# UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas

(Bioquímica)

### JULIANO RODRIGO GUERREIRO

## "IDENTIFICAÇÃO E VALIDAÇÃO DE UM NOVO ALVO FUNCIONAL DE UM PEPTÍDEO COM ATIVIDADE ANTI-HIPERTENSIVA DO VENENO DA Bothrops jararaca".

São Paulo

Data do Depósito na CPG:

15/04/2009

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

### Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

#### JULIANO RODRIGO GUERREIRO

### "IDENTIFICAÇÃO E VALIDAÇÃO DE UM NOVO ALVO FUNCIONAL DE UM PEPTÍDEO COM ATIVIDADE ANTI-HIPERTENSIVA DO VENENO DA Bothrops jararaca".

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

Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos Martins de Camargo Co-orientadora: Dra. Solange Maria Toledo Serrano

São Paulo

2009

Juliano Rodrigo Guerreiro

### "IDENTIFICAÇÃO E VALIDAÇÃO DE UM NOVO ALVO FUNCIONAL DE UM PEPTÍDEO COM ATIVIDADE ANTI-HIPERTENSIVA DO VENENO DA Bothrops jararaca".

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

Aprovado em: \_\_\_\_\_

Banca examinadora

Prof. Dr.	
Instituição:	
Assinatura:	

Banca examinadora

Prof. Dr.	
Instituição:	
Assinatura:	

Banca	examir	nadora

Prof. Dr.	
Instituição:	
, , , , , , , , , , , , , , , , , , ,	
Assinatura:	

Banca examinadora	Banca	examinadora
-------------------	-------	-------------

Prof. Dr.	 		
Instituição:	 		
Assinatura:			

Banca examinadora

Prof. Dr.	
Instituição:	
Assinatura:	

### Conta e Tempo

Deus pede estrita conta de meu tempo e eu vou, do meu tempo, dar-lhe conta, mas, como dar, sem tempo, tanta conta, eu que gastei, sem conta, tanto tempo?

Para dar minha conta feita a tempo, o tempo me foi dado e não fiz conta, não quis, sobrando tempo, fazer conta, hoje quero acertar conta e não há tempo.

Oh vós que tendes tempo sem dar conta, não gasteis vosso tempo sem passatempo cuidai, enquanto é tempo, em vossa conta.

Pois aqueles que, sem conta, gastam tempo, quando o tempo chegar de prestar conta, chorarão, como eu, o não ter tempo.

#### **Agradecimentos**

A Dra. Solange Maria de Toledo Serrano pelo apoio e orientação na realização desse trabalho.

A Profa. **Dra. Mirian Akemi Furie Hayashi** pelo estímulo e incentivo da minha carreira científica.

A Dra. Marina Assakura por ser minha segunda mãe.

A Profa. **Dra. Ohara Augusto** e a **Dra. Edlaine Linares** pelos ensaios de determinação de óxido nítrico.

Ao Dr. Ivo Lebrun pelos ensaios de determinação de arginina.

Ao Dr. Robson Melo pela síntese dos peptídeos.

A Dra. Mônica Ferreira pelos ensaios de microscopia intravital em camundongos.

Ao Prof. **Dr. Bayardo Torres** a quem admiro, respeito pelo importante trabalho que realiza.

Ao Ms. Clécio F. Klitzke pelas análises de espectrometria de massas.

A **Vera Pontieri** pela ajuda nos ensaios *in vivo* e pela admiração como brilhante profissional.

Aos familiares em especial a minha mãe pelo incentivo, pelos conselhos e principalmente pelo amor e carinho.

A todos os meus colegas do CAT/CEPID em especial aos: Eduardo Fontana de Oliveira, Gabriel Benedetti, Kátia Morais, Joana Campeiro, Daniele lanzer e Joyce Giglio.

Aos funcionários do CAT/CEPID, em especial a **Maria Aparecida Siqueira**, **Maria Aparecida das Dores** e a **Neusa Lima** pelo carinho e apoio constantes.

A todos os meus amigos em especial a Thais Fernandes e Valquíria Silva

Ao **Diego Bueno** muito obrigado pela força que você me dá. Obrigado pela alegria que sinto quando estou conversando com você. Obrigado pela compreensão que você tem por mim. Obrigado por você ser essa pessoa que você é. Um enorme OBRIGADO por tudo que você faz por mim!

Se esse trabalho hoje é uma realidade, não posso deixar de agradecer à minha amiga **Claudiana Lameu**. Obrigado por sempre me entender, ouvir e por sempre guardar com você as minhas angústias e aflições, e assim, me fazer enxergar com clareza e lucidez os rumos corretos para minha vida.

#### Agradeço em especial

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Martins de Camargo, pela orientação, conhecimento e apoio transmitidos, através de suas preciosas discussões que foram primordiais para o meu desenvolvimento pessoal e aprimoramento profissional. A ele, que sempre soube que a única forma de conhecer é descobrir, e que descobrir é a única forma de ensinar, dedico todo o meu respeito.

Nossos agradecimentos à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de Doutorado concedida e aos recursos concedidos ao CAT/CEPID que permitiram a execução desse trabalho.

#### Resumo

Guerreiro, J.R. Identificação e validação de um novo alvo funcional de um peptídeo com atividade anti-hipertensiva do veneno da *Bothrops jararaca.* 2009. 128p. Tese de Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

O BPP-10c é um decapeptídeo bioativo, rico em resíduos de prolina e é expresso em uma proteína precursora no cérebro e na glândula de veneno da Bothrops jararaca. Recentemente demonstramos que o BPP-10c tem um potente e sustentado efeito anti-hipertensivo em ratos espontaneamente hipertensos (SHR), sem, no entanto, causar qualquer efeito em ratos normotensos, por um mecanismo farmacológico independente da inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA), levando à hipótese de que outro mecanismo poderia estar envolvido na atividade do peptídeo. Neste trabalho, usamos cromatografia de afinidade para isolar e identificar as proteínas renais com afinidade pelo BPP-10c e demonstramos que a argininosuccinato sintase (AsS) é a principal proteína a se ligar ao peptídeo. Além disso, mostramos que essa interação promove um aumento na atividade catalítica da enzima, de forma dose-dependente. A AsS é reconhecida como uma peça chave na regulação do ciclo da citrulina-óxido nítrico (NO), e sua ação é passo limitante na síntese de NO. A interação funcional do BPP-10c com a AsS foi evidenciada pelos seguintes efeitos promovidos pelo peptídeo: i) estimulação da produção de NO por células HUVEC e da produção de arginina por células HEK 293, ii) aumento da concentração plasmática de arginina em SHR. Corroborando esses achados, mostramos a reversão dos efeitos do peptídeo, inclusive sobre

a pressão arterial em SHR, quando o MDLA, um inibidor específico da AsS, foi co-administrado. Em conjunto, os resultados apresentados neste trabalho sugerem que a AsS é fundamental para o efeito anti-hipertensivo do BPP-10c. Tais resultados nos levaram a propor a AsS como um novo alvo terapêutico, e o BPP-10c como molécula-líder para a geração de medicamentos para tratamento de doenças relacionadas à hipertensão arterial.

**Palavras-chave**: BPP-10c, hipertensão arterial, argininosuccinato sintase, cromatografia de afinidade, vasodilatação e óxido nítrico.

#### <u>Abstract</u>

Guerreiro, J.R. Identification and validation of a novel functional target of a peptide from *Bothrops jararaca* venom with antihypertensive activity. 2009. 128p. PhD Thesis – Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

BPP-10c is a bioactive proline-rich decapeptide, part of the C-type natriuretic peptide precursor, expressed in the brain and in the venom gland of Bothrops jararaca. We recently showed that BPP-10c displays a strong, sustained anti-hypertensive effect in spontaneous hypertensive rats (SHR), without causing any effect in normotensive rats, by a pharmacological mechanism independent of angiotensin converting enzyme inhibition; therefore, we hypothesized that another mechanism should be involved in the peptide activity. Here we used affinity chromatography to search for kidney cytosolic proteins with affinity for BPP-10c and demonstrate that argininosuccinate synthetase (AsS) is the major protein binding to the peptide. More importantly, this interaction activates the catalytic activity of AsS in a dose-dependent manner. AsS is recognized as an important player of the citrulline-nitric oxide (NO) cycle that represents a potential limiting step in NO synthesis. Accordingly, the functional interaction of BPP-10c and AsS was evidenced by the following effects promoted by the peptide: i) increase of NO production in human umbilical vein endothelial cell culture, and of arginine in human embryonic kidney cells; ii) increase of arginine plasma concentration in SHR. Moreover, MDLA, a specific AsS inhibitor, significantly reduced the anti-hypertensive activity of BPP-10c in SHR. These results led us to suggest AsS as a new

therapeutically useful target for the development of activators, such as BPP-10c, useful to treat hypertension related diseases.

**Key Words**: BPP-10c, arterial hypertension, argininosuccinate synthetase, affinity chromatography, vasodilatation, nitric oxide.

#### Lista de Tabelas

TABELA 2. Seqüência dos peptídeos análogos estruturais do BPP-10c......48

TABELA 5. A velocidade catalítica de 1 µg da AsS isolada de rim de camundongo comparada à velocidade catalítica de 1µg da AsS recombinante humana na ausência ou na presença de 1 mM do MDLA......73

#### Lista de Figuras

FIGURA 1. Vasodilatação promovida pelo NO devido ao relaxamento da	
musculatura lisa do vaso	31

FIGURA 2. Representação esquemática da reação catalisada pela AsS......47

FIGURA 3. Representação esquemática da reação de acoplamento do BPP-10c à coluna Hi-Trap NHS-activated HP......63

FIGURA 4. Eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida das frações obtidas pela cromatografia de afinidade na resina HiTrap-BPP-10c......67

FIGURA 5. Análise por *Western blot* das amostras obtidas por cromatografia de afinidade na coluna de HiTrap-BPP-10c utilizando um anticorpo anti-AsS......68

FIGURA 7. Perfil eletroforético em gel 10% de SDS-poliacrilamida da AsS recombinante humana......70

FIGURA 9. Efeito do BPP-10c sobre a atividade enzimática de 1 µg da AsS isolada de camundongo ou da AsS recombinante humana74
FIGURA 10. Efeito do BPP-10c na afinidade da AsS pelos seus substratos76
FIGURA 11. Efeito dos análogos estruturais do BPP-10c sobre a atividade catalítica da AsS recombinante humana
FIGURA 12. <i>Western blot</i> usando anticorpo policional anti-AsS demonstrando a presença dessa enzima em HUVECs e células HEK 29378
FIGURA 13. Efeito do Cy3-BPP-10c comparado ao efeito do BPP-10c sobre a
FIGURA 14. Efeito da marcação do BPP-10c com Cy3 sobre a atividade do
peptídeo em potencializar a bradicinina em íleo isolado de cobaia
FIGURA 16. Quantificação do BPP-10c internalizado pelas células HEK 293 e
FIGURA 17. Aumento da produção de arginina em células HEK 293 pelo
tratamento com o BPP-10c84

FIGURA 18. Efeito do BPP-10c sobre a concentração de arginina no plasma de
ratos
FIGURA 19. Efeito do BPP-10c sobre a produção de NO em células HUVEC.89
FIGURA 20. Ensaio de viabilidade das HUVECs e células HEK 293 tratadas
com o BPP-10c91
FIGURA 21. Inibição parcial do efeito anti-hipertensivo do BPP-10c sobre a
pressão arterial pelo MDLA93
FIGURA 22. Vasodilatação promovida pelo BPP-10c96

#### Lista de Abreviaturas

- A-I = angiotensina I
- A-II = angiotensina II
- AsL = argininosuccinato liase
- AsS = argininosuccinato sintase
- Bk = bradicinina
- BPP = peptídeo potenciador da bradicinina
- Cy3 = cianina 3
- ECA = enzima conversora de angiotensina
- eNOS = óxido nítrico sintase endotelial
- HEK 293 = célula embionária de rim humano
- HUVEC = célula endotelial venal de cordão umbilical humano
- L-NAME = nitro-L-arginina metil éster
- MALDI-TOF = matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight
- MDLA = ácido metil DL aspártico
- NO = óxido nítrico
- PAM = pressão arterial média
- sECA = enzima conversora de angiotensina somática
- SHR = rato esponteanemente hipertenso

### <u>SUMÁRIO</u>

1.	Introdução21
	1.1. Contexto histórico dos peptídeos potenciadores da bradicinina
	(BPPs)
	1.2. Endotélio vascular como alvo para moléculas com atividade anti-
	hipertensiva27
	1.3. Um novo alvo para o BPP-10c31
2.	Objetivos
	2.1. Objetivos gerais
	2.2. Objetivos específicos
3.	Materiais e Métodos35
	3.1. Animais
	3.2. Cromatografia de afinidade
	3.2.1. Síntese e purificação dos peptídeos
	3.2.2. Preparação de colunas para cromatografia de afinidade37
	3.2.3. Preparação dos extratos de rins de camundongo38
	3.2.4. Cromatografia de afinidade
	3.2.5. Identificação das proteínas que tiveram afinidade pelo BPP-
	10c
	3.2.5.1. Espectrometria de massas
	3.2.5.2.Eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida e
	Western blot41
	3.3. Clonagem e expressão da AsS43

	3.3.1. Clonagem do cDNA da AsS humana no vetor de expressão
	pDEST1743
	3.3.2. Expressão da AsS recombinante humana44
	3.4. Determinação da atividade enzimática da AsS46
	3.5. Cultura de células49
	3.5.1. Cultura de HUVECs49
	3.5.2. Cultura de HEK 29350
	3.6. Ensaio de viabilidade celular50
	3.7. Conjugação do BPP-10c com a cianina 3 (Cy3)51
	3.8. Ensaios de internalização em HUVECs e células HEK 29351
	3.9. Avaliação do Cy3-BPP-10c em íleo de cobaia52
	3.10. Ensaios de quantificação da internalização do BPP-10c em
	HUVECs e células HEK 29353
	3.11. Determinação de arginina produzida pelas células HEK 293
	utilizando a detecção de aminoácidos por HPLC54
	3.12. Quantificação de óxido nítrico (NO) em HUVECs56
	3.13. Determinação da arginina plasmática e da pressão arterial
	média de SHRs e ratos Wistar57
	3.14. Efeito do BPP-10c sobre a microvasculatura de camundongos
	pela técnica de microscopia intravital59
	3.15. Análise estatística60
4.	Resultados61
	4.1. Isolamento e identificação da proteína ligante do BPP-10c no
	citosol e na membrana de células renais62
	4.2. Clonagem e expressão da AsS humana68

4.3. Efeito do BPP-10c sobre a atividade catalítica da AsS72
4.4. Internalização do BPP-10c pelas HUVECs e células HEK 29378
4.5. Produção de arginina estimulada pelo BPP-10c em células HEK
293
4.6. O BPP-10c aumenta a concentração plasmática de arginina em
SHRs e ratos Wistar85
4.7. O BPP-10c estimula a produção de NO em HUVECs87
4.8. Avaliação da viabilidade celular da HUVEC e da célula HEK 293
na presença do BPP-10c90
4.9. Efeito do MDLA na atividade anti-hipertensiva do BPP-10c sobre
a pressão arterial de SHRs e ratos Wistar91
4.10. Efeito do BPP-10c sobre a microvasculatura de
camundongos94
5. Discussão97
6. Conclusões107
7. Referências Bibliográficas109
8. Apêndices120
8.1. Anexo A – súmula curricular121

# 1. Introdução

PDF created with pdfFactory trial version <u>www.pdffactory.com</u>

1.1. Contexto histórico dos peptídeos potenciadores da bradicinina (BPPs)

A principal função do veneno das serpentes é a de imobilizar suas presas para garantir a sua alimentação. O estudo dos mecanismos fisiopatológicos do envenenamento e a caracterização molecular de toxinas do veneno da serpente *Bothrops jararaca* resultou em muitas contribuições científicas de grande relevância, e dentre elas destacam-se: a descoberta da bradicinina (Bk) e a descoberta dos primeiros peptídeos potenciadores da Bk (Bradykinin-Potentiating Peptides, BPPs) produzidos pela glândula de veneno (Rocha e Silva et al., 1949; Ferreira, 1965; Ferreira et al., 1970a), cuja ação sinérgica é capaz de promover uma acentuada queda na pressão arterial nas presas.

Os primeiros BPPs do veneno da *B. jararaca* foram caracterizados em 1970 (Ferreira et al., 1970a). Desde então, uma grande variedade de peptídeos apresentando características estruturais semelhantes foram identificados no veneno dessa e de outras serpentes (Hayashi e Camargo, 2005). Tipicamente, os BPPs são peptídeos de 5 a 14 resíduos de aminoácidos e têm como características estruturais: um alto conteúdo de prolina, um resíduo de ácido piroglutâmico na posição N-terminal e um resíduo de prolina na posição C-terminal (Ianzer et al., 2004; tabela 1).

22

		Massa	
Seqüência Peptídica	Nome	Molecular	Potenciação da
		(Da)	ВК
<ekwap< td=""><td>BPP-5a</td><td>611,7</td><td>+++</td></ekwap<>	BPP-5a	611,7	+++
<ewprp< td=""><td>BPP-5b</td><td>665,8</td><td>+</td></ewprp<>	BPP-5b	665,8	+
<eswpgp< td=""><td>BPP-6a</td><td>653,7</td><td>+</td></eswpgp<>	BPP-6a	653,7	+
<edgpipp< td=""><td>BPP-7a</td><td>705,8</td><td>+</td></edgpipp<>	BPP-7a	705,8	+
<ewprpqipp< td=""><td>BPP-9a</td><td>1101,3</td><td>+++</td></ewprpqipp<>	BPP-9a	1101,3	+++
<eswpgpnipp< td=""><td>BPP-10a</td><td>1075,2</td><td>++</td></eswpgpnipp<>	BPP-10a	1075,2	++
<enwprpqipp< td=""><td>BPP-10b</td><td>1215,4</td><td>ND</td></enwprpqipp<>	BPP-10b	1215,4	ND
< ENWPHPQIPP	BPP-10c	1196,3	+++
<ewprptpqipp< td=""><td>BPP-11a</td><td>1299,5</td><td>ND</td></ewprptpqipp<>	BPP-11a	1299,5	ND
< EGRAPGPPIPP	BPP-11b	1069,2	++
<egraphppipp< td=""><td>BPP-11c</td><td>1149,3</td><td>++</td></egraphppipp<>	BPP-11c	1149,3	++
< EGRPPGPPIPP	BPP-11d	1025,3	ND
<eghawprpqipp< td=""><td>BPP-12a</td><td>1415,6</td><td>+++</td></eghawprpqipp<>	BPP-12a	1415,6	+++
<ewgrppgppipp< td=""><td>BPP-12b</td><td>1281,5</td><td>+++</td></ewgrppgppipp<>	BPP-12b	1281,5	+++
< EWAQWPRPQIPP	BPP-12c	1485,8	ND
<eggwprpgpeipp< td=""><td>BPP-13a</td><td>1370,5</td><td>+++</td></eggwprpgpeipp<>	BPP-13a	1370,5	+++
< EGGLPRPGPEIPP	BPP-13b	1297,5	+++
< EWAQWPRPTPQIPP	BPP-14a	1683,8	ND

#### Tabela 1

**Tabela 1** - Peptídeos Potenciadores da Bradicinina ("*Bradykinin Potentiating Peptides*" - BPPs) do veneno da *B. jararaca*. A nomenclatura dos BPPs é baseada no tamanho (número de resíduos) e na ordem cronológica de descoberta (letras) no veneno das serpentes. <E = ácido piroglutâmico (lanzer et al., 2004).

