



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ISADORA BASÍLIO MENESES BEZERRA

**ENVOLVIMENTO DA ENZIMA ARGININOSUCCINATO SINTETASE NO EFEITO
VASORRELAXANTE DO PEPTÍDEO BPP-BrachyNH₂ NA DISFUNÇÃO
ENDOTELIAL INDUZIDA POR ENDOTOXINA**

TERESINA

2019

ISADORA BASÍLIO MENESES BEZERRA

**ENVOLVIMENTO DA ENZIMA ARGININOSUCCINATO SINTETASE NO EFEITO
VASORRELAXANTE DO PEPTÍDEO BPP-BrachyNH₂ NA DISFUNÇÃO
ENDOTELIAL INDUZIDA POR ENDOTOXINA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Dias Rufino Arcaño

Coorientador: Prof. Dr. Ricardo Martins Ramos

TERESINA

2019

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

B574e Bezerra, Isadora Basílio Meneses.
Envolvimento da enzima argininosuccinato sintetase no efeito vasorrelaxante do peptídeo BPP- brachyNH₂ na disfunção endotelial induzida por endotoxina / Isadora Basílio Meneses Bezerra. – 2019.
77 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2019.
“Orientador: Prof. Dr. Daniel Dias Rufino Arcaño”.
“Coorientador: Prof. Dr. Ricardo Martins Ramos”.

1. *Brachycephalus ephippium*. 2. Disfunção endotelial.
3. Lipopolissacarídeo. 4. MDLA. 5. Ancoramento molecular.
I. Título.

CDD 597.8

ISADORA BASÍLIO MENESES BEZERRA

**ENVOLVIMENTO DA ENZIMA ARGININOSUCCINATO SINTETASE NO EFEITO
VASORRELAXANTE DO PEPTÍDEO BPP-BrachyNH₂ NA DISFUNÇÃO
ENDOTELIAL INDUZIDA POR ENDOTOXINA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Daniel Dias Rufino Arcanjo

Universidade Federal do Piauí (Presidente)

Prof.^a Dra. Alexandra Patrícia Rego Plácido do Nascimento

Universidade do Porto (Examinador Externo)

Prof. Dr. José Roberto de Souza de Almeida Leite

Universidade de Brasília (Examinador Externo)

Prof. Dr. João Paulo Jacob Sabino

Universidade Federal do Piauí (Examinador Interno)

Ao meu avô, Sebastião Waldeck (*in memoriam*)

AGRADECIMENTOS

A presente dissertação de mestrado não poderia chegar a bom porto sem o precioso apoio de várias pessoas. Em primeiro lugar, não posso deixar de agradecer ao meu orientador, Prof. Dr. Daniel Dias Rufino Arcanjo, por esta oportunidade que me foi concedida, pela sua orientação e pela confiança para realização deste projeto, por toda paciência, empenho e sentido prático com que sempre me orientou neste trabalho. Muito obrigada por me ter corrigido quando necessário sem nunca me desmotivar, pela dedicação dispensada e pelo o amor a ciência transmitido durante todo esse tempo.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Ricardo Martins Ramos e a seu grupo de pesquisa LAPESI no Instituto Federal do Piauí – IFPI que me orientou nos testes *in silico* de ancoramento e dinâmica molecular.

Aos amigos do Laboratório Interdisciplinar de Neurociências e Toxicologia (LINT), pela colaboração na realização dos experimentos e, principalmente, pela amizade, carinho, dedicação, ajudando nessa jornada.

A Prof.^a Andreлина, a Prof.^a Carol e todos do Laboratório de Eletrofisiologia da Universidade Estadual do Ceará por ter me acolhido de portas abertas em seu laboratório, concedendo a oportunidade de desenvolver parte desse trabalho, com quem pude aprender além de novas técnicas, a importância de perseguir novos conhecimentos.

A família que ganhei no ano de 2018, Tio Jorge, Tia Rosa, Hellen e Leno que me acolheram em seu lar como uma filha, agradeço todo carinho e cuidado que tiveram comigo, vocês são mais que especiais pra mim.

Ao CNPq pelo auxílio e apoio concedido, que foi de fundamental importância para o desenvolvimento desta pesquisa e ao CAPES pelo incentivo, suporte financeiro e por acreditar no potencial desta pesquisa.

A minha família pelo apoio incondicional, permanentes incentivadores de minha trajetória em busca do saber, especialmente, minha mãe Sâmia, minha irmã Clarissa, meu sobrinho Lucas, minha tia Jane e minha prima Ana Clara.

A George, meu namorado, me incentivando a acreditar que tudo daria certo, realmente, deu certo, e você é parte essencial deste trabalho.

A Deus que ilumina os meus caminhos e fortalece os meus passos.

Devemos estar dispostos a nos livrar da vida que planejamos para ter a vida que nos espera.

Joseph Campbell

BEZERRA, Isadora Basílio Meneses. **Envolvimento da enzima argininosuccinato sintetase no efeito vasorrelaxante do peptídeo BPP-BrachyNH₂ na disfunção endotelial induzida por endotoxina.** 2019. 77 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2019.

RESUMO

O BPP-BrachyNH₂, um oligopeptídeo rico em prolina identificado pela primeira vez na secreção cutânea do anfíbio *Brachycephalus ephippium*, apresenta potencial aplicação em estudos com ênfase no tratamento de doenças relacionadas a deficiência de NO, o presente estudo aborda o efeito vasorrelaxante do BPP-BrachyNH₂ em preparações de artérias de resistência do leito mesentérico de ratos em modelo de disfunção endotelial induzida por lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* e investigar os mecanismos de ação envolvidos na produção de NO causada pelo BPP-BrachyNH₂ através de abordagens *in vitro* e *in silico*. 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 - 10⁻⁵ M) foi cumulativamente adicionado sobre pré-contrações induzidas por noradrenalina (10⁻⁶ - 10⁻⁵ M). BPP-BrachyNH₂ apresentou efeito vasorrelaxante em preparações previamente incubadas com LPS (10 µg/mL) durante 5 horas. Não foi observado efeito vasorrelaxante na ausência de LPS. Os possíveis mecanismos envolvidos foram avaliados através da adição de indometacina (3×10⁻⁶ M), inibidor não seletivo da cicloxigenase; L-NNA (10⁻⁴ M), inibidor não seletivo da óxido nítrico sintase; 1400W (10⁻⁵ M), inibidor seletivo da óxido nítrico sintase induzível; ODQ (3×10⁻⁶ M), inibidor da guanilil ciclase solúvel, e MDLA (1 mM), inibidor da argininosuccinato sintetase (AsS), conforme protocolo. Os resultados foram expressos como média±EPM, e foram analisados por ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Bonferroni (p<0,05). O efeito vasorrelaxante induzido pelo BPP-BrachyNH₂ em preparações pré-incubadas com LPS foi abolido na presença de L-NNA e ODQ, e significativamente atenuado na presença de 1400W e MDLA. A redução do efeito vasorrelaxante de BPP-BrachyNH₂ em artérias de resistência na presença de L-NNA, 1400W e ODQ corrobora com estudos prévios, que sugerem o envolvimento da via de produção de NO. A atenuação significativa do efeito do BPP-BrachyNH₂ na presença de MDLA, indica o envolvimento de um possível aumento nos níveis de L-arginina, substrato para síntese de NO, induzido pelo BPP-BrachyNH₂ em modelo de disfunção endotelial induzida por LPS. Os cálculos de ancoramento e dinâmica molecular foram realizados com o programa Autodock 4.2 escolhendo-se o algoritmo genético lamarquiano (LGA) para a busca de geometrias otimizadas. A estrutura da enzima (AsS) e dos ligantes (L-citrulina e BPP-BrachyNH₂) foram preparados com o programa AutoDock Tools 1.5.6. para simulações de ancoramento. Cada simulação de ancoramento LGA consistiu de 100 corridas independentes. O complexo AsS_BPP-BrachyNH₂ apresentou melhores parâmetros de afinidade (energia de ligação, constante de inibição e quantidade de interações com aminoácidos) comparados com o complexo AsS_L-citrulina.

