOLOGIA DE ANÁLISE DE RESULTADOS DA TABELA 13

A Metodologia de análise de resultados foi a mesma utilizada na tabela 7.

4.8.3. ESTUDO DA POTENCIAÇÃO DOS EFEITOS DA BRADICININA (BK) PELO PLASMA DA SCDT TRATADO PELO MÉTODO DE U&K

Figura 23: Dose-efeito da contração (cm) do íleo de cobaia, (N=6) antes e após da incubação pelo plasma da SCDT (150 µg/mL) pelo método de U&K (Média de contração em cm).

Tabela 14: Curva dose-efeito da BK em íleo de cobaia antes da adição do material da SCDT (150 µg/mL) pelo método de U&K (Teste T-student) (EPM: Erro padrão médio).

Dose (ng)	Média do Efeito (cm)	Desvio	EPM
20	3,55	1,339	0,506
40	7,18	2,288	0,864
80	9,46	2,429	0,918
160	11,82	2,560	0,967

Tabela 15: Curva dose-efeito da BK em íleo de cobaia após a adição do material da SCDT (150 µg/mL) pelo método de U&K (Teste T-student) (EPM: Erro padrão médio).

Dose (ng)	Média do Efeito (cm)	Desvio	EPM
20	4,6	1,877	0,709
40	7,1	2,407	0,909
80	10,67	2,505	0,946
160	12,26	2,482	0,938

O pré-tratamento do íleo de cobaia com o plasma da SCDT tratado pelo método de U&K durante 1 minuto seguida a adição de BK revelou uma potenciação de 17,6%, comparada à BK controle, em 6 (seis) experimentos. Os resultados estão descritos na tabela 16, a seguir.

O ensaio em íleo de cobaia permitiu determinar a unidade potenciadora (U.P.) ou Fator de Potenciação.

A atividade potenciadora máxima foi determinada através de uma curva log da dose X resposta (altura da contração) com as doses utilizadas na curva padrão de BK (Figura 23).

Através desta curva calcula-se o número de vezes que a BK foi potenciada pela amostra (plasma).

Em estudo comparativo com o plasma da SCDT tripsinizado, o método que forneceu para o plasma a maior atividade potenciadora em íleo isolado de cobaia foi o método de determinação de bradicininogênio U&K.

Tabela 16: Efeito potenciador do plasma em íleo isolado de cobaia após adição de dose padrão de BK (80 ng/80 ul e 160 ng/160 ul) usando o plasma da SCDT (150 µg/mL) em Método de U&K.

N. do experimento.	µL de plasma (PL)	Extensão de Contração (cm) do plasma (PL)	Valor do PL equivalente de BK (Padrão 80ng e 160ng) antes.	Valor Médio de BK em cm (antes do peptídeo incubado do PI da SCDT)	Valor Médio de BK em cm (após o peptídeo incubado do PL da SCDT)	Fator de Potenciação (P)	% potenciação
1	80	0,15	1,44ng	8,3cm	9,8cm	1,18	18%
	160	0	0ng	12,6cm	13,3cm	1,05	5%
2	80	0	0ng	8,7cm	9,4cm	1,08	8%
	160	0	0ng	10,4cm	11,0cm	1,05	5%
3	80	0	0ng	11,6cm	11,8cm	1,01	1%
	160	0,35	4,24ng	13,2cm	13,3cm	1,00	-
4	80	1	15,38ng	5,2cm	6,3cm	1,21	21%
	160	1,4	32,94ng	6,8cm	7,4cm	1,08	8%
5	80	2,7	20,76ng	10,4cm	13,4cm	1,28	28%
	160	3,2	36,05ng	14,2cm	15,1cm	1,06	6%
6	80	1,5	9,52ng	12,6cm	13,4cm	1,06	6%
	160	0,6	6,95ng	13,8cm	13,5cm	0,97	-

4.8.4. METODOLOGIA DE ANÁLISE DE RESULTADOS DA TABELA 16

A Metodologia de análise de resultados foram os mesmos utilizados na tabela 7.

4.9. ANÁLISE DOS RESULTADOS DE POTENCIAÇÃO DO ÍLEO ISOLADO DE COBAIA

No ensaio "in vitro" de íleo isolado de cobaia não obtivemos efeitos significativos de contração (cm) dos plasmas analisados, mas obtivemos um valor consideravelmente significativo em potenciação da bradicinina de mamíferos sintéticos.

Os valores médios de potenciação foram:

Com o PL da SBJ pelo método de D&C obtivemos uma potenciação da BK no valor de 20% do valor médio obtido antes da administração do PL.

Com o PL da SBJ pelo método de U&K obtivemos uma potenciação da BK no valor de 23% do valor médio obtido antes da administração do PL.

Com o PL da SCDT pelo método de D&C obtivemos uma potenciação da BK no valor de 11,57% do valor médio obtido antes da administração do PL.

Com o PL da SCDT pelo método de U&K obtivemos uma potenciação da BK no valor de 17% do valor médio obtido antes da administração do PL.

Comparando todos os dados resultantes de todos os ensaios de íleo isolado de cobaia com suas respectivas metodologias empregadas, o maior índice de potenciação foi o plasma da SBJ utilizando a metodologia de determinação de bradicininogênio U&K, como pode ser observado na figura 24 a seguir:

Figura 24: Comparação das Doses/Contração dos ensaios de Íleo Isolado de Cobraia, com plasma das serpentes BJ e CDT tratados com os métodos de Diniz & Carvalho e Uchida & Katori. Os valores estão baseados na média de cada dose de cada experimento.

4.10. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA NA PRESENÇA DO PLASMA DA SBJ TRIPSINIZADO CORADO COM PRATA

Figura 25: Análise do Plasma de SBJ tratado com tripsina pelo método de D&C, material bruto e corado com Prata.

Gel de Poliacrilamida na presença de SDS-PAGE a 12,5%

- 1- Padrão de massa molecular (29 a 205 kDa)
- 2- 10 µL (40 µg) de plasma de BJ tripsinizado bruto (250 µg/mL)
- 3- 20 µL (80 µg) de plasma de BJ tripsinizado bruto (250 µg/mL)
- 4- Padrão de Massa Molecular (13,5 a 97 kDa)

Figura 26: Análise do Plasma de SBJ tratado com tripsina, segundo o método de D&C, com marcadores de alto peso (29 - 205 kDa) e o de baixo peso (13 - 97 kDa) e corado com Prata.

Gel de SDS-Poliacrilamida a 12,5%

1. Padrão de massa molecular (13,5 a 97 kDa)
2. 20 μ L de tripsina (1000 μ g/mL)
3. 20 μ L de plasma de BJ tratado sem tripsina
4. 20 μ L de plasma de BJ Puro
5. 20 μ L de plasma tratado com tripsina após a hidrólise (250 μ g/mL)
6. 20 μ L de plasma tratado com tripsina e centrifugado para análise em HPLC após a hidrólise (250 μ g/mL)
7. Padrão de massa molecular (29 a 205 kDa)

4.11. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA NA PRESENÇA DO PLASMA DA SCDT TRATADO PELO MÉTODO DE D&C E CORADO COM PRATA

Figura 27: Gel de SDS-PAGE com o plasma da SCDT, tratado com tripsina e corado com Prata.

Gel de Poliacrilamida a 12,5%

- 1- Padrão de massa molecular (29 a 205 kDa)
- 2- 10 µL de plasma de CDT tripsinizado bruto (150 µg/mL)
- 3- 10 µL de plasma de CDT tripsinizado bruto (150 µg/mL)
- 4- Padrão de massa molecular (13,5 a 97 kDa)

Figura 28: Análise do Plasma da SBJ tratado com tripsina pelo método de Diniz & Carvalho, com marcadores de alto peso (29 - 205 kDa) e o de baixo peso (13 - 97 kDa) corado com Prata.

Gel de Poliacrilamida a 12,5%

1. Padrão de massa molecular (13,5 a 97 kDa)
2. 20 μ L de tripsina (1000 μ g/mL)
3. 20 μ L de plasma tratado sem tripsina
4. 20 μ L de plasma puro
5. 20 μ L de plasma tratado com tripsina (250 μ g/mL)
6. 20 μ L de plasma tratado com tripsina e centrifugado para análise em HPLC (250 μ g/mL)
7. Padrão de massa molecular (29 a 205 kDa)

4.12. COMPARAÇÃO DE ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA NA PRESENÇA DOS PLASMAS DAS SBJ E SCDT PELOS MÉTODOS DE D&C E U&K

Figura 29: Análise dos Plasmas das SBJ e SCDT pelos métodos D&C e U&K.

Gel de SDS-Poliacrilamida a 12,5%

- 1- Padrão de massa molecular (29 a 205 kDa)
- 2- 20 µL de plasma da SBJ pelo método de D&C (250 µg/mL)
- 3- 20 µL de plasma da SCDT pelo método de D&C (250 µg/mL)
- 4- 20 µL de plasma da SBJ pelo método de U&K (150 µg/mL)
- 5- 20 µL de plasma da SCDT pelo método de U&K (150 µg/mL)
- 6- Padrão de massa molecular (13,5 a 97 kDa)

Figura 30: Análise dos Plasmas das SBJ e SCDT pelos métodos D&C e U&K.

Gel de SDS-Poliacrilamida a 12,5%

- 1- 20 μ L de plasma da SBJ pelo método de D&C (250 μ g/mL)
- 2- 20 μ L de plasma da SBJ pelo método de U&K (250 μ g/mL)
- 3- 20 μ L de plasma da SCDT pelo método de D&C (150 μ g/mL)
- 4- 20 μ L de plasma da SCDT pelo método de U&K (150 μ g/mL)

4.13. ANÁLISE DOS GÉIS

No gel (figura 25), observamos as bandas da substância obtida pela incubação do plasma da SBJ pelo método de D&C, na qual identificamos o

cininogênio de alta massa molecular e baixa massa molecular. O plasma da SBJ apresentou bandas com massa molecular de no máximo 110 kDa.

No gel (figura 27), observamos as bandas obtidas da substância pela incubação do plasma da SCDT, na qual também foi possível identificar as bandas correspondentes ao cininogênio de alta e baixa massa molecular.

Nos géis (figuras 29 e 30) utilizamos os plasmas tratados pelas metodologias D&C e U&K, e podemos observar que a metodologia de D&C libera quantidades maiores de substância. De acordo com os resultados obtidos na metodologia de Bradford, também foi possível observar nestes géis que o plasma da SBJ contem maiores quantidades de material liberado.

4.14. ENSAIO DA PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA (P.A.M) DA SERPENTE ANESTESIADA

O Bioensaio em Pressão Arterial Média de Serpente foi utilizado para analisar o possível efeito da substância liberada dos plasmas das serpentes brasileiras SBJ e SCDT.

Figura 31: Modelo de Registro da Pressão Arterial Média da Serpente *Bothrops jararaca*, para dose-efeito do plasma da *Bothrops jararaca* tratado pelo método de D&C.

A figura 31 mostra o efeito causado pela substância resultante da incubação do plasma *Bothrops jararaca* (SBJ) com tripsina (T), um provável peptídeo hipotensivo.

