



UnB

Instituto de Química
Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ)

Dissertação de Mestrado

**PROSPECÇÃO, SÍNTESE E APLICAÇÃO DE PEPTÍDEOS
POTENCIALIZADORES DE BRADICININA (BPPs) DA PEÇONHA DE
*BOTHROPS sp.***

Samuel Ribeiro Costa

Orientador: Dr. Guilherme Dotto Brand

Brasília, DF

2019

FOLHA DE APROVAÇÃO

Comunicamos a aprovação da Defesa de Dissertação do (a) aluno (a) **Samuel Ribeiro Costa**, matrícula nº **17/0118398**, intitulada “**Prospecção, Síntese e Aplicação de peptídeos Potencializadores de Bradicinina (BPPs) da Peçonha da Bothrops sp.**”, apresentada no (a) Auditório Azul do Instituto de Química (IQ) da Universidade de Brasília (UnB) em 26 de fevereiro de 2019.

Prof. Dr. Guilherme Dotto Brand
Presidente de Banca

Prof. Dr. Mauro Vicentini Correia
Membro Titular

Prof. Dr. Marcelo Henrique Soller Ramada
Membro Titular UCB

Prof.^a Dra. Aline Lima de Oliveira Paterno
Membro Suplente

Em 26 de fevereiro de 2019.

“Não podemos ter todo o conhecimento de uma vez. Precisamos
começar acreditando, depois podemos ser levados a
conhecer as provas por nós mesmos”

Tomás de Aquino

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, Wanderley e Silvia, por me incentivarem a ter força e fé, mesmo discordando de minhas ideias, me fazendo buscar ser uma pessoa melhor, tanto academicamente quanto pessoalmente. Tenho uma enorme admiração por vocês e não tenho palavras suficientes para expressar minha eterna gratidão.

A meu irmão, Anderson, a quem tenho como exemplo de perseverança e coragem por almejar um patamar e não parar de buscar até chegar lá, saiba que assim são feitos os vencedores. Obrigado por sempre me aconselhar e ajudar a buscar sempre mais para alcançar meus objetivos.

Ao meu falecido avô, José Emiliano, quem sempre admirei por sua trajetória de vida, por ter conseguido vencer pelos estudos com muito esforço.

A minha noiva que sempre esteve ao meu lado, viu minhas dificuldades e horas de desespero em que eu queria arrancar meus cabelos, mas sempre me acalmou e me fez seguir em frente. Saiba que grande parte do que conquistei devo a sua ajuda e paciência.

A Dona Sônia matriarca de uma bela família, onde todos tem uma importância na minha trajetória acadêmica.

Ao meu orientador, Professor Dr. Guilherme Dotto Brand, que teve a coragem de se aventurar em difíceis sínteses e soube no tempo certo administrar o trabalho guiando para que eu não me perdesse, sempre ajudando pacientemente, mostrando o caminho certo a seguir, sempre muito rigoroso no que faz, uma das pessoas mais inteligentes que conheci, é um verdadeiro “pai” científico para mim, a quem tive a oportunidade e a honra de aprender sobre novas áreas do conhecimento e da produção do trabalho científico. Obrigado por compartilhar uma parte de seu vasto conhecimento. Saiba que ganhou mais que um orientando mais um amigo para a vida.

Ao Professor Dr. Daniel Arcanjo pela importantíssima e essencial ajuda prestada na realização dos testes dos peptídeos sintetizados, pelo conhecimento compartilhado, pela disponibilidade e interesse, realmente muito bom encontrar um pesquisador tão dedicado e apaixonado pelo que faz atuando na mesma linha de pesquisa eu, aprendi muito com o senhor.

Ao Dr. Éder, amigo que tive a oportunidade de conhecer. pelas horas dedicadas em meu auxílio tanto na pesquisa quanto na dissertação.

Ao Mestre Luiz, sempre atencioso e disposto. Obrigado pelas dicas e momentos de descontração.

Ao professor Dr. Rafael quem me apresentou o mundo da química orgânica, me incentivou e me ajudou desde a época da graduação, pelas brilhantes ideias e sua incrível experiência em síntese orgânica que foram fundamentais para a realização correta das sínteses.

Ao professor Dr. Angelo Machado, que me fez gostar ainda mais de química orgânica, pelas boas risadas em momentos de “cafezinhos”, pelas orientações durante a graduação e todo o mestrado.

Ao Professor Dr. José Roberto, sempre muito empolgado em suas ideias e em fazer ciência, fez uma grande colaboração para a elaboração do trabalho.

A central analítica do Instituto de Química – UnB a quem devo meus agradecimentos pela sempre disponibilidade em requisitadas análises rápidas e de última hora o que possibilitou a realização e dinâmica do trabalho.

Ao amigo que tive o prazer de conhecer Adolfo de Souza do Laboratório de Toxicologia do Instituto de Biologia - UnB, que me ajudou muito em minhas análises e sequenciamentos.

Ao José Cardozo do Laboratório de Espectrometria de Massa da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, sempre muito solícito em me ajudar para o preparo das amostras apesar das dificuldades impostas entre empresa e instituto que trabalham pela mesma coisa.

A Andreanne Gomes, sempre extremamente solícita e calma nas horas decisivas, me ajudando a operar o HPLC, fazendo sempre mais do que era requisitada, grande pesquisadora e professora.

Ao Amigo Anderson Dematei pelas informações e ajudas prestadas.

Ao Prof. Carlos Bloch Jr. Do Laboratório de Espectrometria de Massa e à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) – Recursos Genéticos e Biotecnologia por permitir o uso das instalações.

Aos meus colegas de laboratório, José Brango, Charley Lourenço sempre muito solícitos em me ajudar e me ensinar as técnicas e “gambiarras” do laboratório.

Aos Professores componentes da banca, Dr. Marcelo Ramada, Dr. Mauro Vicentini e Dra Aline Paterno por terem aceitado o convite para participar da minha defesa de mestrado, me sinto muito honrado.

| | |
|--|------------|
| ÍNDICE | I |
| LISTA DE ABREVIATURAS | IV |
| RESUMO | VI |
| ABSTRACT | VII |
| 1. Introdução Teórica | 01 |
| 1.1 Sistema Cinina – Calicreína (SCC) | 01 |
| 1.2 Bradicinina | 03 |
| 1.3 Enzima conversora de angiotensina (ECA) e os efeitos da sua inibição | 03 |
| 1.4 Peptídeos potencializadores de bradicinina (BPPs) e sua ação de inibição à ECA | 10 |
| 1.5 A espectrometria de massa aplicada à caracterização de BPPs da peçonha de serpentes do gênero <i>Bothrops</i> | 11 |
| 1.5.1 Espectrometria de massa aplicada ao sequenciamento de BPPs | 12 |
| 1.5.2 Mecanismo de Fragmentação de Peptídeos em Espectrometria de Massa | 13 |
| 1.5.2.1 Mecanismo de Formação dos Íons das séries b e y | 13 |
| 1.5.2.2 – Mecanismo de Formação de Íons da Série Complementar “a” | 14 |
| 1.5.2.3 – Mecanismo de Formação de Íons da Série Complementar “z” | 15 |
| 1.5.3 – Caracterização de BPPs a Partir da Peçonha de Serpentes do Gênero <i>Bothrops</i> | 17 |
| 1.6 Interação de BPPs com outras enzimas que não a ECA | 18 |
| 1.7 Desafios na síntese de Peptídeos Potencializadores de Bradicinina | 24 |
| 1.8 Caracterização taxonômica de serpentes por meio da determinação dos peptídeos presentes na peçonha utilizando espectrometria de massa | 25 |

| | |
|--|-----------|
| 2. Objetivos | 25 |
| 2.1 Objetivos Gerais | 25 |
| 2.2 Objetivos Específicos | 26 |
| 3. Métodos | 27 |
| 3.1 <i>Bothrops sp.</i> | 27 |
| 3.2 Preparo do extrato bruto de <i>Bothrops sp.</i> para fracionamento | 29 |
| 3.2.1 Pré-Fracionamento | 29 |
| 3.2.2 Cromatografia Líquida da fração menor que 10 kDa | 29 |
| 3.3 Análise por MALDI da fração da peçonha menor que 10 kDa | 29 |
| 3.4 LC-MS/MS da fração menor que 10 kDa | 30 |
| 3.5 Sequenciamento <i>de novo</i> de BPPs da peçonha da <i>Bothrops sp.</i> | 30 |
| 3.6 Síntese de peptídeos em fase sólida | 31 |
| 3.6.1 Resinas utilizadas na síntese de peptídeos em fase sólida | 31 |
| 3.6.2 Remoção do grupo protetor Fmoc | 32 |
| 3.6.3 Reações de acoplamento | 33 |
| 3.6.3.1 Síntese com DIC/OXIMA® | 34 |
| 3.6.3.2 Síntese com DIPEA/HATU ou HBTU | 35 |
| 3.6.4 Teste de Kaiser | 36 |
| 3.6.5 Procedimentos e reagentes para a clivagem da ligação peptídeo-resina | 37 |
| 3.6.6 Ordem dos procedimentos para síntese e fase sólida | 39 |
| 3.6.7 Purificação dos peptídeos sintetizados | 40 |
| 3.6.8 Análise dos peptídeos sintetizados por espectrometria de massas | 41 |
| 3.7 Testes Farmacológicos de Vasodilatação | 41 |
| 3.7.1 Ratos | 41 |
| 3.7.2 Anéis de Artéria Aorta | 41 |
| 4. Resultados e Discussão | 42 |

| | |
|--|-----|
| 4.1 Separação cromatográfica e determinação da massa dos peptídeos da fração de baixa massa molecular de <i>Bothrops sp.</i> | 42 |
| 4.2 Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas (LC-MS/MS) da fração de baixa massa molecular de <i>Bothrops sp.</i> | 47 |
| 4.3 Sequenciamento manual dos peptídeos da peçonha de <i>Bothrops sp.</i> | 53 |
| 4.4 Estrutura primária de BPPs com fim taxonômico | 65 |
| 4.5 Síntese em fase sólida (SSP) de BPPs de <i>Bothrops sp.</i> | 67 |
| 4.6 Purificação e análise dos produtos de síntese | 71 |
| 4.6.1 Análise de possível dupla conformação dos peptídeos sintetizados | 73 |
| 4.6.2 Análise dos BPPs sintéticos por espectrometria de massa | 74 |
| 4.7 Ensaios Farmacológicos Preliminares de Vasodilatação | 81 |
| 4.7.1 Análise do Efeito Vasorelaxante do peptídeo Bs03 em Artéria Mesentérica de Ratos | 81 |
| 5. Conclusões | 85 |
| 6. Perspectivas Futuras | 86 |
| BIBLIOGRAFIA | 87 |
| ANEXO 1 | 91 |
| ANEXO 2 | 93 |
| ANEXO 3 | 94 |
| ANEXO 4 | 95 |
| ANEXO5 | 104 |

LISTA DE ABREVIATURAS

DCM - Diclorometano

DIPEA - N,N'-diisopropiletilamina

DMF - Dimetilformamida

BPPs – Do inglês, Bradykinin Potentiating Peptides

HBTU - 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3 – tetrametilurôniohexafluorofatato

HATU - 1-[Bis(dimethylamino)methylene]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridinium 3-oxid hexafluorophosphate]

HPLC - Do inglês, High Performance Liquid Chromatography

DIC - N,N'-Diisopropylcarbodiimide

MALDI-TOF - Matrix-assisted laser desorption/ionization - Time of Flight

LC-MS – Cromatografia Líquida acoplada a Espectrômetro de Massa

ECA – Enzima Conversora de Angiotensina

BK – Bradicinina

AsS – ArgininoSuccinato Sintase

ONS – Óxido Nítrico Sintase

HPLC - High Performance Liquid Chromatography

SCC – Sistema Cinina-Caliceína

EPN – Endopeptidase Neutra

ApN – AminopeptidaseNeutra

ApA – Aminopeptidase A

AsL – ArgininoSuccinato Liase

Acn – Acetonitrila

MDLA – Ácido dimetil L-Aspártico

HCCA - α -Cyano 4-Hydroxycinnamic Acid

FDA- Food and Drug Administration

GCa – Guanilato Sintase Ativada

GTP- Guanosina Trifosfato

GMPC - Guanosina Monofosfato Cíclica

RESUMO

Peptídeos bioativos são compostos que apresentam grande importância no reino animal. Uma classe de peptídeos bioativos é a dos peptídeos potencializadores de bradicinina (BPPs). Esses peptídeos serviram de base para medicamentos sintéticos, os quais possuem a propriedade de inibir a enzima conversora de angiotensina (ECA), capaz de converter angiotensina I em angiotensina II e de degradar a bradicinina (BK). A inibição de ECA aumenta o tempo de vida da BK, sendo assim usada no tratamento da hipertensão. Com o objetivo de caracterizar novos BPPs da peçonha de *Bothrops sp.*, uma serpente capturada em expedição ao Delta do Parnaíba e de difícil classificação taxonômica por herpetólogos, foi feito um pré-fracionamento da peçonha objetivando o enriquecimento com moléculas de baixa massa molecular (<10 kDa). Essa fração foi submetida a cromatografia líquida de alta eficiência e análises de espectrometria de massa MALDI-TOF e LC-MS/MS. Os BPPs foram sequenciados manualmente a partir dos espectros de MS/MS e os peptídeos foram caracterizados e comparados com a literatura. Além disso, três BPPs foram selecionados para a etapa de síntese e posterior avaliação farmacológica. Os peptídeos foram sintetizados pelo método de síntese em fase sólida, sendo em seguida purificados por cromatografia líquida de alta eficiência e armazenados para testes. Estão em andamento testes *ex vivo* em anéis de aorta de ratos e análise por microscopia confocal para mensurar o nível de óxido nítrico produzido pelos BPPs sintetizados além de seu potencial vasorelaxante.

ABSTRACT

Bioactive peptides are compounds that present great importance in the animal kingdom. One class of bioactive peptides is the bradykinin-potentiating peptides (BPPs). These peptides have been used as leads for synthetic drugs, which have the property of inhibiting the angiotensin converting enzyme (ACE), capable of converting angiotensin I to angiotensin II and also degrading bradykinin (BK). Inhibition of ACE increases the life-span of BK and, because of that, these drugs are used in the treatment of hypertension. In order to characterize new BPPs from the venom of *Bothrops sp.*, a snake captured in an expedition to the Delta Parnaíba with difficult taxonomical classification by herpetologists, its venom was subjected to pre-fractionation aiming to obtain an enriched fraction of low molecular mass molecules (<10 kDa). This fraction was subjected to high performance liquid chromatography and MALDI-TOF and LC-MS/MS mass spectrometry analyzes. The BPPs were manually sequenced from the MS/MS spectra and the peptides were characterized and compared to the literature. In addition, three BPPs were selected for synthesis for further pharmacological evaluation. The peptides were synthesized by the solid phase synthesis method and then purified by high performance liquid chromatography and stored for testing. Ex vivo tests are underway in aorta rings of rats and confocal microscopy analysis to measure the level of nitric oxide produced by the application of BPPs as well as their vasorelaxant potential.

1 – Introdução Teórica

Oligopeptídeos bioativos são estruturas proteicas formadas por poucos resíduos de aminoácidos e apresentam inúmeras atividades biológicas sendo de grande importância no reino animal. Uma ampla gama desses peptídeos bioativos é encontrada na peçonha de serpentes e o estudo mais aprofundado desse tipo de molécula tem possibilitado o desenvolvimento de novos fármacos¹.

O isolamento e a prospecção dos peptídeos de baixa massa molecular encontrados em venenos de animais como sapos, rãs, escorpiões, aranhas e serpentes², é de grande importância e tem possibilitado a descoberta de novas moléculas com diferentes aplicações. São conhecidos peptídeos com atividade opioide, antioxidante, antibióticas, antitrombótica além de inibidores de enzimas, dentre elas a Enzima Conversora de Angiotensina (ECA)³.

Serpentes possuem complexos arsenais químicos em sua peçonha e contam com suportes que inoculam o veneno em suas presas com o objetivo de destruir a homeostase da mesma⁴. A peçonha desses animais é rica principalmente de sais inorgânicos, peptídeos de baixa massa molecular e enzimas¹.

Atualmente, existem seis medicamentos aprovados pela *Food and Drug Administration* (sigla em inglês FDA)¹ derivados de venenos para o tratamento de dor crônica e doenças como o diabetes e hipertensão. Entre os medicamentos aprovados pela FDA está o Captopril (Capoten[®]), desenvolvido em 1981 para o tratamento da hipertensão, o qual tem como base a inibição da ECA. Este foi desenhado a partir da estrutura molecular dos peptídeos potencializadores de bradicinina (sigla em inglês BPP), descobertos em 1960 a partir da peçonha de *Bothrops jararaca*¹.

Dentre os peptídeos isolados de venenos e peçonha de animais, destacam-se os que interagem com o sistema cinina-caliceína (SCC), como os peptídeos relacionados a bradicinina (BRPs) e os BPPs.

1.1 – Sistema Cinina-Caliceína (SCC)

O Sistema Cinina-Caliceína é formado por proteínas que desempenham importantes ações no processo de controle da pressão sanguínea, inflamação e dor, entre outros⁵. O Sistema Cinina-Caliceína é importante para o entendimento da condição fisiológica de hipertensão e como estabelecer estratégias para o combate a esse tipo de reação fisiológica⁶.

As pró-caliceínas são proteínas precursoras das caliceínas, que por sua vez tem uma ação proteolítica, agindo sobre os cininogênios e formando assim as cininas (Figura 1)⁵. A bradicinina (BK), um nonapeptídeo, é um exemplo de cinina (Figura 2)⁶. A BK e seus precursores são degradados por cininases, entre elas a Enzima Conversora de Angiotensina (ECA)⁵.

O fígado tem um papel fundamental na regulação das ações do Sistema Cinina-Caliceína, pois sintetiza os cininogênios e a pré-caliceína e converte os precursores de Bradicinina em BK e a degrada, ou seja, ao mesmo tempo em que atua na síntese das proteínas desse sistema, ele também as degrada⁶. Por sua vez, a BK desempenha um papel fundamental no controle do tônus vascular, agindo como agonista em receptores que geram como resposta vasodilatação.

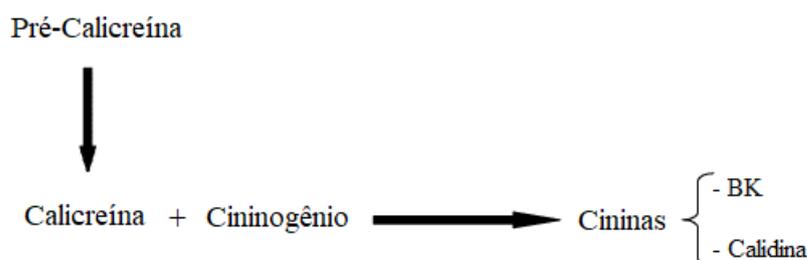


Figura 1: Cascata proteolítica para a formação das Cininas a partir da ação da caliceína no cininogênio.

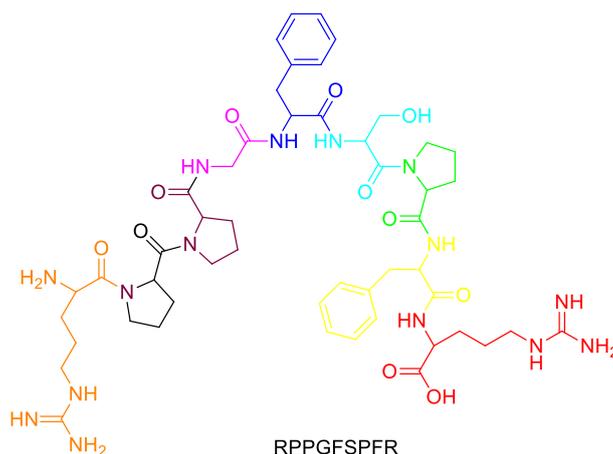


Figura 2: Estrutura da molécula de Bradicinina (BK) com cada resíduo de aminoácido marcado com cores diferentes e sua sequência de nove aminoácidos utilizando código de uma letra (RPPGFSPFR), códigos no anexo 4.

1.2 Bradicinina

A Bradicinina (BK) é um oligopeptídeo de vida curta em meio biológico pertencente a classe das cininas e que participa da regulação da resposta inflamatória e vascular⁷. Entre alguns efeitos correlacionados à BK estão o aumento da permeabilidade tecidual, dilatação vascular, que está intimamente relacionada com a redução da pressão arterial, e contração da musculatura lisa. Quando atua no controle da pressão sanguínea, a BK causa vasodilatação através de mecanismos de controle que diminuem a resistência arteriolar⁷.

Mamíferos expressam dois receptores de bradicinina, B1 e B2⁷. O receptor B2 é expresso constitutivamente e tem maior afinidade pela BK. Já o receptor B1 tem maior afinidade pelos seus produtos de degradação do que pela própria BK e é mais expresso em lesões teciduais ou após interações com endotoxinas bacterianas⁷.

A BK exerce seus efeitos biológicos de controle da pressão arterial a partir de sua interação com o receptor B2 que é acoplado à uma proteína G⁸, uma classe de proteínas transmembrana responsável pela transdução de sinais. Após a interação com o receptor, este gera uma “cascata” de sinalização, fazendo com que seja produzido Óxido Nítrico (NO), molécula importante para a vasodilatação e respiração mitocondrial⁹. Após a ativação, o receptor é dessensibilizado, endocitado e depois novamente ressensibilizado. A degradação de BK por proteólise, tal qual promovida pela ECA, impede que ocorra a interação efetiva desta molécula com o receptor B2 e promova a “cascata” de sinalização com os efeitos ao final de hipotensão⁸. Desta forma, a ECA então controla a BK limitando o tempo de vida fazendo assim com que seus efeitos não perdurem.

1.3 – Enzima Conversora de Angiotensina (ECA) e os efeitos de sua inibição

A Enzima Conversora de Angiotensina (ECA) é uma dicarboxipeptidase dependente de Zinco¹⁰. É uma enzima largamente expressa em diferentes partes do organismo, como no endotélio vascular e no pulmão¹¹. É uma metalo-enzima, ou seja, o seu sítio ativo (Figura 3) tem um átomo de metal, neste caso, o de Zinco no estado de oxidação 2⁺ (Zn²⁺) o qual desempenha papel fundamental na proteólise de seus substratos, como a Angiotensina I e a BK. Esta enzima foi descoberta há mais de meio século, porém, até pouco tempo, não havia sido elucidada completamente a sua estrutura e mecanismo¹⁰. Recentemente, por meio de difração de Raios – X, demonstrou-se ser composta por dois domínios, I e II, onde cada um

conta com um sítio ativo, conforme a ilustração da Figura 4. A enzima contém também em sua estrutura dois ânions monovalentes de Cloro¹⁰ (Figura 4).

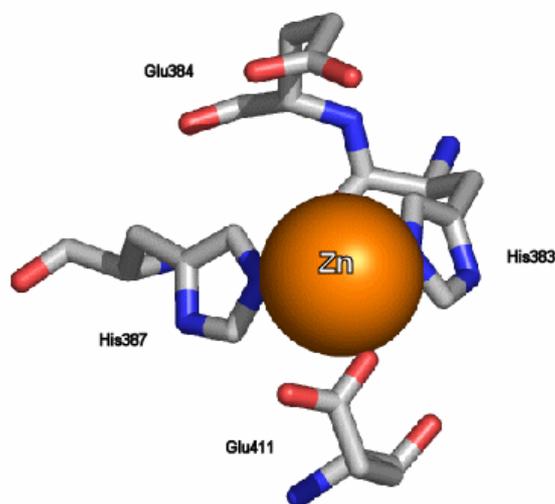


Figura 3: Estrutura do Sítio Ativo da ECA¹⁰. No centro o átomo de Zn²⁺ coordenado com os resíduos de aminoácidos ácidos glutâmicos 384 e 411 (Glu384 e Glu411) e histidinas 383 e 387 (His383 e His387).

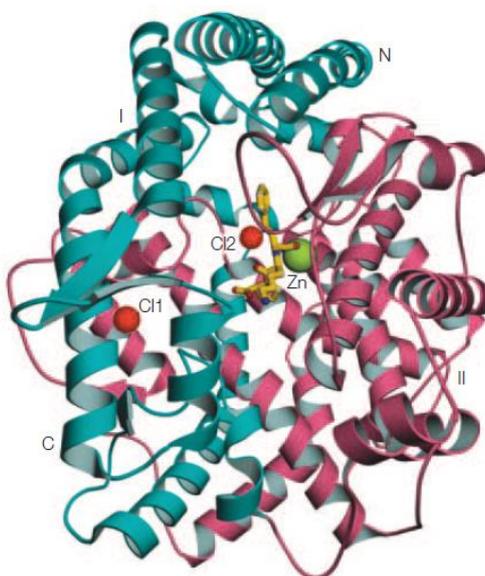


Figura 4: Estrutura Terciária da ECA¹⁰. Os domínios I e II, nas cores verde e vermelho respectivamente. Cl1 e Cl2 representam os dois átomos de cloros presentes na estrutura. Em verde o átomo de Zinco (Zn). No sítio ativo, ao centro, em amarelo, a molécula do medicamento inibidor de ECA, Lisinopril, interagindo com o sítio ativo da enzima.

Atualmente são conhecidos dois tipos de ECA. A Enzima Conversora de Angiotensina Somática (ECAs) contém dois domínios, na qual um deles é dominante na

conversão de angiotensina e na regulação da pressão arterial e funções cardíacas. A segunda forma de ECA conhecida é encontrada nos testículos e tem função na fertilidade. Em ambas as formas são encontrados dois íons de Cloro fora do sítio ativo, experimentos mostram que esses são essenciais para se manter a estrutura enzimática coesa e a sua atividade catalítica¹².

A ação proteolítica da ECA sobre a Angiotensina I (Ang I) e sobre a BK gera fragmentos com ação em diferentes receptores (Figura 5). A ECA, como o próprio nome sugere, converte por hidrólise a Ang I em angiotensina II (Ang II), que é um potente vasoconstritor. A Ang II por sua vez, ativa diretamente o receptor AT₁ causando vasoconstrição, ainda ativa o receptor AT₂ que têm ação no reparo tecidual, diferenciação tecidual e apoptose¹³. A Ang II pode ser ainda degradada pela enzima Aminopeptidase A (ApA) para Angiotensina III (Ang III), que têm sua ação no mesmo receptor AT₁, causando novamente vasoconstrição. Ainda, Ang III pode ser degradada pela enzima Aminopeptidase Neutra (ApN) para Angiotensina IV (Ang IV), que têm seu receptor AT₄ causando aumento no fluxo sanguíneo e natriurese, que é o aumento da excreção de sódio pela urina.

Além disso, a Angiotensina I ainda pode ser degradada pela enzima Endopeptidase Neutra (EPN), formando a Angiotensina 1-7, interagindo no receptor AT₁₋₇ gerando o efeito, assim análogo à Angiotensina I no receptor AT₂. A Angiotensina₁₋₉ é degradada diretamente para Angiotensina₁₋₇ pela EPN agindo também no receptor AT₁₋₇.

A Bradicinina, formada a partir do seu precursor cininogênio pela ação da enzima calicreína, forma pela ação da EPN, da Amino peptidase P (ApP) e da ECA a Bradicinina₁₋₇, que é a molécula de Bradicinina que foi clivada por proteólise entre os resíduos de aminoácidos 7-8, gerando assim a BK₁₋₇ mais o díptido FR presente na porção C-terminal. Como mostrado na Figura 5 a BK₁₋₇ quando degradada não interage mais com o B₂, sítio de ação da BK responsável pela vasodilatação.

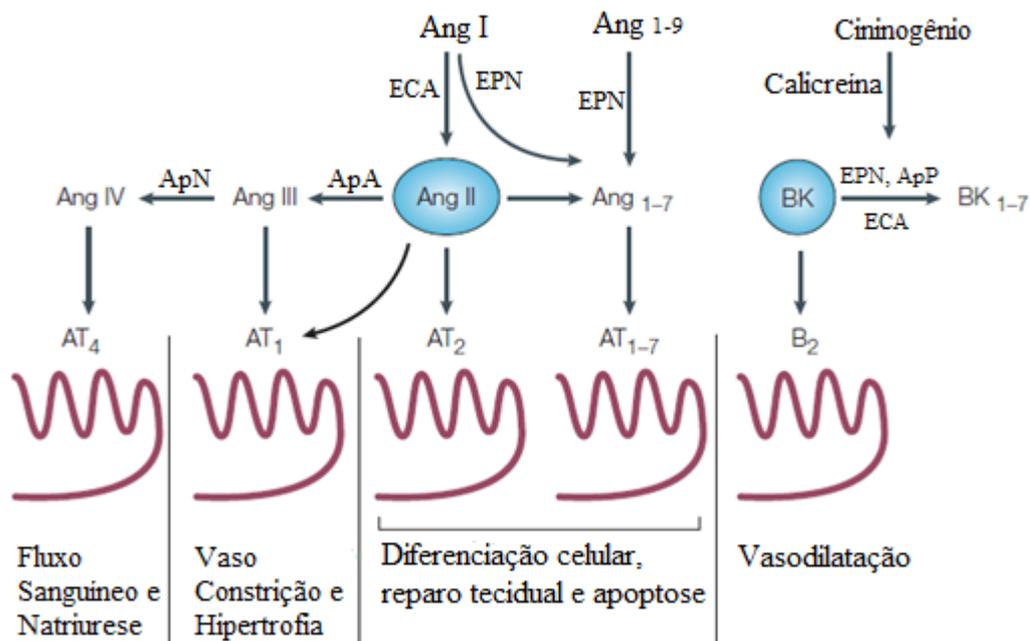


Figura 5: Atividade da Bradicinina e diferentes formas das angiotensinas (figura retirada e modificada da literatura)¹⁰.

A ECA ainda degrada a Bradicinina em mais de um sítio específico gerando os produtos de degradação BK₁₋₅ e BK₁₋₇, ambas inativas na interação com o receptor B2 (Figura 6). Já quando uma Carboxipeptidase realiza uma reação de hidrólise no último aminoácido da Bradicinina, formando a BK₁₋₈ (Des-Arg-Bradicinina), ela passa a ter possibilidade de interação com o receptor B1, receptor que é expresso em condições de injúria ou quando se interage com endotoxinas bacterianas⁷.

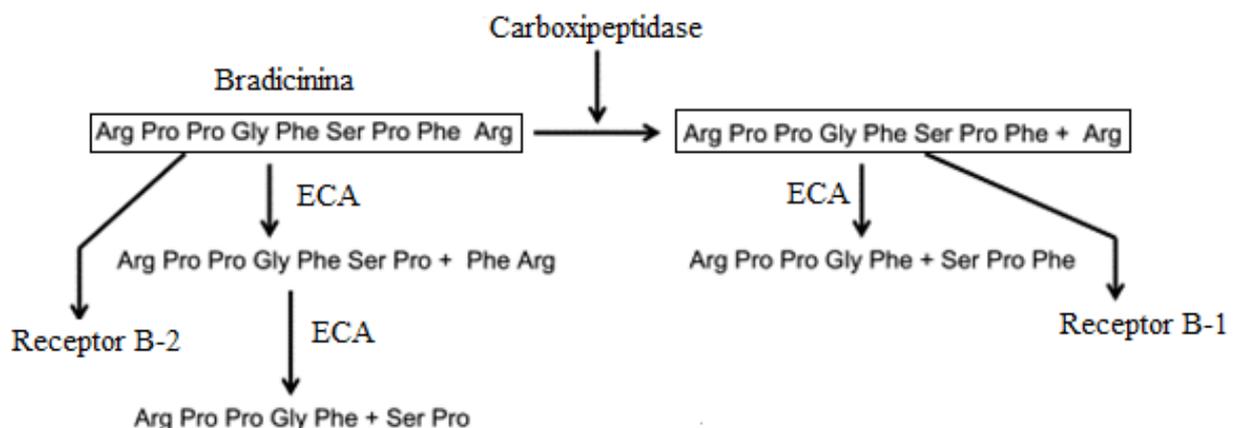


Figura 6: Ligações peptídicas hidrolisadas pela ECA e os dois receptores B2 e B1, que interagem com a BK e a Des-Arg-BK, respectivamente.

Em resumo, pode-se dizer que a ECA é uma importante enzima na degradação de BK, a qual, uma vez hidrolisada, deixa de ter atividade vasodilatadora, e ao mesmo tempo a ECA atua na formação de Ang II, a qual é vasoconstritora. Assim, sua inibição é uma importante forma de se tratar a hipertensão.

O mecanismo de inibição da ECA foi desvendado^{12,14} e, mesmo sem se conhecer até então sua estrutura, novos fármacos foram desenhados para a inibição do seu sítio ativo, o que levou ao desenvolvimento de medicamentos importantes, alguns que são utilizados até os dias atuais. O desenvolvimento de alguns desses fármacos foi feito com base na estrutura do dipeptídeo terminal Pro-Pro de BPPs, justamente pelo fato de ser principalmente ele quem interage com o sítio ativo da ECA^{15,12}. Estudos feitos por Zhang *et al.*⁹ demonstram que moléculas que inibem a ECA podem aumentar a produção de Óxido Nítrico (NO) *in vivo*, que, como comentado, tem um papel importante em muitas funções biológicas, como a vasodilatação e respiração mitocondrial. Um exemplo importante de fármaco para o tratamento da hipertensão mediante inibição de ECA, desenvolvido por David Cushman e Miguel Ondetti, é o Captopril (Capoten®) (figura 7).

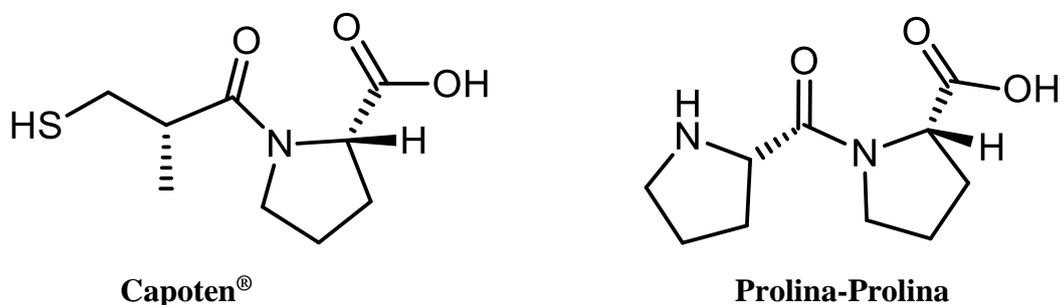


Figura 7: Semelhança estrutural entre a molécula do Capoten® e do dipeptídeo Prolina-Prolina (PP).

Após o Capoten®, outros medicamentos foram desenhados estruturalmente afim de melhorar a interação com o sítio ativo e gerar menos efeitos colaterais, entre eles estão o Lisinopril, Enaprilato e Trandolapril:

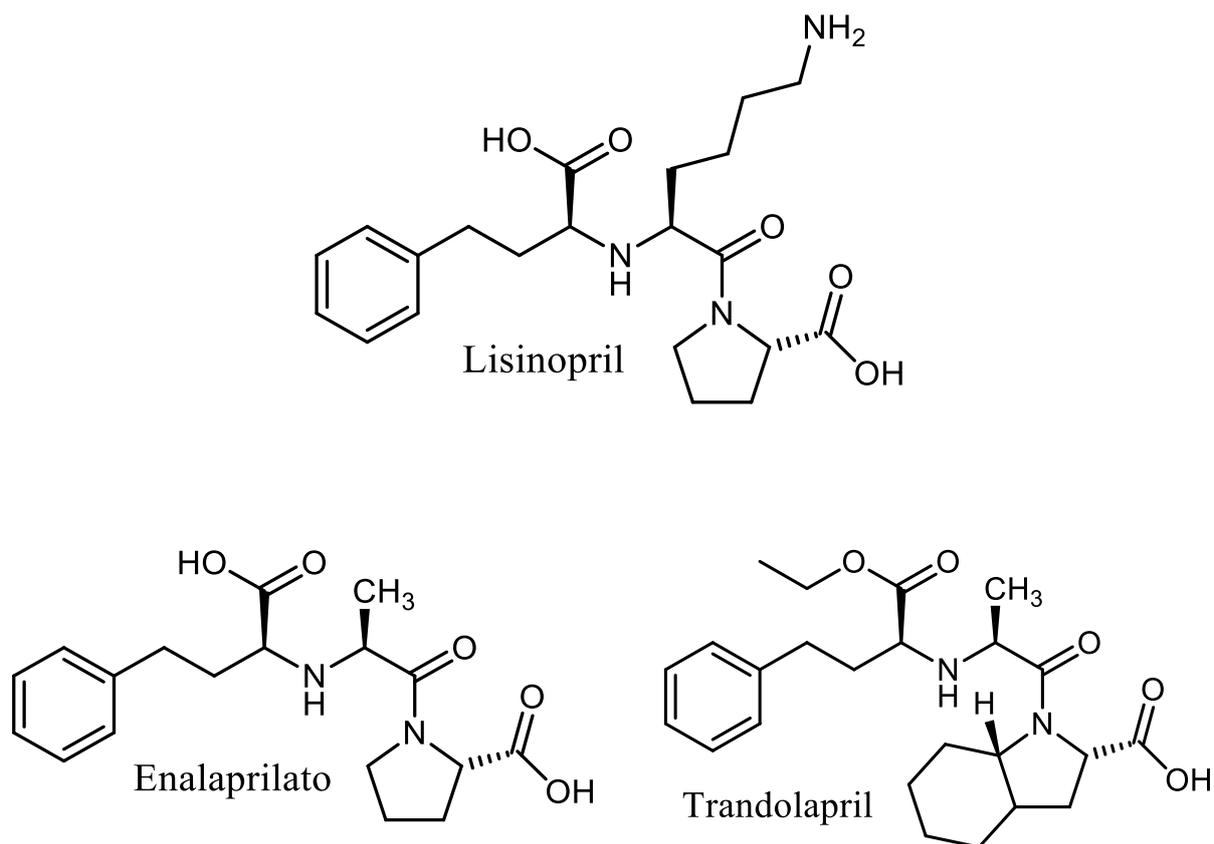


Figura 8: Fármacos comercialmente disponíveis para o tratamento da hipertensão.

