



RENORBIO

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

**Caracterização e aplicações cardiovasculares de
um novo peptídeo rico em prolina obtido da
secreção cutânea de *Brachycephalus ephippium***

Daniel Dias Rufino Arcanjo

Teresina-PI
2016

DANIEL DIAS RUFINO ARCANJO

Caracterização e aplicações cardiovasculares de um novo peptídeo rico em prolina obtido da secreção cutânea de *Brachycephalus ephippium*

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia, Ponto Focal Piauí (RENORBIO/UFPI), como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. **José Roberto de Souza de Almeida Leite**

Co-orientadores: Profa. Dra. **Aldéidia Pereira de Oliveira** e Prof. **Ulf Simonsen**, MD, Ph.D.

Teresina-PI

2016

FICHA CATALOGRÁFICA

Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Comunitária Jornalista Carlos Castello Branco
Serviço de Processamento Técnico

A668c Arcanjo, Daniel Dias Rufino.

Caracterização e aplicações cardiovasculares de um novo peptídeo rico em prolina obtido da secreção cutânea de *Brachycephalus ephippium* / Daniel Dias Rufino Arcanjo. -- 2016.
135 f.

Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2016.

“Orientação: Prof. Dr. José Roberto de Souza de Almeida Leite.”

“Co-orientação: Profa. Dra. Aldeídia Pereira de Oliveira e Prof. Ulf Simonsen, MD, Ph.D.”

1. Vasorrelaxamento. 2. Vasodilatação. 3. *Brachycephalus ephippium*.
4. Inibidor de ECA. 5. Bradicinina. 6. Prolina. I. Título.

CDD 615.71

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
Campus Universitário "Ministro Petrônio Portella" – Bairro Socopo – Centro de Ciências Agrárias - CCA
Telefone: (86) 3217-3331 – e-mail: renorbio@ufpi.edu.br
CEP 64049-550 – Teresina-PI

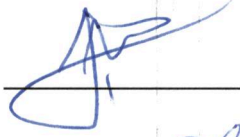
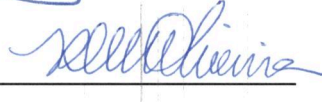
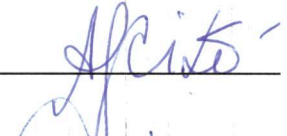
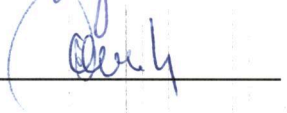

FOLHA DE APROVAÇÃO – DEFESA DE TESE

ALUNO: DANIEL DIAS RUFINO ARCANJO

TÍTULO DO PROJETO: "Caracterização e aplicações cardiovasculares de um novo peptídeo rico em prolina obtido da secreção cutânea de *Brachycephalus ephippium*".

PROFESSOR ORIENTADOR: Prof. Dr. José Roberto de Souza de Almeida Leite

BANCA EXAMINADORA:

	CONCEITO	ASSINATURA
Prof. Dr. José Roberto de Souza de Almeida Leite, UFPI (Presidente)	<u>Satisfatório</u>	
Profa. Dra. Rita de Cássia Meneses Oliveira, UFPI (Examinadora)	<u>Satisfatório</u>	
Profa. Dra. Antônia Maria das Graças Lopes Citó - UFPI (Examinadora)	<u>Satisfatório</u>	
Prof. Dr. Fernando Aécio de Amorim Carvalho – UFPI (Examinador)	<u>Satisfatório</u>	
Prof. Dr. Peter Jonathan Eaton - UNIPORTO (Examinador)	<u>Satisfatório</u>	

DATA DA AVALIAÇÃO: 24 de fevereiro de 2016.
HORÁRIO: 15h30
LOCAL: Auditório do NUPCelt, CCA/UFPI.

Resumo

O presente estudo descreve o isolamento e a caracterização químico-farmacológica e toxicológica de um novo oligopeptídeo rico em prolina (PRO) isolado a partir da secreção cutânea do anfíbio *Brachycephalus ephippium* (Spix, 1824), denominado BPP-Brachy, e sua forma amidada, BPP-BrachyNH₂, ambas encontradas na forma natural. O Capítulo I apresenta breve revisão sobre a descoberta dos PROs a partir do veneno da serpente *Bothrops jararaca* (Wied-Neuwied, 1824) e suas potenciais fontes e aplicações biológicas. No Capítulo II, BPP-BrachyNH₂ foi caracterizado quimicamente e apresentou efeito inibitório sobre a atividade da ECA *in vitro* em soro de ratos, com evidências *in silico* indicando maior energia de interação em direção ao sítio ativo do domínio C do que ao domínio N, assim como induziu vasodilatação dependente de endotélio em anéis de artéria aorta torácica de rato. A presença de L-NAME, um inibidor da óxido nítrico (NO) sintase, assim como a remoção mecânica do endotélio vascular aboliram a vasodilatação induzida por BPP-BrachyNH₂. Em anéis de aorta previamente carregados com a sonda DAF-FM DA (Diacetato de 4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluoresceína), BPP-BrachyNH₂ promoveu aumento de fluorescência observado por microscopia confocal, indicando aumento na liberação de NO. A viabilidade celular de linhagens de células endoteliais de veia umbilical humana, de músculo liso vascular de aorta de rato e de macrófagos murinos foi avaliada pelo método do MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] na presença de BPP-BrachyNH₂, que demonstrou ausência de citotoxicidade nas concentrações testadas. No Capítulo III, a toxicidade aguda foi avaliada em camundongos Swiss fêmeas tratadas com BPP-BrachyNH₂ (5 e 50 mg/kg) por via intraperitoneal, de acordo com o Guia OECD nº 423 (Método de Classe Tóxica Aguda). Nos ensaios toxicológicos *in vivo*, não foram observadas mortes ou outro sinal de toxicidade. No Capítulo IV, BPP-BrachyNH₂ apresentou efeito vasorelaxante em anéis de artérias de resistência isoladas do leito mesentérico de rato e da circulação coronária de porco, possivelmente envolvendo o aumento da produção de NO em decorrência do aumento da biodisponibilidade de L-arginina e a ativação de receptores de bradicinina B₂, respectivamente. Em conclusão, o peptídeo BPP-BrachyNH₂ apresenta uma sequência primária inédita nos bancos de dados internacionais e é o primeiro BPP isolado a partir da secreção cutânea em toda a família Brachycephalidae. Estes achados abrem a possibilidade para se bioprospectar anfíbios como fontes de novas biomoléculas e com ação cardiovascular, assim como para suas potenciais aplicações no tratamento de disfunções endoteliais.

Palavras-chaves: *Brachycephalus ephippium*. Inibidor de ECA. Óxido nítrico. Peptídeo potencializador de bradicinina. Peptídeo rico em prolina. Vasodilatador.

Abstract

The present study describes the isolation as well as the chemical, pharmacological, and toxicological characterization of a new proline-rich oligopeptide (PRO) isolated from the skin secretion of the frog *Brachycephalus ephippium* (Spix, 1824) called BPP-Brachy, and its amidated form BPP-BrachyNH₂, both found in natural form. The Chapter I present brief review on the first identification of PROs from *Bothrops jararaca* (Wied-Neuwied, 1824) venom and their potential biological sources and applications. In the Chapter II, BPP-BrachyNH₂ was chemically characterized and efficiently inhibited *in vitro* ACE activity in rat serum, with *in silico* evidences about higher interaction energy towards the active site of the C-domain then the N-domain, as well as induces endothelium-dependent vasodilation in rat thoracic aorta preparations. The presence of L-NAME, an inhibitor of nitric oxide (NO) synthase, as well as the mechanical removal of the vascular endothelium, abolish BPP-BrachyNH₂-induced vasodilation. In DAF-FM DA (4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetate)-loaded aortic rings, BPP-BrachyNH₂ promoted increase of fluorescence measured by confocal microscopy, indicating an increase of NO release. The cell viability of human umbilical vein endothelial cells, rat aortic smooth muscle cells, and murine macrophages in the presence of BPP-BrachyNH₂ was assessed by the MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] method, which showed absence of cytotoxicity at the concentrations tested. In the Chapter III, the acute toxicity was evaluated in female Swiss mice treated intraperitoneally with BPP-BrachyNH₂ (5 e 50 mg/kg) according with the OECD n° 423 Guidance (Acute Class Toxic Method). In the *in vivo* toxicological assessment, neither death nor signs of toxicity was observed. In the Chapter IV, BPP-BrachyNH₂ presented vasorelaxant effect in both rat small mesenteric and porcine small coronary arteries, possibly involving the increase of NO production related to the increase of L-arginine bioavailability as well as the activation of bradykinin B₂ receptors, respectively. In conclusion, the peptide BPP-BrachyNH₂ presents a novel primary sequence in international databases and is the first BPP isolated from the skin secretion across the Brachycephalidae family. These findings open for the possibility to bioprospect the amphibians as sources of new biomolecules with cardiovascular actions as well as their potential applications in the treatment of endothelial dysfunctions.

Keywords: *Brachycephalus ephippium*. ACE inhibitor. Nitric oxide. Bradykinin potentiating peptide. Proline-rich peptide. Vasodilator.

LISTA DE ABREVIACOES

[Ca²⁺]_i	Concentração intracelular de �ons cálcio
<Glu	Resíduo de ácido piroglutâmico
A	Alanina
ACh	Acetilcolina
ACN	Acetonitrila
Ala	Alanina
ALP	Fosfatase alcalina
ALT	Alanina aminotransferase
ANOVA	Análise de variância
ARRIVE	<i>Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments</i>
AST	Aspartato aminotransferase
BK	Bradicinina
BPP	Peptídeo potencializador de bradicinina
BRP	Peptídeo relacionado à bradicinina
CI₁₀₀	Circunferência interna (CI) da artéria exposta � pressão transmural de 13,3 kPa (100 mmHg)
COX	Cicloxigenase
D	Aspartato
DAF-FM DA	Diacetato de 4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluoresceína
DL₅₀	Dose letal a 50% de animais em experimento
DMEM	Meio Eagle modificado da Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
E	�cido glutâmico
ECA	Enzima conversora de angiotensina-I
EDTA	�cido etilenodiaminotetracético
E_{máx}	Efeito máximo
eNOS	óxido nítrico sintase endotelial
EPM	Erro padrão da média
F	Fenilalanina
FBS	Soro fetal bovino
GGT	Gama-glutamil transferase
GHS	Sistema de Classificação Globalmente Harmonizado
Glu	�cido glutâmico
GPCR	Receptor acoplado a proteína G
H	Histidina
HEK 293	Células de rim embrionário humano
HEPES	�cido 2-[4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il]etanosulfônico
His	Histidina
HOE-140	Icatibant (inibidor seletivo de receptores de bradicinina B ₂)
HUVEC	Células endoteliais de veia umbilical humana
I	Isoleucina

i.p	Via intraperitoneal
IC₅₀	Concentração inibitória de 50% da atividade
INDO	Indometacina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
K	Lisina
L	Leucina
LDH	Lactato desidrogenase
Leu	Leucina
L-NAME	Metilato de N ^G -nitro-L-arginina
L-NNA	N ^G -Nitro-L-arginina
LPS	Lipopolissacarídeo de <i>Escherichia coli</i>
Lys	Lisina
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
Mulvany-PSS	Solução fisiológica salina de Mulvany
N	Asparagina
NA	Noradrenalina
NO	Óxido nítrico
OECD	Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico
P	Prolina
pD₂	Logaritmo negativo da IC ₅₀
PE	Fenilefrina
Phe	Fenilalanina
PRO	Oligopeptídeo rico em prolina
Pro	Prolina
Q	Glutamina
R	Arginina
RMSD	Desvio da raiz média quadrática
ROS	Espécies reativas de oxigênio
S	Serina
Ser	Serina
T	Treonina
TFA	Ácido trifluoroacético
Trp	Triptofano
U46619	9,11-dideoxi-9a,11a-metanoepoxi-prostaglandina F _{2a}
V	Valina
Val	Valina
VSMC	Células de músculo liso vascular de aorta
W	Triptofano
Y	Tirosina

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 – Esquema ilustrativo do papel da ECA nos sistemas renina-angiotensina e caliceína-cininas. A ECA participa tanto da conversão da inativa angiotensina I no agente pressórico angiotensina II (vermelho), quanto da inativação da bradicinina (verde) e formação de metabólitos inativos, através de hidrólise de dipeptídeo C-terminal dos substratos (CAMARGO et al., 2012). 14
- FIGURA 2 – Desenvolvimento racional do captopril, primeiro inibidor seletivo de ECA com alta potência, a partir da sequência Phe-Ala-Pro dos BPPs obtidos do veneno de *Bothrops jararaca* (CUSHMAN; ONDETTI, 1999). 21
- FIGURA 3 – Ciclo da ureia e ciclo de formação da L-arginina a partir da L-citrulina. Bj-BPP-10c induz ativação da argininosuccinato sintase (AsS), aumentando a formação de L-arginina a partir da L-citrulina, levando ao aumento na produção de óxido nítrico (NO) (CAMARGO et al., 2012). 23
- FIGURA 4 – (A) Espécime adulto macho de *B. ephippium* (Foto: Pombal Jr., J.P.). (B) Fracionamento dos peptídeos da secreção cutânea de *B. ephippium*. Amostra contendo 3,0 mg da secreção liofilizada foi dissolvida em 150 µL de TFA 0,1% e injetada em uma coluna C₁₈ Vydac. A cromatografia foi realizada com um gradiente linear de ACN de 0 a 100% em TFA 0,1%, taxa de fluxo de 1,0 mL/min por 60 min. A ocorrência de peptídeos foi monitorada pelas medidas de absorvância nos comprimentos de onda indicados. 38
- FIGURA 5 – Sequenciamento dos peptídeos ricos em prolina (PROs) obtidos da secreção cutânea de *B. ephippium*. (A) Espectro de massas do BPP-Brachy, [M+H]⁺ = 907,37 e do (B) BPP-BrachyNH₂, [M+H]⁺ = 906,36, analisado em um UltraFlex III MALDI-TOF/TOF operando em modo LIFT™ para experimentos MS/MS. Os fragmentos observados permitiram uma completa atribuição da série de íons y e b. A sequência do peptídeo utilizando código de uma letra seguido da orientação das séries y e b está demonstrada na parte superior destes espectros. Legenda: **W**, triptofano; **P**, prolina, **K**, lisina; **V**, valina ; **S**, serina. 39
- FIGURA 6 – Efeito inibitório do BPP-BrachyNH₂ e captopril sobre a atividade da ECA em soro de ratos. Atividade enzimática residual foi plotada em relação às as concentrações do inibidor correspondente. Valores de IC₅₀ foram calculados utilizando regressão não linear. As análises foram realizadas usando o software GraphPad 5.0 (GraphPad Prism, San Diego, CA, EUA). 40
- FIGURA 7 – Modelagem molecular do BPP-Brachy e da ECA humana e estudos de docagem *in silico*. Modelos teóricos do BPP-Brachy (A) e da ECA humana (B), ambos mostrando estrutura com sistema de baixa energia; Docagem molecular entre BPP-

Brachy e ECA (**C**); Relação de complexo binário com interações em detalhes (**D**); e interações entre o substrato e a tríade catalítica His³⁸³, His³⁸⁷ e Glu⁴¹¹ (**E**), indicando um provável bloqueio da atividade catalítica. 42

FIGURA 8 – Efeito vasorelaxante induzido por BPP-BrachyNH₂ e captopril (10⁻⁹ – 3×10⁻⁵ M) em artéria aorta torácica de ratos. Anéis aórticos foram pré-contraídos com fenilefrina (3×10⁻⁷ M) e então cumulativamente incubados com BPP-BrachyNH₂ (**A**) ou captopril (**B**). Efeito do L-NAME (100 μM) sobre o efeito vasorelaxante induzido pelo BPP-BrachyNH₂ (**C**). Comparações respectivas entre valores de E_{max} (**D**) foram plotados. Os resultados foram expressos como média ± EPM (n=6). Teste t de Student. ***p*<0,01 e ****p*<0,001 quando comparados com preparações com endotélio intacto (E+). 44

FIGURA 9 – Medida de NO por microscopia confocal a laser após adição de BPP-BrachyNH₂ em secções de aorta de ratos com endotélio intacto. Intensidade da emissão de fluorescência (ΔF%) após adição de BPP-BrachyNH₂ 10⁻⁷ M (**A**) ou 10⁻⁵ M (**B**). Fotomicrografia confocal representativa de secções de aorta carregadas com DAF-FM DA (5 μM) antes e após a adição de BPP-BrachyNH₂ 10⁻⁷ M (**C-D**) ou 10⁻⁵ M (**E-F**). Os resultados foram expressos como média ± EPM (n=4). Teste *t* de Student para amostras pareadas, **p*<0,05 e ***p*<0,01 em relação ao controle..... 45

FIGURA 10 – Efeitos do BPP-BrachyNH₂ sobre a viabilidade celular. Células do tipo HUVECs (**A**) ou VSMCs (**B**) foram incubadas com diferentes concentrações de BPP-BrachyNH₂ por 24 horas e então com MTT por 4 horas. Cristais de formazan foram dissolvidos em DMSO. O grupo controle foi incubado somente com meio de cultura DMEM. Os resultados foram expressos como média ± EPM (n=3). ****p*<0,001 quando comparado com o grupo controle. 46

FIGURA 11 – Evolução do ganho de peso dos camundongos Swiss fêmeas tratados com veículo (■) ou BPP-BrachyNH₂ nas doses de 5 (○) e 50 (▼) mg/kg, por via intraperitoneal. Dados representados por média ± EPM (n=6/grupo)..... 60

FIGURA 12 – Fotomicrografias de secções histológicas obtidas do fígado (A₁, B₁, C₁), baço (A₂, B₂, C₂), rim (A₃, B₃, C₃) e pulmão (A₄, B₄, C₄) dos camundongos Swiss fêmeas (n=3/grupo) tratados com veículo (**A**) ou BPP-BrachyNH₂ nas doses de 5 (**B**) ou 50 mg/kg (**C**) por via intraperitoneal. Decorridos 14 dias os animais foram eutanasiados e os órgãos foram removidos e processados para as análises histopatológicas. Os resultados mostraram que os órgãos de animais tratados não apresentaram quaisquer alterações quando comparado ao grupo controle. Coloração Hematoxilina & Eosina. 63

FIGURA 13 – Avaliação do efeito vasorelaxante induzido por BPP-BrachyNH₂ (10⁻⁹ – 10⁻⁴ M) em anéis de artéria mesentérica de resistência isolada de ratos, com endotélio funcional (E+). As preparações foram pré-contraídas com PE (10⁻⁶ M) (**A**) ou U46619 (10⁻⁷ M) (**B**), e então BPP-BrachyNH₂ foi cumulativamente adicionado. Os resultados

foram expressos como média ± EPM. ANOVA de duas vias, seguida do pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ vs. veículo..... 71

FIGURA 14 – Efeito vasorelaxante induzido por BPP-BrachyNH₂ (10^{-9} – 3×10^{-5} M) na ausência (A) ou presença (B) de LPS (10 µg/mL) por 5 h em anéis de artéria mesentérica de resistência isolada de ratos, com endotélio funcional (E+). As preparações foram pré-contraídas cumulativamente com NA (10^{-6} – 10^{-5} M), e então cumulativamente incubadas com BPP-BrachyNH₂. Os resultados foram expressos como média ± EPM. ANOVA de duas vias, seguida do pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ vs. veículo. 72

FIGURA 15 – Efeito do L-NNA e da INDO (A) sobre a resposta vasorelaxante induzida por BPP-BrachyNH₂ (10^{-9} – 3×10^{-5} M) na presença de LPS (10 µg/mL) por 5 h em anéis de artéria mesentérica de resistência isolada de ratos, com endotélio funcional (E+). Os agentes foram incubados por 20 min, seguidos de pré-contracção cumulativa com NA (10^{-6} – 10^{-5} M), e então BPP-BrachyNH₂ foi cumulativamente adicionado. Comparações representativas entre os valores de E_{máx} (B) foram plotadas. Os resultados foram expressos como média ± EPM. ANOVA de duas vias, seguida do pós-teste de Bonferroni (A) ou Teste t de Student não pareado (B); * $p < 0,05$ vs. veículo..... 73

FIGURA 16 – Efeito vasorelaxante induzido por BPP-BrachyNH₂ (10^{-9} – 10^{-4} M) em anéis de artéria coronária de resistência isolada de porcos, com endotélio funcional (E+). As preparações foram pré-contraídas com ACh (10^{-7} M) (A) ou U46619 (10^{-7} M) (B), e então BPP-BrachyNH₂ foi cumulativamente adicionado. Os resultados foram expressos como média ± EPM. ANOVA de duas vias, seguida do pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ vs. veículo..... 75

FIGURA 17 – Dados preliminares sobre os efeitos do L-NNA (10^{-4} M) (A), da INDO (3×10^{-6} M) (B) e do HOE-140 (10^{-8} M) (C) sobre a resposta vasorelaxante induzida por BPP-BrachyNH₂ (10^{-9} – 10^{-4} M) em anéis de artéria coronária de resistência isolada de porcos, com endotélio funcional (E+). As preparações foram pré-contraídas com U46619 (10^{-7} M), e então BPP-BrachyNH₂ foi cumulativamente adicionado. Comparações representativas entre os valores de E_{máx} (D) foram plotadas. 76

LISTA DE QUADROS E TABELAS

QUADRO 1 – Oligopeptídeos ricos em prolina (PROs) obtidos de diferentes fontes biológicas (ARCANJO et al., 2015)..... 25

TABELA 1 – Sinais clínicos e comportamentais avaliados em camundongos Swiss fêmeas após administração aguda do BPP-BrachyNH₂ nas doses de 5 e 50 mg/kg por via intraperitoneal. 59

TABELA 2 – Avaliação de parâmetros bioquímicos séricos de camundongos Swiss fêmeas tratadas com BPP-BrachyNH₂ por via intraperitoneal (i.p.). Os valores representam a média ± E.P.M (n=6/grupo). *p<0,05 versus controle; Teste t de Student para amostras não pareadas. 61

TABELA 3 – Peso relativo dos órgãos após 14 dias do tratamento intraperitoneal com dose única de BPP-BrachyNH₂ (5 e 50 mg/kg, i.p.)..... 62

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS	17
2.1 OBJETIVO GERAL.....	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3. CAPÍTULO I – REVISÃO DE LITERATURA.....	19
3.1 PEPTÍDEOS POTENCIALIZADORES DE BRADICININA (BPP) OBTIDOS DE BOTHROPS JARARACA: PROTÓTIPOS PARA INIBIDORES DE ECA.....	19
3.2 OLIGOPEPTÍDEOS RICOS EM PROLINA (PRO): MECANISMOS INDEPENDENTES DE ECA E APLICAÇÕES CARDIOVASCULARES.....	21
3.3 FONTES ALTERNATIVAS DE PROS: ESCORPIÕES E ANFÍBIOS.....	24
4. CAPÍTULO II – BPP-BRACHYNH₂: UM NOVO OLIGOPEPTÍDEO VASOATIVO OBTIDO DE BRACHYCEPHALUS EPHIPIUM.....	28
RESUMO	29
4.1 INTRODUÇÃO	30
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	31
4.2.1 DECLARAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA	31
4.2.2 OBTENÇÃO E PURIFICAÇÃO DA SECREÇÃO CUTÂNEA.....	32
4.2.3 ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS E SEQUENCIAMENTO DE NOVO.....	32
4.2.4 SÍNTESE DO PEPTÍDEO	33
4.2.5 ENSAIO DE INIBIÇÃO DE ECA.....	33
4.2.6 MODELAGEM MOLECULAR E ESTUDOS DE DOCAGEM IN SILICO	34
4.2.7 EFEITO SOBRE A REATIVIDADE VASCULAR EM ARTÉRIA AORTA DE RATOS	35
4.2.8 MEDIDA DE NO EM ANÉIS AÓRTICOS POR MICROSCOPIA CONFOCAL.....	35
4.2.9 ESTUDOS DE CITOTOXICIDADE.....	36
4.2.9.1 Cultura celular.....	36
4.2.9.2 Ensaio do MTT	36
4.2.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	37
4.3 RESULTADOS	37
4.3.1 IDENTIFICAÇÃO DO BPP-BRACHY E BPP-BRACHYNH ₂	37
4.3.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INIBITÓRIA DA ECA IN VITRO	40
4.3.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INIBITÓRIA DA ECA IN SILICO.....	40
4.3.4 EFEITO VASODILATADOR EM ANÉIS DE ARTÉRIA AORTA DE RATOS	43
4.3.5 MEDIDAS DE NO POR MICROSCOPIA CONFOCAL A LASER	43
4.3.6 AVALIAÇÃO CITOTÓXICA EM CÉLULAS VASCULARES.....	43
4.4 DISCUSSÃO	46
AGRADECIMENTOS	50
5. CAPÍTULO III – AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA AGUDA DO BPP-BRACHYNH₂.....	52
RESUMO	52
5.1 INTRODUÇÃO	53
5.2 MATERIAL E MÉTODOS	54

5.2.1	<i>OBTENÇÃO DO PEPTÍDEO BPP-BRACHYNH₂</i>	54
5.2.2	<i>ANIMAIS</i>	54
5.2.3	<i>CULTIVO E RETIRADA DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS MURINOS</i>	55
5.2.4	<i>VIABILIDADE CELULAR DE MACRÓFAGOS PELO TESTE DO MTT</i>	55
5.2.5	<i>AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA IN VIVO</i>	56
5.2.5.1	<i>Avaliação de parâmetros clínicos e comportamentais</i>	56
5.2.5.2	<i>Análise dos parâmetros bioquímicos</i>	56
5.2.5.3	<i>Avaliação de peso corporal e peso dos órgãos dos animais</i>	57
5.2.5.4	<i>Análise histopatológica</i>	57
5.2.6	<i>ANÁLISE ESTATÍSTICA</i>	57
5.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
	AGRADECIMENTOS	62
6.	CAPÍTULO IV – EFEITO VASORELAXANTE DO BPP-BRACHYNH₂ EM ARTÉRIAS DE RESISTÊNCIA ISOLADAS E POSSÍVEIS MECANISMOS ENVOLVIDOS	65
	RESUMO	65
6.1	INTRODUÇÃO	66
6.2	MATERIAL E MÉTODOS	66
6.2.1	<i>OBTENÇÃO DO PEPTÍDEO BPP-BRACHYNH₂</i>	66
6.2.2	<i>ANIMAIS</i>	67
6.2.2.1	<i>Ratos</i>	67
6.2.2.2	<i>Porcos</i>	67
6.2.3	<i>ISOLAMENTO DAS ARTÉRIAS E PREPARAÇÃO DOS ANÉIS</i>	67
6.2.4	<i>INVESTIGAÇÃO DO EFEITO VASORELAXANTE EM ARTÉRIA MESENTÉRICA DE RATOS</i>	68
6.2.4.1	<i>Teste de viabilidade funcional</i>	68
6.2.4.2	<i>Protocolos experimentais</i>	68
6.2.5	<i>INVESTIGAÇÃO DO EFEITO VASORELAXANTE EM ARTÉRIA CORONÁRIA DE PORCOS</i>	69
6.2.5.1	<i>Teste de viabilidade funcional</i>	69
6.2.5.2	<i>Protocolos experimentais</i>	69
6.2.6	<i>ANÁLISE ESTATÍSTICA</i>	69
6.3	RESULTADOS	70
6.3.1	<i>EFEITO VASORELAXANTE DO BPP-BRACHYNH₂ EM ARTÉRIA MESENTÉRICA DE RATOS</i>	70
6.3.2	<i>EFEITO VASORELAXANTE DO BPP-BRACHYNH₂ EM ARTÉRIA CORONÁRIA DE PORCOS</i>	74
6.4	DISCUSSÃO	76
	AGRADECIMENTOS	79
7.	CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	80
8.	OUTRAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS	82
	REFERÊNCIAS	85
	APÊNDICE	94

1. Introdução

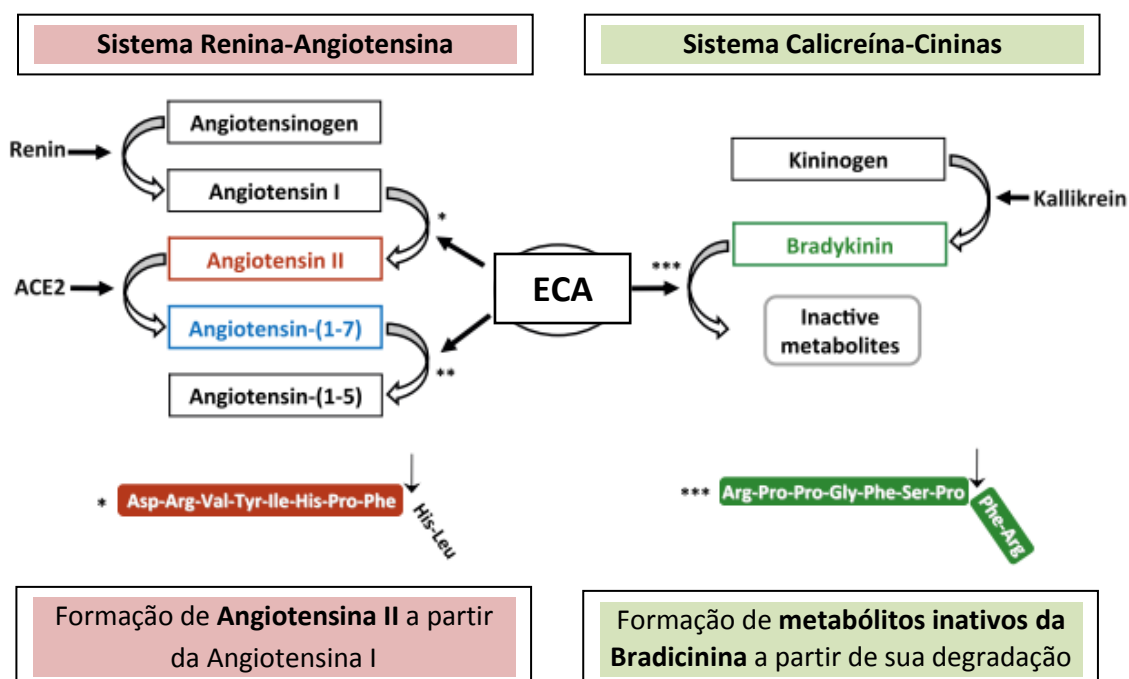
A habilidade de animais venenosos de matar suas presas com mínimas quantidades de veneno tem inspirado fascinação e medo na humanidade ao longo dos tempos. Os venenos de serpentes apresentam-se como uma importante fonte de compostos bioativos, com uma diversidade de atividades farmacológicas, como analgésica, antimicrobiana, anti-hipertensiva, anticoagulante, trombolítica, antiarrítmica, cardiotônica, dentre outras (BEETON; GUTMAN; CHANDY, 2006). Os venenos de serpentes são misturas complexas de moléculas, onde os peptídeos são as principais substâncias biologicamente ativas, pertencentes a diversas classes estruturais, dentre elas, os Peptídeos Potencializadores de Bradicininina (BPPs), com diversas ações biológicas. Devido sua conformação em 3D, os peptídeos podem interagir com diferentes alvos farmacológicos, como receptores nicotínicos e muscarínicos, acetilcolinesterase, canais iônicos e membranas celulares, apresentando um importante potencial terapêutico, baseado em estudos prévios de prova de conceito pré-clínico (HARVEY, 2006; LEWIS; GARCIA, 2003a).

Outra importante fonte de BPPs e demais biomoléculas são as secreções da pele de diferentes espécies de anfíbios, que funcionam como barreira protetora contra agentes infecciosos, além de promover alterações fisiológicas sistêmicas em predadores. Dentre seus principais efeitos farmacológicos, destacam-se a contratilidade da musculatura lisa intestinal, onde se acredita que represente uma importante estratégia de sobrevivência. Sua estimulação leva ao reflexo do vômito e a regurgitação do animal por seu predador. Dentre outras importantes propriedades, destaca-se o relaxamento da musculatura lisa vascular e a hipotensão arterial (BRAND et al., 2006; CONLON, 2006).

Estudos envolvendo BPPs tem origem na descoberta da bradicininina (BK) por Rocha e Silva e colaboradores, ao estudar a fisiopatologia do envenenamento pelo veneno da serpente *Bothrops jararaca* (Wied-Neuwied, 1824) (ROCHA E SILVA; BERALDO; ROSENFELD, 1949). A bradicininina foi inicialmente identificada como um fator hipotensor e estimulante da musculatura lisa intestinal liberado das globulinas plasmáticas por venenos de serpentes e tripsina. Este fato, associado com a evolução na compreensão da circulação sanguínea, motivou pesquisadores em todo mundo em estudar o papel da bradicininina e dos BPPs na fisiopatologia do sistema cardiovascular (CAMARGO et al., 2012).

A descoberta da bradicinina permitiu a elucidação de um sistema de complexas reações denominado “sistema calicreína-cininas”. Sua ativação leva à formação dos peptídeos “bradicinina” e “calidina” a partir da ação de serino-proteases denominadas “calicreínas teciduais” e “calicreínas plasmáticas”, respectivamente, levando à formação das cininas a partir do substrato cininogênio (CAMPBELL, 2006). A degradação da bradicinina e a cessação de seus efeitos farmacológicos ocorrem através da hidrólise de sua porção dipeptídica C-terminal através da ação da enzima conversora de angiotensina-I (ECA), responsável também por formar angiotensina II, um octapeptídeo com propriedades hipertensivas, resultante da hidrólise do dipeptídeo C-terminal His-Leu da angiotensina I, componente do chamado “sistema renina-angiotensina” (FIGURA 1). Ou seja, a ECA tanto aumenta a degradação da bradicinina quanto aumenta a formação de angiotensina II. Desse modo, os sistemas calicreína-cininas e renina-angiotensina contribuem para a homeostase do sistema cardiovascular (CAMARGO et al., 2012).

FIGURA 1 – Esquema ilustrativo do papel da ECA nos sistemas renina-angiotensina e calicreína-cininas. A ECA participa tanto da conversão da inativa angiotensina I no agente pressórico angiotensina II (vermelho), quanto da inativação da bradicinina (verde) e formação de metabólitos inativos, através de hidrólise de dipeptídeo C-terminal dos substratos (CAMARGO et al., 2012).



Sendo a ECA um ponto de intersecção entre os dois sistemas peptidérgicos, sua importância como alvo terapêutico no desenvolvimento de medicamentos que inibissem a degradação da bradicinina foi confirmada quando peptídeos que potencializam a contratilidade do músculo liso intestinal induzida por bradicinina foram identificados no veneno da *B. jararaca* (FERREIRA, 1965). Um destes peptídeos foi o *Bj*-BPP-5a, o primeiro com sequência determinada (FERREIRA; BARTELT; GREENE, 1970). Mais tarde, foi demonstrado que estes peptídeos potencializadores de bradicinina (BPPs) pertencem a uma família de oligopeptídeos ricos em prolina (PRO) cujas propriedades biológicas estão relacionadas com a inibição da geração de angiotensina II e da degradação da bradicinina (CAMARGO et al., 2012).

O tratamento da hipertensão arterial em humanos através da inibição da ECA foi inicialmente realizado através da avaliação dos efeitos da administração parenteral de *Bj*-BPP-9a (teprotida) em pacientes hipertensos, onde foi observada queda significativa da pressão arterial (GAVRAS et al., 1974, 1978). Apesar das crescentes evidências da importância da inibição da ECA como alvo do tratamento da hipertensão, os venenos de jararaca não obtiveram sucesso como medicamentos, devido sua ineficácia por via oral (DENADAI et al., 2007; FERREIRA et al., 1970). Desse modo, diversos estudos envolvendo análogos de BPPs levaram à síntese do captopril, uma molécula que compete com os sítios de ligação da ECA (CUSHMAN; ONDETTI, 1999), gerando um novo paradigma no tratamento da hipertensão arterial, beneficiando milhões de indivíduos em todo o mundo.

O estado hipertensivo está associado com anomalias estruturais no sistema cardiovascular (FOLKOW, 1982). Na hipertensão arterial são descritas anormalidades no músculo liso vascular e no endotélio que estão associadas ao comprometimento da função destas estruturas. Dentre estas disfunções, podemos considerar o aumento da vasoconstrição e redução da vasodilatação, tanto dependente como independente do endotélio vascular, levando a hipertensão e remodelamento vascular (MULVANY, 2012; SIMONSEN; AALKJAER, 2012).

Entretanto, foram relatados para toxinas animais e alguns BPPs diversos eventos relacionados a uma “estratégia especial” de envenenamento, envolvendo diversos mecanismos de ação sobre canais iônicos, enzimas e receptores (LEWIS; GARCIA, 2003b). Estas observações indicam que os BPPs agem não somente sobre a ECA, mas também sobre diferentes alvos para os diferentes tipos de BPPs encontrados (GOMES et al., 2007; MORAIS et al., 2011), ressaltando a importância de estudos que envolvam

a elucidação de novos mecanismos de ação envolvidos, permitindo a descoberta de novos e direcionados alvos terapêuticos no tratamento do estado hipertensivo.

Na busca de uma provável cura ou tratamento para os distúrbios cardiovasculares, vários estudos têm sido realizados na tentativa de se encontrar novas alternativas de tratamento, com maior segurança e eficácia. Nesse contexto, a grande biodiversidade de toxinas animais oriundas da herpetofauna faz dos peptídeos vasoativos uma importante fonte de moléculas precursoras (BARRETO et al., 2009; BRAND et al., 2006; GOMES et al., 2007). Com isso, torna-se importante a pesquisa com toxinas animais que possam fornecer modelos para obtenção de novos agentes terapêuticos (DENADAI et al., 2007; MORAIS et al., 2011; ONYÜKSEL et al., 2006).

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Investigar e caracterizar os efeitos farmacológicos e toxicológicos de um novo peptídeo rico em prolina obtido a partir da secreção cutânea do anfíbio *Brachycephalus ephippium* (Spix, 1824), denominado BPP-BrachyNH₂, visando aplicações biotecnológicas e terapêuticas relacionadas ao sistema cardiovascular.

2.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar o perfil proteômico da secreção cutânea de *B. ephippium* e obter o peptídeo BPP-BrachyNH₂ através de síntese química;
- Avaliar o efeito de BPP-BrachyNH₂ sobre a atividade *in vitro* da enzima conversora de angiotensina-I (ECA) em soro de ratos, e investigar a interação BPP-Brachy/ECA através de docagem molecular *in silico*;
- Avaliar o efeito vasorelaxante de BPP-BrachyNH₂ em anéis de artéria aorta de ratos, assim como em artérias de resistência do leito mesentérico de ratos e da circulação coronária de porcos, verificando o papel do endotélio vascular;
- Investigar os possíveis mecanismos de ação envolvidos no efeito vasorelaxante induzido por BPP-BrachyNH₂;
- Realizar avaliação toxicológica do BPP-BrachyNH₂ em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*.



Capítulo I

Revisão de Literatura

3. Capítulo I – Revisão de literatura

A maioria dos compostos obtidos de venenos e toxinas apresentam alta potência e seletividade, o que faz destas fontes naturais importantes pontos de partida para a bioprospecção de novos fármacos (HODGSON; ISBISTER, 2009). O estudo de venenos e toxinas animais como fonte de novos fármacos para o desenvolvimento de novos tratamentos para doenças cardiovasculares tem se demonstrado promissor, desde o desenvolvimento dos inibidores da enzima conversora de angiotensina-I (ECA), iniciados com a descoberta dos peptídeos potencializadores de bradicinina (BPP) no veneno da serpente *Bothrops jararaca* (Wied-Neuwied, 1824) (FERREIRA, 1965). A partir daí, um grande número de estudos focaram-se na identificação e caracterização de novos BPPs a partir tanto do veneno da jararaca quanto de uma variedade de outras fontes naturais, assim como na identificação de novos alvos biológicos (CAMARGO et al., 2012; CONLON, 2006; MORAIS et al., 2013).

3.1 Peptídeos Potencializadores de Bradicinina (BPP) obtidos de Bothrops jararaca: protótipos para inibidores de ECA

A descoberta dos BPPs como inibidores da ECA iniciou-se com a identificação de peptídeos no veneno da serpente *Bothrops jararaca* que apresentavam a propriedade de potencializar a ação da bradicinina (BK) (FERREIRA, 1965), descoberta por Rocha e Silva e colaboradores como um peptídeo endógeno capaz de promover lentas contrações intestinais e reduzir a pressão arterial (ROCHA E SILVA; BERALDO; ROSENFELD, 1949). Ainda nos anos 1960s, a estrutura química do primeiro peptídeo isolado do veneno de *B. jararaca* foi determinada como sendo <Glu-Lys-Trp-Ala-Pro, denominada *Bj*-BPP-5a, e sua atividade atribuída à inibição enzimática de fatores endógenos que promovem a degradação e a formação dos peptídeos endógenos bradicinina e angiotensina II, respectivamente (FERREIRA; BARTELT; GREENE, 1970). Com a descoberta de que a enzima que promove a inativação da bradicinina é a mesma que converte a inativa angiotensina I no peptídeo hipertensivo angiotensina II, nove BPPs identificados no veneno da jararaca foram sintetizados e tiveram sua atividade atribuída à inibição da enzima conversora de angiotensina-I (ECA) (FERREIRA et al., 1970; GREENE et al., 1972). Assim, a estrutura molecular desses

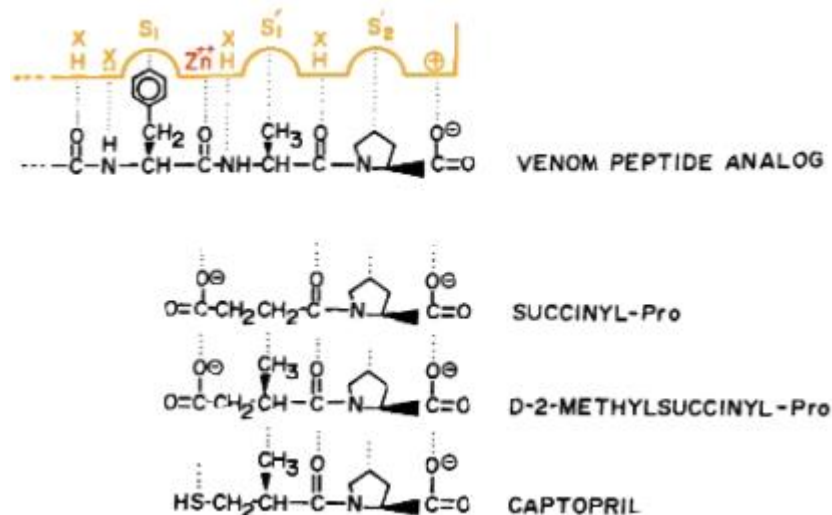
peptídeos tornou-os protótipos de diversos estudos visando o desenvolvimento dos inibidores da ECA disponíveis hoje comercialmente.

O primeiro estudo *in vivo* para demonstrar a eficácia de um BPP como agente hipotensor foi realizado para o Bj-BPP-5a, onde três modelos de hipertensão experimental relacionados ao aumento da produção endógena de angiotensina II foram empregados (KRIEGER et al., 1971). Em seguida, o primeiro estudo realizado em humanos obteve sucesso com o peptídeo Bj-BPP-9a (<Glu-Trp-Pro-Arg-Pro-Gln-Ile-Pro-Pro), que apresentou uma maior atividade inibitória *in vivo* da ECA em relação aos demais BPPs, e onde se observou que sua administração parenteral promoveu redução significativa da pressão arterial em pacientes hipertensos (GAVRAS et al., 1974). Contudo, sua ineficácia por via oral limitou a aplicação deste fármaco como agente terapêutico, despertando a atenção para estudos visando a busca de novos agentes com atividade por via oral, essencial para um medicamento de uso contínuo.

O grande tamanho molecular necessário para se atingir uma atividade intrínseca aliada à instabilidade metabólica devida as múltiplas ligações peptídicas contribuíram para eliminar as possibilidades de aplicação dos peptídeos por via oral. Assim, estudos de relação estrutura-atividade com análogos sintéticos dos BPPs de jararaca desvelaram a compreensão sobre os possíveis sítios ativos da ECA, indicando que a sequência Phe-Ala-Pro, localizada na região C-terminal dos peptídeos, era considerada ótima para a atividade dos BPPs (CUSHMAN; ONDETTI, 1999). A partir dessas evidências, a combinação de ensaios enzimáticos com ensaios sistemáticos em órgãos isolados levaram à síntese do primeiro inibidor seletivo da ECA, porém de menor potência, denominado succinil-L-prolina, a partir de um novo conceito de derivados do ácido benzilsuccínico como inibidores da carboxipeptidase A (BYERS; WOLFENDEN, 1973). Em seguida, novos estudos demonstraram que a estrutura Ala-Pro (D-2-metilsuccinil-L-prolina) era considerada ótima para a ligação do íon Zn^{++} do sítio ativo ao grupo carboxila do ácido succínico. Assim, estudos relacionados à substituição deste grupo por grupos que tinham uma maior afinidade pela ligação ao zinco (ERDÖS; WOHLER, 1963; FERREIRA; ROCHA E SILVA, 1962) levaram à síntese de um derivado da D-2-metilsuccinil-L-prolina com um grupo carboxílico substituído por um grupo sulfidril, sendo denominado *captopril* (FIGURA 2), com aumento em 1000 vezes em sua potência como inibidor seletivo da ECA. O reduzido tamanho da molécula, comparado aos BPPs, e a ausência de ligações peptídicas confere ao captopril

igual, ou até melhor, atividade anti-hipertensiva por via oral em relação à via parenteral (CAMARGO et al., 2012; CUSHMAN; ONDETTI, 1999).

FIGURA 2 – Desenvolvimento racional do captopril, primeiro inibidor seletivo de ECA com alta potência, a partir da sequência Phe-Ala-Pro dos BPPs obtidos do veneno de *Bothrops jararaca* (CUSHMAN; ONDETTI, 1999).



O desenvolvimento do captopril representou um marco relacionado ao desenvolvimento racional de fármacos, e revolucionou o tratamento da hipertensão arterial em todo o mundo. O sucesso clínico do captopril foi popularizado através da inibição da enzima conversora de angiotensina-I como seu único modo de ação. Entretanto, diversas evidências têm sido observadas ao longo dos anos que o benefício deste grupo de fármacos na redução da insuficiência cardíaca e na redução de lesões associadas ao infarto do miocárdio está relacionado principalmente à inibição da degradação da BK, e assim a potencialização de sua atividade (ITO et al., 1997; REMME, 1997; TSCHÖPE et al., 1997). Assim, considerando a potencialização da BK como mecanismo responsável também pela formação de angioedema, um dos principais efeitos colaterais associados ao captopril e aos BPPs, esforços relacionados à investigação de novas moléculas e outros alvos biológicos tem se mostrado importantes.

3.2 Oligopeptídeos ricos em prolina (PRO): mecanismos independentes de ECA e aplicações cardiovasculares

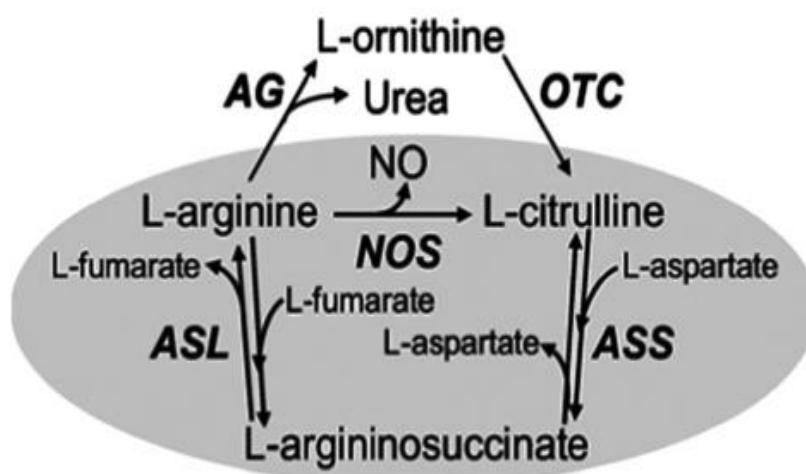
A biodiversidade de toxinas obtidas de venenos animais, mais precisamente peptídeos, faz dela uma importante fonte de protótipos de potenciais novos agentes terapêuticos. Como descrito acima, os BPPs de jararaca apresentam seus efeitos biológicos relacionados ao sistema cardiovascular não só relacionados com a inibição da geração de angiotensina II, mas com a potencialização da atividade da BK, ambas atribuídas à inibição da ECA. Uma série de vários BPPs pode ser encontrada no veneno de *B. jararaca*, sendo que ainda não é totalmente conhecido se os efeitos cardiovasculares dos diferentes peptídeos ricos em prolina são devidos exclusivamente à inibição da ECA (CAMARGO et al., 2012; MORAIS et al., 2013).