A P.A.M foi analisada em serpentes brasileiras (SBJ e SCDT) que foram anestesiadas com sódio pentobarbital sub-escamal (30 mg/kg) e heparinizadas (conforme descrito no apêndice 7.2.1.)

Após a cirurgia e após a colocação da cânula na serpente, esta foi usada para registrar os efeitos causados pelos possíveis peptídeos provenientes do tratamento dos plasmas das SBJ e SCDT pelos métodos de D&C e U&K.

Em todos os ensaios com serpentes antes da análise do efeito do possível peptídeo realizamos um pré-tratamento com captopril ($0,05 \text{ mg/Kg}^{-1}$).

Segundo LAVRAS e cols. (1979) também se observa um efeito hipotensivo quando se administra o veneno da *Bothrops jararaca* (BJV) com pré administração do captopril ($0,05 - 0,10 \text{ mg/Kg}^{-1}$), um inibidor efetivo da enzima conversora da angiotensina I ou cininase II.

O material resultante da incubação do plasma da SBJ após liofilizado foi diluído em 2 mL de 0,9% NaCl e injetado na veia renal, verificando-se uma hipotensão significativa na serpente, contração significativa no ensaio de musculatura lisa em útero de serpente, mas segundo LAVRAS e cols. (1979) é inativo em úteros de ratos e oviduto de pombo. Esta mesma preparação produz contração quando preparada com plasma de pombo (PP).

Os ensaios de P.A.M. serviram para definir as frações com efeitos hipotensivos visíveis e significativos as quais foram purificadas conforme descrito a seguir em resultados da purificação em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

4.15. PURIFICAÇÃO EM CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

Para a obtenção do peptídeo puro do plasma (PL) da SBJ, primeiramente coletamos 30 mL do plasma da SBJ, o qual submetemos ao método de determinação de bradicininogênio D&C (metodologia descrita no item 3.2.3.), e posteriormente purificados e testados em ensaio de Pressão Arterial Média na própria serpente *Bothrops jararaca* (descrito no apêndice 7.2.1.).

Na primeira etapa realizamos uma Cromatografia Líquida de Alta eficiência, conforme descrito no item 3.2.6 (primeira etapa de purificação).

A figura 32 a seguir revela o perfil cromatográfico da primeira etapa de purificação, na quais separamos e coletamos dez frações. Essas frações foram analisadas no bioensaio de pressão arterial média na serpente *Bothrops jararaca*, para a identificação da fração com efeito potencialmente hipotensivo e novamente ser purificado.

4.15.1. PRIMEIRA ETAPA DA PURIFICAÇÃO DO PLASMA DA SBJ (SERPENTES *BOTHROPS JARARACA*) TRATADO PELO MÉTODO DE D&C

Figura 32: Perfil Cromatográfico da primeira etapa da purificação do plasma da SBJ (serpentes *Bothrops jararaca*) tratado com tripsina pelo método de determinação de bradicinogênio Diniz & Carvalho em HPLC. Utilizamos um fluxo de 1 mL/min, monitorado através de um detector UV a 214 nm. O gradiente utilizado foi de 5 a 95% de Fase B (Acetonitrila 90%) e Fase A (H₂O + TFA 0,1%). As frações foram coletadas conforme o delineamento descrito no gráfico de frações (F) 1 a 10.

Dessas coletas, as frações identificadas de frações (F) 1 a 10 foram analisadas e o registro da P.A M será demonstrado na figura 33. O tempo

esperado para administrar estas doses correspondia ao tempo necessário para ocorrer à normalização da pressão arterial.

4.15.2. PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA DA SBJ (SERPENTE *BOTHROPS JARARACA*), PARA ANÁLISE DAS FRAÇÕES DA PRIMEIRA ETAPA DE PURIFICAÇÃO DO PLASMA DA SBJ

Figura 33: Registro da pressão arterial média em serpente *Bothrops jararaca*, identificando a fração com efeito hipotensivo da primeira etapa de purificação, numeradas de F1 a F10.

Na pagina anterior (figura 33) demonstramos o bioensaio da pressão arterial média da SBJ, analisamos as frações de 1 a 10, e verificamos o efeito hipotensivo visível e significativo somente na fração 9 e em outras frações não obtivemos um efeito hipotensivo similar, sugerindo que a molécula hipotensora se encontra somente na fração 9. Confirmado seu efeito, esta fração foi novamente purificada em HPLC (Figura 34), utilizando a metodologia descrita no item 3.2.6. nomeado como segunda etapa de purificação. Segue-se a seguir o perfil cromatográfico da segunda etapa de purificação da fração 9.

4.15.3. PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO 9 DO PLASMA DA SBJ (SERPENTE *BOTHROPS JARARACA*)

Figura 34: Perfil Cromatográfico da segunda etapa de purificação da fração 9. Utilizamos um fluxo de 1 mL/min, monitorado através de um detector UV a 214 nm. O gradiente utilizado foi de 20 a 50% de Fase B (Acetonitrila 90%) e Fase A (H₂O + TFA 0,1%), na qual coletamos novamente as frações de 1 a 17, conforme descrito no cromatograma.

A fração 9 foi novamente purificada e dividida em várias outras frações, totalizando 17 frações, que foram analisadas novamente em ensaio de Pressão Arterial média na Serpente SBJ (figura 35).

4.15.4. PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA DA SBJ (SERPENTE *BOTHROPS JARARACA*), PARA ANÁLISE DAS FRAÇÕES DA SEGUNDA ETAPA DA PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO 9

Figura 35: Registro de Pressão Arterial Média da Serpente SBJ (250g), analisando as frações obtidas da purificação da fração 9, a qual resultou em 17 novas frações.

Primeiramente a serpente foi pré-tratada com Angiotensina I (1,5 mg/Kg) e captopril (0,1 mg/Kg), usados como controles. Após analisamos as 17 frações obtidas, nas quais foi identificado efeito hipotensor nas frações 13, 14 e 15, conforme descrito. O tempo esperado para administrar estas doses correspondia ao tempo necessário para ocorrer à normalização da pressão arterial.

Após a identificação do efeito hipotensivo nas frações 13, 14 e 15, foi purificado novamente com o objetivo de obter frações puras para análise no

espectrômetro de massa. Na purificação destas frações seguimos as metodologias utilizadas na segunda etapa de purificação, descritas no item 3.2.6.

4.15.5. TERCEIRA ETAPA DA PURIFICAÇÃO COM AS FRAÇÕES 13, 14 E 15 DA SBJ

Figura 36: Perfil cromatográfico da fração 13, obtida do plasma da **SBJ**, fração pura utilizada para a análise no espectrômetro de massa. Utilizamos um fluxo de 1 mL/min, monitorado através de um detector UV a 214 nm. O gradiente utilizado foi de 20 a 50% de Fase B (Acetonitrila 90%) e Fase A (H₂O + TFA 0,1%).

Figura 37: Perfil cromatográfico da fração 14, obtida do plasma da **SBJ**, fração pura utilizada para a análise no espectrômetro de massa. Utilizamos um fluxo de 1 mL/min, monitorado através de um detector UV a 214 nm. O gradiente utilizado foi de 20 a 50% de Fase B (Acetonitrila 90%) e Fase A (H₂O + TFA 0,1%).

Figura 38: Perfil cromatográfico da fração 15, obtida do plasma da **SBJ**, fração pura utilizada para a análise no espectrômetro de massa. Utilizamos um fluxo de 1 mL/min, monitorado através de um detector UV a 214 nm. O gradiente utilizado foi de 20 a 50% de Fase B (Acetonitrila 90%) e Fase A (H₂O + TFA 0,1%).

Após a purificação das frações 13, 14 e 15 da SBJ, coletamos as frações e concentramos em liofilizador, após ressuspendemos em NaCl 0,9% e analisamos novamente em ensaio de Pressão Arterial Média na serpente SBJ, onde se confirmaram os efeitos hipotensivos.

Estas frações foram analisadas em espectrômetro Q-TOF-MS no Laboratório de Espectrometria de Massa do CAT/CEPID do Instituto Butantan com a colaboração do Dr. Katsuhiko Konno e obtivemos seqüências derivadas apenas da fração 14. Os resultados constam nas tabelas 17 e 18.

4.15.6. ANÁLISE EM ESPECTROMETRIA DE MASSA Q-TOF

Tabela 17: Análise do Plasma da Serpente *Bothrops jararaca* (fração 14) no espectrômetro de massa. Desta análise foram obtidas as seguintes seqüências.

Íons moleculares	(M+H) ⁺	Seqüência do peptídeo
N	959.51	F-L-P-W-L-Q-R
K	1565.83	L-T-Q-D-L-G-A-Q-L-Q-P-L- L-R
E	1292.60	L-A-G-L-T-Q-N-F-W-S-R
C	1169.67	L-N-L-A-Q-T-L-L-Q-R
B	1004.60	Y-A-L-L-G-S-G-M-G...

Tabela 18: Análise do Plasma da Serpente *Bothrops jararaca* (fração 14) no espectrômetro de massa. Destas análises foram obtidas as seguintes seqüências.

Íons molecular	(M+H) ⁺	Seqüência do peptídeo
A	1009.59	N-A-L-L-S-D-L-M-K
B	1952.93	N-P-M-S-D-E-S-Q-S-L-A-S-A-L-E-A- F-R

Das seqüências acima obtidas, selecionamos o peptídeo A da tabela 18 para ser sintetizado, apesar deste peptídeo não apresentou homologia com uma seqüência de cinina. Realizamos a síntese desta para verificar sua atividade sobre a análise em pressão arterial média de serpente.

4.15.7. SÍNTESE DE PEPTÍDEOS

Realizamos a síntese do peptídeo A com a seguinte seqüência (N-A-L-L-S-D-L-M-K), realizamos pelo o método em fase sólida, estratégia Fmoc em sintetizador automáticos modelo Shimatzu PSSM-8, conforme descrito no apêndice 7.1.4.

Síntese realizada pela Pesquisadora Dra. Solange de Lima Netto do Laboratório de Bioquímica e Biofísica, em colaboração com o Laboratório de Espectrometria de Massa e Síntese do CAT/CEPID do Instituto Butantan. Após sua síntese realizamos a purificação deste para visualizar sua pureza, descrito na figura 39.

4.15.8. PERFIL CROMATOGRÁFICO DA PURIFICAÇÃO DO PEPTÍDEO SINTÉTICO (N-A-L-L-S-D-L-M-K)

Figura 39: Perfil cromatográfico da purificação do peptídeo (N-A-L-L-S-D-L-M-K) sintético. Utilizamos um fluxo de 1 mL/min, monitorado através de um detector UV a 214 nm. O gradiente utilizado foi de 5 a 40% de Fase B (Acetonitrila 90%) e Fase A (H₂O + TFA 0,1%).

Após sua purificação, concentramos este peptídeo sintético no liofilizador e após ressuspendemos com NaCl 0,9% e analisamos novamente em ensaio de Pressão Arterial Média da serpente SBJ, no qual não se confirmou o efeito hipotensivo, o que sugere que este peptídeo não interage com o sistema caliceína-cinina da serpente (Análise do peptídeo na pressão arterial média da serpente na figura 40).