A otimização da interação dos inibidores com o sítio ativo da ECA foi possível após cálculos computacionais demonstrados por Wang *et al.* em 2011 e os estudos estruturais feitos com auxílio de Raio-X, gerando um guia de análise teórica de interações que ocorre entre a molécula inibidora e o sítio ativo (Figura 9)^{10,12}. Tais estudos feitos a respeito da estrutura da ECA possibilitaram o surgimento de uma nova geração de moléculas, cada vez mais eficazes na inibição por ter um melhor encaixe no sítio ativo da enzima (Figura 9)^{4,5},

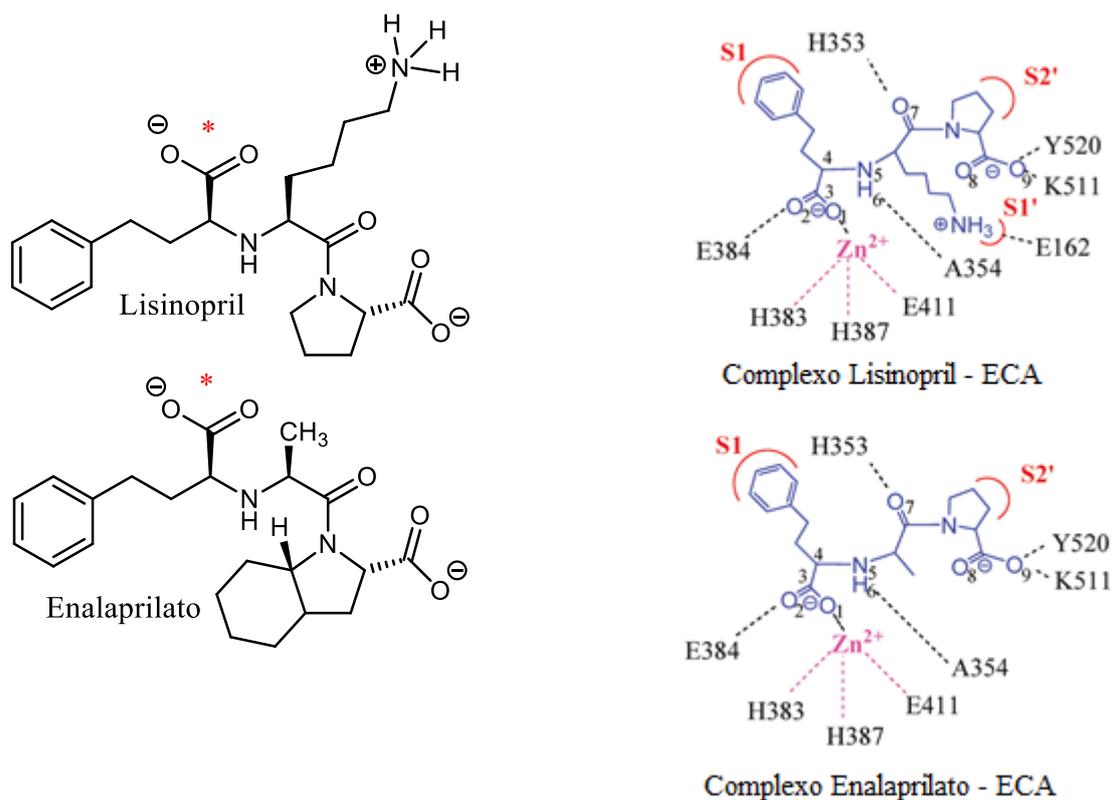


Figura 9: Comparação das estruturas dos medicamentos Lisinopril e Enalaprilato. Sítios da molécula marcadas com asterisco vermelho indicando a parte que interage com o Zn²⁺ presente na enzima e as partes hidrofóbicas dos medicamentos interagindo com as partes hidrofóbicas da enzima¹².

Os medicamentos desenhados a partir da determinação do sítio ativo da enzima interagem em regiões específicas do sítio ativo da ECA. Na Figura 9 podemos observar dois exemplos, Lisinopril e Enalaprilato. Em ambas as moléculas, o íon carboxilato interage com o átomo de Zínco duplamente carregado sendo que este está coordenado com outros três aminoácidos da enzima, as Histidinas 383 e 387 e o Ácido Glutâmico 411. Ambos os medicamentos interagem basicamente nas mesmas regiões do sítio ativo da enzima, porém o Lisinopril tem um sítio de interação a mais, constituída por uma amina protonada primária, que interage com o resíduo de Ácido Glutâmico 162 da enzima. Nos dois, as regiões hidrofóbicas interagem com “bolsões” hidrofóbicos S1 e S2 da enzima. Todas essas interações visam promover um melhor encaixe e assim um candidato com maior afinidade pelo sítio ativo da molécula, fazendo assim com que se prolongue o tempo de vida de BK em meio biológico.

Resumidamente, a ECA é uma enzima muito importante no processo do controle da dilatação vascular. Porém, todo esse avanço no tratamento da hipertensão só foi possível pela descoberta dos peptídeos potencializadores de bradicinina (BPPs), as primeiras moléculas a causar vasodilatação pela inibição da ECA.

1.4 – Peptídeos Potencializadores de Bradicinina (BPPs) e sua ação de inibição à ECA

Dentro de um grande leque de Peptídeos bioativos Ricos em Prolina (PROs)² que são encontrados em muitas espécies animais, como em serpentes, rãs, escorpiões, entre outros, pode-se encontrar os denominados Peptídeos Potencializadores de Bradicinina (BPPs), que são o alvo do presente trabalho. Além de serem ricos em Prolina, os BPPs têm por característica apresentar, na porção C-terminal do peptídeo, a sequência prolina-prolina (PP), que é uma pequena parte do peptídeo que se sabe que interage com o sítio ativo e inibe, por competição, a ECA^{12,10,16}. Além disso, é comum a presença de ácido piroglutâmico na porção N-terminal.¹⁷

Os BPPs foram descobertos por Sérgio Ferreira, que os caracterizou a partir da peçonha da serpente *Bothrops jararaca* na década de 1960¹⁷. Foi visto que após a administração *in vivo* dessas moléculas ocorria uma queda na pressão arterial em ratos e mais tarde foi sugerido que esse efeito de vasodilatação estava correlacionado com a ECA. Em seguida, foi comprovado que a administração dos BPPs promovia um tempo de vida maior às moléculas de BK e inibiam a formação da angiotensina II¹⁸.

Logo se notou o importante efeito observado e seu potencial para o tratamento da hipertensão. David Cushman e Miguel Ondetti desenvolveram uma gama de moléculas tendo como base o BPP Bj-PRO-5a com estrutura primária EKWAP chegando então ao Captopril (Capoten®)¹⁷, primeiro medicamento aprovado pela Food and Drug Administration - FDA para o tratamento da hipertensão. A relação entre BPPs e a ECA discutida nos trabalhos adicionais mostraram que esse peptídeo que estão presentes mais genericamente na peçonha de serpentes do gênero *Bothrops* aumentam o tempo de vida da BK pela inibição por competição do sítio ativo da ECA^{19,12,10,20}, observando-se então uma íntima relação entre BPPs e a BK. No entanto, novos peptídeos estão constantemente sendo caracterizados, utilizando a prospecção por espectrometria de massa (EM). Esses novos peptídeos podem ter atividades diferentes ou mais eficazes dos que os já descobertos, possibilitando a projeção futura de novas moléculas contra a hipertensão.

1.5 – A Espectrometria de Massa aplicada a caracterização de BPPs da peçonha de serpentes do gênero *Bothrops*

A Espectrometria de Massa (EM) é uma técnica analítica que pode ser usada para se determinar quantitativamente e qualitativamente a composição de uma amostra podendo ser utilizada também para se elucidar a estrutura de moléculas. A espectrometria de massa é também muito usada na caracterização de peptídeos, sendo seu uso largamente difundido na caracterização de estruturas primárias de proteínas. Essas caracterizações são realizadas através da medição experimental da massa dos íons em fase gasosa²¹, a partir da razão entre a massa do íon e sua carga (m/z).

O espectrômetro de massa pode ser dividido em fonte de íons, analisador de massa e detector. A fonte de íons ou ionizador garante que as moléculas da amostra que foram injetadas no instrumento sejam ionizadas. O analisador de massa/carga ou m/z é a porção do instrumento que garante a separação dos íons gerados no ionizador. O detector gera os sinais que são um registro dos valores de m/z e a abundância desses íons. O sistema de vácuo garante que o caminho fique livre para a passagem dos íons formados e, por fim, o computador, ou *data system*, que coordena as atividades do equipamento (Figura 10)²¹.

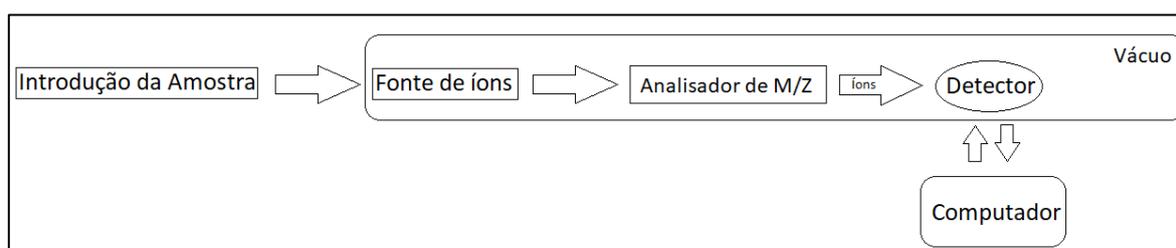


Figura 10: Esquema simplificado de um espectrômetro de massa contendo seus principais componentes, fonte de íons, analisador m/z , detector, sistema de vácuo e o computador.

Existem diferentes tipos de analisadores de massa, dentre eles, TOF, (sigla em inglês para tempo de voo), *orbitrap*, quadrupolos, entre outros. Esses analisadores podem ser usados sozinhos ou em conjunto (híbridos), sendo que neste último, consegue-se somar aspectos positivos gerados a partir de analisadores diferentes. Esses equipamentos permitem a seleção de determinado fragmento para posterior fragmentação (MS/MS)²². Existe ainda o método de IonScan, com o qual é possível “focar” na detecção de um determinado íon de valor m/z

específico, identificando posteriormente seu íon parental, permitindo detectar e selecionar moléculas com um fragmento de mesma massa²².

A análise de peptídeos é normalmente feita em modo positivo. Para a análise e sequenciamento proteico, se faz necessário uma forma branda de ionização para que se preserve a integridade da cadeia polipeptídica no processo de ionização e transferência para a fase gasosa. Para isso são mais largamente utilizados dois tipos de ionização, ESI, sigla em inglês para Ionização por Eletrospray, e ionização por MALDI sigla em inglês para Ionização por Dessorção a Laser Assistida por Matriz²². As moléculas de peptídeos detectadas em modo positivo ainda podem estar associadas a íons de carga positiva, chamados de adutos, que podem ser de Na⁺, K⁺, NH₄⁺ ou H⁺ esses íons associados, geram um acréscimo de massa de 23, 39, 18 ou 1 Daltons, respectivamente. Os íons citados podem estar presentes na solução de análise ou colocados propositalmente junto com a amostra, como o Ácido Fórmico, neste caso afim de se melhorar a ionização²².

1.5.1– Espectrometria de massa aplicada ao sequenciamento de BPPs

Em análise por espectrometria de massa os peptídeos são fragmentados por colisões energéticas, entre as moléculas com alta energia cinética, em um processo denominado CID, sigla em inglês para “dissociação induzida por colisão”. Os fragmentos obtidos dependem da natureza do peptídeo, seu tamanho, a sequência de aminoácidos presentes, a energia utilizada para promover a fragmentação e o estado de carga de cada molécula²³.

Os peptídeos ativados por CID normalmente se fragmentam em íons formando as chamadas séries y e b, com menor presença de fragmentações paralelas de séries ditas complementares^{23, 24}. A diferença entre as massas dos picos das séries é correlacionada com a massa do aminoácido, sendo essa técnica utilizada para o sequenciamento *de novo* de peptídeos através de espectros de MS/MS. Isso se dá através de quebras previsíveis nas ligações peptídicas que já são bem estabelecidas e descritas na literatura^{24, 22, 23}. O sequenciamento de peptídeos pode ser feito tanto da porção N-terminal para a C-terminal a partir da chamada série “y”, quanto o contrário utilizando a série “b”, assim como também nas séries complementares. Sequências mais curtas com aminoácidos e massa bem documentadas e definidas, podem ser utilizadas como banco de dados para o auxílio na prospecção de novos peptídeos desconhecidos²⁵.

Já se tem atualmente na literatura revisões específicas ensinando os métodos de sequenciamento de peptídeos, as fragmentações das séries b e y assim como das séries complementares que ocorrem na espectrometria de massa incluindo seus mecanismos^{26, 23, 24}.

A fragmentação ocorrida por CID é melhor explicada utilizando a teoria dos prótons móveis. Íons H^+ , obtidos pela adição de ácido trifluoracético (TFA) ao material de análise, são captados por átomos com caráter mais básico da estrutura peptídica, normalmente o grupo amino terminal ou em grupos amina de cadeias laterais²³. Em peptídeos monocarregados o próton proveniente do ácido é sequestrado primariamente por esses átomos, promovendo assim uma fragmentação dirigida por carga. Já em peptídeos duplamente carregados (double charge) o próton a mais pode ser sequestrado por átomos com caráter menos básico ou pode migrar para outras partes das molécula, o que induz outras fragmentações ditas remotas²³.

1.5.2 – Mecanismo de Fragmentação de Peptídeos em Espectrometria de Massa

1.5.2.1 – Mecanismo de Formação dos Íons das séries b e y

A formação de íons da série b ocorre mediante a formação de um derivado de oxazolona, que se forma via uma reação de adição-eliminação quando há um ataque nucleofílico de um oxigênio de uma função carbonila do resíduo de aminoácido vizinho a um carbono de carbonila do resíduo de aminoácido seguinte (Figura 11).

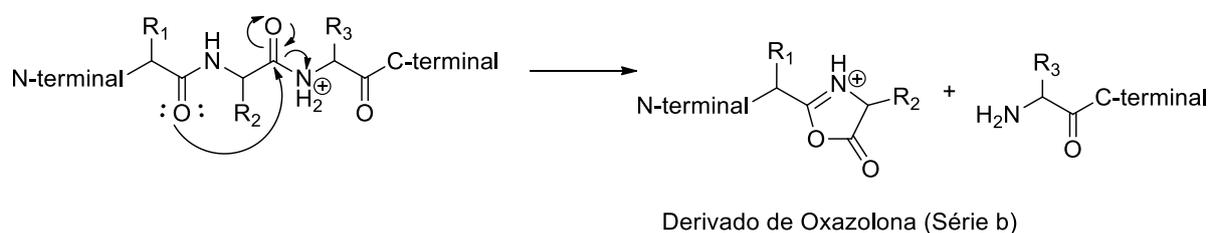


Figura 11: Mecanismo de formação de íons da série b e y, pela formação de um derivado de oxazolona, que ocorre pelo ataque nucleofílico de um oxigênio de carbonila vizinho a um carbono de carbonila ligado a um nitrogênio protonado²³.

Ainda nesse tipo de fragmentação, pode ocorrer o compartilhamento de próton pela formação de um complexo ligado por um próton, formando assim também íons da série y (Figura 12).

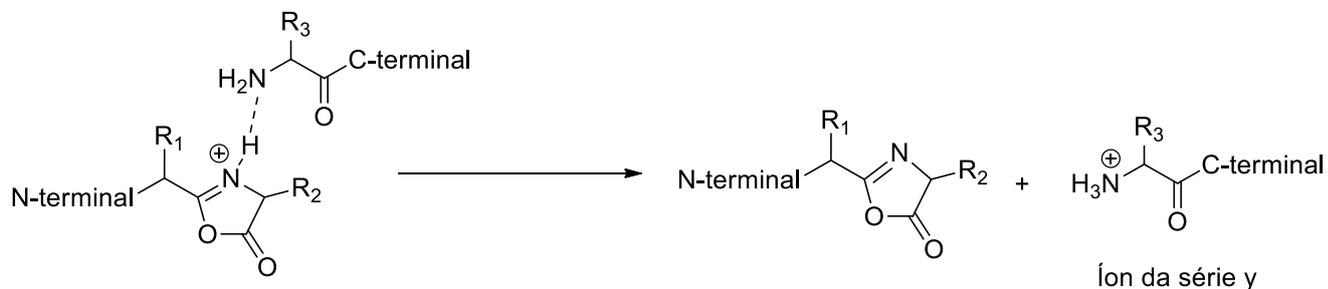


Figura 12: Mecanismo de formação de íons da série y se dá pela transferência de prótons do derivado de oxazolona da série “b” e formação de um íon amônio, referente a série “y”²³.

1.5.2.2 – Mecanismo de Formação de Íons da Série Complementar “a”

A fragmentação que forma os íons da série complementar dita “a” é muito comum e envolve a formação de um íon acílio seguida de uma perda de monóxido de carbono, o que no espectro aparece como um sinal com uma diferença de 28 a partir do íon da série b (Figura 13).

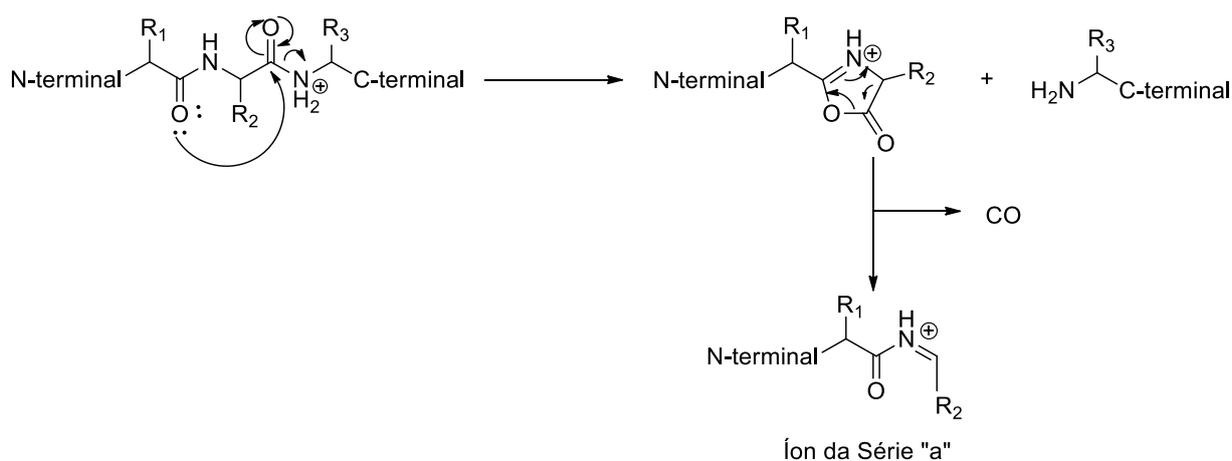


Figura 13: Mecanismo de formação dos íons da série complementar “a” a partir da formação de um íon acílio proveniente da quebra de uma ligação peptídica. Essa série tem uma massa de menos 28 Da a partir do íon da série b que lhe deu origem.

1.5.2.3 – Mecanismo de Formação de Íons da Série Complementar “z”

A fragmentação que dá origem a série complementar z envolve a perda neutra de amônia (NH_3) a partir de um grupo amino protonado, normalmente de uma cadeia lateral, ocorrendo quando o peptídeo tem em sua estrutura resíduos de arginina, glutamina, asparagina ou lisina²³. O mecanismo de perda de amônia desses aminoácidos envolve o ataque nucleofílico de um oxigênio de carbonila, muitas vezes do próprio resíduo, ao carbono que pode ser de carbonila no caso de o aminoácido ser glutamina ou asparagina (Figura 15), de um grupo imínio, no caso de o aminoácido ser arginina (Figura 16), ou de um carbono saturado no caso do aminoácido lisina (Figura 14), ligado a um grupo amino protonado da cadeia lateral, formando em seguida um ciclo e a posterior saída de amônia²³. Essa perda de amônia (NH_3) gera um sinal com m/z de menos 17 Da a partir do sinal da série y que lhe deu origem, porém, na prática nem sempre é visto, porém, não é incomum apresentar um sinal mais intenso quando comparando com o sinal do íon que o deu origem²⁶.

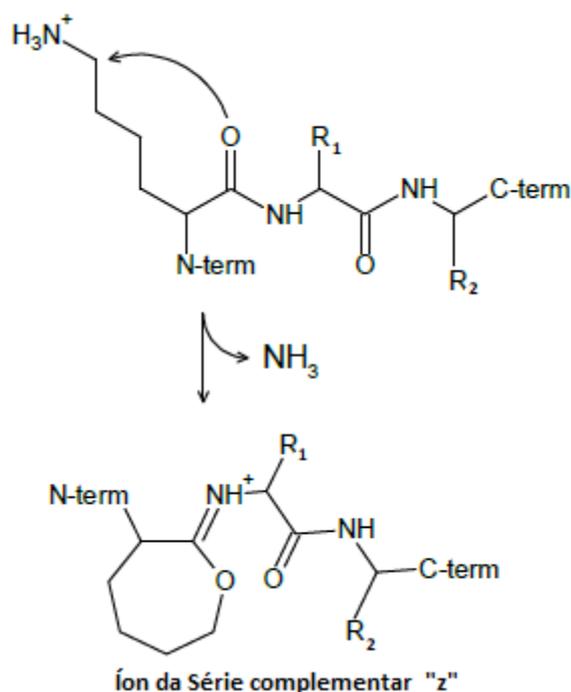


Figura 14: Formação dos íons da série z de um peptídeo contendo lisina, formado a partir da perda neutra de amônia (NH_3) com massa de 17 Da, gerada a partir de um ataque nucleofílico do oxigênio da carbonila, no carbono ligado a um grupo amina protonado, formando um ciclo e a posterior saída de um grupo amônio²³.

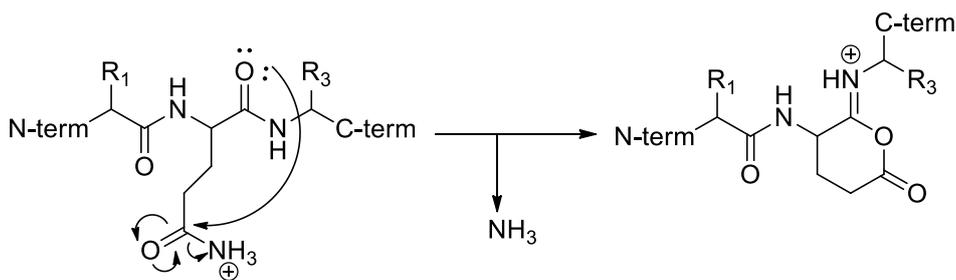


Imagem 15: Mecanismo de perda de amônia (NH_3) a partir de um ataque nucleofílico do oxigênio da carbonila do próprio aminoácido de uma asparagina (Asn) formando um ciclo de seis membros²³.

Um mecanismo parecido ocorre quando se tem um resíduo de arginina internamente no peptídeo, onde ocorre a saída de um grupo amino seguida de um ataque nucleofílico do oxigênio da carbonila e a formação de um ciclo de oito membros (Figura 16).

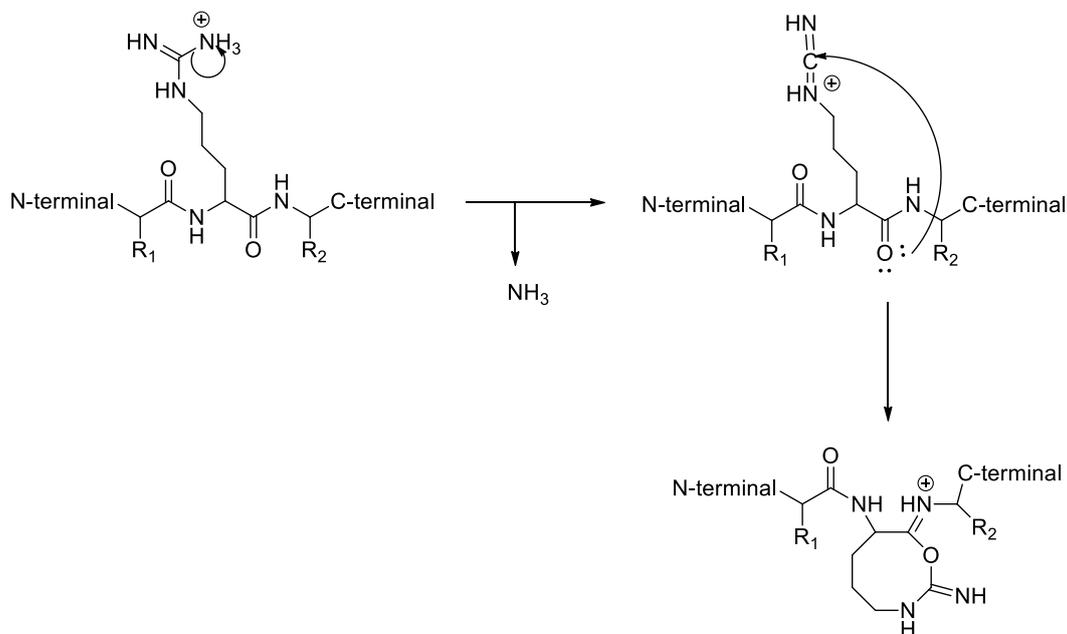


Figura 16: Mecanismo de perda de amônia (NH_3) de um aminoácido arginina (Arg) seguida de um ataque nucleofílico do oxigênio do próprio aminoácido, formando um ciclo de oito membros.

A partir do estudo desses processos de fragmentações é possível elucidar a estrutura primária de peptídeo que é um passo fundamental para inferir a função biológica dos mesmos.

Porém, a prospecção de BPPs provenientes da peçonha de serpentes apresenta desafios. O espectro de MS/MS destes peptídeos comumente apresenta sinais referentes aos

íons da série y e b, que são as principais utilizadas na prospecção dos peptídeos, menos intensos do que os sinais de fragmentações secundárias. Isso pode ocorrer pela presença na estrutura peptídica dos resíduos de aminoácidos prolina, glicina, lisina, arginina e histidina, ocasionando com que os íons da série b se apresentem bem menos intenso que os íons da série y^{26, 27, 27}. Além disso, a presença dos resíduos de aminoácidos prolina e histidina no meio da cadeia peptídica geram duplas fragmentações tornando o reconhecimento da série mais laboriosa. Todos esses fatores tornam desafiador a elucidação da estrutura primária desse tipo de peptídeos.

1.5.3 – Caracterização de BPPs a Partir da Peçonha de Serpentes do Gênero *Bothrops*

A caracterização de BPPs da peçonha de serpentes do gênero *Bothrops*, assim como a prospecção de peptídeos, foi realizada extensivamente por Menin *et al.* (2008) utilizando técnicas de Espectrometria de Massa.

Os autores caracterizaram mais de 40 peptídeos²⁸ com massa abaixo de 2500 Da, dentre os quais, 15 BPPs foram inéditos, de um total de 20 que foram classificados de acordo com o dipeptídeo prolina-prolina (PP) na porção C-terminal.

Visando somente os BPPs relacionados as serpentes do gênero *Bothrops*, infere-se que é comum, além do dipeptídeo PP na porção C-terminal a presença do ácido piroglutâmico (pE) no N-terminal, que é gerado a partir da ciclização do aminoácido glutamina²⁸. Os BPPs de serpentes desse gênero caracterizados no trabalho de Menin *et al.* (2008) estão listados na Tabela 1, assim como outros já descritos na literatura que também estão reunidos no trabalho.

Tabela 1: BPPs encontrados em diferentes espécies de serpentes (retirado de Menin *et al.* ²⁸).

| Sequência de Aminoácidos | Massa (Da) | Espécie(s) Encontrada(s) |
|--------------------------|------------|--|
| pENW | 429.16 | <i>B. moojeni</i> |
| pEKW | 443.21 | <i>B. moojeni</i> |
| pESWP | 449.21 | <i>B. moojeni</i> |
| pEKWA | 514.25 | <i>B. jararaca</i> |
| pENWP | 526.22 | <i>B. moojeni</i> |
| pETNW | 530.21 | <i>B. moojeni</i> |
| pEKWP | 540.27 | <i>B. moojeni</i> |
| pEKWAP | 611.31 | <i>B. insularis; B. jararaca; B. jararacussu</i> |
| pESWPGP | 653.70 | <i>B. jararaca</i> |
| pEWPRP | 665.80 | <i>B. jararaca</i> |
| pEDGPIPP | 705.80 | <i>B. jararaca</i> |
| pENWPHP | 760.33 | <i>B. jararaca</i> |

| | | |
|-----------------|---------|--|
| pENWPRP | 779.37 | <i>B. jararaca</i> |
| pEKWPRP | 793.42 | <i>B. moojeni</i> |
| pEKWPGPK | 822.44 | <i>B. moojeni</i> |
| pEWPRPTP | 863.43 | <i>B. jararaca</i> |
| pEKWPGPKVP | 1018.56 | <i>B. moojeni</i> |
| pEGGAGWPPIPP | 1058.53 | <i>B. jararaca</i> |
| pESAPGNEAIPP | 1062.51 | <i>B. jararaca</i> |
| pEGRAPGPPIPP | 1068.57 | <i>B. jararaca</i> |
| pESWPGPNIPP | 1074.51 | <i>B. jararaca; B. moojeni</i> |
| pEWPRPQIPP | 1100.30 | <i>B. jararaca; B. neuwiedi</i> |
| pEKWPPGKVPP | 1115.61 | <i>B. moojeni</i> |
| pEGGPPRPQIPP | 1125.59 | <i>B. insularis</i> |
| pEKWPQGPIPP | 1129.72 | <i>B. moojeni</i> |
| pEKWPHEHPP | 1137.53 | <i>B. moojeni</i> |
| pEKWALPKVPP | 1145.66 | <i>B. moojeni</i> |
| pEGRAPHPPIPP | 1148.60 | <i>B. jararaca</i> |
| pEWGQHPNIPP | 1155.54 | <i>B. insularis</i> |
| pEARPPHPPIPP | 1188.65 | <i>B. jararaca; B. jararacuçu</i> |
| pENWPHPQIPP | 1195.59 | <i>B. insularis; B. jararaca; B. jararacussu</i> |
| pENWPRPQIPP | 1214.40 | <i>B. jararaca</i> |
| pEWDPSSDIPP | 1220.54 | <i>B. auternatus</i> |
| pENWPRPGPEIP | 1272.62 | <i>B. moojeni</i> |
| pELGPPRPQIPP | 1278.72 | <i>B. insularis</i> |
| pEWGRPPGPPIPP | 1280.66 | <i>B. jararaca</i> |
| pEKWHRNPEIP | 1286.65 | <i>B. moojeni</i> |
| pEGGLPRPGPEIPP | 1297.50 | <i>B. jararaca</i> |
| pEWPRPTPQIPP | 1298.50 | <i>B. jararaca</i> |
| pEWPRPTPQIPP | 1298.85 | <i>B. neuwiedi</i> |
| pEGGWPRPPEIPP | 1369.68 | <i>B. insularis; B. jararaca; B. jararacuçu; B. neuwiedi</i> |
| pENWPRPGPEIPP | 1369.68 | <i>B. moojeni</i> |
| pEKWPRPGPEIPP | 1383.73 | <i>B. moojeni</i> |
| pEGWAWPRPQIPP | 1415.60 | <i>B. jararaca</i> |
| pEWAQWPRPQIPP | 1485.80 | <i>B. jararaca</i> |
| pEWAQWPRPTPQIPP | 1683.85 | <i>B. jararaca</i> |

1.6 – Interação de BPPs com outras enzimas que não a ECA

Foi sugerido por Guerreiro *et al.*²⁹ (2009) que os BPPs podem ter uma ação alternativa à inibição do sítio ativo da ECA. Esse mecanismo alternativo pôde ser comprovado realizando dois experimentos, um *in vitro* e um *in vivo*. Em experimento *in vitro* utilizando BPP (Bj-BPP-10c), com estrutura em letra (ENWPHPQIPP) e o medicamento inibidor de ECA, observou-se que, para se obter o mesmo efeito de inibição, foi preciso uma

concentração de BPP na faixa de micromolares contra uma concentração do medicamento em torno dos nanomolares. Porém, em experimento *in vivo*, o BPP (Bj-BPP-10c) teve ação de inibição na mesma faixa de concentração do medicamento, o que nos sugere a existência de uma forma alternativa de ação de BPPs²⁹.

Um dos mecanismos propostos por Guerreiro *et al.*²⁹, utilizando BPP com origem na *Bothrops jararaca*, foi a ativação da enzima Argininosuccinato Sintase (AsS), uma proteína tetramérica composta por dois dímeros idênticos em sua estrutura geral, semelhante à estrutura da AsS bacteriana²⁹. Porém, não foi sugerido com mais detalhes onde poderia ocorrer essa ligação e de que forma ocorreria a ativação da enzima, necessitando de estudos complementares.

Os experimentos feitos por Guerreiro *et al.*²⁹ mostraram o aumento de L-Arginina com posterior aumento da produção de Óxido Nítrico (NO) provocado pelo BPP, em um procedimento independente da inibição da ECA, como pode ser demonstrado na Figura 17 e 18:

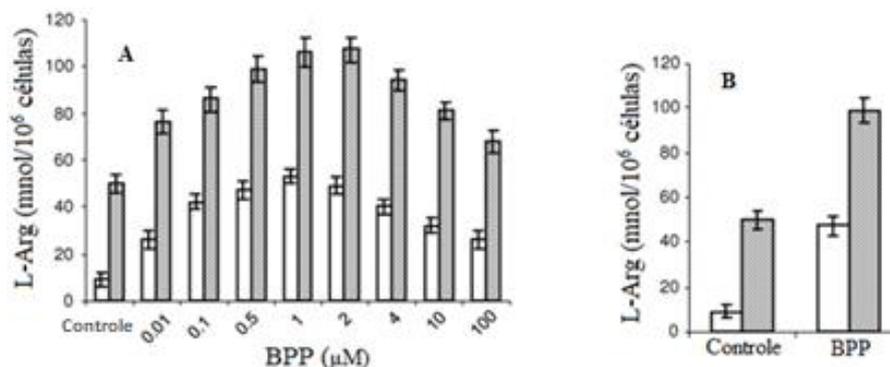


Figura 17: (A) Aumento de produção de L-Arginina em células induzidas por concentrações diferentes de BPP. (B) Aumento na produção de L-Arginina em células provocado pelo BPP em comparação a células sem BPP (adaptada)²⁹. As barras abertas são o meio extracelular e as escuras o meio intracelular.

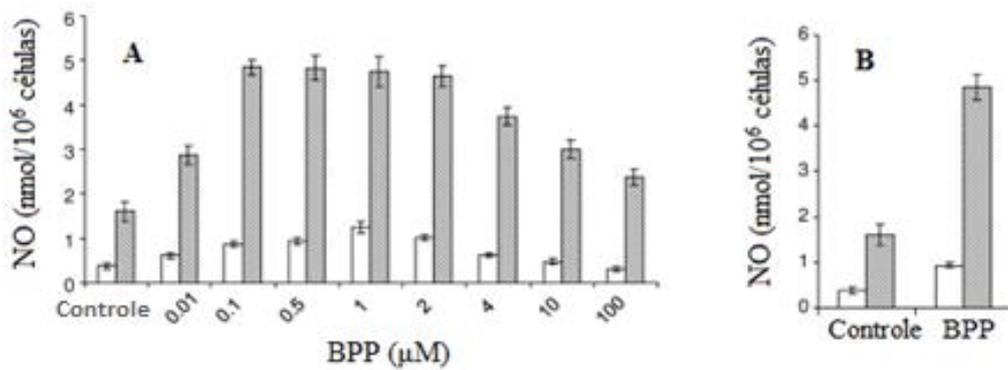


Figura 18: (A) Aumento de produção de NO em células induzidas por concentrações diferentes de BPP. (B) Aumento na produção de NO em células provocado pelo BPP em comparação a células sem BPP (adaptada)²⁹. As barras abertas são o meio extracelular e as escuras o meio intracelular.

Os experimentos realizados demonstraram que a inibição da ECA é apenas uma das formas pelas quais os BPP atuam em meio biológico, de maneira que a enzima AsS desempenha papel fundamental nesse novo mecanismo proposto. A enzima AsS desempenha o importante papel na conversão do aminoácido citrulina em argininosuccinato, precursor da ureia, no ciclo da ureia (Figura 19), gerando posteriormente o aminoácido L-arginina onde, em outro ciclo (Figura 20), pela ação de outra enzima, chamada Óxido nítrico Sintase, em óxido nítrico (NO)^{29,2} como demonstrado na Figuras 15.

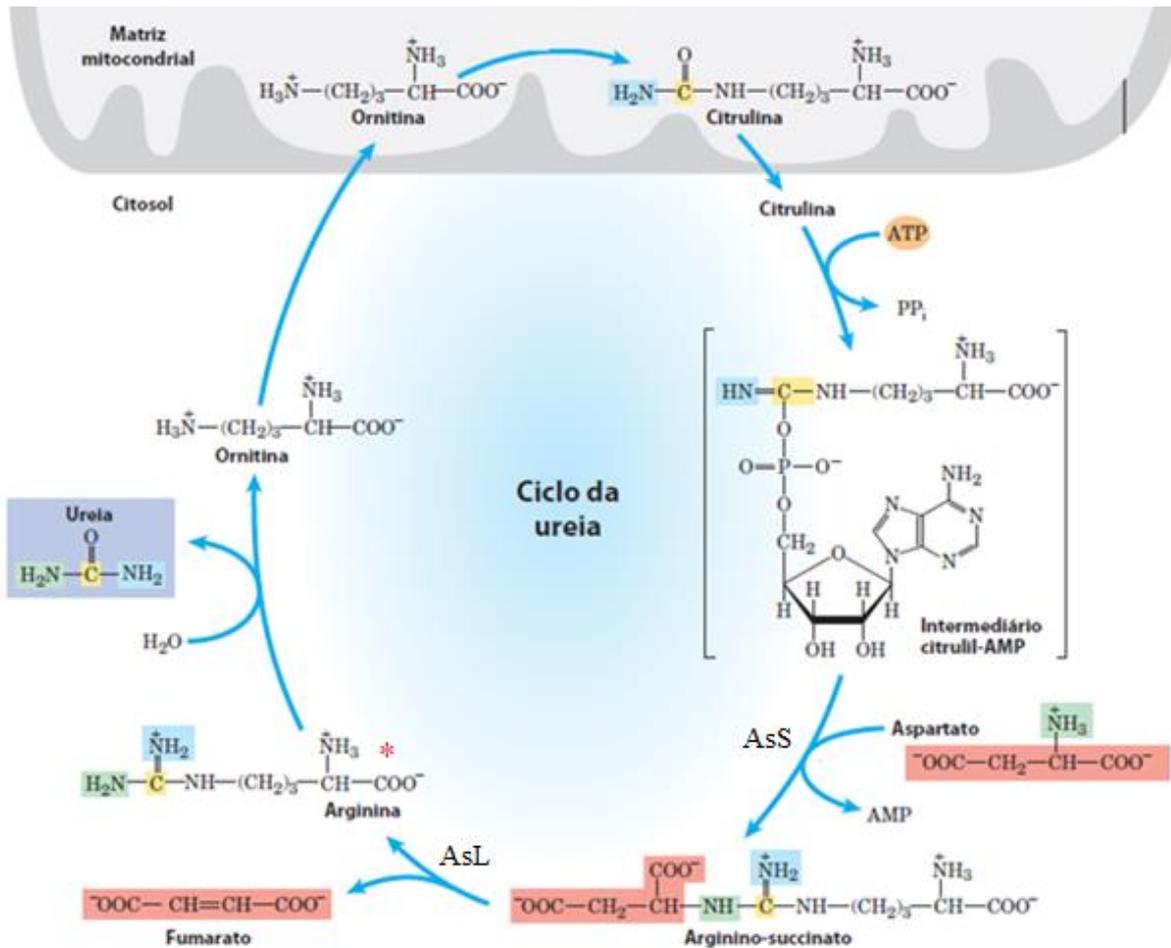


Figura 19: Esquema representativo do ciclo da ureia (adaptada)³⁰. A Arginina marcada com asterisco está correlacionada com a produção de NO, pela Óxido Nítrico Sintase.