Primordialmente foi descrito que o mecanismo de ação dos BPPs resultaria da inibição da atividade da enzima inativadora da Bk (Ferreira et al., 1970b), conhecida hoje como enzima conversora de angiotensina (ECA). A ECA esta inserida na membrana plasmática das células endoteliais nos vasos sanguíneos (ECA somática, sECA) e tem um papel chave na fisiologia cardiovascular devido à sua dupla ação: converter a angiotensina I (A-I) em angiotensina II (A-II) (um potente vasoconstritor) e degradar a Bk, um potente vasodilatador (Skeggs et al., 1956; Villard e Soubier, 1996).

Utilizando-se o peptídeo BPP-9a (nome comercial Teprotide, <E-W-P-R-P-Q-I-P-P) foi atribuída à inibição da sECA pelos BPPs, a propriedade de corrigir a pressão arterial de pacientes hipertensos (Gavras et al, 1974). Essa revelação que revolucionou a terapêutica da hipertensão arterial humana foi aproveitada pelo Laboratório E. R. Squibb and Sons, New Brunswick, N. J., USA, para o desenvolvimento do captopril. Essa molécula não peptídica foi desenhada e testada pelos pesquisadores David Cushman e Miguel Ondetti que utilizaram a estrutura dos BPPs e o conhecimento da especificidade da carboxipeptidase B para sintetizar um composto não-peptídico capaz de atuar como um inibidor sítio-dirigido da sECA e que fosse eficiente por via oral (Cushman et al., 1973; Ondetti et al, 1977).

Os estudos que se iniciaram no final da década de 1960 e se prolongaram por mais duas décadas, comprovaram que a sECA, uma glicoproteína com atividade metalo-carboxidipeptidase, participa do processo de geração da A-II e da degradação da Bk. O mecanismo de catálise se faz através de seus dois sítios catalíticos, localizados nos domínios N-terminal e Cterminal (Wei et al., 1991).

Desde o início dos anos 1980 o captopril tem sido amplamente empregado no tratamento da hipertensão arterial sistêmica humana (Smith e Vane, 2003). A partir do final da década de 1970, o sucesso do desenvolvimento dos inibidores sítios-dirigidos da sECA capazes de reproduzir as principais propriedades farmacológicas dos BPPs diminuiu drasticamente o interesse em aprofundar os estudos sobre mecanismos de ação dos BPPs. Em outras palavras, acreditava-se que o efeito dos BPPs sobre a pressão arterial de animais hipertensos seria resultante da inibição da formação de A-II que seria corroborada pela inibição da degradação da Bk.

Recentemente, contudo, nosso laboratório mostrou que a atividade antihipertensiva de alguns BPPs, como, por exemplo, o BPP-7a (<E-D-G-P-I-P-P) e o BPP-10c (<E-N-W-P-H-P-G-I-P-P), não depende da geração de A-II, pois são capazes de promover a redução da pressão arterial sistêmica em ratos espontaneamente hipertensos (SHRs) em concentrações cerca de 500 vezes abaixo daquelas que promovem inibição da conversão de A-I em A-II (Ianzer et al., 2007). Nesse estudo mostrou-se também que a atividade anti-hipertensiva do BPP-10c e do BPP-7a somente se manifesta em SHR, sendo os mesmos desprovidos de ação cardiovascular em ratos normotensos (Cotton et al., 2002) e lanzer et al., 2007).

Se, por um lado, os resultados apresentados por lanzer et al. 2007 reduzem a importância da inibição da formação da A-II no efeito antihipertensivo dos BPPs, por outro lado, eles não excluem a importância da potenciação dos efeitos da Bk. A hipótese de que não apenas os efeitos cardiovasculares dos BPPs (diminuição na freqüência cardíaca e diminuição da pressão arterial), como também outros efeitos envolvendo a intermediação de cininas, possam ser atribuídos ao efeito potenciador da Bk desses peptídeos, foi discutida por Marcic et al. 2000 e Mueller et al. 2002. Essa hipótese, entretanto, não exclui a participação da sECA como enzima metabolizadora de cininas e como enzima envolvida no processo de sinalização mediada pelos receptores B1 e B2. Essa hipótese é baseada na possível potenciação da Bk de forma independente da inibição da sECA (Marcic et al., 2000). Não pode ser excluído, entretanto, que outros elementos envolvidos na homeostase da pressão arterial e não modulados pelas cininas estejam envolvidos nos efeitos anti-hipertensivos dos BPPs.

O BPP-10c foi utilizado com modelo para esclarecer se há ou não a participação da sECA na sua atividade anti-hipertensiva. Para isso, inicialmente foi realizado um estudo sobre o a biodistribuição do BPP-10c em camundongos (Silva et al., 2008). Os resultados mostraram que este peptídeo, marcado com I<sup>125</sup>, se acumula nos rins em concentração dez vezes mais elevada do que em outros tecidos, e ali permanece em alta concentração por mais de seis horas. Surpreendentemente, a co-administração do peptídeo associado a uma dose molar 1000 vezes superior à docaptopril, um inibidor específico do sítio ativo da sECA (Gross et al., 1981), mostrou que cerca de 50% do peptídeo continuava ainda se acumulando de maneira duradoura nos rins. Esses resultados sugerem fortemente que o BPP-10c possui outro alvo molecular além da sECA.

A permanência do BPP-10c por um longo período nos rins, mesmo quando os sítios de interação com a sECA estavam bloqueados pelo captopril, parece indicar que há uma forte interação com outro(s) sítio(s) receptor(es), caso contrário ele teria sido rapidamente excretado na urina. Esse resultado indicou a possibilidade de que o peptídeo fosse internalizado pelas células renais e se associasse às proteínas citosólicas dentro de algum compartimento celular. É importante mencionar que na urina desses animais, o BPP-10c foi encontrado na forma não degradada (Silva et al., 2008).

Os fatos apresentados acima sugerem que outro alvo de interação do BPP-10c pode ser encontrado no endotélio vascular renal ou em outro tecido renal (parênquima, por exemplo). A identificação desse(s) alvo(s) putativo(s) nos rins de camundongo foi o objeto principal dessa tese. 1.2. Endotélio vascular como alvo para moléculas com atividade anti-hipertensiva

O endotélio vascular tem como característica marcante a sua heterogeneidade morfológica e funcional. Esta diversidade é devida a aspectos relacionados ao calibre do vaso, a órgão-especificidade e à idade do animal, ou seja, cada tecido possui um endotélio vascular específico, gerado a partir do microambiente (Cleaver e Melton, 2003). As moléculas geradas e liberadas pelo endotélio contribuem para orquestrar os processos fisiológicos dependentes do sistema circulatório. Quando esse balanço é afetado, a disfunção endotelial (DE) provoca um grande número de patologias, entre as quais a hipertensão arterial sistêmica e as insuficiências cardíacas e renais (Haller, 1997). Essa DE se caracteriza pela deterioração da função vasodilatadora exercida pelo endotélio vascular e se manifesta das seguintes formas: 1- pela secreção diminuída de substâncias vasodilatadoras; 2- pelo aumento da produção de substâncias vasoconstritoras; 3- pelo aumento da sensibilidade a vasoconstritores; 4- pela resistência da musculatura lisa dos vasos à ação dos vasodilatadores produzidos pelo endotélio (Puddu et al., 2000).

Entre as substâncias secretadas pelo endotélio, e que agem sobre a musculatura lisa dos vasos, destaca-se o óxido nítrico (NO) (Bredt e Snyder, 1994). O NO produzido pela enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) é um mediador fundamental para a manutenção da função e integridade do endotélio, atuando como um regulador do tônus vascular, prevenindo a infiltração de leucócitos e a formação de trombo (Albrecht et al., 2003). Efetores

circulantes, como a bradicinina, ligam-se a receptores específicos na membrana das células endoteliais, sinalizando uma liberação transiente de cálcio intracelular, o qual se liga à calmodulina formando o complexo cálcio-calmodulina (Ca-CaM) responsável pela ativação da eNOS. O NO gerado por essa ativação difunde-se para a camada de células musculares adjacentes, resultando em relaxamento da parede do vaso (Figura 1). A inibição da atividade da eNOS está associada a inúmeras patologias, como aterosclerose (Oemar et al., 1998), hipertensão arterial sistêmica (Panza, 1997) e diabetes (Oyadomari et al., 2001). O aumento da atividade da eNOS está associado ao crescimento de tumores e à angiogênese *in vitro* e *in vivo* (Ziche e Morbidelli, 2000). Dessa forma, a modulação da atividade da eNOS torna-se uma estratégia terapêutica promissora devido à variedade de doenças que são associadas a alterações da atividade desta enzima.

A atividade da eNOS pode ser regulada por fatores como: níveis de expressão da enzima, modificações pós-traducionais, concentração de substratos ou cofatores e localização celular (Govers e Rabelink, 2001). A única modificação pós-traducional da eNOS quando comparada a outras óxido nítrico sintases (óxido nítrico sintase induzível - iNOS e óxido nítrico sintase neuronal - nNOS) é a presença de um resíduo que pode sofrer palmitoilação/miristoilação na região N-terminal. Esta modificação confere à eNOS sua particular localização celular no compartimento caveolar do subplasmalema (Garcia-Gardena et al., 1996). A localização da eNOS na cavéola permite a esta enzima uma estreita proximidade com seu substrato, L-arginina e seus cofatores (Liu et al., 1996).

O fator limitante para a produção de NO endotelial é a viabilidade do fornecimento do substrato para a eNOS, a L-arginina. Os níveis intracelulares de arginina variam de 100 µmol/l a 800 µmol/l, valores muito superiores ao valor de Km (5 µmol/l) para a eNOS (Harrison, 1997). Contudo, a produção de NO endotelial pode ser estimulada por uma fonte de arginina exógena (Vallance e Chan, 2001). Este fenômeno conhecido como paradoxo da arginina sugere a existência de um "pool" separado e exclusivo de arginina para a produção de NO no endotélio (Solomonson et al., 2003).

O transporte de arginina através da membrana das células endoteliais é um possível mecanismo de controle dos níveis de arginina intracelular. McDonald et al. (1997) mostraram que o transportador de aminoácidos catiônico 1 (CAT1) é responsável por 60-80% do total da arginina transportada para o ambiente intracelular, além de se co-localizar com a eNOS na cavéola. Sendo assim, pelo menos parcialmente, a fonte de arginina consumida pela eNOS é mantida pelo CAT1. Outro importante mecanismo de controle e manutenção da viabilidade de arginina dirigida para a produção de NO pode ser a regeneração da arginina. A citrulina produzida na conversão de arginina para NO pela eNOS pode ser reciclada novamente a arginina (Hecker et al., 1990 e Xie et al., 2000). Esta regeneração é catalisada pelas enzimas argininosuccinato sintase (AsS) e argininosuccinato liase (AsL) através de reações acopladas, sendo a AsS a enzima passo limitante neste processo. Essas enzimas possuem também um papel essencial no ciclo da uréia no fígado (Nussler et al., 1994 e Shuttleworth et al., 1995) e na geração de arginina endógena no rim (Gouta et al., 1999).

A importância do sistema de regeneração da arginina na produção de NO endotelial foi corroborada pelo relato clínico sobre crianças que possuíam deficiência na AsL e apresentavam hipertensão arterial. Após administração de arginina a pressão arterial dessas crianças diminuiu para níveis próximos do normal, sugerindo um papel crítico da regeneração da arginina na regulação da pressão arterial sistêmica (Fakler, 1995 e Scaglia et al., 2004). Outra evidência que fortalece a importância do sistema de reciclagem da arginina foi demonstrada pela análise por "microarray" de DNA na qual foi claramente observado um significante e coordenado aumento da expressão do gene da AsS em reposta a estimulação da produção de NO por "shear stress" (McCormick et al., 2001).

Além disso, a regeneração da arginina a partir da citrulina é passo limitante na produção de NO mediada pela bradicinina, e as enzimas envolvidas na reciclagem estão colocalizadas com a eNOS na cavéola em células endoteliais (Flam et al., 2001). Dessa forma, a regulação da atividade da AsS pode ser manipulada para um aumento na produção de NO via eNOS em células endoteliais.





**Figura 1** – Vasodilatação promovida pelo NO devido ao relaxamento da musculatura lisa do vaso. Os agentes vasodilatores atuam em receptores localizados na membrana do endotélio vascular e desencadeiam respostas intracelulares gerando a entrada de Ca<sup>+2</sup> pelos retículos sarcoplasmáticos. O Ca<sup>+2</sup> liga-se à calmodulina formando o complexo Ca/Calmodulina. Este complexo atua sobre a eNOS promovendo sua ativação e conseqüente formação de NO. O NO difunde-se do endotélio vascular para a musculatura lisa do vaso promovendo, nessas células, a ativação da guanilato ciclase e conseqüente produção de cGMP. O cGMP atua sobre canais de K<sup>+</sup> dependentes de voltagem dificultando a despolarização destas células, além de promover diretamente a diminuição da concentração de Ca<sup>2+</sup> intracelular provocando relaxamento muscular. A fonte de arginina utilizada pela eNOS pode ser oriunda do transporte direto através do CAT1 ou através do sistema de reciclagem da arginina.

#### 1.3. Um novo alvo para o BPP-10c

Resultados obtidos neste trabalho sugerem fortemente que a AsS é um alvo para o BPP-10c. Para tanto, foram realizadas cromatografias de afinidade, na qual o BPP-10c foi fixado em uma resina de agarose que foi incubada com extratos citosólicos e extratos de membranas de rim de camundongo. Após eluições com o BPP-10c foi possível isolar e identificar por espectrometria de massas a AsS como a principal proteína alvo deste peptídeo no rim de camundongo. Além disso, ensaios de atividade mostraram que o BPP-10c é capaz de aumentar a atividade catalítica da AsS. Essa ativação está correlacionada com efeitos induzidos pelo peptídeo como aumentar a produção de NO em HUVECs (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) e aumentar a produção de arginina em células HEK 293 (células renais embrionárias humanas transfectadas com adenovírus tipo 5). Esse peptídeo ainda induz o aumento da concentração plasmática de arginina em ratos Wistar e SHR.

## 2. Objetivos

PDF created with pdfFactory trial version <u>www.pdffactory.com</u>

#### 2.1. Objetivo geral

- Identificar e validar um novo alvo de ação do BPP-10c envolvido na atividade anti-hipertensiva deste peptídeo.

#### 2.2. Objetivos específicos

- Estabelecer um método bioquímico para isolar as principais proteínas com afinidade pelo BPP-10c.
- Identificar as principais proteínas com afinidade pelo BPP-10c.
- Estudar o efeito do BPP-10c sobre a principal proteína isolada.
- Estabelecer, em modelos celulares, a funcionalidade da interação do BPP-10c com sua proteína-alvo.
- Estabelecer, em modelos *in vivo*, a funcionalidade da interação do BPP-10c com sua proteína-alvo.
### 3. Materiais e Métodos

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

#### 3.1. Animais

Os animais utilizados para o desenvolvimento deste projeto foram camundongos Balb-c machos (20 g), cobaias machos (150 g), ratos espontaneamente hipertensos machos (250 g) e ratos Wistar machos (250 g), os quais foram criados no Biotério do Instituto Butantan e no Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Todos os animais foram mantidos e manipulados sob condições éticas (protocolo aprovado no Comitê de Ética do Instituto Butantan, CEUAIB 366/07) seguindo as regras internacionais para manipulação de animais, de acordo com a "International Animal Welfare Recommendations" e com o "Guidelines for the Use of Animals in Biochemical Research" (Giles, 1987).

#### 3.2. Cromatografia de afinidade

#### 3.2.1. Síntese e purificação dos peptídeos

Os peptídeos (BPP-10c <E-N-W-P-H-P-Q-I-P-P, sendo <E um resíduo de ácido piroglutâmico e BPP-10c amino livre E-N-W-P-H-P-Q-I-P-P) foram sintetizados pelo Dr. Robson L. Melo no Laboratório de Pré-Formulação do CAT-CEPID, segundo o método de síntese de fase-sólida pela estratégia Fmoc. Os peptídeos foram purificados por cromatografia de fase-reversa em sistema HPLC semi-preparativo (Shimadzu) com sistema binário de bombas LC-6AD e detector SPD-10AV UV-Vis, usando uma coluna de fase-reversa (ODS-C18, Shimadzu, 20x250). A eluição foi feita utilizando-se dois solventes: (A) ácido trifluoracético (TFA)/H<sub>2</sub>O (1:1000) e (B) TFA/acetonitrila (ACN)/ H<sub>2</sub>O (1:900:100), sob fluxo de 5 ml/min com gradiente de 10% para 60% do solvente B por 45 min. Para as cromatografias de fase-reversa em escala analítica foi

utilizando um sistema de HPLC da Shimadzu com um detector SPD-10AV UV-Vis e um detector fluorescente RF-535, acoplado a uma coluna Merck C18 (Merck KGaA, 4,6x30), que foi eluída com um sistema de solvente A e B, sob fluxo de 1 ml/min e um gradiente de 10%-80% de solvente B por 20 min. A eluição da coluna foi monitorada por absorbância em 220 nm. A massa molecular e a pureza dos peptídeos sintetizados foram confirmadas por espectrometria de massas MALDI-TOF (Ettan MALDI-TOF/Pro, GE Healthcare).

#### 3.2.2. Preparação de colunas para cromatografia de afinidade

As colunas utilizadas para a cromatografia de afinidade foram as HiTrap NHS-activated HP (GE Healthcare, volume de 1 ml). A estas colunas foram acoplados 5 mg do BPP-10c. Para tanto, inicialmente a coluna foi lavada com 2 ml de HCl 1 mM por três vezes sob fluxo de 1 ml/min. Posteriormente, foram injetados na coluna o BPP-10c dissolvido em 1 ml de NaHCO<sub>3</sub> 0,2 M e NaCl 0,5 M, pH 8,3, e então, a coluna foi incubada por 30 min a temperatura ambiente. Após o acoplamento do peptídeo, a coluna foi desativada utilizando o tampão A (etanolamina 0,5 M; NaCl 0,5 M, pH 8,3) e o tampão B (acetato de sódio 0,1 M; NaCl 0,5 M, pH 4,0). 6 ml de cada tampão foram aplicados alternadamente na coluna por três vezes, sob fluxo de 1 ml/min. A eficiência de acoplamento foi mensurada de acordo com a recomendação do fabricante, que consiste em lavar a coluna com três volumes de um tampão contendo NaHCO<sub>3</sub> 0,2 M e NaCl 0,5 M, pH 8,3, seguida da aplicação na coluna de 1 ml do tampão de eluição (glicina 2 M). Esse eluato foi submetido a análise por espectrofotometria utilizando como comprimento de onda 214 nm. O valor de

absorbância obtida foi utilizada para calcular o índice de acoplamento do peptídeo à resina. Após este procedimento a coluna foi novamente lavada com NaHCO<sub>3</sub> 0,2 M e NaCl 0,5M, pH 8,3, e armazenada em um tampão contendo Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50 mM e NaN<sub>3</sub> 0,1%, pH 7,0, a 4°C. A coluna assim preparada foi designada HiTrap-BPP-10c. Uma coluna controle (sem peptídeo) foi preparada utilizando a coluna HiTrap NHS-activated HP incubada apenas com o tampão A, e foi designada de HiTrap-controle.

#### 3.2.3. Preparação dos extratos de rins de camundongo

Para a preparação dos extratos renais foram utilizados camundongos Balb-c que pesavam aproximadamente 20 g. Estes foram anestesiados com 0,05 ml de ketamina 10% e xilazina 2% (1:1) e submetidos à perfusão intracardiana (infusão via ventrículo esquerdo e escoamento via átrio direito) com 20 ml de solução salina (NaCl 0,15 M) e heparina sódica 0,01% sob fluxo de 4 ml/min. Logo após, os rins foram retirados, pesados e a cada 0,1 g de rim foram adicionados 0,1 ml de um tampão contendo de Tris-HCI 10 mM, sacarose 25 mM, EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) 1 mM e PMSF (fluoreto de fenil metil-sulfonila) 1 mM, pH 7,5. Os rins foram triturados em um homogeneizador de tecidos (Polytron) e centrifugados a 100.000 g por 35 min, a 4°C, e em seguida o sobrenadante foi coletado e reservado (proteínas da fração citosólica) enquanto que os restos celulares foram ressuspendidos na mesma proporção acima e no mesmo tampão acrescido de o,1% de Triton X-100. Este homogenato foi submetido novamente à centrifugação (mesma condição anterior) e o sobrenadante foi novamente coletado (proteínas da fração de membrana).