4.15.9. PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA NA SERPENTES *BOTHROPS JARARACA*, ANALISANDO O PEPTÍDEO SINTÉTICO (N-A-L-L-S-D-L-M-K)

Figura 40: Pressão arterial média na serpente *Bothrops jararaca*, anestesiada com pentobarbital sódico 30 mg/Kg, testando o peptídeo sintético (N-A-L-L-S-D-L-M-K) com uma solução 500 µg/500 µL, plasma da SBJ (*Bothrops jararaca*) e fração 9 do plasma da SBJ com uma concentração de 250 µg/mL.

No ensaio de pressão arterial média da SBJ administramos injeções intravenosas da seguinte forma: seguindo a "seta" indicada na figura. Primeiramente injetamos 0,2 mL e 0,4 mL da fração 9, depois 0,3 mL do plasma da SBJ e então 0,2 mL e 0,4 mL do peptídeo sintético e finalmente 0,4 e 0,3 mL do plasma da SBJ.

Devido ao resultado não satisfatório deste peptídeo sintético, realizamos outra análise em espectrometria de massa, utilizamos uma metodologia por degradação de Edman, que foi realizado pela Dra. Ana Gisele C. Neves Ferreira do Dep. Fisiologia e Farmacodinâmica da FIOCRUZ - RJ (metodologia descrita no apêndice 7.1.3.).

As seqüências obtidas estão descritas na tabela 19.

4.15.10. ANÁLISE EM ESPECTROMETRIA DE MASSA Q-TOF

Tabela 19: Análise no espectrometro de massa do Plasma da SBJ (Fração 14). Desta análise foram obtidas as seguintes seqüências.

	Seqüências Obtidas	Seqüências Obtidas
SBJ	14 resíduos de aa.	6 resíduos de aa.
Fração 14	SKPNMSDESLAVAI	NPFVDA

Na fração 14, obtivemos 2 seqüências, nas quais não confirmaram homologia com as seqüências obtidas anteriormente, mas que confirmaram homologia com soro albumina de *Trimeresurus flavoviridis* (inibidor de PLA2 miotóxica).

De acordo com este resultado, parece que a seqüência não se trata de uma cinina, segundo a literatura, as cininas são diferentes em apenas alguns aminoácidos, conservando sempre aminoácidos padrões, de acordo com a seqüência da BK (Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg). Este resultado sugere a possibilidade de se tratar de novos compostos peptídicos com atividade hipotensora, as quais somente futuras análises confirmarão.

4.16. ANÁLISE DO PLASMA DE *CROTALUS DURISSUS TERRIFICUS*

Para obtermos o peptídeo puro, primeiramente coletamos 30 mL do plasma da SCDT, submetemos ao método de determinação de bradicininogênio D&C (metodologia descrita no item 3.2.3.), para posterior purificação com o auxílio de ensaio de Pressão Arterial Média da serpente *Bothrops jararaca* (descrito no apêndice 7.2.1.).

Na primeira etapa de purificação, realizamos uma Cromatografia Líquida de Alta eficiência, conforme descrito no item 3.2.6 (primeira etapa de purificação).

A figura 41 revela o perfil cromatográfico da primeira etapa de purificação, na qual separamos e coletamos 14 frações (F). Essas frações foram analisadas em ensaio de pressão arterial média na serpente *Bothrops jararaca*, para a identificação da fração com efeito hipotensivo significativo e depois ser novamente purificado.

4.16.1. PERFIL CROMATOGRÁFICO DA PRIMEIRA ETAPA DA PURIFICAÇÃO DO PLASMA DA SCDT (SERPENTE *CROTALUS DURISSUS TERRIFICUS*) TRATADA PELO MÉTODO DE D&C

Figura 41: Perfil cromatográfico da primeira etapa da purificação do plasma da SCDT (*Crotalus durissus terrificus*) em HPLC. Utilizamos um fluxo de 1 mL/min, monitorado através de um detector UV a 214 nm. O gradiente utilizado foi de 5 a 95% de Fase B (Acetonitrila 90%) e Fase A (H₂O + TFA 0,1%), dividido em 14 frações, que obedeceu a ordem de coleta, a fração 8 e 9 marcadas com uma seta foram encontrado atividade hipotensora, na pressão arterial da própria serpente SCDT.

4.16.2. ENSAIO DA P.A.M EM SERPENTE ANESTESIADA

Primeiramente analisamos o plasma da SCDT na pressão arterial média da serpente SBJ, conforme na literatura de Abdalla e cols. (1989), doses destas frações não causaram efeitos significativos. De acordo com estes

resultados, sugerimos diferenças entre a substância obtida pelo plasma da SCDT com a obtida do plasma da SBJ (Figura 42 (a,b)).

4.16.3. PERFIL DA PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA NA SBJ TESTANDO O PLASMA DA SCDT TRATADA PELO MÉTODO DE D&C

Figura 42a: Registro da Pressão arterial média da SBJ (*Bothrops jararaca*), testando o plasma da SCDT (*Crotalus durissus terrificus*) tratada com tripsina. (150 μ g/mL) com injeções de 0,8 mL e 0,3 mL de CDT, resultando em um material inativo na pressão arterial média da SBJ.

Posteriormente, testamos as frações obtidas da primeira purificação do plasma da SCDT e os resultados confirmaram efeitos negativos (Conforme descrito na figura 42b).

70 50 30 10 mmHg

Figura 42b: Pressão arterial média da serpente *Bothrops jararaca*, para análise das frações da primeira purificação da substância liberada do plasma da *Crotalus durissus terrificus* pelo método de D&C; doses padrões de 0,3 mL com uma solução padrão de (150 µg/mL), 0,3 mL de PL BJ (250 µg/mL), 0,3 mL da fração 9 de BJ (250 µg/mL), 0,3 mL de PL CDT (*crotalus durissus terrificus* bruta) sem purificar (150 µg/mL), 0,3 mL captopril (0,1 mg/Kg) e 0,3 mL AI (100 µg/mL).

Conforme os resultados negativos do ensaio de pressão arterial média da SBJ, realizamos o ensaio da pressão arterial média da própria SCDT com o plasma bruto da SCDT para a confirmação do efeito, descrito a seguir (figura 43).

4.16.4. PERFIL DA PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA DA SCDT TESTANDO O PLASMA DA SCDT TRATADA PELO MÉTODO DE D&C (1963)

Figura 43: Pressão Arterial média da serpente SCDT (*Crotalus durissus terrificus*), testando Injeções intravenosas de 0,3 mL do plasma da SCDT tripsinizado sem purificar (300 µL/mL) material bruto.

Utilizando o ensaio de pressão arterial média da própria SCDT, efeitos significativos do plasma da SCDT foi obtido, confirmando a possibilidade de o peptídeo ser vasoativo e diferente do obtido do plasma da SBJ. Posteriormente realizamos o ensaio de pressão arterial média da SCDT para testar as frações da primeira purificação (figura 44).

4.16.5. PERFIL DA PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA DA SCDT TESTANDO AS FRAÇÕES DA PRIMEIRA PURIFICAÇÃO DO PLASMA DA SCDT TRATADA PELO MÉTODO DE D&C (1963)

Figura 44: Pressão Arterial média da serpente SCDT (*Crotalus durissus terrificus*), testando as frações da primeira purificação do plasma da mesma tratada com tripsina. Injetamos intravenosamente 0,3 mL de cada fração (150 µL/mL).

Analizamos todas as 14 frações resultantes da primeira purificação do plasma da CDT, e foi confirmado um efeito significativo somente nas frações 8 e 9. O tempo esperado para administrar estas doses correspondia ao tempo necessário para ocorrer a normalização da pressão arterial.

Posteriormente submetemos as frações 8 e 9 para uma repurificação e a metodologia empregada encontra-se no item 3.2.6.

Segue-se a seguir as próximas cromatografias das frações 8 e 9 do plasma da SCDT, na qual resultou em novas frações. Estas frações foram coletadas conforme descrito nos cromatogramas.

4.16.6. SEGUNDA ETAPA DA PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO 8 DO PLASMA DA SERPENTE SCDT

Figura 45: Perfil Cromatográfico da fração 8 da CDT (*Crotalus durissus terrificus*), na qual a fração 5, a seta indica a fração ativa na pressão arterial média da SCDT. Utilizamos um fluxo de 1 mL/min, monitorado através de um detector UV a 214 nm. O gradiente utilizado foi de 20 a 50% de Fase B (Acetonitrila 90%) e Fase A (H₂O + TFA 0,1%)

4.16.7. SEGUNDA ETAPA DA PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO 9 DO PLASMA DA SCDT

Figura 46: Perfil Cromatográfico da fração 9 da CDT (*Crotalus durissus terrificus*), onde nas frações 3 e 4, as setas indicam a atividade na pressão arterial média da SCDT. Utilizamos um fluxo de 1 mL/min, monitorado através de um detector UV a 214 nm. O gradiente utilizado foi de 20 a 50% de Fase B (Acetonitrila 90%) e Fase A (H₂O + TFA 0,1%)

Segue-se abaixo o perfil do ensaio de Pressão Arterial Média da Serpente CDT, confirmando os efeitos sobre as frações 8 (5) e o 9 (3,4).

4.16.8. PERFIL DA PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA DA SCDT TESTANDO AS FRAÇÕES DA SEGUNDA ETAPA DE PURIFICAÇÃO DO PLASMA DA SCDT TRATADA PELO MÉTODO DE D&C (1963)

Figura 47: Pressão Arterial média da serpente CDT (*Crotalus durissus terrificus*), testando as frações 8 e 9 purificados do plasma da mesma tratada com tripsina. Cada fração foi resultante da cromatografia. Injeções intravenosas de 0,3 mL de cada fração (150 µL/mL).

A purificação da fração 8, resultou em novas 6 frações, as quais foram analisadas em ensaio de pressão arterial média da SCDT e confirmou um efeito hipotensivo significativo, somente na fração 5. O tempo esperado para administrar estas doses na veia renal da serpente correspondia ao tempo necessário para ocorrer à normalização da pressão arterial, que por sua vez foi purificada novamente e encaminhada para análise no espectrômetro de massa.

A purificação da fração 9 resultou em novas 5 frações, que foram analisadas em ensaio de pressão arterial média da SCDT, confirmando um efeito hipotensivo significativo nas frações 3 e 4. O tempo esperado para administrar estas doses na veia renal da serpente correspondia ao tempo necessário para ocorrer a normalização da pressão arterial. Estas frações foram novamente purificadas e encaminhadas para análise no espectrômetro de massa.

Segue-se abaixo os perfis cromatograficos da purificação das frações 8(5), 9(3) e 9(4).

4.16.9. PERFIL CROMATOGRÁFICO DO POOL 8 (5)

Figura 48: Perfil Cromatográfico da fração 8 (5) do plasma da SCDT (*Crotalus durissus terrificus*). Utilizamos um fluxo de 1 mL/min, monitorado através de um detector UV a 214 nm. O gradiente utilizado foi de 20 a 50% de Fase B (Acetonitrila 90%) e Fase A (H₂O + TFA 0,1%).