O primeiro peptídeo identificado no veneno de *B. jararaca*, Bj-BPP-5a, apresenta atividade potencializadora de bradicinina *in vitro e in vivo* já relatada, além de apresentar afinidade 3,2 vezes mais forte pelo domínio N do que pelo domínio C da ECA (HAYASHI et al., 2003). Assim, considerando que a formação de angiotensina II é seletivamente inibida pelo domínio C, enquanto a degradação de BK ocorre nos dois domínios C e N (CAMARGO et al., 2012; MASUYER et al., 2012), o Bj-BPP-5a apresenta uma maior seletividade em inibir a degradação de BK do que inibir a formação de angiotensina II. Como resultado, os efeitos colaterais mediados pelo aumento da biodisponibilidade da BK, como angioedema, são exacerbados em detrimento do efeito anti-hipertensivo promovido pela redução dos níveis de angiotensina II (CAMARGO et al., 2012; HAYASHI et al., 2003; IANZER et al., 2011).

Por outro lado, um aumento na produção de NO *in vitro* foi observado de modo dependente de concentração em culturas de células HEK 293 (células de rim embrionário humano), sendo este efeito dependente da ativação de receptores muscarínicos M₁ e de bradicinina B₂. Como resultado, após administração intramuscular de Bj-BPP-5a (71 nmol/kg) em camundongos Balb/c, um aumento gradual na vasodilatação até 49% em 25 minutos foi observado através de microscopia intravital (MORAIS et al., 2011). Confirmando estes achados, Bj-BPP-5a induz efeito vasorelaxante em artéria aorta e anti-hipertensivo de longa duração, ambos dependentes de NO, em ratos espontaneamente hipertensos (SHR). Contudo, considerando que não foi observada inibição do efeito pressórico induzido pela angiotensina I, estes relatos corroboram com a existência de um mecanismo independente de ECA e dependente de NO envolvido no efeito anti-hipertensivo de Bj-BPP-5a (CAMARGO et al., 2012; IANZER et al., 2011).

Dentre outros alvos independentes de ECA, a ativação da enzima argininosuccinato sintase (AsS) foi proposta como alvo para o *Bj*-BPP-10c (FIGURA 3). Além de este peptídeo promover aumento da atividade enzimática da AsS *in vitro*, *Bj*-BPP-10c é internalizado em células HUVEC (células endoteliais de veia umbilical humana) e HEK 293, promovendo aumento nos níveis de arginina com consequente formação de NO. De acordo, o aumento nos níveis plasmáticos de L-arginina *in vivo* foi também observado após administração intravenosa de *Bj*-BPP-10c (71 nmol/kg) em ratos normotensos e SHR. O tratamento com ácido α -metil-DL-aspártico (MDLA), um inibidor da AsS, reduz os níveis de L-arginina tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Contudo, MDLA é capaz de reduzir apenas parcialmente o efeito hipotensor de *Bj*-BPP-10c em ratos SHR. Em paralelo, *Bj*-BPP-10c não apresenta efeito hipotensor em ratos normotensos (GUERREIRO et al., 2009). Diferentemente do *Bj*-BPP-5a, apresenta seletividade 400 vezes maior pelo domínio C da ECA em relação ao domínio N, evidenciado pelo efeito potencializador de bradicinina tanto *in vitro* quanto *in vivo* (HAYASHI et al., 2003; IANZER et al., 2007).

FIGURA 3 – Ciclo da ureia e ciclo de formação da L-arginina a partir da L-citrulina. *Bj*-BPP-10c induz ativação da argininosuccinato sintase (AsS), aumentando a formação de L-arginina a partir da L-citrulina, levando ao aumento na produção de óxido nítrico (NO) (CAMARGO et al., 2012).



Dentre os peptídeos obtidos do veneno de *B. jararaca*, Bj-BPP-10c apresenta uma série de vantagens em relação a ser considerada uma molécula-alvo para o desenvolvimento de agentes terapêuticos voltados para o tratamento de disfunções endoteliais relacionadas a doenças cardiovasculares, com ênfase em doenças relacionadas com a deficiência de NO. Aliado a uma maior seletividade ao domínio C da ECA e a seu efeito hipotensor e potencializador de BK observado apenas em animais hipertensos, evidências da AsS como novo alvo para controle da pressão arterial são relevantes e despertam atenção para estudos com demais BPPs de outras fontes biológicas.

3.3 Fontes alternativas de PROs: escorpiões e anfíbios

Além dos venenos de jararaca, outras fontes biológicas ricas em biomoléculas provenientes de secreções e venenos de outros animais, como escorpiões e anfíbios, têm sido estudadas, representando grande potencial a ser investigado. Em relação aos venenos de escorpiões, a espécie *Tityus serrulatus* (Lutz & Mello, 1922) tem sido relatada como importante fonte de PROs, com uma família de novos BPPs denominada *hipotensinas*. Quatro peptídeos, denominados TsHpt-I, TsHpt-II, TsHpt-III e TsHpt-IV foram identificados, contendo de 24 a 25 aminoácidos, com massas moleculares variando entre 2600 a 2800 Da. Apresentam efeito potencializador de BK, apesar de não promoverem inibição da ECA. Produzem efeito vasodilatador dependente de endotélio, com participação do óxido nítrico (VERANO-BRAGA et al., 2008). Estudos tem demonstrado que TsHpt-I atua como agonista do receptor de bradicinina B₂, corroborando com seus efeitos potencializadores de BK (VERANO-BRAGA et al., 2010). Em comparação com os BPPs de jararaca, parecem apresentar melhor atividade potencializadora de bradicinina *in vivo* em ratos normotensos, o que faz das hipotensinas de *Tityus serrulatus* uma importante fonte de BPPs com potencial aplicação biológica.

Por sua vez, as secreções cutâneas de anfíbios como fonte promissora de biomoléculas têm sido estudadas nas últimas décadas. A presença de bradicinina e peptídeos relacionados à bradicinina (BRPs) na pele de anfíbios tem sido relacionada a uma ausência de sistema calicreína-cinina nestes animais. A secreção de BK assim como BRPs pelos anfíbios potencializam os efeitos da BK endógena dos seus predadores, podendo levar a pronunciados efeitos gastrointestinais e cardiovasculares no

predador, como um eficiente mecanismo de defesa (CONLON, 1999, 2006; XI et al., 2015). Dentre as principais espécies de anfíbios como fonte de peptídeos bioativos, destaca-se a espécie *Phyllomedusa hypochondrialis*. O peptídeo denominado Phypo-Xa foi o primeiro BPP identificado na espécie, apresentando efeito potencializador de bradicinina *in vitro* e *in vivo*, e diminuição do efeito pressórico da angiotensina I *in vivo*, mas não da angiotensina II (CONCEIÇÃO et al., 2007). No Capítulo II deste trabalho, um novo BPP denominado BPP-Brachy e sua forma amidada (BPP-BrachyNH₂) foram identificados na secreção cutânea do anfíbio *Brachycephalus ephippium*. BPP-Brachy é o composto majoritário identificado na secreção, e sua forma amidada apresenta atividade inibidora de ECA *in vitro* com maior energia de interação com o domínio C da enzima, além de atividade vasorelaxante dependente de endotélio em artéria aorta, com provável envolvimento da liberação de NO (ARCANJO et al., 2015).

O Quadro 1 relaciona diversos PROs de diversas fontes biológicas que apresentam similaridades estruturais. Os BPPs de *B. jararaca* comumente possuem um resíduo de ácido piroglutâmico (<Glu) típico e uma estrutura rica em resíduos de prolina nas porções N- e C-terminais, respectivamente (IANZER et al., 2004). Contudo, a presença do <Glu N-terminal não tem sido demonstrada como uma característica obrigatória de peptídeos similares aos BPPs de diferentes fontes biológicas, mas sim a presença de resíduos ricos em prolina, principalmente na região C-terminal e pelas respostas biológicas observadas e relacionadas com o aumento da atividade da bradicinina e redução do efeito pressórico da angiotensina I (MORAIS et al., 2013).

QUADRO 1 – Oligopeptídeos ricos em prolina (PROs) obtidos de diferentes fontes biológicas (ARCANJO et al., 2015).

Sequência	Nome	Fonte	Referências
WPPPKVSP	BPP-Brachy	<i>Brachycephalus ephippium</i>	Capítulo II, (ARCANJO et al., 2015)
WPPRPQIPP	Lm-BPP 1	<i>Lachesis muta</i>	(SOARES et al., 2005)
<EKWDPPPVSPP	Potentiator E	<i>Agkistrodon halys blomhoffii</i>	(KATO; SUZUKI, 1971)
<EFRPSYQIPP	Phypo Xa	<i>Phyllomedusa hypochondrialis</i>	(CONCEIÇÃO et al., 2007)
<EKWAP	Bj-BPP-5a	<i>Bothrops jararaca</i>	(FERREIRA; BARTELT; GREENE, 1970)

<i>Cont.</i>			
<EWPRPQIPP	<i>Bj-BPP-9a</i>	<i>B. jararaca</i>	(FERREIRA; BARTELT; GREENE, 1970)
<ESWPGPNIPP	<i>Bj-BPP-10a</i>	<i>B. jararaca</i>	(FERREIRA; BARTELT; GREENE, 1970)
<ENWPRPQIPP	<i>Bj-BPP-10b</i>	<i>B. jararaca</i>	(IANZER et al., 2004; ONDETTI et al., 1971)
<ENWPHPQIPP	<i>Bj-BPP-10c</i>	<i>B. jararaca</i>	(FERREIRA; BARTELT; GREENE, 1970)
<EWPRPTPQIPP	<i>Bj-BPP-11a</i>	<i>B. jararaca</i>	(ONDETTI et al., 1971)
<EGRAPGPPIPP	<i>Bj-BPP 11b</i>	<i>B. jararaca</i>	(IANZER et al., 2004; MURAYAMA et al., 1997)
<EARPPHPPIPP	<i>Bj-BPP-11e</i>	<i>B. jararaca</i>	(HAYASHI et al., 2003)
<EWGRPPGPPIPP	<i>Bj-BPP-12b</i>	<i>B. jararaca</i>	(HAYASHI et al., 2003)
<EGGWPRPGPEIPP	<i>Bj-BPP-13a</i>	<i>B. jararaca</i>	(IANZER et al., 2004)
<EGGWPRPGPEIPP	BPP-III	<i>Bothrops neuwiedi</i>	(FERREIRA; GALLE; RAIDA, 1998)
<EARPPHPPIPP	BPP-XIe	<i>Bothrops jararacussu</i>	(RIOLI et al., 2008)
<ENWPHPQIPP	BPP-Xc	<i>B. jararacussu</i>	(RIOLI et al., 2008)
<EGGWPRPGPEIPP	BPP-XIIIa	<i>B. jararacussu</i>	(RIOLI et al., 2008)
<EARPPHPPIPPAP	BPP-AP	<i>B. jararacussu</i>	(RIOLI et al., 2008)
<EKWPPGKVPP	-	<i>Bothrops moojeni</i>	(MENIN et al., 2008)
<ENWPRPGPEIPP	-	<i>B. moojeni</i>	(MENIN et al., 2008)
<EKWPRPGPEIPP	BPP-BAX12	<i>B. moojeni; Bothrops atrox</i>	(COUTINHO-NETO et al., 2013; MENIN et al., 2008)
<ERWPHLEIPP	Cdt1b	<i>Crotalus d. terrificus</i>	(GOMES et al., 2007)
<EAPWPDITISPP	BPP-S	<i>Scaptocosa raptoria</i>	(FERREIRA et al., 1996)
LRDYANRVINGGPV EAAGPPA	K12	<i>Buthus occitanus</i>	(MEKI; NASSAR; ROCHAT, 1995)

Legenda: <E, ácido piroglutâmico; A, alanina; D, aspartato; E, ácido glutâmico; F, fenilalanina; L, leucina; G, glicina; H, histidina; I, isoleucina; K, lisina; N, asparagina; P, prolina; Q, glutamina; R, arginina; S, serina; T, treonina; V, valina; W, triptofano; Y, tirosina. Letras em negrito representam resíduos C-terminais ricos em prolina tipicamente presentes em PROs.



Capítulo II

BPP-BrachyNH₂: Um novo oligopeptídeo vasoativo obtido de *Brachycephalus ephippium*

4. Capítulo II – BPP-BrachyNH₂: Um novo oligopeptídeo vasoativo obtido de *Brachycephalus ephippium*

Este capítulo corresponde ao artigo publicado no periódico internacional **Plos One** (Fator de Impacto JCR 2014 3,234; Qualis A1 Biotecnologia), DOI N° **10.1371/journal.pone.0145071** (Ver Apêndice).

Um novo oligopeptídeo vasoativo rico em prolina obtido da secreção cutânea do anfíbio *Brachycephalus ephippium*

(Arcanjo, D. D. R. et al. **Plos One**, v. 10, n. 12, e0145071, dez.2015)

Daniel Dias Rufino Arcanjo^{1,2}, Andreanne Gomes Vasconcelos¹, Simón Gabriel Comerma-Steffensen³, Joilson Ramos Jesus¹, Luciano Paulino Silva⁴, Osmindo Rodrigues Pires Júnior⁵, Claudio Miguel Costa-Neto⁶, Eduardo Brandt Oliveira⁶, Ludovico Migliolo⁷, Octávio Luiz Franco⁷, Carolina Baraldi Araújo Restini⁸, Michele Paulo⁹, Lusiane Maria Bendhack⁹, Marcelo Porto Bemquerer⁴, Aldeidia Pereira Oliveira², Ulf Simonsen³, José Roberto de Souza de Almeida Leite^{1*}

¹Núcleo de Pesquisa em Biodiversidade e Biotecnologia – BIOTEC, *Campus* Ministro Reis Velloso – CMRV, Universidade Federal do Piauí – UFPI, Parnaíba, PI, Brazil;

²Laboratório de Farmacologia Cardiovascular – LFC, Núcleo de Pesquisas em Plantas Mediciniais – NPPM, Universidade Federal do Piauí – UFPI, Teresina, PI, Brazil;

³Pulmonary and Cardiovascular Pharmacology, Department of Biomedicine, Aarhus University, Aarhus, Denmark;

⁴Laboratório de Espectrometria de Massa, EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, Brazil;

⁵Laboratório de Toxinologia, Instituto de Ciências Biológicas – ICB, Universidade de Brasília – UnB, Brasília, DF, Brazil;

⁶Departamento de Bioquímica e Imunologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP, Universidade de São Paulo – USP, Ribeirão Preto, SP, Brazil;

⁷Centro de Análises Proteômicas e Bioquímicas – CAPB, Universidade Católica de Brasília – UCB, Brasília, DF, Brazil.

⁸Universidade de Ribeirão Preto – UNAERP, Curso de Medicina. Avenida Costábile Romano 2201, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

⁹Departamento de Física e Química, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – FCFRP, Universidade de São Paulo – USP, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

*Autor correspondente

E-mail: jrsaleite@gmail.com; jrleite@pq.cnpq.br.

Resumo

Oligopeptídeos ricos em prolina (PROs) representam uma extensa família que abrange os denominados peptídeos potencializadores de bradicinina (BPPs). Eles têm a capacidade de inibir a atividade da enzima conversora de angiotensina-I (ECA) e apresentam uma típica estrutura química com um grupo piroglutâmico (<Glu) e uma sequência rica em prolina nas porções N- e C-terminais, respectivamente. Estudos prévios tem demonstrado que PROs promovem redução da pressão sanguínea em animais. Reconhecendo este potencial biológico e sua aplicação, o presente estudo descreve o isolamento e a caracterização químico-farmacológica de um peptídeo inédito com propriedades vasoativas, isolado a partir da secreção cutânea do anfíbio *Brachycephalus ephippium*. Este PRO inédito, denominado “BPP-Brachy”, apresenta a estrutura primária WPPPKVSP. Sua forma amidada, denominada “BPP-BrachyNH₂”, inibe eficientemente a atividade da ECA *in vitro* em soro de ratos. Estudos *in silico* de docagem molecular sugerem que o BPP-BrachyNH₂ é capaz de formar uma rede de pontes de hidrogênio assim como múltiplas interações de Van der Waals com a ECA de rato, causando bloqueio do acesso do substrato ao sítio ativo do domínio C. Em anéis de artéria torácica de ratos, BPP-BrachyNH₂ induz efeito vasodilatador dependente de endotélio e com magnitude similar ao captopril. Em anéis de aorta previamente carregados com a sonda DAF-FM DA e avaliados por microscopia confocal, BPP-BrachyNH₂ aumentou significativamente a liberação de óxido nítrico (NO). Adicionalmente, a viabilidade celular de linhagens de células endoteliais de veia umbilical humana (HUVECs) e em células de músculo liso vascular de aorta de ratos, foi avaliada pelo método do MTT na presença de BPP-BrachyNH₂, onde o peptídeo apresentou ausência de citotoxicidade nas concentrações testadas. Em conclusão, o peptídeo BPP-BrachyNH₂ apresenta uma nova sequência primária e é o primeiro BPP isolado a partir da secreção cutânea em toda a família Brachycephalidae. O BPP-BrachyNH₂ não apresenta citotoxicidade e promove vasodilatação dependente de endotélio provavelmente mediada pela liberação de NO. Estes achados fornecem a possibilidade para se explorar os anfíbios como fontes de novas biomoléculas, assim como para suas potenciais aplicações no tratamento de disfunções endoteliais e doenças cardiovasculares.

4.1 Introdução

A família Brachycephalidae (Amphibian) é composta por 62 espécies, divididas em dois gêneros (*Brachycephalus* Fitzinger, 1826 e *Ischnocnema* Reinhardt & Lütken, 1862). Rãs da família Brachycephalidae têm sido encontradas na região Sudeste e Centro-Oeste do Brasil e no nordeste da Argentina, estando ainda presente em partes adjacentes do Paraguai (FROST, 2016). Pertencente a esta família, a espécie *Brachycephalus ephippium* Spix, 1824 (FIGURA 4-A) é uma pequena rã com hábitos diurnos que apresenta uma atrativa cor amarela-alaranjada e comprimento rostro-cloacal (CRC) de 18 mm (POMBAL; WISTUBA; BORNSCHEIN, 1998). Hábitats naturais para o grupo *ephippium* tem sido propostos para espécies mais relacionadas à *B. ephippium*, como em áreas elevadas na Serra do Mar, Brasil, uma das áreas mais adequadas onde se pode encontrar a espécie (PIE et al., 2013). Pires e colaboradores reportaram a identificação de tetrodotoxina (TTX) e vários análogos na secreção cutânea de *B. ephippium* e em duas outras espécies do gênero *Brachycephalus* (PIRES et al., 2002, 2005). Adicionalmente, um análogo da TTX denominado 11-oxotetrodotoxina foi reportado como sendo de quatro a cinco vezes mais tóxico que a TTX (PIRES et al., 2003).

Os peptídeos bioativos usualmente encontrados na secreção cutânea de diversos anfíbios são frequentemente reportados como sendo parte de uma importante estratégia de defesa contra predadores. Dentre eles, os oligopeptídeos ricos em prolina (PROs) representam uma grande família que inclui os peptídeos potencializadores de bradicinina (BPPs), que promovem inibição de uma zinco-metalopeptidase denominada enzima conversora de angiotensina-I (ECA, EC 3.4.15.1), localizada na membrana plasmática de células endoteliais. Esta enzima atua na conversão da inativa angiotensina no potente agente vasoconstrictor angiotensina II, assim como degrada a bradicinina (BK) nos derivados inativos BK(1-7) ou BK(1-5) (SCHMAIER, 2002; SOARES et al., 2005).

O *Bj*-BPP-5a foi o primeiro BPP cuja sequência de aminoácidos foi descrita, e está presente em extratos hidroalcoolicos do veneno da serpente *B. jararaca* (FERREIRA; BARTELT; GREENE, 1970; FERREIRA, 1965). Em contraste com a administração oral, a administração parenteral mostrou benefícios para o *Bj*-BPP-9a no tratamento da hipertensão humana (GAVRAS et al., 1974). Baseado nestas observações, a inibição da ECA foi considerada um alvo estratégico para o tratamento

da hipertensão, e aliado a um modelo para a ECA somática (sECA), uma metalopeptidase com um grupo carboxila ligado ao zinco no centro catalítico, levaram ao desenvolvimento do captopril. Captopril foi o primeiro fármaco anti-hipertensivo efetivo, desenvolvido para se ligar e inibir os sítios ativos da ECA, e assim representou uma revolução no tratamento da hipertensão (CUSHMAN; ONDETTI, 1999; GAVRAS et al., 1978).

A inibição da ECA é apenas um dos possíveis mecanismos pelos quais toxinas animais e BPPs podem promover efeitos vasodilatador e anti-hipertensivo. Os peptídeos sintéticos *Bj*-BPP-7a e -10c foram reportados como agentes anti-hipertensivos com efeitos independentes da ECA (IANZER et al., 2007), e a ativação da enzima argininosuccinato sintase (AsS) foi proposta como alvo para o *Bj*-BPP-10c, promovendo aumento dos níveis de L-arginina e formação de NO (GUERREIRO et al., 2009). Para o *Bj*-BPP-5a, o aumento na produção de NO é dependente da ativação de receptores muscarínicos M₁ e de bradicinina B₂ (MORAIS et al., 2011), confirmando o efeito anti-hipertensivo dependente de NO observado para este peptídeo (IANZER et al., 2011). Por sua vez, para o *Bj*-BPP-13a, o aumento na produção de NO tem sido relacionado à ativação de receptores muscarínicos M₃ (MORAIS et al., 2013). Então, além da inibição da ECA, toxinas animais e BPPs tem sido reportados como ativados de outras enzimas e receptores que poderiam estar envolvidos no efeito vasodilatador dos BPPs, levando à descoberta de novos alvos com potencial para aplicações terapêuticas (CAMARGO et al., 2012; LEWIS; GARCIA, 2003b).

No presente estudo, a estrutura e as propriedades vasodilatadoras induzidas por BPP-BrachyNH₂ (WPPPKVSP), um oligopeptídeo rico em prolina (PRO) isolado a partir da secreção cutânea de *Brachycephalus ephippium*, foram investigadas.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Declaração do Comitê de Ética

A coleta dos anfíbios foi autorizada pelo *Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis*, IBAMA-Brasil, com licença nº 02010.003041/05-87. Após a coleta da secreção cutânea, as rãs foram eutanasiadas com dióxido de carbono 20%, seguindo a Resolução nº 1000/2012 do Conselho Federal de Medicina Veterinária, Brasil. A morte foi confirmada através da ausência de resposta a um estímulo mecânico

nas patas traseiras. Após a coleta da secreção, 3 (três) espécimes foram incorporados à Coleção Zoológica Brasileira.

Ratos Wistar machos foram manuseados e eutanasiados de acordo com a Resolução nº 1000/2012 do Conselho Federal de Medicina Veterinária, visando minimizar sofrimento dos animais. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Piauí, Brasil (permissão nº 008/2012; Ver Apêndice).

4.2.2 Obtenção e purificação da secreção cutânea

Espécimes adultos de *B. ephippium* (n=23) (FIGURA 4-A) foram coletados em uma região de mata atlântica em Mogi-Mirim, São Paulo, Brasil, em janeiro de 2002. Amostras de secreções cutâneas de *B. ephippium* foram obtidas através de uma breve estimulação elétrica das glândulas cutâneas, e armazenadas em um banco de secreção de venenos e toxinas. Após lavagem com água destilada, as frações hidrofílicas foram injetadas em uma coluna analítica de fase reversa Vydac (150×4,6 mm, C₁₈, 5 µm, 218TP104) acoplada um cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC) (Shimadzu Co., Quioto, Japão). A purificação foi realizada a temperatura ambiente e com gradiente de acetonitrila (ACN) de 0 a 100% em ácido trifluoroacético 0,1% (TFA) por 60 min, com detecção UV em 216 e 280 nm (LEITE et al., 2005).

4.2.3 Análise por Espectrometria de massas e sequenciamento De novo

As massas moleculares e homogeneidade dos BPPs (BPP-Brachy and BPP-Brachy-NH₂) foram determinadas em espectrômetro de massas UltraFlex III MALDI-TOF/TOF (Bruker Daltonics, Billerica, MA, EUA) em uma matriz de ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico (MACHADO et al., 2013). O espectrômetro de massas foi operado no modo positivo refletor para MS ou LIFT™ e no modo positivo para experimentos MS/MS em software FlexControl™. A calibração do equipamento foi realizada externamente com íons [M+H]⁺ de angiotensina I, angiotensina II, substância P, bombesina e hormônios adrenocorticotróficos (fragmentos 1–17 e 18–39). Dados acumulados de 200 disparos de laser foram registrados para cada espectro. As amostras foram analisadas por ambos MALDI-TOF e LIFT™ MALDI-TOF/TOF MS/MS para o mesmo alvo. Os espectros foram manualmente interpretados por sequenciamento *De novo*. Para determinação dos resíduos isoméricos e isobáricos, utilizou-se modo

fragmentação em alta energia (DOURADO et al., 2007). Uma busca por alinhamentos e similaridades entre sequências peptídicas foi realizada em FASTA 3 utilizando o servidor molecular ExPASy (<http://www.expasy.ch/>).

4.2.4 Síntese do peptídeo

A síntese do octapeptídeo BPP-BrachyNH₂ foi realizada manualmente com um padrão químico Fmoc (N-(9-fluorenil)metoxycarbonil) (FIELDS; NOBLE, 1990) iniciando a partir de uma resina Rink-amida-MBHA (0,59 mmol·g⁻¹, Peptides International, Louisville, KY, EUA). Aminoácidos protegidos por Fmoc (Peptides International, Louisville, KY, EUA) foram utilizados em 4 vezes em excesso em relação à escala nominal de síntese (1,2 mmol). Acoplamentos foram realizados com 1,3-diisopropilcarbodiimida/acetato de etil-2-ciano-2-hidroxiimina (DIC/Oxima) em N,N-dimetilformamida (DMF) por 2-3 h. Os grupos protegidos das cadeias laterais foram tert-butyl para Ser, e Boc para Lys e Trp. Grupos desprotegidos foram conduzidos por 4-metilpiperidina (1:4, v:v) por 20-30 min. A remoção da proteção da cadeia lateral e clivagem do peptídeo da resina foi realizada com o uso de 10,0 mL de TFA:água:tioanisol:etanoditiol:triisopropilsilano (86:5:5:2,5:1, v:v:v:v) com adição de 1 g de fenol por 90 min em temperatura ambiente sob agitação. Após evaporação do solvente com nitrogênio, o peptídeo foi precipitado pela adição de éter isopropílico gelado, coletado por filtração e lavado quatro vezes. A extração foi realizada com 200 mL de H₂O:ACN (1:1, v:v) e o peptídeo bruto foi liofilizado. A purificação foi realizada em HPLC Shimadzu com uma coluna C₁₈ Vydac (150×4,6 mm) e um gradiente linear de ACN (12-35%; 25 min) em TFA 0,05%. Pureza e identidade foram verificadas por MALDI-TOF MS and MS/MS. Soluções-estoque dos peptídeos foram preparadas em água e suas concentrações foram determinadas de acordo com o índice de absorvidade molar do triptofano (5550 M⁻¹·cm⁻¹) em 280 nm.

4.2.5 Ensaio de inibição de ECA

Os efeitos inibitórios do BPP-BrachyNH₂ e do captopril sobre a hidrólise catalizada por ECA do substrato H-hipuril-His-Leu-OH foram estimados na presença dos inibidores BPP-BrachyNH₂ (0,05 - 50 μM) e captopril (3 × 10⁻⁵ - 2 μM). Soro fresco de ratos Wistar foram utilizados nas reações como fonte de ECA, e o produto H-His-Leu-OH foi medido fluorimetricamente seguido de derivatização com *o*-

ftaldialdeído, como descrito (SANTOS; KRIEGER; GREENE, 1985; YANG; NEFF, 1972). As reações foram realizadas em duplicata a 37°C por 30 min em 200 µL de tampão Tris-HCl 20 mM, pH 8,1, NaCl 0,3 M, H-hipuril-His-Leu-OH 1,0 mM, 20 µL de soro de rato contendo diferentes concentrações dos inibidores, como descrito acima. Os valores de IC₅₀, correspondentes à concentração do inibidor que resulta em 50% da atividade máxima, foram obtidos a partir da atividade de cada concentração em separado e plotada em função de cada inibidor.

4.2.6 Modelagem molecular e estudos de docagem in silico

Os modelos tridimensionais para a ECA de *Rattus norvegicus* (GenBank: AAG35596.1) e o BPP-Brachy foram construídos baseados nas estruturas da ECA (UniProtKB ID: P12821; PDB code: 2YDM) e da cinase dependente de ciclina 2 – CDK2 (UniProtKB ID: P24941; PDB code: 3QTS) de *Homo sapiens*, respectivamente. O 2YDM apresenta a estrutura da ECA de *Homo sapiens* resolvida por difração de raios-X, com uma resolução de 2,44 Å (AKIF et al., 2011). Esta estrutura foi utilizada como modelo para construção do modelo para a ECA de *Rattus norvegicus*. O 3QTS apresenta a estrutura da CDK2 de *Homo sapiens* (SCHONBRUNN et al., 2013). Esta estrutura foi utilizada como modelo para construção do BPP-Brachy.

Duzentas estruturas teóricas tridimensionais foram construídas utilizando o software Modeller v.9.12 para cada peptídeo. Alguns parâmetros dos modelos finais da ECA e do BPP-Brachy, como geometria, estereoquímica e energia de distribuição entre os modelos avaliados utilizando PROSA II para analisar características de empacotamento e exposição a solvente, e PROCHECK para análises adicionais da qualidade estereoquímica. Adicionalmente, o desvio da raiz quadrática média (RMSD) foi considerado por sobreposição dos traços Ca e as “espinhas dorsais” das moléculas sobre as estruturas dos respectivos modelos, usando o programa 3DSS. O RMSD indica a similaridade estrutural entre as estruturas obtidas do Protein Data Bank (PDB) e os respectivos modelos teóricos construídos, em função do tempo analisado. As estruturas da proteína e peptídeo foram visualizados e analisados com PyMol (<http://pymol.sourceforge.net/>).

Todos os cálculos de docagem foram realizados utilizando o software AUTODOCK 4.2. Simulação de docagem do BPP-Brachy foi realizada em direção aos domínios C e N da ECA. Todas os átomos de hidrogênio polares foram adicionados

utilizando o AutoDockTool. Os mapas foram calculados com $30 \times 30 \times 30 \text{ \AA}$ para ambos os domínios da ECA, e $1,0 \text{ \AA}$ de espaçamento centrado nos sítios ativos dos domínios C e N, permitindo interações com todas as cadeias laterais expostas. (MASUYER et al., 2012). Um algoritmo genético Lamarckiano foi usado como método de busca para encontrar o melhor complexo peptídeo-enzima. Dez corridas de docagem foram realizadas, gerando 90 modelos, onde o máximo de liberdade às cadeias laterais foi desbloqueado para o peptídeo. As estruturas geradas foram classificadas em dois passos: 1) um cluster com os melhores modelos com a mais baixa energia; 2) um desvio da raiz média quadrática (RMSD) para todos os átomos docados com os domínios C ou N da ECA, com tolerância de 4 \AA (FIGURA 7-D), como recomendado para docagem às cegas (JITONNOM; SONTAG, 2012). O software PyMol foi usado para caracterizar as interações peptídeo-enzima (<http://pymol.sourceforge.net/>).

4.2.7 Efeito sobre a reatividade vascular em artéria aorta de ratos

Ratos Wistar machos ($250 \pm 30 \text{ g}$) foram mantidos em temperatura controlada ($22 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$) e ciclo claro-escuro (12/12 h), com livre acesso a água e à comida (Purina-Nestlé, São Paulo, SP, Brasil). 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); $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (2,5); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (5,7); NaHCO_3 (25,0); $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (1,1) e D-glicose (11,0) sob tensão isométrica de 1,0 g e aeração constante com mistura de CO_2 5% e O_2 95%. O endotélio vascular foi considerado como funcionalmente intacto quando acetilcolina (10^{-6} M) induziu vasorelaxamento superior a 70% em preparações pré-contraídas com fenilefrina ($3 \times 10^{-7} \text{ M}$). Após lavagem, as preparações foram novamente pré-contraídas com PE ($3 \times 10^{-7} \text{ M}$) e curvas concentração-respostas para o BPP-BrachyNH₂ e captopril ($10^{-9} - 3 \times 10^{-5} \text{ M}$) foram construídas (SILVA-FILHO et al., 2012).

4.2.8 Medida de NO em anéis aórticos por microscopia confocal

As medidas de óxido nítrico (NO) por fluorescência foram realizadas em anéis aórticos recém-isolados de acordo com Capellini e colaboradores (CAPELLINI et al., 2013). Após a aderência a uma lamínula, os anéis aórticos foram carregados com a sonda diacetato de 4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluoresceína (DAF-FM DA) e mantidos sob CO_2 5% (20 min, $37 \text{ }^\circ\text{C}$). Logo após, as preparações foram excitadas em

488 nm e a emissão de fluorescência foi medida em 515 nm. A solução-estoque de DAF-FM DA foi preparada em dimetilsulfóxido (DMSO) a 5 mM, a solução de trabalho (5 μ M) foi preparada diluindo a solução-estoque em solução de Hanks (pH 7,4) composta de (em mM): CaCl₂ (1,6); MgSO₄ (1,0); NaCl (145,0); KCl (5,0); NaH₂PO₄ (0,5); dextrose (10,0); e HEPES (10,0). A intensidade de fluorescência foi medida através de um microscópio confocal a laser (Leica TSC SP5, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha).

As preparações foram estimuladas durante 100 segundos com solução de Hanks, e logo após foram incubadas com BPP-BrachyNH₂ (10⁻⁷ ou 10⁻⁵ M) durante 200 segundos. As regiões de interesse (ROI) foram selecionadas e a intensidade de fluorescência intracelular foi medida antes e depois da adição de BPP-BrachyNH₂. A fluorescência média foi calculada para cada animal (n=4). A partir destes dados, a emissão de fluorescência inicial em t = 100 s foi considerada como a fluorescência basal (F₀ = 100%), e o valor de fluorescência final (F) foi obtido em t = 200 s após a adição de BPP-BrachyNH₂.

4.2.9 Estudos de citotoxicidade

4.2.9.1 Cultura celular

Células endoteliais de veia umbilical humana (HUVECs) (ATCC, Manassas, VA, EUA) foram cultivadas em Meio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) contendo 40% de soro fetal bovino (FBS). Células de músculo liso vascular (VSMCs) foram obtidas de artéria aorta isolada de rato, após serem longitudinalmente abertas e sua camada íntima exposta em uma placa de cultura de seis poços, com meio de cultura e CO₂ 5% por 30 minutos. Então, 10 μ L de meio de cultura contendo estreptomicina 10000 UI e fungizona 0,1% foi adicionado, e o tecido foi submetido à migração celular e adesão por dois dias.

4.2.9.2 Ensaio do MTT

A viabilidade celular foi avaliada após exposição do BPP-BrachyNH₂ ao ensaio do brometo de 2-(3,5-difeniltetrazol-2-il)-4,5-dimetil-1,3-tiazol (MTT) em HUVECs and VSMCs, como previamente descrito (PAULO et al., 2012), com algumas modificações. Células foram plaqueadas em placas de 96 poços a 2 \times 10⁴ células/poço, e então um volume de 200 μ L de meio de cultura foi adicionado, seguido de incubação a

37 °C sob CO₂ 5% durante 24 h. O meio de cultura foi trocado, e as células foram incubadas com BPP-BrachyNH₂ (10⁻¹², 3×10⁻⁹, 10⁻⁷ and 10⁻⁵ M) por 24 horas. Em seguida, o meio foi removido e substituído por solução tampão fosfato-salino (PBS), 20 µL of solução de MTT (5 mg·mL⁻¹) e 180 µL de DMEM por poço. Após incubação por 4 h, o meio foi substituído por 200 µL de DMSO, visando dissolver os cristais de formazan. A densidade óptica foi medida em 570 nm. As absorbâncias obtidas para células não tratadas e tratadas com Triton X-100 1,0% foram consideradas como controles de viabilidade celular e citotoxicidade, respectivamente.

4.2.10 Análises estatísticas

Os valores de IC₅₀ para a atividade da ECA e os valores de pD₂ para as atividade vasorelaxante foram obtidas por regressão não-linear. Todos os valores foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM), e as significâncias para valores comparados foram analisadas pelo Teste *t* de Student ou análise de variância (ANOVA) de uma via seguida do pós-teste de Bonferroni. Todos os procedimentos foram realizados utilizando o software Graph Pad Prism 5.02™ (Graph Pad Software, Inc., San Diego, CA, EUA).

4.3 Resultados

4.3.1 Identificação do BPP-Brachy e BPP-BrachyNH₂

A secreção cutânea liofilizada de *B. ephippium* (FIGURA 4-A) foi fracionada como demonstrado na FIGURA 4-B. Vários picos foram detectados e as setas indicam o novo BPP e seu derivado amidado. Este achado foi posteriormente analisado e confirmado por experimentos MS e MS/MS. As estruturas primárias WPPPKVSP (BPP-Brachy) e sua forma amidada (BPP-BrachyNH₂) foram obtidas após sequenciamento *De novo* por interpretação do espectro MS/MS (FIGURA 5). O composto com tempo de retenção em 22,5 minutos corresponde ao carotenóide β-caroteno, que pode estar relacionado à coloração aposemática desta espécie. A cor do corpo de vertebrados menores é determinada pelos tipos de cromatóforos na pele, e melanóforos aparecem primeiro no tegumento dorsal da fase larval durante o estágio inicial de desenvolvimento (BAGNARA et al., 1979).

FIGURA 4 – (A) Espécime adulto macho de *B. ephippium* (Foto: Pombal Jr., J.P.). (B) Fracionamento dos peptídeos da secreção cutânea de *B. ephippium*. Amostra contendo 3,0 mg da secreção liofilizada foi dissolvida em 150 μ L de TFA 0,1% e injetada em uma coluna C₁₈ Vydac. A cromatografia foi realizada com um gradiente linear de ACN de 0 a 100% em TFA 0,1%, taxa de fluxo de 1,0 mL/min por 60 min. A ocorrência de peptídeos foi monitorada pelas medidas de absorbância nos comprimentos de onda indicados.

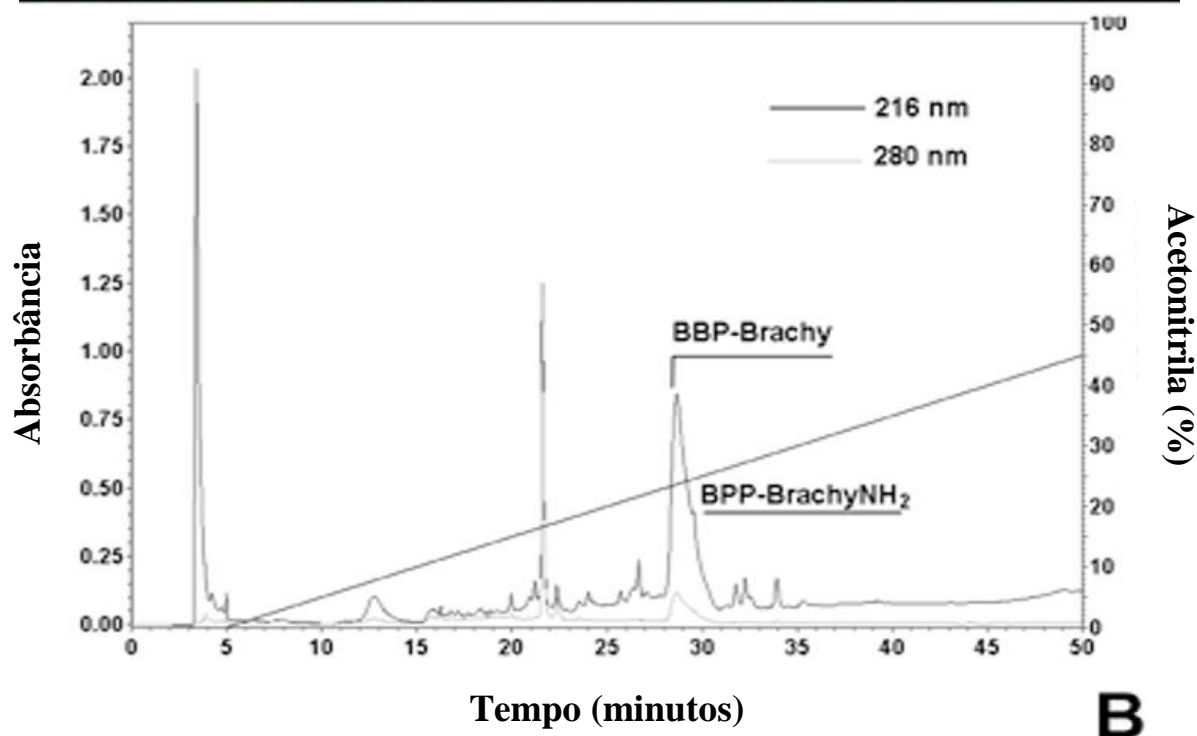
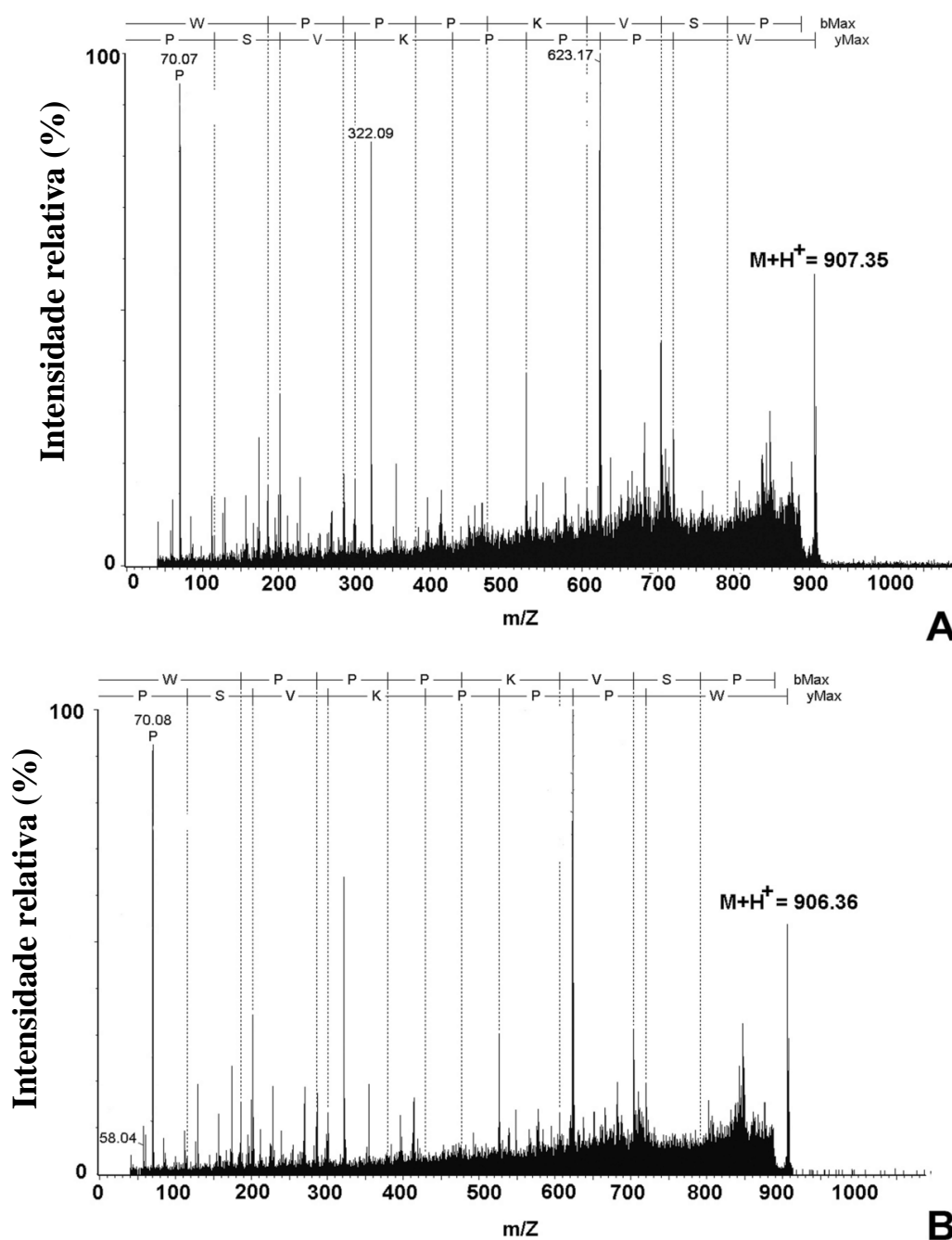


FIGURA 5 – Sequenciamento dos peptídeos ricos em prolina (PROs) obtidos da secreção cutânea de *B. ephippium*. (A) Espectro de massas do BPP-Brachy, $[M+H]^+ = 907,37$ e do (B) BPP-BrachyNH₂, $[M+H]^+ = 906,36$, analisado em um UltraFlex III MALDI-TOF/TOF operando em modo LIFT™ para experimentos MS/MS. Os fragmentos observados permitiram uma completa atribuição da série de íons y e b. A sequência do peptídeo utilizando código de uma letra seguido da orientação das séries y e b está demonstrada na parte superior destes espectros.

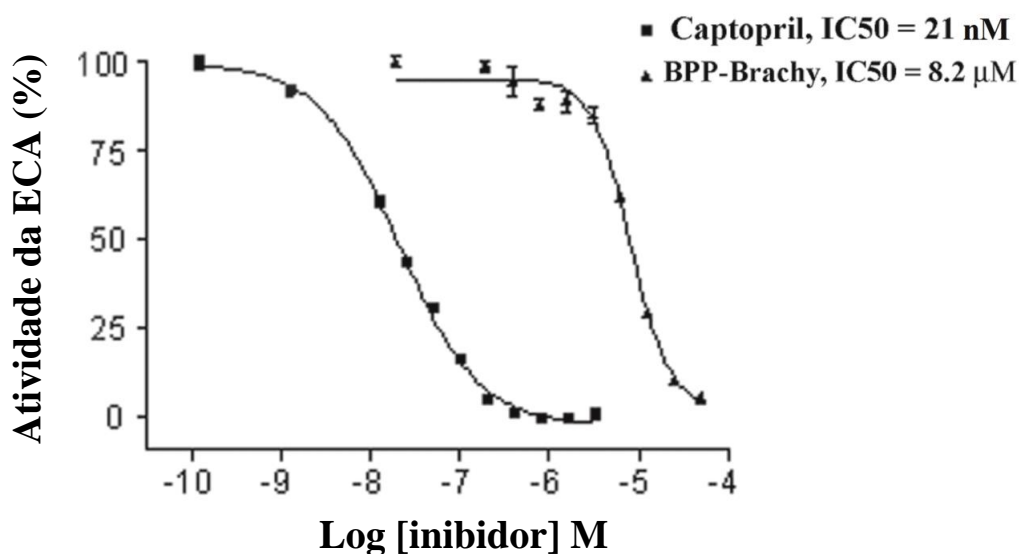


Legenda: **W**, triptofano; **P**, prolina, **K**, lisina; **V**, valina; **S**, serina.