A figura 13 demonstrando o esquema representativo do ciclo da uréia, no qual em uma das etapas ocorre a conversão de aspartato e citrulina em argininosuccinato, precursor da L- Arginina (Arg). A enzima que catalisa essa conversão é a Argininosuccinato Sintase (AsS)^{29,31}. Após a formação do argininosuccinato, este é convertido em L-Arginina e fumarato pela enzima argininosuccinato liase. A L-Arginina (Arg) sofre a ação da enzima Óxido Nítrico Sintase formando citrulina que pode ser empregada novamente como substrato na etapa inicial do ciclo e Óxido nítrico (Figura 20 e 21).

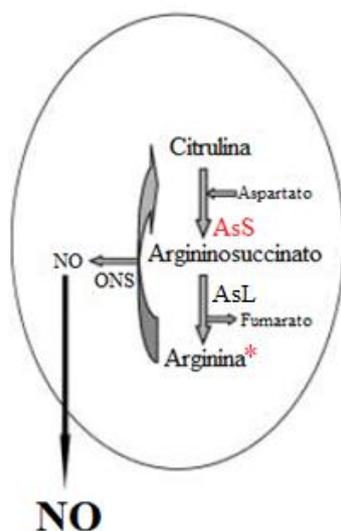


Figura 20: Ação de catálise da AsS para produção de mais L-Arginina, precedente da produção de NO pela Óxido Nítrico Sintase (ONS) (Adaptada)³¹

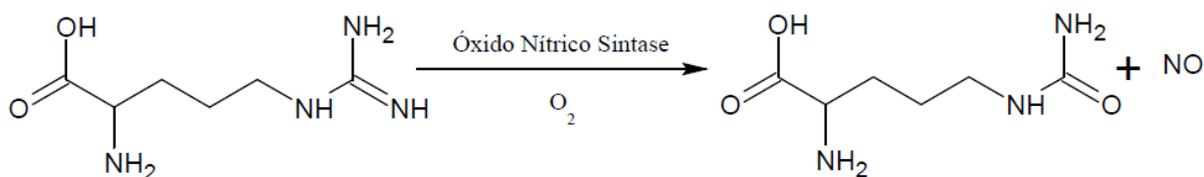


Figura 21: Esquema de reação para a conversão da L-Arginina citrulina com produção de Oxido Nítrico.

O óxido nítrico se difunde rapidamente no tecido endotelial³² causando o efeito de vasodilatação por ativar a enzima Guanilato Sintase (GCa), que então catalisa a saída de dois grupamentos fosfato da molécula Guanosina Trifosfato (GTP), formando a Guanosina Monofosfato Cíclica (GMPC). O aumento da concentração dessa molécula gera uma relaxamento da célula por diminuir a entrada de Ca^{2+} na célula, seguido do sequestro do cátion já presente para o retículo endoplasmático e a inibição de sua saída^{33,34}.

Segundo a literatura²⁹, a ligação BPP-AsS pode ocorrer em algum dos monômeros ou dímeros da estrutura da enzima (AsS) promovendo sua ativação, agindo assim como um possível ativador alostérico. Essa ligação, como sugerido, promove uma mudança conformacional da AsS facilitando sua interação com a ATP. No entanto, a elucidação de como a interação do BPP na AsS promove sua ativação ainda requer estudos adicionais, embora seja evidente que essa interação aumenta o poder catalítico da AsS².

Em experimento feito por Guerreiro *et al.*²⁹ (2009), para confirmar a relação entre a enzima AsS e a ativação por BPP, foi utilizado MDLA, sigla em inglês para Ácido Dimetil L-Aspártico, que é um inibidor específico da AsS que, no experimento, aboliu completamente a ativação que os BPP geram na AsS²⁹, e o resultado foi uma menor produção de NO (Figura 22).

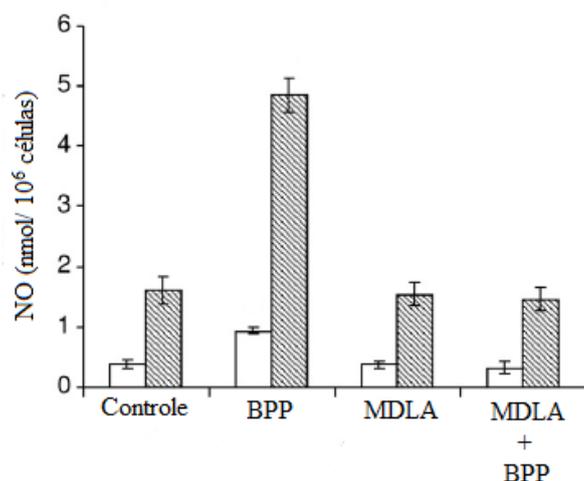


Figura 22: Diminuição abrupta causada pela inibição da atuação do BPP na AsS pelo Ácido Dimetil L-Arspártico. As barras abertas são o meio extracelular e as escuras o meio intracelular (Adaptada)²⁶.

Todos esses dados sugerem que um mecanismo alternativo à inibição da ECA é plausível e que possivelmente os dois mecanismos ocorrem simultaneamente¹⁶.

Como dito, a interação do BPP com a AsS, resultando no aumento de seu poder catalítico, provoca um aumento dos níveis de L-Arginina e, conseqüentemente, o aumento na produção de Óxido Nítrico (NO) em células endoteliais, culminando, assim, uma ação vaso dilatadora ao relaxar a musculatura lisa. Com base nos testes feitos²⁹, pode-se sugerir que a AsS pode ser um novo alvo de ação terapêutica.

A confirmação feita no trabalho de Guerreiro *et al.*²⁹ de que BPPs tem mais de um mecanismo de ação renova o interesse na busca das estruturas de BPPs com efeito global mais pronunciado na vasodilatação, partindo não só de sua atividade inibitória em ECA, mas também de sítios alternativos. É importante reconhecer então quais são os aminoácidos relevantes à interação dos BPPs com AsS e, assim, contribuir no desenho de fármacos mais eficientes do que o próprio captopril.

Porém, para os testes *in vivo* é necessária a síntese desse tipo de peptídeos, pois a extração deles da peçonha é muito laboriosa e são obtidas quantidades que inviabilizam os testes. O método de síntese mais utilizado atualmente para peptídeos, é a síntese em fase sólida³⁵.

1.7 – Desafios na síntese de Peptídeos Potencializadores de Bradicinina

O método de Síntese de Peptídeos em Fase Sólida (do inglês, SPPS) já está bem estabelecido e fundamentado³⁶. Esse método utiliza resinas que são suporte poliméricos insolúveis e contam com linkers que ligam a fase sólida e o primeiro aminoácido do peptídeo, no qual os próximos aminoácidos são acoplados na sequência desejada. O processo de síntese conta com diferentes resinas, em que, para se obter um Ácido Carboxílico na porção “C” terminal ao final da síntese utiliza-se comumente a resina HMBA e a de Wang, e para se obter uma Amida na porção “C” terminal ao final da síntese é muito utilizada a resina Rink.

Diferentes reagentes de acoplamento podem ser utilizados, dependendo do tipo de resina, que podem ser OXIMA[®]/DIC ou HATU ou HBTU/DIPEA. As cadeias laterais dos aminoácidos são protegidas com grupos protetores variados, enquanto o Nitrogênio (N), do esqueleto peptídico é protegido com o grupo Fmoc. Dessa maneira, a cada acoplamento se faz necessária a remoção do grupo Fmoc, que é realizada utilizando a amina secundária 4-metil Piperidina. A mistura de clivagem do peptídeo da resina depende dos aminoácidos presentes no peptídeo³⁵.

O processo de síntese de peptídeos contendo Prolina-Prolina (PP) na porção C-terminal tem algumas peculiaridades. Quando se têm duas Prolinas acopladas em sequência, a remoção do grupo Fmoc da segunda prolina promove uma rápida³⁷ ciclização, que envolve os dois primeiros aminoácidos Pro-Pro, formando dicetopiperazina. Isso ocorre quando o nitrogênio da segunda prolina realiza um ataque nucleofílico à carbonila do primeiro aminoácido, fazendo com que os dois se clivem da resina e os próximos acoplamentos não ocorram na ordem correta³⁸.

Para resolver esse problema, a resina 2-Cloro-Trityl pode ser utilizada, cuja primeira prolina está ligada na resina por um Linker que é um carbono terciário ligado a três grupos Fenila. O efeito estérico causado pelos grupos Fenila impede que a segunda prolina tenha acesso a carbonila do primeiro resíduo de aminoácido. Assim, a ciclização e a formação da dicetopiperazina não ocorrem, permitindo que os próximos aminoácidos acoplem normalmente³⁹.

1.8 – Caracterização taxonômica de serpentes por meio da determinação dos peptídeos presentes na peçonha utilizando espectrometria de massa

O perfil de componentes moleculares que cada espécie de serpente traz em sua peçonha, pode ser utilizada como uma impressão digital⁴¹. Embora exista uma certa variabilidade na composição de peptídeos de uma mesma espécie de serpente, não é comum que ela seja muito grande. Essa variabilidade ocorre quando determinados peptídeos são mais expressos do que outros, o que depende de muitos fatores, como a região geográfica, disponibilidade de alimentos ou mudanças ambientais⁴⁰ e essa variabilidade pode gerar dificuldades na identificação da espécie a qual o animal pertence.

Tendo em vista essas observações, pode-se fazer uma análise taxonômica com base na peçonha de cada indivíduo¹⁵. A técnica de Espectrometria de Massa tem sido utilizada para a identificação taxonômica a partir da peçonha de outros animais como, por exemplo, escorpiões e aranhas⁴⁰. A correlação entre os componentes do veneno e a espécie que a produz é tamanha que já é possível a tipificação do veneno para análises básicas, obtendo um rápido diagnóstico clínico de identificação da serpente e utilização do correto soro antiofídico⁴⁰. Tradicionalmente, estudos taxonômicos são realizados a partir da comparação de sequências de DNA e/ou aspectos morfológicos. Em contrapartida, o emprego de técnicas de espectrometria de massa se mostrou muito vantajoso na triagem de serpentes do gênero *Bothrops*, tendo como princípio a análise do perfil de peptídeos presentes na peçonha dos indivíduos⁴⁰. A partir de tal estratégia é possível sugerir a espécie a qual uma determinada serpente pertence.

2 Objetivos

2.1 Objetivos gerais

Extração, isolamento, sequenciamento e síntese de peptídeos do tipo BPP da Peçonha da *Bothrops sp.*. Além disso, dado que o espécime de *Bothrops* coletado é possivelmente uma nova espécie proveniente do Delta do Parnaíba, objetiva-se também a comparação de BPPs descritos na literatura com os BPPs encontrados, a fim de fornecer novos subsídios

para a classificação do organismo. Ensaios farmacológicos *ex vivo* em anéis de aorta de ratos para avaliação do potencial vasorelaxante dos peptídeos sintetizados.

2.2 Objetivos Específicos

1. Caracterização dos peptídeos da peçonha da *Bothrops sp.* por Espectrometria de Massa.
2. Síntese dos BPPs em fase sólida.
3. Purificação e caracterização dos produtos de síntese.
4. Ensaios farmacológicos preliminares para avaliação de potencial vasorelaxante.
5. Análise taxonômica do espécime coletado com base nos BPPs sequenciados.

3 Métodos

3.1 - *Bothrops sp.*

Dois exemplares de serpentes do gênero *Bothrops* foram encontrados na região do Delta do Parnaíba - Piauí, especificamente na Ilha das Cobras (2.8371° S, 41.8203° W), vizinha a Ilha Grande do Piauí que é a maior ilha do Delta, Município do Maranhão, MA, Nordeste brasileiro. Os exemplares capturados sob licença IBAMA SISBIO 61838-1 durante as expedições do projeto PVE/CNPq/MCTI de outubro de 2017 foram levados para a Coleção Zoológica do Delta do Parnaíba, CZDP/UFPI, onde foi extraída a peçonha (Figura 24) e levadas para liofilização imediata em concentrador de amostra localizado no Núcleo de Pesquisa em Biodiversidade e Biotecnologia, Biotec/UFPI Campus de Parnaíba.

Devido a dificuldades de identificação taxonômica para o gênero, o material após sacrifício e fixação apropriada foi enviado para a Coleção Herpetologica da Universidade de Brasília para a responsabilidade do Dr. Guarino Coli, CHUNB/UnB, onde sua equipe finalizou a identificação e registraram sob número de tombo 76591 e 76592.



Figura 23: *Borthrops sp.* capturadas.



Figura 24: Extração de veneno realizada no CZDP, UFPI.



Figura 25: Indivíduo adulto de *Bothrops sp.* na Ilha das Cobras, Delta do Parnaíba - Piauí.
Foto. Peter Eaton.

3.2- Preparo do extrato bruto de *Bothrops sp.* para fracionamento

3.2.1 – Pré-fracionamento

O extrato bruto obtido da peçonha da *Bothrops sp.* foi solubilizado em água e submetido a um pré-fracionamento para a separação dos peptídeos de baixa massa molecular. O material solubilizado em 1 mL de água Milli-Q foi carregado em um filtro Amicon 10 KDa de 0,5 mL e submetido a centrifugação de 15000 rpm por 15 minutos, sendo a fração filtrada, contendo moléculas com massa inferior a 10kDa, e a fração retida, de massa superior a 10kDa, submetidas separadamente a secagem em um CentriVap (Labconco 7810011). As amostras foram posteriormente armazenadas a - 20° C no laboratório de morfologia da Faculdade de Medicina - UnB.

3.2.2– Cromatografia Líquida da fração menor de 10 KDa

As amostras foram separadas usando um sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - CLAE (Shimadzu®) para isolamento de moléculas do Laboratório de Anatomia Molecular de nanomedicina da área de morfologia da Faculdade de Medicina - FS. O equipamento CLAE-DAD é composto por uma unidade de degaseificação (DGU-20A5R), um sistema binário de bombeamento de solventes (LC-20AR), um detector de arranjo de fotodiodo (PDA, SPD-M20A), um auto-injetor (SIL- 10AF) e um módulo controlador (CBM-20A). As amostras foram diluídas em água na concentração de 12,50 µg/mL e injetadas (400 µL) para separação em coluna analítica RP C18 (4.6×250 mm, 5 µm, Shim-pack VP-ODS). A fase móvel foi composta por Água + ácido trifluoracético 0,1% (v/v, eluente A) e Acetonitrila + ácido trifluoracético 0,1% (v/v eluente B), com um gradiente de 0% Acetonitrila até 5 minutos, de 0% a 30% em 60 minutos, de 30% a 40% em 10 minutos e de 40% a 95% em 5 minutos permanecendo em 95% de acetonitrila até o final da corrida, que teve um tempo total de 90 minutos. A detecção foi realizada na faixa de comprimento de onda de 200-300 nm, com monitoramento a 216 e a 280 nm.

3.3 – Análise por MALDI-TOF da fração da peçonha menor que 10 KDa

Após a etapa de fracionamento, na Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, foi feita a secagem das frações utilizando um SpeedVac (Labconco 7810011). Posteriormente, foi feita

a ressuspensão em acetonitrila dos componentes de cada fração, as quais foram co-precipitadas em uma placa de MALDI utilizando a matriz de ionização ácido α -ciano 4-hidroxicinâmico (sigla em inglês HCCA) a 10mg/mL em 50% (v/v) de acetonitrila e 0,3% (v/v) de TFA. Foram então adquiridos os espectros de MS e de MS/MS pela fragmentação dos íons precursores, por LIFT, presentes em cada fração utilizando MALDI-TOF Ultraflex III Bruker Daltonic no modo refletor, positivo, com range de 600 a 1500, feitas no Laboratório de Espectrometria de Massa da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Foi feita a calibração do aparelho com calibrantes externos (Peptide Calibration Standart, Bruker Daltonics) e a análise de cada peptídeo foi feita utilizando o programa FlexAnalysis (Bruker Daltonics) tendo sido elucidado a estrutura primária de alguns BPPs.

3.4 – LC-MS/MS da fração menor de 10 KDa

Foi realizada cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa da fração <10kDa. Os espectros foram adquiridos em um Q-ToF 5600+ (Sciex, Ontário, Canadá) por análise de injeção de fluxo utilizando um cromatógrafo líquido (Eksigent UltraLC 100, Sciex) do Instituto de Química - UnB. Uma fonte de íons DuoSpray (ESI) foi usada e os espectros de MS e MS/MS foram adquiridos em modo positivo. Foram utilizados o modo IDA de aquisição fragmentando íons de 400 a 1250 Da com intensidade superior a 1000 cps e moléculas de 1 a 4 cargas positivas. A coluna utilizada foi da marca KINETEX® (phenomenex®) de 2,6 μ m, C-18 100 Å com dimensão de 50 x 2,1 mm acomodada em um forno mantido a 40°C.

Para a cromatografia foi utilizado para a fase móvel Água (Fração A) e Metanol (Fração B) ambas acidificadas com 0,1% de TFA e um fluxo de 0,4ml/minuto. A corrida teve um tempo total de 22 minutos com um gradiente de 0-2 minutos com 5% fração B, 2-12 minutos com concentração de 5-40% da fração B, 12-16 minutos com concentração de 40 a 95%, de 16-17 minutos uma diminuição na concentração de B de 95% para 5% mantendo essa concentração até o final da corrida.

3.5 – Sequenciamento *de novo* de BPPs da peçonha da *Bothrops sp.*

Espectros de MS/MS obtidos pela análise em Espectrômetro de Massa Q-TOF (LC-MS) e por Espectrometria de Massa MALDI-TOF foram avaliados manualmente para a determinação da estrutura primária das moléculas. Espectros contendo íon de massa $[M+H]^+$

213.13 Da, sinal ao dipeptídeo Prolina – Prolina (PP) presente na porção c-terminal, característicos de BPPs, foram selecionados para avaliação e sequenciamento.

Os dados foram analisados e os peptídeos selecionados e sequenciados manualmente. Para isso foram usados os softwares PeakView v2.1, mMass, PepSeq e Bruker Daltonics flexAnalysis®.

3.6 - Síntese de peptídeos em fase sólida

Os peptídeos selecionados foram sintetizados utilizando-se a técnica de Síntese de Peptídeos em Fase Sólida, do Inglês - Solid Phase Peptide Synthesis – SPPS³⁵.

3.6.1 – Resinas utilizadas na síntese de peptídeos em fase sólida

Entre as resinas, as de Wang, Rink e HMBA são as mais comumente usadas. O que as diferencia é o tipo de Linker que liga o primeiro resíduo de aminoácido do peptídeo à fase sólida. A resina de Rink, em específico, contém um nitrogênio que irá fazer a reação de adição à carbonila no Ácido Carboxílico do primeiro resíduo, formando então um novo grupo funcional: uma Amida Secundária. Após a clivagem da Resina, será formada uma Amida Primária.

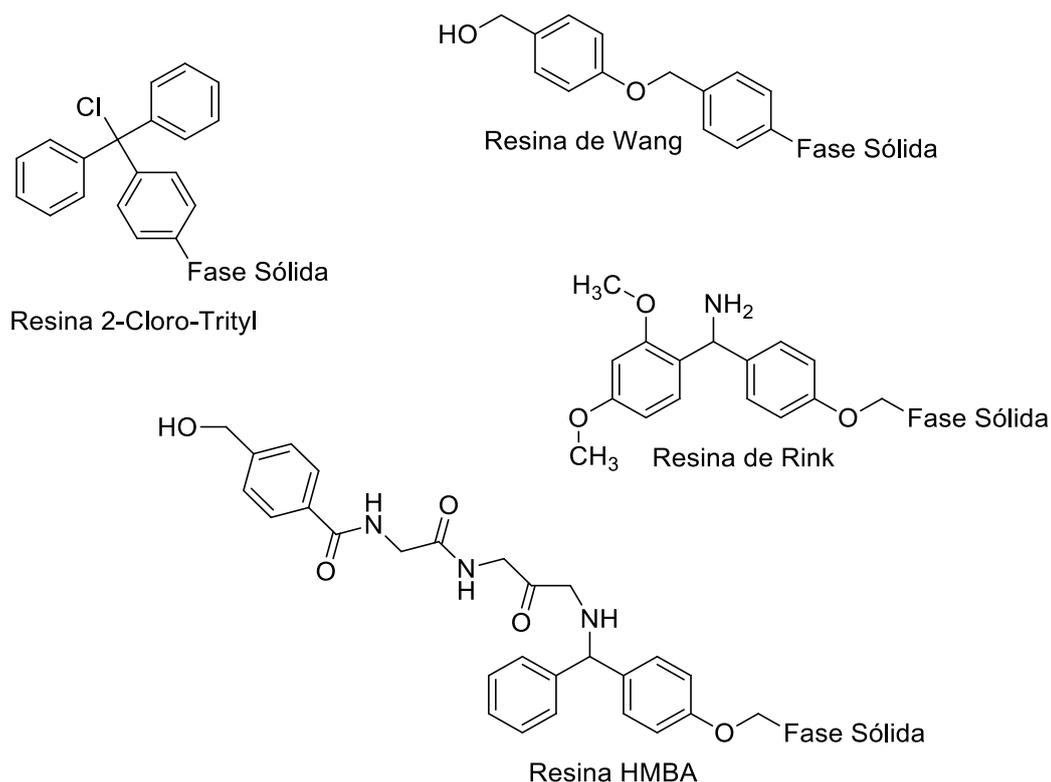


Figura 26: Diferentes tipos de resina empregados na síntese de peptídeos.

Entre os outros tipos de resina, o que se observa em comum é o Grupo Funcional Álcool, que faz com que, após o acoplamento do primeiro aminoácido, forme então um Grupo Funcional Éster e, após a clivagem da Resina, se tenha um Ácido Carboxílico no “C” terminal. Algumas dessas Resinas podem ser compradas já com o primeiro Aminoácido da sequência do peptídeo que será sintetizado acoplado à resina. O processo de clivagem do peptídeo da Resina ocorre através de um “coquetel” de clivagem, que será tratado mais profundamente adiante.

3.6.2 – Remoção do grupo protetor Fmoc

O grupo protetor 9-fluorenilmetil carbonila (Fmoc) é utilizado para evitar que o grupo amino (-NH₂) do aminoácido reaja com outras moléculas, gerando assim subprodutos indesejados. Na síntese de peptídeos em fase sólida é utilizado aminoácidos protegidos com o grupo Fmoc, para se fazer a reação de acoplamento, antes é necessário a remoção desse grupo protetor. Para a remoção do grupo protetor Fmoc que já vem ligado a cada Aminoácido, utiliza-se uma solução de 4-Metil Piperidina 20% em DMF (Figura 27) duas vezes, durante

15 minutos, com o objetivo de remoção do excesso de 4-Metil Piperidina, garantindo, assim, um bom rendimento na reação de desproteção.

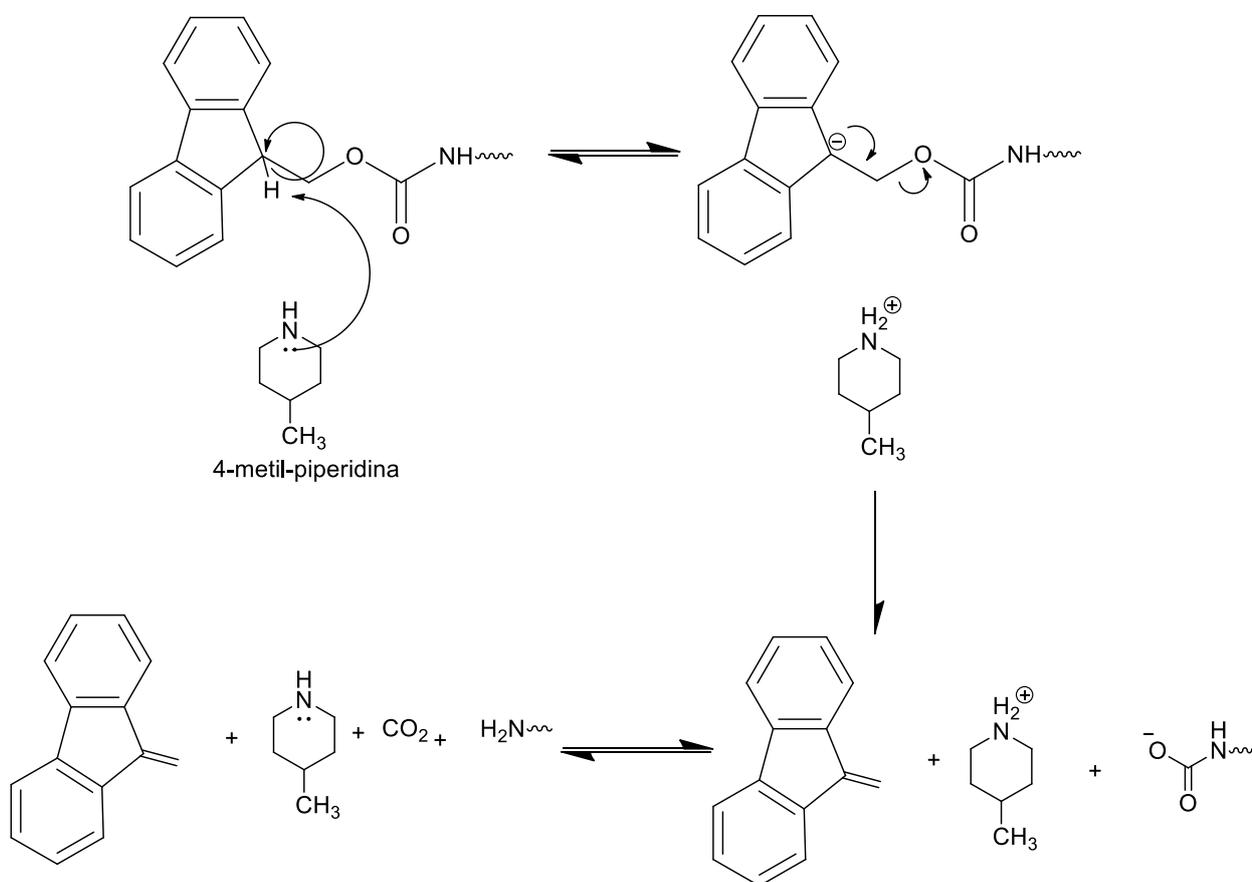


Figura 27: Mecanismo da reação de desproteção do aminoácido ligado a resina (remoção do grupo protetor Fmoc) com 4-Metil Piperidina, no qual retira um hidrogênio do carbono terciário promovendo a saída da parte final do grupo protetor pela formação de um alceno e com a liberação de CO₂, formando um grupo amina livre.

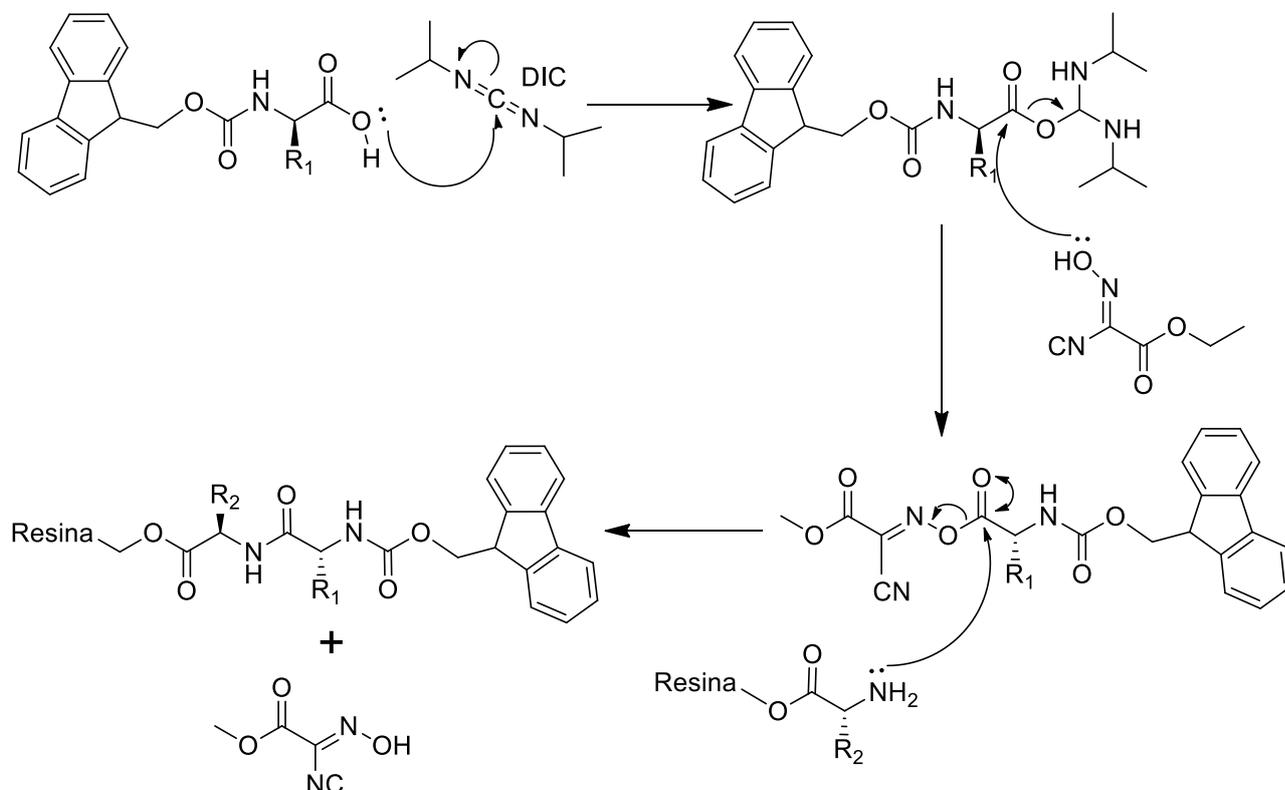
A remoção do grupo protetor Fmoc possibilita o ataque do nitrogênio do Aminoácido já acoplado à Resina na carbonila do Ácido Carboxílico do Aminoácido que se irá acoplar, gerando como subproduto água. A remoção do grupo Fmoc torna o Nitrogênio do Aminoácido nucleofílico, o que faz com que a reação de acoplamento tenha, na maioria das vezes, excelente rendimentos³⁵.

3.6.3 – Reações de acoplamento

Os reagentes e etapas para a síntese de peptídeos, incluído os mecanismos reacionais pelo qual ocorrem já estão bem estabelecidos. Na síntese em fase sólida pode-se usar reagentes de ativação diferentes, entre os mais comumente utilizados estão a síntese com Oxima®/DIC que envolve a formação de carbodiimidas e a síntese utilizando HBTU ou HATU/DIPEA³⁵.

3.6.3.1 – Síntese com DIC/Oxima®

A síntese utilizando DIC e Oxima® envolve a formação da carbodiimida. A reação de acoplamento ocorre quando são gerados de ésteres ativados, pelos reagentes DIC e Oxima®, tornando o carbono da carbonila do éster formado por esses reagentes mais eletrofílico ficando sujeito assim ao ataque da amina primária do aminoácido ligado à resina, ocorrendo assim o acoplamento (Figura 28).



R₁ = Cadeia lateral do aminoácido 1
R₂ = Cadeia lateral do aminoácido 2

Figura 28: Mecanismo de acoplamento utilizando os reagentes ativadores DIC/Oxima®.

3.6.3.2 – Síntese com DIPEA/HATU ou HBTU

A síntese utiliza a mistura dos reagentes DIPEA (N,N Diisopropiletilamina) com HATU 1-[Bis(dimethylamino)methylene]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridinium 3-oxid hexafluorophosphate] ou HBTU (2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3 – tetrametilurôniohexafluorofosfato). O reagente DIPEA, amina terciária, desprotona o Ácido Carboxílico do aminoácido que em seguida fará um ataque nucleofílico ao carbocátion do HATU ou HBTU, onde, após a saída da TMU (tetrametil ureia), ocorrerá o ataque nucleofílico da amina primária do aminoácido ligado à resina à carbonila do éster ativado formado pelo reagente HATU ou HBTU, ocorrendo assim o acoplamento (Figura 29).

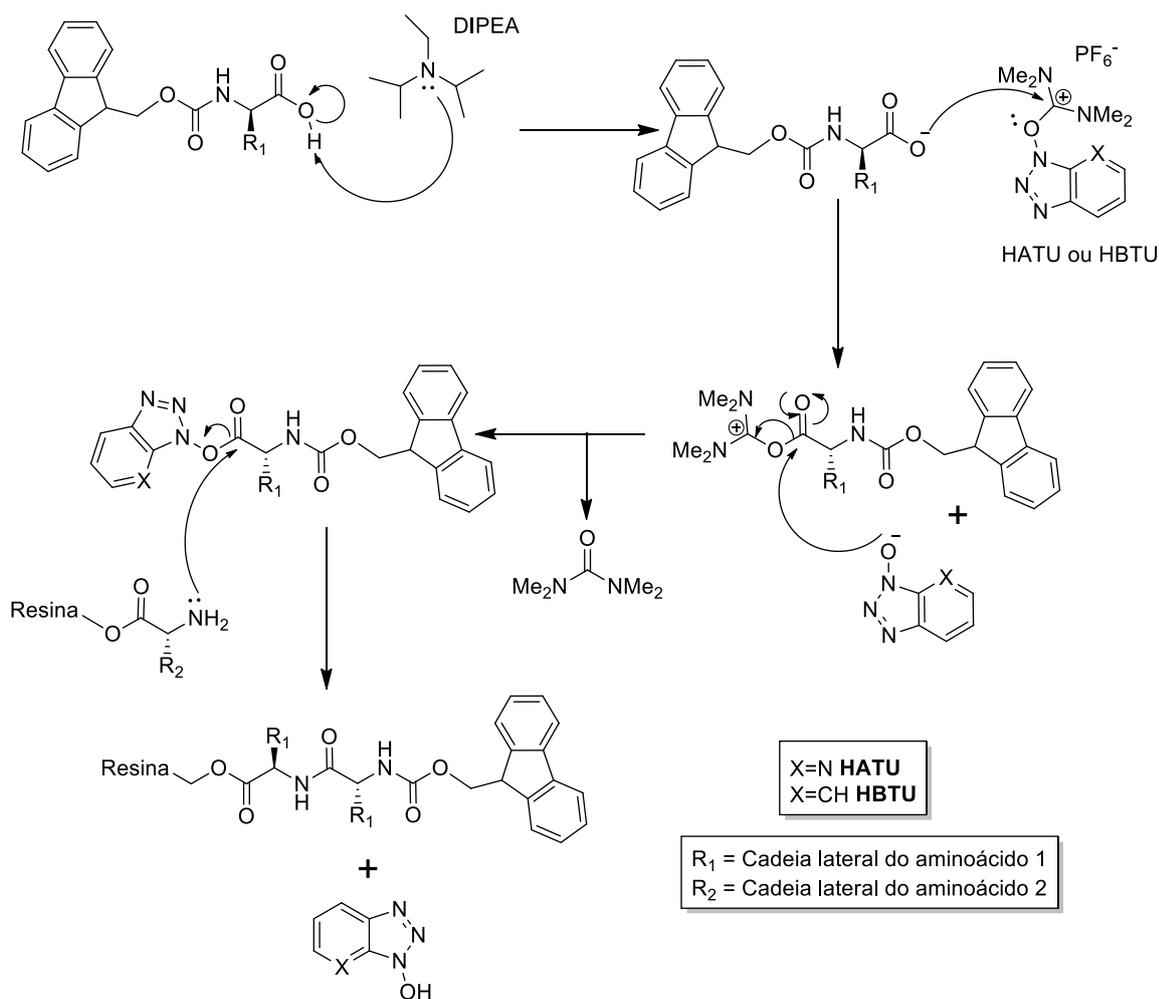


Figura 29: Mecanismo de acoplamento com os reagentes ativadores DIPEA/HBTU ou HATU

Essa segunda reação apresentada foi a escolhida para a síntese dos BPPs. Primeiramente foi pesado 230mg de resina Wang e colocados em suporte próprio para a síntese em fase sólida. Em seguida foi adicionado aproximadamente 3 mL de DCM e colocado sob agitação durante 30 minutos. Em seguida foi feito o procedimento de desproteção como apresentado no subtópico 3.6.2, para a retirada do grupo protetor Fmoc presente na resina. Após a desproteção foram feitas as reações de acoplamento dos aminoácidos na ordem prescrita. Cada reação de acoplamento utilizou-se 4 equivalentes do aminoácido, 228mg de HATU, 139 μ L de DIPEA e aproximadamente 1.5mL de DMF. Cada reação de acoplamento ficou sob agitação durante 1h e, após decorrido o tempo o material era “lavado” com DMF e DCM para a retirada dos reagentes de acoplamento que não reagiram. Cada etapa da síntese que envolvia desproteção e acoplamento era confirmadas pelo teste de Kaiser. Sínteses utilizando a resina 2-Clorotrytil-Pro-Fmoc foram feitas utilizando a mesma metodologia. Essa resina foi gentilmente cedida pelo Laboratório de Espectrometria de Massa da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

3.6.4 – Teste de Kaiser

Para a confirmação do acoplamento ou da desproteção do aminoácido, utiliza-se o teste de Kaiser³⁶. Ele é um teste qualitativo e indica se o último aminoácido do peptídeo ligado à resina está com o grupo amina livre. Neste teste, retira-se uma pequena amostra da fase sólida e caso tenha ocorrido a desproteção, ou seja, não tenha mais o grupo Fmoc, o resultado será uma cor escura, uma vez que a reação ocorre especificamente com o amina livre. Em síntese, esse teste mostra se as reações de desproteção ou acoplamento foram realmente efetivas. O mecanismo da Figura 30, mostra como se dá a formação do cromóforo pela amina primária do N-terminal do peptídeo que está sendo sintetizado.