#### 3.2.4. Cromatografia de afinidade

A coluna HiTrap-BPP-10c foi equilibrada com dois volumes do tampão Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, sob fluxo de 1 ml/min, então, 1 ml dos extratos renais (fração citosólica ou fração de membrana), contendo cerca de 100 mg/ml de proteínas totais, foram aplicados à coluna. Em seguida a coluna foi lavada com 10 volumes do tampão Tris-HCl 20 mM, pH 8,0 para eluição da proteínas não retidas pela resina. As proteínas que tiveram afinidade pelo BPP-10c foram a seguir eluídas com uma solução contendo glicina 100 mM e NaCl 0,5 M, pH 3,0 ou com 5 mg do BPP-10c. Os eluatos foram dialisados contra NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 10 mM, pH 8,0 por 12 h a 4ºC. A concentração de proteínas dos eluatos foi determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando o reagente Protein Assay (Bio Rad). A albumina bovina foi utilizada como padrão de referência, as leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 595 nm e a concentração protéica foi expressa em mg/ml. Em seguida, os eluatos foram concentrados até o volume de 0,1 ml por centrifugação a vácuo e uma amostra de 0,005 ml (5 µg de proteínas totais) foi submetida à eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida (item 3.2.5.2).

#### 3.2.5. Identificação das proteínas que tiveram afinidade pelo BPP-10c

#### 3.2.5.1. Espectrometria de massas

Após análise das proteínas eluídas em gel de SDS-poliacrilamida, as bandas que representavam as proteínas majoritárias foram recortadas do gel com auxílio de uma lâmina e picotadas em fragmentos pequenos. Em seguida, os fragmentos de géis foram transferidos para um tubo no qual foi adicionada uma solução de NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 75 mM em etanol 40% e a mistura foi incubada por 60 min a temperatura ambiente. O processo foi repetido até o gel ficar completamente descolorado. Então as proteínas no gel foram submetidas à reação de redução com a adição de DTT (ditiotreitol) 5 mM em NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 25 mM por 30 min a 60°C, seguida de uma reação de alquilação com iodoacetamida 55 mM em NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 25 mM por 30 min a temperatura ambiente, no escuro. Ao término da alquilação os fragmentos de gel foram lavados uma vez com NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 25 mM e uma vez de acetonitrila. Fez-se a desidratação dos fragmentos de gel incubando-os por três vezes com acetonitrila por 10 min e então os fragmentos foram secos por 10 min a vácuo. Logo após, o gel foi reidratado em uma solução contendo tripsina 40 µg/ml em NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 50 mM por 45 min no gelo. Em seguida, a solução de tripsina foi retirada, uma solução de NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 50 mM foi adicionada (em um volume suficiente para cobrir os fragmentos de gel) e os tubos contendo os fragmentos de gel foram no gelo em tremos tatizado (a 37°C) por 16 h.

Os fragmentos das proteínas digeridas foram extraídos do gel pela adição de 0,05 ml de NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 50 mM e incubação por 10 min em banho de ultra-som, seguida pela adição de 0,05 ml de acetonitrila. Este procedimento foi repetido por três vezes. Os eluatos contendo os fragmentos gerados pela digestão com tripsina foram secos a vácuo, ressuspensos em ácido trifluoroacético 0,1%, e submetidos à dessalinização em ZipTip C18 (Millipore). Cada amostra foi adicionada à placa de análise do espectrômetro de massas Ettan MALDI-TOF/Pro e misturada com o mesmo volume de uma solução saturada de ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico (Sigma) em acetonitrila 50%/ácido trifluoroacético 0,1%. Para as análises o espectrômetro foi 1046,54). As análises foram realizadas pelo Sr. Clécio F. Klitzke (MSc), no Laboratório de Espectrometria de Massas do Centro de Toxinologia Aplicada/CEPID.

#### 3.2.5.2. Eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida e Western blot

A eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida foi realizada como descrito por Laemmli (1970). O gel a 10% foi preparado em tampão Tris-HCI 380 mM, contendo SDS 0,1%, acrilamida 10%, TEMED (N.N.N'.N'-8.8 Ha tetrametiletilenediamina) 0,1% e persulfato de amônio 10%. As amostras aplicadas foram previamente desnaturadas e reduzidas em tampão Tris-HCI 125 mM, pH 6,8, contendo 2-mercaptoetanol 2% e SDS 2% e foram aquecidas a 95°C durante 5 min. Usou-se como tampão de corrida Tris-HCI 25 mM, contendo glicina 180 mM, pH 8,3 e SDS 1%. As corridas foram desenvolvidas a temperatura ambiente e a duração foi de aproximadamente 2 h, sob voltagem constante de 100 V. Os padrões de massas moleculares utilizados foram: soro albumina (68 kDa), IgG (cadeia pesada 50 kDa e cadeia leve 23,5 kDa), ovo albumina (43 kDa) e ribonuclease (13,7 kDa). Após as corridas, os géis foram retirados da placa e submetidos à coloração com uma solução de Coomassie *blue* (Coomassie blue R 250 0,1%, metanol 50%, ácido acético 7%) durante 12 h a temperatura ambiente. Transcorrido o tempo de coloração, o gel foi colocado em solução descorante [etanol, ácido acético e água 4:1:5 (v/v)] até a completa evidenciação das bandas.

Para o Western blot, após a eletroforese, as amostras foram eletrotransferidas para uma membrana de nitrocelulose, utilizando tampão de transferência (Tris-HCl 380 mM, glicina 180 mM em metanol 20%), sob voltagem constante de aproximadamente 30 V, durante 12 h. Após a transferência, a membrana foi retirada do sistema e foi corada com solução de Ponceau, para a visualização das bandas das proteínas transferidas. Após uma curta incubação a temperatura ambiente, o excesso de Ponceau foi retirado por lavagens com água destilada. As bandas visualizadas dos marcadores de massa molecular foram marcadas, para que no final do procedimento fosse possível identificar a massa aproximada das proteínas obtidas da cromatografia de afinidade e que foram reconhecidas pelo anticorpo anti-AsS.

A membrana foi então incubada com a solução TBS-T [tampão Trissalina contendo 0,05% (v/v) de Tween 20] suplementada com BSA 5% (albumina sérica bovina) por 1 h, em agitador orbital, a temperatura ambiente. Após descartar a solução de BSA, adicionou-se o anticorpo policional primário anti-AsS (BD Transduction Laboratories) diluído em tampão TBS-T a 1:500, (recomendação do fabricante) e incubou-se por mais 1 h a temperatura ambiente. Após este período, a solução do anticorpo foi removida, e a membrana foi lavada com a solução TBS-T, por três vezes, durante 10 min cada, a temperatura ambiente. Após descartar a solução de TBS-T, adicionouse o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com fosfatase alcalina (Promega), diluído a 1:7500 em tampão TBS-T. Após a incubação, sob agitação, por 1 h, a temperatura ambiente, a membrana foi novamente lavada por três vezes em tampão TBS-T por 10 min cada. Finalmente, adicionou-se a solução de revelação (solução AP [NaCl 5 M; Tris-HCl 1 M, pH 9,5; MgCl<sub>2</sub> 1 M] com BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato) 115 mM e NBT (nitro blue tetrazolium) 60 mM. A membrana foi mantida nesta solução a temperatura ambiente, até que a banda de interesse pudesse ser visualizada.

#### 3.3. Clonagem e expressão da AsS

3.3.1. Clonagem do cDNA da AsS humana no vetor de expressão pDEST 17

O clone contendo o cDNA da AsS humana foi adquirido comercialmente da Invitrogen (pORF-AsS). Este clone é apropriado para clonagem utilizando o sistema GATEWAY, que consiste em uma recombinação entre o clone pORF-AsS e os vetores pDESTs. Os vetores pDESTs são um conjunto de vetores apropriados para expressão de proteínas em sistemas procariotos, sendo que a variação entre eles consiste apenas na proteína de fusão co-expressa com o proteína desejada. Nesse projeto optou-se por utilizar o vetor pDEST 17, que apresenta uma seqüência que codifica seis resíduos de histidina na região Nterminal. Conforme recomendação do fabricante, realizou-se uma reação de recombinação que continha: pORF-AsS 150 ng/µl, pDEST 17 150 ng/µl, LR clonase II 0,2 U/µl em tampão Tris-EDTA (TE) pH 8,0. Em seguida essa reação foi incubada por 1 h a temperatura ambiente e ao final foi adicionada 0,2 U/µl

O DNA recombinado foi inserido em bactérias pelo método de choque térmico, como descrito a seguir. Aproximadamente 25 a 50 ng do produto da reação descrita acima foram colocados em um tubo plástico de microcentrífuga já contendo 10<sup>5</sup> células da bactéria *Escherichia coli* (*E. coli*) da linhagem DH5α. Após incubação no gelo por 20 min, as bactérias foram incubadas a 42°C por 45 segundos e, em seguida, no gelo por 3 min. Logo após, foram adicionados 0,95 ml de meio de cultura SOB (*Super Optimal Broth,* que é constituído por triptona 2%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 0,05%, KCl 2,5 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, MgSO<sub>4</sub> 10 mM) suplementado com 20 mM de glicose. Então, o tubo de

centrífuga contendo as bactérias foi incubado a 37°C, por 1 h, sob agitação. Só então as bactérias transformadas foram semeadas em placas com meio LB sólido (extrato de levedura 0,5%; triptona 1% e bacto-ágar 2%) contendo um antibiótico de seleção (ampicilina 50  $\mu$ g/ml). Estas placas foram então incubadas em estufa a 37°C entre 12 a 14 h.

Os plasmídeos das colônias bacterianas foram extraídos utilizando o kit *Minipreps ä Wizard DNA Purification System* (Promega) e os clones isolados foram submetidos a seqüenciamento de nucleotídeos utilizando o *ABI Prism Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* (BigDye – Applied Biosystem) em conjunto com o seqüenciador automático ABI 3100 (Applied Biosystem). Os insertos foram seqüenciados usando oligonucleotídeos (senso 5'-ATGTCCAGCAAGGGCTC-3') e anti-senso 5'-TTTGGCAGTGACCTTGC-3') correspondentes às regiões flanqueadoras do sítio de clonagem do vetor pDEST 17.

#### 3.3.2. Expressão da AsS recombinante humana

As bactérias *E. coli* DH5α contendo o vetor pDEST 17 com o cDNA codificante para a AsS foram amplificadas em meio líquido contendo o antibiótico de seleção (ampicilina 50 µg/ml). Para tanto, um pré-inóculo foi preparado retirando-se uma colônia isolada da placa e adicionando-a a 50 ml de meio de cultura LB (Luria Bertani). Após incubação entre 12 a 14 h, a 37°C, sob agitação, este pré-inóculo foi transferido para um erlenmeyer contendo 500 ml de LB líquido contendo ampicilina 100 µg/ml, que foi incubado durante 4 h a 37°C, sob agitação. A absorbância do meio de cultura com as bactérias foi monitorada, até atingir a densidade ótica a 600 nm em torno de 0,6 a 0,8. A expressão da proteína recombinante foi induzida pela adição de L-arabinose

0,2% (Invitrogen), seguido de incubação por aproximadamente 4 h, a 30°C, sob agitação. Após a incubação, a cultura foi centrifugada a 200 g, a 4°C, por 20 min para recuperar as bactérias contendo a proteína recombinante em seu citoplasma. Após descartar o meio de cultura, as bactérias foram lavadas com 10 a 20 ml de solução salina, congeladas e estocadas a –20°C até o seu uso.

As bactérias foram descongeladas e ressuspendidas em 10 ml de tampão Tris (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 e NaCl 150 mM). Essas células foram lisadas por sonicação no gelo e centrifugadas a 250 g, a 4°C, por 45 min. Após a centrifugação, o sobrenadante foi recolhido e a proteína recombinante foi purificada por cromatografia de afinidade, utilizando uma resina de agarose Ni-NTA (níquel-ácido nitriloacético, Qiagen), haja vista que a AsS recombinante foi gerada em fusão com uma cauda de histidina, a qual apresenta alta afinidade pelo níquel.

A resina Ni-NTA foi inicialmente equilibrada com tampão A, contendo Tris-HCl 20 mM pH 8,5, KCl 100 mM, imidazol 70 mM e glicerol 10% e, em seguida, foi incubada com sobrenadante obtido acima por 1 h a 4°C, sob agitação. A resina foi então lavada por 3 vezes com 3 volumes de tampão A. Para eluição da proteína recombinante purificada, foram adicionados 2 volumes de tampão C [Tris-HCl 20 mM pH 8,5, KCl 10 mM, imidazol 300 mM, e glicerol 10% (v/v)], e a resina foi incubada por 1 h a 4°C, sob agitação. Essa amostra (resina mais tampão de eluição) foi centrifugada a 200 g, a 4°C, por 10 min, e o sobrenadante foi transferido para novo tubo, sendo este sobrenadante denominado de primeiro eluato. Foram adicionados mais 2 volumes de tampão C no tubo contendo a resina e, após agitação, a 4°C, por 10 min a resina foi novamente centrifugada e o sobrenadante foi coletado. Estas amostras foram armazenadas e denominadas de segundo eluato. A resina foi então reequilibrada com 2 volumes de tampão A, e armazenada a 4ºC. Os eluatos foram estocados a –20ºC para posterior identificação por espectrometria de massas e *Western blot* (descritos nos itens *3.2.5.1. e 3.2.5.2.*, respectivamente) e quantificação da expressão da AsS.

#### 3.4. Determinação da atividade enzimática da AsS

A AsS isolada de rim de camundongo ou a AsS recombinante foi submetida à quantificação pelo método de Bradford (Bradford, 1976) e utilizada para a determinação da atividade enzimática. A metodologia empregada para medir a atividade enzimática da AsS foi a descrita por Hao et al. (2004). Esta consiste em medir, por colorimetria, o fosfato inorgânico gerado indiretamente pela ação da AsS. A AsS conjuga a citrulina ao aspartato gerando argininosuccinato, com concomitante hidrólise do ATP (adenosina tri-fosfato) gerando AMP (adenosina mono-fosfato) e pirofosfato (Figura 2). O pirofosfato resultante é então hidrolisado pela pirofosfatase (enzima adicionada à reação) liberando duas moléculas de fosfato inorgânico que reagem com molibdato de amônio produzindo uma solução de coloração azul.





**Figura 2** – Representação esquemática da reação catalisada pela AsS. O primeiro passa da reação é a incorporação do AMP à citrulina com liberação de pirofosfato. Em seguida, há a troca do AMP pelo aspartato com liberação do AMP. Finalmente, ocorre a liberação do produto arginosuccinato.

Para tanto, 1 µg de AsS foi adicionado ao tampão de reação (Tris-HCl 20 mM pH 7,8; ATP 2 mM, citrulina 2 mM; aspartato 2 mM; MgCl<sub>2</sub> 6 mM; KCl 20 mM e pirofosfatase 0,2 U) para volume final de 200 µl de reação. As reações foram incubadas a 37°C em placas de 96 poços e após 30 min a reação foi interrompida com a adição de um volume igual de tampão molibdato (ácido ascórbico 10 mM, molibdato de amônio 2,5 mM e ácido sulfúrico 2%). O acúmulo de fosfato inorgânico gerado nas amostras foi determinado por colorimetria a 650 nm e pela comparação dos valores obtidos com uma curva padrão. Esta foi obtida incubando-se crescentes concentrações (0,05 – 2 mM) de fosfato inorgânico e o tampão molibdato.

Para avaliar a ação do BPP-10c sobre a atividade da AsS, realizou-se o experimento descrito acima, porém adicionando quantidades crescentes do BPP-10c (0, 0,5  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 2  $\mu$ M, 4  $\mu$ M e 8  $\mu$ M) e/ou 1 mM do inibidor específico da enzima, o MDLA (ácido metil DL aspártico - Sigma).

Ainda, para analisar o efeito do BPP-10c sobre a afinidade da AsS pelos seus substratos foram realizados ensaios de atividade da AsS na ausência e na presença de 0,5 µM do BPP-10c e com variações crescentes da concentração (0,1 mM, 0,2 mM, 0,5 mM e 1 mM) de um dos seus três substratos (citrulina, aspartato e ATP) fixando a concentração dos outros dois substratos em 2 mM. Os resultados obtidos foram utilizados para a construção do gráfico duplo-recíproco para cada um dos substratos da AsS (curva construída com os valores inversos de velocidade, e com os valores das concentrações do substrato) e o valor do Km para cada substrato foi determinado na presença e na ausência do BPP-10c.

Substituição de alguns resíduos importantes na seqüência do BPP-10c foi realizada como descrito na seção 3.2.1., e estão mostradas na Tabela 2. Optou-se por trocar os resíduos de aminoácidos comuns aos outros BPPs, como a isoleucina e as prolinas por alanina (Ala scan). Os efeitos dos peptídeos modificados sobre a atividade catalítica da AsS foi determinado como descrito acima, fixando-se a concentração dos peptídeos em 0,5 µM.

Peptídeos	Sequência	
BPP-10c	<enwphpqipp< td=""></enwphpqipp<>	
BPP-10c Ala1	<enw<b>AHPQIPP</enw<b>	
BPP-10c Ala2	<enwphaqipp< td=""></enwphaqipp<>	
BPP-10c Ala3	<enwphpqapp< td=""></enwphpqapp<>	
BPP-10c Ala4	<enwphpq<b>ap</enwphpq<b>	
BPP-10c Ala5	<enwphpqip<b>a</enwphpqip<b>	

#### Tabela 2

Tabela 2 – Seqüência dos peptídeos análogos estruturais do BPP-10c. Emnegrito encontra-se a modificação estrutural realizada em relação ao BPP-10c.

#### 3.5. Cultura de Células

#### 3.5.1. Cultura de HUVECs (human umbilical vessel endothelial cells)

Os cordões umbilicais foram cedidos gentilmente pelo Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (protocolo do Comitê de ética do HU 01/2009). Os cordões coletados foram colocados sobre papel alumínio e examinados para verificar se não apresentavam lesões, e então foram lavados externamente com algodão embebido em etanol 96%. Fez-se um corte transversal no extremo do cordão, localizou-se a veia do cordão na qual se fez a canulação. Foi encaixada uma chave de três vias na veia e amarrada fortemente. Em seguida, a veia foi lavada com 20 ml de salina estéril (encheuse uma seringa de 20 ml com salina estéril, conectou-se a torneira que foi aberta para a injeção da salina), então foi amarrada fortemente a outra extremidade do cordão umbilical. Logo após, foi colocado pela via, antepondo um filtro de seringa, 1 ml de uma solução contendo colagenase tipo IV (0,2 mg/ml) para cada centímetro de cordão umbilical e então a chave de três vias foi fechada. Colocou-se o cordão numa placa de petri e incubou-se durante 15 min a 37°C, e o conteúdo interno do cordão (células) foi removido pelo massageamento do cordão e colocado em um tubo estéril. Em seguida, adicionou-se soro bovino fetal até a concentração final de 10% a fim de neutralizar a ação da colagenase. As células coletadas foram centrifugadas durante 10 min a 200 g, a 4°C, e, depois de descartado o sobrenadante, as células foram ressuspendidas em 2 ml de meio de cultura completo contendo 80% de DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium) e 20% de soro bovino fetal com 2 mM de L-glutamina e 100 mg/ml de penicilina/estreptomicina. Colocouse a suspensão de células em uma garrafa previamente tratada com uma

solução de gelatina 1% (30 min a 4°C) e acrescentou-se 5 ml de meio de cultura completo. A placa foi incubada a 37°C em estufa com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. O meio de cultura foi trocado no dia seguinte e depois a cada três dias.