4.16.10. PERFIL CROMATOGRÁFICO DO POOL 9 (3)

Figura 49: Perfil Cromatográfico da fração 9 (3) do plasma da SCDT (*Crotalus durissus terrificus*). Utilizamos um fluxo de 1 mL/min, monitorado através de um detector UV a 214 nm. O gradiente utilizado foi de 20 a 50% de Fase B (Acetonitrila 90%) e Fase A (H₂O + TFA 0,1%)

4.16.11. PERFIL CROMATOGRÁFICO DO POOL 9 (4)

Figura 50: Perfil Cromatográfico da fração 9 (4) do plasma da SCDT (*Crotalus durissus terrificus*). Utilizamos um fluxo de 1 mL/min, monitorado através de um detector UV a 214 nm. O gradiente utilizado foi de 20 a 50% de Fase B (Acetonitrila 90%) e Fase A (H₂O + TFA 0,1%)

Todas as frações foram encaminhadas para análise no espectrômetro de massa. As seqüências obtidas estão descritas na tabela 17.

4.16.12. ANÁLISE EM ESPECTROMETRIA DE MASSA Q-TOF

Tabela 20: Análise por espectrometria de massa do plasma da SCDT [fração 8(5)]. Desta análise foram obtidas as seguintes seqüências (Análise realizada pela Dr. Ana Gisele C. Neves Ferreira do Dep. Fisiologia e Farmacodinâmica da FIOCRUZ - RJ).

	Seqüência do peptídeo	Seqüência do peptídeo
SCDT	15 resíduos de aa.	15 resíduos de aa.
Fração 8(5)	SIPQAPTSNLIEATK	KPDANQVLIQVIGV

Da fração 8(5), obtivemos 2 seqüências que confirmaram homologia com soro albumina de *Trimeresurus flavoviridis* (inibidor de PLA2 miotóxica), de acordo com a pesquisa de homologia e confirmando também homologia com a seqüência obtida do plasma da SBJ.

Com essas seqüências, sugerimos a possibilidade de se tratar de novos princípios peptídicos com atividade hipotensora, na qual futuras análises confirmarão este efeito.

5. DISCUSSÃO

A ação cardiovascular de peptídeos retirados dos plasmas das serpentes *Bothrops jararaca* com atividade relacionada à BK diferem apreciavelmente dos peptídeos de mamíferos. (CONLON e cols., 1999) Em mamíferos injeções de BK reduzem rapidamente a pressão sanguínea e causam vasodilatação arteriolar, aumentando a ativação da prostaglandinas e síntese de óxido nítrico (DONALD e cols., 1990).

O óxido nítrico (NO) é um gás instável gerado nas paredes vasculares a partir de L-arginina pela ação tanto pela cNOS (óxido nítrico sintase constitutiva) como pela iNOS (forma induzida), pertencentes a uma família de enzimas encontradas em muitas células incluindo as que constituem o cérebro, vasos sanguíneos e macrófagos (SIIGUR e cols., 2001).

Depois de formado, o NO atravessa o espaço do endotélio para o músculo vascular liso e estimula diretamente a enzima guanilato ciclase solúvel e a conseqüente formação de cGMP (monofosfato cíclico de guanosina) intracelular, resultando no relaxamento das células da musculatura lisa vascular (LYONS e cols., 1995).

Doses do peptídeo obtido a partir dos plasmas da SBJ e da SCDT, na veia carótida da serpente anestesiada causaram uma hipotensão significativa com duração média de 1,0 min, resposta também observada com o peptídeo obtido através do plasma da serpente *Python*, na pressão arterial média da própria serpente *Python regius*, causando resistência vascular renal, ativação da via nociceptiva e estimulação das fibras aferentes simpáticas (UCHIDA e cols., 1974).

Respostas similares também foram observadas no estudo do sistema caliceína-cinina em outros animais como em galinhas, onde injeções da ornitocinina (Thr⁶, Leu⁸) - BK) produziu uma resposta hipotensiva com duração (< 1min); também uma resposta similar foi observada com injeções do plasma do jacaré (*Alligator mississippiensis*) (Thr⁶) -BK no próprio jacaré anestesiado, em que injeções na veia jugular do jacaré anestesiado causou uma hipotensão com duração de (< 2min). A dose padrão para uma resposta hipotensiva corresponde a 0,07 µg/Kg, dose correspondente à de ratos (COMEAU e cols., 1992).

Em contraste, injeções da (Thr⁶) - BK de jacaré não produziu alteração na pressão sanguínea sistemática de tartarugas (*Pseudemys scripta*) anestesiadas, confirmando que as cininas de tartaruga e jacaré são apreciavelmente diferentes (CONLON e cols., 1990).

No presente estudo foi observado o efeito direto do plasma das SBJ e SCDT tratados pelos métodos de determinação de bradixinogênio D&C e U&K em parâmetros cardiovasculares nas próprias serpentes e em mamíferos, e verificamos a presença de um peptídeo com atividade similar à BK de mamíferos que foi capaz de potenciar o efeito da BK.

Apesar da literatura conter dados relatando que o plasma das serpentes não causa efeitos na pressão sanguínea de mamíferos, assim como a serpente *Python reticulatus*, a tartaruga *Pseudemys scripta*, (CONLON e cols., 1990) o jacaré (*Alligator mississippiensis*), observamos que cininogênio quando clivado com tripsina gera uma bradixinina distinta da bradixinina de mamíferos (COMEAU e cols., 1992).

Os resultados obtidos demonstram que os plasmas das serpentes *Bothrops jararaca* e da *Crotalus durissus terrificus* tratados com tripsina geraram um peptídeo que causou uma hipotensão significativa em experimentos utilizando ratos Wistar anestesiados e ratos SHR (spontaneous hypertensive rats) acordados, não anestesiados, concluindo assim que o possível peptídeo obtido dos plasmas tanto da SBJ quanto da SCDT, seja um peptídeo com uma seqüência de aminoácidos diferentes das cininas de répteis já estudadas até o presente momento, resultando em um peptídeo com estrutura similar à da BK de mamífero, sugerindo um peptídeo com ação efetiva no sistema calicreína cinina.

Resultados de outros autores talvez não tenham obtido este efeito em função da dose empregada, pois utilizamos em nossos experimentos doses de bradicinina sintética de 0,5 µg e 1,0 µg, enquanto a das serpentes foram 25 µg e 50 µg para SBJ e 15 µg e 30 µg para SCDT. Poderia também se tratar de uma preparação não purificada.

Analisando as metodologias foi observado que no método de Diniz & Carvalho os plasmas das SBJ e da SCDT causaram efeitos similares, uma vez que o plasma da SCDT, segundo determinação de proteínas pelo método de Bradford, tinha menos material por mL, confirmando então ser mais ativo que o da SBJ conforme concluído dos resultados observados em experimentos da pressão arterial média de ratos.

Primeiramente foi testado o plasma tratado pelo método de determinação de bradicininogênio sem purificação, no bioensaio de pressão arterial média de ratos normotensos. Os plasmas da SBJ e da SCDT tratados pelo método de Diniz & Carvalho demonstraram uma atividade hipotensora significativa, sendo que o plasma da SBJ (250 µg/mL), diluído em 2 mL de

NaCL, e administrado com injeções de 0,1 mL (25 µg) causou uma hipotensão média de -30,4 mmHg com a duração de 1,6 minutos, e injeções de 0,2 mL (50 µg) causaram uma hipotensão média de -30,5 mmHg com a duração de 1,9 minutos; comparando com injeções da bradicinina sintética (0,5 µg) na pressão arterial média do mesmo rato, a bradicinina causou uma hipotensão média de -25,7 mmHg com 0,7 minutos de duração, permitindo concluir que o plasma da serpente *Bothrops jararaca* contenha peptídeos ativos em mamíferos, mas com doses bem superiores.

Para o plasma da SCDT (150 µg/mL segundo determinação pela técnica de Bradford), injeções de 0,1 mL (15 µg) causaram uma hipotensão média de -31,6 mmHg com a duração de 0,9 minutos, e injeções de 0,2 mL (30 µg) causaram uma hipotensão média de -30,6 mmHg com a duração de 1,4 minutos; comparando com injeções da bradicinina sintética (0,5 µg) na pressão arterial média do mesmo rato, a bradicinina causou uma hipotensão média de -22 mmHg com 0,8 minutos de duração.

Sugerimos que o material liberado tanto do plasma da *Bothrops jararaca* como da *Crotalus durissus terrificus* possua uma cinina análoga a de mamíferos ou um novo peptídeo hipotensor com atividade eficaz em mamíferos.

Neste mesmo experimento o material liberado do plasma da SBJ potenciou a bradicinina em 34% e o da SCDT potenciou em 69% o efeito da bradicinina sintética em mmHg,. Na duração do efeito, o plasma da SBJ potenciou em 100% a bradicinina enquanto o da SCDT potenciou em 50%, resultados bastante significativos, em que os efeitos poderão estar relacionados a possíveis inibidores da ECA ou cininase II, onde efeito similar é obtido com doses de 0,1 mg/Kg de um inibidor efetivo da ECA, o captopril, comercialmente utilizado para tratamento de hipertensão em humanos.

No ensaio utilizando (25 µg) do plasma da SBJ tratado pelo método de Uchida & Katori (1977), obtivemos uma hipotensão média de -11,3 mmHg com duração de 0,9 minutos; usando (50 µg) resultou numa hipotensão média de -18,4 mmHg com duração de 0,9 minutos. Com o plasma da SCDT, empregando (15 µg) resultou numa hipotensão média de -39,3 mmHg com duração de 1,8 minutos e usando (30 µg), resultou numa hipotensão média de -47,3 mmHg com duração de 1,5 minutos.

Neste mesmo experimento o material liberado do plasma da SBJ potenciou em 58% o efeito da bradicinina sintética e da SCDT potenciou 93%. Na duração do efeito, o plasma da SBJ potenciou em 33% enquanto o da SCDT potenciou em 75%, tornando-se também um possível peptídeo potenciador da bradicinina em mamíferos.

Apesar de o tratamento do plasma da SCDT fornecer menos quantidade de material ativo de seu plasma, foi observado que sua atividade é muito mais intensa que o obtido no plasma da BJ.

Com esses dados realizamos experimento "in vitro" em íleo isolado de cobaia, onde foi analisado o material resultante dos métodos, ensaio utilizado para analisar possíveis efeitos contráteis do íleo e possíveis efeitos potenciadores da ação contrátil da bradicinina.

Resultados preliminares indicaram que o plasma da SBJ pelo método de Uchida & Katori liberou um material que resultou em 23% de potenciação da bradicinina e nenhum efeito direto sobre o íleo isolado de cobaia; já o método de Diniz & Carvalho liberou um material que resultou em 21% de potenciação da bradicinina e também nenhum efeito direto de contração sobre o íleo isolado de cobaia.