Palavras-chaves: *Brachycephalus ephippium*; Disfunção endotelial; Lipopolissacarídeo; MDLA; Oligopeptídeo rico em prolina; Óxido nítrico; Vasodilatador; Ancoramento molecular.

BEZERRA, Isadora Basílio Meneses. **Involvement of the enzyme argininosuccinate sintetase in the vasorelaxant effect of peptide BPP-BrachyNH₂ in endothelial dysfunction induced by endotoxin.** 2019. 79 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2019.

ABSTRACT

BPP-BrachyNH₂, a proline-rich oligopeptide identified for the first time in the amphibian cutaneous secretion *Brachycephalus ephippium*, has potential application in studies with emphasis on the treatment of diseases related to NO deficiency, the present study addresses the vasorelaxative effect of BPP-BrachyNH₂ in preparations of rat mesenteric bed endurance arteries in a model of *Escherichia coli* lipopolysaccharide (LPS) induced endothelial dysfunction and to investigate the mechanisms of action involved in the production of NO caused by BPP-BrachyNH₂ through *in vitro* and *in silico* approaches. Segments of arteries were mounted on a Mulvany-Halpern type myograph for isometric voltage records. After normalization and endothelial function testing, BPP-BrachyNH₂ (10⁻⁹ - 10⁻⁵ M) was cumulatively added on pre-contractions induced by noradrenaline (10⁻⁶ - 10⁻⁵ M). BPP-BrachyNH₂ presented vasorelaxing effect in preparations previously incubated with LPS (10 µg / mL) for 5 hours. No vasorelaxant effect was observed in the absence of LPS. The possible mechanisms involved were evaluated by the addition of indomethacin (3 x 10⁻⁶ M), non-selective cyclooxygenase inhibitor; L-NNA (10⁻⁴ M), non-selective inhibitor of nitric oxide synthase; 1400W (10⁻⁵ M), selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase; ODQ (3 x 10⁻⁶ M), soluble guanylyl cyclase inhibitor, and MDLA (1 mM), argininosuccinate synthetase inhibitor (AsS), according to protocol. The results were expressed as mean ± SEM, and were analyzed by one-way ANOVA followed by the Bonferroni post-test (p <0.05). The vasopressin effect induced by BPP-BrachyNH₂ in preparations pre-incubated with LPS was abolished in the presence of L-NNA and ODQ, and significantly attenuated in the presence of 1400W and MDLA. The reduction of the vasorelaxant effect of BPP-BrachyNH₂ on resistance arteries in the presence of L-NNA, 1400W and ODQ corroborates previous studies that suggest the involvement of the NO production pathway. The significant attenuation of the effect of BPP-BrachyNH₂ on the presence of MDLA indicates the involvement of a possible increase in the levels of L-arginine, a substrate for NO synthesis, induced by BPP-BrachyNH₂ in a model of LPS-induced endothelial dysfunction. The anchoring and molecular dynamics calculations were performed with the Autodock 4.2 program, choosing the Lamarque (LGA) genetic algorithm to search for optimized geometries. The structure of the enzyme (AsS) and ligands (L-citrulline and BPP-BrachyNH₂) were prepared with the AutoDock Tools 1.5.6 program. for anchor simulations. Each LGA anchor simulation consisted of 100 independent runs. The AsS_BPP-BrachyNH₂ complex showed better affinity parameters (binding energy, inhibition constant and amount of interactions with amino acids) compared to the AsS_L-citrulline complex.

Key-words: *Brachycephalus ephippium*; Endothelial dysfunction; Lipopolysaccharide; MDLA; Proline-rich oligopeptide; Nitric oxide; Vasodilator.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Papel da ECA nos sistemas renina-angiotensina e calicreína-cinina.....	21
Figura 2 - Via biossintética <i>de novo</i> para produção de arginina.....	28
Figura 3 - Ciclo de citrulina.....	30
Figura 4 – NO derivado do endotélio: Produção e Ações biológicas.....	34
Figura 5 – Ilustração de algoritmos de busca aleatória na ancoramento proteína-proteína.....	41
Figura 6 – (A) Leito mesentérico dissecado; (B) Montagem do miógrafo e ilustração da circunferência interna da artéria e (C) Gráfico representativo da resposta do vaso a estímulos de contração e relaxamento.....	45
Figura 7 – Desenho experimental do protocolo de teste de viabilidade funcional das artérias mesentéricas.....	46
Figura 8 – Desenho experimental do protocolo de investigação do efeito vasorrelaxante do BPP-BrachyNH ₂ em preparações estimuladas com LPS.....	46
Figura 9 – Desenho experimental do protocolo de investigação da participação de fatores endoteliais.....	48
Figura 10 – Efeito vasorrelaxante induzido por BPP-BrachyNH ₂ (10 ⁻⁹ – 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+)......	53
Figura 11 – Efeito da do INDO (A), do 1400W (B) sobre a resposta vasorrelaxante induzida por BPP-BrachyNH ₂ (10 ⁻⁹ – 3x10 ⁻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+)......	54

Figura 12 – Efeito do L-NNA (A) e ODQ (B) sobre a resposta vasorrelaxante induzida por BPP-BrachyNH₂ (10⁻⁹ – 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+).....55

Figura 13 – Efeito do MDLA sobre a resposta vasorrelaxante induzida por BPP-BrachyNH₂ (10⁻⁹ – 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+).....56

Figura 14 - Representação esquemática da estrutura do A) BPP-BrachyNH₂ (bastão vermelho) com a enzima AsS (em fita), B) L-citrulina (bastão verde) com a enzima AsS (em fita) e C) BPP-BrachyNH₂_L-citrulina_AsS (representadas em bastão azul e bola, bastão verde e bola e fitas, respectivamente) e Asn123 (bastão vermelho).....57

Figura 15 - Contatos identificados entre os ligantes e AsS calculados para os últimos 4,0 ns de simulações DM. (A) BPP-BrachyNH₂, (B) L-citrulina, (C) BPP-BrachyNH₂ na presença de L-citrulina e (D) L-citrulina na presença de BPP-BrachyNH₂.....59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Afinidade dos parâmetros do encaixe molecular.....58

Tabela 2 - Energias de ligação de complexos proteína-ligante obtidos por g_mmpbsa.....59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1400W	N-(3-(Aminometil)benzil)-acetamidina
ADMA	Dimetilarginina assimétrica
ACh	Acetilcolina
ADT	AutoDock Tools
Ala	Alanina
Ang I	Angiotensina I
Ang II	Angiotensina II
AMP	Adenosina monofosfato
ANOVA	Análise de variância
Arg	Arginina
ARRIVE	Animal Research: Reporting <i>in vivo</i> experiments
AsL	Argininosuccinato liase
Asn	Asparagina
Asp	Aspartato
AsS	Argininosuccinato sintetase
ATP	Adenosina trifosfato
BH₄	Tetraidrobiopterina
Bj	<i>Bothrops jararaca</i>
Bk	Bradicinina
BPF	Fator de potencialização de bradicinina
BPP	Peptídeo potencializador de bradicinina
CAT	Transportador de aminoácidos catiônicos
CaM	Calmodulina
CEUA	Comitê de ética para uso de animais
CMLV	Células musculares lisas vasculares
CI	Circunferência Interna
CI₁₀₀	CI da artéria exposta à pressão transmural de 13,3 kPa (100 mmHg)
Cys	Cisteína
COX	Ciclooxigenase
DM	Dinâmica molecular
DOPE	Energia protéica discreta otimizada