#### 3.5.2. Cultura de células HEK 293 (human embryonic kidney 293)

A linhagem celular HEK 293 (células renais embrionárias humanas transfectadas com adenovírus tipo 5) foi adquirida do ATCC (American Type Culture Collection). A manutenção da linhagem HEK 293 foi realizada utilizando-se o meio DMEM, suplementado com soro bovino fetal 10%, penicilina/estreptomicina 100 mg/ml e L-glutamina 2 mM. As células foram cultivadas a 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

#### 3.6. Ensaio de viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada utilizando-se o kit Live/Dead (Invitrogen), o qual utiliza dois marcadores fluorescentes, a calceína AM (cal AM) e o homodímero de etídeo (EthD-1), capazes de marcar simultaneamente as células vivas e as células mortas. Assim,  $1 \times 10^6$  células HEK 293 ou HUVEC foram plaqueadas em meio sem soro na presença ou na ausência de 100 µM do BPP-10c durante 24 h a 37°C em uma placa fluorescente de parede preta (Costar) de 96 poços. Após esse período, o meio foi removido e as células foram incubadas com 4 µM de calceina AM e 2 µM de EthD-1 por 30 min, a temperatura ambiente, e a fluorescência verde da calceína (Ex: 485 nm e Em: 530 nm) ou a fluorescência vermelha do EthD-1 (Ex: 530 nm e Em: 645 nm) foi medida utilizando o equipamento FlexStation 3 reader (Molecular Devices). As quantidades de células vivas e mortas foram calculadas no

programa SoftMax Pro (Molecular Devices) a partir de padrões com conhecidos números de células vivas (não tratadas) e mortas (tratadas com 0,1-0,5% de digitonina por 10 min).

#### 3.7. Conjugação do BPP-10c com a cianina 3 (Cy3)

A conjugação do BPP-10c amino livre (E-N-W-P-H-P-QI-PP) com o marcador fluorescente cianina 3 (Cy3) foi realizada de acordo com o protocolo do fabricante (Amersham Bioscences), onde o peptídeo com o grupamento amino livre do resíduo N-terminal foi ligado ao grupamento ácido carboxílico da Cy3. A purificação dos peptídeos conjugados foi realizada por cromatografia de fase reversa em sistema HPLC (RP-HPLC) em coluna C18 sendo monitorada pela medida da fluorescência do grupo marcador. Padrões internos, como a Cy3 livre e o peptídeo sem marcação foram usados. A conjugação do BPP-10c com a Cy3 (Cy3-BPP-10c) foi identificada e confirmada por espectrometria de massas MALDI-TOF (Ettan MALDI-TOF/Pro, GE Healthcare).

#### 3.8. Ensaios de internalização em HUVECs e células HEK 293

As HUVECs e as células HEK 293 foram mantidas sobre uma lamínula numa densidade de aproximadamente  $5\times10^5$  células/100 mm<sup>2</sup>, dentro de placas contendo meio de cultura apropriado, durante 12 h a  $37^{\circ}$ C, com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida, as células foram lavadas com tampão PBS, e incubadas com meio de cultura sem soro bovino fetal, contendo 1 µM do peptídeo Cy3-BPP-10c durante 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h e 24 h a  $37^{\circ}$ C, com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Após incubação, as células foram novamente lavadas com tampão PBS e, então, fixadas com uma solução de

paraformaldeído 4% por 10 min, a temperatura ambiente. Após a fixação, as células foram lavadas com água estéril, e as lamínulas foram colocadas sobre uma lâmina contendo "*anti-fading*" (Vector Laboratories, responsável pela manutenção da fluorescência da Cy3). Após este procedimento, as laterais foram vedadas com esmalte. As lâminas foram analisadas e as imagens capturadas por um microscópio de fluorescência (Axiocam, Zeiss) utilizando filtros com 550 nm de excitação e 570 nm de emissão.

#### 3.9. Avaliação do Cy3-BPP-10c em íleo de cobaia

A atividade potenciadora do peptídeo Cy3-BPP-10c sobre o efeito contrátil da bradicinina em musculatura lisa foi mensurada utilizando-se preparações de íleo isolado de cobaia. Para tanto, foram utilizadas cobaias macho infantil de 180 a 200 g. Cada animal foi deixado em jejum de 18 a 24 h antes da montagem e sacrificado por imobilização mecânica seguida de sangria por rompimento dos vasos cervicais. Amostras do íleo terminal foram removidas após incisão do abdômen, e extensivamente lavadas, interna e externamente, com solução a 37°C de Tyrode [20 ml solução estoque I + 40 ml solução estoque II + 1 ml de solução de difenidramina (1 mg/ml) + 1 ml solução de atropina (1 mg/ml) + D-glicose 5,6 mM para 1 litro de solução, onde solução estoque I = Na<sub>2</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,36 mM; NaHCO3 11,9 mM, e solução estoque II = NaCI 137 mM, KCI 2,7 mM, CaCl<sub>2</sub> 1,36 mM, e MgCl<sub>2</sub> 0,49 mM] e deixado em repouso por 30 min.

Em seguida, uma das extremidades de um segmento de íleo de aproximadamente 2 cm foi fixada no fundo de uma cuba de vidro de 5 ml, apropriada para ensaios de órgãos isolados contendo solução Tyrode a 37°C,

com borbulhamento de carbogênio constante. A outra extremidade deste fragmento de íleo foi fixada a um aparato metálico acoplado a um amplificador, o qual mantinha uma tensão constante de aproximadamente 1 g. Os dados de contração foram capturados por um programa registrador de contratibilidade (Chart v.s.4), Os ensaios analíticos foram realizados adicionando 3  $\mu$ M de Cy3-BPP-10c 30 min antes de se fazer a curva dose e resposta de bradicinina (10<sup>-10</sup> M a 3 X 10<sup>-7</sup> M).

# 3.10. Ensaios de quantificação da internalização do BPP-10c em HUVECs e células HEK 293

As HUVECs e as células HEK 293 foram mantidas até a densidade de aproximadamente 5x10<sup>5</sup> células/100 mm<sup>2</sup>, dentro de placas contendo meio de cultura apropriado, durante 12 h a 37°C, com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida, as células foram lavadas com tampão contendo Tris-HCl 50 mM pH 7,5 e sacarose 1 mM e incubadas com meio sem soro bovino fetal, contendo 500 pmol do BPP-10c durante 30 min, 1 h, 2 h, 4 h a 37°C, com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Após incubação, o meio de cultura (fração extracelular) foi coletado e os fragmentos celulares foram removidos por centrifugação a 10.000 g por 15 min. Paralelamente, as células foram coletadas da placa com tampão contendo Tris-HCl 50 mM pH 7,5 e sacarose 1 mM foram lavadas com o mesmo tampão e submetidas à lise por congelamento em nitrogênio líquido e ao descongelamento a 37°C, por três vezes. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10.000 g por 15 min e o sobrenadante (fração intracelular) foi coletado. Ambas as frações foram liofilizadas e ressuspendidas em acetronitrila e submetidas à análise em espectrômetro de massas por LC-ESI/MS (liquid

chromatography-electrospray/mass spectrometry) utilizando-se 0 espectrômetro Surveyor MSQ Plus (Thermo Electron) no modo positivo, para a detecção do BPP-10c. Amostras de 0,02 ml foram carregadas em uma coluna analítica de fase-reversa (Source 5RPC ST 2.1/150, Amersham Biosciences) e a coluna foi eluída utilizando-se um gradiente de 20% – 100% B (B= acetonitrila 90%, ácido fórmico 0.1%; A= ácido fórmico 0.1%) em 20 min, sob fluxo de 0,2 ml/min. Os potenciais do capilar e do cone foram ajustados para 3,1 kV e 40 V, respectivamente. O BPP-10c foi detectado como um íon duplamente carregado de valor de m/z 599 [M+2H]<sup>2+</sup>, com variação de 1 amu e *dwell time* de 1 s. Para a obtenção de uma curva de calibração do analito o BPP-10c foi adicionado em quantidades crescentes (5 pmol - 1000 pmol) a 0,1 ml da fração solúvel de lisado celular e estas amostras foram injetadas na coluna e eluídas como descrito acima. A curva foi construída plotando-se a área do pico de eluição da coluna versus a quantidade de BPP-10c injetada. Os dados foram processados usando-se o programa Xcalibur 1.4 (Thermo Electron) e as concentrações das amostras desconhecidas de BPP-10c foram calculadas a partir da curva de calibração. As análises foram realizadas pelo Sr. Clécio F. Klitzke (MSc), no Laboratório de Espectrometria de Massas do Centro de Toxinologia Aplicada/CEPID.

#### 3.11. Determinação de arginina produzida por células HEK 293

1 x 10<sup>6</sup> células HEK 293 foram plaqueadas em meio DMEM sem soro na ausência ou presença de concentrações crescentes do BPP-10c (0,01  $\mu$ M, 0,1  $\mu$ M, 0,5  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 2  $\mu$ M, 4  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 100  $\mu$ M) e/ou 1 mM MDLA durante 24 h a 37°C. Logo após, o meio de cultura foi transferido para um tubo e centrifugado a 10.000 g por 5 min a temperatura ambiente, e o sobrenadante foi coletado (meio extracelular). As células foram lavadas cinco vezes com a solução de Krebs (118 mM de NaCl, 4,7 mM de KCl, 1,2 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,17 mM de MgSO<sub>4</sub>, 2,5 mM de CaCl<sub>2</sub>, 25 mM de NaHCO<sub>3</sub> e 5,6 mM de glicose) e ressuspendidas em 0,1 ml da solução de Krebs. As proteínas foram extraídas pela adição de 0,5 ml de metanol e em seguida a mistura foi centrifuga por 2 min a 10.000 g para remover os restos celulares. A seguir 0,2 ml do sobrenadante (meio intracelular) foram adicionados a 0,8 ml de PBS e então essas amostras foram colocadas nas colunas Oasis MCX SPE (Waters), colunas estas que foram previamente acopladas a um sistema de sucção. Após a aplicação da amostra, a coluna foi consecutivamente lavada com 1 ml de HCI 100 mM e 1 ml de metanol. Os analitos ligados foram eluídos com 1 ml de amônia/água/metanol (10/40/50) e secos por centrifugação a vácuo a 70°C. O material seco foi derivatizado com fenilisotiocianato para a determinação de arginina, como previamente descrito por Heinrikson e Meredith, 1984 e Ebert, 1986. Brevemente, a amostra seca foi diretamente derivatizada com 0,03 ml de uma solução contendo 75% de etanol/água (7/1), 12,5% de trietilamina, e 12,5% de fenilisotiocianato. Após agitação vigorosa, a mistura foi incubada por 10 min a temperatura ambiente e então foram adicionados 0,17 ml de água e 0,1 ml dessa mistura foi injetado em uma coluna analítica de fase reversa C18 (250 mm, 4,6 mm, 5 µm, Merck) acoplada a um sistema de HPLC (HP 1100 series). A eluição foi feita utilizando-se dois solventes: (A) ácido trifluoracético (TFA)/H<sub>2</sub>O (1:1000) e (B) TFA/acetonitrila (ACN)/ H<sub>2</sub>O (1:900:100), sob fluxo de 1 ml/min com gradiente de 20% para 80% do solvente B por 45 min, como descrito anteriormente por Ebert (1986). Uma corrida cromatográfica padrão foi realizada utilizando uma amostra de 2,5 mM de arginina previamente derivatizada com o reagente de fenilisotiocianato. Ainda, foi realizada uma corrida cromatográfica controle utilizando apenas 0,1 ml do reagente de fenilisotiocianato. A integração da área dos picos obtidos foi comparada com os valores obtidos pela integração da área do padrão de arginina para calcular a quantidade de arginina presente em cada amostra.

#### 3.12. Quantificação de óxido nítrico (NO) em HUVECs

As HUVECs foram mantidas em placas com meio de cultura e condições apropriadas (descrito no item 3.5.1.) até atingir 80% de confluência, quando foram então replaqueadas na concentração de 1x10<sup>6</sup> células/poco contendo o meio apropriado sem soro bovino fetal. Após 16 h foi adicionado à cultura o BPP-10c em concentrações crescentes (0,01 µM, 0,1 µM, 0,5 µM, 1 µM, 2 µM, 4 μM, 10 μM, 100 μM) por 24 h. Após a incubação, 1 ml do meio de cultura foi removido e adicionado de N-etilmaleimida (concentração final de 10 mM). Em seguida a mistura foi centrifugada a 200 g por 5 min a 4°C para eliminar possíveis células ou fragmentos celulares. O sobrenadante (meio extracelular) foi coletado para análise e quantificação do NO produzido. As células foram lavadas com PBS e lisadas com o tampão RIPA [Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, Nonidet P-40 (NP-40) 1%, deoxicolato de sódio 0,5%, SDS 0,1%, DTPA 1 mM e N-etilmaleimida 10 mM]. Em seguida, o lisado celular foi coletado e incubado no gelo por 20 min e centrifugado a 200 g por 5 min a 4°C para eliminar os fragmentos celulares. Então, amostras de 0,03 ml dos meios extracelulares e intracelulares foram injetadas no analisador de óxido nítrico (NOA, Sievers) utilizando o protocolo otimizado por Feelisch et al. (2002).

Brevemente, os meios extracelulares e intracelulares foram injetados em uma cela contendo uma solução saturada de cloreto de vanádio (III) em HCl 1 N a 90°C. Nestas condições todos os produtos derivados do NO (nitrato, nitrito, nitrosotiol, nitrosaminas e complexo de nitrosil) foram reduzidos a NO e comparados com uma solução padrão de nitrato  $(0,1 - 10 \mu M)$ .

# 3.13. Determinação da arginina plasmática e da pressão arterial média (PAM) de SHR e ratos Wistar

Para realização dos experimentos de determinação dos níveis de arginina plasmática foram utilizados ratos machos da linhagem SHR de 270 a 350 g e ratos machos da linhagem Wistar de 270 a 350 g. Os animais foram mantidos com acesso livre à alimentação e água e sob ciclo luz-escuro de 12 h cada em estante ventilada (ALESCO) no biotério de experimentação convencional de mamíferos do CAT/CEPID.

Os animais foram anestesiados com ketamina (185 mg/kg) e xilasina (9,2 mg/kg) pela via intraperitonial (ip), 22 h antes do experimento para a implantação crônica de cânulas (TYGON Flexible Plastic Tubing,Saint-Gobain PPL Corp) na artéria e veia femoral. Então, as cânulas foram implantadas na artéria e veia femoral, e exteriorizadas e fixadas na porção superior do dorso do animal. No dia do experimento, com o animal acordado, a cânula arterial foi conectada a um transdutor de pressão (strain-Gauge –DT-XX Viggo-spectramed) e as oscilações de pressão captadas foram amplificadas e convertidas em sinais digitais através do conversor analógico/digital (A/D) MP100 (BIOPAC systems, Inc.). O software utilizado foi AcqKowledge 5.0 (BIOPAC Systems, Inc.). Após a prévia calibragem do equipamento, a pressão

arterial pulsátil foi monitorada continuamente. A PAM foi calculada via software a partir dos valores da pressão arterial pulsátil. Após 30 min de medida contínua da PAM foi administrado o BPP-10c (71 nmol/Kg) ou NaCl 0,15 M ou MDLA (1 mmol/Kg) ou BPP-10c concomitantemente com MDLA. A PAM foi registrada até 6 h após a injeção das substâncias.

Para a dosagem de arginina, foram feitas coletas de 0,05 ml de sangue arterial nos seguintes tempos: 0, 30 min, 60 min, 120 min, 240 min e 360 min após o tratamento endovenoso com BPP-10c (71 nmol/Kg) ou NaCl 0,15 M ou MDLA (1 mmol/Kg) ou BPP-10c concomitantemente com MDLA. Essas amostras foram centrifugadas por 5 min a 200 g para remoção das células sanguíneas e, em seguida, submetidas a uma semi-purificação de arginina utilizando cromatografia de troca iônica.

A cromatografia de troca iônica foi realizada utilizando uma coluna MCX catiônica (SPE, Waters) na qual foi injetada por sucção uma amostra de 0,02 ml do plasma sanguíneo. Em seguida, a coluna foi lavada com 1 ml de HCl 100 mM e 1 ml de metanol. A amostra foi eluída com 1 ml de uma mistura contendo amônia 25%, água 40% e metanol 50%. O eluato foi então submetido à secagem por liofilização e o precipitado foi ressuspendido em 0,03 ml do reagente fenilisotiocianato, descrito no item 3.11 (Heirikson e Meredith, 1984). Então, as amostras foram misturadas vigorosamente e incubadas por 10 min a temperatura ambiente, sendo em seguida adicionados a cada amostra 0,17 ml de água. 0,1 ml dessa mistura foi injetado numa coluna analítica C18 (250 mm, 4,6 mm, 5 µm, Merck) acoplada a um sistema de HPLC (HP 1100 series). A eluição foi feita utilizando-se dois solventes: (A) ácido trifluoracético (TFA)/H<sub>2</sub>O (1:1000) e (B) TFA/acetonitrila (ACN)/ H<sub>2</sub>O (1:900:100), sob fluxo de 1 ml/min

com gradiente de 20% para 80% do solvente B por 45 min, como descrito por Ebert (1986). A concentração de arginina foi obtida por comparação com uma curva padrão do aminoácido (1 – 200 μM).

## 3.14. Avaliação do efeito do BPP-10c sobre a microvasculatura de camundongos pela técnica de microscopia intravital

Camundongos da linhagem Balb-c machos jovens, com idade de seis semanas, foram obtidos no Biotério do Instituto Butantan para os ensaios de microscopia intravital. Esses animais foram mantidos com água e ração *ad libitum*. Estes experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Instituto Butantan (366/07).

A dinâmica de alterações na microvasculatura foi determinada usando microscopia intravital por trans-iluminação do músculo cremáster de camundongo após injeção de 71nm/Kg do BPP-10c ou seu controle (BPP-10c invertido, PPIQPHPWNE) ou 1 mmol/Kg do MDLA ou concomitante administração do BPP-10c e do MDLA. Também foi usado como controle o veículo usado para dissolver os peptídeos (solução salina). Antes do início dos experimentos os animais foram anestesiados com pentobarbital 50 mg/Kg via intraperitoneal (hypnol, Cristalia) e o músculo cremáster foi exposto para visualização por microscopia *in situ* (Baez, 1973). Os animais foram mantidos em uma placa termostaticamente controlada a 37°C, a qual contém uma plataforma transparente onde o tecido foi trans-iluminado. Após estabilização da micro-circulação, o número de leucócitos aderentes em vênulas póscapilares foi contado após a injeção do peptídeo. O diâmetro arteriolar também foi determinado neste experimento. O estudo do sistema microvascular em tecido trans-iluminado foi realizado usando um microscópio óptico (Axiolab,

Carl Zeiss) acoplado a uma câmera fotográfica (Coolpix 990, Nikon) usando uma distância longitudinal 10/025. Esses experimentos foram realizados pela Dra. Mônica Lopes Ferreira e todas as determinações foram realizadas em triplicata.

#### 3.15. Análise estatística

Todos os valores apresentados representam a média  $\pm$  desvio-padrão. O teste *t-student* foi utilizado para determinar as diferenças estatísticas. Somente *p-values* menores que 0,01 foram considerados significativos.