O plasma da SCDT tratado pelo método de Uchida & Katori liberou um material que resultou em 17,6% de potenciação da bradicinina e nenhum efeito direto sobre o íleo isolado de cobaia, enquanto o método de Diniz & Carvalho liberou um material que resultou 11,5% de potenciação da bradicinina e também nenhum efeito direto de contração sobre o íleo isolado de cobaia.

Com esses resultados tudo indica que o material obtido pelo tratamento dos plasmas com tripsina gerou um potenciador efetivo da bradicinina onde seu mecanismo de ação será estudado logo após seu seqüenciamento e síntese.

Os dados obtidos por pesquisadores que estudaram os diversos peptídeos potenciadores, particularmente aqueles isolados de venenos de serpentes, demonstraram que há uma correlação entre a inibição da ECA "in vitro" e a potenciação dos efeitos da BK em preparação de músculo liso isolado.

Entretanto, outros autores acreditam que outros mecanismos possam estar envolvidos, uma vez que mesmo após a inibição completa da ECA por agentes inibidores irreversíveis alguns destes peptídeos ainda revelam efeitos potenciadores significativos. Entre os mecanismos sugeridos estão a ação de outras peptidases que poderiam desempenhar um importante papel em vários processos fisiológicos, entre elas a thimet-oligopeptidase 24-15 cujas ações foram primeiramente descritas como sendo uma enzima conversora de encefalinas a partir de precursores peptídicos maiores e que se verificou ser capaz de atuar também inativando a BK.

No primeiro ensaio com SHR (spontaneous hypertensive rats), buscamos analisar o efeito do plasma de SBJ tratado pelo método de Diniz & Carvalho sobre a bradicinina sintética, e foi verificado que o mesmo inibe a hipotensão em mmHg mas ao mesmo tempo aumenta o tempo de duração em minutos.

No segundo ensaio de pressão arterial média com ratos hipertensos (SHR), utilizando Captopril (0,1 mg/Kg), um inibidor da ECA e o plasma tratado pelo método de Diniz & Carvalho, observamos que no animal pré-tratado com captopril o efeito de hipotensão causado pelo plasma aumentou significativamente em 38% em mmHg e min. Esta observação sugeriu que para a potenciação do efeito hipotensivo do peptídeo há necessidade do bloqueio da atividade cininásica, favorecendo a idéia de interação do "peptídeo" hipotensivo do plasma da SBJ com captopril.

O SHR (spontaneous hypertensive rats) é um modelo genético para o estudo da hipertensão que apresenta como característica importante uma característica idade-dependente de inibir a atividade do nervo simpático o que conduz a um aumento na resistência vascular periférica total em ratos mais velhos do que 16 semanas.

Martins e cols sugeriram que os SRH (spontaneous hypertensive rats) fossem mais sensíveis à resposta pressoras de BK quando administrados no ventrículo cerebral, comparado com os ratos normotensos e que estão mediados pelos receptores do subtipo B2. Estas características podem conduzir a uma sensibilidade mais elevada.

A cromatografia de alta performance foi utilizada e permitiu a separação do plasma em várias frações para serem testadas em bioensaio de serpentes e finalmente para a obtenção de um peptídeo puro, no qual foi realizada uma análise de espectrometria de massa para a determinação de sua seqüência.

A metodologia de purificação empregada se baseou na purificação do plasma da serpente *Python Reticulated*, onde foi utilizado um HPLC com uma coluna C18 para a primeira fase da purificação e após foi repurificada com uma

Supelcosil LC18DB, resultando em torno de 2 nmol de produto final (CONLON e cols., 1994).

Os resultados obtidos recentemente permitem sugerir que seja um peptídeo similar à bradicinina de mamíferos, contendo entre 9 e 11 resíduos de aminoácidos.

Bradicinina (BK) é um peptídeo que envolve efeitos notavelmente complexos na função cardiovascular, uniforme em doses mínimas, dependendo de seu local da ação (DOUGLAS e cols., 1980).

HOAGLAND relatou que a injeção intravenosa da BK resultou em uma diminuição rápida na pressão de sangue (BP) através de um mecanismo endotélio dependente, relacionado principalmente à liberação do óxido nítrico. Na mão, a administração local de BK pode ativar um reflexo pressor poderoso estimulando os nervos aferentes das vísceras abdominais e ativando os reflexos do cardiopressor. Estes efeitos contraditórios são ambos mediados através do receptor B2, situado provavelmente em terminais dos aferentes simpáticos (HOAGLAND e cols., 1999).

Particularmente importante observar que a ação de peptídeos biológicos sobre o sistema cardiovascular envolve diversos componentes periféricos como o vasomotor, taxa de frequência cardíaca, débito cardíaco, além dos componentes de regulação centrais e periféricos que agem pelos receptores aórticos e carótidos e pelos centros de regulação do impulso nervoso, o cérebro ativando áreas específicas do regulamento vascular e cardíaco (KEANE e cols., 1987).

Observações do plasma da *Bothrops jararaca* e da *Crotalus durissus terrificus* incubada com tripsina gerou um peptídeo com atividade hipotensiva, uma possível cinina; isto sugeriu que em sua seqüência haja uma diferença das

outras cininas de répteis já estudadas até o momento e com sua caracterização poderemos desvendar o mistério do sistema calicreína cinina de algumas serpentes, como a *Bothrops jararaca* e da *Crotalus durissus terrificus*, o que possibilitará novos caminhos na pesquisa de peptídeos vasoativos.

6. CONCLUSÃO

- Obtivemos uma substância, um provável peptídeo que revelou atividade hipotensora e potenciadora da bradicinina.
- Os plasmas das SBJ e da SCDT apresentaram efeitos com ação hipotensora significativa sobre pressão arterial média de ratos, sugerindo que estes possíveis peptídeos possam interagir com o SCC de mamíferos, sendo similares a BK de mamíferos já conhecida.
- Os plasmas das SBJ e da SCDT revelaram efeitos menos intensos na potenciação da bradicinina em íleo de cobaia.
- Através da hidrólise dos plasmas das serpentes estudadas por nós, até o presente momento, estes revelou uma atividade potenciadora da bradicinina possibilitando uma possível atividade envolvida com a ECA ou outras peptidases envolvidas na degradação da bradicinina.
- Obtivemos seqüências que não foram correspondentes a de cininas, mas que possam ser novos princípios peptídicos com ação hipotensora.

8. REFERÊNCIAS

ADAMS, C.; BISHOP, D.V. Conversational characteristics of children with semantic-pragmatic disorder. I: Exchange structure, turntaking, repairs and cohesion. **Br. J. Disord Commun**, 24(3): 211-39, 1989.

ABDALLA, F.M.F.; HIRAICHI, E.; PICARELLI, Z.P.; PREZOTO, B.C. Kallikrein-kinin system in the plasma of the snake *Bothrops jararaca*. **Br. J. Pharmacol**, 98:252-258, 1989.

ALMENOFF, J.; ORLOWSKI, M. Biochemical and immunological properties of a membrane-bound brain metalloendopeptidase: comparison with thermolysin-like kidney neutral metallopeptidase. **J. Neurochem**, 42(1): 151-7, 1984.

AMORIM, D.S.; FERREIRA, S.H.; MANCO, J.C.; TANAKA, A.; SADER, A. A.; CARDOSO, S. Potentiation of circulatory effects of bradykinin by a factor contained in the *Bothrops jararaca* venom. **Cardiologia**, 50:23, 1967.

ANTONIO, A. The coronary vasodilatador effect of bradykinin, In: Bradykinin and related kinins, Eds. SILVA., M. R; ROTHSCHILD., H. A. **Edart São Paulo**, 25-49, 1967.

AZIZI, M.; ROUSSEAU, A.; EZAN, E.; GUYENE, T. T.; MICHELET, S.; GROGNET, J. M.; LENFANT, M.; CORVOL, P.; MENARD, J. Acute angiotensin-converting enzyme inhibition increases the plasma level of the natural stem cell regulator N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline. **J.Clin.Invest**, 97(3):839-44, 1996.

BARNES, K.; TURNER, A. J. The Endothelin system and endothelin-converting enzyme in the brain: molecular and cellular studies. **Neurochem Research**, 22(8): 1033-40, 1997.

BARRETT, A. J.; RAWLINGS, N.D.; WOESSNER, J.F. Introduction: metallopeptidases and their clans. **Handbook of Proteolytic Enzymes**.

BARRETT, A.J.; RAWLINGS, N.D.; WOESSNER, J.F. **Academic Press, San Diego**, p 989-91, 1998b.

BARRETT, A .J.; RAWLINGS, N.D.; WOESSNER, J.F. Peptidyl-dipeptidase A/ angiotensin I converting enzyme. **Handbook of Proteolytic Enzymes.**

BARRETT, A.J.; RAWLINGS, N.D.; WOESSNER, J.F. **Academic Press, San Diego**, p 1066-76, 1998c.

BARRETT, A .J.; RAWLINGS, N.D.; WOESSNER, J.F. Neprilysin. **Handbook of Proteolytic Enzymes.**

BARRETT, A.J.; RAWLINGS, N.D.; WOESSNER, J.F. **Academic Press, San Diego**, p 1080-85, 1998d.

BARRETT, A .J.; RAWLINGS, N.D.; WOESSNER, J.F. Endothelin-converting enzyme 1. **Handbook of Proteolytic Enzymes.**

BARRETT, A.J.; RAWLINGS, N.D.; WOESSNER, J.F. (Eds). **Academic Press, San Diego**, p 1185-91, 1998e.

BARTON M, VOS I, SHAW S, BOER P, D'USCIO LV, GRONE HJ, RABELINK TJ, , MOREAU P, LUSCHER TF. Dysfunctional renal nitric oxide synthase as a determinant of salt-sensitive hypertension: mechanisms of renal artery endothelial dysfunction and role of endothelin for vascular hypertrophy and Glomerulosclerosis. **J Am Soc Nephrol.** 2000 May;11(5):835-45

BAZZONI, G.; DEJANA, E. Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis. **Physiol Rev**, 84(3): 869-901, 2004.

BENDHACK, L.M.; LINDSEY, C.J.; PAIVA, A.C.M. Converting enzyme inhibitors decrease kininase but not converting activity in the rat mesenteric vascular bed. **Hypertension** 8 (suppl 1),90-94, 1986.

BENETOS, A.; GAVRAS, I.; GAVRAS, H. Hypertensive effect of a bradykinin antagonist in normotensive rats. **Hypertension (Dallas)**, 8: 1089-1092, 1986.

BERALDO, W.T.; ARAUJO, R.L.; MARES-GUIA, M. Oxytocic esterase in rat urine. **Am J Physiol**, 211(4):975-80, 1966.

BERG, T.; SULTER, J.; LAI, C. Y.; SOFFER, R. L. Immunohistochemical localization of 2 angiotensin I-converting isoenzymes in the reproductive-tract of the male rabbit. **J. Histochem. Cytochem.** 34:753-760, 1986.