4.3.2 Avaliação da atividade inibitória da ECA in vitro

Visando avaliar se o BPP-BrachyNH₂ é ativo em um sistema biológico de mamífero, o efeito do peptídeo foi avaliado sobre a atividade da ECA em soro de ratos (FIGURA 6). Embora o BPP-BrachyNH₂ (IC₅₀ = 8,2 μM) apresente menor eficácia que o captopril (IC₅₀ = 21 nM) como um inibidor de ECA, é fato que ele funciona como um inibidor de ECA, aliado a sua estrutura primária característica quando comparado aos clássicos BPPs, fornecendo subsídios para pesquisas voltadas para a determinação da relação estrutura/função com análogos sintéticos.

FIGURA 6 – Efeito inibitório do BPP-BrachyNH₂ e captopril sobre a atividade da ECA em soro de ratos. Atividade enzimática residual foi plotada em relação às concentrações do inibidor correspondente. Valores de IC₅₀ foram calculados utilizando regressão não linear. As análises foram realizadas usando o software GraphPad 5.0 (GraphPad Prism, San Diego, CA, EUA).



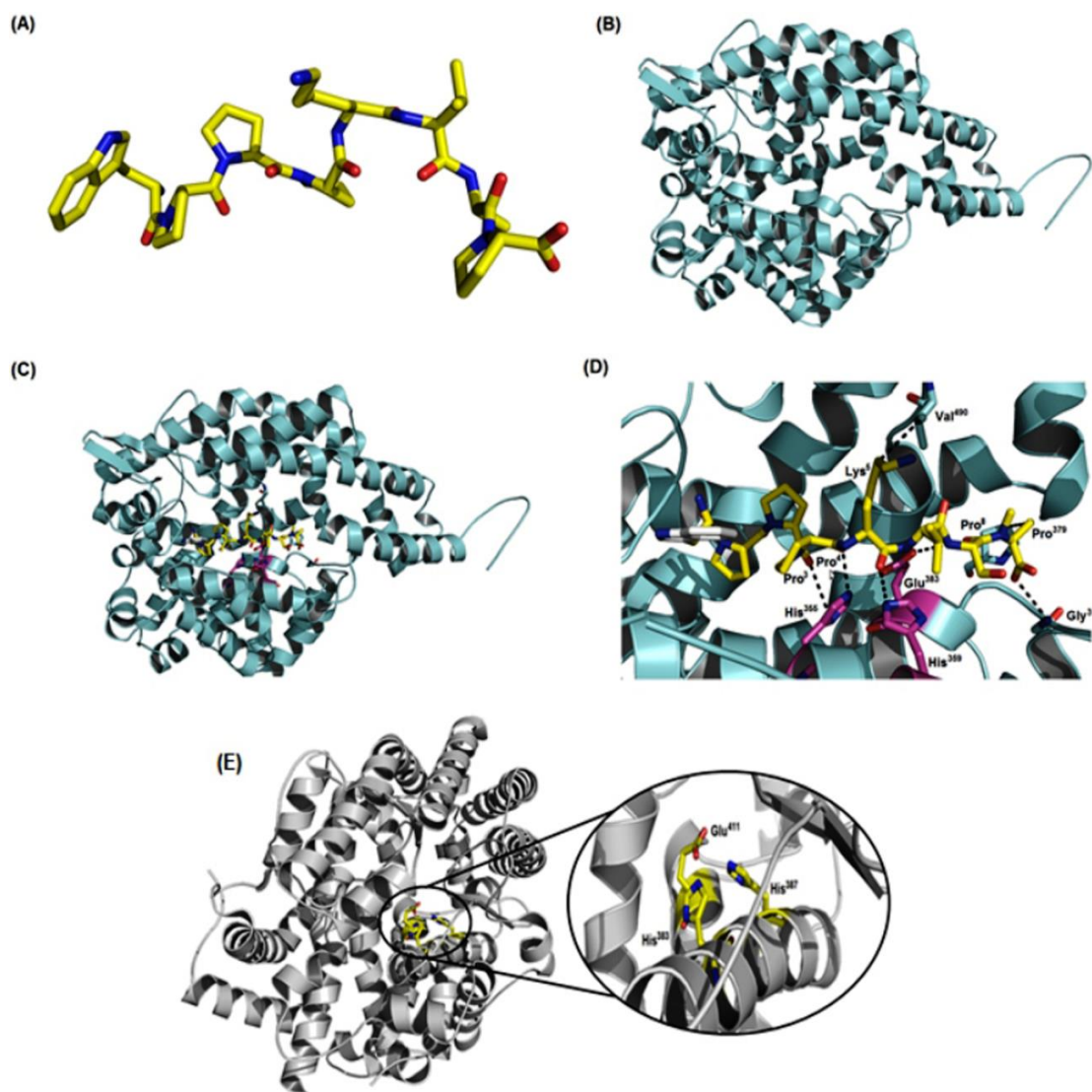
4.3.3 Avaliação da atividade inibitória da ECA in silico

Os modelos tridimensionais para o BPP-Brachy e a ECA mostraram 50 e 83% de identidade com os modelos 3QTS e 2YDM, respectivamente. A cinase dependente de ciclina 2 de *Homo sapiens* foi usada como um modelo para a construção do modelo teórico do BPP-Brachy, devido sua alta similaridade entre as sequências (FIGURA 7-

A). O modelo para a ECA de rato foi gerado a partir da ECA humana, uma estrutura resolvida por difração de raios-X com uma resolução de 2,44 Å (FIGURA 7-B). A validação dos modelos 3D pelo *Plot de Ramachandran* mostrou que os modelos apresentam 100% dos resíduos de aminoácidos em regiões permitidas. O valor do desvio da raiz média quadrática (RMSD), calculado entre as estruturas obtidas do *Protein Data Bank* (PDB) e seus respectivos modelos 3D construídos, foi 2,3 Å para os modelos de BPP-Brachy, e 0,51 Å para os modelos de ECA.

Docagens moleculares foram realizadas entre o BPP-Brachy e os dois sítios catalíticos localizados em uma região denominada domínios N e C (FIGURA 7-C). As interações observadas para o BPP-Brachy e o domínio C apresenta energia de $-9.1 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$. O complexo BPP-Brachy/domínio C foi estabilizado entre as carbonilas de Pro³, Pro⁴ e Lys⁵ e os hidrogênios dos átomos de nitrogênio dos anéis imidazólicos de His³⁵⁵ e His³⁵⁹, formando uma rede de pontes de hidrogênio com distâncias de 3,7, 2,8, e 3,2 Å, respectivamente. BPP-Brachy também forma dois possíveis contatos hidrofóbicos entre os carbonos de Pro⁸ e Lys⁵ e os carbonos dos resíduos Pro³⁷⁹ e Val⁴⁹⁰, com distâncias de 3,5 e 3,0 Å, respectivamente. Pontes de hidrogênio foram observadas também entre o hidrogênio do nitrogênio da Ser⁷ do BPP-Brachy e o átomo de oxigênio da cadeia principal da Glu³⁸³ da ECA, com uma distância de 3,2 Å, assim como entre o hidrogênio do oxigênio da Pro⁸ do BPP-Brachy e o átomo de nitrogênio da cadeia principal da Gly³⁷⁶ da ECA, com uma distância de 3,1 Å (FIGURA 7-D). Os resíduos de histidina parecem ser responsáveis pelas interações entre o substrato e a tríade catalítica His³⁸³, His³⁸⁷ e Glu⁴¹¹, indicando uma provável inibição da atividade catalítica de forma canônica, impedindo a formação do peptídeo hipertensivo angiotensina II pela inibição da atividade da enzima conversora de angiotensina-I (ECA) (FIGURA 7-E) (MASUYER et al., 2012; PETRIZ et al., 2013). Adicionalmente, BPP-Brachy também foi docada com um segundo sítio catalítico relacionado ao domínio N, visando compreender melhor o mecanismo de inibição. Contudo, a energia observada para a interação entre o BPP-Brachy e o domínio N foi $-6.1 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ (dados não mostrados), menor que a energia de interação observada no domínio C. Outro ponto crítico foi a ausência de interação com importantes resíduos de aminoácidos envolvidos na atividade catalítica do domínio N da ECA humana (Tyr³⁶⁹ and Arg³⁸⁹). Estas evidências *in silico* reforçam que a ação inibitória do BPP-Brachy sobre a ECA pode ser atribuída a uma maior interação com o domínio C em relação ao domínio N, que demonstra menor afinidade com a região catalítica.

FIGURA 7 – Modelagem molecular do BPP-Brachy e da ECA humana e estudos de docagem *in silico*. Modelos teóricos do BPP-Brachy(A) e da ECA humana (B), ambos mostrando estrutura com sistema de baixa energia; Docagem molecular entre BPP-Brachy e ECA (C); Relação de complexo binário com interações em detalhes (D); e interações entre o substrato e a tríade catalítica His³⁸³, His³⁸⁷ e Glu⁴¹¹ (E), indicando um provável bloqueio da atividade catalítica.



4.3.4 Efeito vasodilatador em anéis de artéria aorta de ratos

BPP-BrachyNH₂ promoveu um significativo vasorelaxamento dependente de concentração em preparações com endotélio funcional ($E_{\max} = 40,3 \pm 3,5\%$), enquanto o efeito foi mínimo em preparações com endotélio removido ($E_{\max} = 14,7 \pm 4,1\%$) (FIGURA 8-A). O fármaco de referência captopril induziu também vasodilatação dependente de endotélio com o mesmo relaxamento máximo ($E_{\max} = 32,1 \pm 4,2\%$) observado para o BPP-BrachyNH₂ (FIGURA 8-B-D). As preparações aórticas foram lavadas e estabilizadas durante 30 min, e então uma nova vasoconstrição induzida por PE (3×10^{-7} M) foi realizada. Fenilefrina (PE) induziu vasoconstrição com a mesma potência, indicando que o efeito do BPP-BrachyNH₂ em anéis de artéria aorta é reversível e não letal às células vasculares (dados não apresentados).

O envolvimento do NO no relaxamento induzido por BPP-BrachyNH₂ foi avaliado pela inibição da NO sintase endotelial (eNOS) com L-NAME (REES et al., 1990). Na presença do L-NAME, o relaxamento induzido por BPP-BrachyNH₂ foi abolido (FIGURA 8-C), e o efeito máximo foi reduzido em 5,3 vezes ($E_{\max} = 7,6 \pm 2,9\%$) (FIGURA 8-D), sugerindo o envolvimento do NO no relaxamento induzido pelo BPP-BrachyNH₂ em artéria aorta torácica de ratos.

4.3.5 Medidas de NO por microscopia confocal a laser

Para medir diretamente se BPP-BrachyNH₂ aumenta a liberação de NO a partir do endotélio vascular, segmentos aórticos foram carregados com uma sonda sensível ao NO, DAF-FM DA. A incubação com BPP-BrachyNH₂ aumentou intensidade de fluorescência em $12,3 \pm 4,8\%$ e $13,2 \pm 2,4\%$ em resposta ao BPP-BrachyNH₂ nas concentrações de 10^{-7} e 10^{-5} M, respectivamente (FIGURA 9). Estes resultados evidenciam que o aumento na liberação de NO medeia o vasorelaxamento dependente de endotélio induzido pelo peptídeo BPP-BrachyNH₂.

4.3.6 Avaliação citotóxica em células vasculares

O ensaio do MTT foi realizado visando avaliar a viabilidade celular das células HUVECs e VSMCs na presença do BPP-BrachyNH₂. Nenhum efeito citotóxico foi observado para as concentrações avaliadas (FIGURA 10), sugerindo que um suposto dano celular vascular não contribui para a vasodilatação e aumentos na liberação de NO induzida pelo BPP-BrachyNH₂.

FIGURA 8 – Efeito vasorelaxante induzido por BPP-BrachyNH₂ e captopril (10⁻⁹ – 3×10⁻⁵ M) em artéria aorta torácica de ratos. Anéis aórticos foram pré-contraídos com fenilefrina (3×10⁻⁷ M) e então cumulativamente incubados com BPP-BrachyNH₂ (A) ou captopril (B). Efeito do L-NAME (100 μM) sobre o efeito vasorelaxante induzido pelo BPP-BrachyNH₂ (C). Comparações respectivas entre valores de E_{max} (D) foram plotados. Os resultados foram expressos como média ± EPM (n=6). Teste t de Student. ***p*<0,01 e ****p*<0,001 quando comparados com preparações com endotélio intacto (E+).

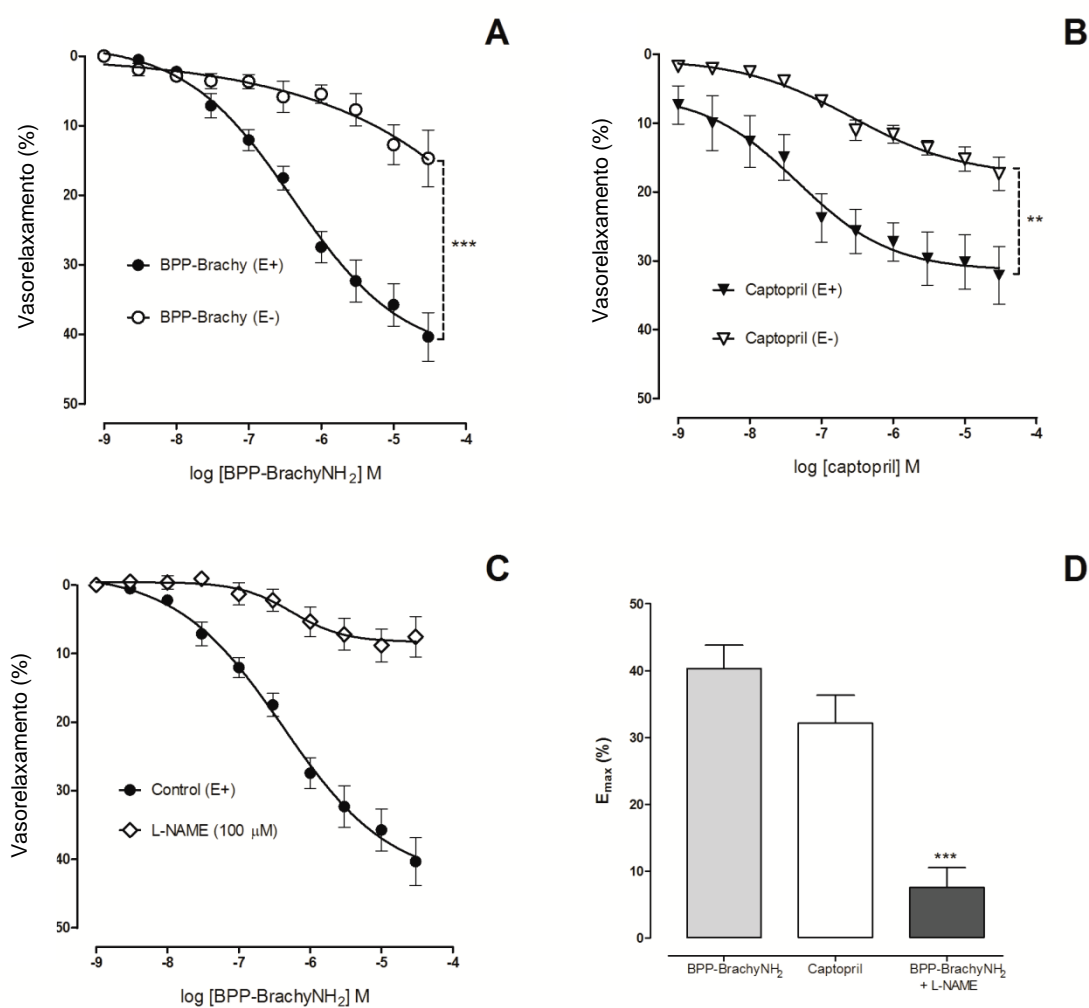


FIGURA 9 – Medida de NO por microscopia confocal a laser após adição de BPP-BrachyNH₂ em secções de aorta de ratos com endotélio intacto. Intensidade da emissão de fluorescência ($\Delta F\%$) após adição de BPP-BrachyNH₂ 10⁻⁷ M (A) ou 10⁻⁵ M (B). Fotomicrografia confocal representativa de secções de aorta carregadas com DAF-FM DA (5 μ M) antes e após a adição de BPP-BrachyNH₂ 10⁻⁷ M (C-D) ou 10⁻⁵ M (E-F). Os resultados foram expressos como média \pm EPM (n=4). Teste *t* de Student para amostras pareadas, **p*<0,05 e ***p*<0,01 em relação ao controle.

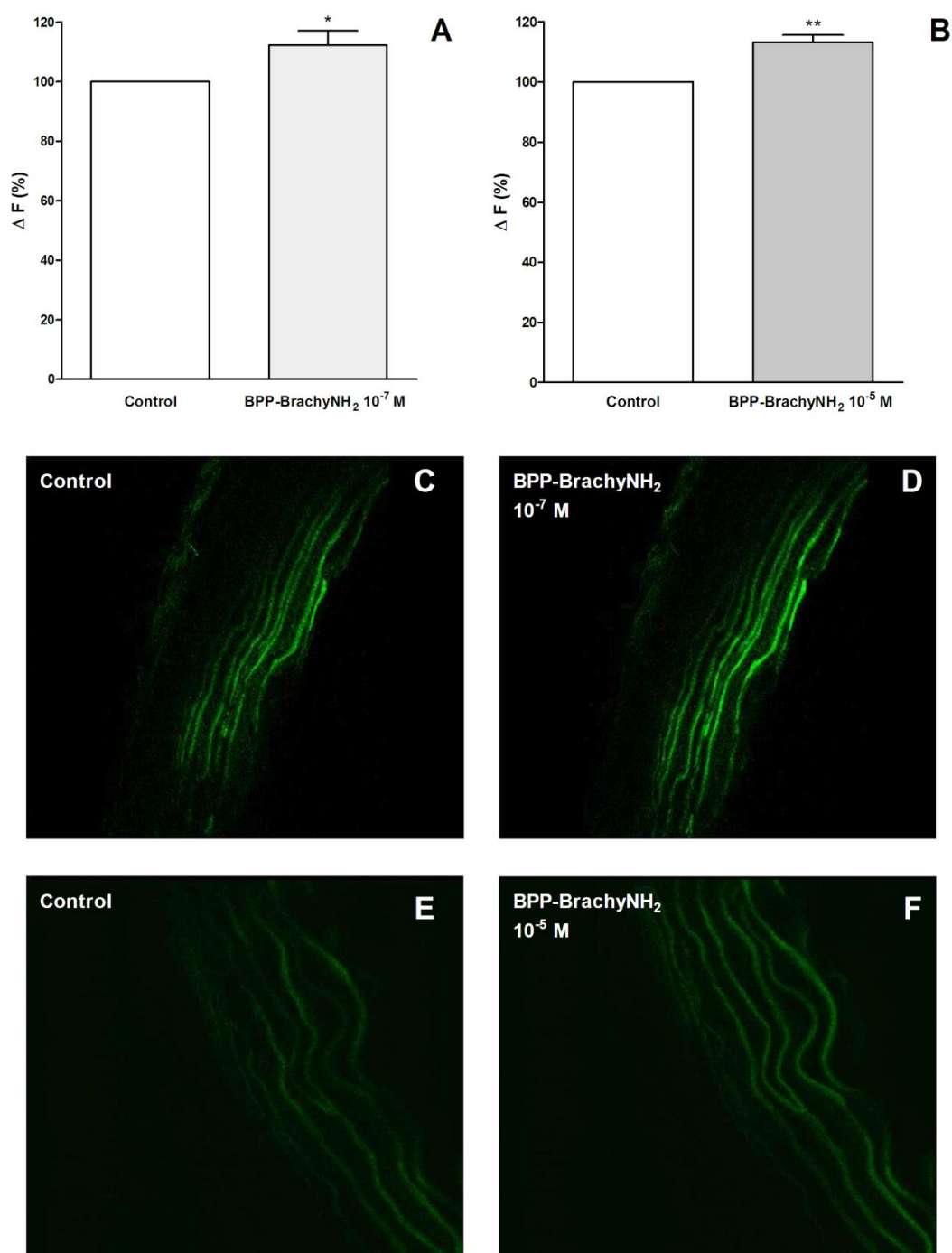
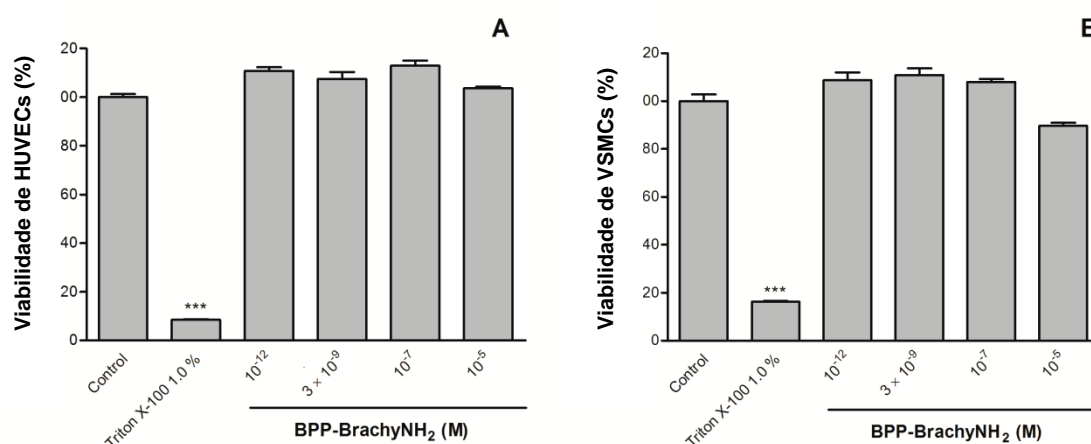


FIGURA 10 – Efeitos do BPP-BrachyNH₂ sobre a viabilidade celular. Células do tipo HUVECs (A) ou VSMCs (B) foram incubadas com diferentes concentrações de BPP-BrachyNH₂ por 24 horas e então com MTT por 4 horas. Cristais de formazan foram dissolvidos em DMSO. O grupo controle foi incubado somente com meio de cultura DMEM. Os resultados foram expressos como média ± EPM (n=3). ****p*<0,001 quando comparado com o grupo controle.



4.4 Discussão

A principal descoberta deste estudo foi que o peptídeo BPP-BrachyNH₂ apresenta uma nova sequência e é o primeiro PRO isolado a partir da secreção cutânea de uma espécie da família Brachycephalidae, o que abre para a exploração de anfíbios como fonte de novas biomoléculas. O BPP-BrachyNH₂ não promove citotoxicidade e promove vasodilatação dependente de endotélio e mediada pelo NO. Interessantemente, este estudo é o primeiro peptidoma caracterizado de uma secreção cutânea na família Brachycephalidae.

A presença de bradicinina (BK) e peptídeos relacionados à bradicinina (BRPs) na pele de anfíbios tem sido relacionada a uma ausência de sistema calicreína-cinina nestes animais (CONLON, 1999). Por esta razão, a secreção de BK assim como BRPs pelos anfíbios potencializam os efeitos da BK endógena dos seus predadores, podendo levar a pronunciados efeitos gastrointestinais e cardiovasculares, como um eficiente mecanismo de defesa (CONCEIÇÃO et al., 2007). No presente estudo, as estruturas

primárias WPPPKVSP (BPP-Brachy) e sua forma amidada (BPP-BrachyNH₂) foram identificadas. Em paralelo, não existe nenhuma evidência para a presença de bradicinina (BK) ou mesmo de peptídeos relacionados à bradicinina (BRPs) na secreção cutânea de *B. ephippium* (FIGURA 4-B). Contudo, a importância fisiológica do BPP-BrachyNH₂ como um mecanismo de defesa requer futuras investigações.

A atividade potencializadora de BK foi primeiramente descrita para extratos hidroalcoólicos do veneno da serpente *Bothrops jararaca* (FERREIRA, 1965), e a partir daí, pelo menos 25 BPPs já foram caracterizados (MENIN et al., 2008). Os BPPs de *B. jararaca* comumente possuem um resíduo piroglutâmico (<Glu) típico e uma estrutura rica em resíduos de prolina nas porções N- e C-terminais, respectivamente (IANZER et al., 2004). Contudo, a presença do resíduo piroglutâmico N-terminal não tem sido demonstrada como uma característica obrigatória de peptídeos similares aos BPPs de diferentes fontes biológicas, mas sim pela presença de resíduos ricos em prolina, principalmente na porção C-terminal (MORAIS et al., 2013). O BPP-BrachyNH₂ não apresenta resíduo piroglutâmico na porção N-terminal, e apresenta um resíduo de prolina na porção C-terminal (FIGURA 5). O QUADRO 1 mostra que o BPP-BrachyNH₂ apresenta similaridades estruturais com vários outros PROs de serpentes, escorpiões, aranhas e do anfíbio *Phyllomedusa hypochondrialis*. A presença do triptofano (W) seguido de resíduos de prolina na porção N-terminal dos peptídeos Lm-BPPs isolados do veneno do escorpião *Lachesis muta*, é uma característica comum entre esses BPPs e o BPP-BrachyNH₂ (SOARES et al., 2005). Interessantemente, complexos prolina-triptofano apresentam interações muito estáveis e desempenham um importante papel estrutural e nas interações com outros complexos proteína/peptídeos. Eles ainda são responsáveis por uma extensa variedade de interações biológicas e ativação de vias de sinalização celular (BIEDERMANN et al., 2008).

Desde a descoberta dos BPPs obtidos do veneno de *B. jararaca*, eles têm sido considerados os primeiros inibidores da ECA obtidos de uma fonte natural (FERREIRA; BARTELT; GREENE, 1970; FERREIRA, 1965; ONDETTI et al., 1971). Em outros animais não ofídicos, a inibição da atividade da ECA tem sido demonstrada para os venenos dos escorpiões *Tityus serrulatus* (MEKI; NASSAR; ROCHAT, 1995) e *Buthus occitanus* (ARAÚJO; GOMEZ, 1976), na aranha *Scaptocosa raptoria* (FERREIRA et al., 1996) e, mais recentemente, na secreção cutânea do anfíbio *Phyllomedusa hypochondrialis* (CONCEIÇÃO et al., 2007). Neste estudo, a atividade da ECA foi determinada pela medida fluorimétrica do resíduo His-Leu originado da

hidrólise do H-hipuril-His-Leu-OH, largamente reconhecido como um substrato para o domínio C da ECA (SANTOS; KRIEGER; GREENE, 1985). BPP-BrachyNH₂ induziu uma redução da atividade da ECA de modo dependente de concentração, e os resultados sugerem que o BPP-BrachyNH₂ atua funcionalmente como um BPP, considerando que é apto em promover a inibição da atividade da ECA (FIGURA 6). Assim, as interações entre BPP-BrachyNH₂ e ambos os domínios N e C da ECA foram investigados por docagem molecular. A avaliação por docagem molecular do complexo peptídeo-enzima foi realizado baseado nos resultados *in vitro*, que demonstraram um melhor perfil de inibição competitivo em direção ao domínio C do que ao domínio N. As relações entre BPP-Brachy e a ECA foram extremamente coordenadas e direcionadas *in silico* via cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos (FIGURA 7). Então, a evidência dos estudos *in silico* reforça a propriedade inibidora de ECA *in vitro* para o BPP-BrachyNH₂.

BPPs têm sido demonstrados como agentes vasodilatadores em ratos normotensos. A hipotensina TsHpt-I do escorpião amarelo *Tityus serrulatus* (VERANO-BRAGA et al., 2008) e o Bj-BPP-5a do veneno de *B. jararaca* induzem ambos efeitos vasodilatadores *in vitro* (IANZER et al., 2011) e *in vivo* (MORAIS et al., 2011). Neste estudo, BPP-BrachyNH₂ induziu relaxamento dependente de concentração em anéis de artéria aorta de ratos, com valores de E_{max} cerca de 2,0 vezes maior que o previamente reportado para o Bj-BPP-5a e o TsHpt-I. Apesar de o captopril apresentar-se como um mais potente inibidor da ECA, a vasodilatação induzida pelo captopril e pelo BPP-BrachyNH₂ foram equipotentes e de mesma magnitude, sugerindo que outros mecanismos independentes de ECA parecem contribuir para o efeito relaxante do BPP-BrachyNH₂ em aorta de ratos (FIGURA 8). Estes resultados estão de acordo com trabalhos prévios que abordam vários alvos para os efeitos vasodilatadores de vários outros BPPs (CAMARGO et al., 2012). Ainda mais, apesar da mais alta seletividade do captopril pela ECA, quando comparado com os BPPs, uma correlação direta entre potenciação de BK, atividade cardiovascular, e inibição da ECA não tem sido observada. Então, estes achados reforçam o possível envolvimento de distintas vias de sinalização, que não necessariamente incluem a inibição da ECA (MORAIS et al., 2013).

O efeito vasodilatador dependente de endotélio induzido pelo BPP-BrachyNH₂ sugere que mediadores derivados do endotélio estão envolvidos na vasodilatação. NO é um importante vasodilatador derivado do endotélio e desempenha papel crucial em diversos processos biológicos (FURCHGOTT, 1988; IGNARRO et al., 1988;

PALMER; FERRIGE; MONCADA, 1987). O aumento na produção de NO desempenha um papel crucial nos efeitos cardiovasculares dos BPPs. Então, vários BPPs foram relatados como promotores do aumento da produção de NO, provavelmente através da ativação da enzima AsS, resultando na conversão da L-citrulina em L-arginina, que leva ao aumento da produção de NO *in vivo* (GUERREIRO et al., 2009; IANZER et al., 2007), ou da ativação de receptores acoplados à proteína G (GPCRs) que disparam mecanismos dependentes de cálcio, resultando no aumento da atividade da NO sintase endotelial (eNOS) (LAMEU; NEIVA; HAYASHI, 2013; MORAIS et al., 2011, 2013). Mais ainda, o TsHpt-I do veneno de *T. serrulatus* e o BPP-5a do veneno de *B. jararaca* induziram relaxamentos dependentes de endotélio e sensíveis à inibição de eNOS em aorta de ratos (IANZER et al., 2011; VERANO-BRAGA et al., 2008). No presente estudo, BPP-BrachyNH₂ induziu vasorelaxamento dependente de endotélio, provavelmente mediado pelo NO, considerando que o relaxamento desapareceu após a inibição da eNOS com L-NAME em artéria aorta de ratos (FIGURA 8).

Estudos adicionais tem demonstrado o aumento *in vitro* na liberação de NO na presença de BPPs. BPP-5a foi avaliado por um ensaio quimioluminescente que demonstrou aumento de NO em células HEK 293 (MORAIS et al., 2011, 2013). Outros compostos, como as hipotensinas obtidas de *T. serrulatus*, aumentam a liberação de NO em cardiomiócitos murinos avaliados por microscopia confocal com o uso da sonda DAF-FM DA (VERANO-BRAGA et al., 2010), uma diaminofluoresceína que contém um grupo 3-amino,4-aminometil,2-benzóico ligado a um fluoróforo (KOJIMA et al., 1998; NAGANO; YOSHIMURA, 2002). Este é essencialmente não fluorescente até reagir com NO para formar um benzotriazol altamente fluorescente. O BPP-BrachyNH₂ promoveu aumento na emissão de fluorescência em anéis de aorta carregados com DAF-FM DA (FIGURA 9). Estes achados sugerem que o NO medeia a vasodilatação dependente de endotélio induzida por BPP-BrachyNH₂.

Em conclusão, o peptídeo BPP-BrachyNH₂ tem uma nova sequência e é o primeiro BPP isolado a partir da secreção cutânea de um espécime da família Brachycephalidae. Estas descobertas abrem para a exploração de anfíbios como fontes de novas biomoléculas. O BPP-BrachyNH₂ não promove citotoxicidade e induz vasodilatação dependente de endotélio mediada pelo NO. Este estudo não apenas reforça os anfíbios como uma interessante fonte de moléculas bioativas importantes, mas também enfatiza o valor em se investigar seu potencial farmacológico,

biotecnológico e terapêutico, visando o tratamento de disfunção endotelial e doenças cardiovasculares.

Agradecimentos

Os autores são gratos à FMRP-USP (Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Brazil) pela *facility* do microscópio confocal a laser, e ao LEM (Laboratório de Espectrometria de Massa) da EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia pela estrutura, espectrômetro de massas e síntese de peptídeos. Daniel Dias Rufino Arcanjo agradece à Fundação CAPES (Bolsista CAPES-PDSE – Processo nº BEX 2883/15-5) pelo suporte financeiro. S. Comerma-Steffensen agradece à CDCH-UCV e à *Aarhus University* por seu suporte. Não há nenhum conflito de interesse.



Capítulo III

Avaliação toxicológica aguda do BPP-BrachyNH₂

5. Capítulo III – Avaliação toxicológica aguda do BPP-BrachyNH₂

Este capítulo corresponde a artigo submetido para publicação no periódico internacional **Natural Product Research** (Fator de Impacto JCR 2014 0,919; Qualis B2 Biotecnologia), manuscrito N° **GNPL-2016-0826** (Ver Apêndice).

Avaliação toxicológica do BPP-BrachyNH₂, um peptídeo vasoativo identificado na secreção cutânea de *Brachycephalus ephippium*

Daniel Dias Rufino Arcanjo^{a,b}, Andreanne G. Vasconcelos^a, José Couras da Silva-Filho^b,
Maurício P. M. Amaral^b, Lucas M. Brito^b, Marcelo P. Bemquerer^c, Selma A. S. Kückelhaus^d,
Alexandra Plácido^e, Cristina Delerue-Matos^e, Nuno Vale^f, Fernando Aécio A. Carvalho^b,
Aldeidia P. Oliveira^b, José Roberto S. A. Leite^{a,d,f*}

^aNúcleo de Pesquisa em Biodiversidade e Biotecnologia – BIOTEC, Campus Ministro Reis Velloso – CMRV, Universidade Federal do Piauí – UFPI, Parnaíba, PI, Brazil;

^bNúcleo de Pesquisas em Plantas Mediciniais – NPPM, Universidade Federal do Piauí – UFPI, 64049-550, Teresina, PI, Brazil;

^cLaboratório de Espectrometria de Massa, EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, Brazil;

^dArea Morfologia, Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, UnB, Brasília, DF, Brazil;

^eREQUIMTE/LAQV, Instituto Superior de Engenharia do Instituto Politécnico do Porto, Rua Dr. António Bernardino de Almeida, 431, 4200-072, Porto, Portugal;

^fUCIBIO/REQUIMTE, Departamento de Química e Bioquímica, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Rua do Campo Alegre, 687, 4169-007 Porto, Portugal;

*Autor correspondente:

Prof. José Roberto de Souza de Almeida Leite, PhD
Faculdade de Medicina (FM)
Universidade de Brasília (UnB)
Campus Universitário Darcy Ribeiro
Asa Norte, Brasília, Distrito Federal (DF)
Brasil 70910-900. Phone number: +55 3107 1891.
Email: jrsaleite@gmail.com; jrsaleite@pq.cnpq.br

Resumo

BPP-BrachyNH₂ é um oligopeptídeo rico em prolina (PRO) com estrutura primária WPPPKVSP e identificado pela primeira vez na secreção cutânea do anfíbio *Brachycephalus ephippium*. Estudo prévio reporta, para este peptídeo, atividade inibidora *in vitro* da enzima conversora de angiotensina-I (ECA), e atividade vasorelaxante dependente de endotélio em aorta de ratos, com provável envolvimento do óxido nítrico (NO). Dessa forma, considerando sua potencial aplicação em estudos com ênfase no tratamento de doenças cardiovasculares, o presente capítulo tem como objetivo avaliar o perfil toxicológico agudo *in vivo* do peptídeo BPP-BrachyNH₂. Previamente, a avaliação da atividade citotóxica foi realizada através do ensaio do MTT em macrófagos murinos. Por sua vez, a toxicidade aguda foi avaliada em camundongos Swiss fêmeas tratadas com BPP-Brachy (5 e 50 mg/kg) por via intraperitoneal, de acordo com o Guia OECD nº 423 (Método de Classe Tóxica Aguda). Nenhuma redução na viabilidade celular foi observada para BPP-BrachyNH₂ no ensaio do MTT, indicando ausência de citotoxicidade para macrófagos murinos. Nos ensaios toxicológicos *in vivo*, não foram observadas mortes ou alterações nos parâmetros clínicos e comportamentais avaliados. A avaliação da curva de ganho de peso e parâmetros bioquímicos séricos, assim como a avaliação macroscópica e histopatológica dos órgãos, não apresentou nenhuma alteração quando comparados ao grupo controle. Dessa forma, a ausência de toxicidade observada para o BPP-BrachyNH₂ demonstra um perfil de segurança adequado para estudos em modelos animais visando investigar os potenciais farmacológicos, biotecnológicos e terapêuticos para este peptídeo.

5.1 Introdução

Oligopeptídeos ricos em prolina (PROs) representam uma classe de peptídeos inicialmente descobertos no veneno da serpente *Bothrops jararaca*, que apresentam resíduos de prolina em suas porções C-terminais e atividade inibidora da atividade da enzima conversora de angiotensina-I (ECA) e potencializadora do efeito da bradicinina (CAMARGO et al., 2012; MORAIS et al., 2013). Secreções e venenos de outros animais, como anfíbios e escorpiões, também têm sido descritos como potencial fonte de PROs com aplicações biológicas (CONCEIÇÃO et al., 2007; VERANO-BRAGA et

al., 2008). Nesse sentido, estudos prévios relatam o peptídeo BPP-BrachyNH₂ isolado a partir da secreção cutânea do anfíbio *Brachycephalus ephippium* (Spix, 1824), que apresenta atividade inibidora *in vitro* da ECA e promove vasodilatação mediada pelo aumento na produção de óxido (NO), além de ausência de citotoxicidade (ARCANJO et al., 2015), enfatizando o valor em se investigar seu potencial farmacológico, toxicológico, biotecnológico e terapêutico.

Estudos de toxicidade aguda em animais são comumente aplicados para atender a requisitos de classificação dos riscos para a saúde humana e para o ambiente. Uma estimativa pontual da dose letal em 50% dos animais de um experimento (DL₅₀), ou do intervalo de sua estimativa, geralmente atende aos requisitos de classificação para todas as autoridades reguladoras nas áreas de produtos químicos, farmacêuticos, produtos de consumo em geral e pesticidas. As informações obtidas nesses estudos são úteis para definir doses em estudos de dose-repetida, e identificar preliminarmente alguns possíveis órgãos alvo de toxicidade, além de fornecer informações relevantes para seleção de doses em estudos de Fase 1 ou overdose em humanos (CDER, 1996; OECD, 2002b).

Desta forma, considerando as potenciais aplicações previamente demonstradas para o BPP-BrachyNH₂, a avaliação de sua toxicidade aguda *in vitro* e *in vivo* foi realizada neste estudo.

5.2 Material e Métodos

5.2.1 Obtenção do peptídeo BPP-BrachyNH₂

O peptídeo BPP-BrachyNH₂, cuja sequência é WPPPKVSP (Trp-Pro-Pro-Lys-Val-Ser-Pro), previamente identificada a partir da secreção cutânea do anfíbio *B. ephippium*, foi obtido através de síntese de fase sólida, seguida de purificação em HPLC, conforme previamente descrito (ARCANJO et al., 2015).

5.2.2 Animais

Camundongos Swiss fêmeas (25-30 g, 2 meses), provenientes do Biotério Setorial do Núcleo de Pesquisa em Plantas Medicinais da Universidade Federal do Piauí, foram utilizados. Os animais foram mantidos durante todo o período de estudo em condições controladas de iluminação (ciclo 12 h claro/escuro) e temperatura (23 ± 2

°C), com livre acesso a água e alimentação (Purina-Nestlé, São Paulo, SP, Brasil). Os procedimentos utilizados estavam de acordo com as normas internacionais preconizadas pela OECD, e realizados com aprovação pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Piauí, Brasil (permissão nº 008/2012; Ver Apêndice).

5.2.3 Cultivo e retirada de macrófagos peritoneais murinos

Macrófagos peritoneais foram obtidos a partir de camundongos Balb/c machos. Três dias após a administração intraperitoneal de 1,5 mL de tioglicolato a 3,0%, os animais foram eutanasiados e imersos em álcool 70% por 1 min para assepsia. Em fluxo laminar, adicionou-se 8,0 mL de PSS estéril na cavidade peritoneal. Após, a solução contendo macrófagos peritoneais foi aspirada e transferida para um tubo estéril em banho de gelo e submetida a duas centrifugações a 1500 rpm a 4 °C durante 10 min, com sucessivas lavagens com solução salina estéril (NaCl 0,9%). Após a última lavagem, o sobrenadante foi descartado e as células resuspensas em 2,0 mL de meio de cultura RPMI 1640 suplementado com soro fetal bovino (FBS) 10%, penicilina 10.000 UI/mL e estreptomicina 10 mg/ml. A contagem dos macrófagos viáveis foi realizada em câmara de Neubauer, na presença do corante Azul de Tripán para análise de viabilidade celular (RODRIGUES et al., 2015).

5.2.4 Viabilidade celular de macrófagos pelo teste do MTT

A avaliação da atividade citotóxica do BPP-BrachyNH₂ em macrófagos murinos Balb/c foi realizada pelo ensaio do MTT. Em placas de 96 poços, macrófagos (1×10⁶/poço) foram incubados com 100 µl de meio RPMI 1640 (Sigma, St Louis, USA) a 37 °C em CO₂ 5% durante 4 horas, para adesão celular. Em seguida, BPP-BrachyNH₂ foi incubado em diferentes concentrações (10⁻¹² – 10⁻⁵ M) durante 48 h a 37 °C e CO₂ 5%. Em seguida, adicionou-se 10 µl of MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) a partir de uma solução estoque a 5 mg/mL em PBS, e incubou-se por 4 h a 37 °C e CO₂ 5%. Logo após, o sobrenadante foi descartado e 100 µl de DMSO foi adicionado em cada poço. A placa foi mantida em agitação por 30 min para completa dissolução do formazan. As absorbâncias foram lidas em um leitor de microplacas (ELx800™, BioTek® Instruments, EUA) em 550 nm. Os resultados foram expressos em

CC₅₀ (concentração citotóxica média para 50% das células) com intervalo de confiança calculados por regressão não-linear (RODRIGUES et al., 2013, 2015).

5.2.5 Avaliação da toxicidade aguda *in vivo*

A avaliação toxicológica do BPP-BrachyNH₂ foi realizada através do Teste de Classe Tóxica Aguda (OECD 423), um protocolo internacionalmente reconhecido por diversas agências reguladoras e preconizado pela Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico, guia no. 423 (OECD, 2002a). Camundongos Swiss fêmeas foram divididos em 03 grupos com 03 animais cada, sendo um controle tratado com solução salina por via intraperitoneal (0,1 mL/10 g de peso corporal), e os outros 02 grupos tratados com dose única de BPP-BrachyNH₂ nas doses de 5 e 50 mg/kg por via intraperitoneal (i.p.). Após a primeira semana de observações, de acordo com a presença ou ausência de mortalidade, os tratamentos foram repetidos em outros 03 grupos de 03 animais cada, totalizando 6 animais por tratamento.

5.2.5.1 Avaliação de parâmetros clínicos e comportamentais

Após administração do BPP-BrachyNH₂, os camundongos foram monitorados nas primeiras 8 h, para observação da ocorrência de morte. Após 24 h, o tempo de observação, para cada grupo foi em torno de 30 minutos a 1 h. Os animais foram pesados diariamente e os parâmetros clínicos e comportamentais foram avaliados conforme o Guia de Reconhecimento, Avaliação e Uso de Sinais Clínicos da OECD (OECD, 2002c). Os principais parâmetros avaliados estão listados na TABELA 1.

5.2.5.2 Análise dos parâmetros bioquímicos

Após o 14.º dia de observação, os camundongos foram anestesiados com tiopental sódico (45 mg/kg) e amostras de sangue foram coletadas dos animais pelo plexo orbital com auxílio de um tubo capilar de vidro e tubos para coleta com ativador de coagulação e gel separador (Vacuette, Greiner Bio-One, Alemanha). O material foi centrifugado a 3500 rpm durante 10 minutos e, em seguida, determinados os parâmetros glicose, ureia, creatinina, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) colesterol total, triglicérides, fosfatase alcalina (ALP), gama-glutamil tranferase (GGT), lactato desidrogenase (LDH) e ácido úrico. Os ensaios foram realizados em aparelho automático LABTEST® Pleno utilizando kits comerciais do fabricante

(Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil).

5.2.5.3 Avaliação de peso corporal e peso dos órgãos dos animais

Os camundongos foram pesados todos os dias do tratamento para elaboração de uma curva dose-efeito. No décimo quarto dia, após eutanásia com dose letal de tiopental sódico (100 mg/kg, via intraperitoneal), os órgãos (coração, pulmão, fígado, baço e rins) foram retirados e pesados para análise morfológica e macroscópica.

Após eutanásia dos animais seguida de necropsia, realizou-se avaliação macroscópica de órgãos internos (pulmões, coração, estômago, fígado, baço e rins) quanto à textura, consistência e cor. Em seguida, os órgãos foram pesados a fim de obter o seu peso relativo através da fórmula: [peso do órgão (g) / peso do animal no dia da necropsia (g)] × 100.

5.2.5.4 Análise histopatológica

Após o período de observação de 14 dias, todos os camundongos foram eutanasiados, e os órgãos (fígado, baço, rim e pulmão) foram integralmente removidos e fixados em solução de formaldeído a 10% por 72 h. Para as análises histopatológicas os órgãos, depois de fixados, desidratados em soluções com concentrações crescentes de álcool (70%, 80%, 90% ou 99,9%), diafanizados em xilol (3x), impregnados e emblocados em parafina aquecida a 60 °C foram submetidos à microtomia para obter secções histológicas (5 µm de espessura). Em seguida, as secções histológicas foram submetidas ao método de coloração padrão para Hematoxilina e Eosina. As análises histopatológicas foram realizadas por um único observador e o registro fotográfico feito em câmera digital acoplada ao microscópio.

5.2.6 Análise Estatística

Os valores serão expressos como média ± EPM. As diferenças entre os grupos serão determinadas através da Análise do teste *t* de Student para amostras não pareadas. Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

5.3 Resultados e Discussão

Ensaio de citotoxicidade são essenciais nos estágios iniciais do desenvolvimento de novos fármacos, pois definem a faixa de concentrações que serão utilizadas nos estágios não clínicos de desenvolvimento, sendo alguns capazes de estimar a dose de partida a ser utilizada no estudo toxicológico *in vivo*, seguindo o Princípio dos 3Rs (*reduction/redução, refinement/refinamento e replacement/substituição*), permitindo o desenvolvimento de diversos métodos alternativos ao uso de animais (ARAÚJO et al., 2014; OECD, 2010). O ensaio do MTT é um teste colorimétrico clássico de viabilidade celular largamente utilizado. Este teste é adequado para avaliar a função mitocondrial celular através da redução enzimática do sal tetrazólio pelas desidrogenases mitocondriais em células viáveis, levando a formação do formazan, um sal insolúvel de coloração arroxeada (MOSMANN, 1983). Na avaliação de um possível efeito citotóxico induzido pelo BPP-BrachyNH₂ em macrófagos murinos, não foi observada redução da viabilidade celular por avaliação da atividade mitocondrial, sugerindo ausência de citotoxicidade para o peptídeo nas concentrações avaliadas.