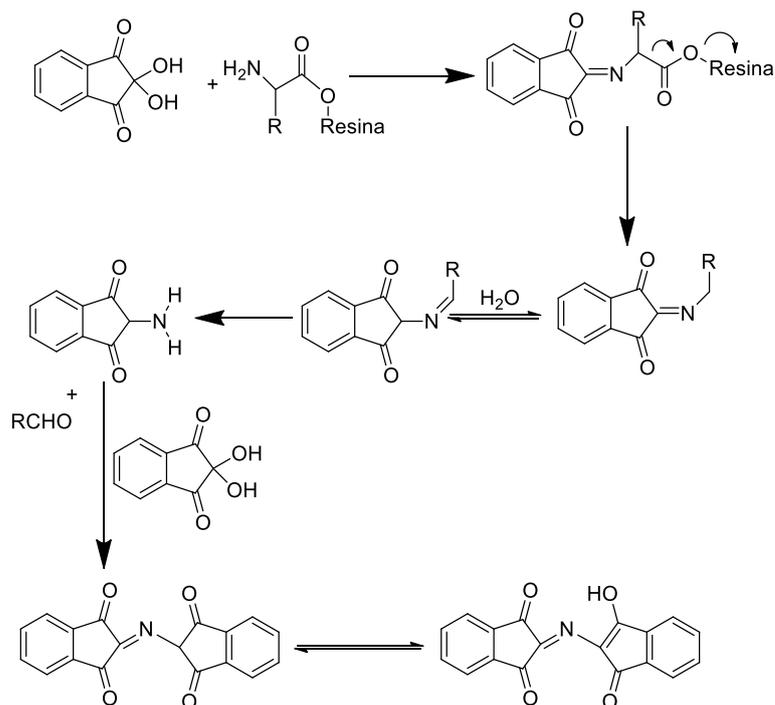


Figura 30: Mecanismo da formação da molécula cromófora na reação do teste de Kaiser

O teste foi procedido conforme Protocolo 13A apresentado em *Fmoc solid phase peptide synthesis – A practical Approach* (páginas 61-62)³⁵. Ele envolve três soluções: 5% de ninidrina em etanol (m/v), 80% de fenol em etanol (m/v) e KCN em piridina (2 mL 0,001 M KCN em 98 mL de piridina)³⁵. Grãos da resina foram coletados e imersos em gotas da solução, sendo posteriormente aquecidos a 120°C.

3.6.5 – Procedimento e reagentes para a clivagem da ligação peptídeo-resina

Após a síntese completa do peptídeo, é feita a clivagem da ligação peptídeo-resina e remoção de todos os grupos protetores de cadeia lateral dos aminoácidos presentes no peptídeo. Tudo isso é feito em um procedimento só utilizando um “coquetel” de clivagem. É usado um tempo e uma mistura de diferentes reagentes dependendo do tipo de aminoácido presente no peptídeo. Após decorrido o tempo de reação de clivagem/desproteção, a solução foi purgada com um gás inerte no caso Argônio, para a concentração do peptídeo mediante a remoção do TFA, que apresenta o maior volume dos reagentes de clivagem. Em seguida é colocado Diisopropil Éter para a precipitação do peptídeo e solubilização do restante dos reagentes de clivagem juntamente com os grupos protetores de cadeia lateral removido no

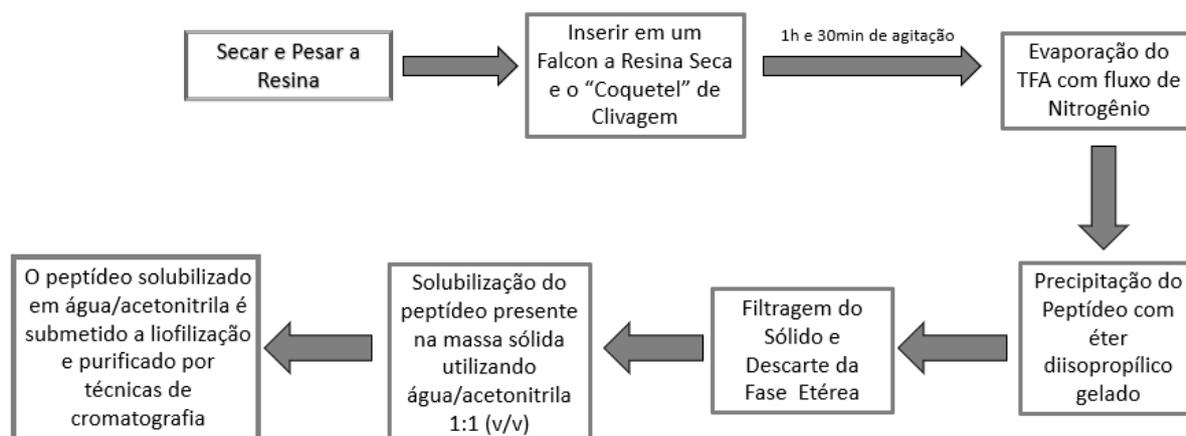
procedimento. A solução então é filtrada em um funil de Buchner e ficarão retidos no funil o peptídeo e a resina. Em seguida, lava-se o retido com água destilada, ficando assim retido no filtro apenas a resina, ficando o peptídeo solubilizado em água e encaminhado para liofilização.

A seguir, apresenta-se uma tabela com “coquetéis” de clivagem normalmente utilizados que variam conforme os aminoácidos presentes no peptídeo sintetizado.

Tabela 2: Tipos de soluções utilizadas na clivagem de peptídeos³⁵.

| Tipos de Aminoácidos nos Peptídeos | “Coquetel de Clivagem” | Tempo de reação |
|---|--|-----------------|
| Peptídeos contendo todos os aminoácidos exceto Arg, Cys e Trp desprotegido. | TFA/TIS/Água 95:2.5:2.5 (V/V) | 1,5h - 3,0h |
| Peptídeos contendo todos os aminoácidos exceto Arg e/ou Trp Desprotegido | TFA/TIS/Água/EDT 94:1:2.5:2.5 (V/V) | 1,5h - 3,0h |
| Todos os Peptídeos | TFA/Tioanisol/Água/Fenol/EDT 82.5:5:5:5:2.5 (V/V) | 1,5h - 18,0h |

O procedimento de clivagem pode ser mostrado em esquema, não necessitando nesse caso uma desproteção final, ou seja, da remoção prévia do grupo protetor Fmoc pois o último aminoácido presente na sequência dos BPPs que serão sintetizados é o Ácido Piroglutâmico, que não tem em sua estrutura o grupo protetor Fmoc.

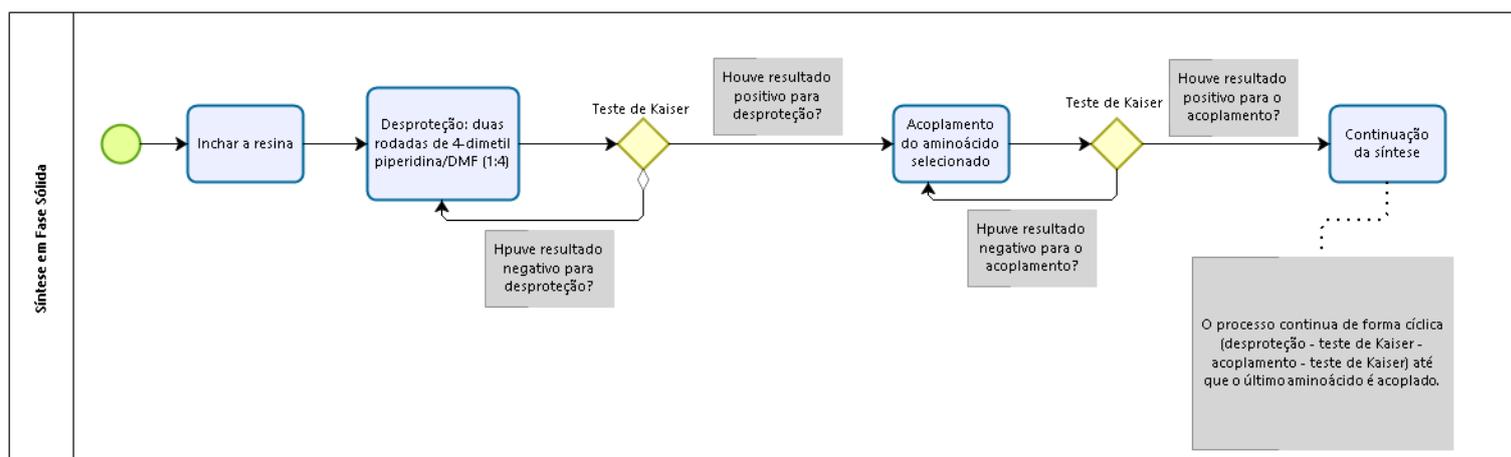


Esquema 1: Fluxo de etapas envolvidas na clivagem do peptídeo sintetizado. Fluxograma elaborado no aplicativo Bizagi Modeler© (modificado)⁴²

Foi utilizado o “coquetel” de clivagem com TFA/Tioanisol/Água/Fenol/EDT em uma proporção de 82,5/5/5/5/2,5 (v/v) respectivamente. Como já descrito na literatura³⁶, ao se colocar reagentes como tioanisol, água, fenol e etanoditiol, é visado evitar reações secundárias dos grupos de proteção clivados com os aminoácidos do próprio peptídeo. Segundo a literatura, os grupos de proteção clivados podem reagir com aminoácidos presentes no peptídeo que são ricos em elétrons, como metionina e triptofano^{36,42}.

3.6.6 – Ordem dos procedimentos para a síntese em fase sólida

Os passos mostrados no fluxograma (esquema 1) são repetidos de forma cíclica até o último aminoácido e após acoplado o último resíduo, é feito o procedimento de clivagem.



Esquema 2: Fluxograma resumido da Síntese em Fase Sólida de Peptídeos. Fluxograma elaborado no aplicativo Bizagi Modeler⁴².

Os passos mostrados no fluxograma são repetidos de forma cíclica até o último aminoácido, onde, após acoplado o último resíduo, é feito um procedimento de clivagem, ou seja, a remoção do peptídeo da resina e a desproteção simultânea das cadeias laterais. Após o procedimento de clivagem ter-se-á o peptídeo livre e totalmente desprotegido em suas cadeias

laterais e após liofilizado, estará pronto para a purificação em cromatografia líquida de alta eficiência.

3.6.7-Purificação dos peptídeos sintéticos

Os peptídeos sintéticos brutos foram purificados no Laboratório de Anatomia Molecular e Nanomedicina, área de morfologia da Faculdade de Medicina (FS) por cromatográfica líquida de alta eficiência (HPLC – Shimadzu Co.), com monitoramento nos comprimentos de onda 216 e 280 nm. O equipamento CLAE-DAD é composto por uma unidade de degaseificação (DGU-20A5R), um sistema binário de bombeamento de solventes (LC-20AR), um detector de arranjo de fotodiodo (PDA, SPD-M20A), um auto-injetor (SIL-10AF) e um módulo controlador (CBM-20A). Os peptídeos brutos foram diluídos em uma concentração de 25mg/mL. Foi utilizado uma coluna preparativa Phenomenex® Jupiter 10 µm C-18 com duas soluções de eluentes, Acetonitrila (ACN) e Água milliQ, ambos com 0,1% (v/v) de Ácido trifluoracético (TFA). O gradiente utilizado foi de 0% (v/v) ACN durante 5 minutos, 0-95% em 60 minutos e de 95%-0% em 5 minutos.

3.6.8-Análise dos peptídeos sintéticos por espectrometria de massa

Os peptídeos sintetizados tiveram sua massa confirmada utilizando espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF/TOF (UltrafleXtreme, Bruker Daltonics), utilizando as instalações do Laboratório de Toxinologia do Departamento de Ciências Fisiológicas do Instituto de Biologia. Foi utilizada uma mistura de matriz a 10mg/mL de HCCA com 50% (v/v) de ACN e 50% (v/v) TFA com cada peptídeo que se analisou, em uma proporção de 3:1 e então aplicada em uma placa de MALDI. Foi utilizado o aparelho no modo refletor positivo para a análise das fragmentações.

3.7 – Testes Farmacológicos de Vasodilatação

Para os testes farmacológicos de vasodilatação foi utilizada o método *ex vivo*, onde foram preparados anéis de artéria mesentérica superior retirada e isolada a partir de ratos. Foram feitos então os testes utilizando os peptídeos Bs01, Bs02 e Bs03 e avaliado o aumento da concentração de óxido nítrico, que é responsável pelo vasorelaxamento. por fluorescência.

3.7.1 - Ratos

Foram utilizados para o experimento ratos da espécie Wistar do sexo masculino (Licença CEUA/UFPI Anexo 3) mantidos a uma temperatura controlada com ciclo claro-escuro (12/12 h) e com livre acesso a água e à comida. A eutanásia dos ratos foi feita após anestesia com tiopental sódico 50 mg/kg + lidocaína 10 mg/kg via intraperitoneal, com decapitação seguida de exsanguinação.

3.7.2 – Anéis de Artéria Aorta

Os anéis de artéria aorta torácica de ratos (3-4 mm) foram mantidos em solução de Krebs, com composição (em mM): NaCl (118,0); KCl (4,6); CaCl₂·2H₂O (2,5); MgSO₄·7H₂O (5,7); NaHCO₃ (25,0); KH₂PO₄·H₂O (1,1) e D-glicose (11,0) sob tensão isométrica de 1,0 g e aeração constante com mistura de CO₂ 5% e O₂ 95%⁴³. O endotélio vascular foi considerado como funcionalmente intacto quando acetilcolina (10⁻⁶ M) induziu vasorelaxamento superior a 70% em preparações pré-contraídas com fenilefrina (PE 3×10⁻⁷ M)⁴³. Após lavagem, as preparações foram novamente pré-contraídas com PE (3×10⁻⁷ M) e curvas concentração-respostas para os peptídeos foram construídas⁴⁴.

4 Resultados e discussão

4.1. – Separação cromatográfica e determinação da massa dos peptídeos da fração de baixa massa molecular de *Bothrops sp.*

A peçonha extraída de *Bothrops sp.* foi submetida a um pré-fracionamento separando a fração inferior a 10 kDa, fazendo-se em seguida uma Cromatografia Líquida de Alta Eficiência utilizando coluna analítica de fase reversa (Figura 31). O método cromatográfico foi ajustado para priorizar a separação de peptídeos de baixa retenção, como os BPPs.

Foram obtidas 9 frações cromatográficas principais, com eluição entre ~10 a 30% de acetonitrila. As frações foram coletadas individualmente, submetidas a secagem a vácuo e analisadas por MALDI-TOF MS em modo refletor utilizando HCCA como matriz de ionização. Foi compilada uma lista de picos para cada uma das frações principais, conforme apresentado na Tabela 3, sendo os picos marcados com asterisco os que tiveram intensidade suficiente para aquisição de espectros de MS/MS.

Pode-se perceber, pelo cromatograma, que os peptídeos tiveram tempos de retenção muito próximos, podendo-se inferir que estes possuem propriedades físico-químicas muito similares e, como a grande parte eluiu com uma baixa porcentagem de acetonitrila e uma maior porcentagem de água, podemos afirmar que esse tipo de peptídeo possui uma elevada hidrofiliabilidade.

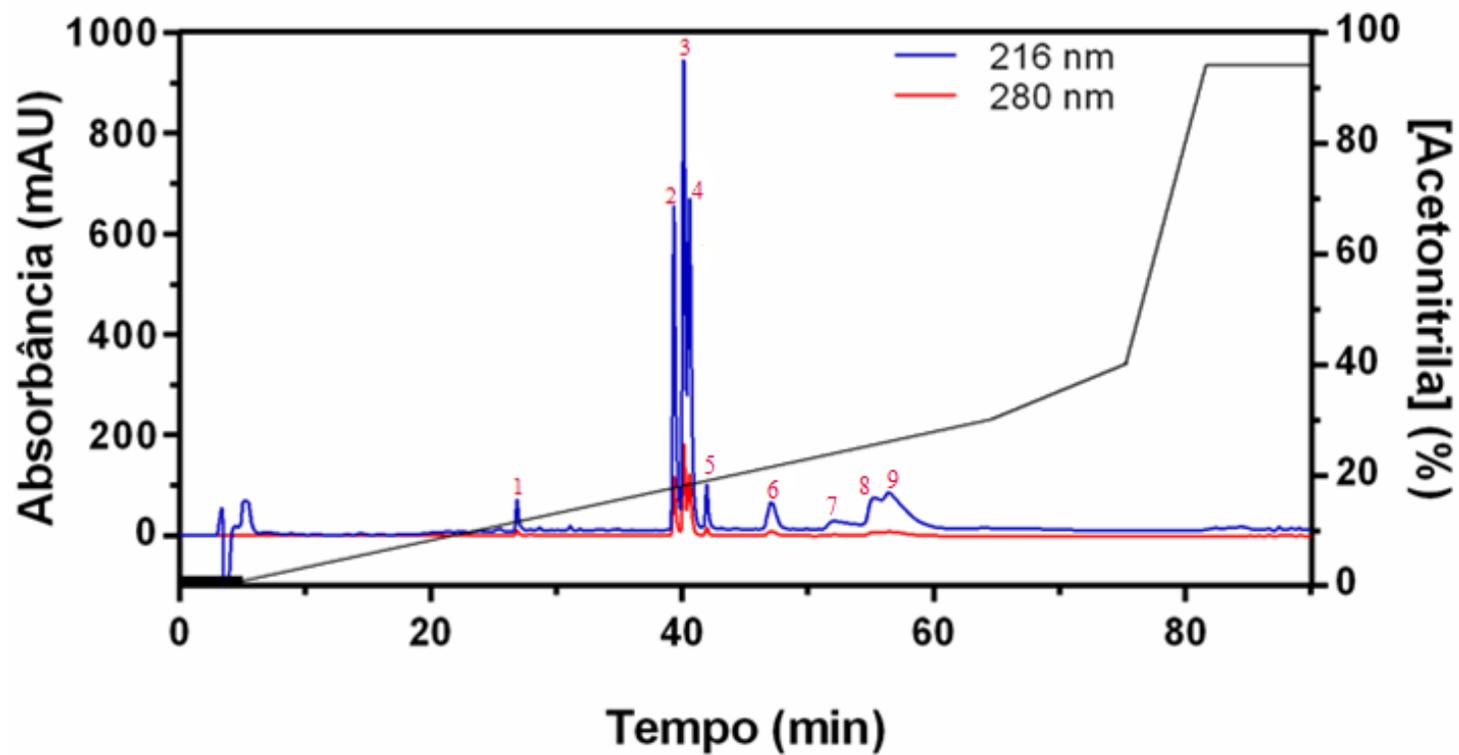


Figura 31: Cromatograma da fração menor que 10 KDa da peçonha da *Bothrops sp.* monitorado nos comprimentos de onda de 216nm e 280nm. O gradiente utilizado foi de 5 minutos com 0% de Acetonitrila, de 0 a 30% em 60 minutos, de 30 a 40% em 10 minutos e de 40 a 95% em 5 minutos permanecendo nessa concentração até o final da corrida cromatográfica.

Tabela 3: Listagem da razão massa/carga (m/z) dos íons obtidas por espectrometria de massa MALDI-TOF das frações cromatográficas da peçonha de *Bothrops sp.*

Fração 1:

| m/z | Intensidade do Sinal | Área do Sinal |
|-----------|----------------------|---------------|
| 790.294 | 381.20 | 90 |
| 869.418 | 1730.58 | 2203 |
| 927.686 | 1132.31 | 2064 |
| 949.843 | 3035.01 | 3873 |
| 1116.476* | 19854.97 | 6745 |
| 1132.458 | 723.81 | 210 |
| 1138.448 | 13361.49 | 4921 |
| 1148.465 | 912.27 | 261 |
| 1154.427 | 1922.00 | 645 |
| 1160.432 | 1764.77 | 568 |
| 1170.437 | 612.65 | 197 |
| 1176.423 | 258.53 | 102 |
| 1178.389* | 1387.89 | 407 |
| 1180.409 | 457.26 | 143 |
| 1400.55* | 426.06 | 167 |
| 1416.554 | 296.14 | 115 |

Fração 2:

| m/z | Intensidade do Sinal | Área do Sinal |
|-----------|----------------------|---------------|
| 655.965 | 1143.88 | 185 |
| 869.417 | 1259.52 | 1640 |
| 927.713 | 745.86 | 1668 |
| 949.890 | 2623.85 | 3074 |
| 1116.480* | 19578.35 | 6154 |
| 1132.477 | 419.02 | 135 |
| 1138.480 | 22866.99 | 6897 |
| 1148.469 | 479.05 | 147 |
| 1154.466 | 2863.58 | 825 |
| 1160.464 | 3446.59 | 905 |
| 1170.456 | 783.70 | 217 |
| 1176.445 | 398.92 | 142 |
| 1178.408* | 910.26 | 289 |
| 1180.406 | 320.75 | 99 |

Fração 3:

| m/z | Intensidade do Sinal | Área do Sinal |
|-----------|----------------------|---------------|
| 1105.319 | 444.15 | 1368 |
| 1114.137 | 583.97 | 1109 |
| 1116.470* | 2447.97 | 1064 |
| 1128.053 | 818.71 | 2021 |
| 1138.437 | 918.53 | 333 |

| | | |
|-----------|----------|-------|
| 1384.592* | 85697.02 | 61364 |
| 1388.596 | 1504.18 | 738 |
| 1389.920 | 879.28 | 510 |
| 1398.577 | 1566.69 | 652 |
| 1400.592* | 6118.21 | 2806 |
| 1406.557 | 4658.02 | 2149 |
| 1416.584 | 5402.09 | 2489 |
| 1422.539 | 492.19 | 236 |
| 1428.545 | 430.76 | 216 |
| 1432.578 | 376.56 | 153 |

Fração 4:

| m/z | Intensidade do Sinal | Área do Sinal |
|-----------|----------------------|---------------|
| 1116.465* | 475.62 | 161 |
| 1138.465 | 369.80 | 139 |
| 1384.562* | 27213.62 | 13554 |
| 1398.566 | 481.97 | 196 |
| 1400.567* | 1551.38 | 621 |
| 1406.557 | 2567.34 | 1043 |
| 1416.567 | 1679.86 | 665 |
| 1422.546 | 401.38 | 162 |
| 1428.549 | 364.79 | 152 |
| 1432.573 | 161.28 | 69 |

Fração 5:

| m/z | Intensidade do Sinal | Área do Sinal |
|-----------|----------------------|---------------|
| 1370.485* | 10645.50 | 3051 |
| 1384.546* | 13113.45 | 4010 |
| 1392.479 | 651.46 | 166 |
| 1400.543* | 330.99 | 82 |
| 1402.485 | 192.04 | 36 |
| 1406.528 | 752.24 | 172 |
| 1416.540 | 178.01 | 41 |

Fração 6:

| m/z | Intensidade do Sinal | Área do Sinal |
|-----------|----------------------|---------------|
| 1042.109 | 814.41 | 757 |
| 1091.070 | 932.20 | 2949 |
| 1097.275* | 1213.06 | 487 |
| 1105.311 | 860.14 | 2612 |
| 1113.901 | 1852.33 | 5968 |
| 1116.376* | 1566.28 | 386 |
| 1128.105 | 1686.68 | 3726 |
| 1138.377 | 762.54 | 290 |
| 1340.445* | 769.51 | 341 |
| 1370.418 | 99771.62 | 85588 |

| | | |
|-----------|-----------|--------|
| 1384.518* | 101442.81 | 103124 |
| 1392.480 | 7731.07 | 4871 |
| 1397.476 | 611.64 | 405 |
| 1399.535 | 875.09 | 354 |
| 1400.523* | 6831.42 | 3240 |
| 1402.475 | 4460.48 | 2033 |
| 1406.517 | 9966.95 | 4761 |
| 1414.475 | 1739.15 | 735 |
| 1416.517 | 5028.65 | 2222 |
| 1422.490 | 1261.94 | 470 |
| 1428.478 | 1470.19 | 586 |
| 1432.459 | 535.35 | 220 |
| 1440.456 | 483.82 | 218 |
| 1446.450 | 539.91 | 179 |

Fração 7:

| m/z | Intensidade do Sinal | Área do Sinal |
|-----------|----------------------|---------------|
| 630.021 | 2197.58 | 426 |
| 650.014 | 781.85 | 155 |
| 833.466* | 17674.19 | 4991 |
| 952.515 | 515.39 | 146 |
| 970.527* | 1988.15 | 623 |
| 1036.535* | 4667.06 | 1500 |
| 1180.584 | 418.43 | 146 |

Fração 8:

| m/z | Intensidade do Sinal | Área do Sinal |
|----------|----------------------|---------------|
| 630.018 | 1128.17 | 199 |
| 833.430 | 13468.08 | 3162 |
| 970.474* | 1804.18 | 436 |
| 1036.493 | 3704.24 | 1004 |

Fração 9:

| m/z | Intensidade do Sinal | Área do Sinal |
|----------|----------------------|---------------|
| 613.275 | 800.06 | 168 |
| 623.976 | 687.01 | 185 |
| 655.991 | 974.06 | 150 |
| 667.933 | 551.48 | 147 |
| 815.332* | 405.61 | 123 |
| 886.347* | 555.41 | 183 |
| 934.437* | 9955.33 | 2918 |
| 948.441* | 829.70 | 197 |

4.2. – Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massa (LC-MS/MS) da fração de baixa massa molecular de *Bothrops sp.*

Foi realizada, além da já citada Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com posterior análise das frações por MALDI-TOF, uma Cromatografia Líquida acoplada em um Espectrômetro de Massa do tipo Q-TOF (LC-MS). Esta análise visa a caracterização de moléculas em baixa concentração no extrato, permitindo uma descrição mais abrangente.

Um Cromatograma Total de Íons (TIC), o qual corresponde ao somatório das intensidades de cada íon em cada espectro adquirido, é apresentado na Figura 32. Neste, percebe-se que a maior parte dos peptídeos pertence a frações com retenção entre 3,5 e 13 minutos. O espectro médio desta região está representado na Figura 33 e neste percebe-se os íons majoritários m/z 444.22, 558.82, 692.88, 685.84, 693.37. Os íons m/z 558.82, 692.88, 685.84 foram extraídos do cromatograma e suas distribuições isotópicas podem ser verificadas nas Figuras 34, 35 e 36. Os íons em questão apresentaram múltiplos tempos de retenção, indicando que pode se tratar de um peptídeo com mais de uma conformação termodinamicamente possível, fato que será discutido de maneira mais aprofundada no item 4.6.1 do presente trabalho. Foram adquiridos também espectros de MS/MS a partir do modo de operação IDA (Information Dependent Acquisition), no qual os íons precursores são selecionados por meio de critérios pré-determinados pelo usuário e submetidos a fragmentação. Desta forma, a análise de LC-MS gerou uma variedade de espectros de MS/MS, cuja interpretação permitiu o assinalamento da estrutura primária dos peptídeos correspondentes.

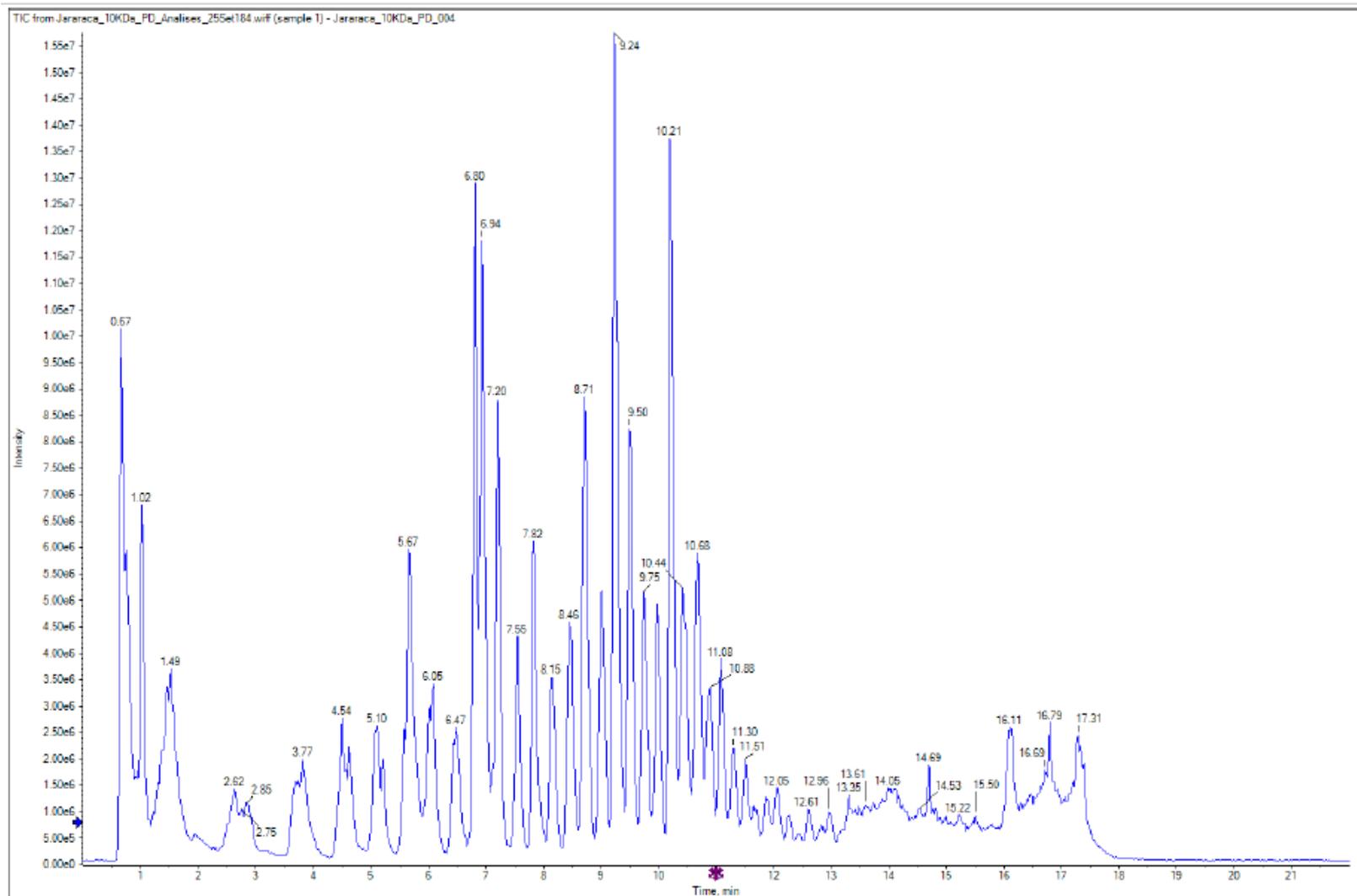


Figura 32: LC-MS (TIC) adquirido mostrando a faixa de eluição dos peptídeos presentes na amostra. Cromatografia com um tempo total de 23 minutos.

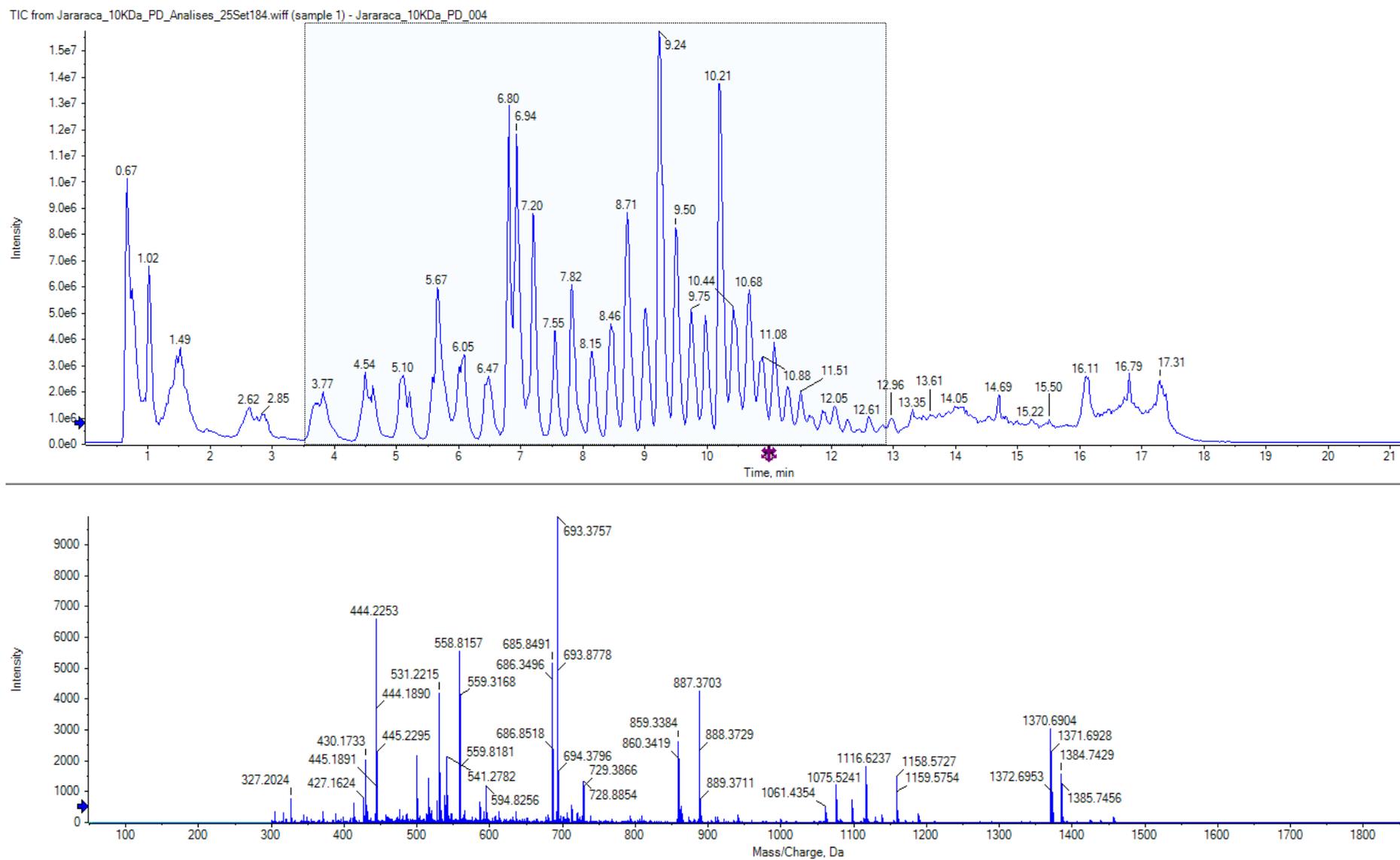


Figura 33: Espectro médio adquirido da região do cromatograma entre três minutos e trinta segundos e aproximadamente treze minutos.

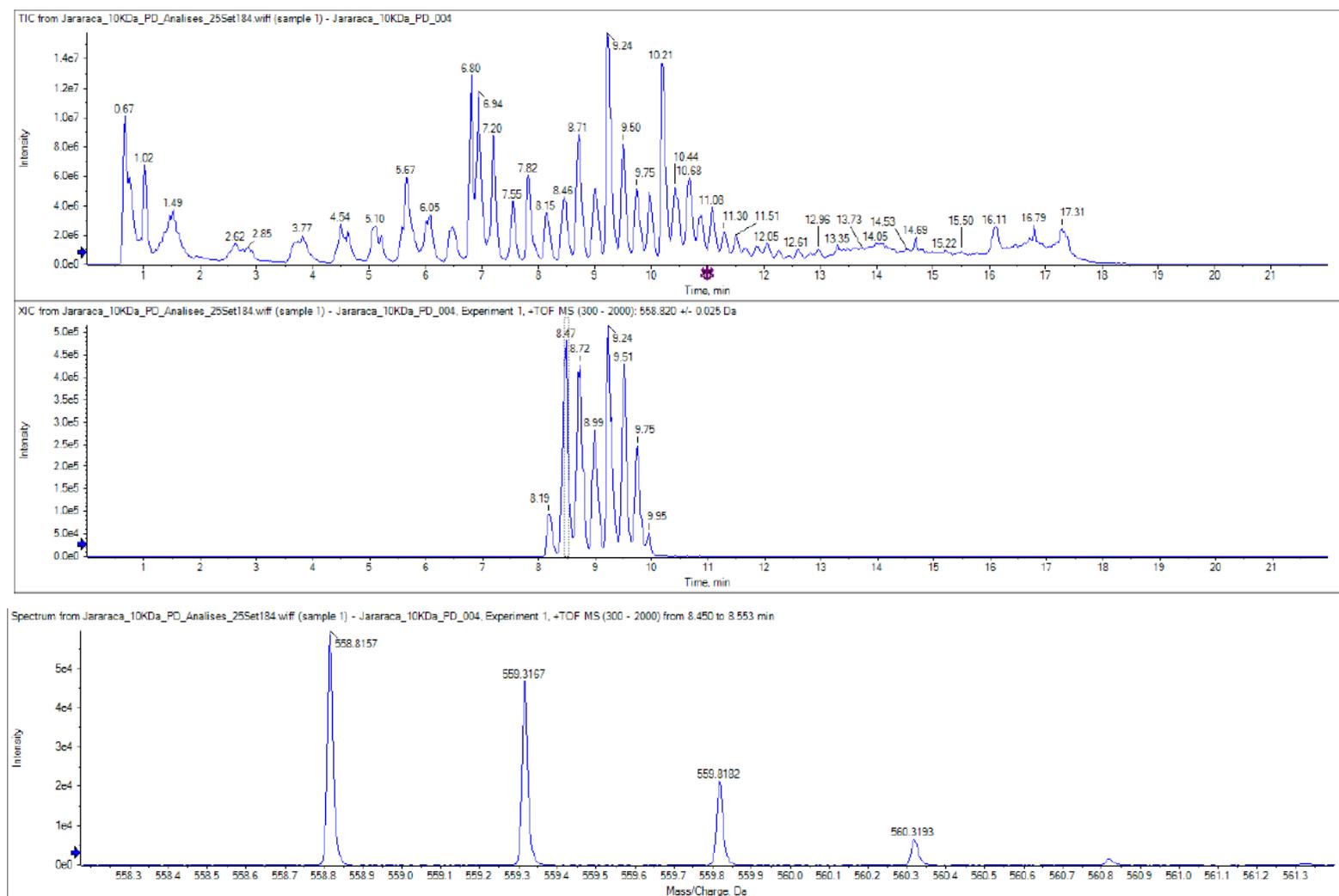


Figura 34: Cromatograma de íon extraído (XIC) da peçonha da *Bothrops sp.*, com tempos de retenção entre 8 e 10 minutos. Selecionado o pico referente ao íon dupla carga do peptídeo $[M+H]^+$ 1116.6 m/z com tempo de retenção de aproximadamente 8,5 minutos, mostrando sua série isotópica.