BERGUER, R.; HOTTENSTEIN, O.D.; PALEN, T.E.; STEWART, J. M.; JACOBSON, E. D. Bradykinin-induced mesenteric vasodilation is mediated by B2-subtype receptors and nitric oxide. **Am J Physiol**, 264:G492-6, 1993.

BERNSTEIN, K.E.; MARTIN, B.M.; EDWARDS, A.S.; BERNSTEIN, E.A. **J. Biol. Chem.** 270:3656-61, 1989.

BHoola, K.D.; CALLE, J.D.; SCHACHER, M. The effect of bradykinin, serum kallikrein and other endogenous substances on capillary permeability in the guinea-pig. **J Physiol**, 152:75-86, 1960.

BHoola, K. D.; MAY YI, R.; MORLEY, J.; SCHACHER, M. Release of kinin by an enzyme in the accessory Sex glands of guinea-pig. **J. Physiol (London)**, v. 163, p. 269-280, 1962.

BHoola, K.D.; LEMON, M.J.C.; MATTHEWS, R. Kallikrein in exocrine glands. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v. 25 (Suppl) p. 484-453, 1979.

BHoola, K.D.; FIGUEROA, C.D.; WORTHY, K. Bioregulation of kinin: Kallikrein, kininogens and kininases, **Pharmacol**, v. 44:1-80, 1992.

BOUGHARIOS G, PONTICOS M, RAJKUMAR V, ABRAHAM D. Extra-cellular matrix in vascular networks, **Cell Prolif.** 2004 Jun;37(3):207-20. Review.

BURNETT, J.C. Vaso-peptidase inhibition: a new concept in blood pressure management. **J. of Hypertension**, 17(1):S37-S43, 1999.

CAMPBELL, D.J.; KLADIS, A.; DUNCAN, A. M. Bradykinin peptides in kidney, blood and other tissues of the rat. **Hypertension**, v.21, p. 155-165, 1993.

CAMPBELL, D. J. Towards understanding the kallikrein-kinin system: insights from measurement of kinin peptides. **Brazilian J. of Medical and Biological Research**, 33(6): 665-77, 2000.

CARRETERO, O.A.; SCICLI, A. G. The renal kallikrein-kinin system in human and experimental hypertension. **Klinische Wochenschrift**, 56:113-125, 1978.

CHEUNG, H.S.; CUSHMAN, D. W. Inhibitors of homogenous angiotensin-converting enzyme of rabbit lung by synthetic venom peptides of *Bothrops jararaca*. **Biochimica et Biophysica Acta**, 293:451-63, 1973.

CHEUNG-WU, C.; MAO-YING, W.; SHAN-SHAN, L.; TING-HWO, C. Structure-function studies on the bradykinin potentiating peptide from chinese snake venom (*Agkistrodon halys pallas*) **Agents and Actions**, 9: 282-8, 1982.

CINTRA, A. C.; VIEIRA, C. A.; GIGLIO, J. R. Primary structure and biological activity of bradykinin potentiating peptides from *Bothrops insularis* snake venom. **J. Protein Chem**, 9(2): 221-7, 1990.

CLARK, M.A.; BOMALASKI, J.S.; CONWAY, T.M.; WARTELL, J.; CROOKE, T. Differential effects of aspirin and dexamethasone on phospholipase A2 and C activities and arachidonic acid release from endothelial cells in response to bradykinin and leukotriene D4. **Prostaglandins**, v.32, p. 703-708, 1986.

CLEMENTS, J. A. The human kallikrein gene family a diversity of expression and function. **Mol Cell Endocrinol**, 99:C1-6, 1994.

COLMAN, R. W. Formation of human plasma kinin. **N.Eng. J. Med**, v.291, p. 509-515, 1974.

COMEAU, S.; LANCE, V.A.; HICKS, J.W.; CONLON, J. M. Purification and biological activity of alligator bradykinin. **Am J Physiol**, 263:R400-4, 1992.

CONLON, J.M.; SMITH, D. D.; HICKS, J. W. Isolation and biological activity of a novel kinin (Thr⁶]bradykinin) from the turtle, *Pseudemys scripta*. **Endocrinol**, 126:985-991, 1990.

CONLON, J. M. Bradykinin and its receptors in non- mammalian vertebrates. **Regul Pept**, 79: 71-81, 1999.

CONLON, J.M.; LANCE, V. A. Generation of (Ala¹, Thr⁶) Bradykinin in the Plasma of a Snake, the *Reticulated Python*. **Biochem**, 1994.

COTTON, J.; HAYASHI, M. A.; CUNIASSE, P.; VAZEUX, G.; IANZER, D.; CAMARGO, A. C. Selective inhibition of the C-domain of angiotensin I converting enzyme by bradykinin potentiating peptides. **Biochem**, 2001.

CUSHMAN, D. W.; PLUSCEC, J.; WILLIAMS, N. J.; WEAVER, E. R.; SABO, E. F.; KOCY, O. Inhibition of angiotensin-converting enzyme by analogs of peptides from *Bothrops jararaca* venom. **Experientia**, 29(8): 1032-5, 1973.
DAMAS, J. The Brown Norway rats and the kinin system. **Peptides**, 17:859-72, 1996.

DAS, M.; SOFFER, R. L. Pulmonary angiotensin-converting enzyme: Structural and catalytic properties. **J. Biol. Chem**, 250:6762-6768, 1991.

DEDDISH, P. A.; WANG, J.; MICHEL, B.; MORRIS, P. W.; DAVIDSON, N. O.; SKIDGEL, R. A.; ERDOS, E. G. Naturally occurring active N-domain of human angiotensin I converting enzyme. **Proc.Natl.Acad. Sci. USA**, 91:7807-11, 1994.

DEDDISH, P.A.; MARCIC, B.; JACKMAN, H.L.; WANG, H. Z.; SIKGEL, R. A.; ERDOS, E. G. N-Domain-specific substrate and C-domain inhibitors of angiotensin-converting enzyme angiotensin- (1-7) and keto-ACE. **Hypertension**, 31: 912-7, 1998.

DENDORFER, A.; WOLFRUM, S.; DOMINIAK, P. Pharmacology and cardiovascular implications of the kinin-kallikrein system. **Jpn. J. Pharmacol**, v.79, p. 403-426, 1999.

DINIZ & CARVALHO. A micromethod for determination of bradykininogen under several conditions. **Ann. N.Y. Acad. Sci**, 104,77-89, 1963.

D'ORLEANS-JUSTE, P.; NUCCI, G.; VANE, J. R. Kinins act on B1 or B2 receptors to release conjointly endothelium-derived relaxing factor and prostacyclin from bovine aortic endothelial cells. **Br J. Pharmacol**, 96:920-6, 1989.

DOUGLAS WW, TARASKEVICH PS. Calcium component to action potentials in rat pars intermedia cells. **J Physiol**. 1980 Dec;309:623-30.

EHLERS, M. R. W.; RIORDAN, J. F. Angiotensin-converting enzyme: new concepts concerning its biological role. **Annu. Rev. Physiol**, 44: 625-38, 1982.

EHLERS, M. R. W.; RIORDAN, J. F. Angiotensin-converting enzyme: Zinc and inhibitor binding stoichiometries of the somatic and testis isoenzymes. **Biochem**, 30:7118-7126, 1991.

EHLERS, M. R. W.; FOX, E. A.; STRYDOM, D. J.; RIORDAN, J. F. Molecular cloning of human testicular angiotensin-converting enzyme: The testis isoenzyme is identical to the C-terminal half of endothelial angiotensin-converting enzyme. **Proc. Natl. Acad. Sci, U.S.A.** 86:7741-7745, 1989.

EL-DORRY, H. A.; BULL, H. G.; IWATA, K.; THORNBERRY, N. A. ; CORDES, E. H.; SOFFER, R. L. Molecular and catalytic properties of rabbit testicular dipeptidyl carboxypeptidase. **J.Biol. Chem**, 257: 14128-14133, 1982.

ERDOS, E. G. The kinins. A status report. **Biochem Pharmacol**, 15;25(14):1563-9, 1976.

ERDOS, E. G.; SKIDGEL, R. A. Neutral endopeptidase 24.11 - enkephalinase and related regulators of peptide hormones. **Faseb J**, 3:145-51, 1989.

ERDOS, E. G. Some old and some new ideas on kinin metabolism. **J. of Cardiovascular Pharmacol**, 15(Suppl. 6): S20-S24, 1990.

FABIANI, M. E.; DINH, D. T.; NASSIS, L. Angiotensin-converting enzyme: basic properties, distribution and functional role. **Hypertension**, pp 90-100, 1999.

FARMER, S.; BURCH, R. Biochemical and molecular pharmacology of kinin receptors. **Annu Ver Pharmacol Toxicol**, 32: 511-36, 1992.

FARMER, S. G.; DESIATO, M. A. Effects of a novel non-peptide bradykinin B2 receptor antagonist on intestinal and airway smooth muscle: further evidence for the tracheal B3 receptors. **Br J Pharmacol**, 112:46-4, 1994.

FERREIRA, S. H.; SILVA, M. R. Potenciação de Polipeptídeos (bradicinina, angiotensina e ocitocina) por um fator presente no veneno de *Bothrops jararaca*. **Ciência e Cultura**, 15(4):276-7, (1963 e 1962).

FERREIRA, S. H.; SILVA, M. R. Potentiation of bradykinin and eledoisin by BPF (Bradykinin Potentiating Factor) from *Bothrops jararaca* venom. **Experiencia**, 15(6): 347-9, 1965.

FERREIRA, S. H. A bradykinin-potentiating factor (bpf) present in the venom of *Bothrops jararaca*. **J. of Pharmacol**, 24: 163-9, 1965.

FERREIRA, S. H.; BARTELT, D. C.; GREENE, L. J. Isolation of bradykinin-potentiating peptides from *Bothrops jararaca* venom. **Biochem**, 23;9(13):2583-93, 1970.

FERREIRA, C.; SILVEIRA, L. A.; MURAD, N.; HALLAL, P. R.; DIAS, V. S.; BASILIO, W.; BARCELLINI, A.; FORTE, V. Accidents in angiocardiology. **Arq Bras Cardiol**, 25(5):357-61, 1972.

FERREIRA, L. A. F.; HENRIQUES, O. B.; LEBRUN, I.; BATISTA, M. B. C.; PREZOTO, B. C.; ANDREONI, A. S. S.; ZELNIK, R.; HABERMEH, G. Biologically active peptides from *Bothrops jararacussu* venom. **Agents and Actions**, Suppl, 36: 209-14, 1992a.

FERREIRA, L. A.F.; HENRIQUES, O. B.; LEBRUN, I.; BATISTA, M. B. C.; PREZOTO, B. C.; ANDREONI, A. S. S.; ZELNIK, R.; HABERMEHL, G. A new bradykinin-potentiating peptide (peptide p) isolated from the venom of *Bothrops jararacussu* (jararacuçu tapete, urutu dourado). **Toxicon**, 30(1): 33-40, 1992b.