### 4. Resultados

## 4.1. Isolamento e identificação da proteína ligante do BPP-10c no citosol e na membrana de células renais

A hipótese de que o BPP-10c teria outra proteína alvo, além da sECA, foi sugerida em trabalhos prévios, nos quais o seu efeito anti-hipertensivo foi dissociado da capacidade de inibição da sECA (lanzer et al., 2007), e foi demonstrada a sua acumulação em rins de camundongos, mesmo quando concomitantemente administrado com o captopril (Silva et al., 2008). Para purificar e isolar a proteína alvo do BPP-10c, frações protéicas citosólicas (com concentração protéica de aproximadamente 90 mg/ml) e frações protéicas de membranas de tecido renal de camundongo (com concentração protéica de aproximadamente 25 mg/ml) foram submetidas à cromatografia de afinidade usando uma coluna HiTrap NHS-activated HP previamente conjugada com o BPP-10c (Figura 3), aqui chamada HiTrap-BPP-10c.



**Figura 3** – Representação esquemática da reação de acoplamento do BPP-10c à coluna Hi-Trap NHS-activated HP. Para ligação covalente do BPP-10c à resina de agarose foi utilizado o resíduo N-terminal modificado, por substituição do resíduo ácido piroglutâmico pelo ácido glutâmico.

Após a preparação das colunas, a eficiência de acoplamento (índice de incorporação do BPP-10c à coluna) foi calculada pela determinação da absorbância em 214 nm de uma solução de glicina 2 M, pH 2,0, que foi aplicada à coluna para eluição do peptídeo que não havia sido ligado covalentemente à resina. Em todas as colunas utilizadas o índice de incorporação mostrou aproximadamente 95% de eficiência.

As frações protéicas de rins de camundongo previamente preparadas foram submetidas à cromatografia de afinidade na coluna HiTrap-BPP-10c e os

eluatos obtidos (tampão de eluição: glicina 100 mM, NaCl 0,5 M, pH 3,0) foram analisados por eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida e mostraram perfis protéicos muito parecidos (Figura 4).

As bandas da proteína majoritária (~46 kDa) obtida da cromatografia de afinidade da fração citosólica (Figura 4, linha 1) e da fração de membrana (Figura 4, linha 2) foram recortadas do gel, submetidas à digestão tripsínica, e posteriormente à análise por espectrometria de massas em espectrômetro MALDI-TOF. Essa análise resultou identificação na da proteína argininosuccinato sintase (AsS), E.C. 6.3.4.5, tendo a análise por espectrometria de massas (*peptide mass fingerprinting*) apresentado cobertura de seqüência de aminoácidos de 30 % e 70 % para a banda de proteína obtida da fração de membrana e da fração citosólica, respectivamente (Tabela 3). Posteriormente, para confirmação da identificação, as mesmas amostras foram analisadas por Western blot utilizando o anticorpo policional anti-AsS (Figura 5, linhas 1 e 2), a qual resultou na identificação positiva da AsS nestas amostras, indicando assim que a proteína de rim de camundongo com maior afinidade pelo BPP-10c nas condições utilizadas na cromatografia é a AsS.

#### Tabela 3

Amostra		Massa	
analisada	Peptídeo identificado	(Da)	Proteína identificada
Proteína majoritária da fração de citosólica. Banda de ~46 kDa da Figura 4A linha 1	TYELPDGQVITIGNER	1804,908	
	IDIVENR	858,468	
	APNSPDMLEIEFK	1490,72	
	VQVSVFK	806,4771	
	NQAPPGLYTK	1088,573	
	EQGYDVIAYLANIGQK	1781,907	
	FELTCYSLAPQIK	1569,777	
	EFVEEFIWPAVQSSALYEDR	2415,15	
	SPWSMDENLMHISYEAGILENPK	2693,224	Argininosuccinato Sintase (E.C. 6.3.4.5)
	RQVEIAQR	999,5694	
	GRNDLMEYAK	1212,569	
	KVFIEDVSK	1064,599	
	VFIEDVSK	936,5037	
	QHGIPIPVTPK	1186,694	
	MPEFYNR	956,4295	
	EDFEEAR	895,3792	
	APNSPDVLEIEFKK	1586,842	
	APNSPDVLEIEFK	1458,748	
	TTSLELFMYLNEVAGK	1831,916	
	VTNIK	574,3559	
Proteína majoritária da fração de membrana. Banda de ~46 kDa da Figura 4A linha 2	YLLGTSLARPCIARR	1590,89	
	FELTCYSLAPQIK	1569,82	
	VIAPWR	740,89	
	MPEFYNR	956,08	Argininosuccinato Sintase (E.C. 6.3.4.5)
	APNSPDVLEIEEFK	1458,61	
	TTSLELFMYLNEVAGK	1816,08	

**Tabela 3** – Identificação da proteína com afinidade pelo BPP-10c, indicada na figura 4, usando digestão tripsínica em gel e posterior análise das massas dos peptídeos gerados por espectrometria de massas MALDI-TOF.

Para verificar se a interação do BPP-10c com a AsS não era de caráter inespecífico foi realizada uma cromatografia de afinidade sob as condições anteriores, porém usando como eluente o BPP-10c. Para tanto, o extrato protéico da fração citosólica de rim de camundongo foi aplicado na coluna Hitrap-BPP10c, a resina foi lavada exaustivamente com tampão Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, e as proteínas que tiveram afinidade pelo BPP-10c foram deslocadas da resina com uma solução contendo o BPP-10c (5 mg/ml). O perfil eletroforético do eluato protéico obtido apresentou uma banda majoritária de 46

kDa (Figura 4, linha 3) e a análise por *Western blot* utilizando o anticorpo policional anti-AsS (Figura 5, linha 3) confirmou a presença da AsS.

Alternativamente, para confirmar a especificidade da interação entre a AsS e o BPP-10c imobilizado na resina, foi utilizada uma coluna controle HiTrap NHS-activated HP, que havia sido apenas bloqueada com etanolamina e não continha peptídeo ligado (HiTrap-controle). Para isso, a fração citosólica de rim de camundongo foi primeiramente cromatografada nessa coluna e o eluato obtido foi aplicado na coluna HiTrap-BPP-10c nas mesmas condições. Essa cromatografia resultou em um perfil protéico por eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida semelhante ao obtido nas cromatografias anteriores (Figura 4, linha 6) e por *Western blot* utilizando o anticorpo anti-AsS (Figura 5, linha 4), confirmando assim, a especificidade de ligação do BPP-10c à AsS.



**Figura 4** - Eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida 10% das frações obtidas pela cromatografia de afinidade na resina HiTrap-BPP-10c – Foram aplicados 5 µg do eluato das cromatografias. Linha 1 – Eluato da cromatografia da fração citosólica renal de camundongo; Linha 2 – Eluato da cromatografia da fração de membrana celular renal de camundongo; Linha 3 – Eluato da cromatografia utilizando como tampão de eluição uma solução de 5 mg/ml de BPP-10c; Linha 4 – Extrato citosólico bruto de rim de camundongo; Linha 5 – Marcadores de massa molecular; Linha 6 – Eluato da cromatografia da fração citosólica de rim de camundongo que havia sido pré-adsorvida na coluna HiTrap-controle. A seta indica as bandas de proteínas (aproximadamente 46 kDa) que foram submetidas à identificação por espectometria de massas.







**Figura 5** – Análise por *Western blot* das amostras obtidas por cromatografia de afinidade na coluna de HiTrap-BPP-10c utilizando um anticorpo anti-AsS. Linha 1 – Eluato da cromatografia de afinidade da fração de membrana de rim de camundongo. Linha 2 – Eluato da cromatografia de afinidade da fração citosólica de rim de camundongo. Linha 3 – Eluato da cromatografia de afinidade da fração citosólica de rim de camundongo na coluna HiTrap-BPP-10c utilizando como tampão de eluição uma solução de 5 mg/ml de BPP-10c. Linha 4 – Eluato da cromatografia da fração citosólica de rim citosólica de rim de camundongo que havia sido pré-adsorvida na coluna HiTrap-controle.

#### 4.2. Clonagem e expressão da AsS recombinante humana

A purificação da AsS utilizando a cromatografia de afinidade com o BPP-10c muitas vezes resultou na obtenção da enzima sem atividade devido à condição drástica de eluição (pH 3,0) ou ao tempo de diálise (8 h), então, optou-se por obtê-la na forma de proteína recombinante. Para tanto, o cDNA que codifica a AsS humana foi adquirido comercialmente (pORF-AsS; Invitrogen). Este clone é apropriado para a subclonagem em vetor de expressão utilizando o sistema GATEWAY (Invitrogen). Tal sistema consiste em uma recombinação entre o clone pORF-AsS e o vetor de expressão de interesse, neste caso, o pDEST 17. A inserção correta do fragmento que contém o cDNA que codifica a AsS humana no vetor de expressão pDEST 17 foi verificada por análise de restrição (Figura 6) e confirmada por seqüenciamento de nucleotídeos (dados não mostrados). O vetor pDEST 17 apresenta uma região codificante para uma cauda com 6 histidinas na porção N-terminal, necessária para a posterior purificação em resina de afinidade.



#### Figura 6

**Figura 6** – Perfil eletroforético em gel de agarose mostrando fragmentos de DNA. Linha 1 – vetor pDEST 17 contendo o fragmento de cDNA codificante para a AsS submetido à digestão com a enzima de restrição EcoR I; linha 2 – vetor pDEST 17 sem a inserção do cDNA codificante para a AsS e digerido com a enzima EcoR I. Linha 3 - padrões de fragmentos de DNA (λ Hind III).

69

A expressão da AsS humana em sistema procarionte apresentou rendimento de cerca de 2 mg de proteína por litro de cultura, após indução com L-arabinose. A AsS recombinante foi purificada utilizando cromatografia de afinidade com uma coluna de níquel, isto porque a cauda de histidina na porção N-terminal apresenta alta afinidade pelo níquel. A análise por eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida da AsS purificada do lisado bacteriano mostrou que a banda correspondente à AsS em fusão com a cauda de histidina foi a única observada quando o gel foi corado com Coomassie blue (Figura 7). Ainda, a análise por Western blot da proteína recombinante purificada utilizando-se 0 anticorpo anti-AsS mostrou que houve reconhecimento da banda correspondente a AsS humana (Figura 8).

#### Figura 7



**Figura 7** – Perfil eletroforético em gel 10% de SDS-poliacrilamida da AsS recombinante humana. Linha 1 - Marcadores de massa molecular. Linha 2 – AsS humana recombinante obtida pela expressão em *E. coli*.


**Figura 8** – Análise por *Western blot* da AsS humana recombinante obtida pela expressão em *E. coli*. Linha 1 - Proteína purificada revelada pelo anticorpo anti-AsS. Linha 2 - Marcadores de massa molecular.

A banda correspondente à AsS em fusão com a cauda de histidina visualizada no gel de SDS-poliacrilamida foi recortada, submetida à digestão com tripsina e os fragmentos gerados foram analisados por espectrometria de massas (*peptide mass fingerprinting* em espectrômetro MALDI-TOF) no qual foi possível identificar os peptídeos correspondentes à AsS humana (Tabela 4). Em conjunto, esses resultados mostraram que houve a expressão da AsS em células procariontes e que a purificação permitiu obter a AsS recombinante humana isolada.

Figura 8

Amostra		Massa	
analisada	Peptídeo identificado	(Da)	Proteína identificada
	IDIVENR	858,468	
	NQAPPGLYTK	1088,573	
	FELTCYSLAPQIK	1569,777	
	EFVEEFIWPAVQSSALYEDR	2415,15	
	RQVEIAQR	999,5694	
	KVFIEDVSK	1064,599	
	NDLMEYAK	999,4463	
	YLLGTSLAR	993,5728	Argininosuccinato Sintase (E.C. 6.3.4.5)
	QVEIAQR	843,4683	
Brotoíno	MPEFYNR	956,4295	
correspondente	VFIEDVSK	936,5037	
a AsS expressa	QHGIPIPVTPK	1186,694	
em bactérias.	EDFEEAR	895,3792	

Tabela 4

**Tabela 4** - Identificação da AsS expressa em bactérias usando digestão tripsínica em gel e posterior análise das massas dos peptídeos gerados por espectrometria de massas MALDI-TOF.

A clonagem, a expressão e a purificação da AsS recombinante humana permitiram avaliar o efeito direto do BPP-10c sobre a atividade catalítica da enzima. Contudo, foi necessário verificar se a AsS recombinante humana apresentava a mesma atividade catalítica da AsS purificada de camundongo, e ainda se o peptídeo apresentaria o mesmo tipo de efeito sobre a atividade catalítica da AsS recombinante humana verificado para a AsS purificada de rim de camundongo.

#### 4.3. Efeito do BPP-10c sobre a atividade catalítica da AsS

Para determinar a velocidade de catálise da AsS foi empregado um método colorimétrico, que consiste em medir o fosfato inorgânico gerado indiretamente pela AsS. Essa enzima conjuga a citrulina ao aspartato gerando argininosuccinato com concomitante hidrólise do ATP e gerando AMP e pirofosfato (Figura 2). O pirofosfato é então hidrolisado pela pirofosfatase

(enzima adicionada à reação) liberando duas moléculas de fosfato inorgânico que reagem com o molibdato de amônio produzindo uma solução de coloração azul.

Os resultados obtidos mostraram que a mesma quantidade de proteína de ambas as preparações (da AsS recombinante humana e da AsS isolada de rim de camundongo) apresentaram velocidades catalíticas equiparáveis e que ambas foram inibidas pelo MDLA, um inibidor específico da AsS (Tabela 5) (Shen et al., 2005 e Flam et al., 2007), sugerindo que a expressão da AsS recombinante humana em sistema procarionte resultou em uma enzima com a capacidade de conjugação da citrulina com o aspartato para gerar argininosuccinato.

	Atividade catalítica (μM/min/mg)	Atividade catalítica na presença de MDLA (µM/min/mg)
AsS isolada de camundongo	$2,5 \pm 0,14$	$0,66 \pm 0,025$
AsS recombinante humana	2,7 ± 0,11	0,71 ± 0,024

Tabela 5

**Tabela 5** – A atividade enzimática da AsS isolada de rim de camundongo comparada à da AsS recombinante humana na ausência ou na presença de 1 mM do MDLA. Os valores são a média ± desvio-padrão de 4 replicatas.

Posteriormente verificamos o efeito de concentrações crescentes de BPP-10c (0,1  $\mu$ M, 0,5  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 2  $\mu$ M, 4  $\mu$ M e 8  $\mu$ M) sobre a atividade de 1  $\mu$ g da AsS isolada do rim de camundongos e recombinante humana. A quantidade de AsS utilizada por ensaio foi de 1  $\mu$ g, pois essa quantidade de enzima estava dentro da região linear da curva de atividade catalítica da enzima. Estes resultados indicaram que o BPP-10c pode aumentar a velocidade de reação catalisada pela AsS humana e que a curva dose resposta apresentou a forma de sino (Figura 9).





**Figura 9** - Efeito do BPP-10c sobre a atividade enzimática de 1 µg da AsS isolada de camundongo ou da AsS recombinante humana. Os valores são a média ± desvio-padrão de 4 replicatas.

A concentração do BPP-10c que causou o maior aumento na atividade da AsS (1,8 vezes) foi 0,5 µM (Figura 9). Dessa forma, foi testado o efeito desta concentração do peptídeo na afinidade da AsS isolada de rim de camundongos para cada um dos seus substratos (ATP, citrulina e aspartato). A AsS foi incubada com 0,5 µM do BPP-10c e várias concentrações de apenas um dos três substratos (0,1 mM, 0,2 mM, 0,5 mM e 1 mM) enquanto que a concentração dos outros dois substratos foi mantida constante (2 mM e a formação do produto foi medida após 30 min de incubação. O plot do gráfico duplo-recíproco, utilizado para determinar os valores de Km para todos os substratos na presença e na ausência do BPP-10c, revelou que a afinidade da AsS pelo ATP (Figura 10 A, D) e pela citrulina (Figura 10 B, D) foi significativamente aumentada devido à presença do peptídeo, uma vez que o valor de Km para esses substratos diminuiu 3,0 e 1,7 vezes, respectivamente. Em contraste, o valor de Km para o aspartato não apresentou alteração significativa (Figura 10 C, D).



**Figura 10** - Efeito do BPP-10c na afinidade da AsS pelos seus substratos. A atividade da AsS foi medida na ausência (triângulos) e na presença de 0,5  $\mu$ M do BPP-10c (quadrados) e a concentração indicada de somente um dos três substratos (Cit, Asp ou ATP); a concentração dos outros dois substratos era de 2 mM. Os dados de velocidade e substratos foram plotados em gráficos duplo-recíprocos (A-C). Valores de Km obtidos na ausência e na presença do BPP-10c (D). Os valores são a média ± desvio-padrão de 4 replicatas.

Posteriormente, foram iniciados ensaios para avaliar a relação entre a estrutura e a atividade de análogos estruturais do BPP-10c sobre a atividade catalítica da AsS. Na Tabela 2 (materiais e métodos no item 3.4) encontram-se os análogos estruturais do BPP-10c utilizados para realizar esses ensaios. Os resultados obtidos com os peptídeos modificados sobre a atividade da AsS recombinante humana mostraram que não há um resíduo chave para a modulação da atividade da enzima, contudo, há dois resíduos de prolina na região C-terminal do peptídeo fundamentais para a ativação da AsS (Figura 11).





**Figura 11** – Efeito dos análogos estruturais do BPP-10c sobre a atividade catalítica da AsS recombinante humana. Cada peptídeo foi testado a 0,5 µM como descrito em materiais e métodos (item 3.4).

#### 4.4. Internalização do BPP-10c pelas HUVECs e células HEK 293

A capacidade do BPP-10c se ligar à AsS e modular sua atividade enzimática são indicativos que essas ações possam desencadear os efeitos fisiológicos observados pelo tratamento de SHRs com o peptídeo. Porém, para que essa hipótese fosse validada seria necessário mostrar que esse peptídeo pode ser internalizado por células que contenham essa enzima. Dessa forma, foi testada a capacidade deste peptídeo ser internalizado por células da linhagem endotelial (HUVEC) e da linhagem renal (HEK 293). Ambas as linhagens celulares mostraram a presença da AsS em seus extratos protéicos citosólicos como visualizado na Figura 12 após análise do conteúdo celular por *Western blot*.



Figura 12

**Figura 12** – *Western blot* usando anticorpo policional anti-AsS demonstrando a presença dessa enzima em HUVECs e células HEK 293. 50 µg das proteínas citosólicas de ambas as células foram submetidas à eletroforese em gel SDS-poliacrilamida e transferidas para uma membrana de nitrocelulose para posterior análise por *Western blot*.

Para os ensaios de internalização, o BPP-10c foi conjugado com a molécula fluorescente cianina 3 (Cy3). O peptídeo conjugado (Cy3-BPP-10c) foi inicialmente testado quanto a sua capacidade de aumentar a atividade catalítica da AsS, a qual não foi afetada quando comparada com o BPP-10c (Figura 13). Ainda, foram realizados ensaios *ex vivo* em íleo de cobaia isolado para verificar se o Cy3-BPP-10c mantinha a capacidade de potencializar o efeito da bradicinina neste sistema. A habilidade do Cy3-BPP-10c em potencializar o efeito da bradicinina em íleo isolado de cobaia foi similar ao peptídeo não marcado (Figuras 14 A e 14 B). Posteriormente, o Cy3-BPP-10c (0,5 μM) foi incubado por 30 min a 37°C com as HUVECs e células HEK 293, e a seguir essas células foram submetidas à visualização em microscópio de fluorescência. O peptídeo marcado foi detectado distribuído homogeneamente no citoplasma dessas células (Figura 15).





**Figura 13** – Efeito do Cy3-BPP-10c comparado ao efeito do BPP-10c sobre a atividade catalítica da AsS. Os valores são a média ± desvio-padrão de 4 replicatas.