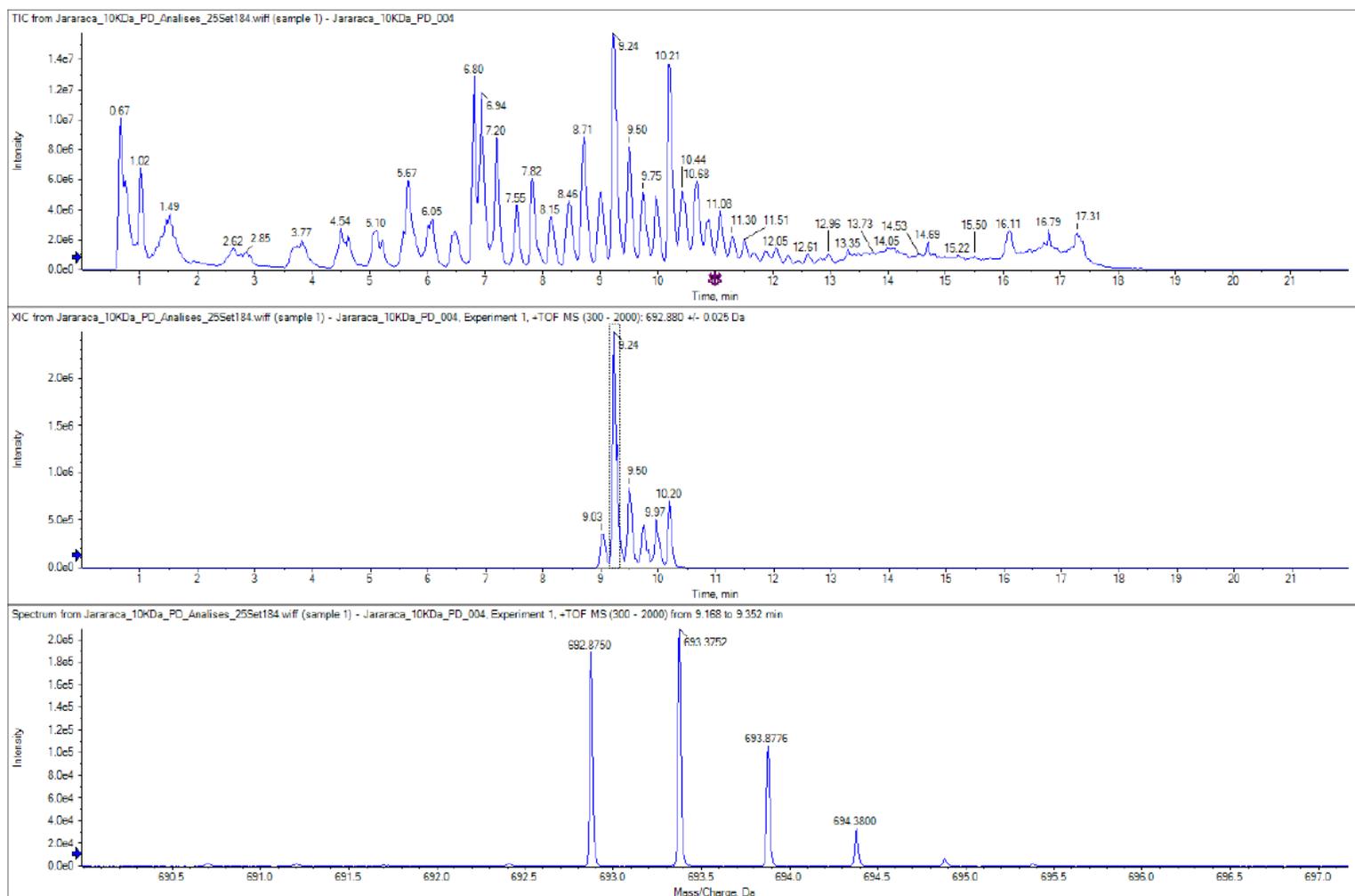


Figura 35: Cromatograma de íon extraído (XIC) da peçonha da *Bothrops sp.*, com tempos de retenção entre 9 e 11 minutos. Selecionado o pico referente ao íon dupla carga do peptídeo $[M+H]^+$ 1384.7 m/z com tempo de retenção de aproximadamente 9,5 minutos, mostrando em seguida sua série isotópica.

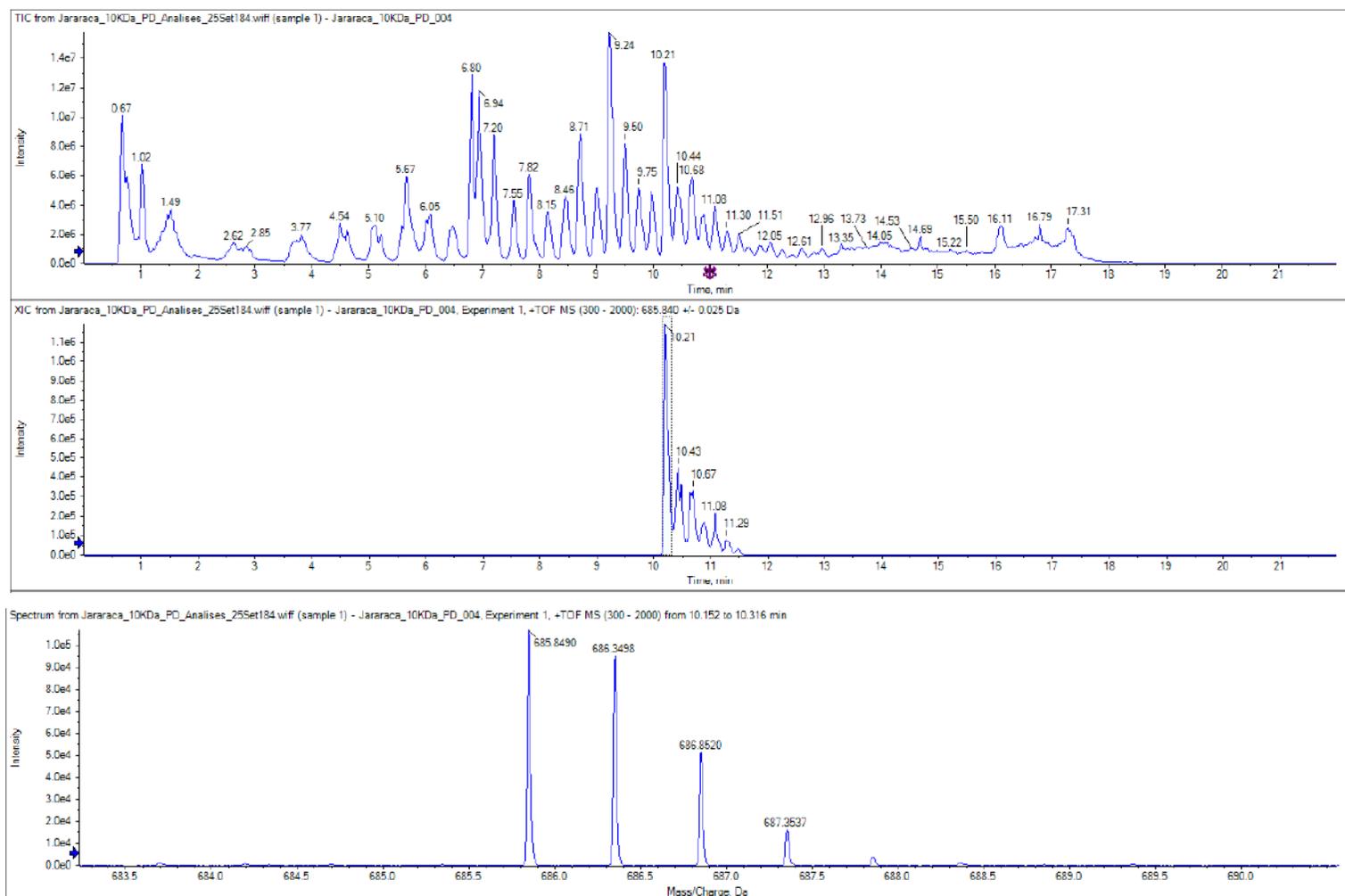


Figura 36: Cromatograma de íon extraído (XIC) da peçonha da *Bothrops sp.*, com tempos de retenção entre 10 e 12 minutos. Selecionado o pico referente íon dupla carga do peptídeo $[M+H]^+$ 1370.4 m/z com tempo de retenção de aproximadamente 10,5 minutos, mostrando em seguida sua série isotópica.

4.3 – Sequenciamento manual dos peptídeos da peçonha de *Bothrops sp.*

Os espectros de MS/MS obtidos a partir da análise de MALDI MS e de LC-MS/MS dos peptídeos de baixa massa molecular da peçonha de *Bothrops sp.* foram submetidos a sequenciamento manual, com assinalamento das séries y e b, além de séries acessórias. Das moléculas sequenciadas até o momento, depreende-se a existência de dois grupos: aquelas que já se encontram descritas na literatura e um conjunto de moléculas novas, cuja estrutura primária ainda necessita de verificação adicional (Tabela 4). Os íons característicos de moléculas da classe dos BPPs que nortearam a determinação da estrutura primária das moléculas são m/z 240.134, ou 226.08 ou 169.06, os quais correspondem ao resíduo b₂, composto por ácido piroglutâmico (pE) e o 2º aminoácido a partir do N-terminal, podendo ser K, N ou G, além do íon 213.12, o qual corresponde ao íon y₂, ou PP, conforme demonstrado na Figura 36 e observados nos espectros das figuras 37 a 39.

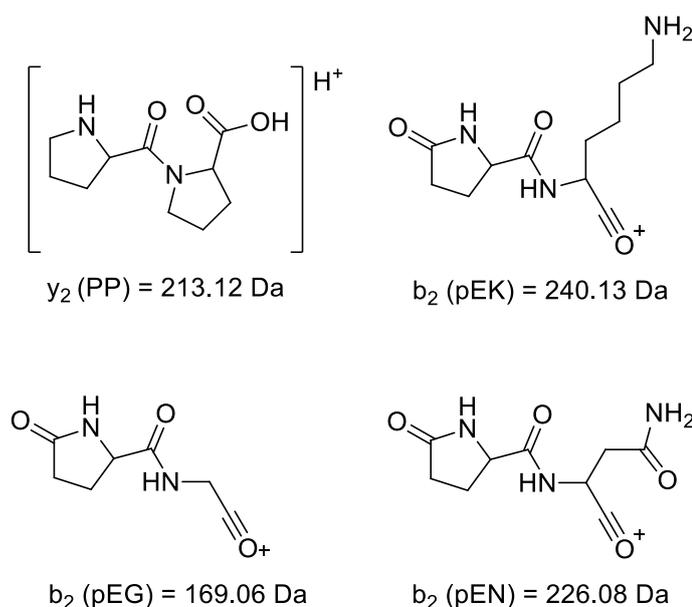


Figura 36: Estruturas dos íons mais comuns presentes nos espectros de BPPs.

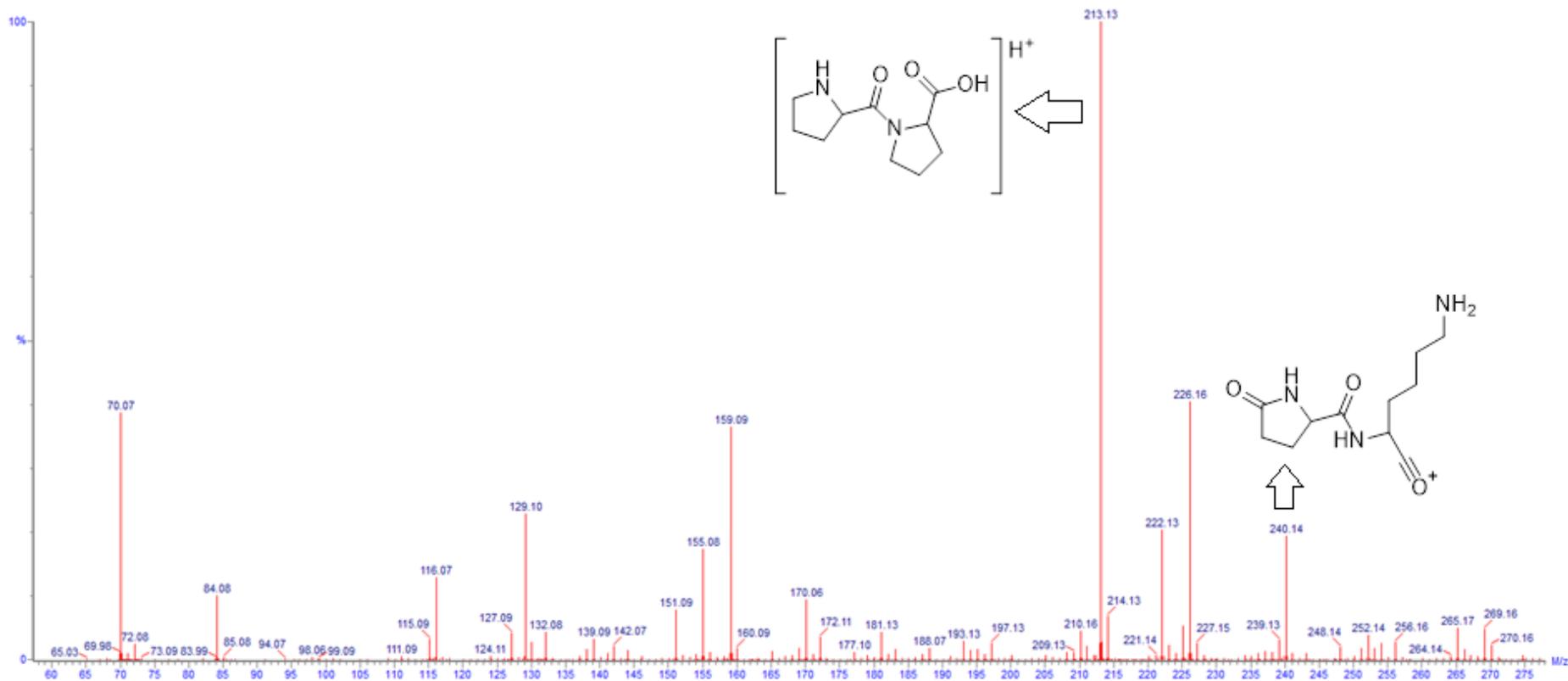


Figura 37: Região do espectro de MS/MS de um BPP modelo mostrando alguns íons comumente encontrados. $[M+H]^+$ 213.13 Da e $[M+H]^+$ 240.14 Da.

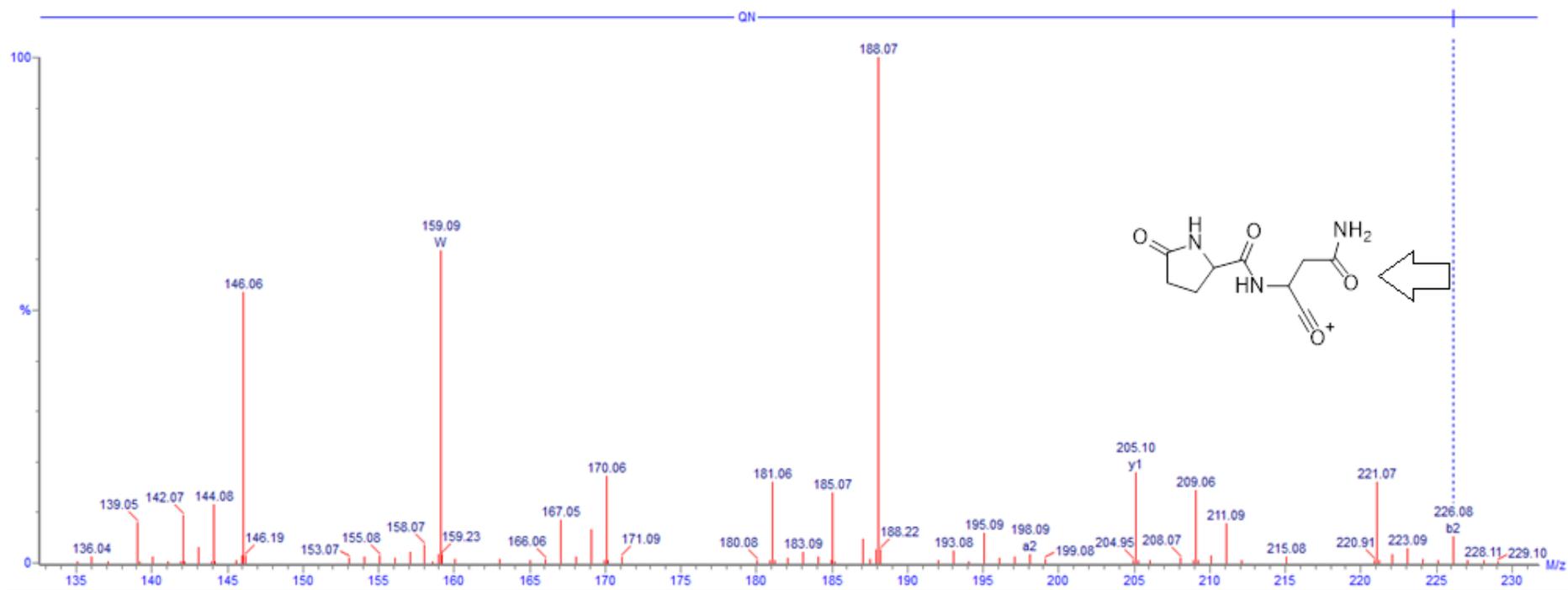


Figura 38: Região do espectro MS/MS de um BPP modelo mostrando o íon $[M+H]^+ = 226.08$ Da correspondente a ácido piroglutâmico e asparagina (pEN)

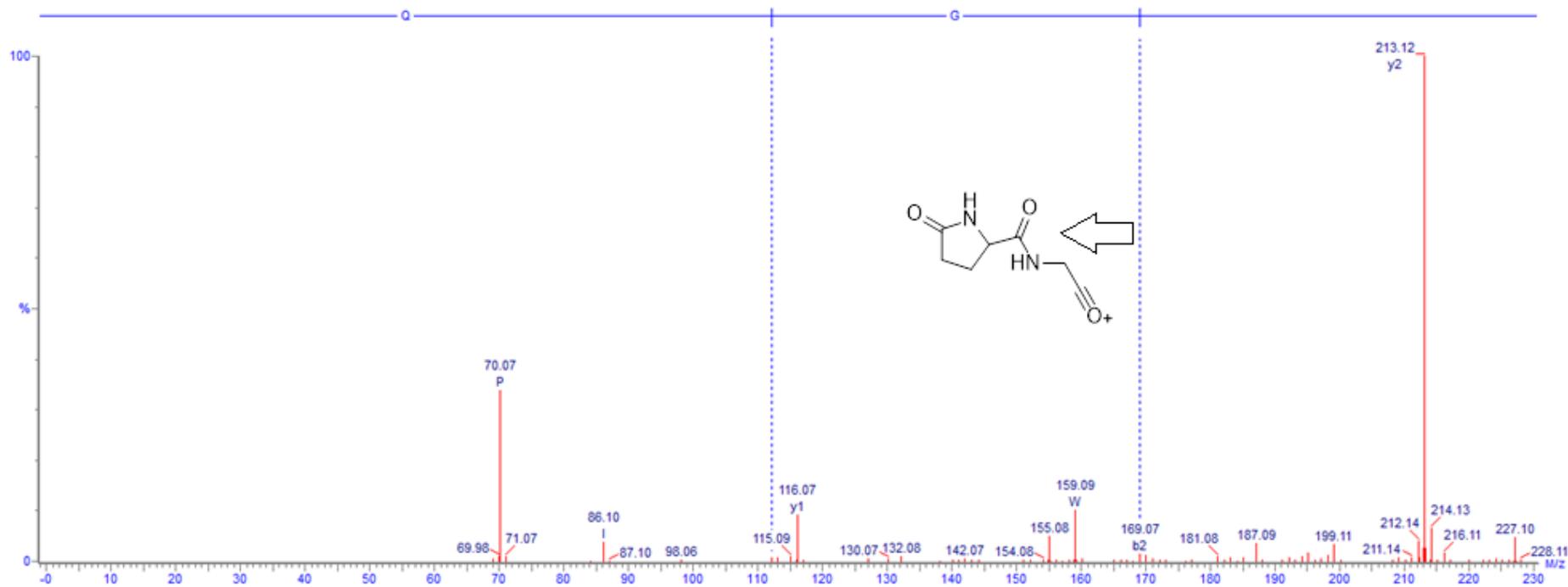


Figura 39: Região do espectro encontrado de MS/MS de um BPP modelo mostrando os os íons $[M+H]^+ = 169.07$ Da correspondente a ácido piroglutâmico e glicina (pEG) e o íon $[M+H]^+ = 213.13$ Da correspondente à prolina e prolina (PP).

Como citado no item 1.5.1, os BPPs têm frequentemente em seu N-terminal o aminoácido modificado ácido piroglutâmico, sendo essa uma modificação comum em peptídeos encontrados no gênero *Bothrops* de serpentes¹⁷. Isso confere uma vantagem, pois já foi demonstrado que peptídeos modificados na porção N-terminal com o ácido piroglutâmico possuem maior estabilidade⁴⁵ e um maior tempo de vida por dificultar a proteólise enzimática inibindo o reconhecimento ou o “encaixe” enzimático⁴⁶. Um maior tempo de vida desses peptídeos significa que esse componente do veneno terá sua ação prolongada na presa, fazendo com que a perturbação à homeostase perdure⁴⁷.

Dentre os BPPs já conhecidos na literatura, destacam-se os peptídeos de massa $[M+H]^+ = 1116.64, 1384.73$ e 1370.68 Da, caracterizados a partir da peçonha de *Bothrops moojeni*²⁸. Os espectros de MS/MS destas moléculas podem ser encontrados nas Figuras 40, 41 e 42. A análise destes espectros evidencia as dificuldades associadas ao sequenciamento de BPPs em geral. Percebe-se que os íons da série y e b não são os mais intensos do espectro, e inúmeros outros íons resultantes de fragmentação interna da cadeia polipeptídica são também observados. Assim, o assinalamento da estrutura primária de peptídeos desconhecidos se torna mais laboriosa.

O assinalamento estrutural de moléculas ainda não descritas na literatura torna-se um desafio ainda maior. Até o momento, são 6 as moléculas cuja estrutura primária não coincide com nenhuma outra molécula do gênero *Bothrops* publicada na literatura (Tabela 1). Os espectros de MS/MS de duas delas, de massa $[M+2H]^{2+} = 565.23$ Da e $[M+2H]^{2+} = 712.81$ Da estão apresentados nas Figuras 43 e 44, respectivamente. Embora tenhamos assinalado uma estrutura primária possível para estas moléculas, novos experimentos são necessários para sua confirmação, já que outros peptídeos, de estrutura primária diferente destes e ainda com ordem inversa de determinados aminoácidos, são possíveis. A confirmação da estrutura pode ser realizada com o auxílio de uma biblioteca de cDNA obtida a partir das glândulas de veneno de *Bothrops sp.*, podendo ser confirmado assim a correta sequência dos aminoácidos nos peptídeos em questão e sua provável função.

Foram também sequenciados peptídeos resultantes da proteólise de proteínas parentais de alta massa molecular, como a Zinco metalloproteínase/disintegrina, sendo essa uma proteína bastante comum no gênero *Bothrops*. Foi também encontrado o peptídeo TGVIQDHSPIN, com 100% de identidade com um fragmento da metaloproteínase BITM02A, de *Bothrops insularis*. Outra observação não relatada previamente na literatura é a presença de peptídeos contendo triptofano oxidado. Os peptídeos pEKW(OH)PRPGPEIPP e pEKW(OH) foram sequenciados e os espectros de MS/MS sugerem a ocorrência de oxidação

nos resíduos de triptofano, já que o imônio deste resíduo de aminoácido está acrescido de 16 Da nos espectros, conforme pode-se verificar nos espectros no anexo 3.

Na Tabela 4 estão os peptídeos com a estrutura primária já confirmada, a confirmar e peptídeos cuja as estruturas se encontram na literatura.

Tabela 4: Estrutura primária, massa detectada e teórica dos peptídeos já sequenciados, os a confirmar e modificações/miscelânea.

| Estrutura primária | Massa detectada (Da) | [M+H] ⁺ (Da) | Código Uniprot* | Técnica | Nome/Referência de descrição prévia |
|---------------------------------------|--------------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------|-------------------------------------|
| pESWPGPNIPP | [M+2H] ²⁺ 538.23 | 1075.513 | Q6LEM5.1 | LC-MS/MALDI | BPP-10 ^a |
| PGPNIPP | [M+H] ⁺ 691.38 | 691.377 | Q6LEM5.1 | LC-MS | |
| pEKWPRPGPEIPP | [M+2H] ²⁺ 692.88 | 1384.729 | | LC-MS/MALDI | ²⁸ |
| pEKW(OH)PRPGPEIPP | [M+H] ⁺ 1400.56 | 1400.56 | | | |
| pEKWPRPGP | [M+H] ⁺ 948.57 | 948.57 | | MALDI | |
| pEKWPGPKVPP | [M+2H] ²⁺ 558.82 | 1116.64 | | LC-MS/MALDI | ²⁸ |
| pEGGWPRPGPEIPP | [M+2H] ²⁺ 685.84 | 1370.677 | P0C7R7.1 | LC-MS/MALDI | BPP-13 ^a |
| pENW | [M+H] ⁺ 430.17 | 430.17 | | LC-MS | ²⁸ |
| pEKW | [M+H] ⁺ 444.23 | 444.23 | | LC-MS | ²⁸ |
| pEKWP | [M+H] ⁺ 541.28 | 541.28 | | LC-MS | ²⁸ |
| pEKF | [M+H] ⁺ 405.21 | 405.21 | | LC-MS | |
| pEKWA | [M+H] ⁺ 515.21 | 515.21 | | LC-MS | |
| pEKW(OH) | [M+H] ⁺ 460.21 | 460.21 | | LC-MS | |
| pETNW | [M+H] ⁺ 531.21 | 531.21 | | LC-MS | ²⁸ |
| Estruturas de BPPs a confirmar | | | | | |

| | | | | | |
|-------------------------------------|--------------------------------|---------|--|--------------|--|
| pEKWPGPSLVPP | [M+2H] ²⁺ 594,83 | 1188,66 | | LC-MS | |
| pEKWPPAAPVPP | [M+2H] ²⁺ 585,78 | 1170,56 | | LC-MS | |
| pESWPGPAPIPP | [M+2H] ²⁺ 565,23 | 1129,46 | | LC-MS | |
| pEGGWPPAPVPEIPP | [M+2H] ²⁺ 712,81 | 1424,62 | | LC-MS | |
| pEGGWPPAPVPEIPP | [M+3H] ³⁺ 475,55 | 1424,65 | | LC-MS | |
| pEKWPPAPVPEIPP | [M+3H] ³⁺ 480,23 | 1438,69 | | LC-MS | |
| Modificações/miscelânea | | | | | |
| pEGGWPRPGPEI (série b 1370 – PP) | [M+H] ⁺ 1158,58 | 1158,58 | | LC-MS | |
| KVTELPKGA | [M+2H] ²⁺ 471,79 | 942,58 | Parte de Q072L5.1 | LC-MS | Zinc metalloproteína eintegrina |
| pEQRFSKY | [M+H] ⁺ 1036,52 | 1036,52 | Variante de Q072L5.1 com modificação pós- traducional | MALDI- MS | Zinc metalloproteína eintegrina |
| APVDRIY | [M+H] ⁺ 833,448 | 833,45 | X2JCV5.1 | MALDI- MS | L-amino ácido oxidase |
| TGVIQDHSPIN | [M+2H] ²⁺ 590,81 | 1180,59 | Q8QG89.1 | LC-MS | Snake venom metalloproteína eintegrina BITM02A |
| TAPVDRIY | [M+2H] ²⁺ 467,86 | 934,72 | X2JCV5.1 | LC-MS | L-amino ácido oxidase |

* UniProt (disponível em: <https://www.uniprot.org>)

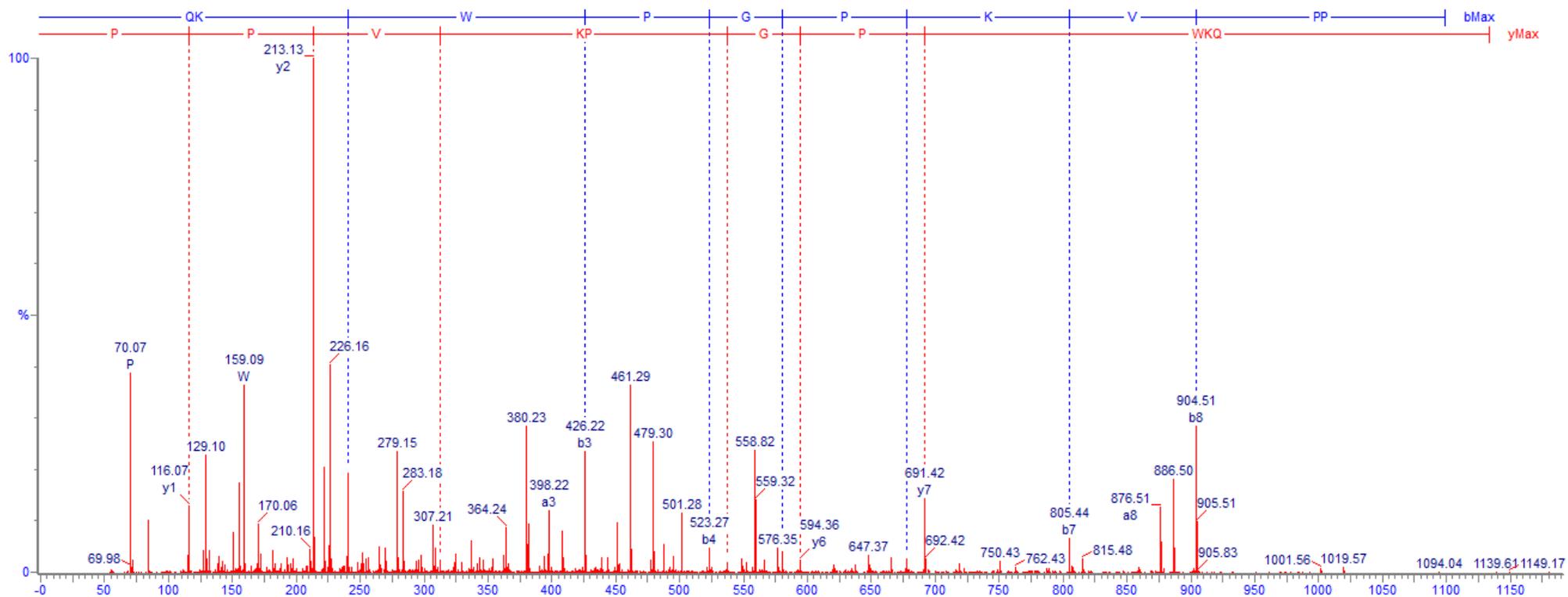


Figura 40: Sequenciamento manual do peptídeo Bs01 por meio da fragmentação do íon duplamente carregado de massa $[M+2H]^{2+} = 558.82$ Da em um Q-TOF obtendo uma sequência de aminoácidos pEKWPGPKVPP (Q=pE=ácido piroglutâmico).

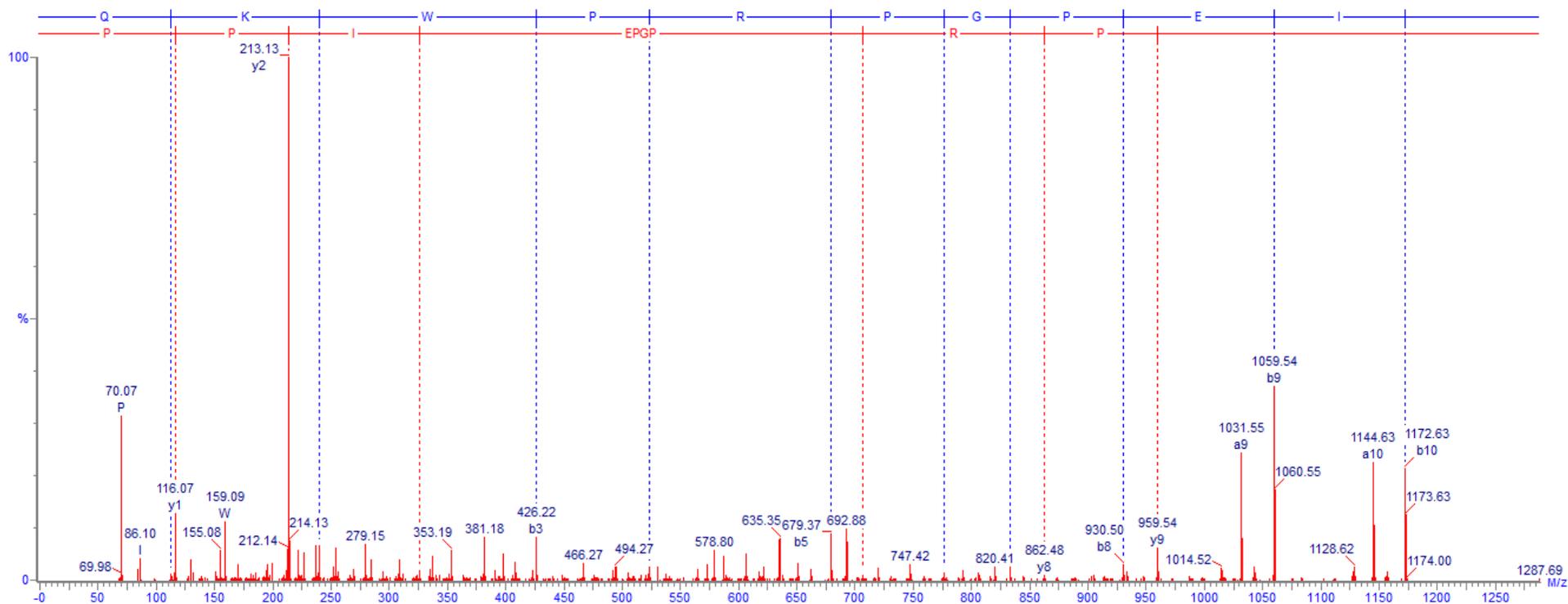


Figura 41: Sequenciamento manual do peptídeo Bs02 por meio da fragmentação do íon duplamente carregado de massa $[M+2H]^{2+} = 692.88$ Da em um Q-TOF obtendo uma sequência de aminoácidos pEKWPRPGPEIPP (Q=pE=ácido piroglutâmico).

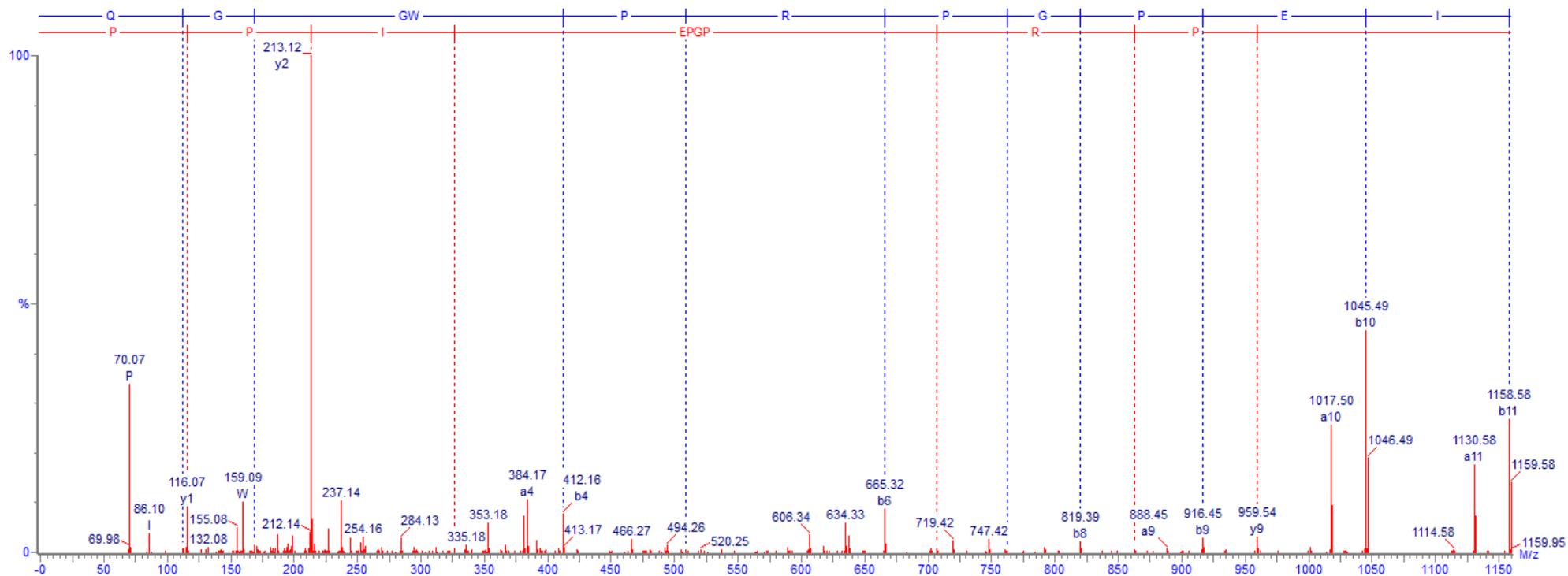


Figura 42: Sequenciamento manual do peptídeo Bs03 por meio da fragmentação do íon duplamente carregado de massa $[M+2H]^{2+} = 685.84$ Da em um Q-TOF obtendo uma sequência de aminoácidos pEGGWPRPGPEIPP (Q=pE=ácido piroglutâmico).