FERREIRA, L. A.; GALLE, A.; RAID, M.; SCHRADER, M.; LEBRUN, I.; HABERMEHL, G. Isolation: analysis and properties of three bradykinin-potentiating peptides (BBP-III, BPP-II, and BPP-V) from *Bothrops neuwiedi* venom. **J. Protein. Chem**, 17(3):285-9, 1998.

FRITZ, I. H.; SCHMIDT, G. The Kallikrein-Kinin system in Health and Disease, 1925-36.

FURCHGOTT, R. F.; CHERRY, P. D.; ZAWADZKI, J. V.; JOTHIANANDAN, D. Endothelial cells as mediators of vasodilation of arteries. **J. Cardiovasc Pharmacol**, Suppl 2:S336-43, 1984.

GALLI, G. L.J.; SKOVGAARD, N.; ABE., A .S.; TAYLOR, E. W.; CONLON, J . M.; WANG, T. Cardiovascular actions of rattlesnake bradykinin ([Val¹, Thr⁶]) bradykinin) in the anesthetized south American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. **Am. J. Hysiol Regul. Integr. Comp. Physiol**, 288: R456-R465 ,2004.

GEPPETTI, P. Sensory neuropeptide release by bradykinin mechanisms and pathophysiological implications. **Regul Pept**, 47:1-23, 1993.

GOODMAN & GILMAN. The Pharmacological Basic of Therapeutics- Mc Graw Hill Companies, 9 th edition, 1996 e 1992.

GRAEFF, F. G.; FERREIRA, S. H.; CORRADO, A. P.; SILVA, M. R. **Experientia**, 21:607, 1965 e 1967.

GUIMARÃES, J. A.; BORGES, D. R.; PRADO, E. S.; PRADO, J. L. Kinin-converting aminopeptidase from human serum. **Biochem. Pharmacol**, v.22, p.3157-3172, 1973.

HAEFLIGER, J. A.; NICOD, P.; MEDA, P. Contribution of connexins to the function of the vascular wall. **Cardiovasc Res**, 1:62(2): 345-56, 2004.

HALL, J. M. Bradykinin receptors. **Gen Pharmacol**, 1997, 28;1-6.

HESS, J. F.; BORKOWSKI, J. A.; MACNEIL, T.; STONESIFER, G. Y.; FRAHER, J.; STRADER, C. D. Differential pharmacology of cloned human and mouse B2 bradykinin receptors. **Mol Pharmacol**, 45:1-8, 1994.

HOAGLAND KM, MADDOX DA, MARTIN DS. Intrarenal infusion of bradykinin elicits a pressor response in conscious rats via a B2-receptor mechanism. **Can J Physiol Pharmacol**. 1999 Aug;77(8):563-70.

HIRATA, I. Y.; BOSCHCOV, P.; OLIVEIRA, M. C. F.; JULIANO, M. A. ; MIRANDA, A. ; CHAGAS, J. R.; TSUBOI, S.; OKADA, Y.; JULIANO, L. Synthesis of human angiotensinogen (1-17) containing one of the putative glycosylation binding sites and its hydrolysis by human renin and porcine pepsin. **Int. J. Pept. Prot. Res**, 38:298-307, 1991.

HUBERT, C.; HOUOT, A. M.; CORVOL, P.; SOUBRIER, F. Structure of the angiotensin I-converting enzyme gene. Two alternate promoters correspond to evolutionary steps of a duplicated gene. **J. Biol. Chem**, 266(23): 15377-83, 1991.

IANZER, D.; KONNO, K.; PORTO, R.M.; PORTARO, F. C. V.; STOCKLIN, R.; CAMARGO, A. C. M.; PIMENTA, D. C. Identification of five new bradykinin potentiating peptides (BPPs) from *Bothrops jararaca*, crude venom by using electrospray ionization tandem mass spectrometry after a two-step liquid chromatography. **Peptides**, 1085-1092, 2004.

JASPARD, E.; WEI, L.; ALHENC-GELAS, F. Differences in the properties and enzymatic specificities of the two active sites of angiotensin-i converting enzyme. **J. Biol. Chem**, 268:9496-9503, 1993.

JULIANO, M. A.; JULIANO, L. Síntesis and kinetic parameters of hydrolysis by trypsin of some acyl-arginyl-p-nitroanilides and peptides containing arginyl-p-nitroanilide. **Braz. J. Med. Biol**, 8:435-445, 1985.

KAPLAN, A. P.; SILVENBERG, M. The coagulation-kinin pathway of human plasma. **Blood**, v.70, p. 1-15, 1987.

KITAMURA, N.; KITAGAWA, H.; FUKUSHIMA, D.; TAKAGAKI, Y.; MIYATA, T.; NAKANISHI, S. Structural organization of the human kininogen gene and a model for its evolution. **J Biol Chem**, 260:8610-7, 1985.

KUMAR, R.S.; THEKKUMKARA, T.J.; SEM, G.C. The mRNAs encoding the two angiotensin-converting isozymes are transcribed from the same gene by a tissue-specific choice of alternative transcription initiation sites. **J. Biol. Chem**, 266(6): 3854-62, 1991.

LAVRAS, A. A. C.; FICHMAN, M.; HIRAICHI, E.; BOUCAULT, A.; TOBO, T.; SCHMUZIGER, P.; NAHAS, L.; PICARELLI, Z.P. Deficiency of kallikrein-kinin system and presence of potent kininase activity in the plasma of *Bothrops jararaca* (Serpentes, Crotalinae). **Ciência e Cultura**, 31:168-74, 1979.

LAVRAS, A. A.; FICHMAN, M.; HIRAICHI, E.; TOBO, T.; BOUCAULT, M. A. The Kininases of *Bothrops jararaca* plasma. **Acta Physiol Lat Am**, 30: 269-274, 1980.

LEBRUN, I.; LEBRUN, F. L. A. S.; HENRIQUES, O.B.; CARMONA, A. K.; JULIANO, L.; CAMARGO, A. C.M. Isolation and characterization of a new bradykinin potentiating octapeptide from γ -casein. **J.Physiol. Pharmacol**, 73: 85-91, 1995.

LI, C.; HERSH, L. B. Neprilysin: assay methods, purification and characterization. **Enzymol**, 248: 253-63, 1995.

LI, Z.; SECOR, S. M.; LANCE, V. A.; MASII, M.; VALLARINO, M.; CONLON, J.M. Characterization of bradykinin-related peptides generated in the plasma of six *Sarcopterygian* species (*African lungfish amphiuma*, *coachwhip*, *bullsnake*, *Gila monster*, and *Gray's monitor*). **Gen Comp Endocrinol**, 112:108-14, 1998.

LYONS, C. R. The role of nitric oxide in inflammation. **Adv Immunol**, 60:323-55, 1995.

MAJNO, G.; SHEA, S. M.; LEVENTHAL, M. Endothelial contraction induced by histamine-type mediators: an electron microscopic study. **Cell Biol**, 42(3):647-72, 1969.

MARCEAU, F. Kinin B1 receptors: a review. **Immunopharmacol**, 1:1-26, 1995.

MARCEAU, F.; HESS, J. F.; BACHYAROY, D. R. The B1 receptors for kinins. **Pharmacol Rev**, 50(3): 357-86, 1998.

MARGOLIUS, H. S. Kallikreins and kinins, Molecular characteristics and cellular and tissue responses. **Diabetes**, 45(suppl1): 14-19, 1996.

MARTIN TW, WYSOLMERSKI RB. Ca²⁺-dependent and Ca²⁺-independent pathways for release of arachidonic acid from phosphatidylinositol in endothelial cells. **J Biol Chem.** 1987 Sep 25;262(27):13086-92.

MAWJI IA, ROBB GB, TAI SC, MARSDEN PA. Role of the 3'-untranslated region of human endothelin-1 in vascular endothelial cells. Contribution to transcript lability and the cellular heat shock response. **J Biol Chem.** 2004 Mar 5;279(10):8655-67. Epub 2003 Dec 3.

MINSHALL, R. D.; NAKAMURA, F.; BECKER, R. P.; RABITO, S. F. Characterization of bradykinin B2 receptors in adult myocardium and neonatal rat cardiomyocytes. **Circ Res**, 76(5):773-80, 1995.

MIURA, H.; LIU, Y.; GUTTERMAN, D. D. Human coronary arteriolar dilation to bradykinin depends on membrane hyperpolarization. **Circulation**, v.99, p. 3132-3138, 1999.

MOTTA, G.; ROJKJAER, R.; HASAN, A. A. K.; CINES, D. B.; SCHAMAIER, A. H. High molecular weight kininogen regulates prekallikrein assembly and activation on endothelial cells. A novel mechanism for contact activation. **Blood**, v.91, p. 516-528, 1998.

MULLER-ESTERL, W. Kininogens, kinin and kinships. **Thromb Haemost**, v.61, p. 2-6, 1989.

NAKAGAWA, M.; NASJLETTI, A. Plasma Kinin levels in experimental hypertension in rats. **Adv. Exp Med Biol**, 247B:115-9, 1989.

NAKAGAWA, M.; NASJLETTI, A. Renal Function as affected by inhibitors of Kininase II and of neutral endopeptidase 24.11 in rats with and without desoxycorticosterone pretreatment. **Adv. Exp Med Biol**, 247B: 495-9, 1989.

NAKAYASU, T.; NAGASAWA, S. Studies of human kininogens. Isolation, characterization, and cleavage by plasma kallikrein of high-molecular-weight (HMW) - Kininogen. **J. Biochem**, 85:249-258, 1979.

NEEDLEMAN, P.; MARSHALL, G.R.; SOBEL, B.E. Hormone interactions in the isolated rabbit heart. Synthesis and coronary vasomotor effects of prostaglandins, angiotensin, and bradykinin. **Circ Res**, 37(6):802-8, 1975.

NG, K.K.F.; VANE, J.R. Conversion of Angiotensin I to Angiotensin II. **Nature**, 216: 762-6, 1967.

NG, K.K.F.; VANE, J.R. Fate of Angiotensin I in the Circulation. **Nature**, 218: 144-50, 1968.

ODYA, C.E.; MARIN, K.D.V.; HAMMON, K.J.; STEWART, T.A.; ERDOS, E.G. Purification and properties of prolylcarboxypeptidase (angiotensinase c) from human kidney. **J. Biol. Chem**, v.253,p.5927-5931, 1978.

OKAMOTO, H.; GREENBAUM, L.M. Isolation and structure of T-kinin. **Biochem. Biophys. Res. Commun**, 112:701-708, 1983.

ONDETTI, M.A.; WILLIAMS, N.J.; SABOM, E.F.; PLUSCEC, J.; WEAVER, E.R.; KOCY, O. Angiotensins-Converting Enzyme inhibitors from the venom of *Bothrops jararaca*. Isolation, Elucidation of structure and synthesis. **Biochem**, 19(22): 4033-39, 1971.

PADFIELD PL, JYOTHINAGARAM SG, WATSON DM, DONALD P, MCGINLEY IM. Problems in the measurement of blood pressure. **J Hum Hypertens**. 1990 Jun;4 Suppl 2:3-7. Review.