79





Α

150

100

50

- Ouchart Loc

**Figura 14** – Efeito da marcação do BPP-10c com Cy3 sobre a atividade do peptídeo em potencializar a bradicinina em íleo isolado de cobaia. (A) Curva de potenciação da bradicinina com BPP-10c 3  $\mu$ M (quadrados) comparada à curva controle obtida apenas com bradicinina (triângulos). (B) Curva de potenciação da bradicinina com Cy3-BPP-10c 3  $\mu$ M (quadrados) comparada à curva controle obtida apenas com bradicinina (triângulos). Cada ponto representa o valor médio de 4 experimentos independentes, enquanto que as linhas verticais correspondem a média ± desvio-padrão. As respostas foram expressas em porcentagem na resposta máxima obtida na primeira curva de bradicinina. As curvas doses-resposta foram obtidas pela regressão não linear e os valores pD<sub>2</sub> (-log EC<sub>50</sub>) foram calculados usando o programa Graph-Pad PRISM (GraphPad Software). Curva controle: pD<sub>2</sub>= 7.633±0.07; BPP-10c: pD<sub>2</sub>= 8.196±0.09; Cy3-BPP-10c: pD<sub>2</sub>= 8.316±0.08.

Figura 14

#### Figura 15



**Figura 15** – Internalização do BPP-10c por células HEK 293 e HUVEC. As células foram incubadas com 0,5  $\mu$ M do Cy3-BPP-10c por 30 min a 37°C e visualizadas em um microscópio de fluorescência. As figuras são representativas de três experimentos individuais. (A e D) Contraste de fase das células HEK 293 e HUVEC tratadas com o Cy3-BPP-10c, respectivamente. (B e E) Fluorescência do Cy3-BPP-10c nas células HEK 293 e HUVEC, respectivamente. (C e F) Sobreposição dos painéis A e B ou D e E, respectivamente. (A-C) Dados já publicados (Silva et al.,2008).

Em paralelo, foi determinada a quantidade de BPP-10c que foi internalizada pelas células utilizando cromatografia líquida aliada a espectrometria de massas (LC/MS). Para tanto, 500 pmoles do BPP-10c foram incubados com 1x10<sup>6</sup> células por 4 h e o meio intracelular foi analisado para a identificação e quantificação do BPP-10c. Como mostrado na Figura 16, após 2 h de incubação, aproximadamente 10% e 15% da quantidade do peptídeo incubada foram detectados no meio intracelular das células HEK 293 e HUVEC, respectivamente (Figura 16).Vale ressaltar que a quantificação de

peptídeo internalizado corresponde á sua forma íntegra. Entretanto, em tempos de incubação superiores a 2 h (2 h - 4 h), o peptídeo intacto não foi mais detectado dentro de ambas as linhagens celulares sugerindo que o BPP-10c pode ter sido metabolizado por essas células.





Figura 16

### 4.5. Produção de arginina estimulada pelo BPP-10c em células HEK 293

A arginina é reconhecida como um aminoácido condicionalmente essencial em adultos. Além disso, muitos tecidos ou células são capazes de sintetizar arginina e é bem estabelecido que o rim é o principal órgão produtor desse aminoácido em adultos (Morris, 2004). Como o BPP-10c tem afinidade pela AsS isolada do rim de camundongos, optou-se por testar o efeito do peptídeo na produção de arginina numa linhagem celular renal.

Dessa forma, as células HEK 293 foram tratadas com concentrações crescentes do BPP-10c (0,01 µM, 0,1 µM, 0,5 µM, 1 µM, 2 µM, 4 µM, 10 µM, 100 µM) por 24 h e a concentração de arginina foi determinada no meio intracelular e no meio extracelular. Os níveis basais de arginina intracelular e extracelular nestas células foram 50  $\pm$  4 nmol/10<sup>6</sup> células e 9  $\pm$  0,15 nmol/10<sup>6</sup> células, respectivamente. O peptídeo causou um importante aumento doseresposta na produção de arginina no meio intracelular e no meio extracelular (2 vezes e seis vezes, respectivamente), sendo que o pico máximo de produção de arginina ocorreu entre 0,5 µM e 2 µM do BPP-10c (Figura 17 A). Entretanto, em concentrações mais altas do peptídeo (4  $\mu$ M – 100  $\mu$ M) houve uma pequena redução na produção de arginina (Figura 17 A). Para confirmar se o aumento na produção de arginina induzido pelo BPP-10c estava relacionado com a ativação da AsS, testou-se o efeito do MDLA neste ensaio. O concomitante tratamento das células HEK 293 com 0,5 µM do BPP-10c e 1,0 mM do MDLA aboliu completamente o efeito do peptídeo na produção de arginina (Figura 17 B), confirmando o envolvimento da AsS no aumento na produção de arginina observado nestas células.



**Figura 17** – Aumento da produção de arginina em células HEK 293 pelo tratamento com o BPP-10c. As células HEK 293 (10<sup>6</sup> células) foram colocadas em placas de 6 poços contendo meio de cultura apropriado e em seguida incubadas em meio sem soro com concentrações crescentes do BPP-10c e/ou 1 mM do MDLA por 24 h. O meio de cultura foi coletado e as células lisadas para determinação da concentração de arginina extracelular e intracelular por análise de aminoácidos. (A) Efeito do BPP-10c sobre a produção de arginina em células HEK 293. (B) Efeito de MDLA 1 mM na produção de arginina induzida por 0,5 μM do BPP-10c. A concentração de arginina foi expressa como média ± desvio-padrão de 6 experimentos independentes. Barra branca, meio extracelular; barra hachurada, meio intracelular. \*p< 0.01 comparada ao controle.

# 4.6. O BPP-10c aumenta a concentração plasmática de arginina em SHRs e ratos Wistar.

Estudos recentes sobre a hipertensão em SHRs têm focado o efeito da arginina como precursor do vasodilatador endógeno NO. É bem conhecido que o NO pode ser sintetizado a partir da arginina no endotélio dos vasos em resposta a um aumento na pressão arterial local (Jones, 1988). Neste trabalho foi determinado o efeito do BPP-10c sobre a concentração plasmática de arginina em SHRs e ratos Wistar durante 6 h. Como é possível observar nas Figuras 18 A e 18 B, a administração de 71 nmol/Kg do BPP-10c aumentou a concentração de arginina plasmática em SHR (de 2,2 ± 0,15 µM para 3,1 ±  $0,25 \ \mu\text{M}$ ) e em ratos Wistar (de  $0,9 \pm 0,05 \ \mu\text{M}$  para  $1,2 \pm 0,05 \ \mu\text{M}$ ). Como havia sido observado em células HEK 293 com relação à produção de arginina, quando 1 mmol/Kg do MDLA foi concomitantemente administrado com o BPP-10c nenhuma alteração nos níveis de arginina plasmática foi observada em ambas linhagens de ratos (Figura 18 A e 18 B). Foi interessante notar que após 1 h da co-infusão do peptídeo com o inibidor da AsS houve uma pequena diminuição na concentração de arginina plasmática quando comparada com os níveis basais em SHR (de 2,2  $\pm$  0,15  $\mu$ M para 1,7  $\pm$  0,2  $\mu$ M) e ratos Wistar (de  $0.9 \pm 0.05 \mu$ M para  $0.65 \pm 0.1 \mu$ M). Entretanto, após 2 h os valores de arginina plasmática voltaram ao nível basal.

Figura 18



**Figura 18** – Efeito do BPP-10c sobre a concentração de arginina no plasma de ratos. BPP-10c (71 nmol/Kg) ou MDLA (1 mmol/Kg) foi administrado em SHRs (n=6) e ratos Wistar (n=3) por injeção em bolus i.v. (0,5 ml) e o sangue foi retirado pela veia femoral para determinação da concentração de arginina. A concentração da arginina plasmática foi determinada em SHR (A) ou ratos Wistar (B) após infusão de 0,15 M de NaCI (triângulos), BPP-10c (quadrados), MDLA (losango) ou BPP-10c mais MDLA (x). Os valores estão representados por média ± desvio-padrão.

#### 4.7. O BPP-10c estimula a produção de NO em células HUVEC.

A arginina é substrato da enzima óxido nítrico sintase endotelial, a qual é convertida em citrulina e NO nas células endoteliais. A citrulina, por meio de de reações catalisadas pela AsS e pela argininosuccinato liase (AsL), pode ser reciclada a arginina novamente, constituindo assim um ciclo arginina-citrulina (Hattori et al., 1994). Considerando que a produção de arginina a partir de citrulina através do ciclo arginina-citrulina é constituída por reações acopladas que provêem uma fonte separada de arginina para a produção de NO em células endoteliais (Flam et al., 2007), um aumento na atividade da AsS poderia resultar em um aumento na quantidade de NO produzida.

Para testar se o BPP-10c seria capaz de estimular a produção de NO pela ativação da AsS, determinou-se a concentração de NO do meio intracelular e do meio extracelular de células HUVEC incubadas com o BPP-10c por 24 h. Os níveis basais de NO intracelular e extracelular nestas células foram 1,8  $\pm$  0,2 nmol/10<sup>6</sup> células e 0,4  $\pm$  0,05 nmol/10<sup>6</sup> células, respectivamente. Quando as células foram tratadas com concentrações crescentes do BPP-10c (0,01 µM, 0,1 µM, 0,5 µM, 1 µM, 2 µM, 4 µM, 10 µM, 100 µM), a concentração de NO intracelular e extracelular mostrou um aumento dose-resposta (2,5 vezes e 3,7 vezes, respectivamente) sendo que o pico máximo de produção de NO ocorreu entre 0,1 µM e 2 µM do BPP-10c (Figura 19 A). Entretanto, em altas concentrações do peptídeo (4 µM – 100 µM) houve uma pequena redução na produção de NO (Figura 19 A). O tratamento concomitante das células HUVEC com BPP-10c 0,5 µM e L-NAME 1,0 mM, um inibidor específico da NOS, ou MDLA 1,0 mM aboliu completamente o efeito do BPP-10c sobre a produção de NO (Figura 19 B) indicando o envolvimento da NOS e da AsS no aumento observado da produção de NO pelo peptídeo.



**Figura 19** – Efeito do BPP-10c sobre a produção de NO em células HUVEC. HUVECs foram colocadas em placas previamente tratadas com gelatina em meio de cultura apropriado e incubadas em meio sem soro com concentrações crescentes do BPP-10c e/ou 1 mM de MDLA e/ou 1 mM de L-NAME por 24 h. O meio de cultura foi coletado e as células foram lisadas em tampão RIPA para medir os produtos do NO nos meios extracelular e intracelular utilizando ensaio de quimioluminescência. (A) Indução da produção de produtos de NO pelo BPP-10c em HUVECs. (B) Efeito de MDLA 1 mM ou L-NAME 1 mM na produção de NO induzida com BPP-10c 0,5 μM. A concentração de NO esta expressa como média ± desvio-padrão de 6 experimentos independentes. Barra branca, meio extracelular; barra hachurada, meio intracelular. \*p< 0.01 comparada ao controle. 4.8. Avaliação da viabilidade celular da HUVEC e da célula HEK 293 na presença do BPP-10c.

O NO quando produzido em excesso pode se tornar nocivo. Se a célula encontra-se em estado pró-oxidante, pode sofrer reações de oxi-redução quando houver excesso de NO e formar compostos tóxicos (por exemplo, peroxinitrito) que causam dano celular (Calabrese et al., 2007). Como o BPP-10c é capaz de aumentar a produção de NO, a viabilidade das células endoteliais e renais tratada com o BPP-10c foi avaliada. Esses experimentos foram realizados por incubação das HUVECs e células HEK 293 por 24 h em meio de cultura sem soro bovino fetal, na presença de 100  $\mu$ M do BPP-10c. Em ambas as linhagens, as células permaneceram viáveis, sendo que as HUVECs apresentaram viabilidade de 87 ± 7% e as células HEK 293 apresentaram viabilidade de 95,3 ± 4,3%, segundo a comparação feita com as células controle que não foram tratadas com o BPP-10c (Figura 20).

#### Figura 20



**Figura 20** – Ensaio de viabilidade das HUVECs e células HEK 293 tratadas com o BPP-10c. A determinação da percentagem de células viáveis por microfluorimetria foi realizada após a incubação das células por 24 h na presença na ausência do BPP-10c. Os dados representam a percentagem da média em relação aos controles e os respectivos desvios padrão de oito experimentos independentes.

# 4.9. Efeito do MDLA na atividade do BPP-10c sobre a pressão arterial de SHRs e ratos Wistar.

Recentemente foi mostrado que o efeito anti-hipertensivo do BPP-10c ocorre apenas em SHRs, mas não em ratos Wistar normotensos (lanzer et al., 2007). O fato de que este peptídeo pode promover um aumento na atividade catalítica da AsS sugeriu que o efeito anti-hipertensivo pudesse ser mediado por essa enzima. Para validar essa hipótese, decidiu-se avaliar a ação do MDLA sobre o efeito anti-hipertensivo do BPP-10c em SHRs e ratos Wistar. A Figura 21 mostra os efeitos sobre a pressão arterial média (PAM) de animais acordados após a concomitante injeção de 71 nmol/Kg de BPP-10c e 1 mmol/Kg de MDLA. O BPP-10c mostrou um significante e prolongado efeito anti-hipertensivo (redução da PAM de 175 ± 5 mmHg para 140 ± 5 mmHg), o qual foi sustentado por mais de 6 h em SHRs (Figura 21 A) e não apresentou efeitos significativos em ratos Wistar (Figura 21 B). A administração de apenas 1 mmol/Kg de MDLA causou um pequeno aumento na PAM, entretanto, a concomitante injeção de BPP-10c não promoveu a redução da pressão arterial em SHRs, indicando pela primeira vez, o envolvimento da AsS no controle da pressão arterial (Figura 21 A).



**Figura 21** – Inibição parcial do efeito anti-hipertensivo do BPP-10c sobre a pressão arterial pelo MDLA. Pressão arterial média (PAM) em SHRs (A) e ratos Wistar (B) PAM após a infusão de 0,15 M de NaCl (triângulos) ou 71 nmol/Kg do BPP-10c (quadrados) ou 1 mmol/Kg de MDLA (losangos) ou BPP-10c mais 1 mmol/Kg de MDLA (x). Os valores apresentados representam a média ± desvio-padrão de SHRs (n=6) e ratos Wistar (n=3). \*p< 0.01 comparada ao controle.

#### 4.10. Efeito do BPP-10c sobre a microvasculatura de camundongos

O tônus vascular é um dos principais responsáveis pela regulação da pressão arterial (Saino et al., 2002). Um dos fatores relaxantes da musculatura lisa que participa desse processo é o NO liberado pelo endotélio, que se difunde até as células adjacentes do músculo liso promovendo a dilatação dos vasos pela ativação da guanilato ciclase e geração do GMP cíclico (Cawley et al., 2007).

Considerando que o BPP-10c é capaz de aumentar a produção de NO em células endoteliais, resolvemos verificar se o efeito anti-hipertensivo do BPP-10c é mediado pelo NO e se o peptídeo promove vasodilatação diretamente. Para essa avaliação realizamos alguns experimentos *ex vivo*, utilizando microscopia intravital, pela qual é possível monitorar os efeitos na microvasculatura do músculo cremáster.

Os vasos do músculo cremáster de camundongo foram primeiramente monitorados por 10 min e em seguida foi adicionado o BPP-10c ou o BPP-10c invertido (seqüência de aminoácidos invertida – controle estrutural) na concentração de 71 nmol/Kg, intravenosamente ou topicamente. Os resultados obtidos nesses experimentos revelaram que esse peptídeo não foi capaz de relaxar as arteríolas quando administrado topicamente sobre o músculo cremáster, porém, quando administrado diretamente na corrente sanguínea ocorreu uma vasodilatação generalizada dos vasos, em arteríolas de pequeno e de grande calibre, sugerindo que essa vasodilatação é dependente do endotélio (Figura 22). O BPP-10c invertido não apresentou qualquer efeito sobre a vasodilatação de vasos no músculo cremáster de camundongos (Figura 22). E ainda, o peptídeo não causou alteração ou indução da migração leucocitária, indicando uma ausência de efeitos pró-inflamatórios. A vasodilatação observada se restringe apenas às artérias, não tendo sido visualizada nas vênulas. Tal efeito foi duradouro e se iniciou após 15 min da administração do peptídeo (Figura 22).

A concomitante administração de 71 nmol/Kg do BPP-10c e 1 mol/Kg do MDLA aboliu completamente o efeito do peptídeo sobre todos as arteríolas (dados não mostrados) sugerindo o envolvimento da AsS na vasodilatação mediada pelo BPP-10c.





**Figura 22** – Vasodilatação promovida pelo BPP-10c. Análise por microscopia intravital do músculo cremáster de camundongos após injeção endovenosa de 71 nmol/Kg de BPP-10c ou BPP-10c invertido (controle negativo). Parâmetro avaliado: diâmetro de vasos (arteríolas, vênulas e capilares), por um período de observação de 30 min após a injeção dos peptídeos. (A) Efeito do BPP-10c (losango) e do BPP-10c invertido (quadrado) sobre as arteríolas de pequeno calibre. (B) Efeito do BPP-10c (losango) e do BPP-10c (losango) e do BPP-10c (losango) e do BPP-10c invertido (quadrado) sobre as arteríolas de pequeno calibre. (B) Efeito do BPP-10c (losango) e do BPP-10c (losango) e do BPP-10c invertido (quadrado) sobre as arteríolas de grande calibre. (C) Fotografia de uma região do músculo cremáster de camundongo antes da administração do BPP-10c. (D) Fotografia de uma região do músculo cremáster de camundongo após da administração do BPP-10c. \*p< 0.01 comparada ao controle.

### 5. Discussão

PDF created with pdfFactory trial version <u>www.pdffactory.com</u>

Milhões de pacientes hipertensivos que são tratados com inibidores da ECA se beneficiaram das pesquisas iniciadas por Rocha e Silva e colaboradores no final da década de 40 (Rocha e Silva et al., 1949), sobre a fisiopatologia do envenenamento por *B. jararaca*, e por Ferreira e colaboradores (Ferreira et al., 1965, 1970a e 1970b) que isolaram os primeiros inibidores naturais da sECA (peptídeos ricos em resíduos de prolina) do veneno de B. jararaca e que foram essenciais para o entendimento da regulação do tônus vascular (Hayashi e Camargo, 2005). Em meados da década de 90, nosso grupo decidiu aprofundar as investigações sobre o papel biológico dos peptídeos ricos em prolina, especialmente porque é bem conhecido que muitas toxinas de venenos de serpentes possuem correlatos endógenos em vertebrados (Hayashi e Camargo, 2005; Menez, 1998). De fato, a origem genética e a expressão do precursor dos peptídeos ricos em prolina (BPPs) em vários tecidos da *B. jararaca*, além da glândula de veneno, sugerem que essas moléculas participam da maquinaria molecular endócrina dessa serpente. Além disso, o precursor dos BPPs é também precursor do peptídeo natriurético do tipo C (CNP) que é expresso em regiões de controle neuroendócrino no cérebro da serpente (Hayashi et al., 2003).

Três aspectos relativos às propriedades do BPP-10c levaram-nos a selecioná-lo entre as duas dezenas de peptídeos ricos em prolina da *Bothrops jararaca*: estar presente no precursor BPP-CNP (Hayashi et al., 2003), ser o mais ativo e seletivo inibidor da sECA (Cotton et al., 2002) e principalmente, por este ser efetivo para reduzir a pressão arterial dos SHRs em doses abaixo daquela utilizada para a inibição da sECA *in vivo* (lanzer et al., 2007). Em

outras palavras, interessava-nos conhecer qual seria o outro mecanismo de ação desse peptídeo uma vez que a inibição da sECA não é o único mecanismo envolvido no efeito anti-hipertensivo do BPP-10c (lanzer et al., 2007). Tais indícios levaram-nos a especular se outro mecanismo que não envolvesse o sistema cinina-angiotensina estaria implicado na atividade do BPP-10c *in vivo*. Este hipótese foi estimulada pelos estudos de Silva e colaboradores (Silva et al., 2008) que mostraram que 50% do BPP-10c marcado com l<sup>125</sup> se acumulava nos rins de camundongo mesmo quando co-administrado com captopril numa concentração molar 1000 vezes maior que a do peptídeo (Silva et al., 2008).