O princípio do Teste de Classe Tóxica Aguda consiste em um uso mínimo de animais por etapa (3 animais), geralmente fêmeas. A ausência ou presença de morte determinará se o estudo continuará com a mesma dose ou com dose inferior em outros 3 animais. O número de mortes observadas por grupo e tratamento classifica o produto em uma escala GHS (Sistema de Classificação Globalmente Harmonizado) de 1 a 5, referente a uma estimativa da DL₅₀ (OECD, 2002a). O BPP-BrachyNH₂ nas doses de 5 e 50 mg/kg, administradas por via intraperitoneal em camundongos Swiss fêmeas, não provocou morte dos animais, dentro de 240 minutos a 72 horas e até 14 dias após a observação, indicando ausência de toxicidade para as doses e esquema de administração avaliados. Dessa forma, não foi possível determinar a DL₅₀ para o BPP-BrachyNH₂, sendo classificado na Categoria 5 do GHS.

Durante as primeiras 24 h da administração intraperitoneal de BPP-BrachyNH₂ (5 e 50 mg/kg) e ao longo dos 14 dias, nenhum animal apresentou sinais característico de toxicidade como: cianose, piloereção, contorções, ptose palpebral, tremores, convulsões, ataxia ou diarreia. Também não existiram diferenças significativas entre os grupos tratados para os parâmetros de atividade motora, frequência respiratória e reflexos corneal e auricular (TABELA 1). Dessa forma, nenhum sinal clínico visível de toxicidade foi observado. A atividade geral dos camundongos não foi alterada, apresentando um bom estado geral.

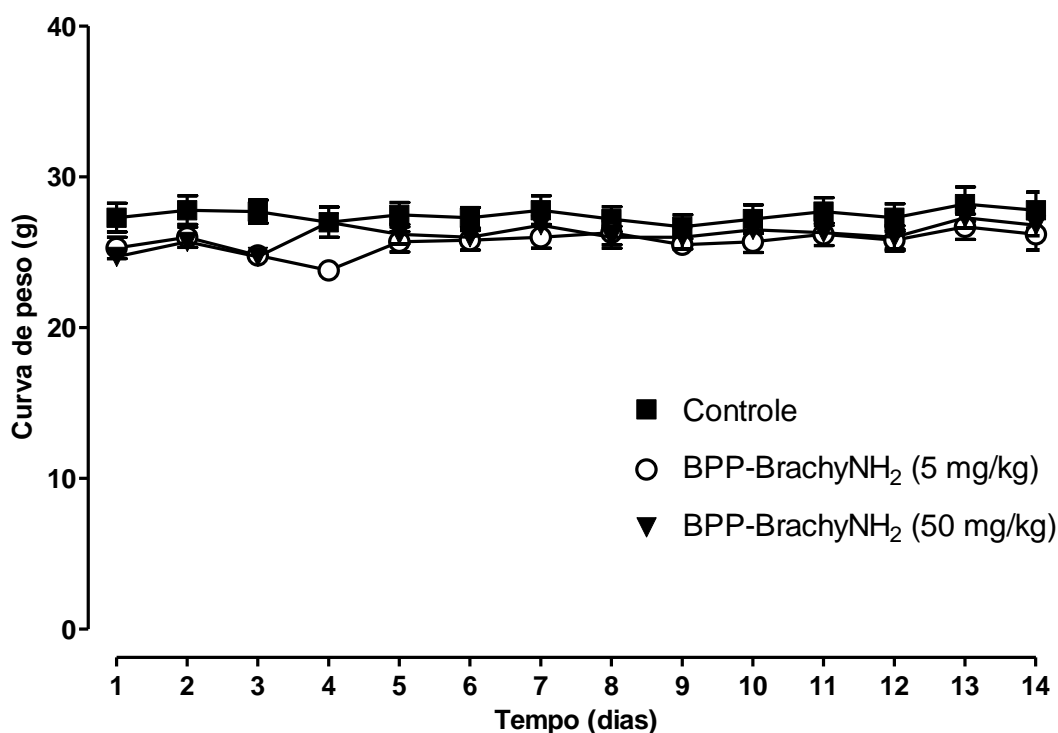
TABELA 1 – Sinais clínicos e comportamentais avaliados em camundongos Swiss fêmeas após administração aguda do BPP-BrachyNH₂ nas doses de 5 e 50 mg/kg por via intraperitoneal.

Atividades	Tempo (minutos)				
	30	60	120	180	240
ESTIMULANTE					
Hiperatividade	0	0	0	0	0
Agressividade	0	0	0	0	0
Tremores	0	0	0	0	0
Convulsão	0	0	0	0	0
Piloereção	0	0	0	0	0
DEPRESSOR					
Ptose palpebral	0	0	0	0	0
Sedação	0	0	0	0	0
Anestesia	0	0	0	0	0
Ataxia	0	0	0	0	0
Reflexo de endireitamento	0	0	0	0	0
Catatonía	0	0	0	0	0
Analgesia	0	0	0	0	0
Perda do reflexo palpebral	0	0	0	0	0
Perda do reflexo auricular	0	0	0	0	0
Ptose palpebral	0	0	0	0	0
SISTEMA NERVOSO AUTÔNOMO					
Diarréia	0	0	0	0	0
Constipação	0	0	0	0	0
Lacrimejamento	0	0	0	0	0
Salivação	0	0	0	0	0
Cianose	0	0	0	0	0
OUTROS COMPORTAMENTOS					
Ambulação	0	0	0	0	0
Autolimpeza	0	0	0	0	0
Levantar	0	0	0	0	0
Escalar	0	0	0	0	0
Vocalização	0	0	0	0	0
Contorções abdominais	0	0	0	0	0
MORTE	0	0	0	0	0

Legenda: (0) Sem efeito.

O acompanhamento da massa corporal do animal é importante indicador para a avaliação da toxicidade de uma substância, geralmente acompanhada em mudanças no consumo de água e ração. A perda de peso pode indicar doenças como câncer e doença renal crônica, dor, estresse ou a incapacidade de comer. Por sua vez, o aumento de peso pode ser causado por outras condições, como distúrbios metabólicos que levam ao aumento do consumo de ração, ou formação de tumores grandes (OECD, 2002c). O tratamento com BPP-BrachyNH₂ não alterou o ganho de massa corporal dos camundongos durante todo o período do tratamento (FIGURA 11).

FIGURA 11 – Evolução do ganho de peso dos camundongos Swiss fêmeas tratados com veículo (■) ou BPP-BrachyNH₂ nas doses de 5 (○) e 50 (▼) mg/kg, por via intraperitoneal. Dados representados por média ± EPM (n=6/grupo).



A administração aguda do peptídeo BPP-BrachyNH₂ (5 e 50 mg/kg) por via intraperitoneal em camundongos não induziu modificações no perfil bioquímico, em comparação com o grupo controle (TABELA 2). Os camundongos apresentaram todos os parâmetros dentro da faixa de referência observada para vários biotérios

padronizados (SANTOS et al., 2010), exceto os valores referentes aos níveis glicêmicos, que apresentaram redução significativa quando comparados ao grupo controle (TABELA 2). Estes dados sugerem estudos adicionais referentes à avaliação de um possível efeito hipoglicemiante induzido pelo BPP-BrachyNH₂ em modelos experimentais de diabetes, reforçando assim sua potencial aplicação no tratamento de doenças cardiovasculares (ARCANJO et al., 2015).

TABELA 2 – Avaliação de parâmetros bioquímicos séricos de camundongos Swiss fêmeas tratadas com BPP-BrachyNH₂ por via intraperitoneal (i.p.). Os valores representam a média ± E.P.M (n=6/grupo). **p*<0,05 versus controle; Teste t de Student para amostras não pareadas.

Parâmetros	Controle	BPP-BrachyNH ₂ (i.p.)	
		5 mg/kg	50 mg/kg
Glicose (mg/dL)	186,0 ± 18,7	132,8 ± 9,0*	136,5 ± 6,9*
Uréia (mg/dL)	63,5 ± 8,5	64,6 ± 3,4	50,7 ± 3,1
Creatinina (mg/dL)	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0
AST (U/mL)	96,2 ± 11,0	120,0 ± 26,0	85,5 ± 16,6
ALT (U/mL)	58,0 ± 8,2	76,6 ± 6,3	48,7 ± 6,0
ALP (U/mL)	88,0 ± 13,6	87,4 ± 4,4	114,8 ± 9,5
GGT (U/mL)	2,3 ± 1,4	1,1 ± 0,5	1,6 ± 0,7
LDH (U/mL)	648,7 ± 70,9	899,2 ± 130,3	599,0 ± 40,1
Colesterol Total (mg/dL)	82,3 ± 6,4	78,8 ± 6,5	77,3 ± 3,0
Triacilgliceróis (mg/dL)	83,3 ± 9,7	77,4 ± 11,3	72,7 ± 1,3
Ácido úrico (mg/dL)	4,5 ± 1,9	1,7 ± 0,5	1,3 ± 0,2

A avaliação do peso dos órgãos é uma ferramenta de triagem útil na caracterização de efeitos relacionados a estudos de toxicidade geral, sendo considerados dentro de um contexto geral envolvendo alguns fatores, como alterações no peso corporal dos animais, ação farmacológica pretendida, assim como jejum ou exsanguinação prévios (MICHAEL et al., 2007; SELLERS et al., 2007). A análise macroscópica dos órgãos (pulmão, coração, fígado, baço e rins) dos animais não

detectou alterações relevantes em nenhum dos grupos tratados. Nenhuma alteração também foi encontrada no peso dos órgãos (TABELA 3).

TABELA 3 – Peso relativo dos órgãos após 14 dias do tratamento intraperitoneal com dose única de BPP-BrachyNH₂ (5 e 50 mg/kg, i.p.).

Órgãos (g)	Controle	BPP-BrachyNH ₂ (i.p.)	
		5 mg/kg	50 mg/kg
Pulmões	0,656 ± 0,042	0,674 ± 0,042	0,610 ± 0,037
Coração	0,478 ± 0,026	0,555 ± 0,030	0,463 ± 0,020
Fígado	4,909 ± 0,084	5,036 ± 0,429	4,824 ± 0,293
Baço	0,395 ± 0,037	0,362 ± 0,034	0,348 ± 0,048
Rins	1,227 ± 0,052	1,282 ± 0,075	1,185 ± 0,049

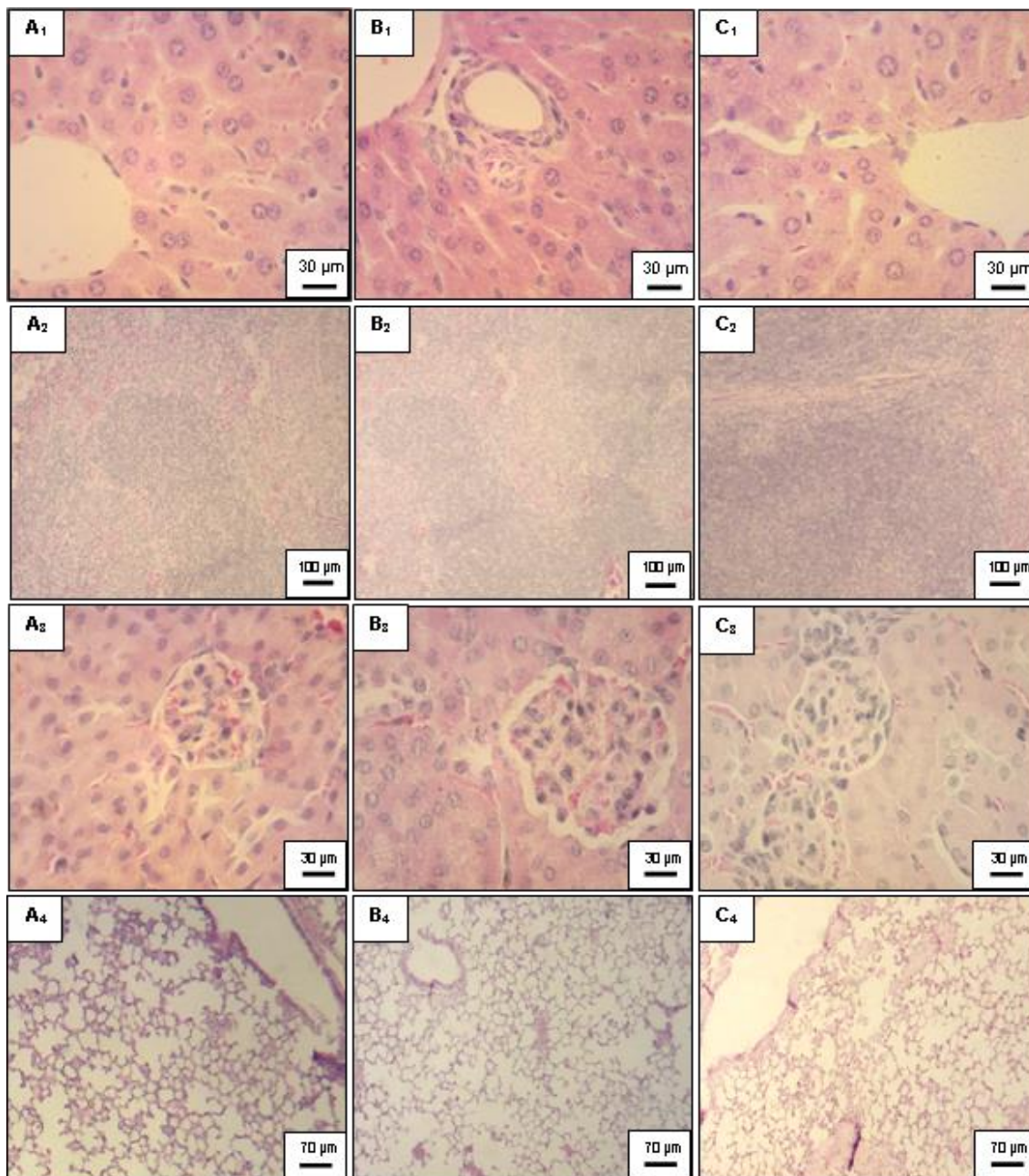
O estudo detalhado de secções histológicas representativas do fígado, baço, rim e pulmão oriundos de camundongos Swiss fêmeas tratados por via intraperitoneal com dose única de 5 ou 50 mg/kg de BPP-BrachyNH₂ mostrou que os órgãos de animais tratados com as duas concentrações da substância não apresentaram quaisquer alterações morfológicas quando comparado às secções histológicas obtidas do grupo controle (sem tratamento) (FIGURA 12).

Os resultados apresentados permitem concluir que o peptídeo BPP-BrachyNH₂ não apresenta toxicidade aguda após administração em dose única no modelo avaliado. Dessa forma, a ausência de toxicidade observada para o BPP-BrachyNH₂ demonstra um aceitável perfil de segurança para estudos em modelos animais visando investigar os potenciais farmacológicos, biotecnológicos e terapêuticos para este peptídeo.

Agradecimentos

Os autores são gratos à UFPI, CNPq, CAPES e FAPEPI pelo suporte financeiro. Daniel Dias Rufino Arcanjo contou com financiamento como Bolsista CAPES-FAPEPI – Edital n° 008/2012 na qualidade de Coordenador de Projeto e bolsista de Doutorado. Não há nenhum conflito de interesse.

FIGURA 12 – Fotomicrografias de secções histológicas obtidas do fígado (A₁, B₁, C₁), baço (A₂, B₂, C₂), rim (A₃, B₃, C₃) e pulmão (A₄, B₄, C₄) dos camundongos Swiss fêmeas (n=3/grupo) tratados com veículo (A) ou BPP-BrachyNH₂ nas doses de 5 (B) ou 50 mg/kg (C) por via intraperitoneal. Decorridos 14 dias os animais foram eutanasiados e os órgãos foram removidos e processados para as análises histopatológicas. Os resultados mostraram que os órgãos de animais tratados não apresentaram quaisquer alterações quando comparado ao grupo controle. Coloração Hematoxilina & Eosina.





Capítulo IV

Efeito vasorelaxante do BPP-BrachyNH₂ em artérias de resistência isoladas e possíveis mecanismos envolvidos

6. Capítulo IV – Efeito vasorelaxante do BPP-BrachyNH₂ em artérias de resistência isoladas e possíveis mecanismos envolvidos

Este Capítulo relata os principais resultados obtidos durante **Doutorado Sanduíche** (PDSE/CAPES) realizado no *Department of Biomedicine* da *Aarhus University*, Dinamarca, sob supervisão do Prof. Ulf Simonsen, M.D., Ph.D., no período de junho a dezembro de 2015.

Resumo

BPP-BrachyNH₂ é um oligopeptídeo rico em prolina (PRO) identificado pela primeira vez na secreção cutânea do anfíbio *Brachycephalus ephippium*. Estudo prévio reporta atividade inibidora *in vitro* da enzima conversora de angiotensina-I (ECA) e vasorelaxante dependente de endotélio em aorta de ratos, com provável envolvimento do óxido nítrico (NO). Considerando sua potencial aplicação em estudos com ênfase no tratamento de doenças cardiovasculares, o presente capítulo aborda o efeito vasorelaxante do BPP-BrachyNH₂ em preparações de artérias de resistência obtidas do leito mesentérico de ratos e da circulação coronária de porcos, assim como investigar os mecanismos de ação envolvidos. Segmentos de artérias foram montados em miógrafo do tipo Mulvany-Halpern para registros de tensão isométrica. Após normalização e teste de função endotelial, BPP-BrachyNH₂ (10^{-9} – 10^{-4} M) foi cumulativamente adicionado sobre pré-contrações induzidas por fenilefrina (10^{-6} M), acetilcolina (3×10^{-7} M) ou U46619 (10^{-7} M), conforme protocolo. BPP-BrachyNH₂ apresentou efeito vasorelaxante em artérias de resistência oriundas do leito mesentérico de ratos e da circulação coronária de porcos. Os possíveis mecanismos envolvidos foram avaliados através da adição de lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (10 µg/mL), L-NNA (10^{-4} M), indometacina (3×10^{-7} M) ou HOE-140 (10^{-8} M), conforme protocolo. O efeito vasorelaxante de BPP-BrachyNH₂ em artérias de resistência envolve o aumento da produção de NO, tanto resultante de possível aumento da biodisponibilidade de L-arginina em artéria mesentérica de ratos pré-tratada com LPS quanto pela ativação de receptores de bradicinina B₂ em artéria coronária de porcos. Esses resultados reforçam a importância deste peptídeo em estudos relacionados à investigação de outras vias de sinalização celular envolvidas nesta resposta, reforçando suas potenciais aplicações no tratamento de doenças cardiovasculares.

6.1 Introdução

Oligopeptídeos ricos em prolina (PROs) representam uma classe de peptídeos inicialmente descobertos no veneno da serpente *Bothrops jararaca*, que apresentam resíduos de prolina em suas porções C-terminais e atividade inibidora da atividade da enzima conversora de angiotensina-I (ECA) e potencializadora do efeito da bradicinina (CAMARGO et al., 2012; MORAIS et al., 2013). Secreções e venenos de outros animais, como anfíbios e escorpiões, também têm sido descritos como potencial fonte de PROs com aplicações biológicas relacionadas ao sistema cardiovascular (CONCEIÇÃO et al., 2007; VERANO-BRAGA et al., 2008).

Estudos tem reportado mecanismos relacionados com o aumento de óxido nítrico (NO) e independentes de ECA como os responsáveis pelos efeitos cardiovasculares observados para diversos PROs (IANZER et al., 2007), como a ativação da enzima argininosuccinato sintase (GUERREIRO et al., 2009), a ativação de receptores de bradicinina B₂ e muscarínicos M₁ (MORAIS et al., 2011), além da ativação de receptores muscarínicos M₃ (MORAIS et al., 2013). Nesse sentido, o peptídeo BPP-BrachyNH₂ isolado a partir da secreção cutânea do anfíbio *Brachycephalus ephippium* (Spix, 1824), apresenta efeito vasodilatador mediado pelo aumento na produção de óxido (NO), além de ausência de toxicidade *in vitro* (ARCANJO et al., 2015) e *in vivo* (Ver Capítulo III, página 48).

Estes dados enfatizam a potencial aplicação do BPP-BrachyNH₂ em estudos voltados para a elucidação de possíveis alvos biológicos relacionados com o aumento da produção de NO para este peptídeo, com ênfase no tratamento de doenças cardiovasculares. Desta forma, a atividade vasorelaxante do BPP-BrachyNH₂ em dois modelos de artérias de resistência isoladas, assim como possíveis mecanismos envolvidos, foram avaliados neste estudo.

6.2 Material e Métodos

6.2.1 Obtenção do peptídeo BPP-BrachyNH₂

O peptídeo BPP-BrachyNH₂, cuja sequência é WPPPKVSP (Trp-Pro-Pro-Pro-Lis-Val-Ser-Pro) e previamente identificado a partir da secreção cutânea do anfíbio *B. ephippium*, foi obtido através de síntese de fase sólida, seguida de purificação em HPLC, conforme previamente descrito (ARCANJO et al., 2015).

6.2.2 Animais

6.2.2.1 Ratos

Para os experimentos em artéria mesentérica, foram utilizados ratos Wistar machos (250-300 g, 12-14 semanas) adquiridos comercialmente e mantidos no Biotério do *Bartholin's Building* do *Department of Biomedicine* da *Aarhus University*, Dinamarca. Os animais foram mantidos em condições controladas de iluminação (ciclo 12h claro/escuro) e temperatura (21 ± 2 °C), com livre acesso a água e alimentação. Os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical seguido de exsanguinação. O leito mesentérico foi imediatamente removido e imerso em Solução Fisiológica Salina de Mulvany (Mulvany-PSS) gelada (5 °C), previamente aerada com mistura de CO₂ 5%, O₂ 21% e N₂ 74%, e contendo (em mM): NaCl, (119); KCl (4,7); CaCl₂·2H₂O (1,6); MgSO₄·7H₂O (1,17); NaHCO₃ (25); KH₂PO₄ (1,18); EDTA (0,026); e glicose (5,5) (HEDEGAARD et al., 2016). Os experimentos foram realizados de acordo com o Guia ARRIVE (KILKENNY et al., 2010).

6.2.2.2 Porcos

Para os experimentos em artéria coronária, corações de porcos (70-90 kg) foram obtidos de um abatedouro local. Logo após eutanásia, foram imediatamente mantidos em solução modificada de Mulvany-PSS tamponado com HEPES (5 °C; previamente aerada com CO₂ 5%, O₂ 21% e N₂ 74%), contendo (em mM): NaCl, (119); KCl (4,7); CaCl₂·2H₂O (1,6); MgSO₄·7H₂O (1,17); HEPES (20); EDTA (0,026); e glicose (5,5). Os corações foram utilizados dentro de um período de até 2 h após a eutanásia dos animais (FROBERT; BUUS; REMBOLD, 2005). Os experimentos foram realizados de acordo com a Convenção Europeia para Proteção de Animais Vertebrados usados para Propósitos Científicos Experimentais e Outros (COE, 1991).

6.2.3 Isolamento das artérias e preparação dos anéis

Segmentos dos terceiros ramos da artéria mesentérica superior de ratos e dos terceiros ramos descendentes da artéria coronária esquerda anterior de porcos foram livres de tecido perivascular e isolados com auxílio de estereomicroscópio, dissecados em anéis entre 1,5-2,0 mm de comprimento e 200-300 µm de diâmetro, e montados entre dois fios de aço de 40 µm em miógrafo do tipo Mulvany-Halpern (DMT 310M,

Danish MyoTechnology, Aarhus, Dinamarca) para registros de tensão isométrica. As preparações foram mantidas a 37 °C e aeração constante com mistura de CO₂ 5%, O₂ 21% e N₂ 74%. Após 30 minutos de estabilização, as preparações foram submetidas a procedimento de normalização, onde as artérias foram tensionadas em 90% de CI₁₀₀ (CI₉₀), definida como a circunferência interna (CI) da artéria exposta à pressão transmural de 13,3 kPa (100 mmHg) (MULVANY; HALPERN, 1977). Os cálculos de normalização e CI₉₀ foram realizados pelo aplicativo DMT Normalization (Danish MyoTechnology, Aarhus, Dinamarca), parte integrante do software LabChart 5.0 (ADInstruments, Sydney, Australia).

6.2.4 Investigação do efeito vasorelaxante em artéria mesentérica de ratos

6.2.4.1 Teste de viabilidade funcional

Trinta minutos após a normalização, a viabilidade das preparações foi avaliada através de duas contrações induzidas por noradrenalina (NA 10⁻⁵ M) de 3 min de duração cada, seguidas de lavagem com PSS e estabilização de 5 min. A presença de endotélio funcional foi avaliada pela adição de acetilcolina (ACh 10⁻⁵ μM) em preparações pré-contraídas com noradrenalina (NA 3×10⁻⁶ μM). As preparações incluídas no estudo apresentaram o mínimo de 60% de relaxamento em resposta à ACh (10⁻⁵ M), indicando a presença de endotélio funcional (HEDEGAARD et al., 2016).

6.2.4.2 Protocolos experimentais

Após verificação do endotélio funcional, as preparações foram pré-contraídas com fenilefrina (PE 10⁻⁶ M) ou 9,11-dideoxi-9a,11a-metanoepoxi-prostaglandina F_{2a} (U46619 10⁻⁷ M), e após 30 minutos, concentrações cumulativas de BPP-BrachyNH₂ (10⁻⁹ – 10⁻⁴ M) foram adicionadas em intervalos entre 4-5 min.

Em outra série de experimentos, preparações com endotélio funcional foram incubadas com lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*, sorotipo 055:B5 (LPS 10 μg/mL) durante 5 h (HERNANZ, 2004). Então, preparações pré-tratadas e não tratadas com LPS foram pré-contraídas com adição cumulativa de noradrenalina (NA 10⁻⁶ – 10⁻⁵ M). Após 30 min, BPP-BrachyNH₂ (10⁻⁹ – 3×10⁻⁵ M) foi cumulativamente adicionado.

Para investigar a participação de fatores endoteliais no efeito vasorelaxante de BPP-BrachyNH₂, preparações pré-tratadas com LPS (10 μg/mL) durante 5 horas foram incubadas com N^G-Nitro-L-arginina (L-NNA, 10⁻⁴ M), um inibidor da enzima óxido

nítrico sintase (NOS), ou indometacina (INDO, 3×10^{-6} M), um inibidor não seletivo da cicloxigenase (COX), durante 20 min. Então, as preparações foram pré-contraídas com adição cumulativa de noradrenalina (NA, 10^{-6} – 10^{-5} M). Após 30 minutos, BPP-BrachyNH₂ (10^{-9} – 3×10^{-5} M) foi cumulativamente adicionado.

6.2.5 Investigação do efeito vasorelaxante em artéria coronária de porcos

6.2.5.1 Teste de viabilidade funcional

Trinta minutos após a normalização, a viabilidade das preparações foi avaliada através de duas contrações induzidas por ACh (3×10^{-7} M) de 5 min de duração cada, seguidas de lavagem com PSS e estabilização de 7 min. A presença de endotélio funcional foi avaliada pela adição de bradicinina (BK, 3×10^{-8} μ M) em preparações pré-contraídas com ACh (3×10^{-7} M). As preparações incluídas no estudo apresentaram o mínimo de 50% de relaxamento em resposta à BK, indicando a presença de endotélio funcional (HEDEGAARD et al., 2014).

6.2.5.2 Protocolos experimentais

Após verificação do endotélio funcional, as preparações foram pré-contraídas com ACh (3×10^{-7} M) ou U46619 (10^{-7} M), e após 30 minutos, concentrações cumulativas de BPP-BrachyNH₂ (10^{-9} – 10^{-4} M) foram adicionadas em intervalos de 4-5 min. Em outra série de experimentos, para investigar a participação de fatores endoteliais no efeito vasorelaxante de BPP-BrachyNH₂, as preparações foram pré-tratadas durante 20 min com: L-NNA (10^{-4} M); INDO (3×10^{-6} M); ou icatibant (HOE-140, 10^{-8} M), um antagonista seletivo dos receptores B₂ de bradicinina (DALSGAARD et al., 2010). Então, as preparações foram pré-contraídas com U46619 (10^{-7} M). Após 30 minutos, BPP-BrachyNH₂ (10^{-9} – 10^{-4} M) foi cumulativamente adicionado.

6.2.6 Análise Estatística

Os valores foram tabulados como média \pm EPM. Os gráficos foram plotados como o vasorelaxamento (%) em função do logaritmo da concentração do BPP-BrachyNH₂. O nível de significância entre os grupos foi determinado através da análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguido do pós-teste de Bonferroni, ou do Teste *t* de Student para amostras não pareadas, quando aplicado. Os resultados foram

considerados significativos quando $p < 0,05$. Os gráficos e as análises estatísticas foram obtidos com o software Graph Pad Prism 5.02™ (Graph Pad Software, Inc., San Diego, CA, EUA).

6.3 Resultados

6.3.1 Efeito vasorelaxante do BPP-BrachyNH₂ em artéria mesentérica de ratos

Em preparações pré-contraídas com PE ou U46619, o peptídeo BPP-BrachyNH₂ induziu vasorelaxamento apenas na concentração de 10^{-4} M (PE: $E_{\max} = 35,6 \pm 3,4\%$; U46619: $E_{\max} = 32,2 \pm 10,1\%$) em relação ao veículo (PE: $E_{\max} = -3,6 \pm 3,0\%$; U46619: $E_{\max} = 6,3 \pm 5,5\%$). Nas demais concentrações (10^{-9} – 3×10^{-5} M), nenhum efeito vasorelaxante foi observado (FIGURA 13). Após lavagem com Mulvany-PSS e estabilização por 30 min, pré-contrações com PE ou U46619 foram novamente induzidas, apresentando mesma potência em relação às pré-contrações induzidas antes da adição de BPP-BrachyNH₂ (dados não apresentados) Estes dados indicam que o efeito é reversível, similar ao previamente observado para seu efeito vasorelaxante em anéis de artéria aorta de ratos e ausência de citotoxicidade em células endoteliais e de músculo liso vascular (ARCANJO et al., 2015).

Em preparações pré-tratadas com LPS e pré-contraídas com NA (10^{-6} – 10^{-5} M), o peptídeo BPP-BrachyNH₂ induziu vasorelaxamento de modo dependente de concentração ($E_{\max} = 24,6 \pm 10,2\%^{**}$) em relação ao veículo ($E_{\max} = -14,5 \pm 5,4\%$) (FIGURA 14-B). Em preparações não pré-tratadas com LPS, nenhum efeito foi observado em relação ao veículo ($E_{\max} = 4,1 \pm 7,3\%$ e $9,4 \pm 8,9\%$, respectivamente) (FIGURA 14-A).

O envolvimento do NO na resposta vasorelaxante induzida por BPP-BrachyNH₂ em preparações pré-tratadas com LPS foi avaliado pela adição de L-NNA (10^{-4} μ M) como inibidor da NO sintase. Na presença de L-NNA, o relaxamento induzido por BPP-BrachyNH₂ foi abolido (FIGURA 15-A), e o efeito máximo foi reduzido em aproximadamente 15 vezes ($E_{\max} = -1,7 \pm 3,3\%$) (FIGURA 15-B), confirmando o envolvimento do NO na resposta vasorelaxante induzida pelo BPP-BrachyNH₂. Adicionalmente, o papel dos prostanoídes também foi avaliado pela adição de INDO (3×10^{-6} M), um inibidor não seletivo da COX. Contudo, nenhuma alteração no efeito vasorelaxante induzido pelo BPP-BrachyNH₂ foi observada (FIGURA 15-A,B).

FIGURA 13 – Avaliação do efeito vasorelaxante induzido por BPP-BrachyNH₂ (10⁻⁹ – 10⁻⁴ M) em anéis de artéria mesentérica de resistência isolada de ratos, com endotélio funcional (E+). As preparações foram pré-contraídas com PE (10⁻⁶ M) (A) ou U46619 (10⁻⁷ M) (B), e então BPP-BrachyNH₂ foi cumulativamente adicionado. Os resultados foram expressos como média ± EPM. ANOVA de duas vias, seguida do pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ vs. veículo.

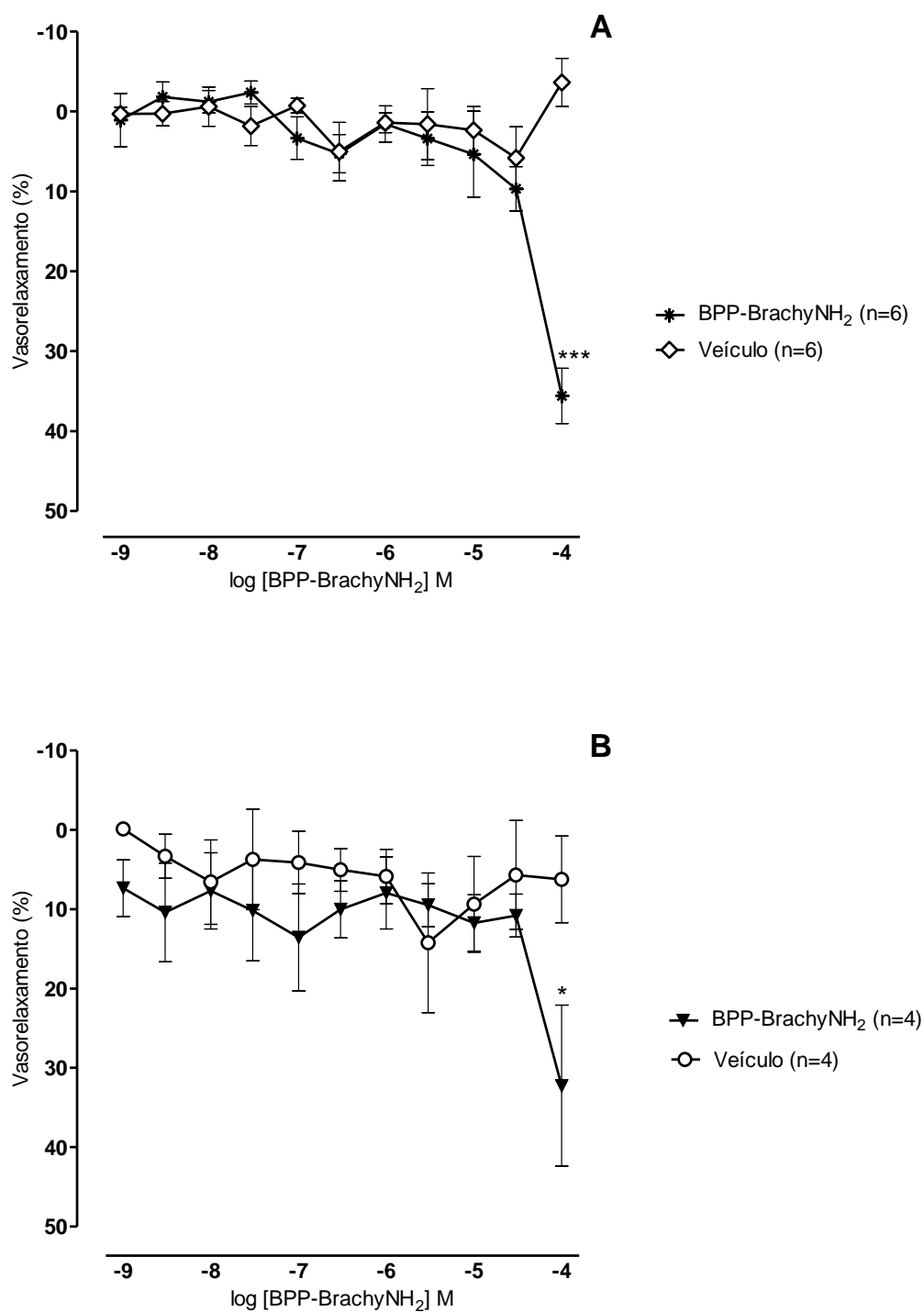


FIGURA 14 – Efeito vasorelaxante induzido por BPP-BrachyNH₂ (10^{-9} – 3×10^{-5} M) na ausência (A) ou presença (B) de LPS (10 µg/mL) por 5 h em anéis de artéria mesentérica de resistência isolada de ratos, com endotélio funcional (E+). As preparações foram pré-contraídas cumulativamente com NA (10^{-6} – 10^{-5} M), e então cumulativamente incubadas com BPP-BrachyNH₂. Os resultados foram expressos como média ± EPM. ANOVA de duas vias, seguida do pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ vs. veículo.

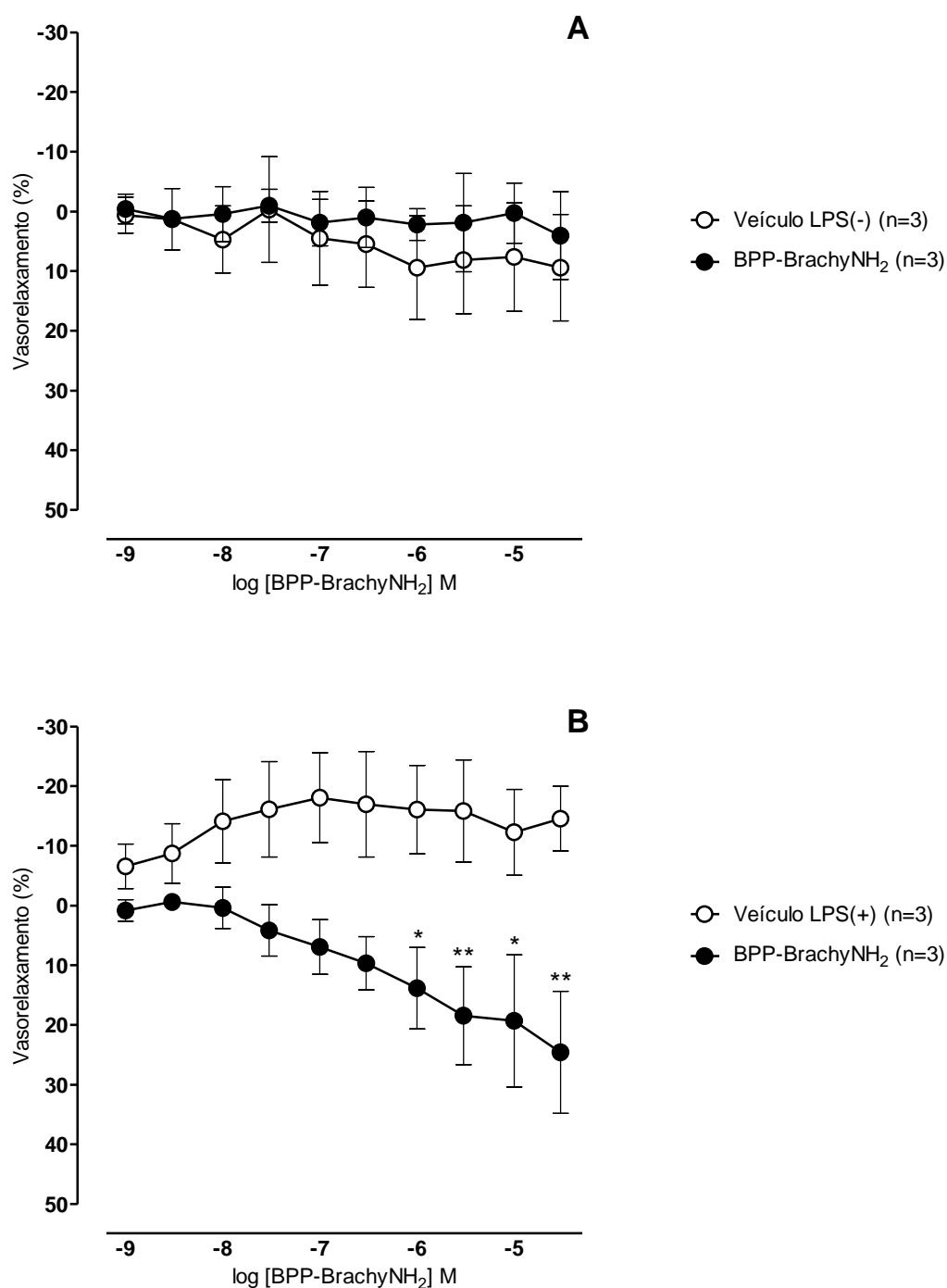
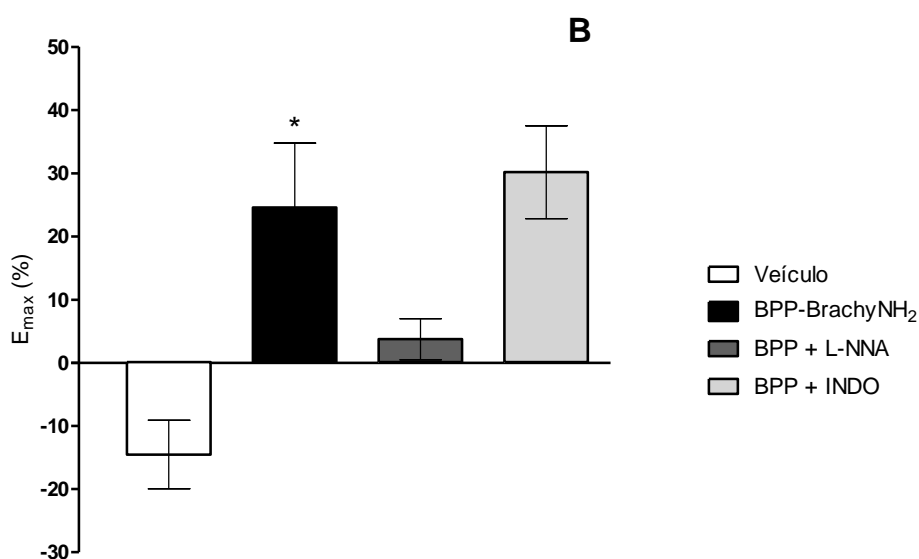
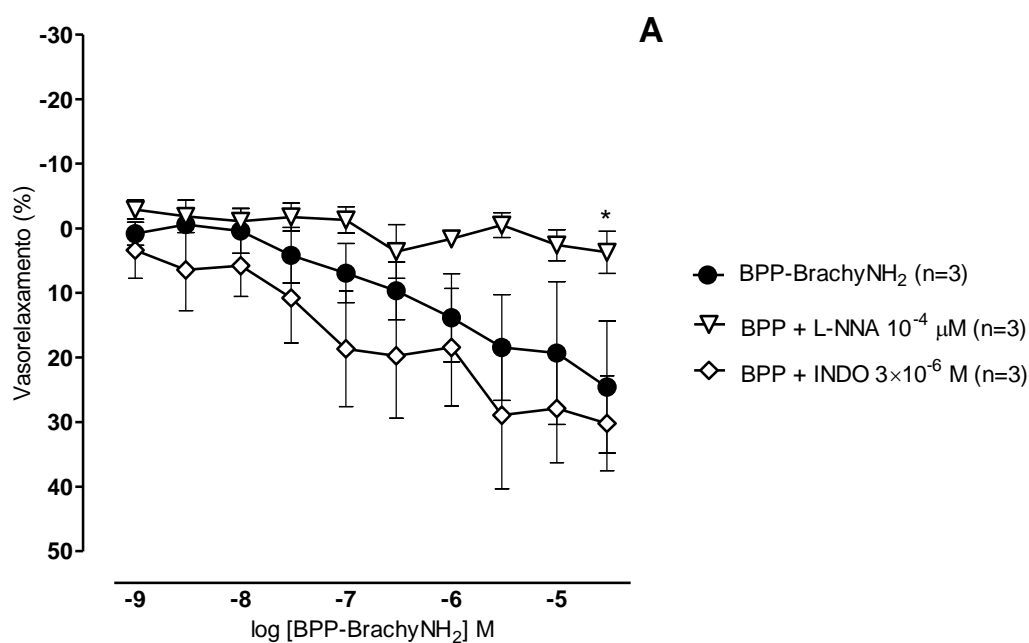


FIGURA 15 – Efeito do L-NNA e da INDO (A) sobre a resposta vasorelaxante induzida por BPP-BrachyNH₂ (10^{-9} – 3×10^{-5} M) na presença de LPS ($10 \mu\text{g/mL}$) por 5 h em anéis de artéria mesentérica de resistência isolada de ratos, com endotélio funcional (E+). Os agentes foram incubados por 20 min, seguidos de pré-contracção cumulativa com NA (10^{-6} – 10^{-5} M), e então BPP-BrachyNH₂ foi cumulativamente adicionado. Comparações representativas entre os valores de E_{máx} (B) foram plotadas. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. ANOVA de duas vias, seguida do pós-teste de Bonferroni (A) ou Teste t de Student não pareado (B); * $p < 0,05$ vs. veículo.



6.3.2 Efeito vasorelaxante do BPP-BrachyNH₂ em artéria coronária de porcos

Em preparações pré-contraídas com ACh, o peptídeo BPP-BrachyNH₂ não promoveu efeito vasorelaxante (FIGURA 16-A). Por sua vez, em preparações pré-contraídas com U46619, induziu significativo efeito vasorelaxante ($E_{\max} = 60,1 \pm 16,1\%$) em relação ao veículo ($E_{\max} = -6,6 \pm 17,5\%$) (FIGURA 16-B). Após lavagem com Mulvany-PSS e estabilização por 30 min, a capacidade das preparações responderem a novo estímulo com U46619 foi avaliada. A mesma potência em relação às pré-contrações induzidas antes da adição de BPP-BrachyNH₂ foi observada, indicando que o efeito é reversível, de acordo com o previamente reportado para artérias aorta e mesentérica de ratos.

O envolvimento do receptor de bradicinina B₂, resultando no aumento da liberação de NO e prostanóides, na resposta vasorelaxante induzida por BPP-BrachyNH₂ foi avaliado pela adição de L-NNA (10^{-4} μ M) como inibidor da NO sintase, INDO (3×10^{-6} M), um inibidor não seletivo da cicloxigenase, e HOE-140 (10^{-8} M), um antagonista seletivo dos receptores de bradicinina B₂. Inicialmente, dados preliminares indicaram que na presença de L-NNA e INDO, o relaxamento induzido por BPP-BrachyNH₂ foi abolido (FIGURA 17-A,B), com redução do E_{\max} em aproximadamente 11 vezes ($E_{\max} = 5,5\%$) e 7,7 vezes ($E_{\max} = 7,8\%$), respectivamente (FIGURA 17-D). Por sua vez, a presença de HOE-140 reduziu o efeito vasorelaxante induzido pelo BPP-BrachyNH₂ (FIGURA 17-C), com redução do E_{\max} em aproximadamente 3,1 vezes ($E_{\max} = 19,45\%$).

FIGURA 16 – Efeito vasorelaxante induzido por BPP-BrachyNH₂ (10^{-9} – 10^{-4} M) em anéis de artéria coronária de resistência isolada de porcos, com endotélio funcional (E+). As preparações foram pré-contraídas com ACh (10^{-7} M) (A) ou U46619 (10^{-7} M) (B), e então BPP-BrachyNH₂ foi cumulativamente adicionado. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. ANOVA de duas vias, seguida do pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ vs. veículo.