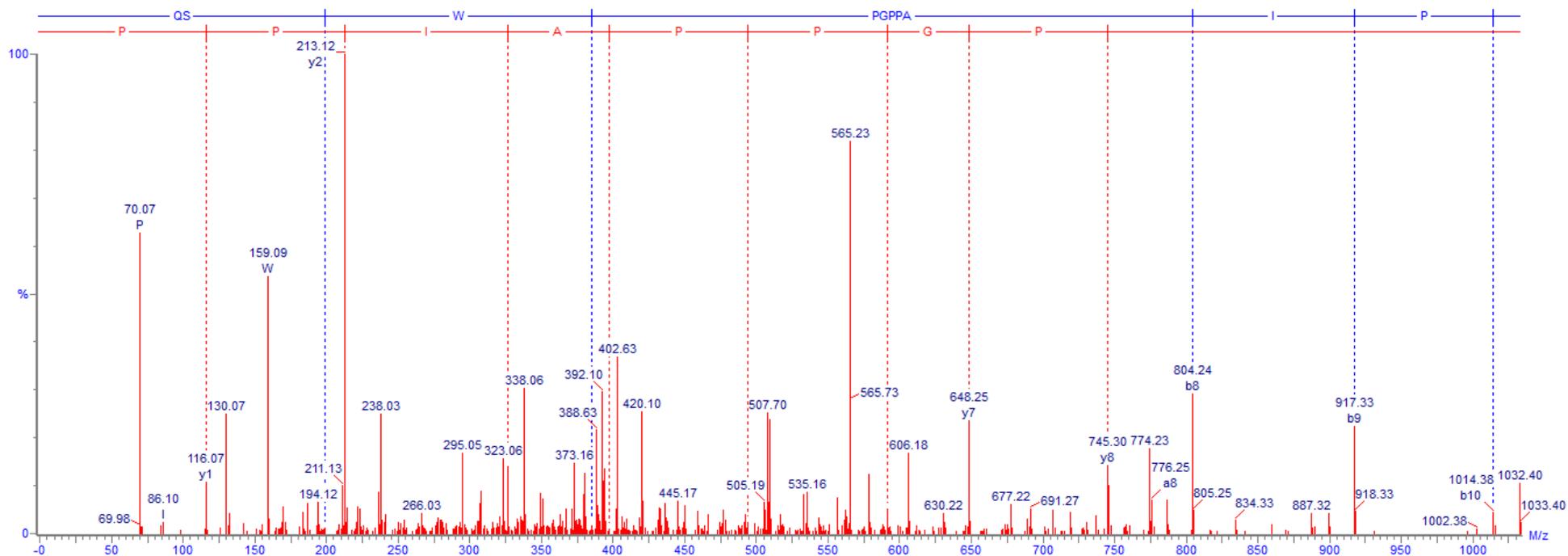


Figura 43: Sequenciamento manual por meio da fragmentação do íon duplamente carregado do peptídeo de massa $[M+2H]^{2+} = 565.23$ Da em um Q-TOF obtendo uma sequência de aminoácidos pESWPGPAPIPP (Q=pE=ácido piroglutâmico), podendo ser um possível BPP.

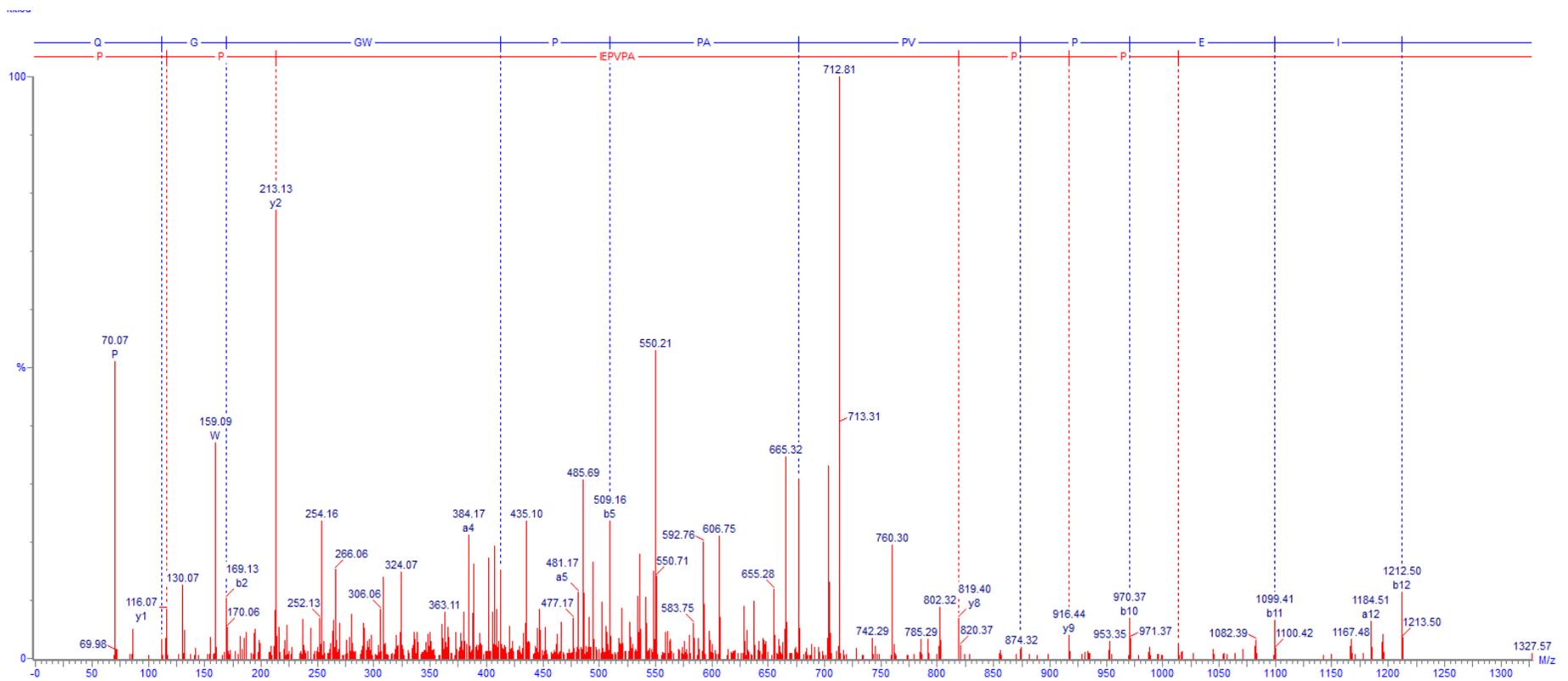


Figura 44: Sequenciamento manual do peptídeo por meio da fragmentação do íon duplamente carregado de massa $[M+2H]^{2+} = 712.81$ Da em um Q-TOF obtendo uma sequência de aminoácidos pEGGWPPAPVPEIPP (Q=pE=ácido piroglutâmico).

4.4 – Estrutura primária de BPPs com fim taxonômico

A técnica de espectrometria de massa possui potencial uso na identificação do veneno para fins taxonômicos⁴⁰. Dado que a espécie de *Bothrops* coletada no Delta do Parnaíba não foi facilmente identificada pelos herpetólogos, a análise bioquímica de sua peçonha pode fornecer novos dados que facilitem sua identificação. Os 3 principais íons encontrados neste trabalho, m/z 692.88, 685.84 e 558.82, são provenientes de peptídeos compatíveis com *Bothrops moojeni*, de acordo com a literatura⁴⁰. Além disso, a literatura aponta que o íon m/z 502 Da, correspondente ao peptídeo VTVLEASER, um fragmento do precursor de L-amino-ácido oxidase, é um marcador desta espécie. No extrato avaliado, foi encontrado o íon m/z 502.2753 (massa teórica 502.271, erro 8.5 ppm) em baixa intensidade, a qual não foi suficiente para aquisição de espectro de massa em modo IDA.

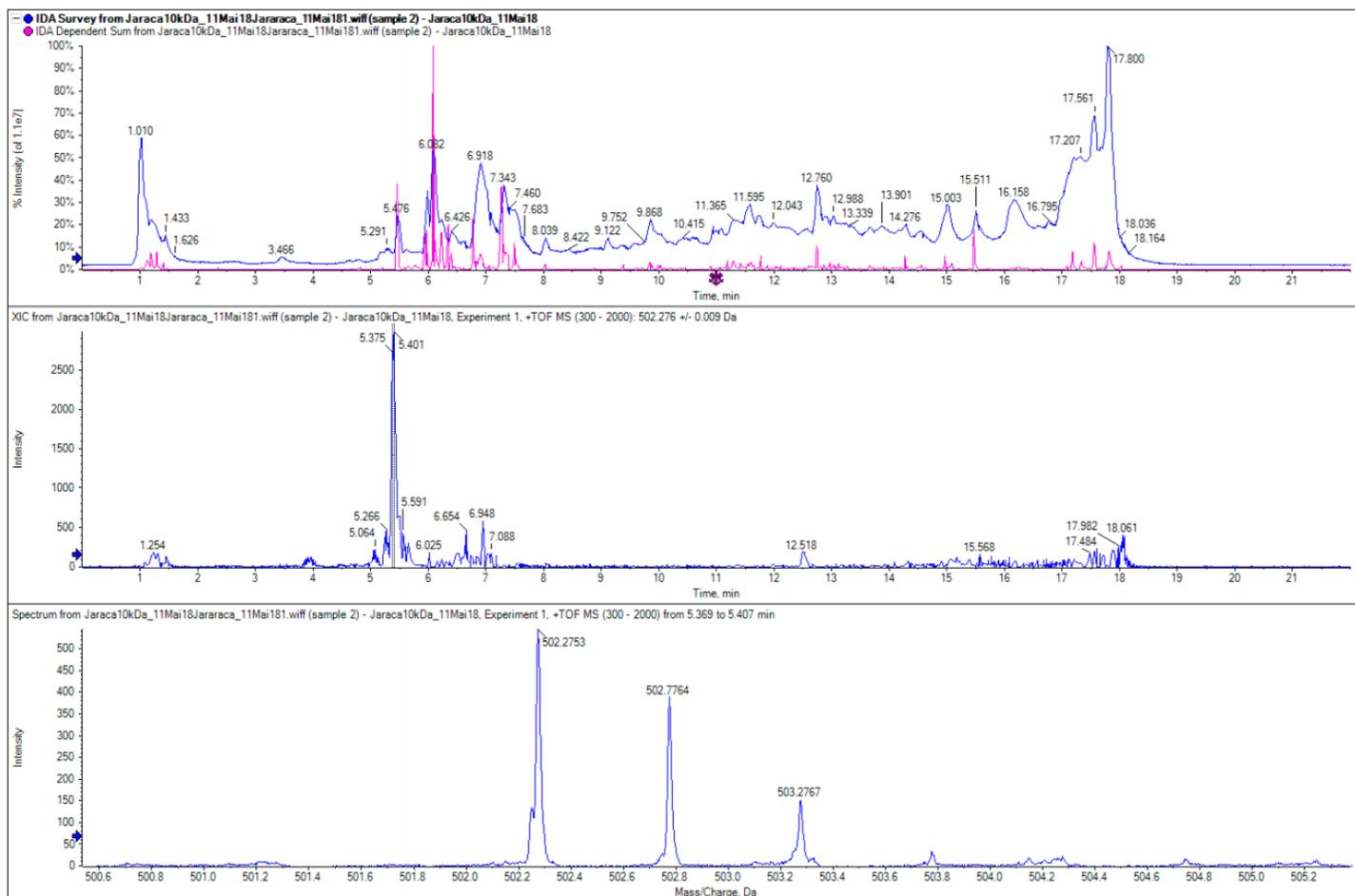


Figura 45: Pico de massa $[M+2H]^{2+} = 502.27$ Da, possivelmente referente ao peptídeo VTVLEASER, fragmento do precursor de L-amino-ácido oxidase marcador da espécie *Bothrops moojeni*. Devido a baixa intensidade, não se pode ter a aquisição de espectro de massa em modo IDA

Embora estes achados indiquem que as serpentes capturadas são efetivamente da espécie *B. moojeni*, existem outras evidências que apontam a necessidade de mais dados para tal afirmação. Dos BPPs encontrados na peçonha das serpentes coletadas, somente 7 de 15 moléculas foram previamente reportadas, em estudo abrangente e exaustivo realizado na literatura²⁸. Desta forma, é possível afirmar que há sobreposição parcial dos BPPs encontrados nos indivíduos coletados com serpentes da espécie *B. moojeni* e que o indivíduo em questão deve ser mais profundamente estudado para que seja feita tal afirmação.

4.5. – Síntese em Fase Sólida (SPFS) de BPPs de *Bothrops sp.*

Com base na caracterização por Espectrometria de Massa dos peptídeos provenientes da fração menor que 10 kDa da peçonha do exemplar capturado, foram selecionados para a síntese 3 peptídeos que coincidiram com os peptídeos já descritos na literatura para a espécie *B. moojeni*:

Tabela 5: Sequência dos aminoácidos dos peptídeos escolhidos para a síntese e sua massa monoisotópica

| Nome | PEPTÍDEOS | Massa Monoisotópica (Da) Experimental | Massa Monoisotópica teórica (Da) |
|------|----------------|---------------------------------------|----------------------------------|
| Bs01 | pEKWPGPKVPP | 1115.60 | 1115.60 |
| Bs02 | pEKWPRPGPEIPP | 1383.73 | 1383.72 |
| Bs03 | pEGGWPRPGPEIPP | 1369.68 | 1369.71 |

A síntese do peptídeo Bs01 foi primariamente feita utilizando a resina de Wang. Após análise por espectrometria de massa MALDI-TOF MS e MS/MS do produto bruto de síntese, percebeu-se que o peptídeo efetivamente sintetizado tem massa diferente da teórica, com $[M+H]^+ = 922.47$ Da ($[M+H]^+$ teórico = 1116,64 Da). O espectro de MS/MS do peptídeo investigado aponta ainda a falta do íon de m/z de 213.13, o que indica a ausência do dipeptídeo Pro-Pro em sua porção C-terminal (Figura 47). Conforme já descrito na literatura, acredita-se ter havido a ciclização dos dois resíduos sequenciais presentes na porção “C”

terminal de Prolina-Prolina, formando a dicetopiperazina (Figura 46), a qual é clivada da resina e deixa uma hidroxila livre, a qual torna-se então sítio de acoplamento do aminoácido correspondente ao terceiro ciclo, neste caso, a Valina.

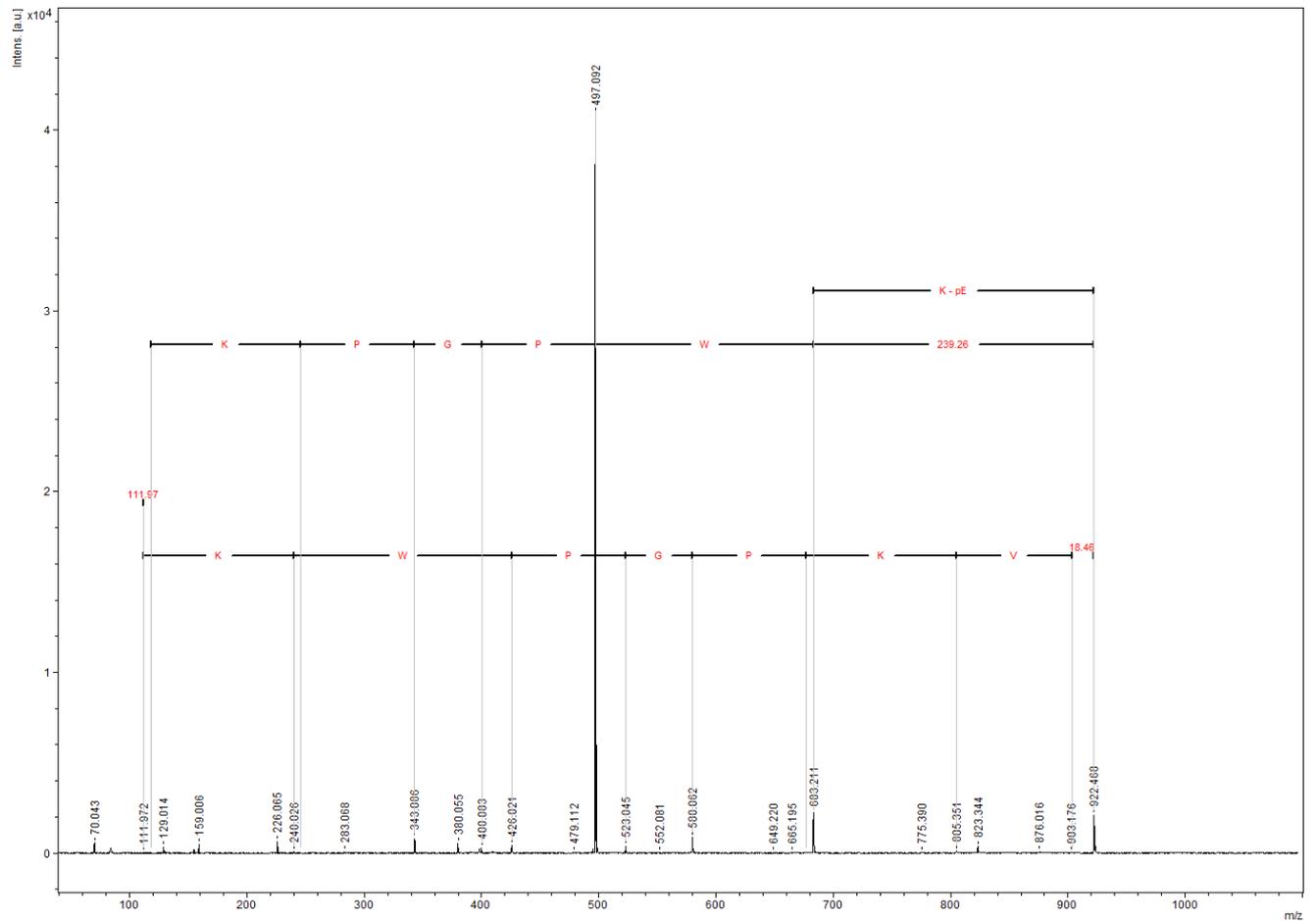


Figura 46: Espectro de MS/MS do peptídeo Bs01 de massa monisotópica teórica $[M+H]^+ = 1116.60$ Da sem o di-aminoácido Prolina-Prolina (PP)

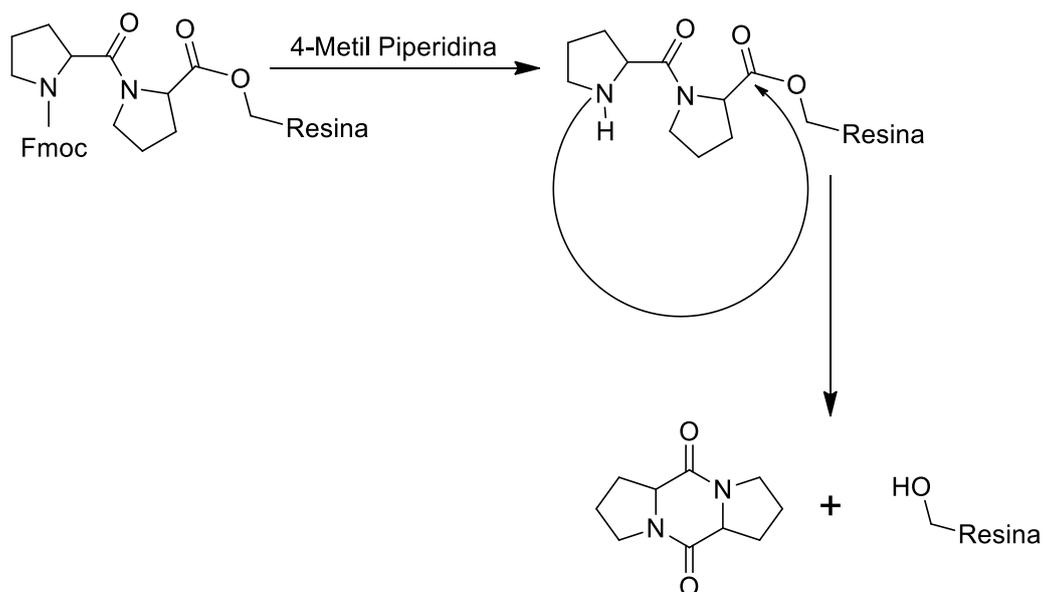


Figura 47: Desproteção do segundo aminoácido e posterior ciclização e formação da dicetopiperazina.

A formação da dicetopiperazina ocorre quando se faz a desproteção do segundo aminoácido gerando um Nitrogênio livre, ou seja, sem o grupo protetor Fmoc (Figura 37). O Nitrogênio ataca a carbonila do primeiro resíduo, deixando a Resina livre, onde o próximo aminoácido (terceiro da sequência de síntese) age como se fosse o primeiro. Esse efeito de ciclização e formação da Diketopiperazina só é observado na desproteção do segundo aminoácido, não ocorrendo a ciclização quando se faz a desproteção do terceiro resíduo em diante³⁷.

Para contornar esse problema de síntese, foi escolhida uma resina específica, a H-Pro-2-CITrt Resin (Figura 48), que dificulta essa indesejada ciclização (muito provavelmente pelo efeito estérico que dificulta a aproximação do Nitrogênio do segundo resíduo de aminoácido no ataque a Carbonila do primeiro aminoácido).

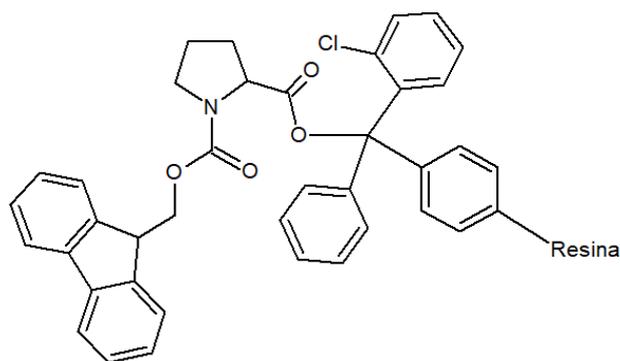


Figura 48: Resina 2-Cloro Trytil (Fmoc-Pro-2-Cl-Trt) com o aminoácido Prolina já acoplado.

A síntese do peptídeo Bs01 foi então refeita utilizando a resina 2- cloro trityl seguindo o protocolo de síntese de peptídeos já mostrada no presente trabalho. Após a purificação por HPLC foi identificado, com auxílio de espectrometria de massa com Ionização por Eletrospray, ESI-MS, em qual das frações correspondentes aos sinais presentes no cromatograma se encontrava o peptídeo sintetizado.

Esse mesmo modo de síntese, com os mesmos métodos e a mesma resina, foi utilizado para a síntese dos outros dois peptídeos escolhidos, Bs02 e Bs03. A tabela 6 lista a massa bruta dos peptídeos pós síntese, obtidas após a clivagem da resina e liofilização, e também as massas dos peptídeos após a purificação por HPLC em escala preparativa e liofilização, prontos para os testes biológicos.

Tabela 6: Sequências dos aminoácidos dos peptídeos sintetizados, sua massa após a clivagem e após a purificação.

| PEPTÍDEOS | MASSA DO PEPTÍDEO BRUTO (mg) | MASSA DO PEPTÍDEO PURIFICADO (mg) |
|----------------|------------------------------|-----------------------------------|
| pEKWPGPKVPP | 47,18 | 15,02 |
| pEKWPRPGPEIPP | 79,44 | 36,88 |
| pEGGWPRPGPEIPP | 81,00 | 15,51 |

4.6 – Purificação e Análise dos produtos de síntese

Os BPPs Bs01, Bs02 e Bs03 foram submetidos a purificação por HPLC em escala preparativa, utilizando como fase móvel Água milliQ e acetonitrila, ambos com 0,1% (v/v) de Ácido Trifluoracético. Bs01 teve um tempo de eluição de 25,75 minutos, correspondente ao pico de maior absorbância do cromatograma. Pelo cromatograma obtido (Figura 49) pode-se afirmar que a síntese foi efetiva, porém, alguns subprodutos foram formados.

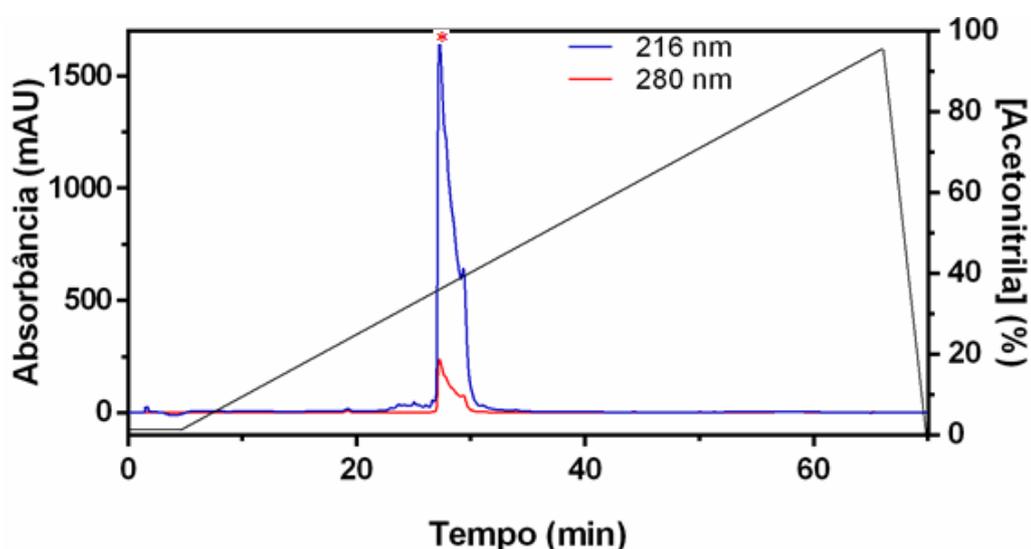


Figura 49: Cromatograma do peptídeo Bs01, monitorado no comprimento de onda 216nm e 280nm. O asterisco destaca o sinal referente ao tempo de eluição do peptídeo, mostrando que teve um ponto de eluição de 25,75 minutos. Foi utilizado um gradiente de 5 min. A 0% acn, 0-95% em 60 min. E 95-0% em 5 min.

Bs02 teve um tempo de eluição de 27,80 minutos, correspondente pico de maior absorbância do cromatograma (Figura 50). Pode-se afirmar com base em seu cromatograma que a síntese foi efetiva, gerando majoritariamente o peptídeo de interesse e poucos subprodutos.

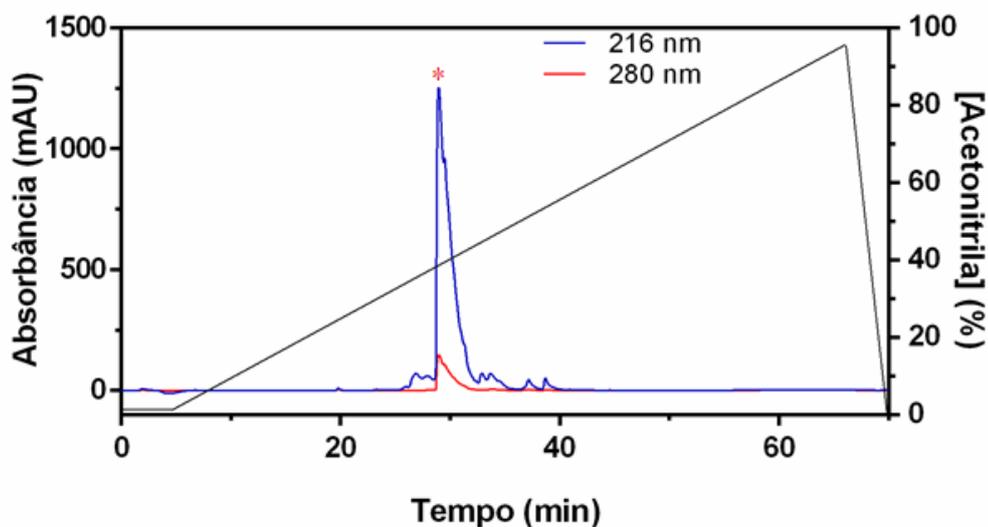


Figura 50: Cromatograma do peptídeo sintetizado 2, monitorado no comprimento de onda 216nm e 280nm. O asterisco destaca o sinal referente ao tempo de eluição do peptídeo, mostrando que teve um ponto de eluição de 27,80 minutos. Foi utilizado um gradiente de 5 min. A 0% acn, 0-95% em 60 min. E 95-0% em 5 min..

O peptídeo sintetizado Bs03 teve um tempo de eluição de 28,60 min. Correspondendo ao sinal de maior absorbância do cromatograma (Figura 51). Com a análise do cromatograma, pode-se inferir que a síntese foi eficaz, formado poucos produtos secundários, onde pelo método empregado, foi possível sua adequada separação.

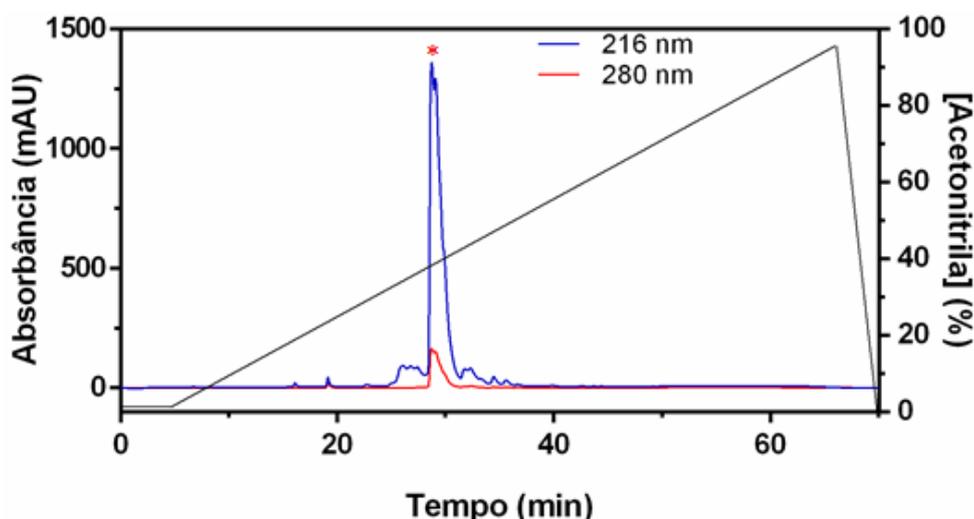


Figura 51: Cromatograma CLAE do peptídeo sintetizado 3, monitorado no comprimento de onda 216nm e 280nm. O asterisco destaca o sinal referente ao peptídeo de interesse com tempo de eluição de 28,60 minutos. Foi utilizado um gradiente de 5 min. A 0% acn, 0-95% em 60 min. E 95-0% em 5 min..

4.6.1-Análise de possível múltipla conformação dos peptídeos sintetizados

Pode-se observar pelos cromatogramas obtidos a partir dos peptídeos sintéticos, assim como no LC-MS feito da peçonha da serpente (Figura 34), que alguns peptídeos tem mais de um tempo de retenção, ou seja, apresentaram um duplo pico ou apresentavam um sinal com uma base larga, sugerindo coeluição. Essa provável coeluição pode ser resultado da presença de resíduos de D-aminoácido ou de múltiplas conformações termodinamicamente acessíveis, que pode ocorrer em peptídeos pequenos, flexíveis e altamente desordenados.

Counterman e Clemmer em 2002 ⁴⁸, foram os primeiros a revelar que os peptídeos contendo prolina eram mais propensos a exibir mais picos em experimentos de mobilidade iônica que os peptídeos sem prolina. A pesquisa acabou por sugerir que a presença de múltiplos picos surgia de populações CIS-prolina e TRANS-prolina, acabando por concluir que a presença desses isômeros CIS ou TRANS – prolina era comum em análises de peptídeos que continham prolina em sua estrutura.

Um estudo posterior realizado por Pierson *et al* ⁴⁹, utilizando a técnica de mobilidade iônica juntamente com espectrometria de massa, realizado com um peptídeo com prolina e outro idêntico mas sem a prolina, demonstrou que a prolina é o único aminoácido com capacidade apreciável de fazer transições CIS-TRANS, gerando assim estruturas tridimensionais diferentes para a mesma sequência de aminoácidos.

Ainda o estudo de mobilidade iônica aliado a espectrometria de massa de peptídeos desenvolvido por Nicholas *et al.* ⁵⁰ utilizou uma série de sete análogos de peptídeos em que as combinações presentes de alanina são substituídos por prolina, onde os dados obtidos por espectrometria de massa – mobilidade iônica mostrou que as múltiplas estruturas estão associadas a diferentes combinações CIS/TRANS dos resíduos de prolina.

Todos esses dados corroboram para um maior aprofundamento a respeito das possíveis conformações estruturais que esses peptídeos apresentam e o papel que essas estruturas podem gerar na potencialidade e nas interações intermoleculares que os peptídeos ricos em prolina podem apresentar.

4.6.2-Análise dos BPPs sintéticos por espectrometria de massa

Foi usada Espectrometria de Massa para se determinar, após a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, se a massa dos BPPs sintéticos correspondia a massa do peptídeo sequenciado proveniente da fração de baixa massa molecular da *Bothrops sp.* e para se determinar o quão eficiente foi a purificação CLAE.

Os espectros de MS e MS/MS mostrados abaixo (Figuras 52 a 57), correspondem ao pico de maior sinal do cromatograma, comprovando que se trata do peptídeo sintetizado de interesse e mostra o grau de pureza do peptídeo purificado. Com base nos espectros de MS, é possível observar que os peptídeos sintetizados apresentam contaminantes, sendo Bs03 o peptídeo que apresenta um melhor estado de pureza. Este foi encaminhado para testes em anéis de aorta de ratos na Universidade Federal do Piauí (UFPI) em caráter preliminar, com seus resultados discutidos mais à frente no trabalho. Os BPPs sintéticos serão submetidos a mais etapas de purificação antes da realização das próximas etapas do trabalho.

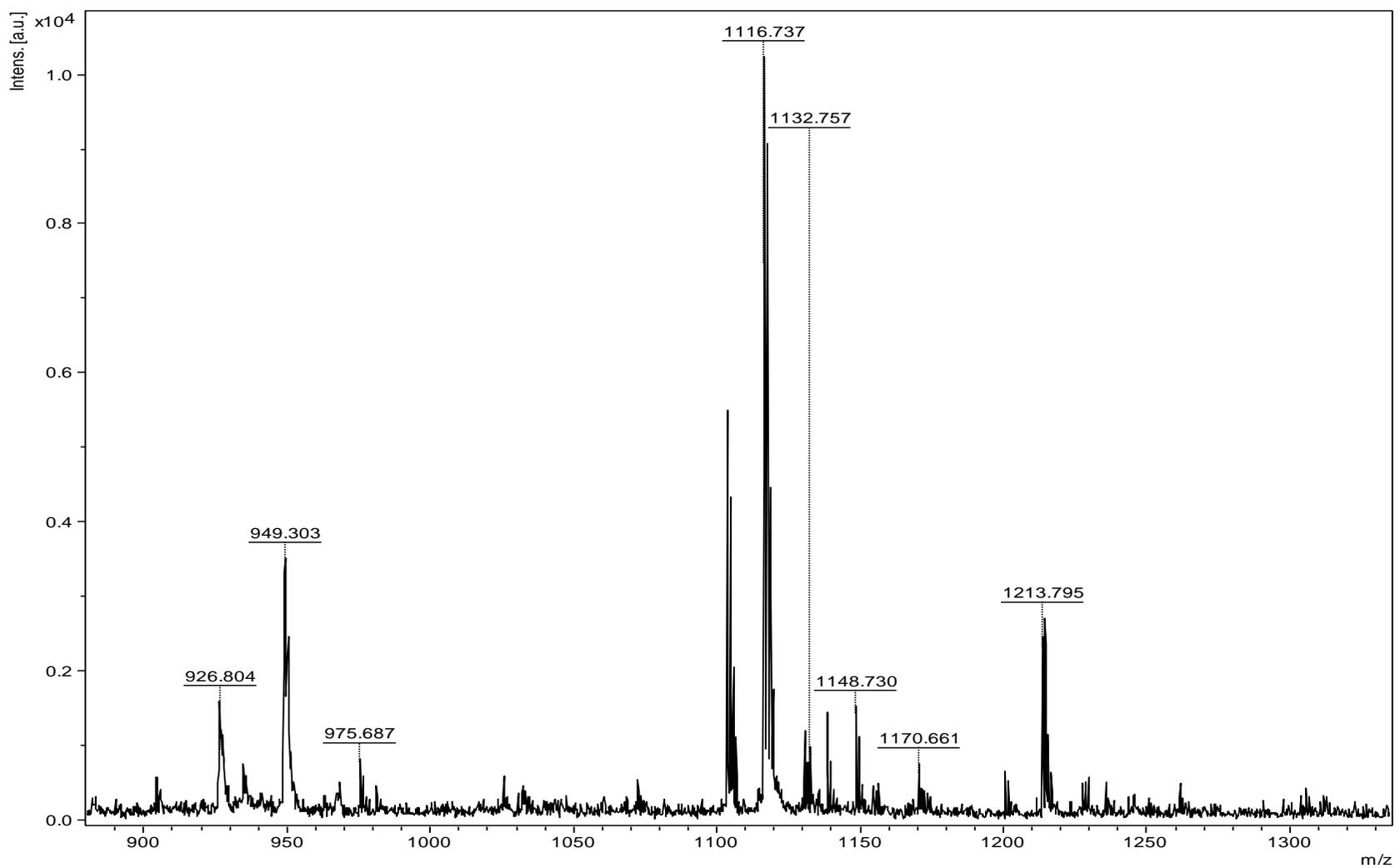


Figura 52: Espectro de MS de Bs01 obtido por MALDI-TOF MS em modo refletor, após a purificação por CLAE em escala preparativa. O íon predominante de $[M+H]^+ = 1116.73$ Da é referente ao peptídeo sintetizado.