ECA	Enzima conversora de angiotensina-I
EDRF	Fator relaxante derivado do endotélio
E_{máx}	Efeito de relaxamento máximo
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
EPM	Erro padrão da média
GCs	Guanilil ciclase solúvel
Gln	Glutamina
Gly	Glicina
Glu	Glutamato
GMPc	Monofosfato de guanosina cíclico
GTP	Trifosfato de guanosina
H₂S	Sulfeto de hidrogênio
His	Histidina
HUVEC	Células endoteliais de veia umbilical humana
IFN – γ	Interferon gama
Ile	Isoleucina
INDO	Indometacina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
K_i	Constante de inibição
K_m	Constante enzimática
Leu	Leucina
LGA	Algoritmo genético lamarquiano
L-NAME	N ^G -nitro-L-arginina éster metílico
L-NNA	N ^G -Nitro-L-arginina
LPS	Lipopolissacarídeo
Lys	Lisina
MALDI-TOF	<i>Matriz-assisted laser Desorption/Ionization Time of Flight</i>
MDLA	Ácido alfa-metil-DL-aspártico
Met	Metionina
MM/GBSA	Mecânica molecular / área de superfície de Borne generalizada
MM/PBSA	Mecânica molecular / área de superfície de Poisson-Boltzmann
MS	Espectrometria de massa
Mulvany-PSS	Solução fisiológica salina de Mulvany

NA	Noradrenalina
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido Nítrico Sintase
Ns	Nanossegundos
ONOO⁻	Peroxinitrito
ODQ	1 H-[1,2,4] oxadiazólo [4,3-a] quinoxalin-1-ona
PDB	Banco de dados de proteínas
Phe	Fenilalanina
PKA	Proteína quinase A
PPi	Pirofosfato inorgânico
Pro	Prolina
PRO	Oligopeptídeo rico em prolina
RMSD	Raiz quadrada do erro-médio
Ser	Serina
SHR	Rato espontaneamente hipertenso
SPC	Carga pontual simples
Thr	Treonina
Trp	Triptofano
Tyr	Tirosina
Val	Valina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVOS	19
2.1 <i>Objetivo geral</i>	19
2.2 <i>Objetivos específicos</i>	19
3. REFERENCIAL TEÓRICO	20
3.1 <i>Oligopeptídeos ricos em prolina: histórico</i>	20
3.2 <i>Um novo alvo: Argininosuccinato sintetase</i>	28
3.3 <i>Endotélio, óxido nítrico e biologia vascular</i>	32
3.4 <i>Disfunção endotelial e NO</i>	35
3.5 <i>Modelagem Molecular</i>	40
4. MATERIAIS E MÉTODOS	43
4.1 <i>Síntese do peptídeo</i>	43
4.2 <i>Animais</i>	43
4.3 <i>Isolamento das artérias, preparação dos anéis e normalização</i>	44
4.4 <i>Teste de viabilidade funcional das artérias mesentéricas</i>	45
4.5 <i>Investigação do efeito vasorrelaxante do BPP-BrachyNH₂ em preparações estimuladas com LPS</i>	46
4.6 <i>Participação da NO sintase induzível (iNOS) e da cicloxigenase (COX) no efeito do BPP-BrachyNH₂</i>	47
4.7 <i>Participação da via NO/GMPc no efeito do BPP-BrachyNH₂</i>	47
4.8 <i>Participação da Argininosuccinato Sintetase (AsS) no efeito do BPP-BrachyNH₂</i>	47
4.9 <i>Análise Estatística</i>	48
4.10 <i>Estudos de interação da AsS-ligantes in silico</i>	48
4.10.1 <i>Configuração de AsS e ligantes</i>	48
4.10.2 <i>Modelagem por homologia</i>	49
4.10.3 <i>Ancoramento molecular</i>	49
4.10.4 <i>Simulações por Dinâmica Molecular (DM)</i>	50
4.10.5 <i>Mecânica molecular Poisson-Boltzmann área de superfície MM-PBSA</i>	51
5. RESULTADOS	53
5.1 <i>Investigação do efeito vasorrelaxante do BPP-BrachyNH₂ em preparações estimuladas com LPS</i>	53
5.2 <i>Participação da NOS induzível (iNOS) e da cicloxigenase (COX) no efeito do BPP-BrachyNH₂</i>	54
5.3 <i>Participação da via NO/GMPc no efeito do BPP-BrachyNH₂</i>	55
5.4 <i>Participação da Argininosuccinato Sintetase (AsS) no efeito do BPP-BrachyNH₂</i>	56

5.5 Estudos de interação <i>in silico</i> com AsS.....	57
6. DISCUSSÃO.....	60
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	66
REFERÊNCIAS	67

1. Introdução

Os peptídeos potencializadores de bradicinina (BPP) da *Bothrops jararaca* (Bj), descobertos no início dos anos 60, foram os primeiros inibidores naturais da enzima conversora de angiotensina I (ECA). Estes peptídeos pertencem a uma grande família de oligopeptídeos ricos em prolina (PRO) cujas propriedades biológicas estão relacionadas com a inibição da conversão de angiotensina I (Ang-I) em angiotensina II (Ang-II) e da degradação de bradicinina (Bk). Um dos peptídeos estudados, o Bj-PRO-9a, foi fundamental na definição da ECA como alvo eficaz de drogas e desenvolvimento do captopril, uma molécula que compete por sítios ativos de ligação da ECA, usado para o tratamento da hipertensão arterial humana. Evidências experimentais atualmente demonstram que os BPPs agem não somente sobre a ECA, mas exercem seus efeitos cardiovasculares sobre diferentes alvos para diferentes tipos de BPPs encontrados (CAMARGO et al., 2012; DENADAI et al., 2007; GUERREIRO et al., 2009; LAMEU; ULRICH, 2013; MORAIS et al., 2013). Em estudos recentes, Guerreiro et al. (2009) demonstrou a argininosuccinato sintetase (AsS) como um novo alvo dos BPPs, o Bj-PRO-10c foi capaz de ativar a AsS e reduzir os níveis de L-arginina tanto *in vivo* quanto *in vitro*.

A descoberta e identificação da AsS como outro alvo para os Bj-PROs, demonstrou *in vitro* e *in vivo* a capacidade de modulação positiva da atividade dessa enzima, que leva à síntese de L-arginina a partir de L-citrulina. A L-arginina é um aminoácido não essencial sob condições normais, pois é obtido a partir da quebra de proteínas ou sintetizada *de novo* a partir de L-citrulina nos rins por AsS e a enzima argininosuccinato liase (AsL). AsS catalisa a condensação reversível de citrulina com aspartato e ATP para formar argininosuccinato; a AsL catalisa a conversão do argininosuccinato em fumarato e L-arginina, que é liberado na circulação (GUERREIRO et al., 2009; IANZER et al., 2011; LAMEU; ULRICH, 2013).

Em mamíferos, a AsS, juntamente com a AsL, faz parte do ciclo da ureia no fígado, do ciclo arginina-citrulina e do ciclo citrulina-NO, a principal fonte de arginina e óxido nítrico (NO) nas células renais e endoteliais, respectivamente. Reconhece-se que a biossíntese prejudicada da arginina afeta uma série de vias metabólicas e de sinalização, como a geração de uma ampla gama de intermediários biologicamente ativos, por exemplo, NO, poliaminas, creatinina e L-aminoácidos. Nas células endoteliais, o ciclo citrulina-NO, juntamente com a óxido nítrico sintase (NOS), garante o suprimento de NO, que desempenha vários papéis como molécula de sinalização na fisiologia dos mamíferos, incluindo a regulação do tônus vascular (CAMARGO et al., 2012; HUSSON et al., 2003; WU; MORRIS, 1998).

Quando a capacidade das células endoteliais para liberar NO é reduzida, e em particular se a propensão para produzir fatores de contração derivados do endotélio é aumentada, a disfunção endotelial se inicia, o que parece ser o primeiro passo na cadeia de eventos que leva a aterosclerose, hipertensão e diabetes. Assim, a disfunção endotelial é a marca e, de fato, um preditor de doença vascular. O papel da gênese da doença vascular nas mudanças da reatividade vascular devido ao desequilíbrio entre mediadores derivados do endotélio tem sido alvo de vários estudos (VANHOUTTE et al., 2017).