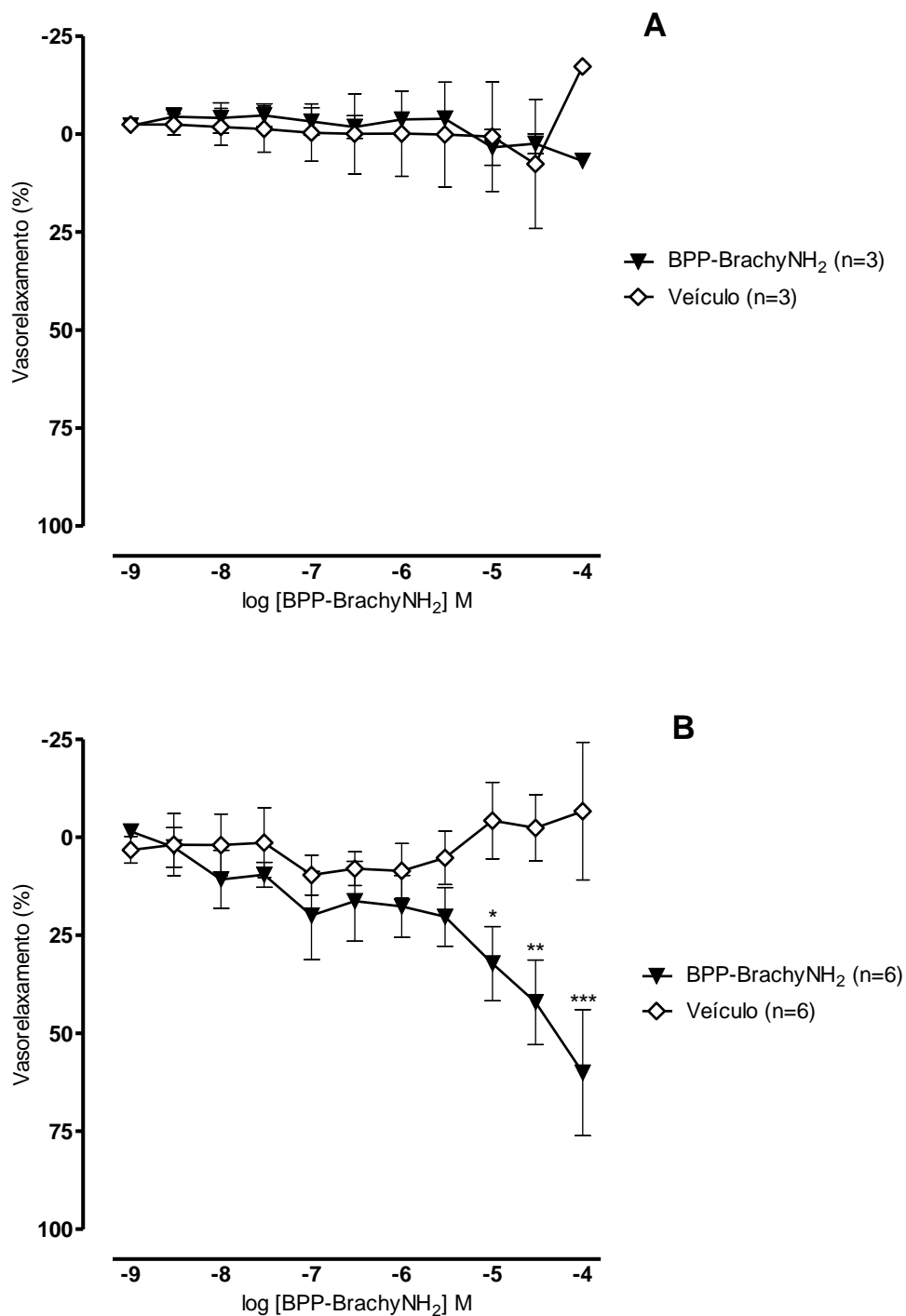
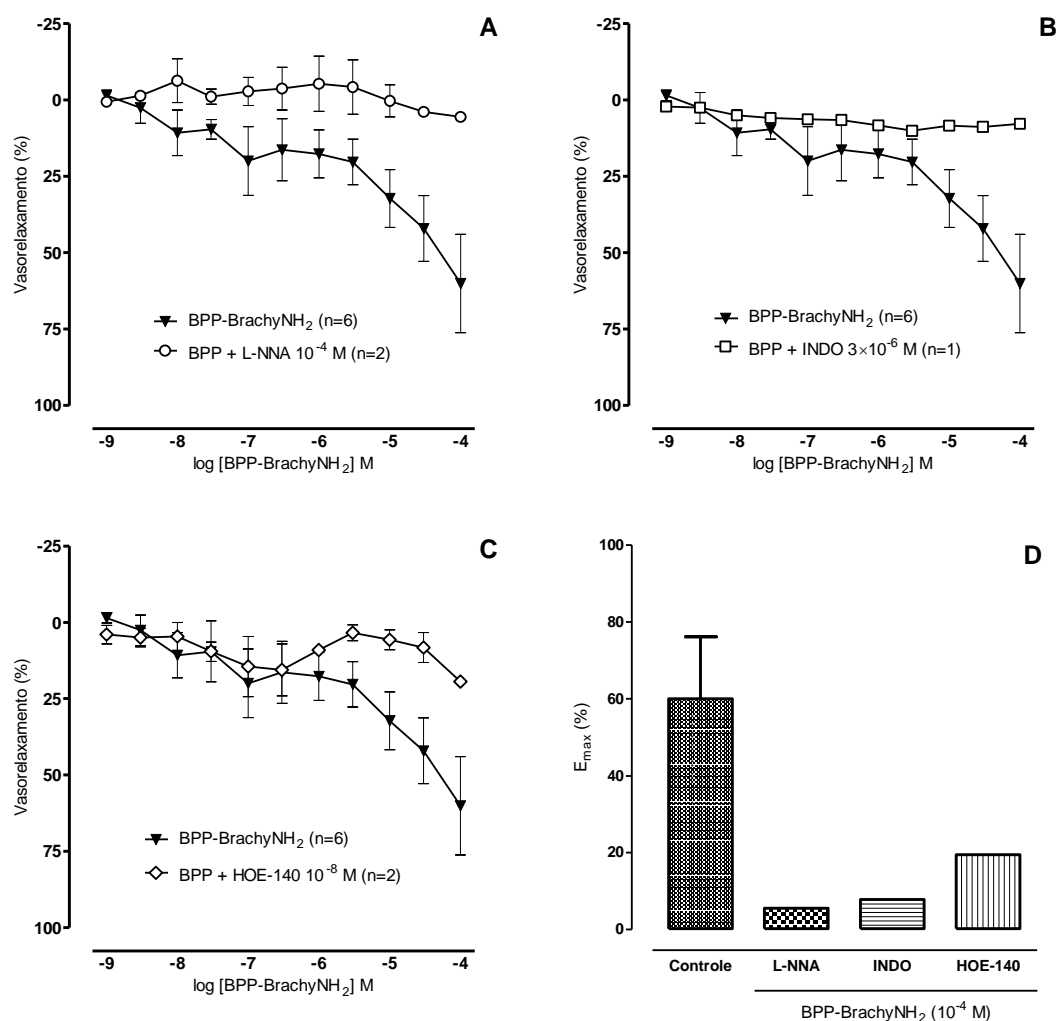


FIGURA 17 – Dados preliminares sobre os efeitos do L-NNA (10^{-4} M) (A), da INDO (3×10^{-6} M) (B) e do HOE-140 (10^{-8} M) (C) sobre a resposta vasorelaxante induzida por BPP-BrachyNH₂ (10^{-9} – 10^{-4} M) em anéis de artéria coronária de resistência isolada de porcos, com endotélio funcional (E+). As preparações foram pré-contraídas com U46619 (10^{-7} M), e então BPP-BrachyNH₂ foi cumulativamente adicionado. Comparações representativas entre os valores de E_{máx} (D) foram plotadas.



6.4 Discussão

O principal achado deste capítulo refere-se ao efeito vasorelaxante do BPP-BrachyNH₂ em dois modelos animais de artérias de resistência isoladas, ambos envolvendo o aumento da liberação de NO como provável mecanismo envolvido. Considerando que os vasos de resistência são os mais importantes vasos do sistema

circulatório que refletem a resistência periférica global, evidências relacionadas com o aumento na produção de L-arginina em artéria mesentérica de ratos pré-tratadas com LPS, assim como com a ativação de receptores B₂ de bradicinina em artéria coronária de porcos, evidenciam possíveis alvos para os efeitos cardiovasculares do BPP-BrachyNH₂.

O tratamento com LPS promove ativação da NO sintase induzível (iNOS), capaz de gerar largo aumento na produção de NO, levando à formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e estoques intracelulares de NO na forma de complexos ferro-dinitrosila em anéis de artéria mesentérica superior de ratos (HERNANZ, 2004). A depleção dos níveis de L-arginina em decorrência da larga produção de NO promove um decréscimo da atividade da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), promovendo então disfunção endotelial similar ao observado no choque séptico, que necessitaria de L-arginina extracelular para corrigir o desbalanço L-arginina/eNOS (MACKENZIE; WADSWORTH, 2003). Adicionalmente, aumento na $[Ca^{+2}]_i$ e hiporresponsividade a agentes contráteis são observados em anéis de artéria mesentérica de resistência de ratos (MARTINEZ et al., 1996).

No presente estudo, o BPP-BrachyNH₂ induziu vasorelaxamento de modo dependente de concentração apenas em anéis de artéria mesentérica de resistência de ratos pré-tratadas com LPS (FIGURA 14-B), mas não em preparações não tratadas (FIGURA 14-A). O envolvimento do NO no efeito vasorelaxante induzido por BPP-BrachyNH₂ em preparações pré-tratadas com LPS foi avaliado pela adição de L-NNA, um inibidor da NO sintase, promovendo atenuação da resposta (FIGURA 15-A) com redução significativa do efeito máximo (FIGURA 15-B). Estudo prévio demonstrou que o pré-tratamento com L-NAME, outro inibidor da NO sintase, abole o efeito vasorelaxante do BPP-BrachyNH₂ em anéis de artéria aorta de ratos (ARCANJO et al., 2015), reforçando assim o envolvimento do NO na resposta vasorelaxante induzida pelo BPP-BrachyNH₂.

O envolvimento de PROs no aumento da produção de NO têm sido atribuído à ativação da enzima argininosuccinato sintase (AsS). Estudos prévios relatam que o B_j-BPP-10c identificado no veneno da *B. jararaca* é internalizado na célula endotelial e aumenta a atividade enzimática da AsS, resultando na conversão da L-citrulina em L-arginina e promovendo aumento nos níveis intracelulares e plasmáticos de L-arginina, com consequente formação de NO (GUERREIRO et al., 2009; IANZER et al., 2007). No entanto, os níveis fisiológicos intracelulares de L-arginina são suficientes para

saturar a ligação do substrato à eNOS (MACKENZIE; WADSWORTH, 2003). Assim, só é possível observar atividade vasorelaxante ou hipotensora quando os níveis endógenos de L-arginina estão em desbalanço. Estudos prévios demonstraram que a L-arginina não é capaz de promover efeito vasorelaxante em preparações não tratadas com LPS, sendo os níveis extracelulares necessários para corrigir o desbalanço e aumentar a síntese de NO, levando à vasodilatação (HERNANZ, 2004; MACKENZIE; WADSWORTH, 2003; MARTINEZ et al., 1996). A ausência de efeito vasorelaxante do BPP-BrachyNH₂ em preparações não tratadas com LPS corrobora com estas observações (FIGURAS 13 e 14-A). Assim, o presente estudo sugere o possível envolvimento da AsS na recuperação dos níveis de L-arginina e NO como mecanismo envolvido no vasorelaxamento induzido pelo BPP-BrachyNH₂ em artéria mesentérica de resistência de ratos.

Por sua vez, nos estudos em anéis de artéria coronária de resistência de porcos, o peptídeo BPP-BrachyNH₂ induziu significativo efeito vasorelaxante em preparações pré-contraídas com U46619 (FIGURA 16-B), superior ao observado em artéria mesentérica de resistência de ratos na presença ou ausência de pré-tratamento com LPS. Esses resultados apontam para o estudo de outras vias de sinalização possivelmente envolvidas no efeito vasorelaxante do BPP-BrachyNH₂. Dentre as principais vias de sinalização envolvida nos efeitos cardiovasculares dos PROs, relata-se a ativação de receptores B₂ de bradicinina (MORAIS et al., 2011) e muscarínicos M₃ (MORAIS et al., 2013), todos culminando no aumento da produção de NO. Assim, considerando que a ativação de receptores muscarínicos pela ACh promove vasoconstrição em artéria coronária de porcos, além de esses vasos apresentarem alta responsividade à BK de modo dependente de endotélio (FROBERT; BUUS; REMBOLD, 2005; HEDEGAARD et al., 2014), o possível envolvimento dos receptores B₂ de bradicinina no efeito vasorelaxante do BPP-BrachyNH₂ em artéria coronária de resistência de porcos foi avaliado neste estudo.

O papel da BK e da ativação de seus receptores B₁ e B₂ representam um papel chave no controle da fisiologia vascular. Animais nocaute para receptores de bradicinina B₁^{-/-} e B₂^{-/-} apresentam disfunção endotelial envolvendo redução na biodisponibilidade de NO, promovido por estresse oxidativo com consequente inativação do NO produzido no endotélio (LOIOLA et al., 2011). O presente estudo apresenta evidências sobre o envolvimento do aumento da produção de NO e prostanóides vasodilatadores na resposta vasorelaxante do BPP-BrachyNH₂, que foi abolida na presença de L-NNA ou

INDO (FIGURA 17-A,B). Por sua vez, o papel do receptor de bradicinina B₂ na resposta vasorelaxante induzida por BPP-BrachyNH₂ foi confirmado devido atenuação da resposta vasorelaxante na presença de HOE-140, que reduziu o efeito vasorelaxante induzido pelo BPP-BrachyNH₂ (FIGURA 17-C), com redução do efeito máximo para cerca de 20,0%. Considerando a seletividade de HOE-140 para receptores B₂, esse efeito residual pode hipotetizar o envolvimento de outros alvos, como a ativação dos receptores B₁ e a inibição da ECA.

Evidências têm demonstrado que inibidores da ECA, além de seus respectivos produtos de degradação de BK e calidina, são conhecidos por serem agonistas diretos (SKIDGEL; STANISAVLJEVIC; ERDÖS, 2006) ou ativadores alostéricos (ERDOS; TAN; SKIDGEL, 2010) de receptores B₁ e B₂, promovendo aumento na produção de NO, contribuindo com efeitos benéficos associados à ativação bradicininérgica (IGNJATOVIC et al., 2004). Assim, considerando que a atividade da BK apresenta fundamental importância na melhora do quadro hipertensivo, assim como na redução da insuficiência cardíaca e na redução de lesões associadas ao infarto do miocárdio (ITO et al., 1997; REMME, 1997; TSCHÖPE et al., 1997), a ativação de receptores B₂ pelo BPP-BrachyNH₂, aliado a ausência de toxicidade (Ver Capítulos II e III), representa uma promissora aplicação deste peptídeo no tratamento de doenças cardiovasculares.

Em conclusão, BPP-BrachyNH₂ apresentou efeito vasorelaxante nos modelos de artérias de resistência avaliados, envolvendo o aumento da produção de NO, tanto em decorrência do aumento da biodisponibilidade de L-arginina quanto através do envolvimento da ativação de receptores B₂ de bradicinina.

Agradecimentos

Os autores são gratos à UFPI, CNPq e CAPES e FAPEPI pelo suporte financeiro. Daniel Dias Rufino Arcanjo contou com financiamento como Bolsista CAPES/PDSE – Processo nº BEX 2883/15-5 para realização de Doutorado Sanduíche na *Aarhus University*, Dinamarca.

7. Considerações finais e perspectivas

A partir dos resultados obtidos, foi possível concluir que:

- O peptídeo BPP-Brachy e sua forma amidada BPP-BrachyNH₂ foram identificados na secreção cutânea de *B. ephippium*. Sua sequência de aminoácidos é característica de oligopeptídeos ricos em prolina (PROs);
- O BPP-BrachyNH₂ apresenta atividade inibidora da ECA *in vitro* em soro de ratos de modo dependente de concentração;
- O complexo BPP-Brachy/ECA apresenta maior energia de ligação relacionada à interação com o sítio ativo localizado no domínio C da enzima;
- BPP-BrachyNH₂ induz vasodilatação dependente de endotélio mediada pela liberação de óxido nítrico (NO) em anéis de artéria aorta de ratos;
- BPP-BrachyNH₂ não promove citotoxicidade em linhagens de células originárias de leitos vasculares (endotélio e músculo liso vascular), assim como em macrófagos murinos;
- A avaliação toxicológica *in vivo* do BPP-BrachyNH₂ (5 e 50 mg/kg) após administração por via intraperitoneal, não apresentou sinais de toxicidade em camundongos Swiss fêmeas, indicando um perfil de segurança para realização de testes *in vivo*;
- BPP-BrachyNH₂ apresenta efeito vasorelaxante em artérias de resistência oriundas do leito mesentérico de ratos e da circulação coronária de porcos, possivelmente envolvendo o aumento da produção de NO em decorrência do aumento da biodisponibilidade de L-arginina e a ativação de receptores de bradicinina B₂, respectivamente.
- BPP-BrachyNH₂ apresenta ausência de toxicidade e potencial farmacológico para a investigação de aplicações no desenvolvimento de bioprodutos relacionados ao tratamento de disfunção endotelial relacionada a doenças cardiovasculares.

A partir dos resultados apresentados nesta Tese de Doutorado, a investigação do potencial farmacológico, toxicológico e biotecnológico do peptídeo BPP-BrachyNH₂ apresenta como perspectivas:

- Relação estrutura-atividade do BPP-BrachyNH₂ sobre a atividade da ECA e da AsS *in vitro*, avaliada através da síntese e avaliação de análogos sintéticos do peptídeo;
- Estudo *in silico* de dinâmica molecular dos complexos BPP-BrachyNH₂/ECA, BPP-BrachyNH₂/AsS e de seus respectivos análogos sintéticos;
- Avaliação imunomoduladora *in vitro* do BPP-BrachyNH₂ em macrófagos murinos obtidos de camundongos Balb/c, visando caracterizar uma possível atividade imunogênica;
- Investigação do possível papel da ativação da AsS e de mecanismos antioxidantes no efeito vasorelaxante induzido pelo BPP-BrachyNH₂, assim como dos estoques ferro-dinitrosila relacionados à integridade das cavéolas por microscopia eletrônica em artéria mesentérica de ratos pré-tratadas com LPS;
- Investigação da atividade potencializadora de bradicinina no efeito do BPP-BrachyNH₂ em artéria coronária de porco, com ênfase na ativação de receptores de bradicinina B₁ e B₂ de modo dependente e independente da ativação da ECA;
- Estudo dos efeitos cardiovasculares *in vivo* e *ex vivo* do BPP-BrachyNH₂ sobre a pressão arterial, frequência cardíaca e reatividade vascular, em modelos animais envolvendo disfunção endotelial, como choque séptico, infarto do miocárdio, hipertensão pulmonar e diabetes;
- Realização de estudo toxicológico sub-agudo (28 dias) *in vivo*, com avaliação de sinais comportamentais, bioquímicos, hematológicos e histopatológicos em ratos ou camundongos tratados diariamente com BPP-BrachyNH₂.

8. Outras atividades desenvolvidas

Durante o período de realização do curso de Doutorado em Biotecnologia – RENORBIO (2012-Atual), outras atividades acadêmico-científicas foram realizadas, envolvendo a coordenação de um projeto financiado relacionado ao Projeto de Tese (CAPES/FAPEPI) e participação em Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE/CAPES), tendo como produto a publicação de 01 (um) artigo em periódico internacional indexado relacionado com o referido Projeto de Tese (ver Apêndice), assim como outros 02 (dois) em co-autoria. Além disso, o envolvimento em outras atividades de pesquisas no grupo e em parcerias originaram outras 14 (quatorze) publicações em periódicos internacionais e outras produções listadas a seguir:

7.1 Participação em atividades acadêmicas no exterior

Participação em Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE/CAPES) com o projeto de pesquisa intitulado “*Investigation of the mechanisms underlying a vasodilatory effect of BPP-brachy peptide in rat small mesenteric vessels by use of nitric oxide microsensors and confocal microscopy*”. realizado na **Aarhus University (Dinamarca)**, sob supervisão do Prof. Ulf Simonsen, M.D., Ph.D.

Período: 01-Jun a 31-Dez-2015.

Processo: BEX 2883/15-5

Participação em curso teórico-prático de capacitação financiado pelo Centro Brasileiro-Argentino de Biotecnologia – CBAB, intitulado “*Capacitação em desenvolvimento pré-clínico de medicamentos biológicos*” realizado no **Laboratório Nacional de Biociências – LNBio (Campinas-SP)** e no **Centro de Imunología Molecular (Havana, Cuba)**, coordenado pelos Profs. Dr. João Antônio Pêgas Henriques e Dr. Eduardo Pagani.

Períodos: 08 a 19 de setembro de 2014 (Módulo I – Campinas-SP)

06 a 17 de outubro de 2014 (Módulo II – Havana, Cuba)

Carga horária: 160 h

7.2 Coordenação de projeto de pesquisa financiado

Coordenação do projeto de pesquisa intitulado “**Bioprospecção de peptídeos vasoativos e desenvolvimento de derivados nanoestruturados a partir da herpetofauna do Delta do Parnaíba - NanoCardio**” (Edital CAPES/FAPEPI n.º 008/2012).

Situação: Em andamento

Financiados: Bolsa de Doutorado (24 meses) / Mobilidade acadêmica (R\$ 10.000,00).

Alunos envolvidos: Doutorado: (1).

Integrantes: **Daniel Dias Rufino Arcanjo** - Coordenador / José Roberto de Souza de Almeida Leite - Integrante.

7.3 Artigos publicados em periódicos

1. GRANN, M.; COMERMA-STEFFENSEN, S. G.; **ARCANJO, D. D. R.**; SIMONSEN, U. Mechanisms Involved in Thromboxane A₂-induced Vasoconstriction of Rat Intracavernous Small Penile Arteries. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology (Print)**, 2016. <http://dx.doi.org/10.1111/bcpt.12544>.
2. HEDEGAARD, E. R. ; GOULIAEV, A. ; WINTHER, A. K. ; **ARCANJO, D. D. R.** ; AALLING, M. ; SIVASUBRAMANIAM, N. ; WOOD, M. E. ; WHITEMAN, M. ; SKOVGAARD, N. ; SIMONSEN, U. . Involvement of potassium channels and calcium-independent mechanisms in hydrogen sulfide-induced relaxation of rat mesenteric small arteries. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics (Online)**, v. 356, p. 53-63, 2016.
3. LUSTOSA, A. K. M. F. ; **ARCANJO, D. D. R.** ; RIBEIRO, R. G. ; RODRIGUES, K. A. F. ; PASSOS, F. F. B. ; PIAUILINO, C. A. ; SILVA FILHO, J. C. ; ARAÚJO, B. Q. ; LIMA NETO, J. S. ; COSTA JUNIOR, J. S. ; CARVALHO, F. A. A. ; CITÓ, A. M. G. L. . Immunomodulatory and toxicological evaluation of the fruit seeds from *Platonia insignis*, a native species from Brazilian Amazon Rainforest. **Revista Brasileira de Farmacognosia (Impresso)**, v. 26, p. 77-82, 2016.
4. SANTOS, M. E. P. ; MOURA, L.H.P. ; MENDES, M.B. ; **ARCANJO, D.D.R.** ; MONÇÃO, N.B.N. ; ARAÚJO, B. Q. ; LOPES, J.A.D. ; SILVA-FILHO, J.C. ; FERNANDES, R.M. ; OLIVEIRA, R.C.M. ; CITÓ, A. M. G. L. ; OLIVEIRA, A.P. . Hypotensive and vasorelaxant effects induced by the ethanolic extract of the *Mimosa caesalpinifolia* Benth. (Mimosaceae) inflorescences in normotensive rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 164, p. 120-128, 2015.
5. COELHO, A. G. ; MOURA, A. K. S. ; LIMA NETO, J. S. ; MORAIS, I. C. P. S. ; CARVALHO, G. D. ; CUNHA, F. V. M. ; MEDEIROS, M. G. F. ; VASCONCELOS, E. A. F. ; OLIVEIRA, A. P. ; **ARCANJO, D. D. R.** ; NUNES, L. C. C. ; CITÓ, A. M. G. L. . Optimization and standardization of extraction method from *Lippia origanoides* H.B.K.: Focus on potential anti-hypertensive applications. **Industrial Crops and Products (Print)**, v. 78, p. 124-130, 2015.
6. **ARCANJO, D. D. R.**; VASCONCELOS, A. G.; COMERMA-STEFFENSEN, S. G.; JESUS, J. R. ; SILVA, L. P. ; PIRES JUNIOR, O. R.; COSTA NETO, C. M.; OLIVEIRA, E. B. ; MIGLIOLO, L. ; FRANCO, O. L.; RESTINI, C. B. A. ; PAULO, M. ; BENDHACK, L. M. ; BEMQUERER, M. P. ; OLIVEIRA, A. P. ; SIMONSEN, U. ; LEITE, J. R. S. A. . A Novel Vasoactive Proline-Rich Oligopeptide from the Skin Secretion of the Frog *Brachycephalus ephippium*. **Plos One**, v. 10, p. e0145071, 2015.
7. MONCAO, N. B. N. ; COSTA, L. M. ; **ARCANJO, D. D. R.** ; ARAÚJO, B. Q. ; LUSTOSA, M. C. G. ; RODRIGUES, K. A. F. ; CARVALHO, F. A. A. ; COSTA, A. P. R. ; CITÓ, A. M. G. L. . Chemical constituents and toxicological studies of leaves from *Mimosa caesalpinifolia* Benth., a Brazilian honey plant. **Pharmacognosy Magazine**, v. 10, p. 456, 2014.
8. **ARCANJO, D. D. R.**; COSTA JUNIOR, J. S. ; MOURA, L. H. P. ; FERRAZ, A. B. F. ; ROSSATTO, R. R. ; DAVID, J. M. ; QUINTANS JUNIOR, L. J. ; OLIVEIRA, R. C. M. ; CITÓ, A. M. G. L. ; OLIVEIRA, A. P. . Garcinielliptone FC, a polyisoprenylated benzophenone from *Platonia insignis* Mart., promotes vasorelaxant effect on rat mesenteric artery. **Natural Product Research (Print)**, v. 28, p. 923-927, 2014.
9. MENDES, M. B. ; SILVA FILHO, J. C. ; SABINO, C. K. B. ; **ARCANJO, D. D. R.** ; SOUSA, C. M. M.; COSTA, I. C. G. ; CHAVES, M. H. ; OLIVEIRA, R. C. M. ; OLIVEIRA, A. P. . Pharmacological Evidence of α -Adrenergic Receptors in the Hypotensive Effect of *Platonia insignis* Mart.. **Journal of Medicinal Food**, v. 17, p. 1079-1085, 2014.
10. SANTANA, L. C. L. R. ; CARNEIRO, S. M. P. ; CALAND NETO, L. B. ; **ARCANJO, D. D. R.** ; MOITA NETO, J. M. ; CITÓ, A. M. G. L. ; CARVALHO, F. A. A. . Brazilian brown propolis elicits antileishmanial effect against promastigote and amastigote forms of *Leishmania amazonensis*. **Natural Product Research (Print)**, v. 28, p. 340-343, 2014.

11. NASCIMENTO, J. L. ; COELHO, A. G. ; BARROS, Y. S. O. ; SILVA, O. A. ; FREITAS, R. M. ; ROCHA, M. S. ; DAVID, J. M. ; COSTA JUNIOR, J. S. ; **ARCANJO, D. D. R.** ; OLIVEIRA, R. C. M. ; CITÓ, A. M. G. L. . Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* do extrato hexânico da semente do bacuri (*Platonia insignis* Mart.) e de seu complexo de inclusão com β -ciclodextrina. **Boletim Informativo Geum**, v. 5, p. 44-53, 2014.
12. BARRETO, H. M. ; FONTINELE, F. C. ; OLIVEIRA, A. P. ; **ARCANJO, D. D. R.** ; SANTOS, B. H. C. ; ABREU, A. P. L. ; COUTINHO, H. D. M. ; SILVA, R. A. C. ; SOUSA, T. O. ; MEDEIROS, M. G. F. ; CITÓ, A. M. G. L. ; LOPES, J. A. D. . Phytochemical Prospection and Modulation of Antibiotic Activity In Vitro by *Lippia organoides* H.B.K. in Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1-7, 2014.
13. MACHADO, F. D. F. ; SILVA, F. V. ; FERNANDES, H. B. ; PASSOS, F. F. B. ; **ARCANJO, D. D. R.** ; LIMA, J. T. ; ALMEIDA, J. R. G. S. ; OLIVEIRA, F. A. ; OLIVEIRA, R. C. M. . Gastroprotective Effect of Ethanolic Extract from *Neoglaziovia variegata* (Arruda) Mez. (Bromeliaceae) in Rats and Mice. **Zeitschrift fur Naturforschung. C, A Journal of Biosciences**, v. 68c, p. 97-107, 2013.
14. FERREIRA FILHO, E. S. ; **ARCANJO, D. D. R.** ; MOURA, L. H. P. ; SILVA FILHO, J. C. ; PAULINO, E. T. ; RIBEIRO, E. A. N. ; CHAVES, M. H. ; OLIVEIRA, R. C. M. ; OLIVEIRA, A. P. . Antihypertensive and vasorelaxant effects of stem barks from *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. (Rutaceae) in rats. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 51, p. 661-669, 2013.
15. VIANA, A. F. S. C. ; FERNANDES, H. B. ; SILVA, F. V. ; OLIVEIRA, I. S. ; PASSOS, F. F. B. ; MACHADO, F. D. F. ; COSTA, C. L. S. ; **ARCANJO, D.D.R.** ; CHAVES, M. H. ; OLIVEIRA, F. A. ; OLIVEIRA, R. C. M. . Gastroprotective activity of *Cenostigma macrophyllum* Tul. var. *acuminata* Teles Freire leaves on experimental ulcer models. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 150, p. 316-323, 2013.
16. **ARCANJO, D. D. R.** ; ALBUQUERQUE, A. C. M. ; MELO NETO, B. ; SANTANA, L. C. L. R. ; MEDEIROS, M. G. F. ; CITÓ, A. M. G. L. . Bioactivity evaluation against *Artemia salina* Leach of medicinal plants used in Brazilian Northeastern folk medicine. **Brazilian Journal of Biology (Impresso)**, v. 72, p. 505-509, 2012.
17. SILVA, F. V. ; GUIMARAES, A. G. ; SILVA, E. R. S. ; SOUSA NETO, B. P. ; MACHADO, F. D. F. ; QUINTANS JUNIOR, L. J. ; **ARCANJO, D. D. R.** ; OLIVEIRA, F. A. ; OLIVEIRA, R. C. M. . Anti-inflammatory and Antiulcer Activities of Carvacrol, a Monoterpene Present in the Essential Oil of Oregano. **Journal of Medicinal Food**, v. 15, p. 984-991, 2012.

7.4 Trabalhos apresentados em eventos

1. **ARCANJO, D. D. R.** ; VASCONCELOS, R. L. H. ; VASCONCELOS, A. G. ; RESTINI, C. B. A. ; BENDHACK, L. M. ; OLIVEIRA, A. P. ; LEITE, J. R. S. A. . Provável envolvimento do óxido nítrico (NO) no efeito vasorelaxante do peptídeo BPP-Brachy em artéria aorta isolada de ratos. In: **II Simpósio Latino-Americano de Biotecnologia do Nordeste**, 2014, Parnaíba-PI. Resumos, 2014.
2. **ARCANJO, D. D. R.** ; VASCONCELOS, A. G. ; JESUS, J. R. ; SILVA, L. P. ; PIRES JUNIOR, O. R. ; COSTA NETO, C. M. ; OLIVEIRA, E. B. ; OLIVEIRA, A. P. ; BLOCH JUNIOR, C. ; LEITE, J. R. S. A. . Characterization of a Novel Bradykinin Potentiating Peptide (BPP) from the Skin Secretion of *Brachycephalus ephippium* (Brachycephalidae, Amphibian). In: **IX International Symposium on Vasoactive Peptides**, 2013, Belo Horizonte-MG. Resumos, 2013

Referências

- AKIF, M. et al. Structural characterization of angiotensin I-converting enzyme in complex with a selenium analogue of captopril. **The FEBS Journal**, v. 278, n. 19, p. 3644–3650, out. 2011.
- ARAÚJO, G. L. DE et al. Alternative methods in toxicity testing: the current approach. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 50, n. 1, p. 55–62, mar. 2014.
- ARAUJO, R. L.; GOMEZ, M. V. Potentiation of bradykinin action on smooth muscle by a scorpion venom extract. **General Pharmacology: The Vascular System**, v. 7, n. 2-3, p. 123–126, ago. 1976.
- ARCANJO, D. D. R. et al. A Novel Vasoactive Proline-Rich Oligopeptide from the Skin Secretion of the Frog *Brachycephalus ephippium*. **PloS One**, v. 10, n. 12, p. e0145071, jan. 2015.
- BAGNARA, J. et al. Common origin of pigment cells. **Science**, v. 203, n. 4379, p. 410–415, 2 fev. 1979.
- BARRETO, S. A. et al. Effects of three vasoactive peptides isolated from the plasma of the snake *Bothrops jararaca*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 149, n. 4, p. 552–558, maio 2009.
- BEETON, C.; GUTMAN, G. A.; CHANDY, K. G. Targets and Therapeutic Properties of Venom Peptides. In: **Handbook of Biologically Active Peptides**. [s.l.] Elsevier, 2006. p. 403–414.
- BIEDERMANNNOVA, L. et al. Another role of proline: stabilization interactions in proteins and protein complexes concerning proline and tryptophane. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 10, n. 19, p. 6350–6359, 2008.
- BRAND, G. D. et al. Bradykinin-related peptides from *Phyllomedusa hypochondrialis*. **Peptides**, v. 27, n. 9, p. 2137–2146, out. 2006.
- BYERS, L. D.; WOLFENDEN, R. Binding of the by-product analog benzylsuccinic acid by carboxypeptidase A. **Biochemistry**, v. 12, n. 11, p. 2070–2078, maio 1973.
- CAMARGO, A. C. M. et al. Bradykinin-potentiating peptides: beyond captopril. **Toxicon**, v. 59, n. 4, p. 516–523, 15 mar. 2012.
- CAMPBELL, D. J. **Handbook of Biologically Active Peptides**. [s.l.] Elsevier, 2006.
- CAPELLINI, V. K. et al. The effect of extracellular pH changes on intracellular pH and nitric oxide concentration in endothelial and smooth muscle cells from rat aorta. **PloS One**, v. 8, n. 5, p. e62887, jan. 2013.
- CDER. **Guidance for Industry: Single Dose Acute Toxicity Testing for Pharmaceuticals**. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Gu>

idances/UCM079270.pdf>. Acesso em: 7 fev. 2016.

COE. **European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes**. Disponível em: <<http://www.coe.int/en/web/conventions/full-list/-/conventions/treaty/123>>. Acesso em: 14 fev. 2016.

CONCEIÇÃO, K. et al. Isolation and characterization of a novel bradykinin potentiating peptide (BPP) from the skin secretion of *Phyllomedusa hypochondrialis*. **Peptides**, v. 28, n. 3, p. 515–23, mar. 2007.

CONLON, J. M. Bradykinin and its receptors in non-mammalian vertebrates. **Regulatory Peptides**, v. 79, n. 2-3, p. 71–81, fev. 1999.

CONLON, J. M. Bradykinin-Related Peptides from Frog Skin. In: **Handbook of Biologically Active Peptides**. [s.l.] Elsevier, 2006. p. 291–294.

COUTINHO-NETO, A. et al. ESI-MS/MS identification of a bradykinin-potentiating peptide from Amazon *Bothrops atrox* snake venom using a hybrid Qq-oaTOF mass spectrometer. **Toxins**, v. 5, n. 2, p. 327–335, fev. 2013.

CUSHMAN, D. W.; ONDETTI, M. A. Design of angiotensin converting enzyme inhibitors. **Nature Medicine**, v. 5, n. 10, p. 1110–1112, out. 1999.

DALSGAARD, T. et al. Openers of small conductance calcium-activated potassium channels selectively enhance NO-mediated bradykinin vasodilatation in porcine retinal arterioles. **British Journal of Pharmacology**, v. 160, n. 6, p. 1496–1508, jul. 2010.

DENADAI, Â. M. L. et al. Novel pharmaceutical composition of bradykinin potentiating penta peptide with β -cyclodextrin: Physical–chemical characterization and anti-hypertensive evaluation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 336, n. 1, p. 90–98, 4 maio 2007.

DOURADO, F. S. et al. Antimicrobial peptide from the skin secretion of the frog *Leptodactylus siphax*. **Toxicon**, v. 50, n. 4, p. 572–580, 2007.

ERDOS, E. G.; TAN, F.; SKIDGEL, R. A. Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitors Are Allosteric Enhancers of Kinin B1 and B2 Receptor Function. **Hypertension**, v. 55, n. 2, p. 214–220, 11 jan. 2010.

ERDÖS, E. G.; WOHLER, J. R. Inhibition *in vivo* of the enzymatic inactivation of bradykinin and kallidin. **Biochemical Pharmacology**, v. 12, p. 1193–1199, out. 1963.

FERREIRA, L. A. F. et al. Isolation and characterization of a bradykinin potentiating peptide (BPP-S) isolated from *Scaptocosa raptoria* venom. **Toxicon**, v. 34, n. 5, p. 599–603, maio 1996.

FERREIRA, L.; GALLE, A.; RAIDA, M. Isolation: Analysis and Properties of Three Bradykinin–Potentiating Peptides (BPP-II, BPP-III, and BPP-V) From *Bothrops Neuwiedi* Venom. **Journal of Protein Chemistry**, v. 17, n. 3, p. 285–289, 1998.

FERREIRA, S. H. A bradykinin-potentiating factor (BPF) present in the venom of *Bothrops jararaca*. **British Journal of Pharmacology and Chemotherapy**, v. 24, n. 1, p. 163–169, 19 fev. 1965.

FERREIRA, S. H. et al. Activity of various fractions of bradykinin potentiating factor against angiotensin I converting enzyme. **Nature**, v. 225, n. 5230, p. 379–80, 24 jan. 1970.

FERREIRA, S. H.; BARTELT, D. C.; GREENE, L. J. Isolation of bradykinin-potentiating peptides from *Bothrops jararaca* venom. **Biochemistry**, v. 9, n. 13, p. 2583–2593, jun. 1970.

FERREIRA, S. H.; ROCHA E SILVA, M. Potentiation of bradykinin by dimercaptopropanol (bal) and other inhibitors of its destroying enzyme in plasma. **Biochemical Pharmacology**, v. 11, p. 1123–1128, dez. 1962.

FIELDS, G. B.; NOBLE, R. L. Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids. **International Journal of Peptide and Protein Research**, v. 35, n. 3, p. 161–214, 12 jan. 1990.

FOLKOW, B. Physiological aspects of primary hypertension. **Physiological Reviews**, v. 62, n. 2, p. 347–504, abr. 1982.

FROBERT, O.; BUUS, C. L.; REMBOLD, C. M. HSP20 phosphorylation and interstitial metabolites in hypoxia-induced dilation of swine coronary arteries. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 184, n. 1, p. 37–44, maio 2005.

FROST, D. **Brachycephalidae Günther, 1858. Amphibian Species of the World 6.0, an Online Reference.** Disponível em: <<http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/Amphibia/Anura/Brachycephalidae>>. Acesso em: 13 jan. 2016.

FURCHGOTT, R. F. Studies on relaxation of rabbit aorta by sodium nitrite: the basis for the proposal that the acid-activatable inhibitory factor from retractor penis is inorganic nitrite and the endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide. In: VANHOUTTE, P. (Ed.). **Mechanisms of Vasodilation**. New York: Raven Press, 1988. p. 401–404.

GAVRAS, H. et al. An angiotensin converting-enzyme inhibitor to identify and treat vasoconstrictor and volume factors in hypertensive patients. **The New England Journal of Medicine**, v. 291, n. 16, p. 817–821, 17 out. 1974.

GAVRAS, H. et al. Antihypertensive effect of the oral angiotensin converting-enzyme inhibitor SQ 14225 in man. **The New England Journal of Medicine**, v. 298, n. 18, p. 991–995, 4 maio 1978.

GOMES, C. L. et al. Identification of novel bradykinin-potentiating peptides (BPPs) in the venom gland of a rattlesnake allowed the evaluation of the structure-function relationship of BPPs. **Biochemical Pharmacology**, v. 74, n. 9, p. 1350–1360, 1 nov. 2007.

GREENE, L. J. et al. Inhibition of the conversion of angiotensin I to II and potentiation of bradykinin by small peptides present in *Bothrops jararaca* venom. **Circulation Research**, v. 31, n. 9, Suppl 2, p. 62–71, set. 1972.

GUERREIRO, J. R. et al. Argininosuccinate synthetase is a functional target for a snake venom anti-hypertensive peptide: role in arginine and nitric oxide production. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 30, p. 20022–20033, 24 jul. 2009.

HARVEY, A. L. **Handbook of Biologically Active Peptides**. [s.l.] Elsevier, 2006.

HAYASHI, M. A. F. et al. The C-type natriuretic peptide precursor of snake brain contains highly specific inhibitors of the angiotensin-converting enzyme. **Journal of Neurochemistry**, v. 85, n. 4, p. 969–977, 15 abr. 2003.

HEDEGAARD, E. R. et al. K_v7 channels are involved in hypoxia-induced vasodilatation of porcine coronary arteries. **British Journal of Pharmacology**, v. 171, n. 1, p. 69–82, jan. 2014.

HEDEGAARD, E. R. et al. Involvement of Potassium Channels and Calcium-Independent Mechanisms in Hydrogen Sulfide-Induced Relaxation of Rat Mesenteric Small Arteries. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 356, n. 1, p. 53–63, 25 nov. 2016.

HERNANZ, R. Measurements of nitric oxide concentration and hyporeactivity in rat superior mesenteric artery exposed to endotoxin. **Cardiovascular Research**, v. 62, n. 1, p. 202–211, 1 abr. 2004.

HODGSON, W. C.; ISBISTER, G. K. The application of toxins and venoms to cardiovascular drug discovery. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 9, n. 2, p. 173–176, 2009.

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**, v. 25, n. 7, p. 1085–1092, jul. 2004.

IANZER, D. et al. Do the cardiovascular effects of angiotensin-converting enzyme (ACE) I involve ACE-independent mechanisms? new insights from proline-rich peptides of *Bothrops jararaca*. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 322, n. 2, p. 795–805, ago. 2007.

IANZER, D. et al. BPP-5a produces a potent and long-lasting NO-dependent antihypertensive effect. **Therapeutic Advances in Cardiovascular Disease**, v. 5, n. 6, p. 281–295, dez. 2011.

IGNARRO, L. J. et al. Pharmacological evidence that endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide: use of pyrogallol and superoxide dismutase to study endothelium-dependent and nitric oxide-elicited vascular smooth muscle relaxation. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 244, n. 1, p. 181–189, 1988.

IGNJATOVIC, T. et al. Kinin B1 receptors stimulate nitric oxide production in endothelial cells: signaling pathways activated by angiotensin I-converting enzyme inhibitors and peptide ligands. **Molecular Pharmacology**, v. 66, n. 5, p. 1310–1316, 21 nov. 2004.

ITO, K. et al. Contribution of bradykinin to the cardioprotective action of angiotensin converting enzyme inhibition in hypertension and after myocardial infarction. **Japanese Journal of Pharmacology**, v. 75, n. 4, p. 311–318, dez. 1997.

JITONNOM, J.; SONTAG, C. Comparative study on activation mechanism of carboxypeptidase A1, A2 and B: first insights from steered molecular dynamics simulations. **Journal of Molecular Graphics & Modelling**, v. 38, p. 298–303, set. 2012.

KATO, H.; SUZUKI, T. Bradykinin-potentiating peptides from the venom of *Agkistrodon halys blomhoffii*. Isolation of five bradykinin potentiators and the amino acid sequences of two of them, potentiators B and C. **Biochemistry**, v. 10, n. 6, p. 972–980, mar. 1971.

KILKENNY, C. et al. Animal research: Reporting in vivo experiments: The ARRIVE guidelines. **British Journal of Pharmacology**, v. 160, n. 7, p. 1577–1579, ago. 2010.

KOJIMA, H. et al. Development of a Fluorescent Indicator for Nitric Oxide Based on the Fluorescein Chromophore. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 46, n. 2, p. 373–375, fev. 1998.

KRIEGER, E. . et al. POTENTIAL SCREENING TEST FOR DETECTION OF OVERACTIVITY OF RENIN-ANGIOTENSIN SYSTEM. **The Lancet**, v. 297, n. 7693, p. 269–271, fev. 1971.

LAMEU, C.; NEIVA, M.; HAYASHI, M. Venom Bradykinin-related peptides (BRPs) and its multiple biological roles. In: RADIS-BAPTISTA, G. (Ed.). . **An Integrated View of the Molecular Recognition and Toxinology - From Analytical Procedures to Biomedical Applications**. [s.l.] InTech, 2013. p. 119–151.

LEITE, J. R. S. A. et al. Phylloseptins: a novel class of anti-bacterial and anti-protozoan peptides from the *Phyllomedusa* genus. **Peptides**, v. 26, n. 4, p. 565–573, abr. 2005.

LEWIS, R. J.; GARCIA, M. L. Therapeutic potential of venom peptides. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 2, n. 10, p. 790–802, out. 2003a.

LEWIS, R. J.; GARCIA, M. L. Therapeutic potential of venom peptides. **Nature Reviews. Drug Discovery**, v. 2, n. 10, p. 790–802, out. 2003b.

LOIOLA, R. A. et al. Role of vascular Kinin B1 and B2 receptors in endothelial nitric oxide metabolism. **Peptides**, v. 32, n. 8, p. 1700–5, ago. 2011.

MACHADO, R. J. A. et al. Characterization and pharmacological properties of a novel multifunctional Kunitz inhibitor from *Erythrina velutina* seeds. **PloS One**, v. 8, n. 5, p. e63571, jan. 2013.

MACKENZIE, A.; WADSWORTH, R. M. Extracellular L-arginine is required for optimal NO synthesis by eNOS and iNOS in the rat mesenteric artery wall. **British Journal of Pharmacology**, v. 139, p. 1487–1497, 2003.

MARTINEZ, M. C. et al. Alteration by lipopolysaccharide of the relationship between intracellular calcium levels and contraction in rat mesenteric artery. **British Journal of Pharmacology**, v. 118, n. 5, p. 1218–1222, 1996.

MASUYER, G. et al. Molecular recognition and regulation of human angiotensin-I converting enzyme (ACE) activity by natural inhibitory peptides. **Scientific Reports**, v. 2, p. 717, jan. 2012.

MEKI, A.-R. M. A.; NASSAR, A. Y.; ROCHAT, H. A bradykinin-potentiating peptide (peptide K12) isolated from the venom of Egyptian scorpion *Buthus occitanus*. **Peptides**, v. 16, n. 8, p. 1359–1365, jan. 1995.

MENIN, L. et al. High throughput screening of bradykinin-potentiating peptides in *Bothrops moojeni* snake venom using precursor ion mass spectrometry. **Toxicon**, v. 51, n. 7, p. 1288–1302, 1 jun. 2008.

MICHAEL, B. et al. Evaluation of Organ Weights for Rodent and Non-Rodent Toxicity Studies: A Review of Regulatory Guidelines and a Survey of Current Practices. **Toxicologic Pathology**, v. 35, n. 5, p. 742–750, 1 ago. 2007.

MORAIS, K. L. P. et al. Bj-PRO-5a, a natural angiotensin-converting enzyme inhibitor, promotes vasodilatation mediated by both bradykinin B2 and M1 muscarinic acetylcholine receptors. **Biochemical Pharmacology**, v. 81, n. 6, p. 736–742, 15 mar. 2011.

MORAIS, K. L. P. et al. Proline rich-oligopeptides: diverse mechanisms for antihypertensive action. **Peptides**, v. 48, p. 124–133, out. 2013.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55–63, dez. 1983.

MULVANY, M. J. Small artery remodelling in hypertension. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 110, n. 1, p. 49–55, jan. 2012.

MULVANY, M. J.; HALPERN, W. Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. **Circulation Research**, v. 41, n. 1, p. 19–26, 1 jul. 1977.

MURAYAMA, N. et al. Cloning and sequence analysis of a *Bothrops jararaca* cDNA encoding a precursor of seven bradykinin-potentiating peptides and a C-type natriuretic peptide. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 4, p. 1189–1193, 1997.