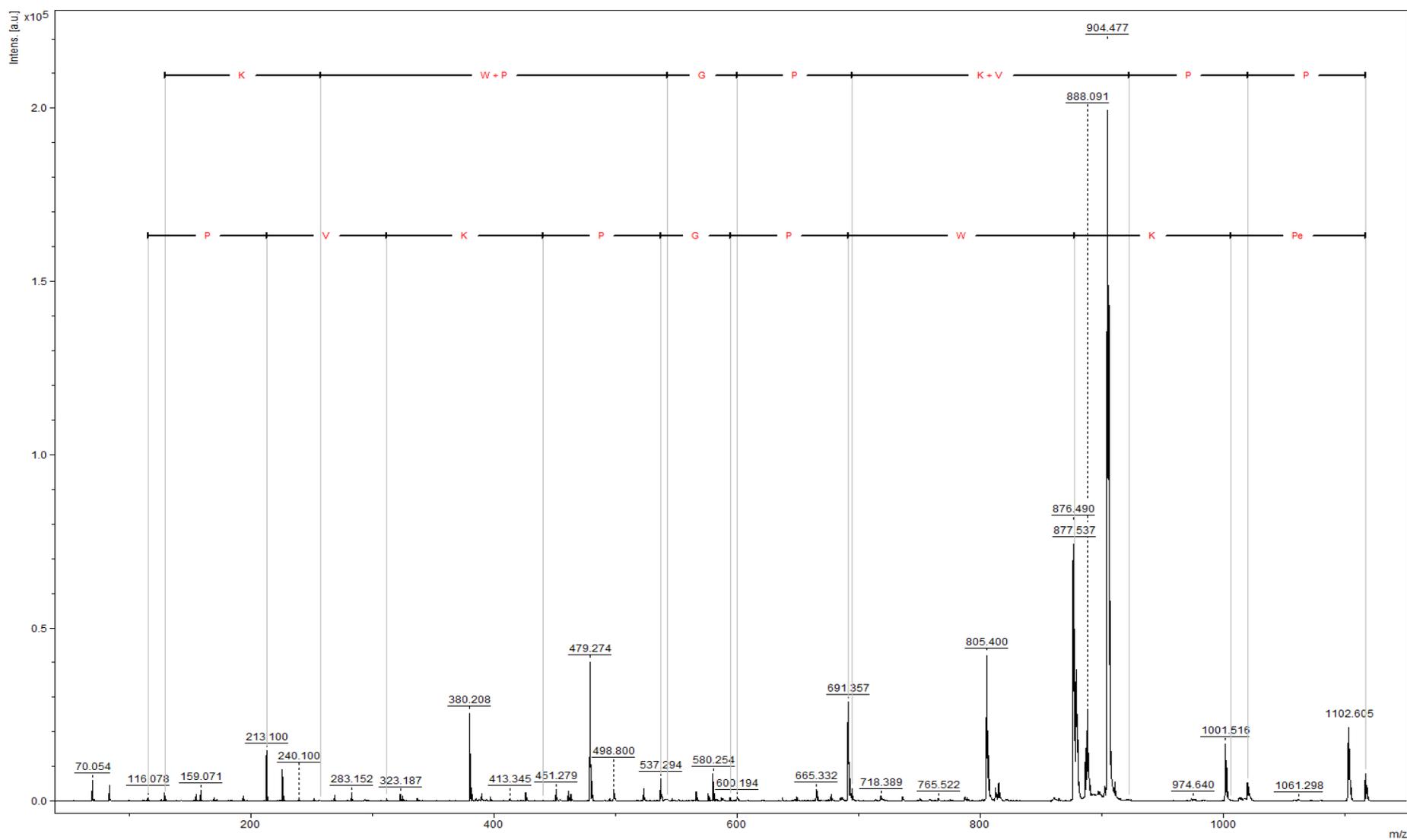


Figura 53: Espectro de MS/MS do peptídeo Bs01, $[M+H]^+ = 1116.73$ Da, podendo-se confirmar que foi sintetizado na sequência correta pré-determinada.

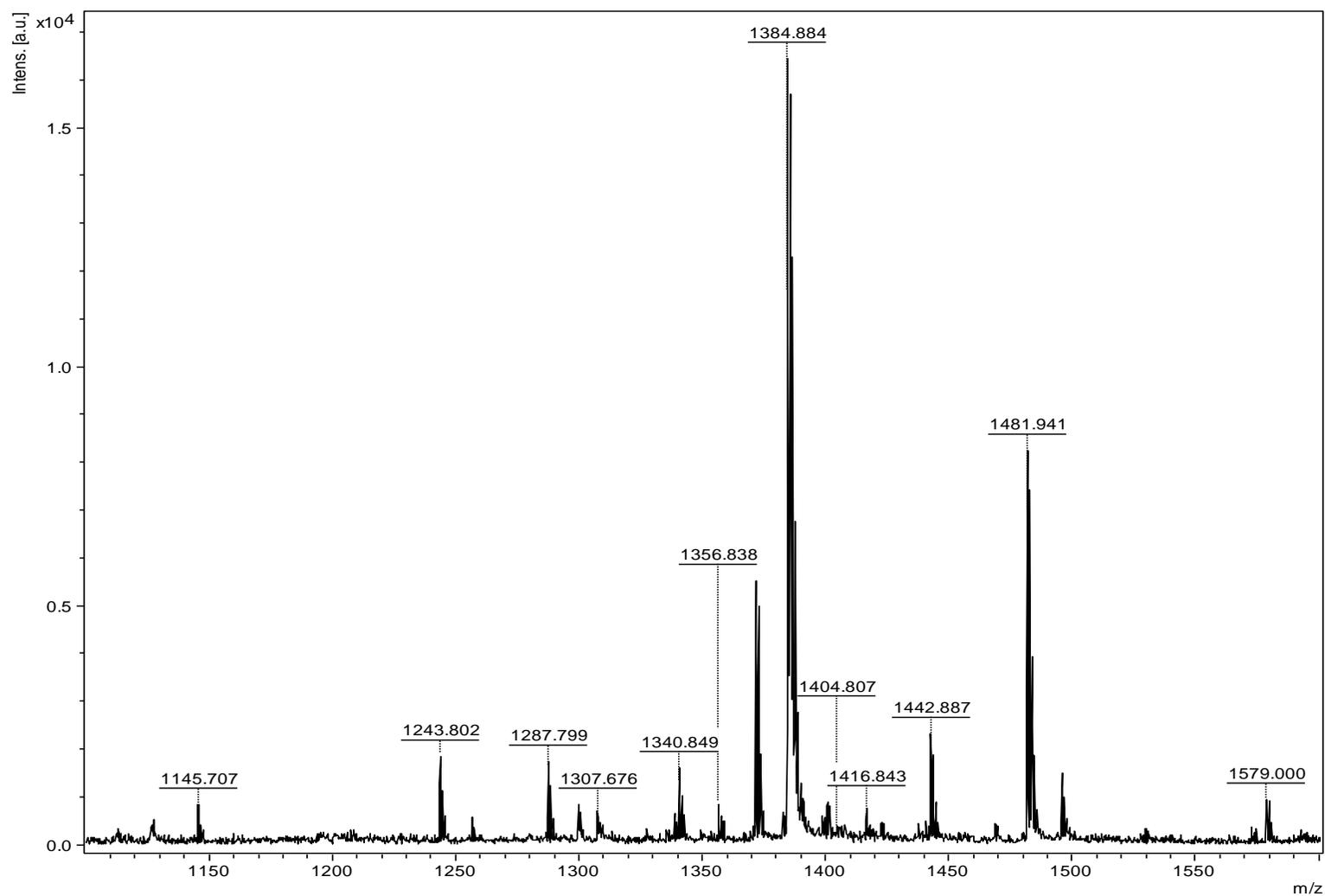


Figura 54: Espectro de MS de Bs02 obtido por MALDI-TOF MS em modo refletor, após a purificação por CLAE em escala preparativa. O íon predominante de $[M+H]^+ = 1384.88$ Da é referente ao peptídeo sintetizado.

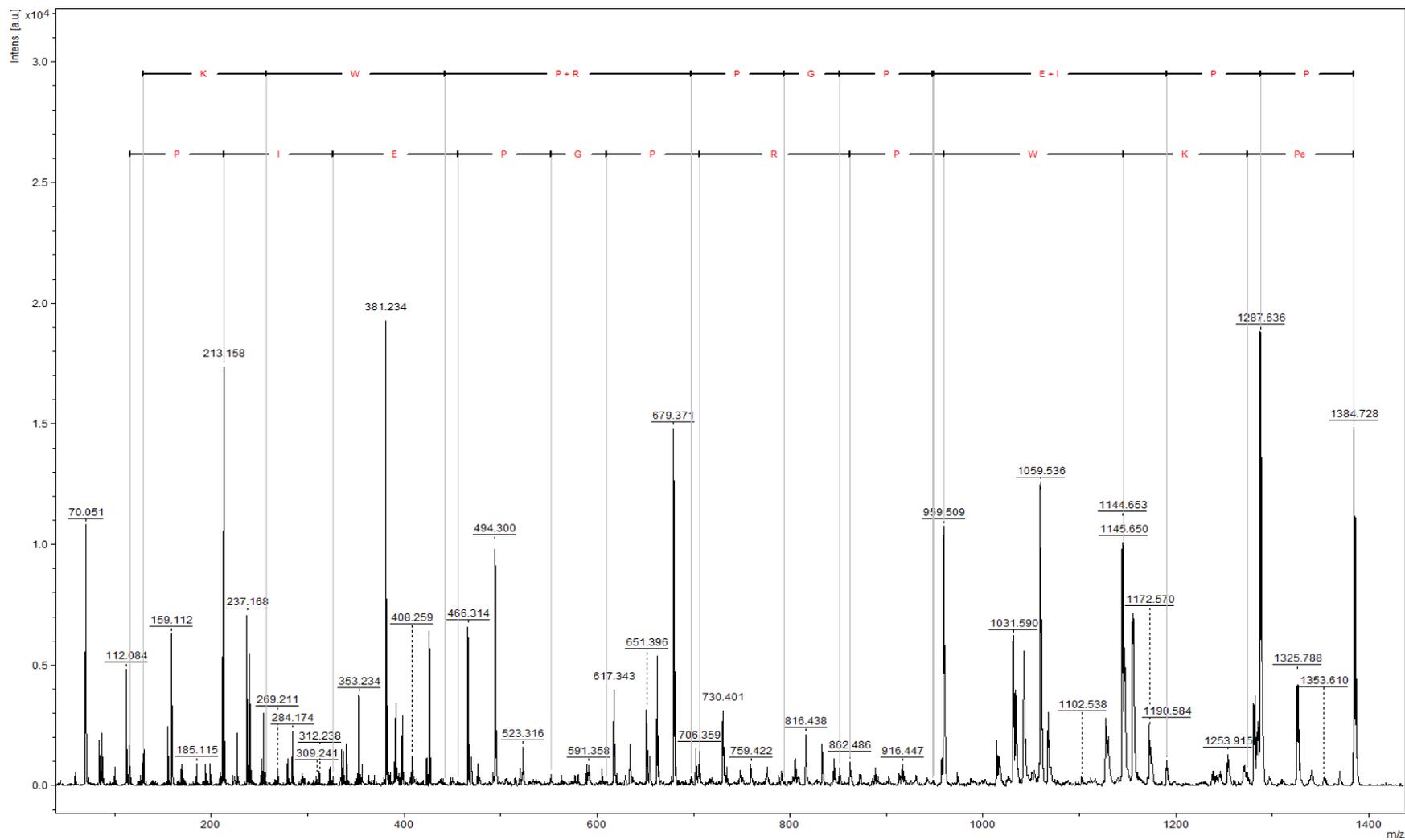


Figura 55: Espectro de MS/MS do peptídeo Bs02, $[M+H]^+ = 1384.88$ Da, podendo-se confirmar que foi sintetizado na sequência correta pré-determinada.

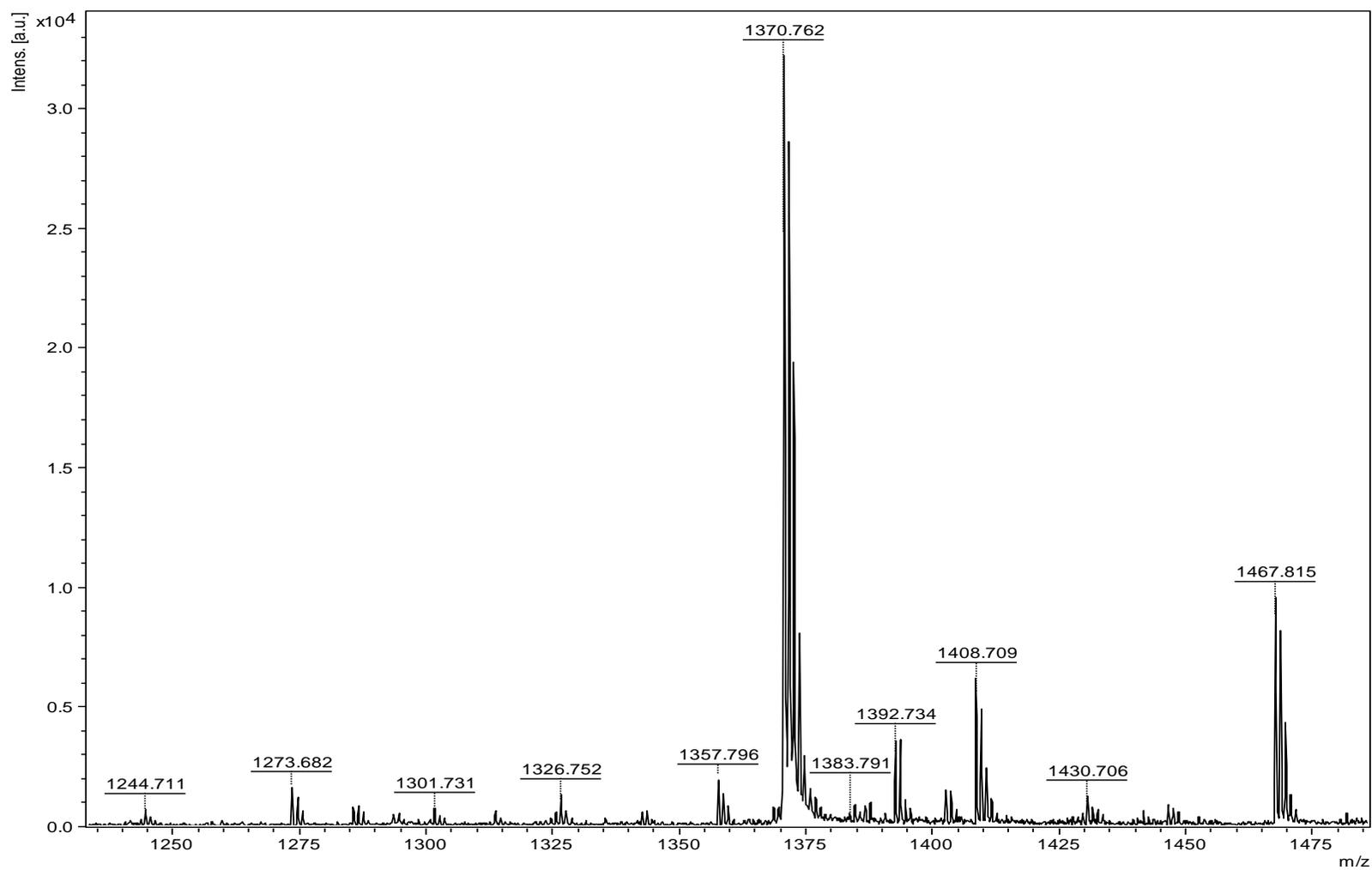


Figura 56: Espectro de MS de Bs03 obtido por MALDI-TOF MS em modo refletor, após a purificação por CLAE em escala preparativa. O íon predominante de $[M+H]^+ = 1370.76$ Da é referente ao peptídeo sintetizado.

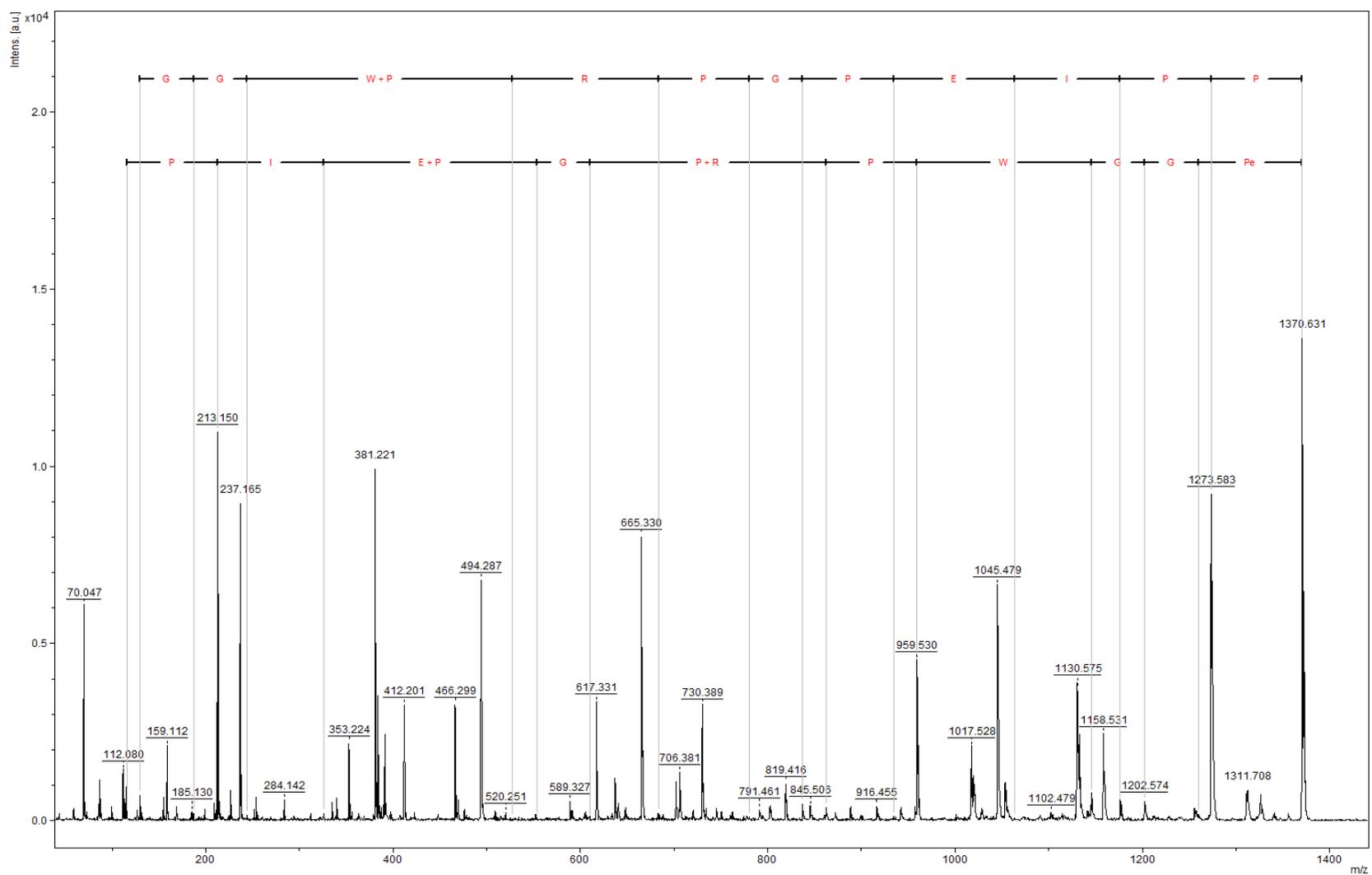


Figura 57: Espectro de MS/MS do peptídeo Bs03, $[M+H]^+$ 1370.76 Da, podendo-se confirmar que foi sintetizado na sequência correta pré-determinada.

Pode-se afirmar com base nos espectros de massa adquiridos, após a realização de CLAE, que a síntese dos peptídeos de interesse foi efetiva, carecendo, contudo, ainda de melhor purificação.

4.7 – Ensaios Farmacológicos Preliminares de Vasodilatação

4.7.1 Análise do Efeito Vasorelaxante do peptídeo Bs03 em Artéria Mesentérica de Ratos

Foram realizados testes preliminares de ação vasorelaxante em anéis de aorta de ratos, primeiramente com o peptídeo Bs03, o qual apresentou um maior grau de pureza dos peptídeos sintetizados. Os testes preliminares utilizaram concentrações do BPP variando de 1×10^{-9} a 3×10^{-6} mol.L⁻¹ e a análise da redução da resistência vascular. Foram realizados testes controle, apenas com os anéis sem a presença do peptídeo e anéis de aorta com o peptídeo em concentrações diferentes, no qual foi utilizado um transdutor de força, onde foi induzida uma pré-contracção com agente contrátil, no caso a fenilefrina, sem a presença do BPP, e testes utilizando o BPP nos anéis com endotélio e sem endotélio, que é uma camada que reveste internamente os vasos sanguíneos, sendo responsável pela mediação de alguns mecanismos de resposta a vasoconstrição.

Com os dados obtidos foi montado um gráfico (Figura 58). Neste, observa-se que não houve uma ação vasorelaxante significativa induzida pelo BPP, em comparação com o controle, nos anéis de aorta com ou sem endotélio. A queda de tensão observada na curva de controle (curva contrátil) se dá pela própria resposta fisiológica, sendo que uma relaxação de 10 a 15% é considerada normal, analisando a capacidade do peptídeo de gerar um vasorrelaxamento além desse valor.

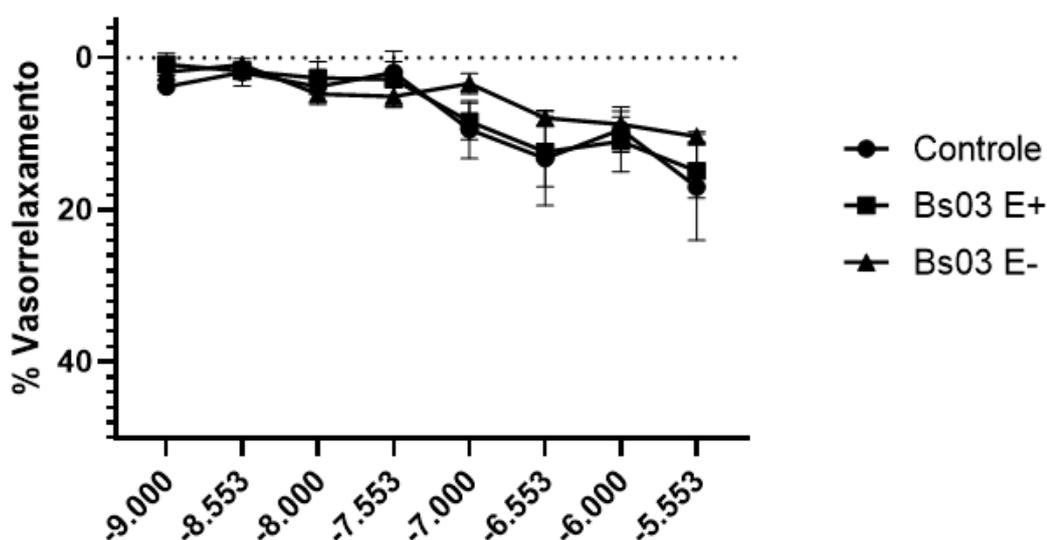


Figura 58: Percentual de vasorrelaxamento induzido pelo peptídeo Bs03 em função do logaritmo de concentração. As curvas indicadas por E+ e E- é referente ao teste de vasorrelaxamento em aortas com endotélio e sem o endotélio respectivamente. Não houve significativo efeito de relaxação dos anéis com a administração do BPP.

Pode-se inferir a partir dos dados preliminares obtidos que o BPP no protocolo utilizado no experimento pode ter tido uma meia-vida muito curta ou que a ação não teve como alvo a ECA nem a ação como antagonista do receptor de vasodilatação B2. Estudos demonstram que a vasodilatação causada pelo BPP é mais significativa em anéis de aorta com uma contração induzida, condições que serão feitas nos próximos experimentos^{51,52}.

O resultado obtido utilizando esse tipo de protocolo já é esperado para BPPs em testes preliminares de ação vasorrelaxante, como já foi demonstrado na literatura⁵¹ (Figuras 59 e 60) onde foi utilizado o BPP-5a, um pentapeptídeo, que teve sua resposta dependente do endotélio, no entanto, em uma porcentagem de vasodilatação abaixo dos 20%, aproximadamente na mesma faixa do resultado obtido nos testes preliminares. Porém, quando o teste foi realizado em anéis de aorta de ratos com hipertensão a resposta de vasorrelaxamento foi consideravelmente mais pronunciada.

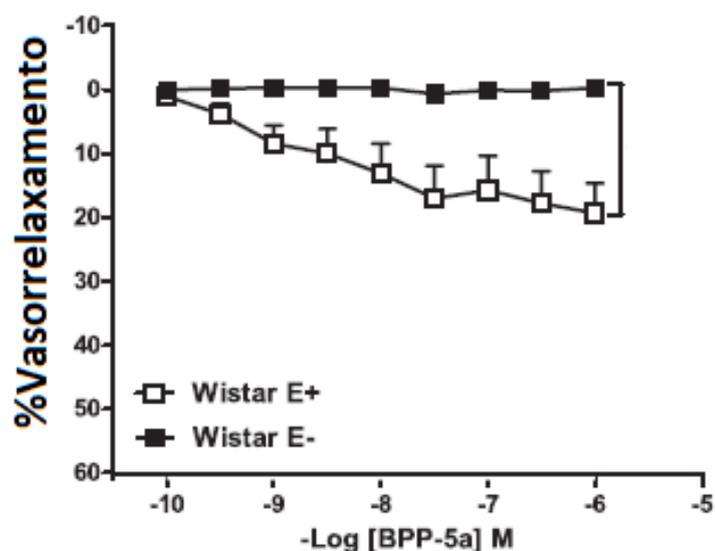


Figura 59: Porcentagem de vasorrelaxamento aferida em anéis de aorta de ratos Wistar com e sem endotélio, E+ e E- respectivamente, utilizando o pentapeptídeo BPP-5a. Observa-se um efeito mais pronunciado de vasodilatação para os anéis com endotélio, indicando uma dependência para ser gerado um processo de relaxamento⁵¹.

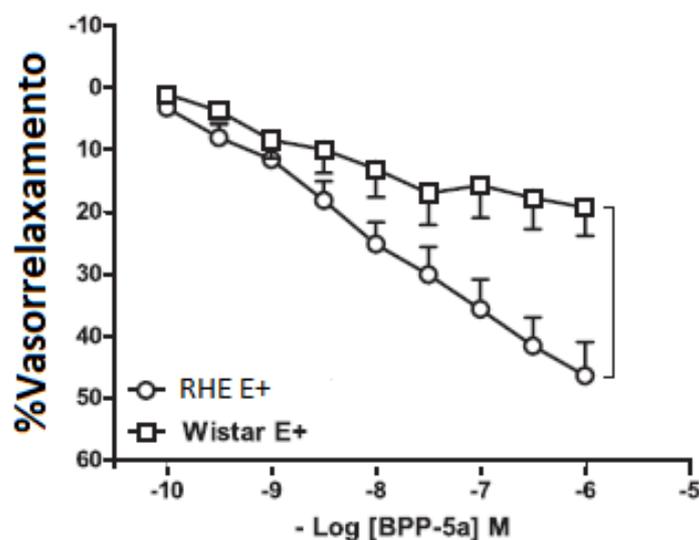


Figura 60: Resposta de vasorrelaxamento em porcentagem do peptídeo BPP-5^a em aortas de ratos Wistar com hipertensão espontânea e em aortas de ratos com endotélio sem hipertensão. Observa-se que o efeito de vasorrelaxamento foi mais pronunciado em aortas de ratos com hipertensão, mantendo a porcentagem abaixo dos 20% em artérias de ratos com endotélio sem hipertensão⁵¹.

As próximas etapas de testes incluirão a análise do potencial de vasorrelaxamento juntamente com Acetilcolina, neurotransmissor conhecido por induzir vasorrelaxamento na presença do endotélio e ainda o potencial de relaxação do BPP em anéis aortas com hipertensão induzidas por LPS.

5. CONCLUSÕES

Frente ao presente trabalho, pode-se perceber que a caracterização de peptídeos provenientes da fração de baixa massa molecular da peçonha de serpentes, no caso do gênero *Bothrops*, foi possível, apesar das dificuldades inerentes a esse tipo de peptídeo. Foi possível a caracterização de BPPs que já foram descritos na literatura, pertencentes a espécie *Bothrops moojeni*, além de novos peptídeos do tipo BPP cuja estrutura primária ainda necessita de confirmação.

A caracterização dos BPPs presentes na fração de baixa massa molecular da peçonha da serpente capturada mostrou 3 principais íons, $[M+2H]^{2+}$ 692.88, 685.84 e 558.82 Da, os quais são provenientes de peptídeos compatíveis com *Bothrops moojeni*. Não se pode ter uma confirmação do íon m/z 502 referente ao peptídeo VTVLEASER, proposto como marcador dessa espécie, devido sua baixa intensidade impedindo seu sequenciamento. Apenas 7 de 15 peptídeos encontrados na peçonha coincidem com peptídeos já reportados, desta forma, é possível afirmar que há sobreposição parcial dos BPPs encontrados nos indivíduos coletados com serpentes da espécie *B. moojeni* e que o espécime deve ser mais profundamente estudado para que seja feita a confirmação de espécie. Com isso torna-se necessário análises de outra natureza, como sequenciamento de DNA, para se ter uma maior certeza a respeito de qual espécie se trata a serpente capturada.

Não foi possível a síntese dos peptídeos selecionados utilizando a resina de Wang, devido a ciclização e formação de dicetopiperazina, que ocorre em alguns peptídeos que tem em seu segundo aminoácido um resíduo de prolina. Foi necessário utilizar a resina 2-Clorotryl que impede a ciclização e formação da dicetopiperazina, possivelmente pelo efeito estérico dos grupos fenila. A síntese utilizando a resina 2-Clorotryl se mostrou efetiva tendo como resultando poucos subprodutos, no entanto, a purificação dos peptídeos sintetizados, não foi eficiente, sendo ainda necessárias mais etapas de purificação.

Os testes farmacológicos preliminares utilizando o peptídeo Bs03 indicaram uma baixa atividade de vasodilatação com a utilização do protocolo escolhido para os testes, em comparação com o controle utilizado. Contudo, estes são resultados que até o momento são esperados para esses tipos de peptídeo. Serão realizados novos testes utilizando acetilcolina e um vasoconstritor LPS para a análise mais precisa do potencial vasodilatador do peptídeo em anéis de aorta de ratos.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

- 1) Repurificar por cromatografia os peptídeos Bs01, Bs02 e Bs03;
- 2) Finalizar os ensaios e analisar o potencial de vasodilatação com os três peptídeos sintetizados;
- 3) Analisar a provável dupla conformação dos peptídeos contendo prolina e o efeito com a interação com a ECA e a AsS.

BIBLIOGRAFIA

1. Robinson, S. D., Undheim, E. A. B., Ueberheide, B. & King, G. F. Venom peptides as therapeutics: advances, challenges and the future of venom-peptide discovery. *Expert Rev. Proteomics* **14**, 931–939 (2017).
2. Arcanjo, D. D. R. Vasconcelos A., A novel vasoactive proline-rich oligopeptide from the skin secretion of the frog *Brachycephalus ephippium*. *PLoS One* **10**, 1–19 (2015).
3. Bhat, Z. F., Kumar, S. & Bhat, H. F. Antihypertensive peptides of animal origin: A review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **57**, 566–578 (2017).
4. Henney, N. C. *Glenn F. King: Venoms to Drugs: Venom as a Source for the Development of Human Therapeutics. Chromatographia* **78**, (2015).
5. Rhaleb, N. E., Yang, X. P. & Carretero, O. A. The Kallikrein-Kinin system as a regulator of cardiovascular and renal function. *Compr. Physiol.* **1**, 971–993 (2011).
6. Morais, F. V., Molina, H. M., Borges, D. R. & Kouyoumdjian, M. Enzima inativadora de bradicinina liberada de fígado preservado ex-vivo. *Rev Ass Med Bras.* **45**, 19–23 (1999).
7. Brand, G. D. Estratégias para prospecção e predição de peptídeos bioativos. (2007).
8. Prado, G. N. Mechanisms regulating the expression, self-maintenance, and signaling-function of the bradykinin B2 and B1 receptors. *J. Cell. Physiol.* **193**, 275–286 (2002).
9. Cardiorrenal, F. *EQUIPE TECNICA DO PROJETO* : (2018).
10. Acharya, K. R., Sturrock, E. D., Riordan, J. F. & Ehlers, M. R. W. Ace revisited: A new target for structure-based drug design. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2**, 891–902 (2003).
11. FERREIRA, S. H. a Bradykinin-Potentiating Factor (Bpf) Present in the Venom of Bothrops Jararaca. *Br. J. Pharmacol. Chemother.* **24**, 163–169 (1965).
12. Wang, X., Wu, S., Xu, D., Xie, D. & Guo, H. Inhibitor and substrate binding by angiotensin-converting enzyme: Quantum mechanical/molecular mechanical molecular dynamics studies. *J. Chem. Inf. Model.* **51**, 1074–1082 (2011).
13. Kaschina, E. & Unger, T. Angiotensin AT1/AT2 receptors: Regulation, signalling and function. *Blood Press.* **12**, 70–88 (2003).
14. Schindler, C., Bramlage, P., Kirch, W. & Ferrario, C. M. Role of the vasodilator peptide angiotensin-(1-7) in cardiovascular drug therapy. *Vasc. Health Risk Manag.* **3**, 125–137 (2007).
15. Ianzer, D. *et al.* Identification of five new bradykinin potentiating peptides (BPPs)

- from Bothrops jararaca crude venom by using electrospray ionization tandem mass spectrometry after a two-step liquid chromatography. *Peptides* **25**, 1085–1092 (2004).
16. Bartelt, D. C. Isolation of Bradykinin-Potentiating Peptides from. **9**, 2583–2593
 17. Sciani, J. M. & Pimenta, D. C. The modular nature of bradykinin-potentiating peptides isolated from snake venoms. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases* **23**, (2017).
 18. Erdös, E. G. & Wohler, J. R. Inhibition in vivo of the enzymatic inactivation of bradykinin and kallidin. *Biochem. Pharmacol.* **12**, 1193–1199 (1963).
 19. Morais, K. L. P. Bj-PRO-5a, a natural angiotensin-converting enzyme inhibitor, promotes vasodilatation mediated by both bradykinin B2 and M1 muscarinic acetylcholine receptors. *Biochem. Pharmacol.* **81**, 736–742 (2011).
 20. Gavras, H. An Angiotensin Converting-Enzyme Inhibitor to Identify and Treat Vasoconstrictor and Volume Factors in Hypertensive Patients. *N. Engl. J. Med.* **291**, 817–821 (1974).
 21. Ashcroft, A. E. *An Introduction to Mass Spectrometry*. (2017).
 22. Hoffmann, E. *Mass spectrometry*. (2005).
 23. Patterton, H.-G. Low energy peptide fragmentation pathways. *Adv. Biomol. Res. Clust.* 1–25 (2009).
 24. In, L., Peptide, D. E. N., By, S. & Spectrometry, M. HHS Public Access. **34**, 43–63 (2016).
 25. Group, N. P. Furchgott and Zawadski 1980. doi:10.1038/288373*0
 26. Delmar, M. Marcelo Delmar Cantú e Emanuel Carrilho*. **31**, 669–675 (2008).
 27. Huo, D., Qin, T. & Zu, L. Energetic Switch of the Proline Effect in Collision-Induced Dissociation of Singly and Doubly Protonated Peptide Ala-Ala-Arg-Pro-Ala-Ala. doi:10.1002/jms.4311
 28. Menin, L. Favreau, P. High throughput screening of bradykinin-potentiating peptides in Bothrops moojeni snake venom using precursor ion mass spectrometry. *Toxicon* **51**, 1288–1302 (2008).
 29. Guerreiro, J. R. Lameu, C. Oliveira, C. Argininosuccinate synthetase is a functional target for a snake venom anti-hypertensive peptide. Role in arginine and nitric oxide production. *J. Biol. Chem.* **284**, 20022–20033 (2009).
 30. Nelson, D. L. & Cox, M. M. *Lehninger Principles of Biochemistry 6th ed. Book* (2013). doi:10.1016/j.jse.2011.03.016
 31. Husson, A., Brasse-Lagnel, C., Fairand, A., Renouf, S. & Lavoigne, A.

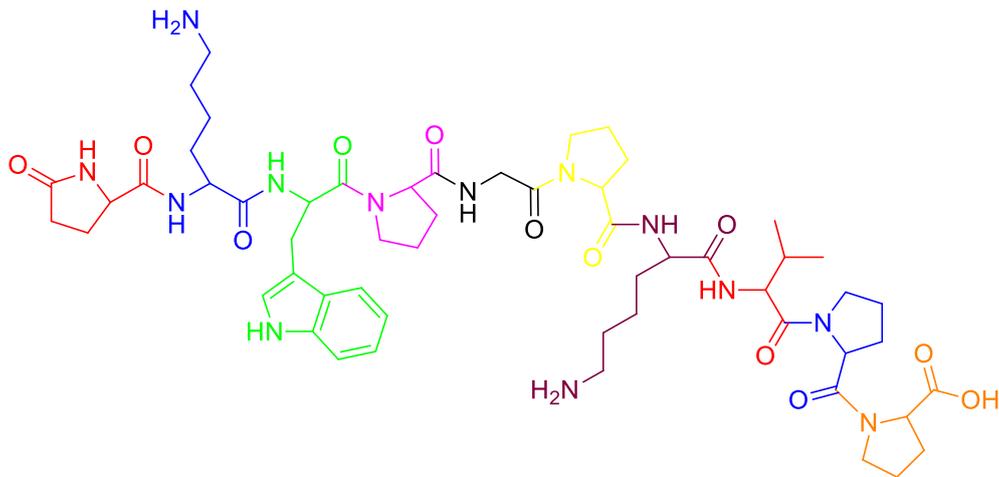
- Argininosuccinate synthetase from the urea cycle to the citrulline-NO cycle. *Eur. J. Biochem.* **270**, 1887–1899 (2003).
32. Nava, E. & Lüscher, T. F. Endothelium-derived vasoactive factors in hypertension: nitric oxide and endothelin. *J. Hypertens. Suppl.* **13**, S39-48 (1995).
 33. Sant’Ana Dusse, L. M., Vieira, L. M. & Carvalho, M. das G. Revisão sobre óxido nítrico. *J. Bras. Patol. e Med. Lab.* **39**, 343–350 (2003).
 34. Katsuki, S., Arnold, W., Mittal, C. & Murad, F. Stimulation of guanylate cyclase by sodium nitroprusside, nitroglycerin and nitric oxide in various tissue preparations and comparison to the effects of sodium azide and hydroxylamine. *J. Cyclic Nucleotide Res.* **3**, 23–35 (1977).
 35. Chan, W. & White, P. *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach*. (2000).
 36. Chan, W. & White, P. *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach*. Oxford University Press (2000).
 37. Goolcharran, C. & Borchardt, R. T. Kinetics of diketopiperazine formation using model peptides. *J. Pharm. Sci.* **87**, 283–288 (1998).
 38. Deppermann, N., Prenzel, A. H. G. P., Beitat, A. & Maison, W. Synthesis of proline-based diketopiperazine scaffolds. *J. Org. Chem.* **74**, 4267–4271 (2009).
 39. Kong, S., Application, F. & Data, P. (12) United States Patent. **2**, 12–15 (2011).
 40. Gustavo H.M. F. Souza, 1, 2* Rodrigo R. Catharino, 2 Demian R. Ifa, 2, 3 Marcos N. Eberlin² and & Hyslop¹, S. Peptide fingerprinting of snake venoms by direct infusion nano-electrospray ionization mass spectrometry: potential use in venom identification and taxonomy. *J. Mass Spectrom.* **43**, 854–864 (2008).
 41. Chem, J. A. *Molecular pharmacology*, 22:657-666. 657–666 (1982).
 42. Sá, L. G. gomes de. PROSPECÇÃO, SÍNTESE E APLICAÇÃO DE PEPTÍDEOS INTRAGÊNICOS ANTIMICROBIANOS NA CONSERVAÇÃO DE ALIMENTOS. (2018).
 43. Arcanjo, D. D. R. AVALIAÇÃO DO EFEITO VASORRELAXANTE DO EXTRATO ETANÓLICO DAS PARTES AÉREAS DE *Sida santaremnensis* H. Monteiro (Malvaceae) EM ARTÉRIA MESENTÉRICA ISOLADA DE RATO. 96 (2009). doi:10.1016/j.specom.2008.11.001
 44. Silva-Filho, J. C. Oliveira, M. Investigation of Mechanisms Involved in (–)-Borneol-Induced Vasorelaxant Response on Rat Thoracic Aorta. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **110**, 171–177 (2012).