Por todas estas razões, manter a produção de NO em nível homeostático, de modo que um limiar deletério não seja atingido, é de particular interesse. O presente estudo revela a complexidade dos efeitos exercidos pelo PRO obtido a partir da secreção cutânea do anfíbio *Brachycephalus ephippium*, denominado BPP-BrachyNH₂, no controle da produção de NO em estudos experimentais no em preparações de endotélio vascular pré-tratadas com lipopolissacarídeo (LPS), causando uma condição fisiopatológica que leva à disfunção endotelial e, em estudos computacionais, que buscam averiguar o possível envolvimento da enzima AsS na atividade do peptídeo BPP-BrachyNH₂. Esta pesquisa, abre caminhos para o melhor entendimento da regulação do NO e para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas, e assim, contribuir com o fortalecimento das potenciais aplicações terapêuticas dos PRO em doenças relacionadas à deficiência de NO e de seus possíveis alvos farmacológicos envolvidos.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

- Investigar as características do efeito vasorrelaxante do oligopeptídeo rico em prolina denominado BPP-BrachyNH₂, presente na secreção cutânea do anfíbio *Brachycephalus ephippium*, em modelo experimental *in vitro* de disfunção endotelial induzido por LPS em anéis de artéria mesentérica de resistência de ratos, e em modelo computacional *in silico* com a realização de ensaios de ancoramento e dinâmica molecular.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito vasorrelaxante do BPP-BrachyNH₂ em artérias de resistência de ratos na presença e ausência de LPS;
- Investigar os mecanismos de ação envolvidos no efeito vasorrelaxante induzido pelo oligopeptídeo BPP-BrachyNH₂ em anéis de artéria mesentérica de resistência de ratos;
- Verificar o possível envolvimento da enzima Argininosuccinato Sintetase (AsS) através de protocolos *in vitro* em artéria do leito mesentérico e *in silico* através de ancoramento e dinâmica molecular.

3. Referencial Teórico

3.1 Oligopeptídeos ricos em prolina: histórico

Venenos de animais podem ser vistos como um coquetel inexplorado de compostos biologicamente ativos, sendo cada vez mais reconhecidos como uma fonte inestimável de ligantes para o estudo das propriedades de alvos farmacológicos e como fonte emergente de peptídeos com potenciais aplicações terapêuticas. Os animais peçonhentos, considerados predadores especializados que desenvolveram a mais sofisticada química e farmacologia de peptídeos para seus próprios propósitos biológicos, produzem venenos que contêm uma vasta gama de toxinas com uma incrível diversidade estrutural e funcional, dirigidos contra uma variedade de alvos farmacológicos (LEWIS; GARCIA, 2003; PEIGNEUR; TYTGAT, 2018).

Os estudos dos mecanismos fisiopatológicos do envenenamento e caracterização molecular de toxinas do veneno da serpente *Bothrops jararaca* (*Bj*) resultou em importantes contribuições científicas de grande relevância para a ciência, como a descoberta de um potente agente vasodilatador, denominado bradicinina (Bk) por Rocha e Silva e Beraldo, em 1949. Os peptídeos bioativos da *Bj* foram os primeiros inibidores naturais da enzima conversora da angiotensina I (ECA) descritos e são conhecidos como peptídeos potencializadores de bradicinina (BPPs). Esses peptídeos não só foram importantes na validação da ECA como alvo para o tratamento da hipertensão humana, mas também como modelo para o desenvolvimento do captopril, o primeiro inibidor da ECA e o primeiro medicamento comercialmente disponível para tratamento da hipertensão (CUSHMAN et al., 1977; IANZER et al., 2011; LEWIS; GARCIA, 2003; ONDETTI; CUSHMAN, 1981; QUEROBINO; RIBEIRO; ALBERTO-SILVA, 2018).

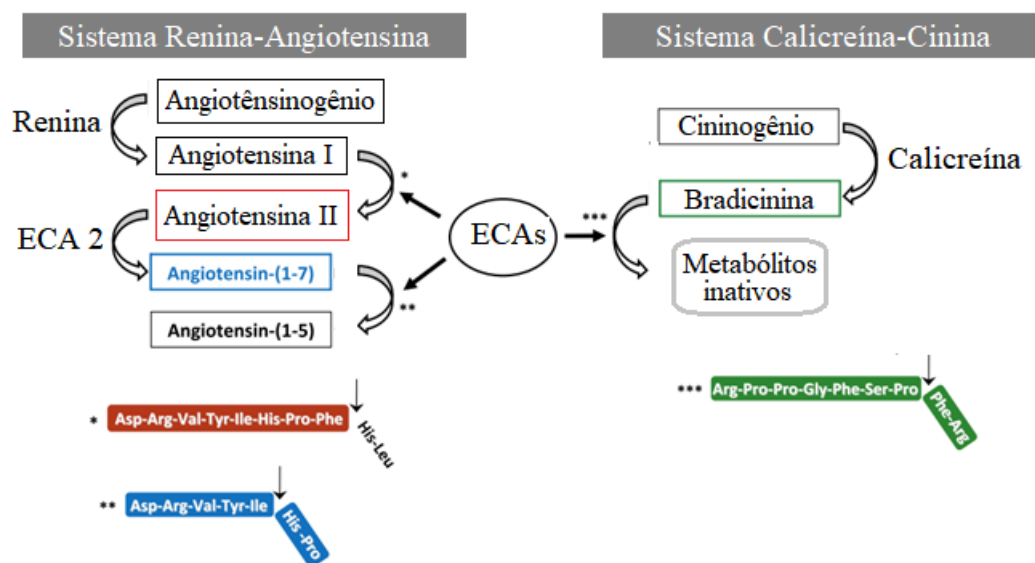
Os BPPs fazem parte de uma família de peptídeos denominados “Oligopeptídeos Ricos em Prolina” (PRO – *Proline-Rich Oligopeptides*), cujas sequências variam entre 5 e 14 resíduos de aminoácidos e exibem um resíduo de ácido piroglutâmico comum na posição N-terminal e um resíduo de prolina na posição C-terminal. Os BPPs são moléculas capazes de potencializar algumas atividades farmacológicas da Bk, como por exemplo, a ação contrátil da musculatura lisa do íleo isolado de cobaia (FERREIRA, 1965). Os primeiros BPPs do veneno da *Bj* foram caracterizados em 1970 (FERREIRA; BARTELT; GREENE, 1970), e desde então, uma grande variedade de peptídeos apresentando características estruturais semelhantes foram identificados

no veneno dessa e de outras serpentes (HAYASHI; CAMARGO, 2005). Esses peptídeos são descritos como moléculas anti-hipertensivas que inibem a degradação da Bk, potencializando sua atividade, e inibem a formação de Ang-II (CAMARGO et al., 2012; MORAIS et al., 2013; QUEROBINO; RIBEIRO; ALBERTO-SILVA, 2018; SCIANI; PIMENTA, 2017).

A descoberta da Bk permitiu a elucidação de um sistema de complexas reações denominado “sistema caliceína-cininas”, uma cascata metabólica que gera uma família de peptídeos bioativos, denominados cininas, com diferentes atividades biológicas e que inclui Bk, que é a principal, e calidina e seus respectivos metabólitos. A Bk e seus peptídeos relacionados são gerados pela ação de enzimas caliceínas em substratos cininogênicos. A Bk e a calidina são liberadas de cininogênios predominantemente pela ação das serino-proteases, caliceína plasmática e caliceína tecidual, respectivamente. Essas cininas são potentes vasodilatadores dependentes de endotélio que contribuem para a vasodilatação e hipotensão na circulação sistêmica (CAMPBELL, 2013).

A ECA, uma metaloproteinase chave do sistema renina-angiotensina, é responsável pela formação da Ang-II, um octapeptídeo com propriedades hipertensivas, resultante da hidrólise do dipeptídeo C-terminal His-Leu da Ang-I. A ECA desempenha um papel importante no metabolismo da Bk, produzindo Bk-(1-5), o mais abundante metabólito da Bk por clivagem sequencial do dipeptídeo carboxiterminal da Bk, levando a sua consequente degradação e a cessação de seus efeitos farmacológicos (FIGURA 1). (CAMARGO et al., 2012; LAMEU; ULRICH, 2013; SCIANI; PIMENTA, 2017).