NAGANO, T.; YOSHIMURA, T. Bioimaging of Nitric Oxide. **Chemical Reviews**, v. 102, n. 4, p. 1235–1270, abr. 2002.

OECD. **Test No. 423: Acute Oral toxicity - Acute Toxic Class Method**. Paris: OECD Publishing, 2002a.

OECD. Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing. In: **OECD Series on Testing and Assessment**. OECD Series on Testing and Assessment. Paris: OECD Publishing, 2002b. p. 24.

OECD. Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Human Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. In: **OECD Series on Testing and Assessment**. OECD Series on Testing and Assessment. Paris: OECD Publishing, 2002c. p. 39.

OECD. Guidance document on using cytotoxicity tests to estimate starting doses for acute oral systemic toxicity tests. In: **OECD Series on Testing and Assessment**. Paris: OECD Publishing, 2010. p. 1–54.

ONDETTI, M. A. et al. Angiotensin-converting enzyme inhibitors from the venom of *Bothrops jararaca*. Isolation, elucidation of structure, and synthesis. **Biochemistry**, v. 10, n. 22, p. 4033–4039, out. 1971.

ONYÜKSEL, H. et al. Human VIP- α : a long-acting, biocompatible and biodegradable peptide nanomedicine for essential hypertension. **Peptides**, v. 27, n. 9, p. 2271–5, set. 2006.

PALMER, R. M.; FERRIGE, A. G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, v. 327, n. 11, p. 524–526, 1987.

PAULO, M. et al. A new NO donor failed to release NO and to induce relaxation in the rat basilar artery. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, n. 3, p. 344–350, 14 fev. 2012.

PETRIZ, B. D. A. et al. Pharmacological potential of exercise and RAS vasoactive peptides for prevention of diseases. **Current Protein & Peptide Science**, v. 14, n. 6, p. 459–471, set. 2013.

PIE, M. R. et al. Understanding the mechanisms underlying the distribution of microendemic montane frogs (*Brachycephalus* spp., Terrarana: Brachycephalidae) in the Brazilian Atlantic Rainforest. **Ecological Modelling**, v. 250, p. 165–176, 2013.

PIRES, O. R. et al. Occurrence of tetrodotoxin and its analogues in the Brazilian frog *Brachycephalus ephippium* (Anura: Brachycephalidae). **Toxicon**, v. 40, n. 6, p. 761–766, jun. 2002.

PIRES, O. R. et al. The occurrence of 11-oxotetrodotoxin, a rare tetrodotoxin analogue, in the brachycephalidae frog *Brachycephalus ephippium*. **Toxicon**, v. 42, n. 5, p. 563–566, out. 2003.

PIRES, O. R. et al. Further report of the occurrence of tetrodotoxin and new analogues in the Anuran family Brachycephalidae. **Toxicon**, v. 45, n. 1, p. 73–79, jan. 2005.

POMBAL, J. P.; WISTUBA, E. M.; BORNSCHEIN, M. R. A New Species of Brachycephalid (Anura) from the Atlantic Rain Forest of Brazil. **Journal of Herpetology**, v. 32, n. 1, p. 70, mar. 1998.

REES, D. D. et al. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. **British Journal of Pharmacology**, v. 101, n. 3, p. 746–752, 1990.

REMME, W. J. Bradykinin-mediated cardiovascular protective actions of ACE inhibitors. A new dimension in anti-ischaemic therapy? **Drugs**, v. 54 Suppl 5, p. 59–70, jan. 1997.

RIOLI, V. et al. A novel bradykinin potentiating peptide isolated from *Bothrops jararacussu* venom using catalytically inactive oligopeptidase EP24.15. **The FEBS Journal**, v. 275, n. 10, p. 2442–2454, maio 2008.

ROCHA E SILVA, M.; BERALDO, W. T.; ROSENFELD, G. Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by trypsin. **The American Journal of Physiology**, v. 156, n. 2, p. 261–273, fev. 1949.

RODRIGUES, K. A. F. et al. *Eugenia uniflora* L. Essential Oil as a Potential Anti-Leishmania Agent: Effects on *Leishmania amazonensis* and Possible Mechanisms of Action. **Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM**, v. 2013, p. 279726, jan. 2013.

RODRIGUES, K. A. F. et al. *Syzygium cumini* (L.) Skeels essential oil and its major constituent α -pinene exhibit anti-Leishmania activity through immunomodulation in vitro. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 160, n. 2, p. 32–40, fev. 2015.

SANTOS, M. R. V. et al. **Parâmetros bioquímicos, fisiológicos e morfológicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) produzidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Sergipe** *Scientia Plena*, 30 nov. 2010.

SANTOS, R. A.; KRIEGER, E. M.; GREENE, L. J. An improved fluorometric assay of rat serum and plasma converting enzyme. **Hypertension**, v. 7, n. 2, p. 244–252, 1 mar. 1985.

SCHMAIER, A. H. The plasma kallikrein-kinin system counterbalances the renin-angiotensin system. **Journal of Clinical Investigation**, v. 109, n. 8, p. 1007–1009, 15 abr. 2002.

SCHONBRUNN, E. et al. Development of highly potent and selective diaminothiazole inhibitors of cyclin-dependent kinases. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 56, n. 10, p. 3768–3782, 23 maio 2013.

SELLERS, R. S. et al. Society of Toxicologic Pathology Position Paper: Organ Weight Recommendations for Toxicology Studies. **Toxicologic Pathology**, v. 35, n. 5, p. 751–755, 1 ago. 2007.

SILVA-FILHO, J. C. et al. Investigation of Mechanisms Involved in (-)-Borneol-Induced Vasorelaxant Response on Rat Thoracic Aorta. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 110, n. 2, p. 171–177, 22 ago. 2012.

SIMONSEN, U.; AALKJAER, C. Small artery structure and function: a dual interaction with many players. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 110, n. 1, p. 2–4, jan. 2012.

SKIDGEL, R. A.; STANISAVLJEVIC, S.; ERDÖS, E. G. Kinin- and angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitor-mediated nitric oxide production in endothelial cells. **Biological chemistry**, v. 387, n. 2, p. 159–65, 1 mar. 2006.

SOARES, M. R. et al. Identification of novel bradykinin-potentiating peptides and C-type natriuretic peptide from *Lachesis muta* venom. **Toxicon**, v. 46, n. 1, p. 31–38, jul. 2005.

TSCHÖPE, C. et al. Antihypertensive and cardioprotective effects after angiotensin-converting enzyme inhibition: role of kinins. **Journal of Cardiac Failure**, v. 3, n. 2, p. 133–148, jun. 1997.

VERANO-BRAGA, T. et al. *Tityus serrulatus* Hypotensins: a new family of peptides from scorpion venom. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 371, n. 3, p. 515–520, 4 jul. 2008.

VERANO-BRAGA, T. et al. Structure-function studies of *Tityus serrulatus* Hypotensin-I (TsHpt-I): A new agonist of B2 kinin receptor. **Toxicon**, v. 56, n. 7, p. 1162–1171, 2010.

XI, X. et al. A Review on Bradykinin-Related Peptides Isolated from Amphibian Skin Secretion. **Toxins**, v. 7, n. 3, p. 951–970, 2015.

YANG, H.-Y. T.; NEFF, N. H. Distribution and properties of Angiotensin Converting Enzyme of rat brain. **Journal of Neurochemistry**, v. 19, n. 10, p. 2443–2450, out. 1972.

APÊNDICE



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO COM ANIMAIS
Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil; CEP: 64049-550
Telefone (86) 32155734 – e-mail: ceeapi@ufpi.br

Teresina, 16 de maio de 2012.

Ao (A)

Prof (a): Dra. Rita de Cássia Meneses Oliveira e Francisco de Assis Oliveira

Departamento: UFPI/CCS/NPPM

Sr. (a) Pesquisador (a),

Declaro para os devidos fins que o projeto intitulado: **“Estudo químico-farmacológico de plantas medicinais do cerrado e da caatinga do nordeste brasileiro e de produtos sintéticos e seus derivados bioativos.”**, foi avaliado pelo Comitê de Ética em Experimentação com Animais – CEEA/UFPI teve parecer **APROVADO sob o nº. 008/12**. Esclarecemos que o mesmo se encontra de acordo com os requisitos exigidos para apreciação de projetos de pesquisa.


Prof.^a Ivete L. de Mendonça,
Comitê de Ética em Experimentação Animal-UFPI
Coordenadora

Atenciosamente,

RESEARCH ARTICLE

A Novel Vasoactive Proline-Rich Oligopeptide from the Skin Secretion of the Frog *Brachycephalus ephippium*

Daniel Dias Rufino Arcanjo^{1,2}, Andreanne Gomes Vasconcelos¹, Simón Gabriel Comerma-Steffensen³, Joilson Ramos Jesus¹, Luciano Paulino Silva⁴, Osmino Rodrigues Pires, Júnior⁵, Claudio Miguel Costa-Neto⁶, Eduardo Brandt Oliveira⁶, Ludovico Migliolo⁷, Octávio Luiz Franco⁷, Carolina Baraldi Araújo Restini⁸, Michele Paulo⁹, Lusiane Maria Bendhack⁹, Marcelo Porto Bemquerer⁴, Aldeidia Pereira Oliveira², Ulf Simonsen³, José Roberto de Souza de Almeida Leite^{1*}



CrossMark
click for updates

OPEN ACCESS

Citation: Arcanjo DDR, Vasconcelos AG, Comerma-Steffensen SG, Jesus JR, Silva LP, Pires OR, Júnior, et al. (2015) A Novel Vasoactive Proline-Rich Oligopeptide from the Skin Secretion of the Frog *Brachycephalus ephippium*. PLoS ONE 10(12): e0145071. doi:10.1371/journal.pone.0145071

Editor: Paulo Lee Ho, Instituto Butantan, BRAZIL

Received: March 13, 2015

Accepted: November 29, 2015

Published: December 14, 2015

Copyright: © 2015 Arcanjo et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper.

Funding: The authors would like to thank Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, 552676/2011-0 process number), Fundação de Amparo a Pesquisa do Piauí (FAPEPI, payment of scholarships to students) for the financial support and Genetic Resources and Biotechnology (EMBRAPA) for the facilities, structure mass spectrometry and peptide synthesis. Daniel D. R. Arcanjo acknowledges the CAPES Foundation (Bolsista CAPES-PDSE – Processo nº BEX 2883/15-5) for the financial support. S. Comerma-Steffensen

1 Núcleo de Pesquisa em Biodiversidade e Biotecnologia–BIOTEC, *Campus* Ministro Reis Velloso–CMRV, Universidade Federal do Piauí –UFPI, Parnaíba, PI, Brazil, **2** Laboratório de Farmacologia Cardiovascular–LFC, Núcleo de Pesquisas em Plantas Medicinais–NPPM, Universidade Federal do Piauí –UFPI, Teresina, PI, Brazil, **3** Pulmonary and Cardiovascular Pharmacology, Department of Biomedicine, Aarhus University, Aarhus, Denmark, **4** Laboratório de Espectrometria de Massa, EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, Brazil, **5** Laboratório de Toxinologia, Instituto de Ciências Biológicas–ICB, Universidade de Brasília–UnB, Brasília, DF, Brazil, **6** Departamento de Bioquímica e Imunologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto–FMRP, Universidade de São Paulo–USP, Ribeirão Preto, SP, Brazil, **7** Centro de Análises Proteômicas e Bioquímicas–CAPB, Universidade Católica de Brasília–UCB, Brasília, DF, Brazil, **8** Universidade de Ribeirão Preto–UNAERP, Curso de Medicina, Avenida Costábile Romano 2201, Ribeirão Preto, SP, Brazil, **9** Departamento de Física e Química, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto–FCFRP, Universidade de São Paulo–USP, Ribeirão Preto, SP, Brazil

* jrsaleite@gmail.com

Abstract

Proline-rich oligopeptides (PROs) are a large family which comprises the bradykinin-potentiating peptides (BPPs). They inhibit the activity of the angiotensin I-converting enzyme (ACE) and have a typical pyroglutamyl (Pyr)/proline-rich structure at the N- and C-terminus, respectively. Furthermore, PROs decrease blood pressure in animals. In the present study, the isolation and biological characterization of a novel vasoactive BPP isolated from the skin secretion of the frog *Brachycephalus ephippium* is described. This new PRO, termed BPP-Brachy, has the primary structure WPPPKVSP and the amidated form termed BPP-BrachyNH₂ inhibits efficiently ACE in rat serum. *In silico* molecular modeling and docking studies suggest that BPP-BrachyNH₂ is capable of forming a hydrogen bond network as well as multiple van der Waals interactions with the rat ACE, which blocks the access of the substrate to the C-domain active site. Moreover, in rat thoracic aorta BPP-BrachyNH₂ induces potent endothelium-dependent vasodilatation with similar magnitude as captopril. In DAF-FM DA-loaded aortic cross sections examined by confocal microscopy, BPP-BrachyNH₂ was found to increase the release of nitric oxide (NO). Moreover, BPP-BrachyNH₂ was devoid of toxicity in endothelial and smooth muscle cell cultures. In conclusion, the peptide BPP-BrachyNH₂ has a novel sequence being the first BPP isolated from the skin secretion of the Brachycephalidae family. This opens for exploring amphibians as a source of new biomolecules. The BPP-BrachyNH₂ is devoid of cytotoxicity and elicits

acknowledges the CDCH-UCV and the Aarhus University for their support. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

endothelium-dependent vasodilatation mediated by NO. These findings open for the possibility of potential application of these peptides in the treatment of endothelial dysfunction and cardiovascular diseases.

Introduction

The Brachycephalidae family is composed of 54 frog species, divided into two genera (*Brachycephalus* Fitzinger, 1826 and *Ischnocnema* Reinhardt and Lütken, 1862). Frogs of the Brachycephalidae family have been found in Southern and Central Brazil and adjacent Northern Argentina, and they are probably also present in the adjacent part of Paraguay (American Museum of Natural History. <http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/Amphibia/Anura/Brachycephalidae> - Retrieved on 07 Apr 2014). Among this family, *Brachycephalus ephippium* Spix, 1824 (Fig 1A) is a diurnal small frog (18 mm SVL [snout-vent length]) and presents an attractive yellow warning coloration [1]. Modeling of habitats of the *ephippium* cluster had been proposed for species closely related to *B. ephippium*, being the high elevation areas in the Serra do Mar, Brazil, one of the most suitable areas found [2]. Pires et al. have reported the identification of tetrodotoxin (TTX) and several analogues in the skin secretion of *B. ephippium* and of two other species from *Brachycephalus* genus [3,4]. Interestingly, a TTX-analogue called 11-oxotetrodotoxin, has been reported to be four to five-fold more toxic than TTX [5].

The bioactive peptides usually found in the skin secretion of several amphibians are often reported as an important defense strategy against predators. Among them, the proline-rich oligopeptides (PROs) are a large family, which include the bradykinin-potentiating peptides (BPPs), known as inhibitors of angiotensin I-converting enzyme (ACE, EC 3.4.15.1). Thus, in endothelial cells they inhibit the zinc metallopeptidase, which is able to convert inactive angiotensin I to the potent vasoconstrictor angiotensin II and degrades bradykinin (BK) into either inactive BK (1–7) or BK (1–5) [6,7].

The *Bj*-BPP-5a was the first BPP for which the amino acid sequence was described. *Bj*-BPP-5a is present in hydroalcoholic extracts of the snake venom *Bothrops jararaca* [8,9]. In contrast to oral administration, parenteral administration showed benefits of *Bj*-BPP-9a for the treatment of human hypertension [10]. Based on these observations, ACE inhibition was considered a pivotal target for treatment of hypertension, and together with a model of somatic ACE (sACE), a metallopeptidase with a zinc-binding carboxyl group at the catalytic center, led to design of captopril. Captopril was the first effective antihypertensive drug designed to bind and inhibit the active sites of ACE, and represented a breakthrough in the treatment of hypertension [11,12].

Interestingly, ACE inhibition is only one possible mechanism whereby animal toxins and BPPs may have a vasodilatory and antihypertensive effect. The synthetic peptides *Bj*-BPP-7a and -10c were suggested to have an ACE-independent antihypertensive effect [13], and the activation of the argininosuccinate synthetase enzyme (AsS) was proposed as a target for *Bj*-BPP-10c followed by increased L-arginine levels and formation of NO [14]. For *Bj*-BPP-5a, the increment of NO production depends on M₁ muscarinic receptor and B₂ bradykinin receptor activation [15], which supports the NO-dependent anti-hypertensive effect observed for this peptide [16]. For *Bj*-BPP-13a, the increase of NO production have been related to the M₃ muscarinic receptors activation [17]. Thus, apart from ACE inhibition, animal toxins and BPPs have been reported to activate other enzymes and receptors which could be involved in the

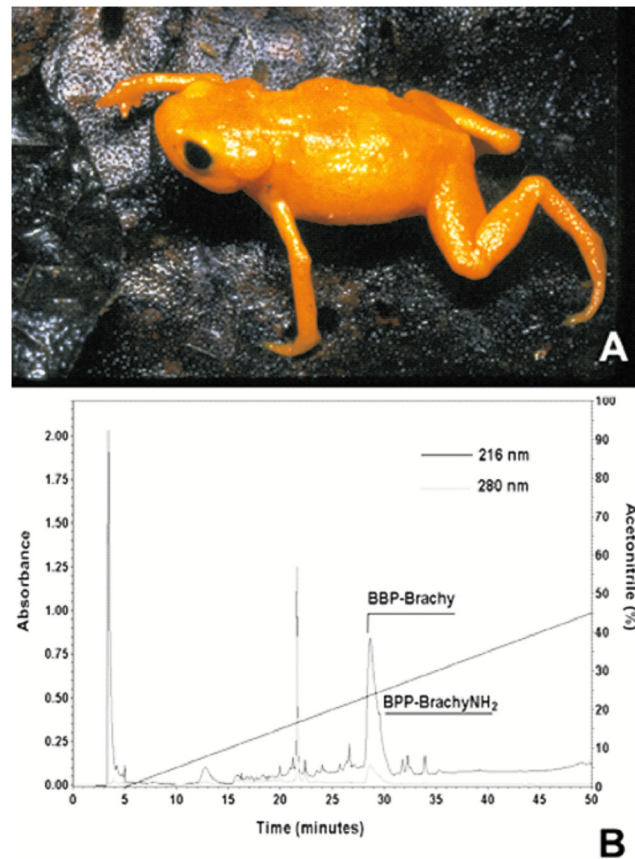


Fig 1. (A) Adult male of *Brachycephalus ephippium* (Spix, 1824) (Photo: Pombal Jr., J.P.). **(B)** Fractionation of peptides from crude skin secretion of *B. ephippium*. Sample containing 3.0 mg of lyophilized skin secretion was dissolved in 150 μ L of 0.1% trifluoroacetic acid and loaded onto a Vydac C₁₈ column; chromatography was carried out with a linear gradient of acetonitrile concentration on water from 0 to 100% in 0.1% trifluoroacetic acid, at flow rate of 1.0 mL/min for 60 min. Peptides in the effluent of the column were monitored by absorbance measurements at the indicated wavelengths.

doi:10.1371/journal.pone.0145071.g001

vasodilatory effect of BPPs, and lead to discovery of new targets with potential for therapeutic applications [18,19].

In the present study, we investigated the structure and vasodilatory properties of BPP-BrachyNH₂ (WPPPKVSP), a novel proline-rich oligopeptide (PRO) isolated from the skin secretion of the pumpkin toadlet frog, *Brachycephalus ephippium*.

Material and Methods

Ethics Statement

The collection of frogs was authorized by the *Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis*, IBAMA-Brazil, under license number 02010.003041/05-87. After collection of the cutaneous secretion, the frogs were euthanized by 20% carbon dioxide, following the Resolution no. 1000/2012 from the Federal Council of Veterinary Medicine, Brazil. The death was confirmed by the absence of response to mechanical stimulus on the hind paws. The approval by an ethics committee for this purpose is not required in Brazil, but only the permission to collect the frogs, in concordance to the environmental legislation. Afterwards, the frogs were incorporated in the Brazilian Zoological collection.

Rats were handled and euthanized in accordance with Resolution no. 1000 (2012) of the Brazilian Federal Council of Veterinary Medicine, in order to minimize suffering. All procedures were approved by the local Ethics Committee for Animal Experimentation (*Universidade Federal do Piauí*, Brazil; permission number: 008/2012).

Cutaneous secretion of frogs and purification of the peptides

Adult specimens of *B. ephippium* ($n = 23$) (Fig 1A) were collected in Mogi-Mirim, a region of the Brazilian Atlantic forest in São Paulo State. Cutaneous secretions from *B. ephippium* were obtained by a brief electric stimulation of the skin glands. The hydrophilic secretive fractions were injected into an analytical Vydac reversed-phase column (150 mm \times 4.6 mm, C₁₈, 5 μ m, 218TP104) in a High Performance Liquid Chromatography (HPLC) analytical system (Shimadzu Co., Kyoto, Japan). The purification was performed at room temperature and under 0 to 100% gradient of acetonitrile (ACN) in 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) for 60 min with UV detection at 216 and 280 nm [20].

Mass spectrometry analysis and *De novo* sequencing

The molecular masses and homogeneity of BPPs (BPP-Brachy and BPP-Brachy-NH₂) were determined by UltraFlex III MALDI-TOF/TOF (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA) in an α -cyano-4-hydroxycinnamic acid matrix, similar to Machado and colleagues, but with modifications [21]. The mass spectrometer was operated in reflector positive mode for MS or LIFT™ and positive mode for MS/MS experiments by FlexControl™ software. Instrument calibration was performed externally with [M+H]⁺ ions of angiotensin I, angiotensin II, substance P, bombesin, and adrenocorticotrophic hormones (fragments 1–17 and 18–39). Accumulated data from 200 consecutive laser shots were acquired for each spectrum. Samples were analyzed by both MALDI-TOF and LIFT™ MALDI-TOF/TOF MS/MS from the same target. The ion spectra were manually interpreted by *De novo* sequencing. For determination of isomeric and isobaric residues, the high-energy fragmentation was used [22]. A Search for peptide sequence alignments and similarities were performed by using the FASTA 3 program on the ExpASY molecular server (<http://www.expasy.ch/>).

Peptide synthesis

The synthesis of the octapeptide BPP-BrachyNH₂ was carried out manually, with a standard Fmoc (N-(9-fluorenyl)methoxycarbonyl) chemistry [23] starting from a Rink-amide-MBHA resin (0.59 mmol.g⁻¹, Peptides International, Louisville, KY, USA). Fmoc-protected amino acids (Peptides International, Louisville, KY, USA) were used in four-fold molar excess relative to the nominal scale of synthesis (1.2 mmol). Couplings were performed with 1,3-diisopropylcarbodiimide/ethyl 2-cyano-2-(hydroxyimino) acetate (DIC/Oxyma) in N,N-dimethylformamide (DMF) for 2–3 h. Side chain protected groups were tert-butyl for Ser, and Boc for Lys and Trp. Deprotected groups were conducted by 4-methylpiperidine/DMF (1:4, v:v) for 20–30 min. Removal of side chain protection and cleavage of the peptide from the resin were performed by the use of 10.0 mL TFA:water:tioanisole:ethanodithiol:triisopropylsilane (86:5.0:5.0:2.5:1.0, v:v:v:v:v) with addition of 1 g phenol for 90 min at room temperature under shaking. After solvent evaporation under nitrogen, the peptide was precipitated by addition of cold diisopropyl ether, collected by filtration and washed four times with cold diisopropyl ether. Extraction was performed with 200 mL H₂O:ACN (1:1, v:v) and crude peptide was lyophilized. Purification was performed using a Shimadzu HPLC system fitted with a Vydac C₁₈ column (150 \times 4.6 mm) developed with a linear ACN gradient (12–35%; 25 min) in 0.05% TFA. Purity and identity were verified by the use of MALDI-TOF MS and MS/MS. Stock peptide solutions were

prepared in water and their concentrations were determined according to tryptophan molar absorptivity ($5550 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) at 280 nm.

ACE inhibition assay

The inhibitory effects of BPP-BrachyNH₂ and captopril on the ACE-catalyzed hydrolysis of hippuryl-His-Leu-OH were estimated in presence of increasing concentrations of inhibitors (BPP-BrachyNH₂ from 0.05 to 50 μM ; captopril from 3×10^{-5} to 2 μM). Fresh Wistar rat serum was used as source of ACE in these reactions, and the product H-His-Leu-OH was measured fluorimetrically following derivatization with *o*-phthalaldehyde, as described [24,25]. Reactions were carried out, in duplicate, at 37°C for 30 min in 200 μL of 20 mM Tris-HCl buffer, pH 8.1, 0.3 M NaCl, 1.0 mM H-hippuryl-His-Leu-OH, 20 μL of enzyme-containing serum and different inhibitor concentrations as described above. The IC₅₀ values, corresponding to the concentration of the inhibitor that results in 50% of maximal activity, were derived from fractional activity data plotted as a function of each inhibitor.

Molecular modeling and *in silico* docking studies

The three-dimensional models for ACE from *Rattus norvegicus* (GenBank: AAG35596.1) and BPP-Brachy were constructed based on the structures of *Homo sapiens* ACE (UniProtKB ID: P12821; PDB code: 2YDM) and CDK2 (UniProtKB ID: P24941; PDB code: 3QTS), respectively. The 2YDM presents the structure of angiotensin I-converting enzyme from *Homo sapiens* ACE, resolved by X-ray diffraction with a resolution of 2.44 Å [26]. This structure was used as a template for the construction of a model for *Rattus norvegicus* ACE. The 3QTS presents the structure of a cyclin-dependent kinase 2 from *Homo sapiens* [27]. This structure was used as a template for the construction of BPP-Brachy.

Two hundred theoretical tridimensional peptide structures were constructed using Modeller v.9.12 for each peptide. The ACE and BPP-Brachy final models, i.e., geometry, stereochemistry, and energy distributions in the models, were evaluated using PROSA II to analyze packing and solvent exposure characteristics and PROCHECK for additional analysis of stereochemical quality. In addition, RMSD was considered by overlap of C α traces and backbones onto the template structure by the use of the program 3DSS. The protein and peptide structures were visualized and analyzed on Delano Scientific's PyMol (<http://pymol.sourceforge.net/>).

All docking calculations were performed using AUTODOCK 4.2 program. Docking simulation of BPP-Brachy was performed toward ACE C- and N-domain. All polar hydrogen atoms were added using the AutoDockTool. Grid maps were calculated with $30 \times 30 \times 30$ Å for both ACE domains and 1.0 Å spacing centered in the active sites of the enzyme characterized as C- and N-domain, allowing interaction with all side chains exposed [28]. A Lamarckian genetic algorithm was used as the search method to find the best peptide-enzyme complex. Ten docking runs were done generating ninety models, where the maximum freedom to side chains was unlocked to the peptide. The generated structures were ranked in two steps: firstly a cluster with the best models with lowest energy, and secondly with a root-mean-square deviation (RMSD), for all atoms docked with the ACE C- or N-domain, showing tolerance of 4 Å, as recommended for blind docking [29]. The program PyMol (<http://pymol.sourceforge.net/>) was used to characterize peptide-enzyme interactions.

Effect on vascular reactivity of rat thoracic aorta

Male Wistar rats (250 ± 30 g) were maintained under controlled temperature (22 ± 1 °C), 12/12 h light/dark cycle, and had free access to water and food (Purina-Nestlé, São Paulo, SP, Brazil). Rat thoracic aortic rings were prepared according to Silva-Filho and colleagues [30].

Briefly, aortic rings (3–4 mm) were maintained in Krebs solution (in mM: NaCl, 118.0; KCl, 4.6; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2.5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5.7; NaHCO_3 , 25.0; $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1.1; and D-glucose, 11.0) under isometric tension of 1.0 g, 37°C and bubbled with 5% CO_2 in 95% O_2 . The endothelium was considered as functionally intact if acetylcholine (10^{-6} M) induced relaxations larger than 70% in phenylephrine (PE 3×10^{-7} M)-contracted preparations. After washout, the preparations were contracted with PE (PE 3×10^{-7} M) and concentration-response curves for BPP-BrachyNH₂ and captopril (10^{-9} – 3×10^{-5} M) were constructed. Time control contractions induced by PE, but without adding drug were obtained in parallel with other vascular segments.

NO measurement on aortic rings by confocal microscopy

The fluorescence measurements of nitric oxide (NO) were conducted in freshly isolated aortic rings according to the method by Capellini and colleagues [31]. After the adherence to a slide, the aortic rings were loaded with 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetate (DAF-FM DA) and maintained under 5% CO_2 (20 min, 37°C). Afterwards, the preparations were excited at 488 nm and fluorescence emitted was measured at 515 nm. The stock solution of the DAF-FM DA was prepared at 5 mM in dimethyl sulfoxide (DMSO), and the work solution (5 μM) was prepared by diluting the stock solution into Hanks solution (in mM: CaCl_2 , 1.6; MgSO_4 , 1.0; NaCl, 145.0; KCl, 5.0; NaH_2PO_4 , 0.5; dextrose, 10.0; and HEPES, 10.0; pH 7.4). Fluorescence intensity was measured by use of a confocal laser microscope (Leica TSC SP5, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

The preparations were stimulated during 100 seconds with Hanks solution, and thereafter they were stimulated with BPP-BrachyNH₂ (10^{-7} or 10^{-5} M). The regions of interest (ROI) were selected and the intracellular fluorescence intensity was measured before and after the addition of BPP-BrachyNH₂. The average fluorescence intensity was calculated for each animal (n). From these data, the initial fluorescence value at $t = 100\text{s}$ was taken as the basal fluorescence ($F_0 = 100\%$), and the final fluorescence intensity value (F) was obtained, before and at $t = 200\text{s}$ after BPP-BrachyNH₂ addition.

Cytotoxicity study

Cell culture. Human umbilical vascular endothelial cells (HUVECs) (ATCC, Manassas, VA, USA) were grown in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) containing 40% of fetal bovine serum (FBS). Rat aortic vascular smooth muscle cells (VSMCs) were obtained from isolated rat aorta rings, that were longitudinally opened and its intimae layer exposed, in a six-well culture plate with culture medium under CO_2 for 30 min. Then, 10 μL of culture medium containing streptomycin 10000 UI and 0.1% fungizone were added, and the tissue was submitted to cell migration and adhesion for two days.

MTT Assay. The cell viability after exposure to BPP-BrachyNH₂ was measured, by 2-(3,5-diphenyltetrazol-2-ium-2-yl)-4,5-dimethyl-1,3-thiazole bromide (MTT) assay on HUVECs and VSMCs as described by Paulo and colleagues [32], with some modifications. Cells were plated into 96-well plates at 2×10^4 cells/well, then a volume of 200 μL of culture medium was added, and the cell culture was incubated at 37°C under 5% CO_2 for 24 hours. The culture medium was exchanged, and the cells were incubated with BPP-BrachyNH₂ (10^{-12} , 3×10^{-9} , 10^{-7} and 10^{-5} M) for 24 hours. Afterwards, the medium was removed and replaced by phosphate buffered saline (PBS), 20 μL of MTT solution (5 mg mL^{-1}) was added to 180 μL DMEM for each well. After incubation for 4 hours, the medium was replaced with 200 μL of DMSO, in order to dissolve the formazan crystals. The optical density was measured

at 570 nm. The absorbances obtained for untreated cells and 1.0% Triton X-100-treated cells were taken as controls of cell viability and cytotoxicity, respectively.

Statistical analyses

The IC_{50} values for the ACE activity and the pD_2 values for the vasodilator curves were obtained by non-linear regression. All values were expressed as means \pm SEM, and significances for compared values were analyzed by Student's "t" test or One-way ANOVA followed by Bonferroni's post-test. All procedures were performed using Graph Pad Prism 5.02™ (Graph Pad Software, Inc., San Diego, CA, USA).

Results

Identification of BPP-Brachy and BPP-BrachyNH₂

The lyophilized crude skin secretion from *B. ephippium* (Fig 1A) was fractionated by analytical RP-HPLC, as shown in Fig 1B. Several peaks along the profile were detected and the arrows indicate the novel BPP and the amidated form thereof. This was further elaborated and confirmed by MS and MS/MS experiments. The primary structures WPPPKVSP (BPP-Brachy) and the amidated form thereof (BPP-BrachyNH₂) were obtained after *De novo* sequencing by interpreting the MS/MS spectra (Fig 2). The compound with retention time of 22.5 minutes corresponds to the carotenoid β -carotene, which may be related to aposematic coloration of this species. The body color of lower vertebrates is determined by the types of chromatophores in the skin, and melanophores appear first in the dorsal integument of the larvae stage during the initial development [33].

In vitro Evaluation of inhibitory ACE activity

In order to test if BPP-BrachyNH₂ was active in a mammalian system, the effect of the peptide was assessed on ACE activity in rat serum (Fig 3). Although BPP-BrachyNH₂ (IC_{50} = 8.2 μ M) had lower efficacy than captopril (IC_{50} = 21 nM) as ACE inhibitor, the fact that it functions as an ACE inhibitor and its distinct primary structure as compared with classical BPPs, prompted structure/function research with synthetic analogs.

In silico Evaluation of inhibitory ACE activity

The three-dimensional models of BPP-Brachy and ACE showed 50 and 83% of identity with 3qts and 2ydm, respectively. The cyclin-dependent kinase 2 from *Homo sapiens* was used as a template for the BPP-Brachy theoretical model, due to its high sequence identity (Fig 4A). The model for ACE was generated from the angiotensin I-converting enzyme of *Homo sapiens*, a structure that was resolved by X-ray diffraction with a resolution of 2.44 Å (Fig 4B). Validation of the 3D models by Ramachandran plot showed that the models presented a 100% of amino acid residues in allowed regions. The root mean square deviation (RMSD) values for both BPP-Brachy and ACE models were 2.3 and 0.51 Å, respectively.

Molecular dockings were performed between BPP-Brachy and the two catalytic sites located in a region denominated N- and C-domain (Fig 4C). The interactions observed for BPP-Brachy and the C-domain presented energy of -9.1 kcal.mol⁻¹. The complex BPP-Brachy/C-domain was stabilized among carbonyls of Pro³, Pro⁴ and Lys⁵ and hydrogens of nitrogen atoms from the imidazole rings of His³⁵⁵ and His³⁵⁹, forming a net of hydrogen bonds with distances of 3.7, 2.8, and 3.2 Å, respectively. BPP-Brachy also formed two possible hydrophobic contacts between the carbons of Pro⁸ and Lys⁵ (CE and CD) and the carbons (CG and CG) of the residues Pro³⁷⁹ and Val⁴⁹⁰, with distances of 3.5 and 3.0 Å, respectively. Hydrogen bonds were also

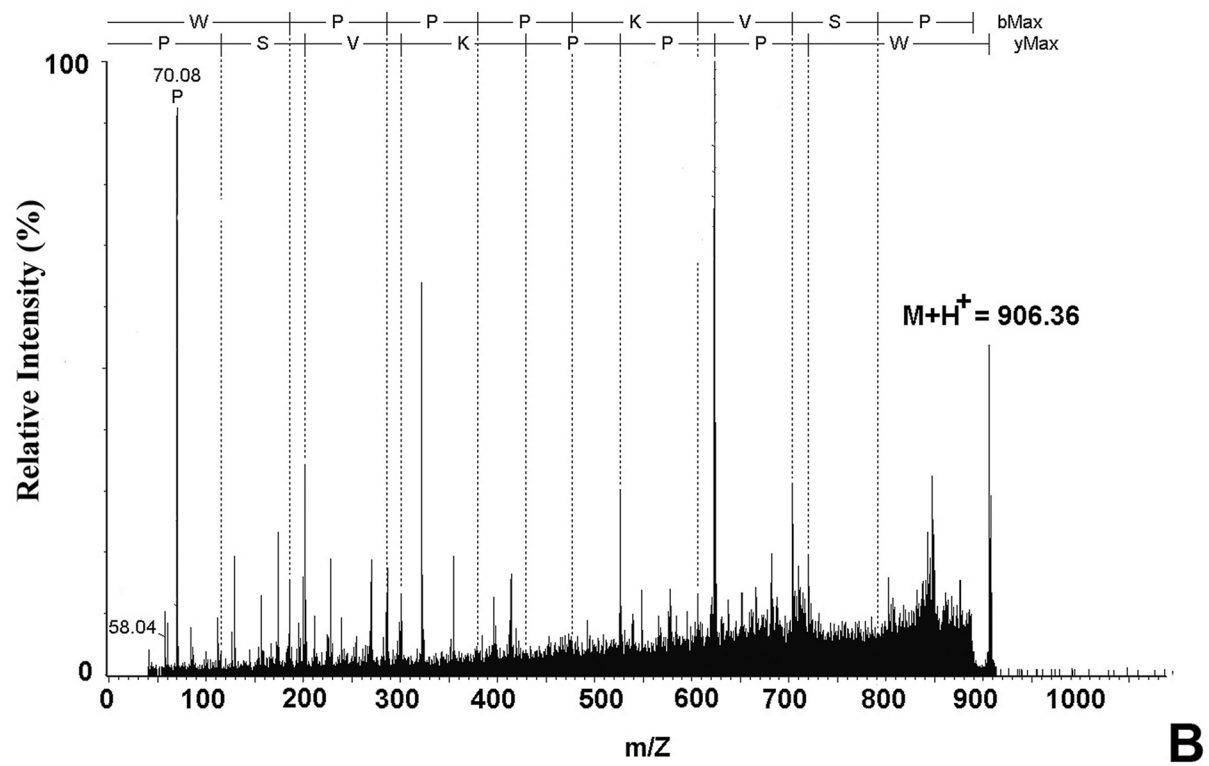
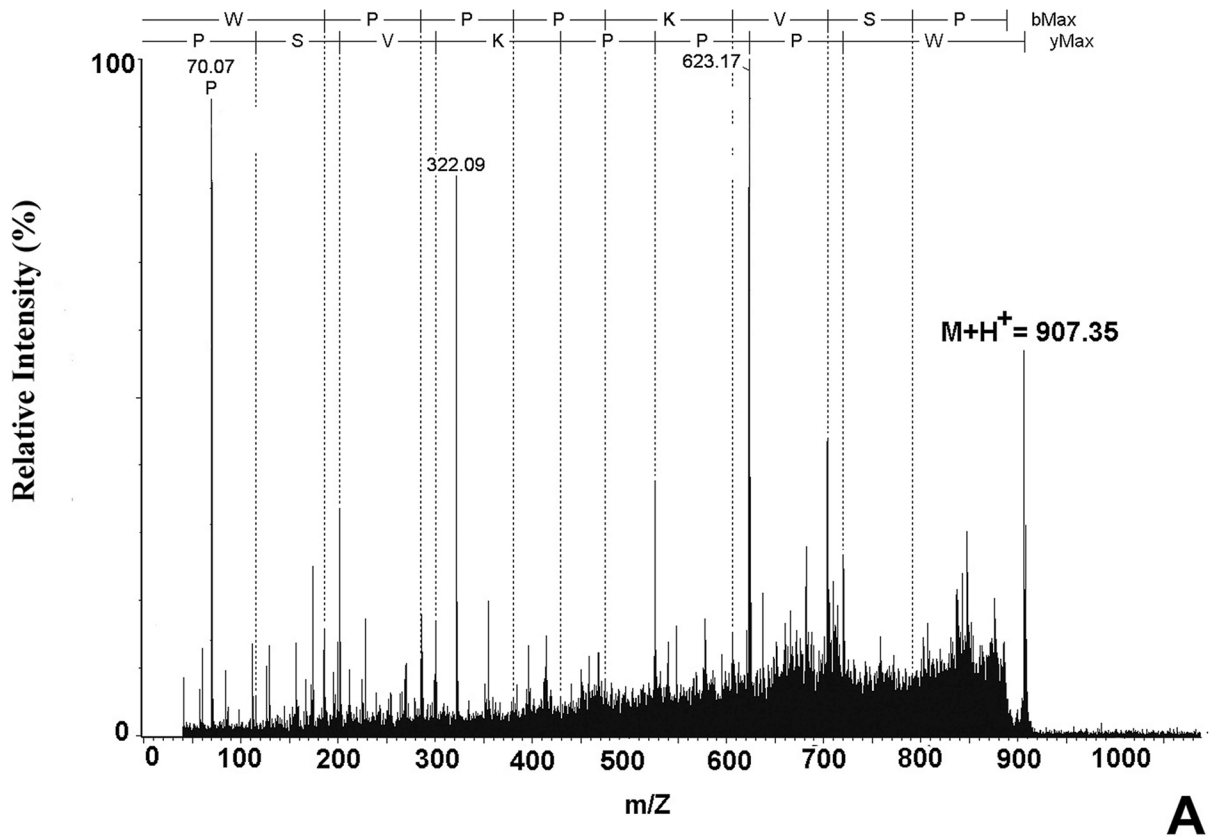


Fig 2. Sequencing of the proline-rich peptides (PROs) from the skin secretion of *B. ephippium*. (A) Mass spectra of BPP-Brachy, $[M+H]^+ = 907.37$ and (B) BPP-BrachyNH₂, $[M+H]^+ = 906.36$ acquired in an UltraFlex III MALDI-TOF/TOF operating under LIFT™ mode for MS/MS experiments. The observed fragments allowed complete assignment of the major y and b ion series. The peptide sequence using one-letter code following the y and b series orientation is shown on the top part of the spectra.

doi:10.1371/journal.pone.0145071.g002

observed between the hydrogen of nitrogen of Ser⁷ from BPP-Brachy and oxygen backbone atom of Glu³⁸³ from ACE, with a distance of 3.2 Å, as well as between the hydrogen of oxygen of Pro⁸ from BPP-Brachy and the nitrogen backbone atom of Gly³⁷⁶ from ACE, with a distance of 3.1 Å (Fig 4D). The histidine residues seem to be responsible for interactions between the substrate and the catalytic triad His³⁸³, His³⁸⁷ and Glu⁴¹¹, indicating a probable inhibition of the catalytic activity in a canonical fashion style, disallowing the generation of hypertensive peptide angiotensin II, by inhibiting the activity of angiotensin I-converting enzyme (ACE) (Fig 4E) [28,34]. In addition, BPP-Brachy was also docked to a second catalytic site in order to better understand the mechanism of inhibition. Nevertheless, the energy observed for the interaction between BBP-Brachy and N-terminal domain was -6.1 kcal.mol⁻¹ (data not shown), lower than the interaction energy observed at the C-domain. Another critical point was the absence of interaction with important amino acid residues involved in catalytic activity of N-domain of human ACE (Tyr³⁶⁹ and Arg³⁸⁹). These *in silico* evidence reinforce that the ACE-inhibiting property of BPP-Brachy can be ascribed to a C-domain interaction rather than the N-domain, demonstrating lower affinity in the catalytic region.