PETERSON PK, SHARP B, GEKKER G, BRUMMITT C, KEANE WF. Opioid-mediated suppression of interferon-gamma production by cultured peripheral blood mononuclear cells. **J Clin Invest**. 1987 Sep;80(3):824-31.

PICARELLI, Z.P.; PREZOTO, B.C.; HIRAICHI, E.; ABDALLA, F.M. Kallikrein-kinin system in the plasma of snakes. **Agents Actions Suppl**, 36:271-81, 1992.

PISANO, J.J. Chemistry and biology of the kallikrein-kinin system. In: *Proteases and Biological Control* (Reich, Rifkein-Show ed.). New York, **Cold Spring Harbor** 2, pp 199-200, 1975.

QUARTARA L, RICCI R, MEINI S, PATACCHINI R, GIOLITTI A, AMADESI S, RIZZI C, RIZZI A, VARANI K, BOREA PA, MAGGI CA, REGOLI D. Ala scan analogues of HOE 140. Synthesis and biological activities. **Eur J Med Chem.** 2000 Nov;35(11):1001-10.

RASPI, G. Kallikrein and kallikrein-like proteinases: purification and determination by chromatographic and electrophoretic methods. **Chromatogr B Biomed Appl**, 684:265-87, 1996.

REGOLI, D.; BARABE, J. Pharmacology of bradykinin and related kinins. **Pharmacol, Ver.**, 32: 1-46, 1980.

REGOLI, D.; GOBEIL, F. Pharmacology of kinin receptors: recent developments **.J Physiol Pharmacol**, 73:791-6, 1995.

REIS, M.L.; OKINO, L.; SILVA, M. R. Comparative pharmacological actions of bradykinin and related kinins of larger molecular weights. **Biochem Pharmacol**, 20(11):2935-46, 1971.

RIEDI CA, ZAVADNIAK AF, SILVA DC, FRANCO A, FILHO NA. [Comparison of conductivity with sodium determination in the same sweat sample]. **J Pediatr** (Rio J). 2000 Nov-Dec;76(6):443-6. Portuguese.

RIEGER, K.J.; SAEZ-SERVENT, N.; PAPET, M.P.; WDZIECZAK-BAKALA, J.; MORGAT, J.L.; THIERRY, J.; VOELTER, W.; LENFANT, M. Involvement of human plasma angiotensin I-converting enzyme in the degradation of the haemoregulatory peptide N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline. **Biochem. J**, 296: 373-8, 1993.

RODRIGUES, M.S.; SCHAFFEL, R.; ASSREUY, J. Comparative study on the mechanism of bradykinin potentiation induced by bradykinin-potentiating peptide 9a, enalaprilat and kinin potentiating peptide. **J Pharmacol**, 216: 357-362, 1992.

ROUSSEAU, M.F.; MELIN, J.; BENEDICT, C.R.; AHN, S.; RAPHAEL, D.; BORNEMANN, M.; POULEUR, H. Effects of nisoldipine therapy on myocardial perfusion and neuro-hormonal status in patients with severe ischaemic left ventricular dysfunction. **Eur. Heart J.**, 15(7):957-64, 1994.

RYAN, J.W.; ROBLERO, J.; STEWART, J.M. Inactivation of bradykinin in the pulmonary circulation. **Biochem. J**, 110(4): 795-7, 1989.

SILVA, M. R.; BERALDO, W.T.; ROSENFELD, G. Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by trypsin. **Am. J. Physiol**, 156:261-73, 1949.

SILVA, M. R. Métodos Fisiológicos Aplicados a Farmacologia, *Fundamentos da Farmacologia e suas aplicações a terapêutica*, 2ªEd.: 40-60, 1968.

SILVA, M. R. Polipeptídicos Vasoativos Angiotensina e Bradicinina. *Fundamentos da Farmacologia e suas aplicações a Terapêutica*, 3ªEd: 229-251, (1973 e 1970).

SEKI, T.; MIWA, I.; NAKAJIMAT, E.G. Kallikrein-kinin system in nonmammalian blood: evolutionary aspects. **Am J Physiol**, 1973, 224:1425-30.

SCHOLKENS, B.A. Kinins in the cardiovascular system. **Immunopharmacol**, 33:209-16, 1996.

SCHACHTER, M. A delayed slow contracting effect of serum and plasma due to the release of a substance resembling kallidin and bradykinin. **Br. J. Pharmacol**, v.11, p. 111-118, 1956.

SCHACHTER, M. Kallikrein (kininogenases): a group of serine proteases with bioregulatory actions. **Pharmacol. Rev**, v.31, p. 1-17, 1980.

SCHROR, K. Role of prostaglandins in the cardiovascular effects of bradykinin and angiotensin-converting enzyme inhibitors. **J. Cardiovasc. Pharmacol**, 20 (Suppl. 9), p. S68-73, 1992.

SHARIAT-MADAR, Z.; MAHDI, F.; SCHMAIER, A.H. Assembly and activation of the plasma kallikrein/kinin system: a new interpretation. **International immunopharmacol**, v.2, p. 1841-1849, 2002.

SHIMUTA, S.I.; SABIA, E.B.; PAIVA, A.C.M.; PAIVA, T.B. Effect of stretching on the sensitivity of the guinea pig ileum to bradykinin and on its modification by bradykinin potentiating peptides. **J Pharmacol**, 70:551-8, 1981.

SIIGUR, E.; TÕNISMÄGI, K.; TRUMMAL, K.; AASPÕLLU, A.; VIJA, H.; SUBBI, J.; SIIGUR, J. Factor X activator from *Vipera lebetina* venom with factor IX activating activity. **Thromb Haemost**, suppl: P2108, 2001.

SKEGGS, L. T.; KAHN, J. R.; SHUMWAY, N. P. Preparation and function of the hypertensin-converting enzyme. **J.Exp.Med**, 103:295-299, 1956.

SNYDER, S. H.; BREDT, D.S.; DAWSON, T.M.; WENNIGER, J.J.; MARZLOFF, F.; HYMAN, B.T. Relative sparing of nitric oxide synthase-containing neurons in the hippocampal formation in Alzheimer's disease. **Ann. Neurol**, 32(6):818-20, 1992.

SOFFER, R.L. Angiotensin-converting enzyme and the regulation of vasoactive peptides. **Annu. Rev. Biochem**, 45:73-94, 1976.

SOFFER, R. L. In *Biochemical Regulation of Blood Pressure* pp. 123-164, John Wiley & Sons, New York, 1981.

SOUBRIER, F.; ALHENC-GELAS, F.; HUBERT, C.; ALLEGRINI, J.; JOHN, M.; TREGGAR, G.; CORVOL, P. Two putative active centers in human angiotensin I-converting enzyme. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, 85:9386-9390, 1988.

STEWART, J.M.; YOUNG, J. D. *Solid Phase Peptide Synthesis*. Pierce Chemical Company, Rockford, Illinois, 1984.

STEWART, J.M. Bradykinin B2 receptor antagonist, development and applications. **J Physiol Pharmacol**, 73: 787-90, 1995.

SUZUKI, T.; IWANAGA, S.; SATO, T. In: *Hypotensive peptides*, pp 149-160, Erdos, E.G.; Bach, N.; Sicuteri, F.; Wild, A.; New York, **Springer**, 1966.

TOBIAS, W.; MICHAEL, A.; JORGENSEN, J.; CONLON, J.M. Cardiovascular actions of python bradykinin and substance P in the anesthetized python,

python regius. **J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol**, 279:R531-R538, 2000.

TURNER, A. I. Membrane peptidases of the nervous and immune systems. **Adv. Neuroimmunol**, 3: 163-170, 1993.

TURNER, A .J.; TANZAWA, K. Mammalian membrane metallopeptidases: NEP, ECE, KELL, and PEX. **The FASEB journal**, 11:355-64, 1997.

UCHIDA, Y.; MURÃO, S. Bradykinin-induced excitation of afferent cardiac sympathetic fibers. **Jpn Heart**, 15:84-91, 1974.

UCHIDA, Y .; KATORI , M. Na improved method for determination of the total kininogen in rabbit and human plasma, 1977.

VALLANCE, P.; COLLIER, J.; MONCADA, S. Effects of endothelium-derived nitric oxide on peripheral arteriolar tone in man. **Lancet**, 2(8670): 997-1000, 1989.

WANG, T.; AXELSSON, M.; JENSEN, J.; CONLON, J.M. Cardiovascular actions of *python* bradykinin and substance P in the anesthetized *python*, *Python regius*. **J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol**, 279:R531-R538, 2000.

WARD, P.E.; CHOW, A.; DRAPEAU, G. Metabolism of bradykinin agonists and antagonists by plasma aminopeptidase P. **Biochem Pharmacol**, 42:712-727, 1991.

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**, 266: 9002-9008, (1991 a).

WEI, L.; ALHENC-GELAS, F.; SOUBRIER, F.; MICHAUD, A.; CORVOL, P.; CLAUSER, E. Expression and characterization of recombinant human angiotensin I-converting enzyme. Evidence for a C-terminal transmembrane anchor and for a proteolytic processing of the secreted recombinant and plasma enzymes. **J. Biol. Chem**, 266:5540-5546 (1991 b).

WERLE, E.; GOTZE, W.; KEPPLER, A. Über die Wirkung des kallikreins und den Isolierten Darm und über eine neue Darmskontra Ilrende Substanz. **Biochem Z**, 289:217, 1937.

WERLE, E.; BEREK, U. Ubre Kallidin. **Biochem. Z**, 320: 136, 1950.

WERLE, E. Kallikrein, kallidin and related substances. In: SCHACHTER, M. (ed.). Polypeptides which affect blood vessels and smooth muscles. **Oxford: Pergamon**, p. 199-209, 1960.

WILLIAMS, T. A.; BARNES, K.; KENNY, A . J.; TUNER, A .J.; HOOPER N. M. A comparison of the zinc contents and substrate specificities of the endothelial and testicular forms of porcine angiotensin converting enzyme and the preparation of isoenzyme-specific antisera. **Biochem J**, 288:875-881, 1992.

WHORTON, A.R.; YOUNG, S.L.; DATA, J.L.; BARCHOWSKY, A.; KENT, R. S. Mechanism of bradykinin-stimulated prostacyclin synthesis in porcine aortic endothelial cells. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 712, p. 79-87, 1982.

YANG, H.Y.T.; ERDOS, E.G.; LEVIN, Y. A dipeptidyl carboxypeptidases that converts angiotensin I and activates bradykinin. **Biochimia et Biophysica Acta**, 214: 374-6, 1970.

YONG, T.; GAO, P.X.; KOIZUMI, S.; CONLON, J.M.; RENNARD, S.I.; MAYHAN, W.G.; RUBINSTEIN, I. Role of peptidases in bradykinin induced increase in vascular permeability in vivo. **Circ. Rev**, 70: 952-959, 1992.

De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS.

NBR6023: Informações e Documentação - Referencias - Elaboração.

Rio de Janeiro: ABNT, 2000. 22p.

NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. List of journals indexed in index Medicus. 2001.

Available from: www.ncbi.nih.gov/entrez/jrbrowser.cgi
www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html