Figura 1 - Papel do ECA nos sistemas renina-angiotensina e caliceína-cinina (adaptada CAMARGO et al., 2012).



A ECA exibe dois sítios ativos homólogos, um na região C-terminal e outro na região N-terminal da proteína. Enquanto ambos os sítios ativos convertem a Ang-I em Ang-II e clivam a Bk em Bk-(1-5) e Bk-(1-7) (metabólitos inativos), o sítio na região C-terminal é mais efetivo na hidrólise desses peptídeos vasoativos. Ou seja, a ECA tanto aumenta a degradação da Bk quanto aumenta a formação de Ang-II, portanto, sua inibição é composta por dois alvos diferentes, causando efeitos hipotensores globais. Desse modo, os sistemas caliceína-cininas e renina-angiotensina são dois sistemas que interagem em diferentes níveis e contribuem para a homeostase do sistema cardiovascular (CAMARGO et al., 2012; LAMEU; ULRICH, 2013; SCIANI; PIMENTA, 2017).

A base primordial para o desenvolvimento do captopril iniciou com Rocha e Silva e colaboradores, em 1949, quando descobriram que o plasma, quando incubado com o veneno da serpente *Bj*, gerava novo fator hipotensor e espasmogênico para musculatura lisa, denominado Bk (ROCHA E SILVA; BERALDO, 1949). A descoberta de que as carboxipeptidases eram metaloproteinases de zinco e que a inativação da Bk no plasma estava relacionada a atividade de uma carboxipeptidase (ERDOS; WOHLER, 1963; VALLEE, 1961) baseou a descoberta dos primeiros agentes queladores de metais, como o dimercapto, agentes que intensificavam os efeitos da Bk (FERREIRA; SILVA, 1962). Ferreira (1965) observou, durante um experimento no qual testava a habilidade do veneno da *Bj* em potencializar a atividade espasmogênica da Bk em preparações isoladas do íleo de cobaia, que no veneno propriamente dito havia um potente fator de potencialização da bradicinina (BPF – *Bradykinin Potentiating Factor*) descrito como uma família de pequenos peptídeos presente no veneno da *Bj*.

Em 1967, Ferreira realizou o isolamento, caracterização e definição da potência relativa de 9 peptídeos extraídos do BPF, que foram utilizados para demonstrar o paralelismo existente entre a inibição da conversão da angiotensina e potencialização da Bk. Em sequência, a estrutura do menor peptídeo do BPF foi determinada, o BPP-5a (FERREIRA et al., 1970; FERREIRA; BARTELT; GREENE, 1970; GREENE; STEWART; FERREIRA, 1970). E com o BPP-5a, foi realizada a primeira demonstração *in vivo* de que um peptídeo potencializador da Bk tinha efeito hipotensor em três modelos de hipertensão experimental em virtude da intensa atividade do sistema renina-angiotensina (KRIEGER et al., 1971).

A estrutura e a síntese do BPP-9a (teprotídeo) foi realizada pelo grupo de pesquisadores da indústria farmacêutica Squibb, e apresentava-se mais efetivo e de efeito mais duradouro que o BPP-5a na pressão arterial, tanto para a potencialização da Bk como para a inibição da conversão da Ang-I (GREENE; LEWIS J. et al., 1972; ONDETTI et al., 1971). Em seguida, o

BPP-9a foi utilizado na primeira demonstração clínica da utilidade dos BPPs no controle da hipertensão humana, onde se observou uma redução significativa da pressão arterial em pacientes hipertensos após administração parenteral do peptídeo (GAVRAS et al., 1974).

Entretanto, o teprotídeo, isolado do veneno da *Bj* escolhido como molécula líder devido à sua longa duração na atividade *in vivo*, era inaceitável do ponto de vista clínico, pois não era oralmente ativo e sua síntese, muito cara. Despertou, assim, enorme interesse dos pesquisadores na busca do desenvolvimento de um inibidor não peptídico específico para a ECA efetivo por via oral. O grande tamanho molecular necessário para se atingir uma atividade intrínseca aliada à instabilidade metabólica originados das múltiplas ligações peptídicas contribuíram para eliminar as possibilidades de aplicação dos peptídeos por via oral (CUSHMAN; ONDETTI, 1999; FERREIRA, 1998; IANZER et al., 2007).

Os estudos de relação estrutura-atividade do teprotídeo com análogos do veneno sintético ajudaram na compreensão dos sítios ativos da ECA e indicaram uma sequência ótima de aminoácidos na região carboxiterminal de inibidores, Phe-Ala-Pro (CUSHMAN; ONDETTI, 1999), era um farmacóforo mínimo para se ajustar a um sítio de ligação de substrato hipotético na ECA desenvolvido a partir da estrutura cristalina da carboxipeptidase A. A descoberta da possibilidade de sintetizar inibidores não-peptídicos da carboxipeptidase-A a partir de um derivado do ácido benzilsuccínico por Byers e Wolfenden (1972), conduziu ao um passo fundamental, à síntese do primeiro inibidor seletivo da ECA, porém de menor potência, denominado succinil-L-Pro. O succinil-L-Pro foi o primeiro inibidor da ECA projetado, mas mostrou baixa afinidade apesar da seletividade da ECA (BYERS; WOLFENDEN, 1972).

Estudos adicionais em torno do succinil-L-Pro, incluindo a adição de um grupo sulfidrila, que apresentou uma maior afinidade pela ligação Zn^{2+} , aumentando em 1000 vezes sua potência inibitória da ECA, sendo responsáveis pela descoberta do primeiro inibidor da ECA com reduzido tamanho e igual, ou até melhor, atividade anti-hipertensiva por via oral em relação à via parenteral (CAMARGO et al., 2012; CUSHMAN; ONDETTI, 1999).

O captopril é um verdadeiro peptidomimético, possuindo um quinto do tamanho do teprotídeo, e apresenta quase todos os grupos funcionais contribuindo para a atividade global, preenchendo cada um dos locais de ligação do substrato para produzir uma interação de alta afinidade com o sítio ativo na ECA (CUSHMAN; ONDETTI, 1999; LEWIS; GARCIA, 2003).

A partir daí, e desde o início dos anos de 1980, o captopril tem sido amplamente empregado no tratamento da hipertensão arterial sistêmica humana. Assim, a partir do final da década de 1970, o sucesso do desenvolvimento dos inibidores sítios-dirigidos da ECA capazes de reproduzir as principais propriedades farmacológicas dos BPPs diminuiu drasticamente o interesse em aprofundar os estudos sobre seus mecanismos de ação (GUERREIRO, 2009; SMITH; VANE, 2003).

A partir da descoberta dos BPPs, em 1949, por Rocha e Silva, Beraldo e Rosenfeld, estudos biológicos foram conduzidos a descoberta de vários outros BPPs e de fontes diferentes, como escorpiões, cobras de outras espécies. No entanto, como o termo BPP na verdade descreve um efeito e não um padrão estrutural, existem muitas sequências peptídicas não relacionadas aos primeiros BPPs descobertos também capazes de desencadear efeito potencializador de Bk (ROCHA E SILVA; BERALDO; ROSENFELD, 1949; SCIANI; PIMENTA, 2017). Ensaio *in vitro* mostraram que os BPPs são capazes de distinguir entre os dois sítios catalíticos da ECA (COTTON et al., 2002) e fornecer diferentes níveis de atividade potencializadora de Bk (HAYASHI et al., 2003; IANZER et al., 2004).