Esta tese teve como contribuição principal a identificação da AsS como um novo alvo molecular para o BPP-10c. A utilização de cromatografia de afinidade com o BPP-10c imobilizado em uma resina, análise por espectrometria de massas e *Western blot* permitiu identificar a AsS como o principal ligante do peptídeo no citosol de células renais. A interação do BPP-10c foi confirmada pelo fato de que o peptídeo promove a ativação enzimática da AsS, principalmente por aumentar a afinidade da enzima pelo ATP.

Em mamíferos, a AsS juntamente com a AsL são enzimas que participam do ciclo da uréia no fígado, e do ciclo da arginina-citrulina no rim e nas células endoteliais, que são os maiores produtores de arginina e NO constitutivo, respectivamente (Husson et al., 2003), sendo a AsS a enzima passo limitante no ciclo de reciclagem da arginina-citrulina no rim e nas células endoteliais. Em células endoteliais, o ciclo arginina-citrulina juntamente com a eNOS é responsável por produzir e sustentar o fornecimento de NO, o qual possui um papel fundamental como molécula sinalizadora em muitos processos

99

em mamíferos, incluindo a regulação do tônus vascular. Mostramos nesse trabalho, pela primeira vez, que a ativação da AsS, é pelo menos em parte, responsável pelo efeito anti-hipertensivo do BPP-10c

A influência do BPP-10c sobre a cinética da atividade da AsS frente aos seus três substratos foi determinada utilizando a equação clássica de Michaelis-Menten. De fato, a afinidade da enzima para o ATP e citrulina foi aumentada 3 vezes e 1,7 vezes, respectivamente. Sabe-se que a AsS humana é uma proteína tetramérica constituída de dois dímeros idênticos e que sua estrutura é altamente similar à da AsS bacteriana. A estrutura do monômero é constituída de três domínios: um domínio ligante de nucleotídeo, um domínio sintetase e um domínio, na região C-terminal, envolvido na oligomerização da proteína (Karlberg et al., 2008). Sabe-se também que a AsS bacteriana sofre uma importante mudança conformacional guando o ATP se liga a ela, reduzindo a distância entre os grupos de fosfato e a molécula de citrulina, haja vista que o primeiro passo na reação é a adição do AMP à citrulina (Lemke e Howell, 2002). Analogamente, a AsS humana também sofre esta mudança conformacional quando o ATP se liga permitindo que a citrulina faça um ataque nucleofílico no  $\alpha$ -fosfato do ATP produzindo o intermediário citrulil-AMP (Lemke e Howell, 2002). Baseado no fato de o BPP-10c aumentar a atividade catalítica da AsS sugere-se que a ligação do peptídeo à enzima ocorre em um sítio diferente dos sítios de ligação do ATP e do MDLA e que a interação BPP-10c-AsS acarreta uma mudança conformacional na enzima que facilita sua interação com seu substrato ATP. A interação do peptídeo com a AsS poderia ocorrer em cada um dos monômeros ou em uma unidade de cada dímero da enzima. Entretanto, a elucidação de como a interação do BPP-10c e a AsS resulta na ativação do processo catalítico da enzima requer estudos estruturais mais aprofundados. Independentemente do mecanismo envolvido na ativação da AsS pelo BPP-10c, nossos resultados mostraram que a atividade da enzima é aumentada 1,8 vezes pelo peptídeo *in vitro*, fato que pode estar correlacionado com a estimulação do ciclo arginina-citrulina em células endoteliais pelo BPP-10c.

Foi também possível estabelecer que os aminoácidos mais importantes para o efeito do BPP-10c sobre a atividade catalítica da AsS são os dois resíduos de prolina na região C-terminal do peptídeo, já que a substituição desses resíduos por alanina praticamente aboliu o efeito do BPP-10c sobre a atividade catalítica da AsS. Esses dados são de fundamental importância para a utilização do BPP-10c como protótipo para o desenho de moléculas que visem promover a ativação da AsS. O estabelecimento dos resíduos do BPP-5a fundamentais para a inibição da sECA foram decisivos para o desenho molecular do captopril (Cushman et al., 1973; Ondetti et al., 1977).

Um pré-requisito para o BPP-10c poder influenciar na ativação da biosíntese de arginina e/ou a ativação do ciclo citrulina-NO é este ter a capacidade de penetrar em células, uma vez que a AsS é claramente uma enzima citosólica (Husson et al., 2003 e Dhanakotti et al., 1992). Os resultados de internalização do Cy3-BPP-10c mostraram que este peptídeo é capaz de penetrar nas células HEK 293 e HUVEC, como observado por microscopia de fluorescência. Foi possível ainda estabelecer a quantidade de BPP-10c não marcado que foi internalizado nessas células. Estas células foram escolhidas para os estudos dos efeitos do BPP-10c in vitro porque são originalmente derivadas de rim e endotélio vascular, sendo estes, os maiores tecidos

responsáveis pela biosíntese de arginina e produção de NO, respectivamente. Aproximadamente 15% do BPP-10c adicionado ao meio de cultura penetrou em ambas as linhagens celulares, permanecendo o peptídeo intacto dentro destas células até cerca de 2 h após o início da incubação. Estes resultados não foram surpreendentes uma vez que peptídeos ricos em prolina possuem a característica de ser internalizados por células além de ser resistentes à proteólise (Pujals e Giralt, 2007).

A internalização do BPP-10c pelas células HEK 293 e a sua resistência à proteólise foi importante para demonstrar a habilidade do peptídeo em ativar a AsS para produção de arginina. De fato, um aumento de 6 vezes na produção de arginina foi verificado no meio extracelular da cultura de células HEK 293 tratadas com concentrações crescentes do BPP-10c (0,01 μM a 2 μM). Curiosamente, entretanto, em altas concentrações do peptídeo houve uma diminuição na produção de arginina. Igualmente, a concentração de arginina no meio intracelular foi aumentada em 2 vezes quando a cultura de células HEK 293 foi tratada com o BPP-10c. O aumento da produção de arginina induzido por ação do peptídeo sobre a AsS foi evidenciado pela clara redução na concentração de arginina quando as células foram co-tratadas com o inibidor específico da AsS, o MDLA.

Sabendo que o rim é o principal órgão produtor de arginina em roedores adultos, bem como em humanos (Husson et al., 2003), não foi surpresa detectar um aumento na concentração de arginina plasmática tempo dependente, em SHR e ratos Wistar após o tratamento com o BPP-10c. Curiosamente, o aumento médio nos níveis plasmáticos de arginina foi semelhante em ambos, SHR e ratos Wistar. Esse aumento pode ser

102

relacionado diretamente com a potenciação da AsS induzida pelo BPP-10c, haja vista que o aumento na concentração de arginina no plasma de ambas as linhagens de rato foi completamente abolido com o tratamento concomitante com MDLA.

Sabe-se que a deficiência na biosíntese de arginina afeta a produção de vários metabólitos e vias de sinalização, por exemplo, a geração de intermediários biologicamente ativos como o NO, as poliaminas, a creatinina, e alguns aminoácidos (Wu e Morris, 1998). Em células produtoras de NO, a arginina é sintetizada a partir da citrulina, que é um co-produto da reação catalisada pela NOS, além de mais duas reações següenciais envolvendo a AsS e a AsL (Xie e Gross, 1997). Notavelmente, a AsS é a enzima passo limitante para a contínua regeneração de arginina a partir de citrulina para garantir à NOS o sustentado fornecimento do seu principal substrato (Goodwin et al., 2004). No presente estudo, o aumento na produção de NO (3 vezes) dose dependente, induzido pelo BPP-10c em culturas de HUVEC, é outra clara evidência da integridade e funcionalidade deste peptídeo dentro dessa linhagem celular. A diminuição na produção de NO induzida pelo BPP-10c tratado concomitantemente com MDLA e com o L-NAME (inibidor específico da NOS), confirmou a ativação da AsS e o envolvimento da NOS no aumento da produção de NO induzido pelo peptídeo em HUVECs.

É muito importante ressaltar que a diminuição da pressão arterial pelo BPP-10c somente foi observada em SHR e não em ratos normotensos. Surpreendentemente, este efeito em SHR foi significativamente diminuído quando o animal foi co-tratado com o peptídeo e o MDLA indicando a participação da AsS no controle da pressão arterial. A dramática diferença observada na resposta do BPP-10c em SHR quando comparada com os ratos normotensos é de particular interesse, haja vista que o aumento na produção de arginina leva a um conseqüente aumento na produção de NO em células produtoras de NO. Por outro lado, é conhecido que este fenômeno é reduzido em ratos hipertensos (Hasegawa et al., 1992). Tais resultados revelaram a importância do sistema de reciclagem da arginina na produção de NO endotelial, fato sugerido também pelo relato de crianças com hipertensão arterial essencial que coincidentemente possuíam deficiência de AsL. Após administração de arginina a pressão arterial dessas crianças diminuiu para níveis próximos do normal, sugerindo um papel crítico da regeneração da arginina na regulação da pressão arterial sistêmica (Fakler, 1995 e Scaglia et al., 2004).

Finalmente, a vasodilatação de arteríolas do músculo cremáster de camundongos promovida pelo BPP-10c é sugestiva de uma ação direta do peptídeo no vaso. Sabe-se que o ciclo citrulina-NO é passo limitante na produção de NO mediada pela bradicinina e outras moléculas vasoativas (Flam e cols., 2001). Dessa forma, a regulação da atividade da AsS se mostra como de fundamental importância na vasodilatação na micro-circulação, visto que essa regulação pode aumentar e sustentar a produção de NO em células endoteliais.

Mostramos nesse trabalho que o BPP-10c estimula a síntese de arginina em células endoteliais e renais elevando os níveis desse aminoácido no sangue. Recentemente tem sido muito estudado o efeito benéfico da administração de L-arginina em disfunções circulatórias (Lee et al., 2004). Sabe-se que o aumento no suplemento de arginina exógena causa um aumento na produção de NO (Taylor e Poston, 1994 e Lee et al., 2004). Este efeito, conhecido como o "paradoxo da arginina", refere-se a situações em que a administração exógena de arginina parece aumentar a atividade enzimática da NOS, apesar do fato de as NO sintases estarem sempre teoricamente saturadas com a arginina. (Kurz e Harrison, 1997). Este fenômeno foi analisado *in vivo* recentemente, usando o mesentério de rato e preparações de microcirculação de intestino delgado, tendo sido mostrado que o aumento na disponibilidade de arginina causa um significante aumento na produção de NO (Vukosavljevic et al., 2006). Em nossos estudos, o observado aumento nos níveis de arginina plasmática em SHR pode não estar diretamente relacionado com a redução na pressão arterial, isto porque a ativação da AsS pelo peptídeo possivelmente ocorre na cavéola, onde se co-localizam a AsS e a NOS. O aumento da produção de arginina e o conseqüente aumento da geração de NO neste sub-compartimento celular é que resultaria na vasodilatação observada, e não a elevação da arginina plasmática diretamente.

Essa hipótese tem sido reforçada por trabalhos recentes mostrando que o sistema de reciclagem da citrulina a arginina pelas enzimas AsS, AsL e eNOS é utilizado para a produção de NO. Tais enzimas se co-localizam em células endoteliais numa região da parte interna da membrana plasmática conhecida como cavéola (Solomonson et al., 2003). Um fato que ressalta a importância da AsS no sistema de geração de NO no endotélio é que curiosamente, a expressão gênica da AsS está diminuída em SHR (Koeners et al., 2007). Além disso, a regulação da produção de NO pela AsS pode ser elegantemente regulada por um mecanismo mediado pela nitrosilação do resíduo de cisteína 132, a qual inativa a enzima e diminui a disponibilidade de arginina (Hao et al., 2004).

Em vista dos resultados apresentados, propomos a AsS como um novo alvo para o controle da modulação da pressão arterial. Em consonância com a contínua tendência do uso de toxinas para o desenvolvimento de novos fármacos (Fox e Serrano, 2007), acreditamos que o BPP-10c possa ser considerado como uma molécula líder para o desenvolvimento de agentes terapêuticos para várias patologias que envolvem a deficiência da produção de NO como causa ou efeito, uma vez que o peptídeo interfere diretamente com o metabolismo da arginina, uma molécula precursora para a síntese de NO. Dessa forma, a utilização do BPP-10c como fármaco ou sua utilização como protótipo para o desenvolvimento de fármacos que possam regular a produção de NO sem gerar sub-produtos reativos indesejados são de fundamental interesse comercial e humano.
# 6. Conclusão

PDF created with pdfFactory trial version <u>www.pdffactory.com</u>

O fato da AsS estar associada com a produção de arginina (com participação da AsL) para diferentes fins, como por exemplo, no endotélio vascular para o fornecimento do substrato da eNOS, indica que a regulação da atividade desta enzima possa ser chave para tratamento de inúmeras disfunções envolvendo o suprimento constante e sustentado de arginina.

Dessa forma, sugerimos que o BPP-10c, uma molécula peptídica dotada de atividade anti-hipertensiva, possa ser utilizado como fármaco para o tratamento das patologias associadas com a disfunção na produção de arginina. Isto pode ser evidenciado no caso do tratamento da hipertensão em SHR, onde houve um aumento na produção de arginina e acompanhada de diminuição na pressão arterial.

Acreditamos ainda, que o BPP-10c possa ser considerado uma molécula-líder para o desenvolvimento de agentes terapêuticos para várias patologias que envolvam tanto a deficiência da produção de NO como a deficiência na produção de arginina, uma vez que o peptídeo interfere diretamente com o metabolismo deste aminoácido, que é um dos precursores na síntese de NO.

# 7. Referências Bibliográficas

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

Albrecht, E. W.; Stegeman, C. A.; Heeringa, P.; Henning, R. H. e van Goor, H. (2003). Protective role of endothelial nitric oxide synthase. *J. Pathol.* **199**, 8-17.

Baez, S. (1973). An open cremaster muscle preparation for the study of blood vessels by in vivo microscopy. *Microvasc. Res.* **5**, 384-394.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.

Bredt, D. S. e Snyder, S. H. (1994). Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Annu. Rev. Biochem.* **63**, 175-195.

Calabrese, V.; Mancuso, C.; Calvani, M.; Rizzarelli, E.; Butterfield, D. A. e Stella, A. M. (2007). Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. *Nat. Rev. Neurosc.* **8**, 766-775.

Cawley, S. M.; Sawyer, C. L.; Brunelle, K. M.; van der Vliet, A. e Dostmann, W. R. (2007). Nitric oxide-evoked transient kinetics of cyclic GMP in vascular smooth muscle cells. *Cell Signal* **19**, 1023-1033.

Cleaver, O. e Melton, D. A. (2003). Endothelial signaling during development. *Nature Medicine* **9**, 661-668.

Cotton, J.; Hayashi, M. A. F.; Cuniasse, P.; Vazeux, G.; Ianzer, D.; Camargo, A. C. M. e Dive, V. (2002). Seletive inhibitor of the C-domain of the angiotensin I converting enzyme by bradykinin potentiang peptide. *Biochemistry* **41**, 6065-6071.

Cushman, D. W.; Pluscec, J.; Williams, N. J.; Weaver, E. R.; Sabo, E. F.; Kocy, O.; Cheung, H. S. e Ondetti, M. A. (1973). Inhibition of angiotensincoverting enzyme by analogs of peptides from *Bothrops jararaca* venom. *Experientia* **29**, 1032-1035.

Dhanakotti, S. N.; Brosnan, M. E.; Herzberg, G. R. e Brosnan, J. T. (1992). Cellular and subcellular localization of enzymes of arginine metabolism in rat kidney. *Biochem. J.* **282**, 369-375.

Ebert, R. F. (1986). Amino acid analysis by HPLC: optimized conditions for chromatography of phenylthiocarbamyl derivatives. *Anal. Biochem.* **154**, 431-435.

Fakler, C. R. (1995). Two cases suggesting a role for the L-arginine nitric oxide pathway in neonatal blood pressure regulation. *Acta Paediatr.* **84**, 460-462.

Feelisch, M.; Rassaf, T.; Mnaimneh, S.; Singh, N.; Bryan, N. S.; Jourd'heuil, D. e Kelm, M. (2002). Concomitant S-, N-, and heme-nitros(yl)ation in biological tissues and fluids: implications for the fate of NO in vivo. *FASEB J.* **16**, 1775-1785.

Ferreira, S. H. (1965) Bradykinin potentiation factor (BPF) present in snake venom of *Bothrops jararaca*. *Br. J. Pharmacol.* **24**, 163-169.

Ferreira, S. H.; Barteld, D. C. e Greene, L. J. (1970a). Isolation of bradykinin potentiating peptides from *Bothrops jararaca* venom. *Biochemistry* **6**, 2583-2593.

Ferreira, S. H.; Greene, L. H.; Alabaster, V. A.; Bakhle, Y. S. e Vane, J. R. (1970b). Activity of various fractions of bradykinin potentiating factor against angiotensin I converting enzyme. *Nature* **225**, 379-380.

Flam, B. R.; Hartmann. P. J.; Harrell-Booth, M.; Solomonson, L. P. e Eichler, D. C. (2001). Caveolar localization of arginine regeneration enzymes, argininosuccinate sythase, and lyase, with endothelial nitric oxide synthase. Nitric Oxide **5**, 187-197.

Flam, B. R.; Eichler, D. C. e Solomonson, L. P. (2007). Endothelial nitric oxide production is tightly coupled to the citrulline-NO cycle. *Nitric Oxide* **17**, 115-121.

Fox, J. W. e Serrano, S. M. T. (2007). Approaching the golden age of natural product pharmaceuticals from venom libraries: an overview of toxins and toxin-derivatives currently involved in therapeutic or diagnostic applications. *Curr. Pharm. Des.* **13**, 2927-2934.

Garcia-Gardena, G.; Oh, P.; Liu, J.; Schnitzer, J. E. e Sessa, W. C. (1996). Targeting of nitric oxide synthase to endothelial cell caveolae via palmitoylation: implications for nitric oxide signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 6448-6453.

Gavras, H.; Brunner, H. R.; Laragh, J. H.; Searley, S. E.; Gavras, I. e Vukovich, R. A. (1974). An angiotensin converting enzyme inhibitor to identify and treat vasocontrictor and volume factors in hypertensive patients. *N. Engl. J. Med.* **291**, 817–821.

Giles, A. R. (1987). Guidelines for the use of animals in biomedical research. *Thromb. Haemost.* **58**, 1078-1084.

Goodwin, B. L.; Solomonson, L. P. e Eichler, D. C. (2004). Argininosuccinate synthase expression is required to maintain nitric oxide production and cell viability in aortic endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **279**, 18353-18360. Gouta, I.; Fairand, A. e Husson, A. (1999). Expression of the genes of arginine-synthesizing enzymes in the ratkidney during development. *Biol. Neonate* **76**, 253-260.

Govers, R. e Rabelink, T. J. (2001). Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase. Am. *Physiol. Renal Physiol.* **280**, 193-206.

Gross, D. M.; Sweet, C. S.; Ulm, E. H.; Backlund E. P.; Morris A. A.; Weitz, D.; Bohn, D. L.; Wenger H. C.; Vassil, T. C. e Stone C. A. (1981). Effect of N-[(S)-1-carboxy-3-phenylpropyl]-L-Ala-L-Pro and its ethyl ester (MK-421) on angiotensin converting enzyme in vitro and angiotensin I pressor responses in vivo. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **216**, 552-557.

Haller, H. (1997). Endothelial function. General consideration. *Drugs* **53**, 1-10.

Hao, G.; Xie, L. e Gross, S. S. (2004). Argininosuccinate synthetase is reversibly inactivated by S-nitrosylation *in vitro* and *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **270**, 36192-36200.

Harrison, D. G. (1997). Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. *J. Clin. Invest.* **100**, 2153-2157.