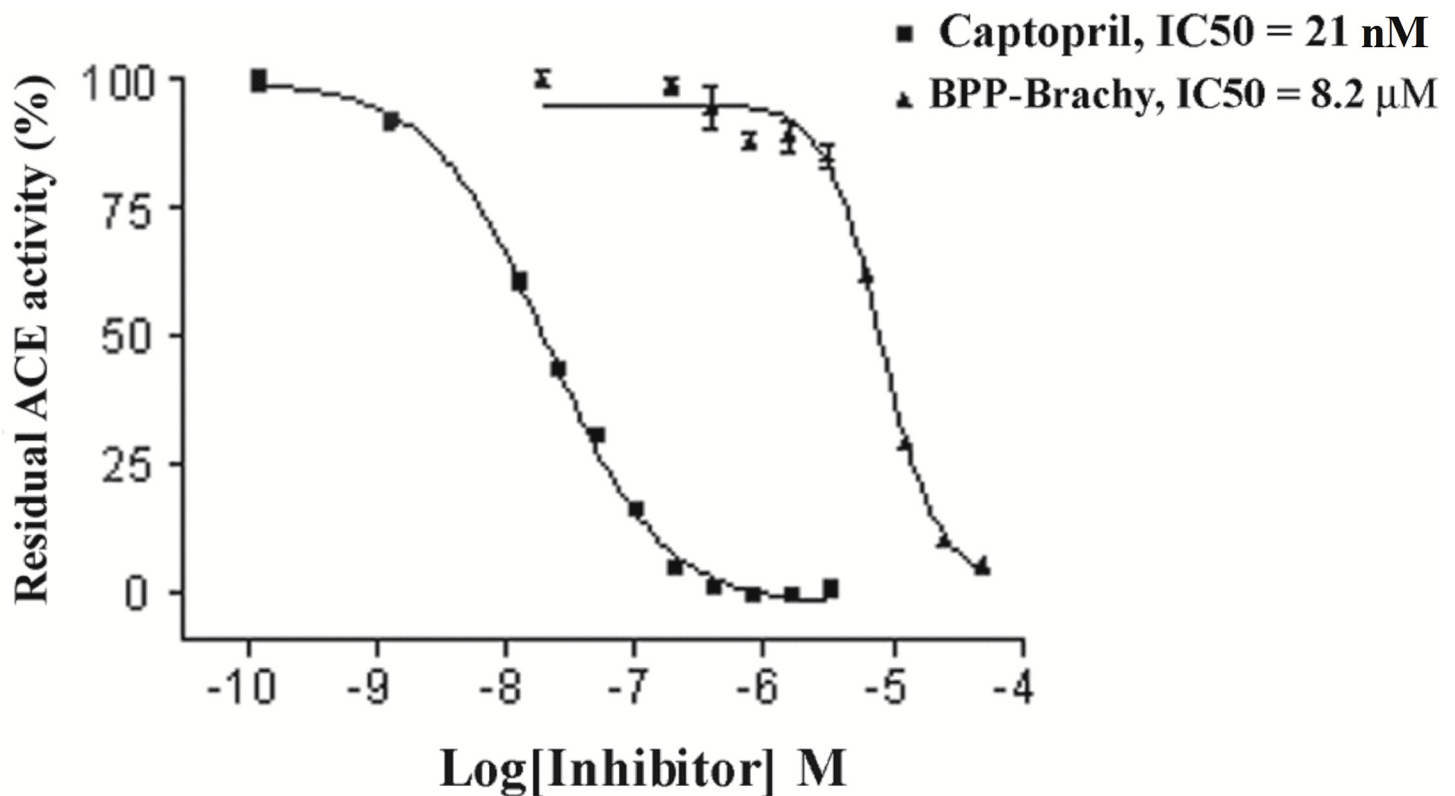


Fig 3. The inhibitory effect of BPP-BrachyNH₂ and captopril on rat serum ACE activity. Residual enzymatic activities are plotted against the corresponding inhibitor concentrations. IC₅₀ values were calculated from nonlinear regression analysis of obtained data using GraphPad 5.0 software (GraphPad Prism, San Diego, CA).

doi:10.1371/journal.pone.0145071.g003

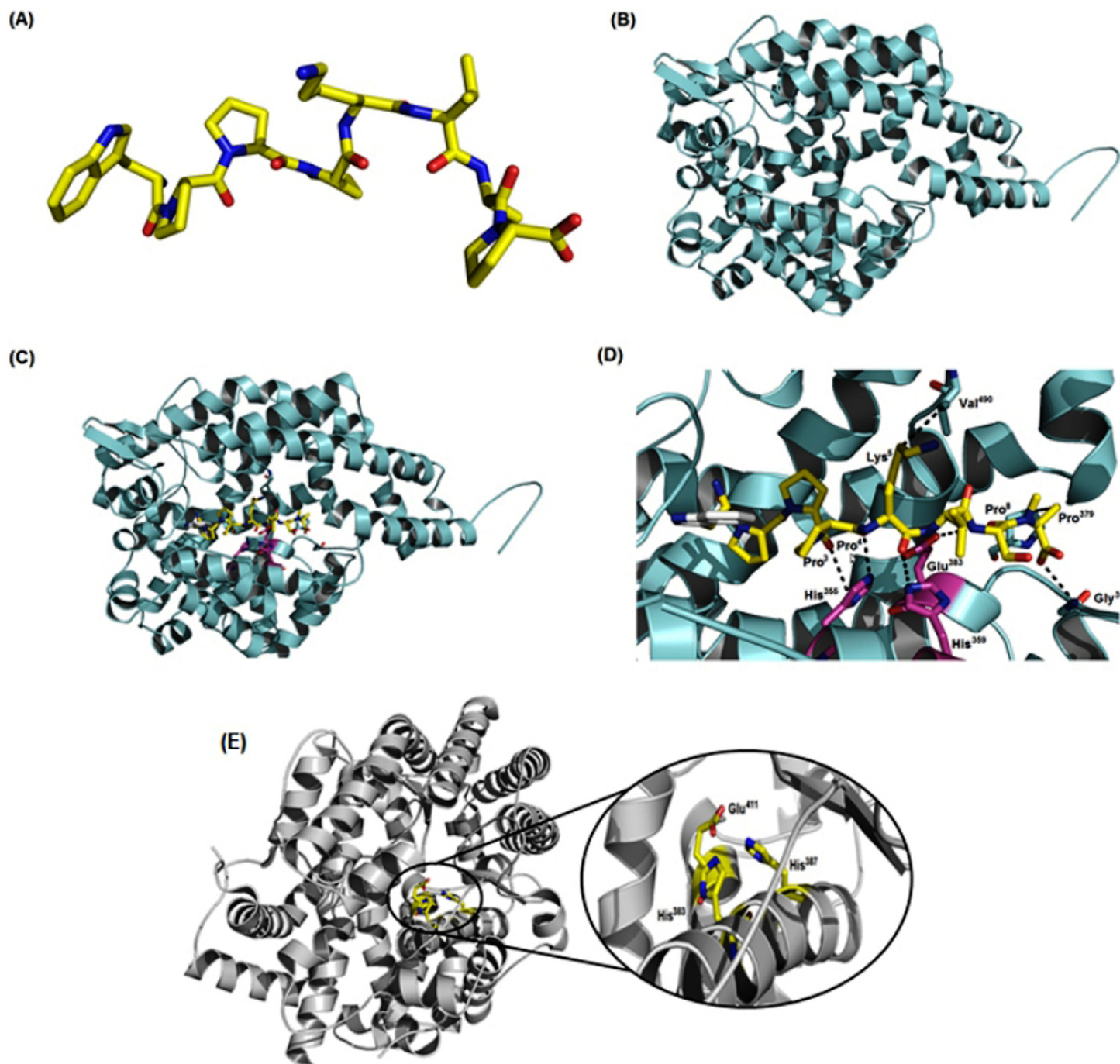


Fig 4. Molecular modeling of BPP-BrachyNH₂ and human ACE and *in silico* docking studies. (A) Theoretical model of BPP-BrachyNH₂ showing the structure with lower energy system; (B) theoretical model of ACE showing the structure with lower energy system; (C) Docking between BPP-BrachyNH₂/ACE; (D) binary complex relationship with zoom in and detailed interactions; and (E) interactions between the substrate and the catalytic triad His³⁸³, His³⁸⁷ and Glu⁴¹¹, indicating a probable block of the catalytic activity.

doi:10.1371/journal.pone.0145071.g004

Vasodilator effect in rat aortic rings

BPP-BrachyNH₂ induced pronounced concentration-dependent relaxation in preparations with endothelium ($E_{max} = 40.3 \pm 3.5\%$), while the effect was minimal in preparations without

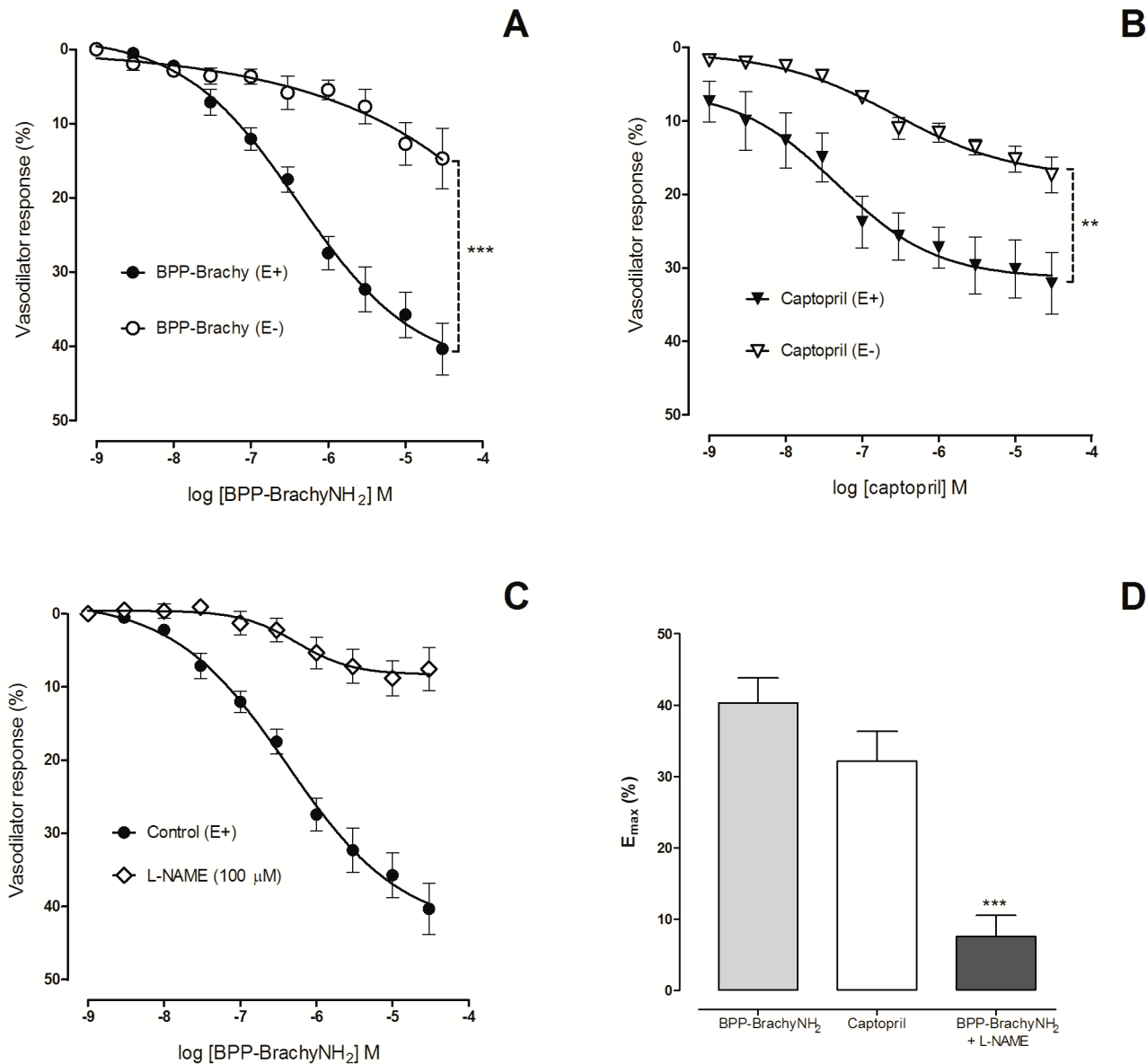


Fig 5. Vasodilator effect of BPP-BrachyNH₂ and captopril (10^{-9} – 3×10^{-5} M) on rat thoracic aorta. Aortic rings were pre-contracted with phenylephrine (3×10^{-7} M) and then cumulatively incubated with BPP-BrachyNH₂ (A) or captopril (B). Effect of L-NAME (100 μM) on BPP-BrachyNH₂-induced vasodilator effect (C). Respective comparisons among E_{max} (D) values were plotted. The results were expressed as means ± SEM (n = 6). Non-paired Student's t test. **p < 0.01 and ***p < 0.001 versus endothelium-intact (E+) preparations.

doi:10.1371/journal.pone.0145071.g005

endothelium ($E_{max} = 14.7 \pm 4.1\%$) (Fig 5A). The reference drug captopril induced also endothelium-dependent vasodilatation with the same maximal relaxation ($E_{max} = 32.1 \pm 4.2\%$) as BPP-BrachyNH₂ (Fig 5B–5D). The aortic preparations were washed and stabilized during 30 min, and then a new PE-induced vasoconstriction was evoked. PE induced vasoconstriction with the same potency, indicating that the effect of BPP-BrachyNH₂ in aortic cross sections is reversible and non-lethal to vascular cells (data not shown).

The involvement of NO in BPP-BrachyNH₂-induced relaxation was evaluated by inhibition of endothelial NO synthase with L-NAME [35]. In the presence of L-NAME, BPP-BrachyNH₂

relaxation was abolished (Fig 5C), and the E_{\max} value was decreased 5.3-fold ($E_{\max} = 7.6 \pm 2.9\%$) (Fig 5D), suggesting the involvement of NO in BPP-BrachyNH₂-induced relaxation in rat thoracic aorta.

NO measurements by laser confocal microscopy

To directly measure whether BPP-BrachyNH₂ increase NO release from the endothelium, aortic segments were loaded with a NO-sensitive probe, DAF-FM DA. Incubation with BPP-BrachyNH₂ increased fluorescence with, respectively, $12.3 \pm 4.8\%$ and $13.2 \pm 2.4\%$ in response to 10^{-7} and 10^{-5} M of BPP-BrachyNH₂ (Fig 6). These results support that BPP-BrachyNH₂ increases NO and that NO mediates the endothelium-dependent relaxations of the peptide.

Cytotoxic evaluation in vascular cells

The MTT assay was performed in order to evaluate the cell viability of HUVECs and aortic vascular smooth muscle cells in the presence of BPP-BrachyNH₂. No cytotoxic effects were observed for the concentration range assayed (Fig 7), suggesting that vascular cell damage does not contribute to the vasodilatation and increases in NO induced by BPP-BrachyNH₂.

Discussion

The major finding of this study is that the peptide BPP-BrachyNH₂ has a novel sequence and is the first PRO isolated from the skin secretion of the Brachycephalidae family, which opens for exploring amphibians as a source of new biomolecules. The BPP-BrachyNH₂ is devoid of cytotoxicity and elicits endothelium-dependent vasodilatation mediated by NO. Interestingly, this study is the first peptidome characterized of a skin secretion in the Brachycephalidae family.

The presence of bradykinin (BK) and bradykinin-related peptides (BRPs) in the skin of amphibians has been related to the absence of the kallikrein-kinin system in these animals [36]. Therefore, the amphibian skin secretion of BK as well as BRPs potentiating the endogenous predator BK may lead to pronounced cardiovascular and gastrointestinal changes in the predator and function as a defense mechanism [37]. In the present study, the primary structures of WPPPKVSP (BPP-Brachy) and the amidated form thereof (BPP-BrachyNH₂) were identified. Besides, there was no evidence for the presence of BK or any BRP in the skin secretion of *B. ephippium* (Fig 1B). However, the physiological importance of BPP-BrachyNH₂ as a defense mechanism requires further investigation.

BK-potentiating activity was first described in hydroalcoholic extracts of *Bothrops jararaca* snake venom [8], and thereafter 25 BPPs have already been characterized [38]. The BPPs from *B. jararaca* commonly have a typical pyroglutamyl (Pyr) residue and proline-rich structure at the N- and C-terminus, respectively [39]. Nevertheless, the presence of the N-terminal pyroglutamyl residue has been demonstrated as a non-obligatory characteristic of BPP-similar peptides from different biological sources, but the presence of proline-rich residues mainly in the C-terminal region [17]. The BPP-BrachyNH₂ lacks N-terminal pyroglutamic acid residues, and possesses two proline residues at the C-terminal portion (Fig 2). Table 1 shows that BPP-BrachyNH₂ shares similarities with several other PROs from snakes, scorpions, spiders, and the frog *P. hypochondrialis*. The presence of tryptophan (W) followed by proline residues at N-terminal of the Lm-BPPs isolated from the scorpion *Lachesis muta*, is a common characteristic between these BPPs and BPP-BrachyNH₂ [7]. Interestingly, the proline-tryptophan complexes possess very stable interactions and play important structural and interaction roles with other protein/peptide complexes. They are responsible for a wide variety of biological interactions and activation of cell signaling pathways [40].

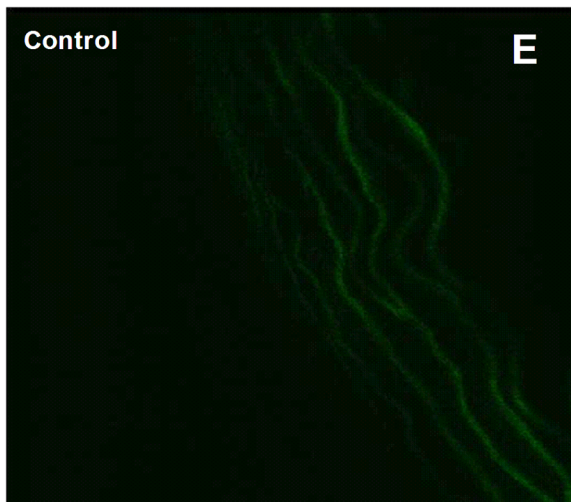
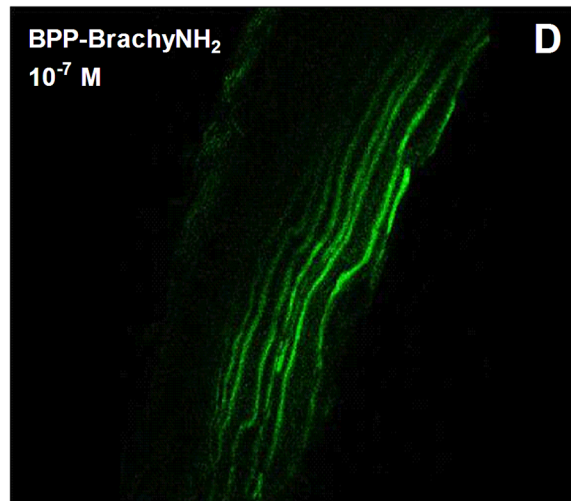
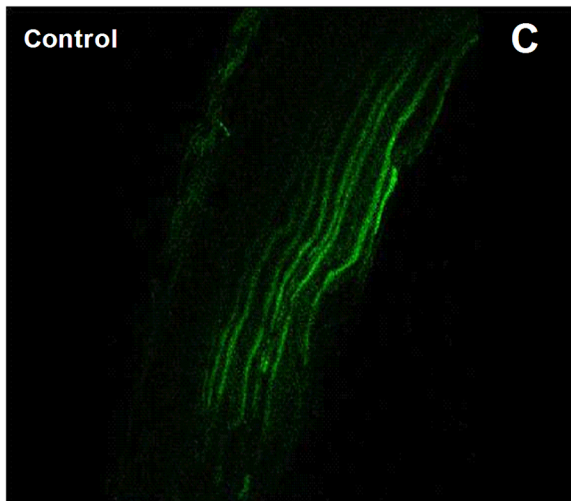
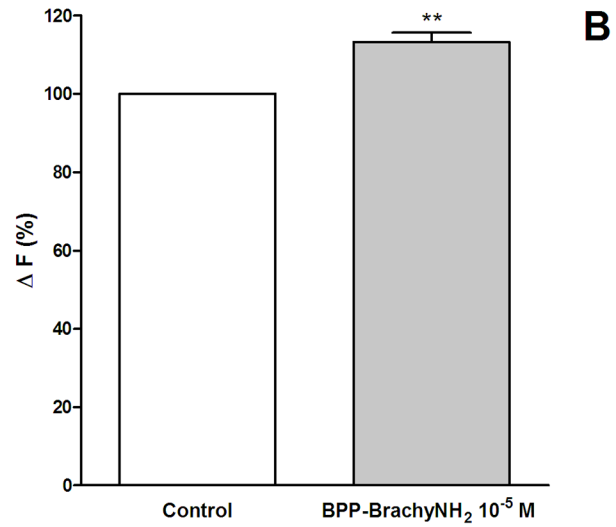
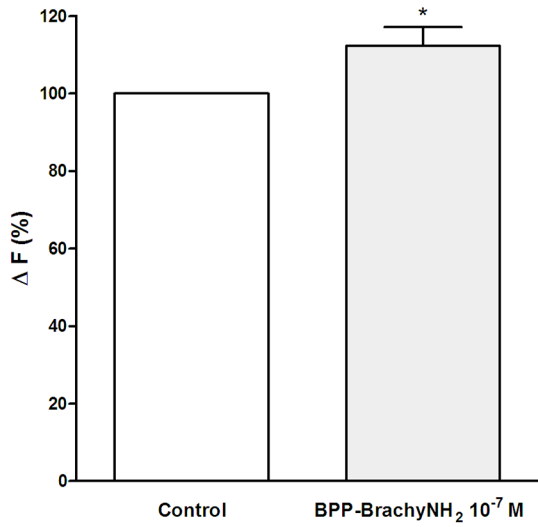


Fig 6. NO measurement after BPP-BrachyNH₂ addition on endothelium-intact rat aorta cross sections assessed by using a confocal scanning laser microscope. (A) Fluorescence emission intensity for BPP-BrachyNH₂ 10⁻⁷ M and (B) BPP-BrachyNH₂ 10⁻⁵ M. Representative confocal photomicrograph of aortic cross sections loaded with DAF-FM DA (5 μM) before and after addition of BPP-BrachyNH₂ 10⁻⁷ M (C-D) or 10⁻⁵ M (E-F). Results are reported as mean ± SEM (n = 4). Paired Student's t test, *p < 0.05 and **p < 0.01 versus control.

doi:10.1371/journal.pone.0145071.g006

Since the discovery of BPPs obtained from *B. jararaca* venom, they have been considered the first ACE inhibitors obtained from a natural source [8,9,41]. In animals other than snakes, inhibition of ACE activity has been found in venoms of the scorpions *Tityus serrulatus* [42] and *Buthus occitanus* [43], the spider *Scaptocosa raptorica* [44] and, more recently, in the skin secretion of *Phyllomedusa hypochondrialis*, the Brazilian tiger-legged monkey frog [37]. In this study, the ACE activity was determined by the fluorimetry measurement of His-Leu originated from hydrolysis of Hippuryl-His-Leu, a well recognized substrate of the C-domain of ACE [24]. BPP-BrachyNH₂ induced a concentration-dependent decrease of ACE activity, and the results suggest that BPP-BrachyNH₂ functionally acts as a BPP, as it was able to inhibit ACE activity (Fig 3). Therefore, the interactions between BPP-BrachyNH₂ and both N- and C-domain of ACE were investigated by molecular docking. The evaluation by docking studies of peptide-enzyme was carried out based on *in vitro* results, which demonstrated a better competitive inhibition profile towards C-domain rather than N-domain. The relations between peptide and enzyme were extremely coordinated and guided *in silico* via amino acid residue side chains (Fig 4). Thus, the evidence from the *in silico* studies reinforces the ACE-inhibiting property of BPP-BrachyNH₂ *in vitro*.

BPPs have been shown to cause vasodilatation in normotensive rats. The hypotensin TsHpt-I from the yellow scorpion *Tityus serrulatus* [45] and the *Bj*-BPP-5a from the *B. jararaca* venom induces both *in vitro* [16] and *in vivo* [15] vasodilatory effects. In this study, BPP-BrachyNH₂ induced concentration-dependent relaxations in rat aortic rings, with E_{max} values around 2.0-fold higher than previously reported for *Bj*-BPP-5a and TsHpt-I. Despite captopril was a more potent inhibitor of ACE, the vasodilatation induced by captopril and

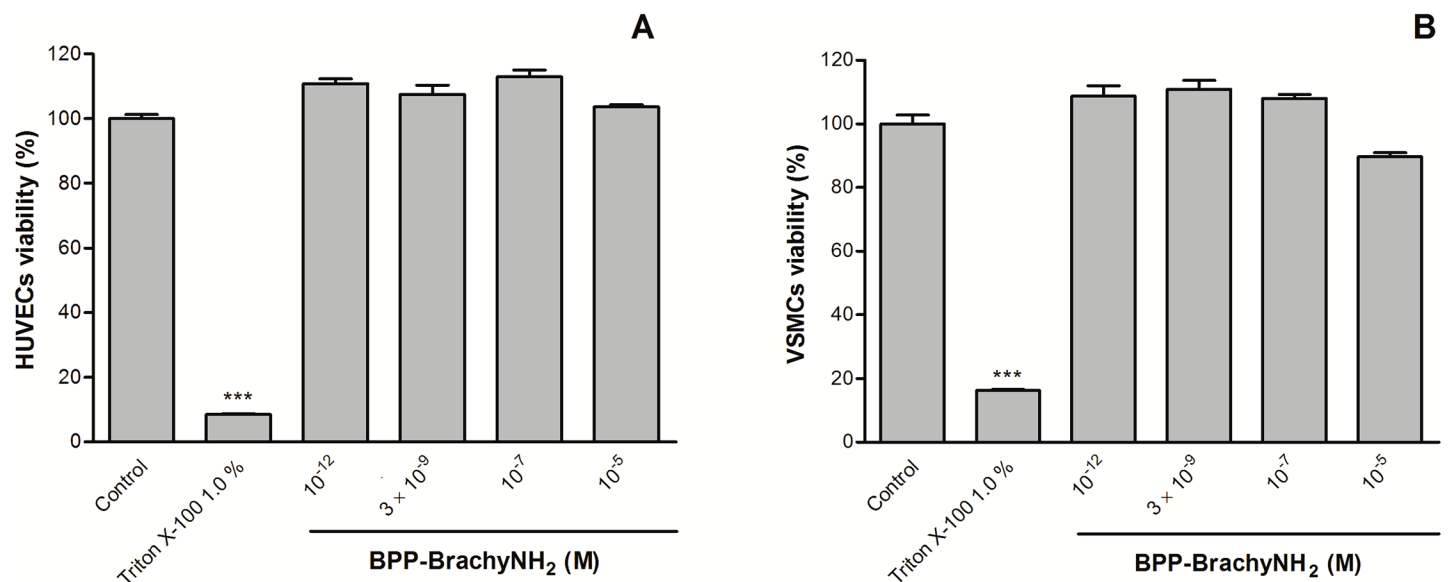


Fig 7. Effects of BPP-BrachyNH₂ on cell viability of HUVECs and VSMCs cells. HUVECs (A) or VSMCs (B) were incubated with different concentrations of BPP-BrachyNH₂ for 24 hours and then with MTT for 4 hours. Formazan crystals were dissolved in DMSO. The control group was treated with culture medium only. Data are mean ± SEM (n = 3). ***p < 0.001 versus control.

doi:10.1371/journal.pone.0145071.g007

Table 1. Proline-Rich Oligopeptides (PROs) from different biological sources.

Sequence	Name	Source	References
WPPPKVSP	BPP-Brachy	<i>Brachycephalus ephippium</i>	This work
WPPRPQIPP	Lm-BPP 1	<i>Lachesis muta</i>	[7]
<EKWDPPPVSPP	Potentiator E	<i>Agkistrodon halys blomhoffii</i>	[53]
<EFRPSYQIPP	Phypo Xa	<i>Phyllomedusa hypochondrialis</i>	[37]
<EKWAP	<i>Bj</i> -BPP-5a	<i>Bothrops jararaca</i>	[9]
<EWPRPQIPP	<i>Bj</i> -BPP-9a	<i>B. jararaca</i>	[9]
<ESWPGPNIPP	<i>Bj</i> -BPP-10a	<i>B. jararaca</i>	[9]
<ENWPRPQIPP	<i>Bj</i> -BPP-10b	<i>B. jararaca</i>	[39,41]
<ENWPHPQIPP	<i>Bj</i> -BPP-10c	<i>B. jararaca</i>	[9]
<EWPRPTPQIPP	<i>Bj</i> -BPP-11a	<i>B. jararaca</i>	[41]
<EGRAPGPIIPP	<i>Bj</i> -BPP 11b	<i>B. jararaca</i>	[39,54]
<EARPPHPPIIPP	<i>Bj</i> -BPP-11e	<i>B. jararaca</i>	[55]
<EWGRPPGPIIPP	<i>Bj</i> -BPP-12b	<i>B. jararaca</i>	[55]
<EGGWPRPGPEIIPP	<i>Bj</i> -BPP-13a	<i>B. jararaca</i>	[39]
<EGGWPRPGPEIIPP	BPP-III	<i>Bothrops neuwiedi</i>	[56]
<EARPPHPPIIPP	BPP-XIe	<i>Bothrops jararacussu</i>	[57]
<ENWPHPQIPP	BPP-Xc	<i>B. jararacussu</i>	[57]
<EGGWPRPGPEIIPP	BPP-XIIIa	<i>B. jararacussu</i>	[57]
<EARPPHPPIIPPAP	BPP-AP	<i>B. jararacussu</i>	[57]
<EKWPPGKVPP	-	<i>Bothrops moojeni</i>	[38]
<ENWPRPGPEIIPP	-	<i>B. moojeni</i>	[38]
<EKWPRPGPEIIPP	BPP-BAX12	<i>B. moojeni</i> ; <i>Bothrops atrox</i>	[38,58]
<ERWPHLEIIPP	Cdt1b	<i>Crotalus d. terrificus</i>	[59]
<EAPWPDITISPP	BPP-S	<i>Scaptocosa raptoria</i>	[44]
LRDYANRVINGGPVEAAGPPA	K12	<i>Buthus occitanus</i>	[42]

<E represents pyroglutamic acid; Bold represents typical C-terminal proline-rich sequences present in PROs.

doi:10.1371/journal.pone.0145071.t001

BPP-BrachyNH₂ was equipotent and of the same magnitude, suggesting that mechanisms other than ACE inhibition, appear to contribute to the relaxant effect of BPP-BrachyNH₂ in rat aorta (Fig 5). These results were alike to previous reports on several targets for other BPPs-induced vasodilatory effects [19]. Moreover, despite a higher selectivity of captopril for ACE, when compared with BPPs, a direct correlation between BK potentiation, cardiovascular activity, and inhibition of the ACE has not been observed. Thus, this reinforces the possible involvement of distinct signaling pathways, which do not necessarily include inhibition of ACE [17].

The BPP-BrachyNH₂-induced endothelium-dependent vasodilator effect suggests endothelium-derived mediators are involved in the vasodilatation. NO is an important endothelium-derived vasodilator and is pivotal in several biological processes [46–48]. The increase in NO production plays a pivotal role in the cardiovascular effects of BPPs. Thus, several *Bj*-BPPs were found to increase NO production either by activation of the AsS enzyme, resulting in conversion of L-citrulline to L-arginine, which increases the NO production in vivo [13,14], or the activation of G-protein coupled receptors (GPCRs) that triggers calcium-dependent mechanisms, which results in the increase of endothelial NO synthase (eNOS) activity [15,17,49]. Moreover, TsHpt-I from *T. serrulatus* venom, and *Bj*-BPP-5a from *B. jararaca* venom induced endothelium-dependent relaxations sensitive to eNOS inhibition in rat aorta [16,45]. In the present study, BPP-BrachyNH₂ induced endothelium-dependent relaxations, which were

mediated by NO as relaxation disappeared after inhibition of eNOS with L-NAME in rat aortic preparations (Fig 5).

Additional reports have demonstrated the *in vitro* increase of NO release in the presence of BPPs. Bj-BPP-5a was found by use of a chemiluminescence assay to increase NO release in HEK293 cells [15,17]. Other compounds, as hypotensins obtained from *T. serrulatus* venom increase NO release in murine cardiomyocytes, evaluated by confocal microscopy with the use of DAF-FM DA [50], a diaminofluorescein, which contains a 3-amino,4-aminomethyl,2-benzoic group linked to a fluorophore [51,52]. It is essentially non-fluorescent until it reacts with NO to form a highly fluorescent benzotriazole. The BPP-BrachyNH₂ was able to increase fluorescence emission in DAF-FM DA-loaded aortic cross sections (Fig 6). These findings suggest that NO mediates the endothelium-dependent BPP-BrachyNH₂-induced vasodilatation.

In conclusion, the peptide BPP-BrachyNH₂ has a novel sequence and is the first BPP isolated from the skin secretion of the Brachycephalidae family. These findings open for exploring amphibians as a source of new biomolecules. The BPP-BrachyNH₂ is devoid of cytotoxicity and elicits endothelium-dependent vasodilatation mediated by NO. This study not only reinforces the amphibians as an interesting source of important bioactive molecules, but it also emphasizes the worth of investigating their pharmacological, biotechnological and therapeutic potential for the treatment of endothelial dysfunction and cardiovascular diseases.

Acknowledgments

The authors are grateful to FMRP-USP (Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Brazil) for the facility of laser confocal microscopy, and to LEM (Laboratório de Espectrometria de Massa) at EMBRAPA Genetic Resources and Biotechnology for the facilities, structure mass spectrometry and peptide synthesis. Daniel D. R. Arcanjo acknowledges the CAPES Foundation (Bolsista CAPES-PDSE—Processo n° BEX 2883/15-5) for the financial support. S. Comerma-Steffensen acknowledges the CDCH-UCV and the Aarhus University for their support. There is no conflict of interest.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: CMCN EBO OLF LMB MPB APO JRSAL. Performed the experiments: DDRA AGV JRJ LPS ORPJ LM CBAR MP JRSAL. Analyzed the data: DDRA AGV SGCS JRJ LPS ORPJ EBO CBAR MPB. Contributed reagents/materials/analysis tools: EBO LMB MPB US JRSAL. Wrote the paper: DDRA SGCS LM CBAR US JRSAL. Provided the English revision by their institution: SGCS OLF US.

References

1. Pombal JP Júnior, Witsuba EM, Bornschein MR. A new Species of Brachycephalid (Anura) from Atlantic Rain Forest of Brazil. *J Herpetol.* 1998; 32: 70–74. Available: <http://www.jstor.org/discover/10.2307/1565481?uid=37607&uid=3737664&uid=2134&uid=5909624&uid=2&uid=70&uid=3&uid=37606&uid=67&uid=62&sid=21103953674473>
2. Pie MR, Meyer ALS, Firkowski CR, Ribeiro LF, Bornschein MR. Understanding the mechanisms underlying the distribution of microendemic montane frogs (*Brachycephalus* spp., Terrarana: Brachycephalidae) in the Brazilian Atlantic Rainforest. *Ecol Modell.* Elsevier B.V.; 2013; 250: 165–176. doi: [10.1016/j.ecolmodel.2012.10.019](https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2012.10.019)
3. Pires OR, Sebben A, Schwartz EF, Largura SWR, Bloch C, Morales RAV, et al. Occurrence of tetrodotoxin and its analogues in the Brazilian frog *Brachycephalus ephippium* (Anura: Brachycephalidae). *Toxicon.* 2002; 40: 761–766. doi: [10.1016/S0041-0101\(01\)00279-3](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(01)00279-3) PMID: [12175613](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12175613/)
4. Pires OR, Sebben A, Schwartz EF, Morales RA V, Bloch C, Schwartz CA. Further report of the occurrence of tetrodotoxin and new analogues in the Anuran family Brachycephalidae. *Toxicon.* 2005; 45: 73–79. doi: [10.1016/j.toxicon.2004.09.016](https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2004.09.016) PMID: [15581685](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15581685/)

5. Pires OR, Sebben A, Schwartz EF, Bloch C, Morales RA V., Schwartz CA. The occurrence of 11-oxotetrodotoxin, a rare tetrodotoxin analogue, in the brachycephalidae frog *Brachycephalus ephippium*. *Toxicon*. 2003; 42: 563–566. doi: [10.1016/S0041-0101\(03\)00235-6](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(03)00235-6) PMID: [14529740](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14529740/)
6. Schmaier AH. The plasma kallikrein-kinin system counterbalances the renin-angiotensin system. *J Clin Invest*. 2002; 109: 1007–1009. doi: [10.1172/JCI200215490](https://doi.org/10.1172/JCI200215490) PMID: [11956236](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11956236/)
7. Soares MR, Oliveira-Carvalho AL, Wermelinger LS, Zingali RB, Ho PL, Junqueira-de-Azevedo I de LM, et al. Identification of novel bradykinin-potentiating peptides and C-type natriuretic peptide from *Lachesis muta* venom. *Toxicon*. 2005; 46: 31–38. doi: [10.1016/j.toxicon.2005.03.006](https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.03.006) PMID: [15876444](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15876444/)
8. Ferreira SH. A bradykinin-potentiating factor (BPF) present in the venom of *Bothrops jararaca*. *Br J Pharmacol Chemother*. 1965; 24: 163–169. doi: [10.1111/j.1476-5381.1965.tb02091.x](https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1965.tb02091.x) PMID: [14302350](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14302350/)
9. Ferreira SH, Bartelt DC, Greene LJ. Isolation of bradykinin-potentiating peptides from *Bothrops jararaca* venom. *Biochemistry*. 1970; 9: 2583–2593. doi: [10.1021/bi00815a005](https://doi.org/10.1021/bi00815a005) PMID: [4317874](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4317874/)
10. Gavras H, Brunner HR, Laragh JH, Sealey JE, Gavras I, Vukovich RA. An angiotensin converting-enzyme inhibitor to identify and treat vasoconstrictor and volume factors in hypertensive patients. *N Engl J Med*. 1974; 291: 817–821. doi: [10.1056/NEJM197410172911603](https://doi.org/10.1056/NEJM197410172911603) PMID: [4371298](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4371298/)
11. Gavras H, Brunner HR, Turini GA, Kershaw GR, Tiffet CP, Cuttler S, et al. Antihypertensive effect of the oral angiotensin converting-enzyme inhibitor SQ 14225 in man. *N Engl J Med*. 1978; 298: 991–995. doi: [10.1056/NEJM197805042981803](https://doi.org/10.1056/NEJM197805042981803) PMID: [205788](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/205788/)
12. Cushman DW, Ondetti MA. Design of angiotensin converting enzyme inhibitors. *Nat Med*. 1999; 5: 1110–1112. doi: [10.1038/13423](https://doi.org/10.1038/13423) PMID: [10502801](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10502801/)
13. Ianzer D, Santos RAS, Etelvino GM, Xavier CH, de Almeida Santos J, Mendes EP, et al. Do the cardiovascular effects of angiotensin-converting enzyme (ACE) I involve ACE-independent mechanisms? new insights from proline-rich peptides of *Bothrops jararaca*. *J Pharmacol Exp Ther*. 2007; 322: 795–805. doi: [10.1124/jpet.107.120873](https://doi.org/10.1124/jpet.107.120873) PMID: [17475904](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17475904/)
14. Guerreiro JR, Lameu C, Oliveira EF, Klitzke CF, Melo RL, Linares E, et al. Argininosuccinate synthetase is a functional target for a snake venom anti-hypertensive peptide: role in arginine and nitric oxide production. *J Biol Chem*. 2009; 284: 20022–20033. doi: [10.1074/jbc.M109.021089](https://doi.org/10.1074/jbc.M109.021089) PMID: [19491403](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19491403/)
15. Morais KLP, Hayashi MAF, Bruni FM, Lopes-Ferreira M, Camargo ACM, Ulrich H, et al. Bp-PRO-5a, a natural angiotensin-converting enzyme inhibitor, promotes vasodilatation mediated by both bradykinin B2 and M1 muscarinic acetylcholine receptors. *Biochem Pharmacol*. Elsevier Inc.; 2011; 81: 736–742. doi: [10.1016/j.bcp.2010.12.016](https://doi.org/10.1016/j.bcp.2010.12.016) PMID: [21185808](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21185808/)
16. Ianzer D, Xavier CH, Fraga FC, Lautner RQ, Guerreiro JR, Machado LT, et al. BPP-5a produces a potent and long-lasting NO-dependent antihypertensive effect. *Ther Adv Cardiovasc Dis*. 2011; 5: 281–295. doi: [10.1177/1753944711427318](https://doi.org/10.1177/1753944711427318) PMID: [22032921](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22032921/)
17. Morais KLP, Ianzer D, Miranda JRR, Melo RL, Guerreiro JR, Santos RAS, et al. Proline rich-oligopeptides: diverse mechanisms for antihypertensive action. *Peptides*. 2013; 48: 124–133. doi: [10.1016/j.peptides.2013.07.016](https://doi.org/10.1016/j.peptides.2013.07.016) PMID: [23933300](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23933300/)
18. Lewis RJ, Garcia ML. Therapeutic potential of venom peptides. *Nat Rev Drug Discov*. 2003; 2: 790–802. doi: [10.1038/nrd1197](https://doi.org/10.1038/nrd1197) PMID: [14526382](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14526382/)
19. Camargo ACM, Ianzer D, Guerreiro JR, Serrano SMT. Bradykinin-potentiating peptides: beyond captopril. *Toxicon*. 2012; 59: 516–523. doi: [10.1016/j.toxicon.2011.07.013](https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.07.013) PMID: [21835190](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21835190/)
20. Leite JRSA, Silva LP, Rodrigues MIS, Prates M V, Brand GD, Lacava BM, et al. Phylloseptins: a novel class of anti-bacterial and anti-protozoan peptides from the *Phyllomedusa* genus. *Peptides*. 2005; 26: 565–573. doi: [10.1016/j.peptides.2004.11.002](https://doi.org/10.1016/j.peptides.2004.11.002) PMID: [15752569](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15752569/)
21. Machado RJA, Monteiro NK V, Migliolo L, Silva ON, Pinto MFS, Oliveira AS, et al. Characterization and pharmacological properties of a novel multifunctional Kunitz inhibitor from *Erythrina velutina* seeds. *PLoS One*. 2013; 8: e63571. doi: [10.1371/journal.pone.0063571](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063571) PMID: [23737945](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23737945/)
22. Dourado FS, Leite JRSA, Silva LP, Melo JAT, Bloch C, Schwartz EF. Antimicrobial peptide from the skin secretion of the frog *Leptodactylus syphax*. *Toxicon*. 2007; 50: 572–580. doi: [10.1016/j.toxicon.2007.04.027](https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2007.04.027) PMID: [17628627](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17628627/)
23. Fields GB, Noble RL. Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids. *Int J Pept Protein Res*. 1990; 35: 161–214. doi: [10.1111/j.1399-3011.1990.tb00939.x](https://doi.org/10.1111/j.1399-3011.1990.tb00939.x) PMID: [2191922](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2191922/)
24. Santos RA, Krieger EM, Greene LJ. An improved fluorometric assay of rat serum and plasma converting enzyme. *Hypertension*. 1985; 7: 244–252. doi: [10.1161/01.HYP.7.2.244](https://doi.org/10.1161/01.HYP.7.2.244) PMID: [2984118](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2984118/)
25. Yang H-YT, Neff NH. Distribution and properties of Angiotensin Converting Enzyme of rat brain. *J Neurochem*. 1972; 19: 2443–2450. doi: [10.1111/j.1471-4159.1972.tb01298.x](https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1972.tb01298.x) PMID: [4348982](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4348982/)

26. Akif M, Masuyer G, Schwager SLU, Bhuyan BJ, Mugesh G, Isaac RE, et al. Structural characterization of angiotensin I-converting enzyme in complex with a selenium analogue of captopril. *FEBS J.* 2011; 278: 3644–3650. doi: [10.1111/j.1742-4658.2011.08276.x](https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08276.x) PMID: [21810173](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21810173/)
27. Schonbrunn E, Betzi S, Alam R, Martin MP, Becker A, Han H, et al. Development of highly potent and selective diaminothiazole inhibitors of cyclin-dependent kinases. *J Med Chem.* 2013; 56: 3768–3782. doi: [10.1021/jm301234k](https://doi.org/10.1021/jm301234k) PMID: [23600925](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23600925/)
28. Masuyer G, Schwager SLU, Sturrock ED, Isaac RE, Acharya KR. Molecular recognition and regulation of human angiotensin-I converting enzyme (ACE) activity by natural inhibitory peptides. *Sci Rep.* 2012; 2: 717. doi: [10.1038/srep00717](https://doi.org/10.1038/srep00717) PMID: [23056909](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23056909/)
29. Jitonnom J, Sontag C. Comparative study on activation mechanism of carboxypeptidase A1, A2 and B: first insights from steered molecular dynamics simulations. *J Mol Graph Model.* 2012; 38: 298–303. doi: [10.1016/j.jmkgm.2012.09.002](https://doi.org/10.1016/j.jmkgm.2012.09.002) PMID: [23085168](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23085168/)
30. Silva-Filho JC, Oliveira NNPM, Arcanjo DDR, Quintans-Júnior LJ, Cavalcanti SCH, Santos MR V, et al. Investigation of Mechanisms Involved in (-)-Borneol-Induced Vasorelaxant Response on Rat Thoracic Aorta. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2012; 110: 171–177. doi: [10.1111/j.1742-7843.2011.00784.x](https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2011.00784.x) PMID: [21883938](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21883938/)
31. Capellini VK, Restini CBA, Bendhack LM, Evora PRB, Celotto AC. The effect of extracellular pH changes on intracellular pH and nitric oxide concentration in endothelial and smooth muscle cells from rat aorta. *PLoS One.* 2013; 8: e62887. doi: [10.1371/journal.pone.0062887](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062887) PMID: [23690964](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23690964/)
32. Paulo M, Rodrigues GJ, da Silva RS, Bendhack LM. A new NO donor failed to release NO and to induce relaxation in the rat basilar artery. *Eur J Pharm Sci.* Elsevier B.V.; 2012; 45: 344–350. doi: [10.1016/j.ejps.2011.12.002](https://doi.org/10.1016/j.ejps.2011.12.002) PMID: [22178018](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22178018/)
33. Bagnara J, Matsumoto J, Ferris W, Frost S, Turner W, Tchen T, et al. Common origin of pigment cells. *Science (80-).* 1979; 203: 410–415. doi: [10.1126/science.760198](https://doi.org/10.1126/science.760198) PMID: [760198](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/760198/)
34. Petriz BDA, de Almeida JA, Migliolo L, Franco OL. Pharmacological potential of exercise and RAS vasoactive peptides for prevention of diseases. *Curr Protein Pept Sci.* 2013; 14: 459–471. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23968354> PMID: [23968354](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23968354/)
35. Rees DD, Palmer RM, Schulz R, Hodson HF, Moncada S. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol.* 1990; 101: 746–752. PMID: [1706208](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1706208/)
36. Conlon JM. Bradykinin and its receptors in non-mammalian vertebrates. *Regul Pept.* 1999; 79: 71–81. doi: [10.1016/S0167-0115\(98\)00160-8](https://doi.org/10.1016/S0167-0115(98)00160-8) PMID: [10100919](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10100919/)
37. Conceição K, Konno K, de Melo RL, Antoniazzi MM, Jared C, Sciani JM, et al. Isolation and characterization of a novel bradykinin potentiating peptide (BPP) from the skin secretion of *Phyllomedusa hypochondrialis*. *Peptides.* 2007; 28: 515–23. doi: [10.1016/j.peptides.2006.10.002](https://doi.org/10.1016/j.peptides.2006.10.002) PMID: [17098329](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17098329/)
38. Menin L, Perchuc A, Favreau P, Perret F, Michalet S, Schöni R, et al. High throughput screening of bradykinin-potentiating peptides in *Bothrops moojeni* snake venom using precursor ion mass spectrometry. *Toxicon.* 2008; 51: 1288–1302. doi: [10.1016/j.toxicon.2008.02.019](https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2008.02.019) PMID: [18471845](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18471845/)
39. Ianzer D, Konno K, Marques-Porto R, Vieira Portaro FC, Stöcklin R, Camargo ACM, et al. Identification of five new bradykinin potentiating peptides (BPPs) from *Bothrops jararaca* crude venom by using electrospray ionization tandem mass spectrometry after a two-step liquid chromatography. *Peptides.* 2004; 25: 1085–1092. doi: [10.1016/j.peptides.2004.04.006](https://doi.org/10.1016/j.peptides.2004.04.006) PMID: [15245866](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15245866/)
40. Biedermannova L, Riley KE, Berka K, Hobzaa P, Vondrasek J. Another role of proline: stabilization interactions in proteins and protein complexes concerning proline and tryptophane. *Phys Chem Chem Phys.* 2008; 10: 6350–6359. doi: [10.1039/b805087b](https://doi.org/10.1039/b805087b) PMID: [18972023](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18972023/)
41. Ondetti MA, Williams NJ, Sabo E, Pluscec J, Weaver ER, Kocy O. Angiotensin-converting enzyme inhibitors from the venom of *Bothrops jararaca*. Isolation, elucidation of structure, and synthesis. *Biochemistry.* 1971; 10: 4033–4039. doi: [10.1021/bi00798a004](https://doi.org/10.1021/bi00798a004) PMID: [4334402](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4334402/)
42. Meki A- RMA, Nassar AY, Rochat H. A bradykinin-potentiating peptide (peptide K12) isolated from the venom of Egyptian scorpion *Buthus occitanus*. *Peptides.* 1995; 16: 1359–1365. doi: [10.1016/0196-9781\(95\)02036-5](https://doi.org/10.1016/0196-9781(95)02036-5) PMID: [8745044](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8745044/)
43. Araujo RL, Gomez M V. Potentiation of bradykinin action on smooth muscle by a scorpion venom extract. *Gen Pharmacol Vasc Syst.* 1976; 7: 123–126. doi: [10.1016/0306-3623\(76\)90047-1](https://doi.org/10.1016/0306-3623(76)90047-1)
44. Ferreira LAF, Alves WE, Lucas MS, Habermehl GG. Isolation and characterization of a bradykinin potentiating peptide (BPP-S) isolated from *Scaptocosa raptor* venom. *Toxicon.* 1996; 34: 599–603. doi: [10.1016/0041-0101\(96\)00010-4](https://doi.org/10.1016/0041-0101(96)00010-4) PMID: [8783454](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8783454/)
45. Verano-Braga T, Rocha-Resende C, Silva DM, Ianzer D, Martin-Eauclaire MF, Bougis PE, et al. *Tityus serrulatus* Hypotensins: a new family of peptides from scorpion venom. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008; 371: 515–520. doi: [10.1016/j.bbrc.2008.04.104](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.04.104) PMID: [18445483](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18445483/)