De acordo, estudos tem demonstrado que semelhanças entre as sequências de aminoácidos não estão relacionadas com a atividade potencializadora de Bk (HAYASHI et al., 2003; IANZER et al., 2007, 2011). Por exemplo, o BPP-5a e o B_j-PRO-10c, apesar de ambos serem eficientes em potencializar a ação contrátil da Bk em íleo isolado de cobaia e a ação hipotensiva em ratos anestesiados, apresentam atividades biológicas diferentes, tanto na potência de inibição como na seletividade pelo sítio ativo da ECA, indicando que os mecanismos, pelos quais os BPPs potencializam a Bk não são exclusivamente os mesmos, não estando diretamente relacionados apenas à inibição da ECA (GOMES et al., 2007; HAYASHI; CAMARGO, 2005; LAMEU; ULRICH, 2013). Nesse sentido, apesar da inibição da ECA ser um mecanismo relevante para explicar a ação dos BPPs, como já anteriormente sugerido, o mecanismo de potencialização da Bk desses peptídeos não podem ser inteiramente elucidado pela inibição de enzimas que degradam a Bk, indicando que esses peptídeos interagem com outros alvos (CAMARGO; FERREIRA, 1971; GREENE; LEWIS J. et al., 1972).

Estudos recentes fornecem evidências de que os efeitos mediados por BPP não se limitam à inibição da ECA ou a potencialização dos efeitos induzidos pela Bk e sugerem diferentes ações para cada peptídeo para promover a redução da pressão arterial (CAMARGO; FERREIRA, 1971; GREENE; LEWIS J. et al., 1972; HAYASHI et al., 2003; MORAIS et al., 2013; MUELLER et al., 2005). Mueller et al. (2005) utilizando o BPP-9a e análogos também

demonstraram que a inibição da ECA e a atividade potencializadora de Bk podem ser evocadas por mecanismos diferentes. Estudos sobre a atividade anti-hipertensiva de alguns BPPs, como, o BPP-7a e o *Bj*-PRO-10c, não depende da geração de Ang-II, pois são capazes de promover a redução da pressão arterial sistêmica somente em ratos espontaneamente hipertensos (SHRs – *Spontaneously Hypertensive Rats*) em concentrações cerca de 500 vezes abaixo daquelas que promovem inibição da conversão de Ang-I em Ang-II (IANZER et al., 2007).

Com relação às atividades de potencialização de Bk e inibição da ECA, estudos tem demonstrado efeitos opostos para BPPs similares (IANZER et al., 2007). A maioria desses peptídeos compartilha características comuns, como muitos resíduos de prolina no meio de sua estrutura e o tripeptídeo Ile-Pro-Pro na porção C-terminal. No entanto, existem exceções para BPPs curtos, como o BPP-5a (FERREIRA; BARTELT; GREENE, 1970; HAYASHI et al., 2003; IANZER et al., 2004, 2011). Apesar destas diferenças, BPP-7a e *Bj*-PRO-10c, que contêm o resíduo Ile-Pro-Pro, produziram efeito anti-hipertensivo sustentado em SHRs não relacionado com a sua capacidade para inibir a ECA somática ou para potencializar Bk *in vivo* (IANZER et al., 2007). Ensaio de biodistribuição do *Bj*-PRO-10c em camundongos revelaram que esse peptídeo encontrava-se em altas concentrações e permanência em rins de camundongos, mesmo após a saturação dos sítios ativos da ECA, com o captopril, inibidor seletivo da ECA (SILVA et al., 2008).

Neste contexto, Guerreiro et al. (2009) mostraram que o *Bj*-PRO-10c levou ao aumento da produção de NO em células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC) devido ao aumento da atividade da enzima argininosuccinato sintetase (AsS), a enzima limitante da velocidade de regeneração contínua de L-arginina a partir de L-citrulina no ciclo NO-citrulina, induzindo aumentos na produção de L-arginina e NO em culturas de células renais e endoteliais, respectivamente. Elevações da concentração de L-arginina induzida por *Bj*-PRO-10c também foram observadas *in vivo*. Demonstraram assim, que o *Bj*-PRO-10c foi capaz de ativar a enzima AsS e aumentar os níveis de L-arginina tanto *in vivo* quanto *in vitro*.

Corroborando esses achados, o *Bj*-PRO-10c teve seu efeito anti-hipertensivo parcialmente revertido pelo ácido alfa-metil-DL-aspartico (MDLA), um inibidor da enzima AsS. Esses resultados demonstraram que a enzima AsS desempenha um papel importante no efeito anti-hipertensivo induzido por este decapeptídeo. 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 enzima AsS como novo alvo para tratamento de disfunções endoteliais relacionadas com a deficiência de NO são relevantes e despertam atenção para

estudos com demais BPPs e de outras fontes biológicas (GUERREIRO et al., 2009; IANZER et al., 2011; ARCANJO et al., 2015).

Outros estudos com o *Bj*-PRO-10c, investigando os efeitos do peptídeos nos níveis de L-arginina, produção de NO e seus efeitos antiproliferativos em células de astroglioma C6, demonstraram que este foi internalizado por essas células onde aumentam a concentração intracelular de L-arginina em células C6, regula positivamente enzimas do ciclo da citrulina-NO de modo dependente da dose, induzindo níveis de expressão do gene da enzima AsS e por isso, o *Bj*-PRO-10c sustenta a geração de NO (FONTANA DE OLIVEIRA et al., 2010).

O primeiro BPP descoberto por Ferreira e Rocha e Silva (FERREIRA; ROCHA E SILVA, 1965) denominado como tal devido ao seu efeito farmacológico, foi o ponto de partida de muitos estudos e ensaios biológicos sobre BPPs, basicamente descrevendo novos peptídeos e testando seus efeitos farmacológicos, principalmente em comparação com o captopril, conduziram à descoberta de vários outros BPPs de outras fontes biológicas, como venenos de cobras de outras espécies (CHI et al., 1985; CINTRA; VIEIRA; GIGLIO, 1990), aranhas (FERREIRA et al., 1996), escorpiões (MEKI; NASSAR; ROCHAT, 1995; VERANO-BRAGA et al., 2008) e secreções cutânea de anfíbios (ARCANJO et al., 2015; CONCEIÇÃO et al., 2007).

O objetivo desta pesquisa é o papel de um específico PRO, denominado BPP-BrachyNH₂, isolado a partir da secreção cutânea do anfíbio *Brachycephalus ephippium*, cuja sequência de aminoácidos é Trp-Pro-Pro-Pro-Lys-Val-Ser-Pro, e sintetizado em sua forma amidada. Descoberto e caracterizado com efeito vasorrelaxante de mesma potência do captopril, este peptídeo apresenta efeito inibidor *in vitro* da ECA, com uma possível maior seletividade pelo sítio ativo no domínio C da ECA (ARCANJO et al., 2015, 2017a). Em ensaios de viabilidade celular *in vitro* e toxicidade aguda *in vivo*, o BPP-BrachyNH₂ demonstrou ausência de citotoxicidade e toxicidade nos modelos empregados (ARCANJO et al., 2017b). O peptídeo também apresenta efeito vasorrelaxante em modelo de disfunção endotelial induzido por LPS em anéis de artérias de resistência isoladas do leito mesentérico de rato e da circulação coronária de porco, efeito, possivelmente, envolvendo o aumento da produção de NO (ARCANJO, 2016).