Hasegawa, T.; Takagi, S.; Nishimaki, K.; Morita, K. e Nakajima, S. (1992). Impairment of L-arginine metabolism in spontaneously hypertensive rats. *Biochem. Int.* **26**, 653-658.

Hattori, Y.; Campbell, E. B. e Gross, S. S. (1994). Argininosuccinate synthetase mRNA and activity are induced by immunostimulants in vascular smooth muscle. Role in the regeneration or arginine for nitric oxide synthesis. *J. Biol. Chem.* **269**, 9405-9408.

Hayashi, M. A. F.; Murbach, A. F.; Ianzer, D.; Portaro, F. C.; Prezoto, B.
C.; Fernandes, B. L.; Silveira, P. F.; Silva, C. A.; Pires, R. S.; Britto, L. R.; Dive,
V. e Camargo, A. C. M. (2003). The C-type natriuretic peptide precursor of snake brain contains highly specific inhibitors of the angiotensin-converting enzyme. *J. Neurochem.* 85, 969-977.

Hayashi, M. A. F. e Camargo, A. C. M. (2005). The Bradykininpotentiating peptides from venom gland and brain of *Bothrops jararaca* contain highly site specific inhibitors of the somatic angiotensin-converting enzyme. *Toxicon* **45**, 1163-1170.

Hecker, M.; Sessa, W. C.; Harris, H. J.; Anggard, E. E. e Vane, J. R. (1990). The metabolism of L-arginine and its significance for the biosynthesis of endothelium-derived relaxing factor: cultured endothelial cells recycle L-citruline to L-arginine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 8612-8616.

Heinrikson, R. L. e Meredith, S. C. (1984). Amino acid analysis by reversephase high-performance liquid chromatography: precolumn derivatization with phenylisothiocyanate. *Anal. Biochem.* **136**, 65-74.

Husson, A.; Brasse-Lagnel, C.; Fairand, A.; Renouf, S. e Lavoinne, A. (2003). Argininosuccinate synthetase from the urea cycle to the citrulline-NO cycle. *Eur. J. Biochem.* **270**, 1887-1899.

lanzer, D.; Konno, K.; Marques-Porto, R.; Portaro, F. C. V.; Stocklin, R.; Camargo, A. C. M. e Pimenta, D. C. (2004). Identification of five new bradykinin poteating peptides (BPPs) from Bothrops jararaca crude venom by using electrospray ionizaton tandem mass spectrometry after a two-step liquid chromatography. *Peptides* **25**, 1085-1092. Ianzer, D.; Santos, R. A. S.; Etelvino, G. M.; Xavier, C. H.; Santos, J. A.;
Mendes, E. P.; Machado, L. T.; Prezoto, B. C.; Dive, V. e Camargo, A. C. M.
(2007). Do the cardiovascular effects of angiotensina-converting enzyme (ACE)
I involve ACE-independent mechanisms? New insights from proline-rich peptides of *Bothrops jararaca*. *J. Pharm. Exp. Ther.* **322**, 795-805.

Jones, M. R. (1988). Free amino acid pools in the spontaneously hypertensive rat: a longitudinal study. *J. Nutr.* **118**, 579-587.

Karlberg, T.; Collins, R.; van der Berg, S.; Flores, A.; Hammarström, M.; Högbom, M.; Schiavone, L. H. e Uppenberg, J. (2008). Structure of human argininosuccinate synthetase. *Acta Cryst. D. Biol. Cryst.* **64**, 279-286.

Koeners, M. P.; van Faassen, E. E.; Wesseling, S.; de Sain-van der Velden, M.; Koomans, H. A.; Braam, B. e Joles, J. A. (2007). Maternal supplementation with citrulline increases renal nitric oxide in young spontaneously hypertensive rats and has long-term antihypertensive effects. *Hypertension* **50**, 1077-1084.

Kurz, S. e Harrison, D. G. (1997). Insulin and the arginine paradox. *J. Clin. Invest.* **99**, 369-370.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

Lee, J. Y.; Rudich, S. M.; Schreiner, R. J. e Meyerhoff, M. E. (2004). Improved planar amperometric nitric oxide sensor based on platinized platinum anode. 2. Direct real-time measurement of NO generated from porcine kidney slices in the presence of I-arginine, I-arginine polymers, and protamine. *Anal. Chem.* **76**, 545-551. Lemke, C. T. e Howell, P. L. (2002). Substrate induced conformational changes in argininosuccinate synthetase. *J. Biol. Chem.* **277**, 13074-13081.

Liu, J.; Garcia-Gardena, G. e Sessa, W. C. (1996). Palmitoylation of endothelial nitric oxide synthase is necessary for optimal stimulated release of nitric oxide: implications for caveolae localization. *Biochemistry* **35**, 13277-13281.

Marcic, B.; Deddish, P. A.; Skidgel, R. A.; Erdös, E. G.; Minshall, R. D. e Tan, F. (2000). Replacement of the transmembrane anchor in angiotensin Iconverting enzyme (ACE) with a glycosylphosphatidylinositol tail affects activation of the B2 bradykinin receptor by ACE inhibitors. *J. Biol. Chem.* **275**, 16110-16118.

McCormick, S. M.; Eskin, S. G.; McIntire, L. V.; Teng, C. L.; Lu, C. M.; Russel, C. G. e Chittur, K. K. (2001). DNA microarray reveals changes in gene expression of shear stressed human umbilical vein endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 8955-8960.

McDonald, K. K.; Zharikov, S.; Block, E. R. e Kilberg, M. S. (1997). A caveolar complex between the cationic amino acid transporter 1 and endothelial nitric oxide synthase may explain the "arginine paradox". *J. Biol. Chem.* **272**, 31213-31216.

Menez, A. (1998). Functional architectures of animal toxins: a clue to drug design? *Toxicon* **36**, 1557-1572.

Morris, S. M. Jr. (2004). Enzymes of arginine metabolism. *J. Nutr.* **134**, 2743–2747.

Mueller, S.; Liebmann, C. e Reissmann, S. (2002). Intramolecular signal transduction by the bradykinin B2 receptor. *Int. Immunopharmacol.* **2**, 1763-1770.

Nussler, A. K.; Biliar, T. R.; Liu, Z. Z. e Moris, S. M. (1994). Coinduction of nitric oxide synthase and argininosuccinate synthase in a murine macrophage cell line. Implications for regulation of nitric oxide production. *J. Biol. Chem.* **269**, 1257-1261.

Oemar, B. S.; Tschudi, M. R.; Godoy, N.; Brovkovich, V.; Malinski, T. e Luscher, T. F. (1998). Reduced endothelial nitric oxide synthase expression and production in human atherosclerosis. *Circulation* **97**, 2494-2498.

Ondetti, M. A.; Rubin, B. e Cushman, D. W. (1977). Design of specific inhibitors of angiotensin-converting enzyme: new class of orally active antihypertensive agents. *Science* **196**, 441-444.

Oyadomari, S.; Gotoh, T.; Aoyagi, K.; Araki, E.; Shichiri, M. e Mori, M. (2001). Coinduction of endothelial nitric oxide synthase and arginine recycling enzymes in aorta of diabetics rats. *Nitric Oxide* **5**, 252-260.

Panza, J. A. (1997). Endothelial dysfunction in essential hypertension. *Clin. Cardiol.* **20**, 26-33.

Puddu P.; Puddu G. M.; Zaca, F. e Muscari, A. (2000). Endothelial dysfunction in hypertension. *Acta Cardiol.* **55**, 221-232.

Pujals, S. e Giralt, E. (2007). Proline-rich, amphipathic cell-penetrating peptides. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **60**, 473-484.

Rocha e Silva, M.; Beraldo, W. T. e Rosenfeld, G. (1949). Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by trypsin. *Am. J. Physiol.* **156**, 261-273.

Saino, T.; Matsuura, M. e Satoh, Y. (2002). Application of real time confocal microscopy to intracellular calcium ion dynamics in rat arterioles. *Histochem. Cell Biol.* **117**, 295-305.

Scaglia, F.; Brunetti-Pierri, N.; Kleppe, S.; Marini, J.; Carter, S.; Garlick, P.; Jahoor, F.; O'Brien, W. e Lee, B. (2004). Clinical consequences of urea cycle enzyme deficiencies and potential links to arginine and nitric oxide metabolism. *J. Nutr.* **134**, 2775-2782.

Shen, L. J.; Beloussow, K. e Shen, W. C. (2005). Modulation of arginine metabolic pathways as the potential anti-tumor mechanism of recombinant arginine deiminase. *Biochem. Pharmacol.* **69**, 97-104.

Shuttleworth, C. W.; Burns, A. J.; Ward, S. M.; O'Brien, W. E. e Sanders, K. M. (1995). Recycling of L-citrulline to sustain nitric oxide-dependent enteric neurotransmission. *Neuroscience* **68**, 1295-1304.

Silva, C. A.; Portaro, F. C. V.; Fernandes, B. L.; Ianzer, D. A.; Guerreiro, J. R.; Gomes, C. L; Konno, K.; Serrano, M. T.; Nascimento, N. e Camargo, A. C. M. (2008). Tissue distribution in mice of BPP-10c, a potent proline-rich antihypertensive peptide of *Bothrops jararaca*. *Toxicon* **51**, 515-523.

Skeggs, L. T.; Kahn, J. R. e Shumway, N. P. (1956). The preparation and function of hypertensin-converting enzyme. *J. Exp. Med.* **103**, 295-299.

Smith, C. G. e Vane, J. R. (2003). The discovery of captopril. *FASEB J.* **17**, 788-789.

Solomonson, L. P.; Flam, B. R.; Pendleton, L. C.; Goodwin, B. L. e Eichler, D. C. (2003). The caveolar nitric oxide synthase/arginine regeneration system for NO production in endothelial cells. *J. Exp. Biol.* **206**, 2083-2087.

Taylor, P. D. e Poston, L. (1994). The effect of hyperglycaemia on function of rat isolated mesenteric resistance artery. *Br. J. Pharmacol.* **113**, 801-808.

Vallance, P. e Chan, N. (2001). Endothelial function and nitric oxide: clinical relevance. *Heart* **85**, 342-350.

Villard, E. e Soubrier, F. (1996). Molecular biology and genetics of the angiotensin-I-converting enzyme: potential implications in cardiovascular diseases. *Cardiovasc. Res.* **32**, 999-1007.

Vukosavljevic, N.; Jaron, D.; Barbee, K. A. e Buerk, D. G. (2006). Quantifying the L-arginine paradox in vivo. *Microvasc. Res.* **71**, 48-54.

Xie, L. e Gross, S. S. (1997). Argininosuccinate synthetase overexpression in vascular smooth muscle cells potentiates immunostimulant-induced NO production. *J. Biol. Chem.* **272**, 16624-16630.

Xie, L.; Hattori, Y.; Tume, N. e Gross, S. S. (2000). The preferred source of arginine for high-output nitric oxide synthesis in blood vessels. *Semin. Perinatol.* **24**, 42-45.

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

Wu, G. e Morris, S. M. Jr. (1998). Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem. J.* **336**, 1-17.

Ziche, M. e Morbidelli, L. (2000). Nitric oxide and angiogenesis. J. Neurooncol. **50**, 139-148.

## 8. Anexos

PDF created with pdfFactory trial version <u>www.pdffactory.com</u>

#### 8.1. Anexo A – Súmula Curricular

#### **DADOS PESSOAIS**

Nome: Juliano Rodrigo Guerreiro

Local e data de nascimento: Piracicaba – 01/10/1978

## **EDUCAÇÃO**

- Cel. Fernando Febeliano da Costa Piracicaba 1997. Ênfase em Eletrotécnica.
- Universidade de São Paulo São Paulo 2004. Graduação em Farmácia e Bioquímica.

## FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

- Gestão de Projetos segundo o PMBOK. Project Management Institute, Brasil – 2009.
- Como otimizar a Expressão de Proteínas Recombinantes em *E. coli*.
   MERCK S.A. São Paulo, Brasil.
- Extensão universitária em Bioquímica dos Venenos Animais Universidade de São Paulo, Brasil – 2006.
- Propriedade Intelectual e Desenvolvimento Farmacêutico. Agência de Gestão da Inovação Farmacêutica, AGIF, Brasil – 2006.
- Boas Práticas de Laboratório BPL. SGB Consultoria Química Ltda, SGB, Brasil – 2005.
- Inovação Farmacêutica e Propriedade Intelectual. Agência de Gestão da Inovação Farmacêutica, AGIF, Brasil – 2004.

- Extensão universitária em Biologia Molecular no Estudo de Toxinas.
   Instituto Butantan, IBU, Brasil 2001.
- Atualização em Legislação Farmacêutica. Universidade de São Paulo, USP, Brasil – 2000.

## OCUPAÇÃO

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

### PUBLICAÇÕES

#### - Artigos

- Guerreiro, J.R.; Winnischofer, S.M.; Bastos, M.F.; Portaro, F.C.; Sogayar, M.C.; Camargo, A.C. and Hayashi, M.A.F. (2005). Cloning and characterization of the human and rabbit NUDEL-oligopeptidase promoters and their negative regulation. *Biochim Biophys Acta* 1730, 77-84.
- Hayashi, M.A.F.; Portaro, F.C.V.; Bastos, M.F.; Guerreiro, J.R.; Gorrão, S.S.; Tambourgi, D.V.; Sant'Anna, O.A.; Camargo, L.M.; Brandon, N.J. and Camargo, A.C.M. (2005). Inhibition of NUDEL-oligopeptidase activity by the schizophrenia risk factor Disrupted in Schizophrenia 1 (DISC1). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 3828-3833.

- Silva, C.A.; Portaro, F.C.; Fernandes, B.L.; Ianzer, D.A.; Guerreiro, J.R.; Gomes, C.L.; Konno, K.; Serrano, S.M.T.; Nascimento, N. and Camargo, A.C.M. (2008). Tissue distribution in mice of BPP 10c, a potent prolinerich anti-hypertensive peptide of *Bothrops jararaca*. *Toxicon* 51, 515-523.
- Guerreiro, J.R.; Lameu, C.; Oliveira, E.F.; Klitzke, C.F.; Linares, E.; Augusto, O.; Fox, J.W.; Lebrun, I.; Serrano, S.M.T. and Camargo, A.C.M. (2008). Argininosuccinate synthetase is a novel, functional target for a snake venom anti-hypertensive peptide: role in L-arginine and nitric oxide production. *Resubmetido a J. Biol. Chem*.
- Hayashi, M.A.F.; Guerreiro, J.R.; Kamiya, A.; Machado, M.F.; Campeiro, J.D.; Oliveira, V.; Sawa, A.; Camargo, A.C.M. and Brandon, N.J. (2008). Endooligopeptidase activity of Ndel1 (Nuclear-distribution like 1) is critical for neurite outgrowth. Submetido a *Human Genetics*.
- Lameu, C.; Hayashi, M.A.F.; Guerreiro, J.R.; Oliveira, E.F.; Morais, K.L.P.; Camargo, A.C.M. and Ulrich, H. (2008). Mechanism of induction of calcium signaling by a proline-rich oligopeptide from the pit viper *Bothrops jararaca*. Submetido a *J. Neurochem*.
- Montagna, E.; Guerreiro, J.R. and Torres, B.B. (2008). Na interdisciplinarity model for a Pharmacy course. Submetido a Am. J. of Pharm. Educ.

#### -Patentes

- Camargo, A.C.M.; Guerreiro, J R.; Silva, C.A.; Ianzer, D.; Lameu, C.; Melo, R.; Augusto, O.; Hayashi, M.A.F. and Serrano, S.M.T. Produção sustentada de óxido nítrico por peptídeos ricos em prolina (Z-Pros) January 2006 (Brazil); January 2007 PCT.
- Silva, C.A.; Camargo, A.C.M.; Ianzer, D.; Guerreiro, J.R.; Lameu, C.and Hayashi, M.A.F. Peptídeo rico em prolina,composição farmacêutica, uso de um ou mais peptídeos. 2006. Patent application number PI 0600331-1(Brazil); Proline-rich peptides, pharmaceutical composition, use of one or more peptides and methods of treatment. Patent application Number PCT/BR2007/000003.
- Camargo, A.C.M.; Hayashi, M.A.F.; Portaro, F.; and Guerreiro, J.R.
   Process for the determination of the primary structure of the messenger
   RNA coding for the human recombinant endooligopeptidase A (HEOPA)
   which can be useful for the treatment of neurological, phychiatric and
   degenerative pathologies". Depositado no PCT em 08 de dezembro de
   2003.

#### -Congressos, Simpósios e Reuniões

 Benedetti, G.; Morais, K.L.P; Oliveira, E.F.; Clissa, P.B.; Guerreiro, J.R.; Lameu, C. Evaluation of the PRO-10c (proline-rich oligopeptide-10c) effects on the endothelial parameters involved in the physiopathology of the preeclampsia. 2008 X Reunião Científica Anual do Instituto Butantan.

- Lameu, C.; Guerreiro, J.R.; Oliveira, E.F.; Morais, K.L.P.; Hayashi, M.A.F.; Campos, R.R.; Camargo, A.C.M.; Ulrich, H. Discovery of a novel mechanism for anti-hypertensive actions of the proline-rich peptide (BPP-10c). 2008 X Reunião Científica Anual do Instituto Butantan.
- Morais, K.L.P.; Benedetti, G.; Oliveira, E.F.; Lameu, C., Guerreiro, J.R.
   Effects of prolinerich oligopeptides (PROs) in Bothrops jararaca venom on argininosuccinate synthetase. 2008 X Reunião Científica Anual do Instituto Butantan
- Oliveira, E.F.; Guerreiro, J.R.; Gomes, C.L.; Fernandes, B.L.; Camargo, A.C.M.; Silva, C.A. Identification of the molecular targets of bradykinin potentiating peptide 10c in the central nervous system. 2007 IX Reunião Científica Anual do Instituto Butantan.
- Guerreiro, J.R.; Gomes, C.L.; Ianzer, D.; Linares, E.; Silva, C.A.; Augusto, O.; Serrano, S.M.T.; Camargo, A.C.M. Proline-rich oligopeptides exert blood pressure down regulation independently on angiotensin and bradykinin. 2006 XXXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq.

#### -Premiações

Prêmio da XXXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica
 e Biologia Molecular – SBBq, realizada em Águas de Lindóia nos dias 01

a 04 de Julho de 2006, apresentando o trabalho intitulado: "**Proline-Rich oligopeptides exert Blood Pressure Down Regulation Independently on Angiotensin and Bradykinin**".

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

# Livros Grátis

(<u>http://www.livrosgratis.com.br</u>)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração Baixar livros de Agronomia Baixar livros de Arquitetura Baixar livros de Artes Baixar livros de Astronomia Baixar livros de Biologia Geral Baixar livros de Ciência da Computação Baixar livros de Ciência da Informação Baixar livros de Ciência Política Baixar livros de Ciências da Saúde Baixar livros de Comunicação Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE Baixar livros de Defesa civil Baixar livros de Direito Baixar livros de Direitos humanos Baixar livros de Economia Baixar livros de Economia Doméstica Baixar livros de Educação Baixar livros de Educação - Trânsito Baixar livros de Educação Física Baixar livros de Engenharia Aeroespacial Baixar livros de Farmácia Baixar livros de Filosofia Baixar livros de Física Baixar livros de Geociências Baixar livros de Geografia Baixar livros de História Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura Baixar livros de Literatura de Cordel Baixar livros de Literatura Infantil Baixar livros de Matemática Baixar livros de Medicina Baixar livros de Medicina Veterinária Baixar livros de Meio Ambiente Baixar livros de Meteorologia Baixar Monografias e TCC Baixar livros Multidisciplinar Baixar livros de Música Baixar livros de Psicologia Baixar livros de Química Baixar livros de Saúde Coletiva Baixar livros de Servico Social Baixar livros de Sociologia Baixar livros de Teologia Baixar livros de Trabalho Baixar livros de Turismo