45. Beck, A. Bussat M. Stability and CTL activity of N-terminal glutamic acid containing peptides. *J. Pept. Res.* **57**, 528–538 (2001).
46. Lee, V. H. L. Vincent Lee on integration of drug delivery and discovery. *Drug Discovery Today* **6**, 172–174 (2001).
47. Benoiton, N. L. & Group, F. *Chemistry of Peptide Synthesis*. Taylor & Francis Group (2006).
48. Counterman, A. E. & Clemmer, D. E. Peptides in the Gas Phase. **74**, 1946–1951 (2002).
49. Lietz, C. B. Chen, Z. Son, C. Multiple gas-phase conformations of proline-containing peptides: is it always cis/trans isomerization? 4863–4869 (2016).
doi:10.1039/c5an00835b
50. Pierson, N. A., Chen, L., Russell, D. H. & Clemmer, D. E. Cis – Trans Isomerizations of Proline Residues Are Key to Bradykinin Conformations. (2012).
51. Ianzer, D. Xavier, C. Fraga, F. BPP-5^a produces a potent and long-lasting NO-dependent antihypertensive effect. (2011). doi:10.1177/1753944711427318
52. Nunes, A. D. C., Alves, P. H., Mendes, E. P., Ianzer, D. & Castro, C. H. Peptides BJ - PRO-7^a and BJ -PRO-10C induce vasodilatation and inotropic effects in normotensive and hypertensive rats : Role of nitric oxide and muscarinic receptors. *Peptides* **110**, 1–9 (2018).

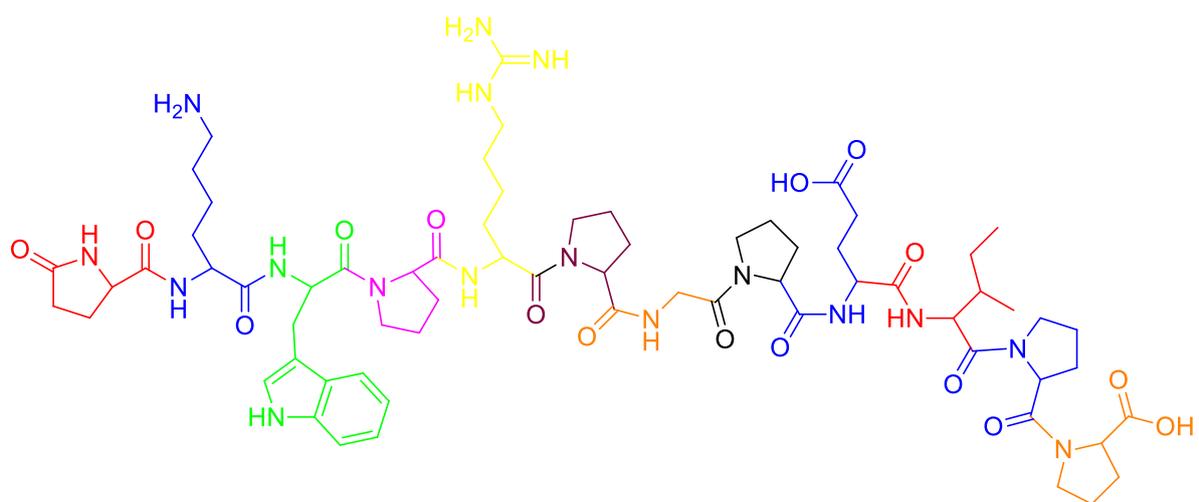
Anexo 1

Estrutura dos peptídeos sintetizados:

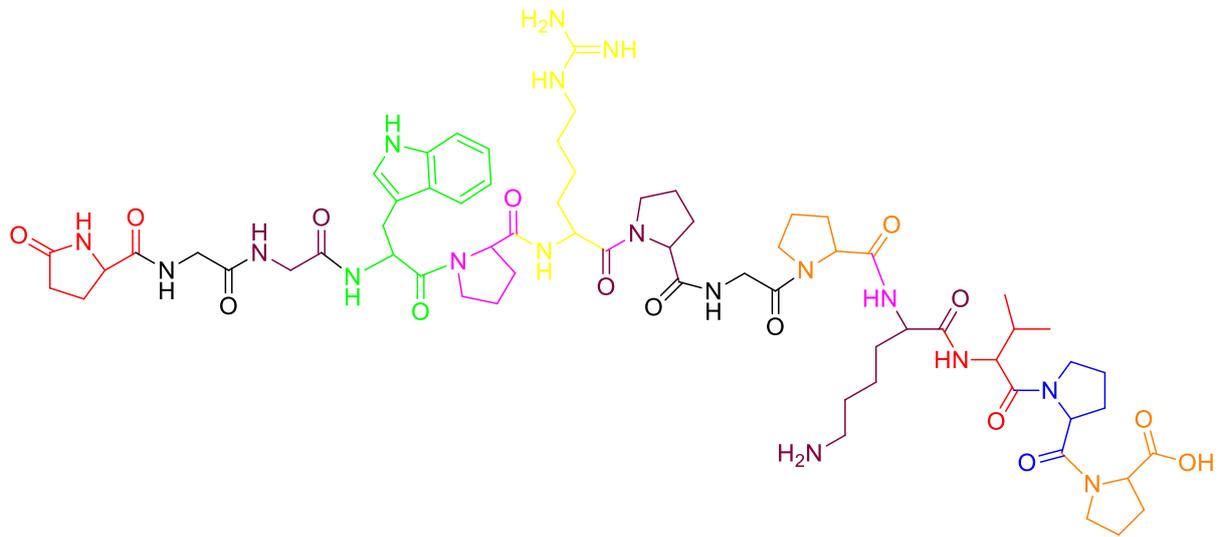
- Peptídeo 1 (pEKWPGPKVPP – 1115.60 Da)



- Peptídeo 2 (pEKWPRPGPEIPP – 1383.72 Da)



- Peptídeo 3 (pEGGWPRPGPEIPP – 1369.71 Da)



Anexo 2

Cadastro do exemplar *Bothrops sp.* capturado:

Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado

Número de cadastro: **AE5F104**

Usuário: **José Roberto de Souza de Almeida Leite**

CPF/CNPJ: **80478352115**

Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**

Data: **29/04/2018**

Anexo 3

Número de registro: **446/18**

Responsável: **Prof. Dr. Daniel Dias Rufino Arcanjo**

Finalidade: **Pesquisa Científica**

Vigência da Autorização: **01/07/2018 à 30/06/2020**

Espécie/Linhagem/Raça: **Rato Heterogênico Winstar**

Número de Animais: **170**

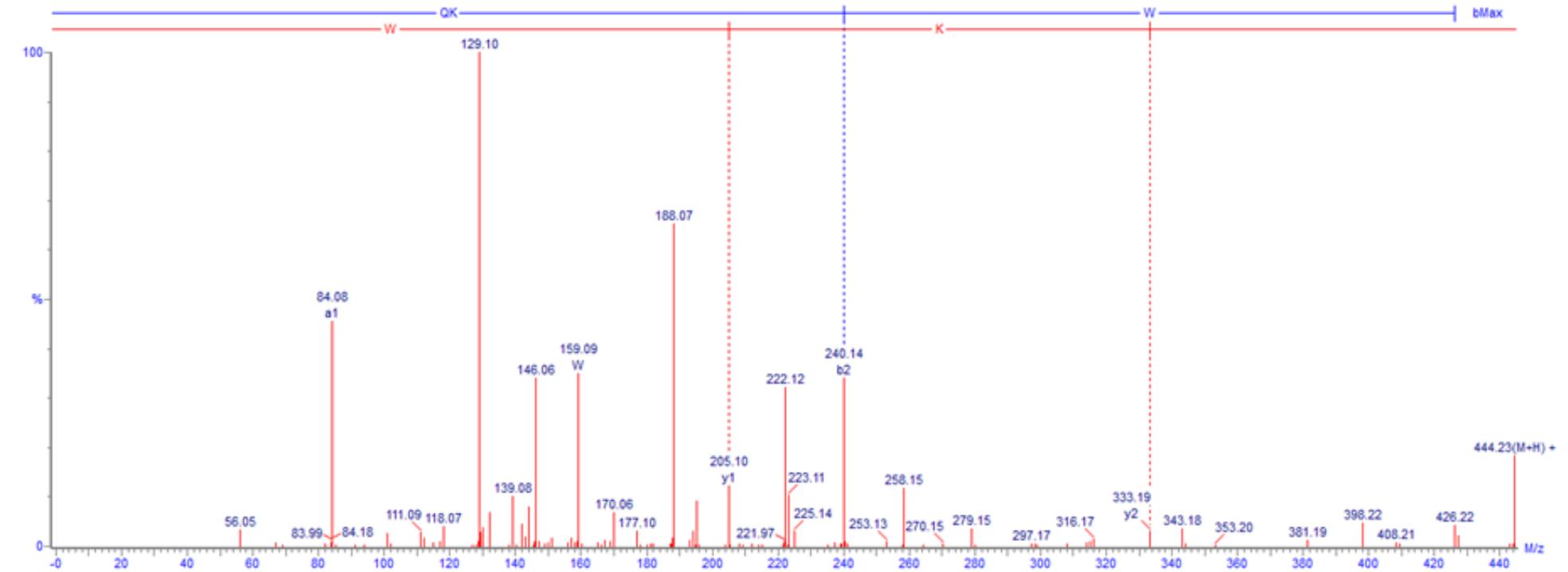
Peso/Idade: **180-200g**

Sexo: **Macho**

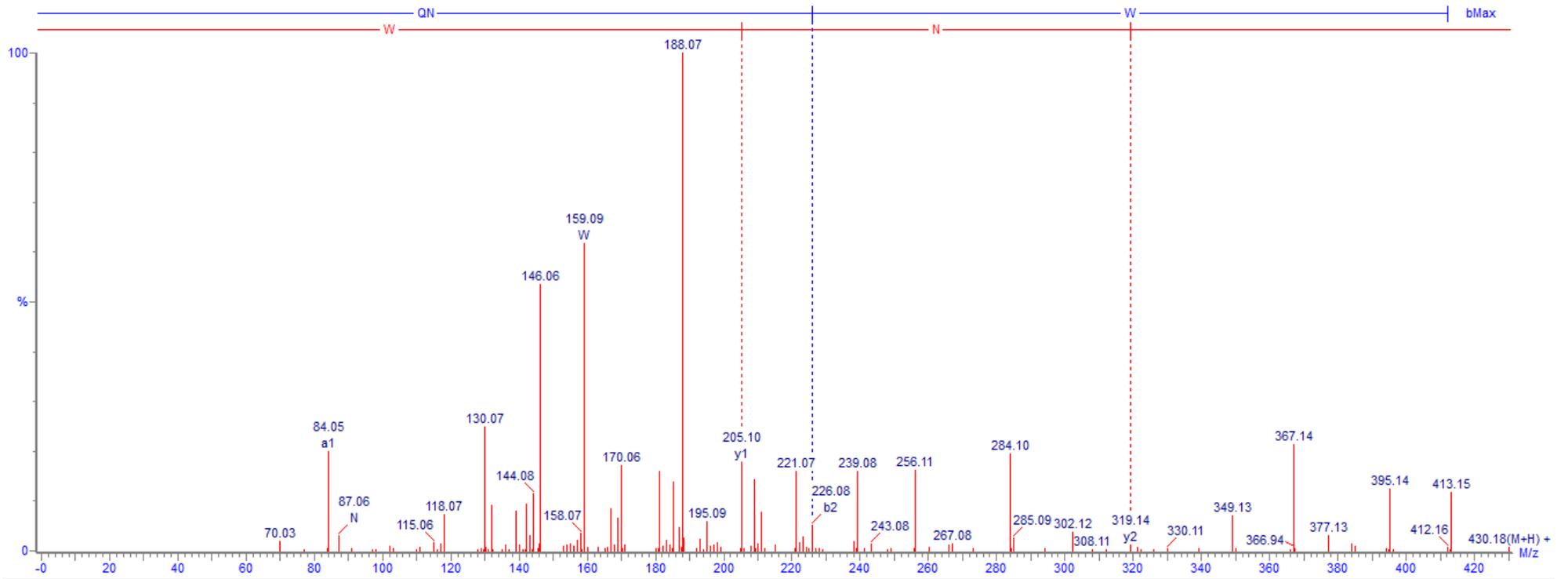
Origem: **Biotério Setorial da UFPI**

Aprovação pela CEUA/UFPI: **28/08/2018**

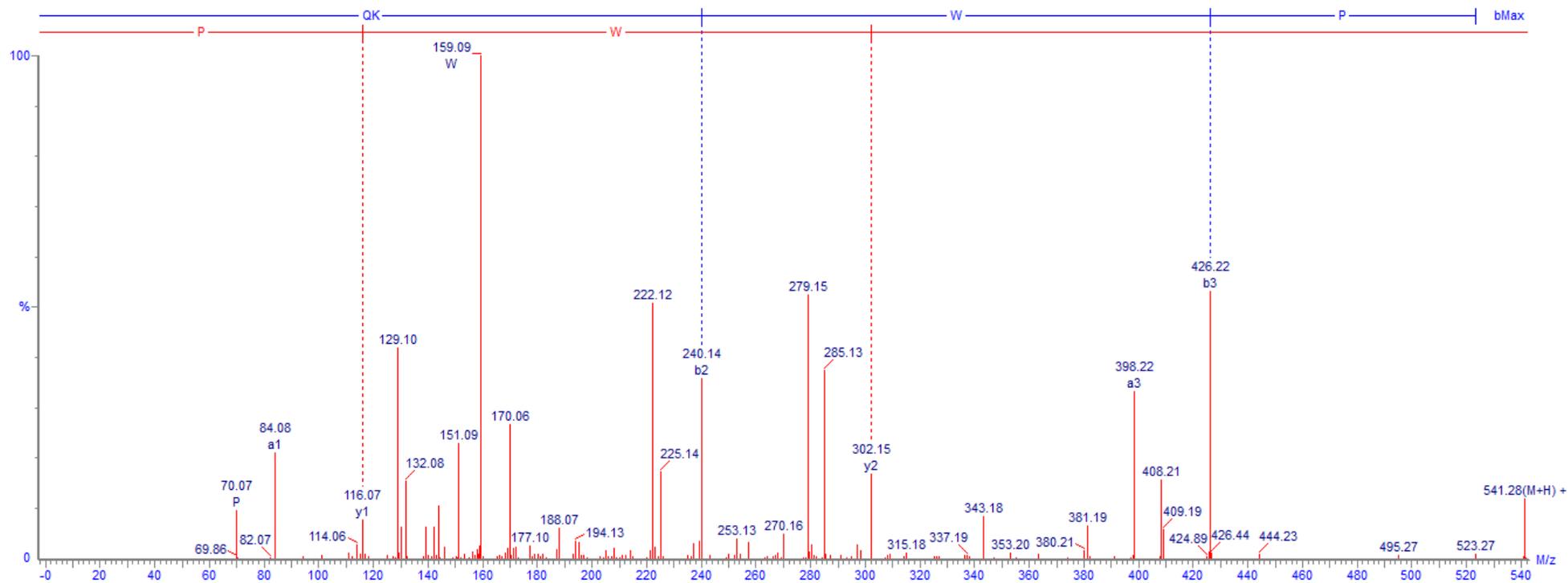
Anexo 4



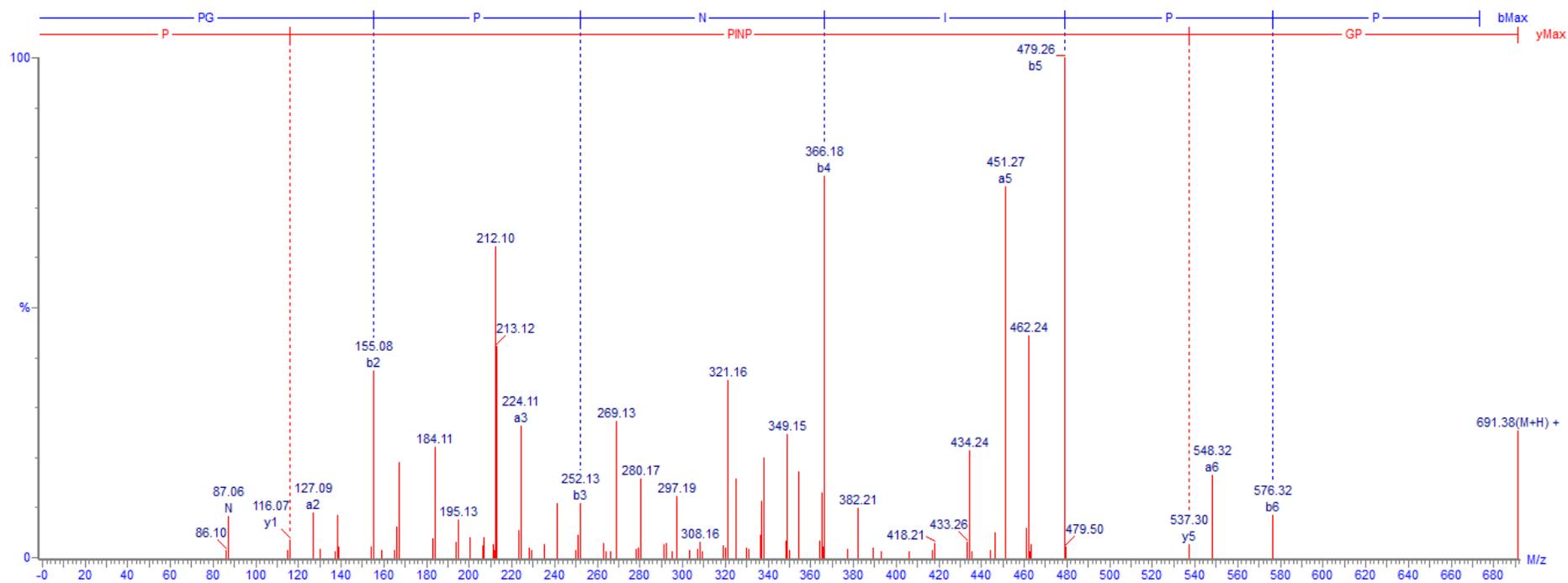
Espectro 1: Sequenciamento do peptídeo QKW (Q=pE) de $[M+H]^+ = 444.23$ Da



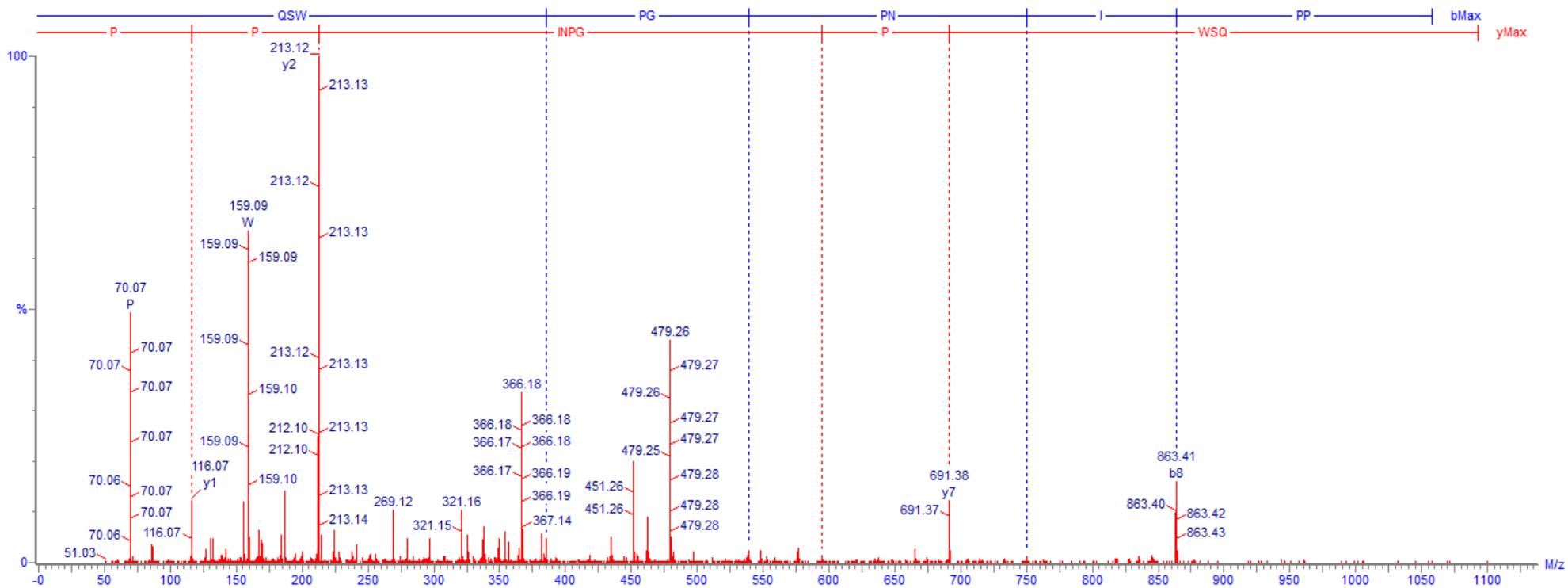
Espectro 2: Sequenciamento do peptídeo QNW (Q=pE) de $[M+H]^+ = 430.18$ Da



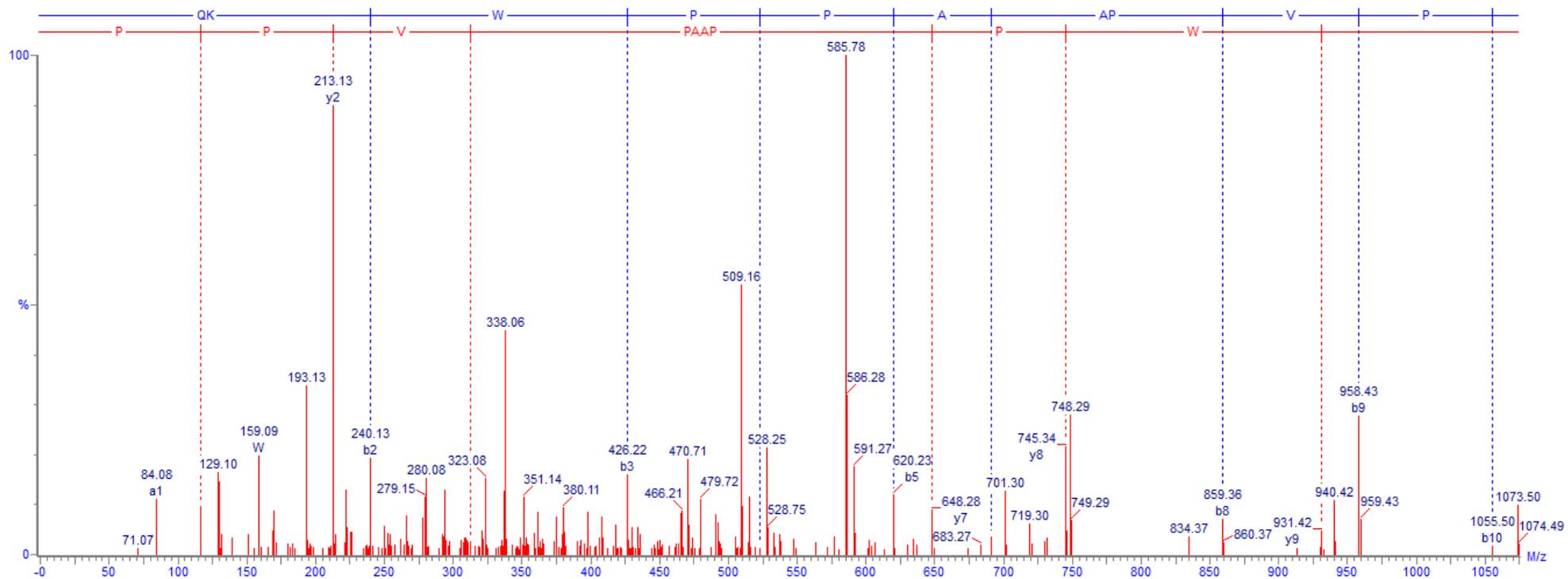
Espectro 3: Sequenciamento do peptídeo QKWP (Q=pE) de $[M+H]^+ = 541.28$ Da



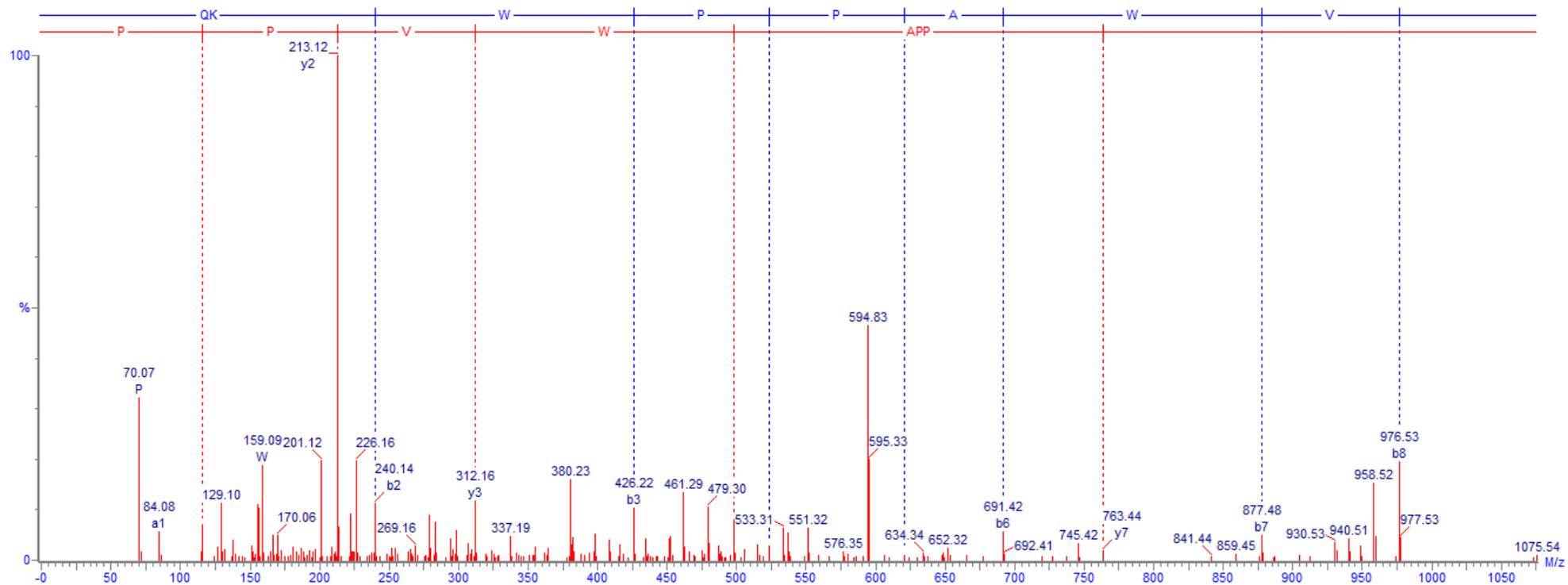
Espectro 4: Sequenciamento do peptídeo PGPNIIP de $[M+H]^+ = 691.38$ Da



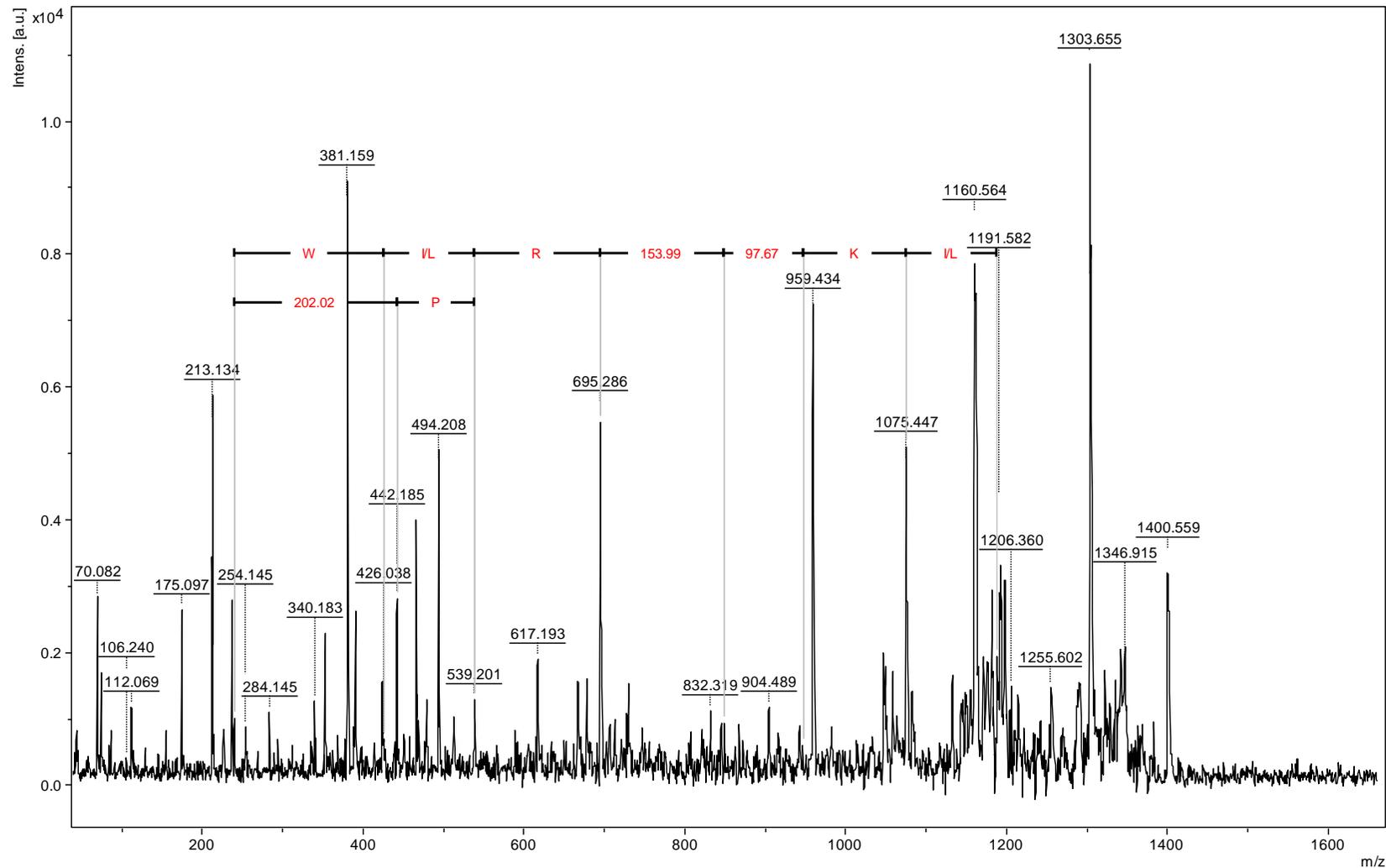
Espectro 5: Sequenciamento do peptídeo QSWPGPNIPP (Q=pE) de $[M+2H]^{2+} = 538.23$ Da



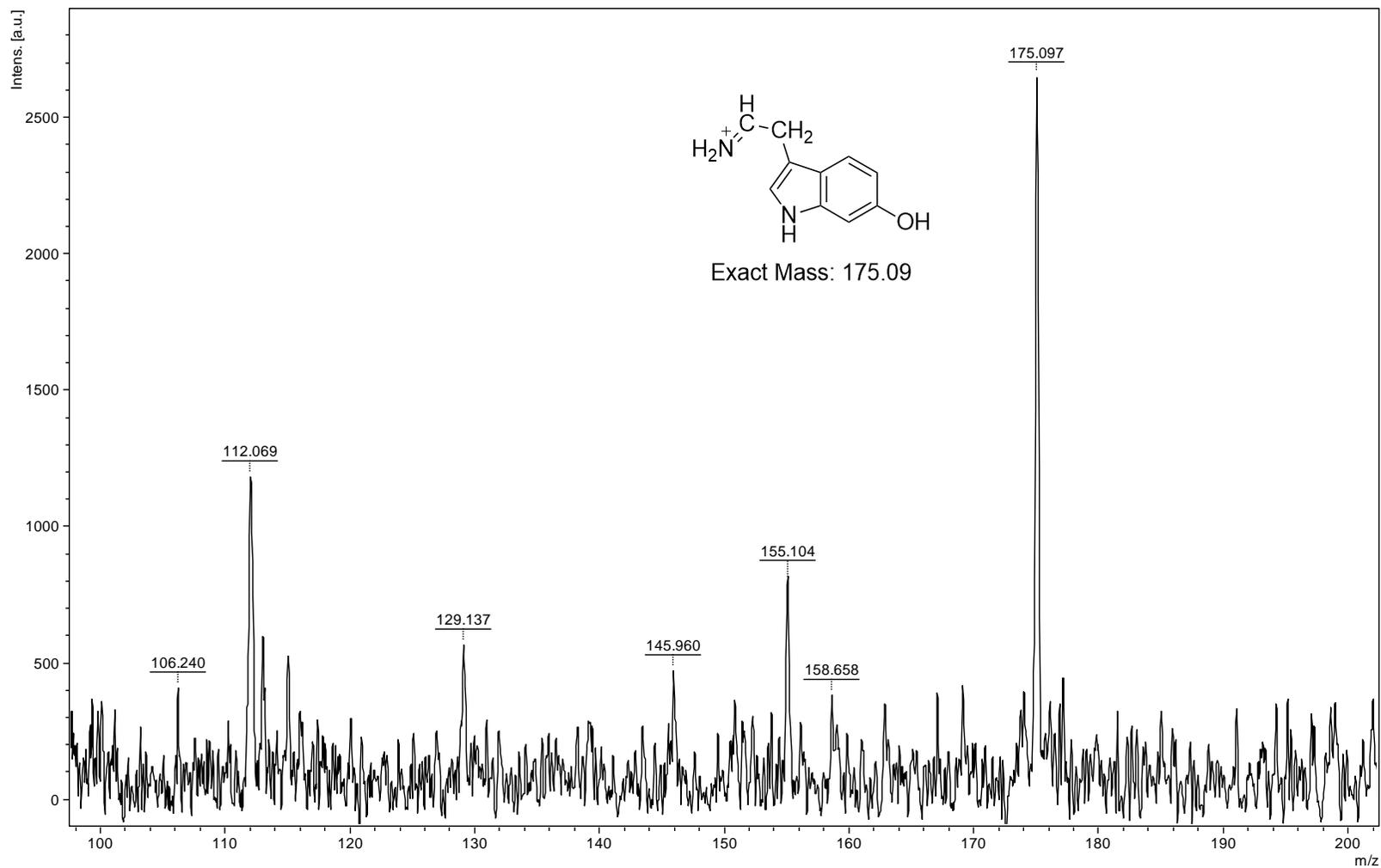
Espectro 6: Sequenciamento do peptídeo QKWPPAAPVPP (Q=pE) de $[M+2H]^{2+} = 585.78$ Da que ainda necessita de confirmação



Espectro 7: Sequenciamento do peptídeo QKWPPAWVPP (Q=pE) de $[M+2H]^{2+} = 594.83$ Da que ainda necessita de confirmação



Espectro 8: Sequenciamento do peptídeo pEKW(OH)PRPGPEIPP, de $[M+H]^+ = 1400.56$ Da. Este peptídeo necessita de confirmação. Perceber a diferença de massa de 202,02 Da na série b, sugestiva da presença de triptofano oxidado .



Espectro 10. Região dos íons imônio obtida para o peptídeo pEKW(OH)PRPGPEIPP indicando a ausência do íon m/z 159.09 e presença de m/z 175,1, compatível com oxidação do triptofano. A posição da oxidação na estrutura do íon é sugerida.

Anexo 5

Tabela de aminoácidos

| Aminoácido | Símbolo de uma letra | Símbolo de três letras | Massa <u>monoisotópica</u> |
|-----------------|----------------------|------------------------|----------------------------|
| Ácido aspártico | D | <u>Asp</u> | 115,026 |
| Ácido glutâmico | E | <u>Glu</u> | 129,042 |
| Alanina | A | Ala | 71,037 |
| Arginina | R | <u>Arg</u> | 156,101 |
| Asparagina | N | <u>Asn</u> | 114,042 |
| Cisteína | C | <u>Cys</u> | 103,009 |
| Fenilalanina | F | <u>Phe</u> | 147,068 |
| Glicina | G | <u>Gly</u> | 57,021 |
| Glutamina | Q | <u>Gln</u> | 128,058 |
| Histidina | H | His | 137,058 |
| Isoleucina | I | <u>Iso</u> | 113,084 |
| Leucina | L | Leu | 113,084 |
| Lisina | K | <u>Lys</u> | 128,094 |
| Metionina | M | <u>Met</u> | 131,04 |
| Prolina | P | Pro | 97,052 |
| Serina | S | Ser | 87,032 |
| Tirosina | Y | <u>Tyr</u> | 163,063 |
| Treonina | T | <u>Thr</u> | 101,047 |
| Triptofano | W | <u>Trp</u> | 186,079 |
| Valina | V | Val | 99,068 |