Ressaltando que o potencial dos BPPs vão além da inibição da ECA (CAMARGO et al., 2012; GUERREIRO et al., 2009; LAMEU; ULRICH, 2013; MORAIS et al., 2013), dentre os possíveis alvos mais importantes está a enzima AsS. O BPP-BrachyNH₂ demonstrou que a inibição da ECA não foi o único mecanismo envolvido no seu efeito vasorrelaxante em anéis

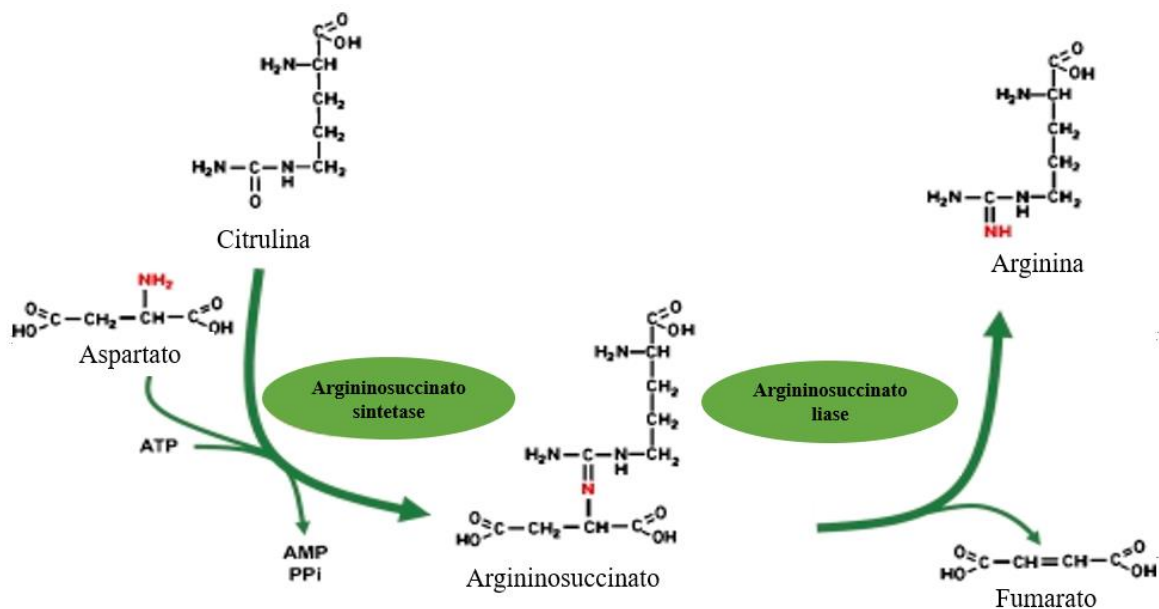
de artéria aorta, sugerindo possíveis mecanismos independentes da inibição da ECA. Assim, os resultados com o BPP-BrachyNH₂ nos levaram a especular se um mecanismo diferente, não requerendo a participação de Ang-II e Bk, poderia estar implicado nesta atividade (ARCANJO et al., 2015).

Sendo a disfunção endotelial um evento fisiopatológico caracterizado pela redução da biodisponibilidade de NO que promove danos celulares, os BPPs apresentam importante aplicação potencial para estudos que envolvem modelos experimentais de disfunção endotelial. Assim, os BPPs poderiam estar envolvidos na melhora da disfunção endotelial em doenças relacionadas a deficiência de NO, e neste contexto, investigações envolvendo o papel da enzima AsS são sugeridos.

3.2 Um novo alvo: Argininosuccinato sintetase

A L-arginina é considerada como um aminoácido semi-essencial ou condicionalmente essencial, pois a capacidade do organismo em sintetizá-la em quantidades suficientes depende do estágio de desenvolvimento e do estado de saúde do indivíduo. A L-arginina é necessária em todos os tecidos do corpo humano para a síntese de proteínas e, em alguns tecidos, para necessidades especializadas. Qualquer via biossintética *de novo* para a produção de arginina envolve a conversão do aminoácido L-citrulina em L-arginina pela ação sequencial das enzimas argininosuccinato sintetase (AsS) e argininosuccinato liase (AsL). A enzima AsS, passo limitante da taxa na regeneração de arginina a partir de citrulina, catalisa a síntese de argininosuccinato, adenosina monofosfato (AMP) e pirofosfato inorgânico (PPi) a partir da conjugação de citrulina, adenosina trifosfato (ATP) e aspartato. Uma vez formado, o argininosuccinato é então clivado pela AsL para produzir L-arginina e fumarato (FIGURA 2) (GOODWIN; SOLOMONSON; EICHLER, 2004; HAINES; PENDLETON; EICHLER, 2010).

Figura 2 – Via biossintética *de novo* para produção de arginina (Adaptada de Haines; Pendleton; Eichler, 2010).



A enzima AsS foi identificada pela primeira vez no fígado, como uma enzima limitante na síntese de ureia e atualmente, é reconhecida como uma enzima onipresente nos tecidos de mamíferos, tendo maiores valores encontrados no fígado e nos rins, sua expressão, localização

e regulação diferem significativamente dependendo das necessidades específicas de arginina do tecido. A enzima AsS desempenha um papel importante por ser limitante da taxa de síntese no fornecimento de arginina para uma variedade de processos metabólicos uma vez que o RNAm e a atividade da enzima AsL foram encontrados para serem constitutivamente expressos (HAINES; PENDLETON; EICHLER, 2010; XIE; GROSS, 1997).

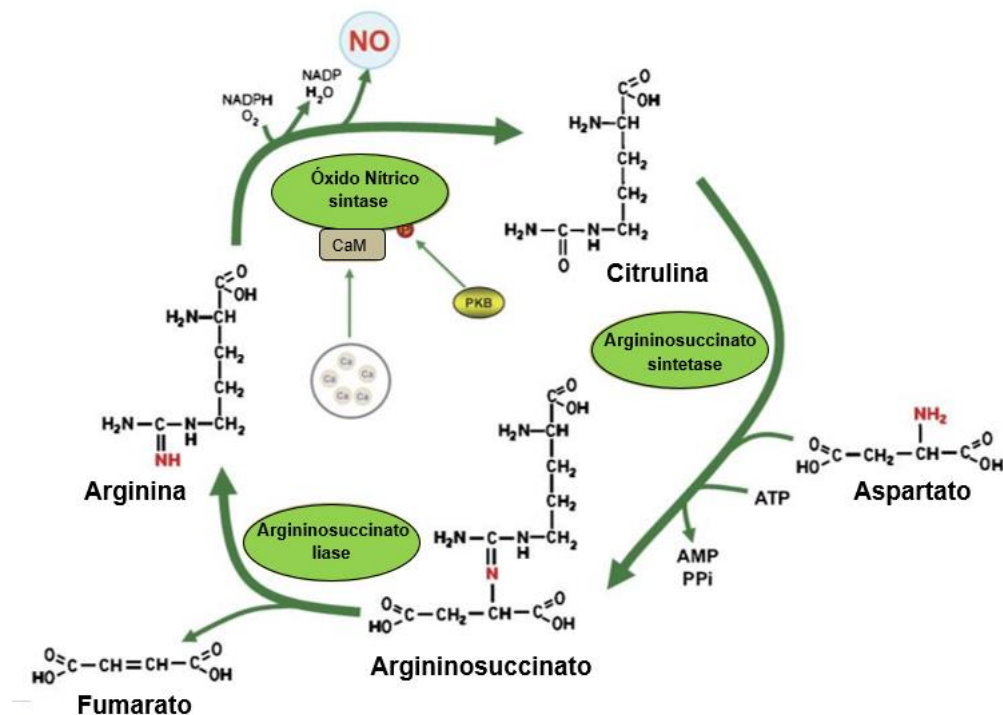
A atividade da enzima AsS que leva à síntese de arginina contribui para três principais funções diferentes no organismo adulto dependendo da célula/tecido considerado: no fígado, o AsS e o AsL funcionam juntos como componentes do ciclo da ureia, na formação de arginina a partir da citrulina. Nos rins, é responsável pela produção de arginina para todo o organismo participando do ciclo citrulina-arginina. A descoberta do NO derivado a partir da arginina, catalisada por NOS, revelou um novo papel para as enzimas AsS e AsL. Juntamente com a NOS, elas funcionam como parte do ciclo de citrulina-NO em que AsS e AsL convertem a citrulina em arginina, que depois é oxidada para formar NO e citrulina pela NOS (GOODWIN; SOLOMONSON; EICHLER, 2004; HUSSON et al., 2003).