46. Furchgott RF. Studies on relaxation of rabbit aorta by sodium nitrite: the basis for the proposal that the acid-activatable inhibitory factor from retractor penis is inorganic nitrite and the endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide. In: Vanhoutte P, editor. Mechanisms of Vasodilation. New York: Raven Press; 1988. pp. 401–404.
47. Ignarro LJ, Byrns RE, Buga GM, Wood KS, Chaudhuri G. Pharmacological evidence that endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide: use of pyrogallol and superoxide dismutase to study endothelium-dependent and nitric oxide-elicited vascular smooth muscle relaxation. *J Pharmacol Exp Ther*. 1988; 244: 181–189. PMID: [2826766](#)
48. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*. 1987; 327: 524–526. doi: [10.1038/327524a0](#) PMID: [3495737](#)
49. Lameu C, Neiva M, Hayashi M. Venom Bradykinin-related peptides (BRPs) and its multiple biological roles. In: Radis-Baptista G, editor. An Integrated View of the Molecular Recognition and Toxinology—From Analytical Procedures to Biomedical Applications. InTech; 2013. pp. 119–151. doi: [10.5772/3429](#)
50. Verano-Braga T, Figueiredo-Rezende F, Melo MN, Lautner RQ, Gomes ERM, Mata-Machado LT, et al. Structure-function studies of *Tityus serrulatus* Hypotensin-I (TsHpt-I): A new agonist of B2 kinin receptor. *Toxicon*. Elsevier Ltd; 2010; 56: 1162–1171. doi: [10.1016/j.toxicon.2010.04.006](#) PMID: [20417225](#)
51. Kojima H, Sakurai K, Kikuchi K, Kawahara S, Kirino Y, Nagoshi H, et al. Development of a Fluorescent Indicator for Nitric Oxide Based on the Fluorescein Chromophore. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 1998; 46: 373–375. doi: [10.1248/cpb.46.373](#)
52. Nagano T, Yoshimura T. Bioimaging of Nitric Oxide. *Chem Rev*. 2002; 102: 1235–1270. doi: [10.1021/cr010152s](#) PMID: [11942795](#)
53. Kato H, Suzuki T. Bradykinin-potentiating peptides from the venom of *Agkistrodon halys blomhoffii*. Isolation of five bradykinin potentiators and the amino acid sequences of two of them, potentiators B and C. *Biochemistry*. American Chemical Society; 1971; 10: 972–980. doi: [10.1021/bi00782a007](#) PMID: [4323853](#)
54. Murayama N, Hayashi MAF, Hiroaki O, Ferreira LAF, Hermann V V, Saito H, et al. Cloning and sequence analysis of a *Bothrops jararaca* cDNA encoding a precursor of seven bradykinin-potentiating peptides and a C-type natriuretic peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997; 94: 1189–1193. Available: <http://www.pnas.org/content/94/4/1189.short> PMID: [9037028](#)
55. Hayashi MAF, Murbach AF, Ianzer D, Portaro FCV, Prezoto BC, Fernandes BL, et al. The C-type natriuretic peptide precursor of snake brain contains highly specific inhibitors of the angiotensin-converting enzyme. *J Neurochem*. 2003; 85: 969–977. doi: [10.1046/j.1471-4159.2003.01743.x](#) PMID: [12716428](#)
56. Ferreira L, Galle A, Raida M. Isolation: Analysis and Properties of Three Bradykinin-Potentiating Peptides (BPP-II, BPP-III, and BPP-V) From *Bothrops Neuwiedi* Venom. *J Protein Chem*. 1998; 17: 285–289. doi: [10.1023/A:1022545020764](#) PMID: [9588953](#)
57. Rioli V, Prezoto BC, Konno K, Melo RL, Klitzke CF, Ferro ES, et al. A novel bradykinin potentiating peptide isolated from *Bothrops jararacussu* venom using catalytically inactive oligopeptidase EP24.15. *FEBS J*. 2008; 275: 2442–2454. doi: [10.1111/j.1742-4658.2008.06389.x](#) PMID: [18400032](#)
58. Coutinho-Neto A, Caldeira CAS, Souza GHMF, Zaqueo KD, Kayano AM, Silva RS, et al. ESI-MS/MS identification of a bradykinin-potentiating peptide from Amazon *Bothrops atrox* snake venom using a hybrid Qq-oaTOF mass spectrometer. *Toxins (Basel)*. 2013; 5: 327–335. doi: [10.3390/toxins5020327](#)
59. Gomes CL, Konno K, Conceição IM, Ianzer D, Yamanouye N, Prezoto BC, et al. Identification of novel bradykinin-potentiating peptides (BPPs) in the venom gland of a rattlesnake allowed the evaluation of the structure-function relationship of BPPs. *Biochem Pharmacol*. 2007; 74: 1350–1360. doi: [10.1016/j.bcp.2007.07.014](#) PMID: [17714693](#)



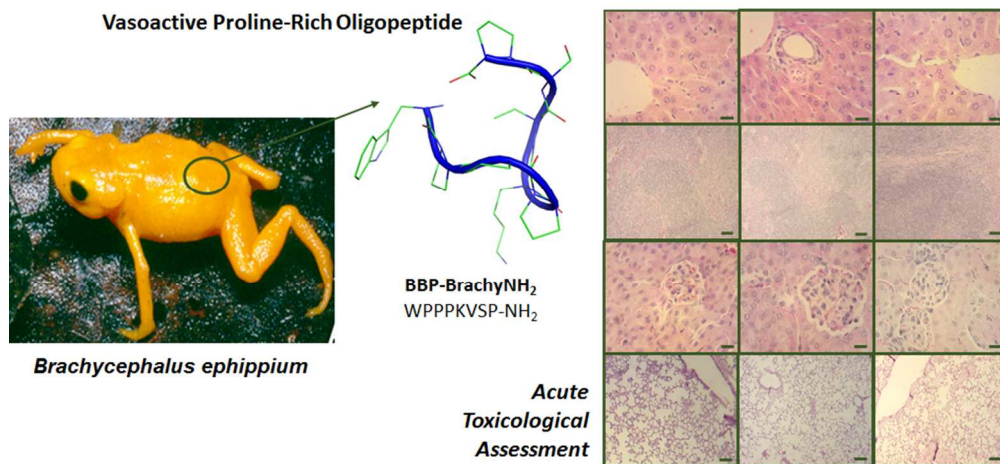
Toxicological assessment of BPP-BrachyNH2, a proline-rich oligopeptide from the skin secretion of the frog *Brachycephalus ephippium*

Journal:	<i>Natural Product Research</i>
Manuscript ID	GNPL-2016-0826
Manuscript Type:	Short Communication
Date Submitted by the Author:	23-May-2016
Complete List of Authors:	<p>Arcanjo, Daniel; Federal University of Piauí, Medicinal Plants Research Center Vasconcelos, Andreeane; Federal University of Piauí, Núcleo de Pesquisa em Biodiversidade e Biotecnologia Silva-Filho, José Couras; Universidade Federal do Piauí, Núcleo de Pesquisas em Plantas Medicinais Amaral, Maurício; Universidade Federal do Piauí, Núcleo de Pesquisas em Plantas Medicinais Brito, Lucas; Federal University of Piauí, Medicinal Plants Research Center Bemquerer, Marcelo; Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Laboratory of Mass Spectrometry Kückelhaus, Selma; University of Brasilia, Faculty of Medicine, Laboratory of Histology Plácido, Alexandra; Instituto Politecnico do Porto Instituto Superior de Engenharia do Porto, REQUIMTE/LAQV Delerue-Matos, Cristina; Instituto Politecnico do Porto Instituto Superior de Engenharia do Porto, REQUIMTE/LAQV Vale, Nuno; Universidade do Porto, Departamento de Química e Bioquímica Carvalho, Fernando Aécio de Amorim; Departamento de Bioquímica e Farmacologia, Universidade Federal do Piauí, 64049-550 Teresina, PI, Brazil., Oliveira, Aldeidia; Federal University of Piauí, Leite, José Roberto; Federal University of Piauí, Post-Graduation Program in Biotechnology, Biotechnology and Biodiversity Center Research (BIOTEC)</p>
Keywords:	cytotoxicity, MTT, proline-rich oligopeptide, toxicological, OECD

SCHOLARONE™
Manuscripts

For Peer Review Only

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



Peer Review Only

1
2
3 **Toxicological assessment of BPP-BrachyNH₂, a proline-rich oligopeptide**
4 **from the skin secretion of the frog *Brachycephalus ephippium***
5
6
7

8
9 Daniel D. R. Arcanjo^{a,b}, Andreanne G. Vasconcelos^a, José Couras da Silva-
10 Filho^b, Maurício P. M. Amaral^b, Lucas M. Brito^b, Marcelo P. Bemquerer^c,
11 Selma A. S. Kückelhaus^d, Alexandra Plácido^e, Cristina Delerue-Matos^e, Nuno
12 Vale^f, Fernando Aécio A. Carvalho^b, Aldeidia P. Oliveira^b, José Roberto S. A.
13 Leite^{a,d,f*}
14
15
16
17
18
19

20
21 ^a*Núcleo de Pesquisa em Biodiversidade e Biotecnologia – BIOTEC, Campus Ministro Reis*
22 *Velloso – CMRV, Universidade Federal do Piauí – UFPI, Parnaíba, PI, Brazil;*

23
24 ^b*Núcleo de Pesquisas em Plantas Mediciniais – NPPM, Universidade Federal do Piauí –*
25 *UFPI, 64049-550, Teresina, PI, Brazil;*
26
27

28 ^c*Laboratório de Espectrometria de Massa, EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia,*
29 *Brasília, DF, Brazil;*
30

31 ^d*Area Morfologia, Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, UnB, Brasília, DF,*
32 *Brazil;*
33

34 ^e*REQUIMTE/LAQV, Instituto Superior de Engenharia do Instituto Politécnico do Porto,*
35 *Rua Dr. António Bernardino de Almeida, 431, 4200-072, Porto, Portugal;*
36
37

38 ^f*UCIBIO/REQUIMTE, Departamento de Química e Bioquímica, Faculdade de Ciências da*
39 *Universidade do Porto, Rua do Campo Alegre, 687, 4169-007 Porto, Portugal;*
40
41
42
43
44

45
46 *Corresponding Author:

47 Prof. José Roberto de Souza de Almeida Leite, PhD
48 Faculdade de Medicina (FM)
49 Universidade de Brasília (UnB)
50 *Campus Universitário Darcy Ribeiro*
51 *Asa Norte, Brasília, Distrito Federal (DF)*
52 *Brasil 70910-900. Phone number: +55 3107 1891.*
53 *Email: jrsaleite@gmail.com; jrsaleite@pq.cnpq.br*
54
55
56
57
58
59
60

Toxicological assessment of BPP-BrachyNH₂, a proline-rich oligopeptide from the skin secretion of the frog *Brachycephalus ephippium*

BPP-BrachyNH₂ is a proline-rich oligopeptide (PRO) firstly identified in skin secretion of the frog *Brachycephalus ephippium*, which possess *in vitro* inhibitory activity of angiotensin-I converting enzyme (ACE) and endothelium-dependent vasorelaxant activity. Thus, considering its potential application in the treatment of cardiovascular diseases, the present work assessed *in vitro* and *in vivo* toxicological profile of the BPP-BrachyNH₂. The MTT assay was applied for the cytotoxic evaluation in murine macrophages. The acute oral toxicological study was performed according to the Acute Toxic Class Method (OECD no. 423). A decrease of cell viability was not observed in the MTT assay. After oral administration, no death, alterations in behavioral parameters or weight gain curve was observed, as well as none in the serum biochemical parameters and gross and histopathological analyses. These observations demonstrates an acceptable safety profile for BPP-BrachyNH₂, leading towards further studies focused on investigation of pharmacological and therapeutical applications for this peptide.

Keywords: Cytotoxicity, MTT, OECD, proline-rich oligopeptide, toxicological.

1. Introduction

Proline-Rich Oligopeptides (PROs) represent a class of peptides firstly isolated from the *Bothrops jararaca* venom, which present proline residues at their C-terminal portions and inhibitory activity of the angiotensin-I converting enzyme (ACE) as well as the potentiation of bradykinin effects (Camargo et al. 2012; Morais et al. 2013). Furthermore, secretions and venoms from other animals, such as amphibians and scorpions have also been described as a potential source of PROs with biological applications (Conceição et al. 2007; Verano-Braga et al. 2008). Interestingly, the peptide BPP-BrachyNH₂ (Figures S1 and S2) obtained from the skin secretion of the frog *Brachycephalus ephippium* induces *in vitro* inhibitory activity of ACE and endothelium-dependent vasorelaxant effect (Arcanjo et al. 2015), reinforcing the potential therapeutic applications of this peptide. Therefore, the *in vitro* and *in vivo* toxicological profile of BPP-BrachyNH₂ was assessed and reported in this study.

2. Results and Discussion

Acute toxicity studies in animals are commonly applied in order to attend a sort of requirements related to controlled risks for human health and the environment. The information obtained in these studies are important to provide relevant information for possible target organs, as well as for selection of doses in repeated dose studies, Phase I studies or overdose in humans (CDER 1996; OECD 2002a). Firstly, *in vitro* cytotoxicity assays are essential in the early stages of the development of new drugs, because they are able to estimate the starting dose and the range of concentrations to be used in the *in vivo* non-clinical stages (OECD 2010). In this study, a decrease of cell viability induced by BPP-BrachyNH₂ in murine macrophages was not observed in MTT assay, suggesting the absence of cytotoxicity for this peptide.

Regarding the *in vivo* toxicological study, the Class Acute Toxic Test classifies the product on a GHS scale (Globally Harmonized Classification System) from 1 to 5 related to an estimated range of LD₅₀, based on the number of dead animals observed in the treated groups (OECD 2002b). The BPP-BrachyNH₂ (5 and 50 mg/kg) did not cause any death after intraperitoneal administration in Swiss female mice, indicating absence of toxicity. Therefore, BPP-BrachyNH₂ was classified as Category 5 in the GHS. Besides, during the first 24 h after treatment and throughout 14 days, no clinical or behavioral sign of toxicity was observed (Table S1). The general activity of mice was not altered during the period of study, demonstrating a good health condition.

The evaluation of the body weight curve of the animals is an important indicator for the toxicological assessment of a substance, generally related to alterations in the consumption of water and food (OECD 2002c). The acute administration of BPP-BrachyNH₂ did not promote alterations in the body weight curve of mice throughout the treatment period (Figure S3). Furthermore, no marked alterations were observed in the serum biochemical parameters when compared with the reference ranges observed for animals from different standardized animal houses (Santos et al. 2010). However, a mild alteration of blood glucose levels was observed when compared with vehicle (Table 1), suggesting further studies for a possible BPP-BrachyNH₂-induced hypoglycemic effect in experimental models of diabetes, thereby enhancing the potential application of this peptide in the treatment of cardiovascular diseases (Arcanjo et al. 2015).

>>>>>>>>>> Insert Table 1 here <<<<<<<<<<<<

The evaluation of the organ weight is a useful screening tool in the characterization of effects related to general toxicity studies (Michael et al. 2007). After treatment with BPP-BrachyNH₂, no changes were also found in organ weights (Table 2). Besides, no significant change was observed in the gross pathological examination of the organs (lungs, heart, liver, spleen and kidneys), as well as morphological changes were not observed in the histological sections (Figure S4).

>>>>>>>>>> Insert Table 2 here <<<<<<<<<<<<

3. Conclusions

The BPP-BrachyNH₂ did not presented any signal of acute toxicity after single dose intraperitoneal administration. This study indicates an acceptable safety profile for studies in animal experimental models focused on the investigation of the potential pharmacological, biotechnological and therapeutic applications of this peptide.

Acknowledgments

We are grateful to CAPES and FAPEPI (Edital no. 008/2012, Acordo CAPES-FAPEPI) for the financial support for this work. Nuno Vale thanks Programa Operacional Regional do Norte (ON.2) and Faculdade de Ciências da Universidade do Porto (FCUP) for co-funding refurbishment of the Porto Peptide Synthesis Facility (POP-UP) through operation NORTE-07-0162-FEDER000111. NV thanks *Fundação para a Ciência e Tecnologia* (FCT, Portugal) and FEDER (European Union) for funding through UID/MULTI/04378/2013 and project grant IF/00092/2014. NV thanks also FCT for the IF2014 position. Alexandra Plácido is gratefully to FCT by her grant SFRH/BD/97995/2013, financed by POPH-QREN-Tipologia 4.1-Formação Avançada, subsidized by Fundo Social Europeu and Ministério da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior. The authors wish to acknowledge to Materials Centre of the University of Porto (CEMUP) for mass spectrometry MALDI-TOF facilities.

References

Arcanjo DDR, Vasconcelos AG, Comerma-Steffensen SG, Jesus JR, Silva LP, Pires OR, Costa-Neto CM, Oliveira EB, Migliolo L, Franco OL, et al. 2015. A Novel Vasoactive Proline-Rich Oligopeptide from the Skin Secretion of the Frog *Brachycephalus ephippium*. PLoS One. 10:e0145071.

Camargo ACM, Ianzer D, Guerreiro JR, Serrano SMT. 2012. Bradykinin-potentiating peptides: beyond captopril. Toxicon. 59:516–523.

1
2
3 CDER. 1996. Guidance for Industry: Single Dose Acute Toxicity Testing for Pharmaceuticals. Cent
4 Drug Eval Res [Internet]. [cited 2016 Feb 7]:1–3. Available from:
5 <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM079>
6 270.pdf
7

8 Conceição K, Konno K, de Melo RL, Antoniazzi MM, Jared C, Sciani JM, Conceição IM, Prezoto BC,
9 de Camargo ACM, Pimenta DC. 2007. Isolation and characterization of a novel bradykinin potentiating
10 peptide (BPP) from the skin secretion of *Phyllomedusa hypochondrialis*. Peptides. 28:515–23.

11 Michael B, Yano B, Sellers RS, Perry R, Morton D, Roome N, Johnson JK, Schafer K, Pitsch S. 2007.
12 Evaluation of Organ Weights for Rodent and Non-Rodent Toxicity Studies: A Review of Regulatory
13 Guidelines and a Survey of Current Practices. Toxicol Pathol. 35:742–750.

14 Morais KLP, Ianzer D, Miranda JRR, Melo RL, Guerreiro JR, Santos RAS, Ulrich H, Lameu C. 2013.
15 Proline rich-oligopeptides: diverse mechanisms for antihypertensive action. Peptides. 48:124–133.

16 OECD. 2002a. Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing. In: OECD Ser Test Assess. Paris:
17 OECD Publishing; p. 24.

18 OECD. 2002b. Test No. 423: Acute Oral toxicity - Acute Toxic Class Method. Paris: OECD Publishing.

19 OECD. 2002c. Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as
20 Human Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. In: OECD Ser Test Assess.
21 Paris: OECD Publishing; p. 39.

22 OECD. 2010. Guidance document on using cytotoxicity tests to estimate starting doses for acute oral
23 systemic toxicity tests. In: OECD Ser Test Assess. Paris: OECD Publishing; p. 1–54.

24 Santos MRV, Souza VH, Menezes IAC, Bitencurt JL, Resende-Neto JM, Barreto AS, Andrade FC,
25 Marçal RM, Teixeira-Silva F, Quintans-Júnior LJ, Barbosa APO. 2010. Parâmetros bioquímicos,
26 fisiológicos e morfológicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) produzidos pelo Biotério
27 Central da Universidade Federal de Sergipe. Sci Plena. 6:106101.

28 Verano-Braga T, Rocha-Resende C, Silva DM, Ianzer D, Martin-Eauclaire MF, Bougis PE, de Lima
29 ME, Santos RAS, Pimenta AMC. 2008. *Tityus serrulatus* Hypotensins: a new family of peptides from
30 scorpion venom. Biochem Biophys Res Commun. 371:515–520.
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Table 1: Serum biochemical parameters of female Swiss mice 14 days after the treatment with single intraperitoneal dose of BPP-BrachyNH₂ (5 and 50 mg/kg, i.p.). The values are expressed as mean \pm SEM (n=6/group). *p<0.05 when compared with control; Student t Test for non-paired samples.

Parameters	Control	BPP-BrachyNH ₂ (i.p.)	
		5 mg/kg	50 mg/kg
Glucose (mg/dL)	186.0 \pm 18.7	132.8 \pm 9.0*	136.5 \pm 6.9*
Urea (mg/dL)	63.5 \pm 8.5	64.6 \pm 3.4	50.7 \pm 3.1
Creatinine (mg/dL)	0.2 \pm 0.0	0.2 \pm 0.0	0.2 \pm 0.0
AST (U/mL)	96.2 \pm 11.0	120.0 \pm 26.0	85.5 \pm 16.6
ALT (U/mL)	58.0 \pm 8.2	76.6 \pm 6.3	48.7 \pm 6.0
ALP (U/mL)	88.0 \pm 13.6	87.4 \pm 4.4	114.8 \pm 9.5
GGT (U/mL)	2.3 \pm 1.4	1.1 \pm 0.5	1.6 \pm 0.7
LDH (U/mL)	648.7 \pm 70.9	899.2 \pm 130.3	599.0 \pm 40.1
Total cholesterol (mg/dL)	82.3 \pm 6.4	78.8 \pm 6.5	77.3 \pm 3.0
Triglycerides (mg/dL)	83.3 \pm 9.7	77.4 \pm 11.3	72.7 \pm 1.3

Legend: AST: aspartate aminotransferase; ALT: alanine aminotransferase; ALP: alkaline phosphatase; GGT: gamma-glutamyl transferase; LDH: lactate dehydrogenase.

Table 2: Relative organ weights of female Swiss mice 14 days after the treatment with single intraperitoneal dose of BPP-BrachyNH₂ (5 and 50 mg/kg, i.p.). The values are expressed as mean ± SEM (n=6/group).

Organs (g)	Control	BPP-BrachyNH ₂ (i.p.)	
		5 mg/kg	50 mg/kg
Lungs	0.656 ± 0.042	0.674 ± 0.042	0.610 ± 0.037
Heart	0.478 ± 0.026	0.555 ± 0.030	0.463 ± 0.020
Liver	4.909 ± 0.084	5.036 ± 0.429	4.824 ± 0.293
Spleen	0.395 ± 0.037	0.362 ± 0.034	0.348 ± 0.048
Kidneys	1.227 ± 0.052	1.282 ± 0.075	1.185 ± 0.049

Supplementary Material

Toxicological assessment of BPP-BrachyNH₂, a proline-rich oligopeptide from the skin secretion of the frog *Brachycephalus ephippium*

Daniel D. R. Arcanjo^{a,b}, Andreeanne G. Vasconcelos^a, José Couras da Silva-Filho^b, Maurício P. M. Amaral^b, Lucas M. Brito^b, Marcelo P. Bemquerer^c, Selma A. S. Kückelhaus^d, Alexandra Plácido^e, Cristina Delerue-Matos^e, Nuno Vale^f, Fernando Aécio A. Carvalho^b, Aldeidia P. Oliveira^b, José Roberto S. A. Leite^{a,d,f,*}

^a*Núcleo de Pesquisa em Biodiversidade e Biotecnologia – BIOTEC, Campus Ministro Reis Velloso – CMRV, Universidade Federal do Piauí – UFPI, Parnaíba, PI, Brazil;*

^b*Núcleo de Pesquisas em Plantas Mediciniais – NPPM, Universidade Federal do Piauí – UFPI, 64049-550, Teresina, PI, Brazil;*

^c*Laboratório de Espectrometria de Massa, EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, Brazil;*

^d*Area de Morfologia, Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, UnB, Brasília, DF, Brazil;*

^e*REQUIMTE/LAQV, Instituto Superior de Engenharia do Instituto Politécnico do Porto, Rua Dr. António Bernardino de Almeida, 431, 4200-072, Porto, Portugal;*

^f*UCIBIO/REQUIMTE, Departamento de Química e Bioquímica, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Rua do Campo Alegre, 687, 4169-007 Porto, Portugal;*

Toxicological assessment of BPP-BrachyNH₂, a proline-rich oligopeptide from the skin secretion of the frog *Brachycephalus ephippium*

BPP-BrachyNH₂ is a proline-rich oligopeptide (PRO) firstly identified in skin secretion of the frog *Brachycephalus ephippium*, which possess *in vitro* inhibitory activity of angiotensin-I converting enzyme (ACE) and endothelium-dependent vasorelaxant activity. Thus, considering its potential application in the treatment of cardiovascular diseases, the present work assessed *in vitro* and *in vivo* toxicological profile of the BPP-BrachyNH₂. The MTT assay was applied for the cytotoxic evaluation in murine macrophages. The acute oral toxicological study was performed according to the Acute Toxic Class Method (OECD no. 423). A decrease of cell viability was not observed in the MTT assay. After oral administration, no death, alterations in behavioral parameters or weight gain curve was observed, as well as none in the serum biochemical parameters and gross and histopathological analyses. These observations demonstrates an acceptable safety profile for BPP-BrachyNH₂, leading towards further studies focused on investigation of pharmacological and therapeutical applications for this peptide.

Keywords: Cytotoxicity, MTT, OECD, proline-rich oligopeptide, toxicological.

1. Experimental

1.1. Synthesis, Purification and Characterization of BBP-Brachy-NH₂

The synthesis of the octapeptide BPP-BrachyNH₂ (WPPPKVSP) was carried out manually, with a standard Fmoc (N-(9-fluorenyl)methoxycarbonyl) chemistry (Fields and Noble, 1990) starting from a Rink-amide-MBHA resin (0.59 mmol.g⁻¹, Peptides International, Louisville, KY, USA). F-moc-protected amino acids (Peptides International, Louisville, KY, USA) were used in four-fold molar excess relative to the nominal scale of synthesis (1.2 mmol). Couplings were performed with 1,3-diisopropylcarbodiimide/ethyl 2-cyano-2-(hydroxyimino) acetate (DIC/Oxyma) in N,N-dimethylformamide (DMF) for 2-3h. Side chain protected groups were tert-butyl for Ser, and Boc for Lys and Trp. Amino groups deprotections were conducted by 4-methylpiperidine/DMF (1:4, v:v) for 20–30 min. Removal of side chain protection and cleavage of the peptide from the resin were

1
2
3 performed by the use of 10.0 mL TFA:water:tioanisol:ethanodithiol:triisopropylsilane
4 (86:5.0:5.0:2.5:1.0, v:v:v:v) with addition of 1 g phenol for 90 min at room temperature
5 under shaking. After solvent evaporation under nitrogen, the peptide was precipitated by
6 addition of cold diisopropyl ether, collected by filtration and washed four times with cold
7 diisopropyl ether. Extraction was performed with 200 mL H₂O:ACN (1:1, v:v) and crude
8 peptide was lyophilized. Purification was performed using a preparative HPLC system
9 (LaPrep Sigma), with LP1100 Quaternary LPG pump injection with fractionation valve.
10 The elution conditions consisted of a linear gradient from 10% to 30% of acetonitrile in
11 water. The eluent was monitored at the absorbance of 220 nm, and products corresponding
12 to absorbing peaks were collected. Purity and molecular mass determination of the
13 synthetic peptide (BPP) were performed using a MALDI-TOF/TOF mass spectrometer
14 (UltrafleXtreme, Bruker Daltonics) operating under LIFT™ mode for MS/MS experiments
15 (Figures S1 and S2). Purified peptide was obtained with 96% based on starting resin. Stock
16 peptide solutions were prepared in water and their concentrations were determined
17 according to tryptophan molar absorptivity (5550 M⁻¹.cm⁻¹) at 280 nm (Arcanjo et al.
18 2015).
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32

33 **1.2. Animals**

34
35 Swiss female mice (25-30 g, 2 months) were used. The animals were maintained
36 throughout the study period at 12h light/dark cycle and temperature of 23±2 °C), with free
37 access to water and food (Purina-Nestlé, São Paulo, SP, Brazil). The experimental
38 procedures were performed according to recommendations of the Organization for
39 Economic Co-operation and Development (OECD), and performed with approval by the
40 Ethics Committee for Animal Experimentation from the Federal University of Piauí, Brazil
41 (permission No. 008/2012).
42
43
44
45
46
47
48

49 **1.3. Obtention and culture of murine peritoneal macrophages**

50 Peritoneal macrophages were obtained from male BALB/c mice. Three days after
51 intraperitoneal administration of 1.5 mL of 3.0% thioglycollate, animals were euthanized,
52 and immersed in 70% alcohol for 1 min. Then, eight milliliters of sterile PSS was added in
53 the peritoneal cavity, and the solution containing peritoneal macrophages was aspirated and
54
55
56
57
58
59
60

transferred to a sterile tube, and then submitted to two centrifugations at 1500 rpm and 4° C during 10 min, with repeated washings with sterile saline (0.9% NaCl). Afterwards, the supernatant was discarded and the cells re-suspended in 2 mL of RPMI 1640 medium supplemented with fetal bovine serum (10% FBS), penicillin (10,000 IU/mL), and streptomycin (10 mg/mL). The counting of viable macrophages was carried out in a Neubauer chamber and Blue Trypan staining, for analysis of cell viability (Rodrigues et al. 2015).

1.4. *In vitro* cell viability of murine macrophages by MTT assay

The evaluation of the cytotoxic activity of BPP-BrachyNH₂ in BALB/c murine macrophages was performed by MTT assay. Briefly, macrophages (1×10⁶/well) were incubated in 96-well plates with 100 µL of RPMI 1640 medium (Sigma, St. Louis, USA) at 37 °C and 5% CO₂ during 4 h. The BPP-BrachyNH₂ was incubated at different concentrations (10⁻¹² – 10⁻⁵ M) during 48 h, and 10 µL of MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) was added in each well from a stock solution at 5 mg/mL in PBS, and was incubated during 4 h. Rightly after, the supernatant was discarded and 100 µL of DMSO was added to each well. The plate was stirred during 30 min in order to completely dissolve the formazan salt. The absorbances were read at 550 nm (Absorbance microplate reader ELx800™, BioTek® Instruments, USA). The results were expressed as CC₅₀ (mean cytotoxic concentration for 50% of the cells) with the confidence intervals calculated by non-linear regression (Rodrigues et al. 2013; Rodrigues et al. 2015).

1.5. *In vivo* assessment of acute toxicity in mice

The toxicological evaluation of BPP-BrachyNH₂ was performed based on the Acute Toxic Class Method (OECD no. 423), an internationally recognized protocol by various regulatory agencies and recommended by the Organization for Economic Co-operation and Development–OECD (OECD 2002a). Female Swiss mice were divided in three groups with three animals each, one control group intraperitoneally treated with saline (0.1 mL/10 g body weight), and two other groups intraperitoneally treated with BPP-BrachyNH₂ at doses of 5.0 and 50 mg/kg, respectively. After the first week of observations, the treatments were repeated on other three groups of three animals each according to the presence or

1
2
3 absence of death, totaling six animals per treatment.
4
5

6 7 **1.5.1. Evaluation of clinical and behavioral parameters**

8
9 After administration of BPP-BrachyNH₂, the animals were monitored during the
10 first 8 h in order to observe the occurrence of death. After 24 h, the observation time for
11 each group was around 30 minutes to 1 hour. The animals were weighed daily, as well as
12 clinical and behavioral parameters were evaluated according to the Guidance Document on
13 the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs from OECD (OECD 2002b). The
14 main evaluated endpoints are listed in Table 1.
15
16
17
18

19 20 21 **1.5.2. Evaluation of serum biochemical parameters**

22
23 After 14 days of observation, animals were anesthetized with sodium thiopental (45
24 mg/kg), and then blood samples were collected from orbital plexus by a glass capillary tube
25 and collecting tubes with coagulation activator and separator gel (Vacuette, Greiner Bio-
26 One, Germany). The material was centrifuged at 3,500 rpm during 10 min, and then the
27 following biochemical parameters were evaluated: glucose, urea, creatinine, aspartate
28 aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP),
29 gamma-glutamyl transferase (GGT), lactate dehydrogenase (LDH), total cholesterol, and
30 triglycerides. The tests were performed using comercial kits following the manufacturer's
31 instructions (LABTEST[®] Pleno; Labtest, Lagoa Santa, MG, Brazil).
32
33
34
35
36
37
38
39

40 41 **1.5.3. Evaluation of body and relative organ weights**

42
43 The animals were daily weighed in order to obtain the dose-effect curve. After 14
44 days, the animals were anesthetized and then euthanized with a lethal dose of sodium
45 thiopental (100 mg/kg, i.p.). Right after, the organs (heart, lung, stomach, spleen, liver and
46 kidneys) were removed for gross pathology analysis (texture, consistency and color). Then,
47 the organs were weighed in order to calculate the relative weight, as follows: [body weight
48 (g) / animal weight on the day of necropsy (g)] × 100.
49
50
51
52
53
54

55 56 **1.5.4. Histopathological analyses**

57 After euthanasia, the organs (liver, spleen, kidney and lung) were carefully removed
58
59
60

1
2
3 and fixed in 10% formaldehyde solution during 72 h. For the histopathological analysis, the
4 fixed organs were dehydrated in solutions with increasing concentrations of ethanol (70%,
5 80%, 90% or 99.9%), diaphanized in xylene (3x), impregnated and embedded in warm
6 paraffin at 60 °C. Then, the histological sections were obtained by a microtome (5 µm
7 thick). Then, histological sections were submitted to the Hematoxylin & Eosin staining
8 method. Histopathological analyzes were performed by a single observer and the
9 photographic record made in digital camera coupled to an optical microscope.
10
11
12
13
14
15
16
17

18 **1.6. Statistical analyses**

19 Values are expressed as mean ± standard error of the mean (S.E.M.). Differences
20 between groups were determined by Student's t test analysis for unpaired samples. The
21 results were considered statistically significant when $p < 0.05$.
22
23
24
25

26 **References**

- 27
28
29
30 Arcanjo DDR, Vasconcelos AG, Comerma-Steffensen SG, Jesus JR, Silva LP, Pires OR, Costa-
31 Neto CM, Oliveira EB, Migliolo L, Franco OL, et al. 2015. A Novel Vasoactive Proline-Rich
32 Oligopeptide from the Skin Secretion of the Frog *Brachycephalus ephippium*. PLoS One.
33 10:e0145071.
34
35 OECD. 2002a. Test No. 423: Acute Oral toxicity - Acute Toxic Class Method. Paris: OECD
36 Publishing.
37
38 OECD. 2002b. Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as
39 Human Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. In: OECD Ser Test Assess.
40 Paris: OECD Publishing; p. 39.
41
42 Rodrigues KAF, Amorim LV, Dias CN, Moraes DFC, Carneiro SMP, Carvalho FAA. 2015.
43 *Syzygium cumini* (L.) Skeels essential oil and its major constituent α -pinene exhibit anti-
44 Leishmania activity through immunomodulation in vitro. J Ethnopharmacol. 160:32–40.
45
46 Rodrigues KAF, Amorim LV, de Oliveira JMG, Dias CN, Moraes DFC, Andrade EHA, Maia JGS,
47 Carneiro SMP, Carvalho FAA. 2013. *Eugenia uniflora* L. Essential Oil as a Potential Anti-
48 Leishmania Agent: Effects on *Leishmania amazonensis* and Possible Mechanisms of Action. Evid
49 Based Complement Alternat Med. 2013:279726.
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Table S1: Clinical and behavioral signs assessed after acute administration of BPP-BrachyNH₂ at doses of 5.0 and 50 mg/kg i.p.

Evaluated signs	Time (minutes)				
	30	60	120	180	240
STIMULANT					
Hyperactivity	0	0	0	0	0
Aggressiveness	0	0	0	0	0
Tremors	0	0	0	0	0
Convulsion	0	0	0	0	0
Piloerection	0	0	0	0	0
DEPRESSIVE					
Ptosis	0	0	0	0	0
Sedation	0	0	0	0	0
Anesthesia	0	0	0	0	0
Ataxia	0	0	0	0	0
Righting reflex	0	0	0	0	0
Catatonia	0	0	0	0	0
Analgesia	0	0	0	0	0
Loss of corneal reflex	0	0	0	0	0
Loss of auricular reflex	0	0	0	0	0
AUTONOMIC NERVOUS SYSTEM-RELATED					
Diarrhea	0	0	0	0	0
Constipation	0	0	0	0	0
Lacrimation	0	0	0	0	0
Salivation	0	0	0	0	0
Cyanosis	0	0	0	0	0
OTHERS					
Ambulation	0	0	0	0	0
Self-cleaning	0	0	0	0	0
Climb	0	0	0	0	0
Vocalization	0	0	0	0	0
Abdominal writhes	0	0	0	0	0
DEATHS					
	0	0	0	0	0

Legend: (0) Without effect.

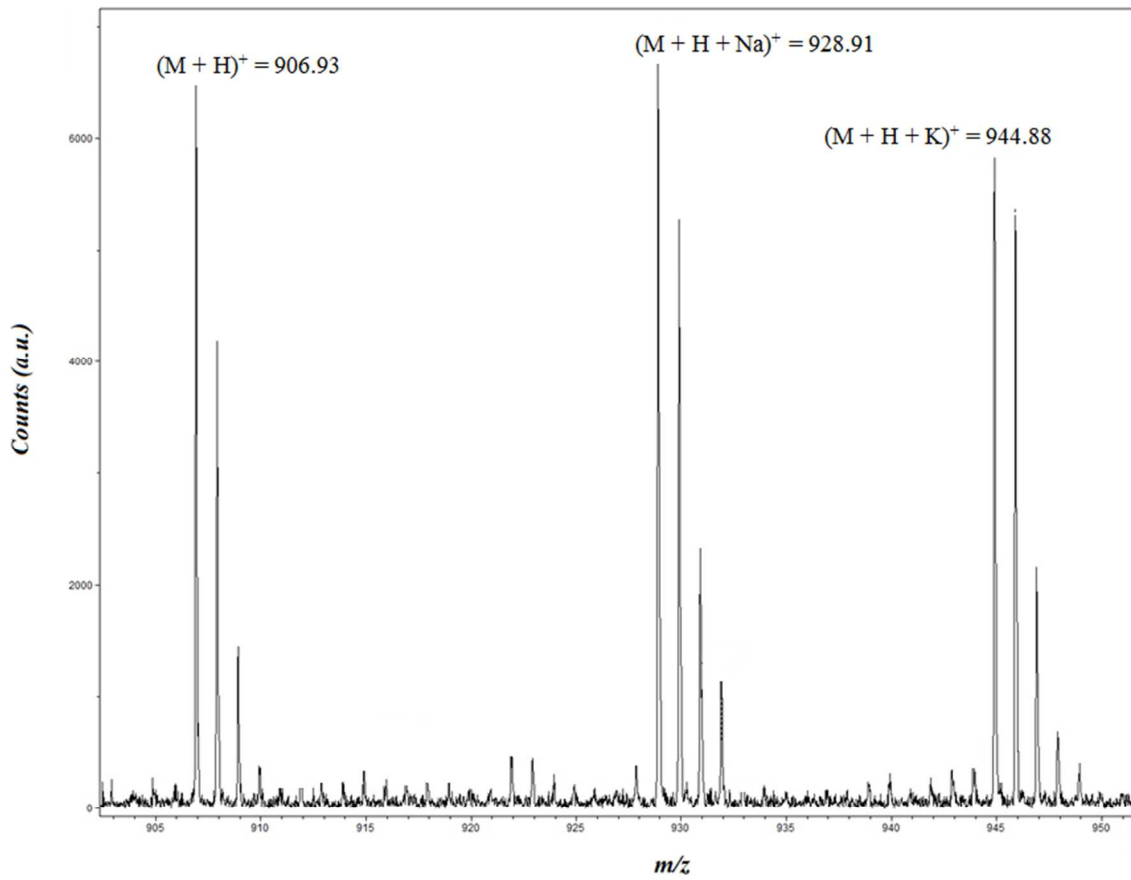


Figure S1: MS spectra of BPP-BrachyNH₂, [M+H]⁺ = 906.93.

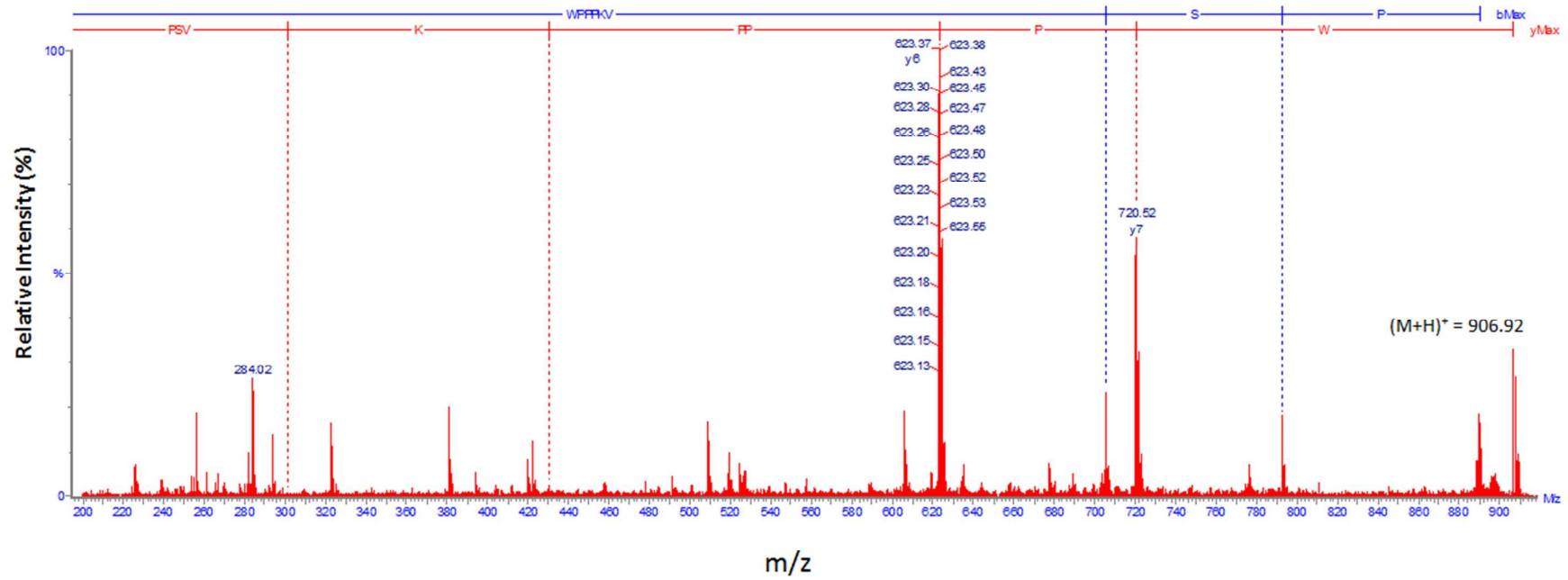


Figure S2: MS/MS spectra of BPP-BrachyNH₂, [M+H]⁺ = 906.92, acquired in an UltrafleXtreme MALDI-TOF/TOF.

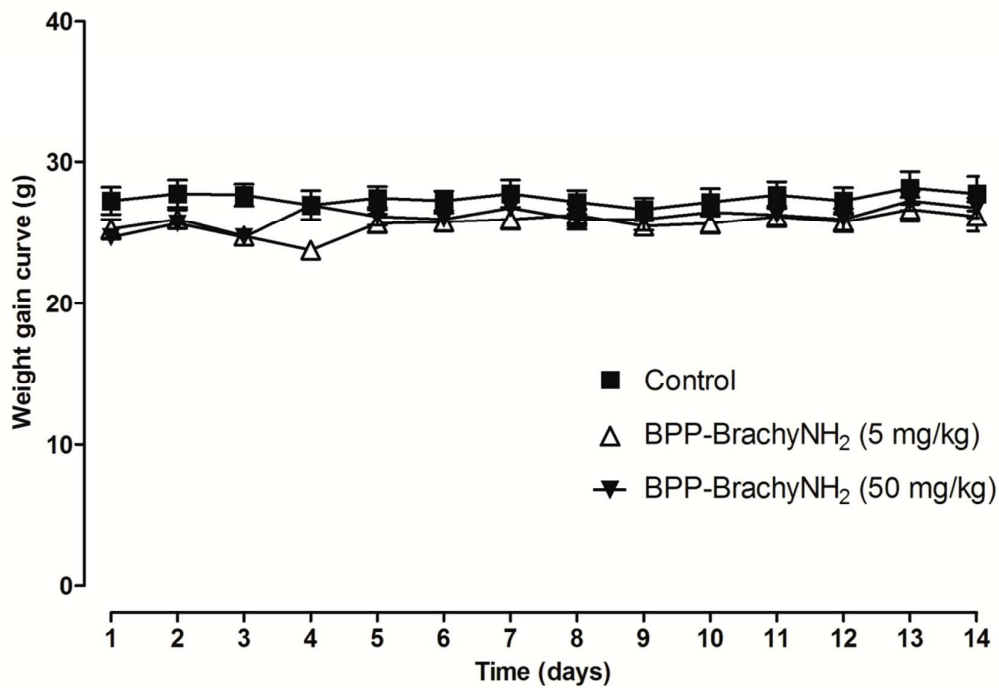


Figure S3: Evolution of the weight gain of the animals from control group (■) or intraperitoneally treated with BPP-BrachyNH₂ at doses of 5.0 (Δ) and 50 (▼) mg/kg. Data represented as mean ± SEM, n=6 animals per group.

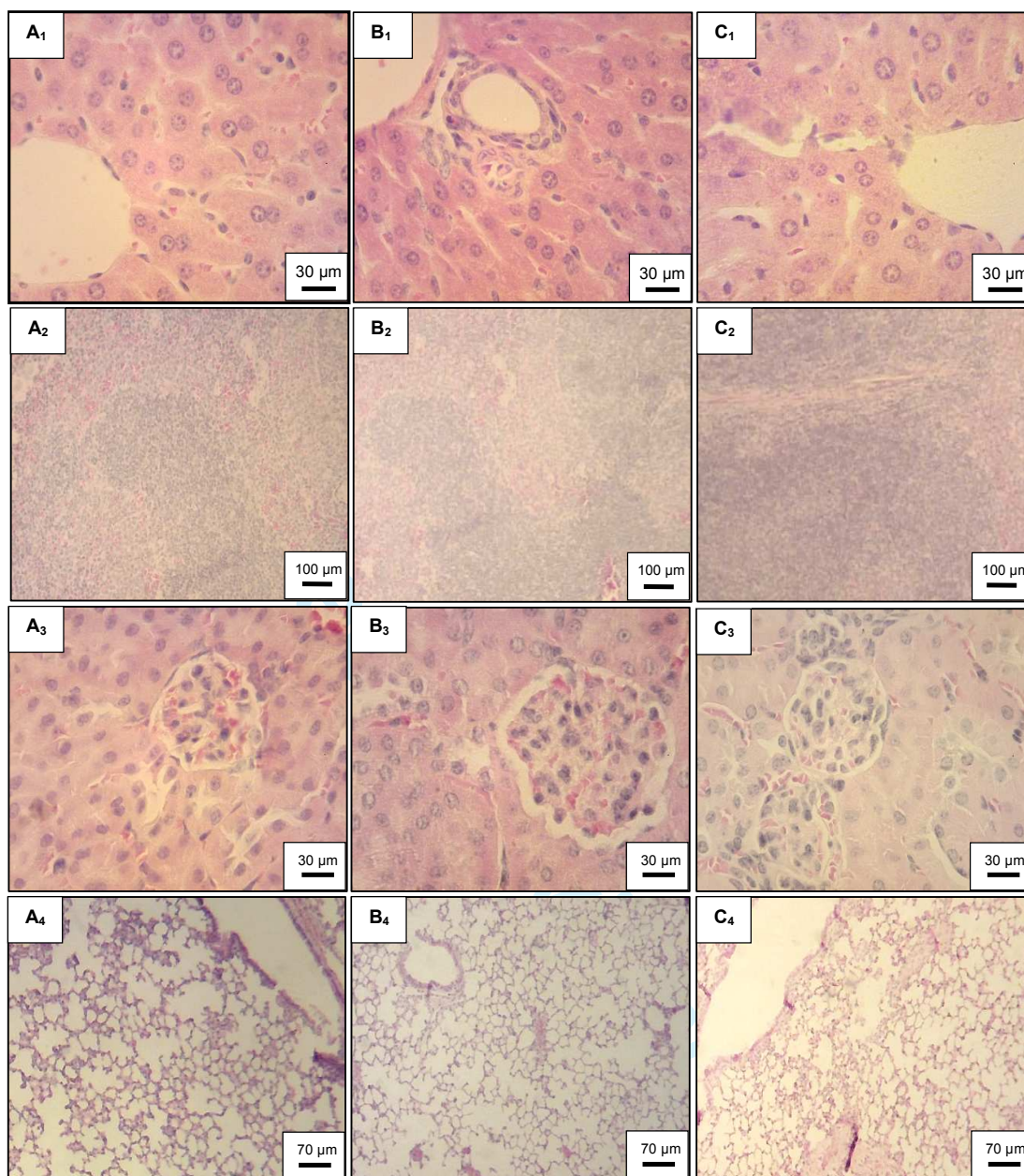


Figure S4: Photomicrographs of histological sections obtained from the liver (A₁, B₁, C₁), spleen (A₂, B₂, C₂), kidney (A₃, B₃, C₃) and lung (A₄, B₄, C₄) of animals (n=3) intraperitoneally treated with vehicle (A) or BPP-BrachyNH₂ at doses of 5.0 (B) and 50 (C) mg/kg. After 14 days, the animals were euthanized, and the organs were removed and processed to histopathological analysis. The results showed that the treatment with BPP-BrachyNH₂ did not show any changes compared with vehicle. Hematoxylin & Eosin staining.