A enzima AsS é limitante da taxa da reciclagem de citrulina em arginina, o substrato necessário para a produção de NO pela enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) sendo a função do ciclo citrulina-NO como um todo crucial para a produção de NO. Esse sistema está fortemente acoplado e foi implicado como a fonte primária de arginina para a produção de NO mediada por eNOS. Embora ambas as concentrações extracelulares e intracelulares de arginina serem superiores aos valores do K_m aparente de arginina por eNOS, e da existência dos sistemas disponíveis de transporte de arginina, a produção de NO ainda parece ser limitado pela disponibilidade de arginina, sendo um fator chave que limita a síntese de NO. Este fenômeno é denominado “paradoxo da arginina”, pois apesar da existência de sistemas de transporte disponíveis que supostamente forneçam a arginina utilizada para a produção de NO, esta produção é limitada pela capacidade de regenerar a arginina a partir da citrulina (CORBIN et al., 2008; GOODWIN; SOLOMONSON; EICHLER, 2004).

O NO por ser um composto de radical livre, de alta reatividade, não pode ser armazenado dentro das células produtoras de NO, sua capacidade de ação deve ser controlada nos níveis de síntese e biodisponibilidade local. Assim, embora a enzima eNOS seja criticamente importante para o controle temporal e espacial da produção de NO vascular, a função do ciclo de citrulina-NO como um todo é essencial, já que as enzimas a enzimas AsS e AsL reciclam a L-citrulina em L-arginina, o principal substrato da eNOS na produção de NO nas células endoteliais. Suportando a ideia do papel central da AsS e sua coordenada regulação

com a eNOS, pesquisadores sugerem estudos adicionais para fornecer uma compreensão total de um sistema tão importante (HAINES et al., 2012; HAINES; PENDLETON; EICHLER, 2010).

Figura 3 - Ciclo de citrulina-NO (adaptada de Haines; Pendleton; Eichler, 2010).



Estudos de Corbin e colaboradores, em 2008, voltados em demonstrar o importante papel da enzima AsS na regulação da produção de NO, mostraram que a expressão da enzima AsS é regulada de forma consistente com sua função no suporte à produção de NO mediada pela eNOS, sendo a AsS fosforilada nas células endoteliais pela proteína quinase A (PKA) em resposta à estimulação do fator de crescimento endotelial vascular, estudos já demonstrados por Xie e Gross, em 1997, onde a superexpressão da enzima AsS em células musculares lisas vasculares (CMLV) aumenta a produção de NO quando essas são estimuladas com LPS e interferon gama (IFN- γ).

Estudos em 2004, por Hao, Xie e Gross mostraram que a enzima AsS pode ser inativada por nitrosilação reversível em resposta ao tratamento com o LPS em CMLV, sob condições de produção excessiva de NO via iNOS, sugerindo também que a atividade da AsS é pelo menos parcialmente responsável pela produção dos níveis de NO celular. Apresentando que a nitrosilação possa fornecer um mecanismo de retroalimentação no qual o NO pode limitar a disponibilidade de arginina em células produtoras de NO.

A arginina enquanto único substrato fisiológico para a reação da enzima NOS, é responsável pela determinação da taxa de produção de NO celular através da regulação de sua disponibilidade. Hattori e colaboradores mostraram que imunoestimulantes, como LPS e IFN- γ , induzem uma via metabólica em CMLVs, permitindo regenerar a arginina a partir da citrulina pela ação das enzimas AsS e AsL, mostrando que o tratamento com LPS *in vivo* alteraria a expressão tecidual das enzimas AsS e AsL, e sugerindo assim que um aumento na capacidade de conversão de citrulina em arginina pode ter um papel fundamental na formação de NO *in vivo* quando a arginina se torna limitante (HATTORI; CAMPBELL; GROSS, 1994; HATTORI; SHIMODA; GROSS, 1995).

Recentemente, a AsS foi identificada como outro potencial alvo para os PROs da *Bj* (SILVA et al., 2008). O *Bj*-PRO-10c é um inibidor seletivo do domínio C da ECA (CAMARGO et al., 2012), e também modula cineticamente a atividade da AsS *in vitro* e *in vivo*, a ligação do *Bj*-PRO-10c a AsS aumenta a afinidade enzimática por ATP e citrulina (GUERREIRO et al., 2009), induzindo a produção de NO nas células endoteliais e redução da pressão arterial (IANZER et al., 2011; MORAIS et al., 2011, 2013).

As funções do NO são controladas em níveis de biossíntese e disponibilidade, porque não pode ser armazenado. Como potencialmente todas as propriedades fenotípicas das células endoteliais que funcionam normalmente estão relacionadas ao NO, sua produção é rigidamente controlada. Esse controle rigoroso requer múltiplos mecanismos regulatórios. Um desses mecanismos é a regulação da expressão das enzimas do ciclo citrulina-NO, envolvendo não somente a regulação da enzima eNOS, mas também a regulação da enzima AsS (CORBIN, 2008). De tal modo, a enzima AsS representa um promissor alvo para aplicação dos PROs no tratamento de disfunções endoteliais.

3.3 Endotélio, óxido nítrico e biologia vascular

O endotélio é caracterizado como uma interface ampla e seletivamente permeável, que separa compartimentos vascular e intersticial do corpo e serve como peneira, regulando o transporte de fluidos e macromoléculas. Sendo o endotélio uma monocamada contínua de células que reveste a parede interna dos vasos sanguíneos envolvendo o sangue circulante, as células endoteliais são muito mais do que uma barreira semipermeável entre o sangue e o músculo liso vascular, elas ocupam uma localização estratégica entre a circulação e os tecidos. Assim, o endotélio desenvolve um diversificado repertório de funções metabólicas do endotélio, que inclui a biossíntese e degradação de mediadores vasoativos, o tamponamento enzimático de espécies reativas de oxigênio, o transporte e metabolismo de lipoproteínas, a secreção e remodelação enzimática de componentes da matriz extracelular, elaboração de vários fatores de crescimento, citocinas e substâncias semelhantes a hormônios, e a biossíntese de prostaglandinas e outros autocóides potentes. A partir da perspectiva da Bioengenharia, as células endoteliais que compõem o revestimento de parte do sistema cardiovascular funcionam como transdutores biomecânicos locais, detectando e traduzindo as diversas forças conferidas pelo fluxo pulsátil de sangue em respostas biológicas (GIMBRONE; GARCÍA-CARDEÑA, 2016; VANHOUTTE et al., 2017).

Portanto, o que era considerada uma mera barreira de difusão que impedia o acesso das células sanguíneas à matriz vascular, atualmente, o endotélio vascular é caracterizado como um órgão que apresenta uma interface protetora biocompatível, adaptável dinamicamente e, no nível celular, um integrador do meio fisiopatológico local, um agente predominante no controle da fluidez do sangue, das plaquetas, agregação e tônus vascular, sendo importante na regulação da imunologia, inflamação e angiogênese. Considerando assim, o sistema endotelial como um órgão metabólico e endócrino ativo por si só que, pela sua localização estratégica, permite a manutenção da homeostase vascular (FÉLÉTOU, 2011; GIMBRONE; GARCÍA-CARDEÑA, 2016; VANE; ÄNGGÅRD; BOTTING, 1990; VANHOUTTE et al., 2017; VERMA; BUCHANAN; ANDERSON, 2003).

Quando ocorre uma disfunção dessa barreira, esse equilíbrio é interrompido, predispondo, em um sentido geral, múltiplas alterações não adaptativas em seu fenótipo funcional normal, com implicações importantes para a regulação da hemostasia, o tônus vascular local, o equilíbrio redox e a orquestração da inflamação aguda e crônica (FÉLÉTOU, 2011; GIMBRONE; GARCÍA-CARDEÑA, 2016; VANHOUTTE et al., 2017)

A evidência inicial de que endotélio vascular é componente fundamental na regulação do tônus vascular foi demonstrada a partir da década de 80, quando Furchgott e Zawadzki (1980) descreveram pela primeira vez que o relaxamento induzido pela acetilcolina dependia da presença de um endotélio íntegro e demonstraram que a célula endotelial modula o tônus vascular mediado através da liberação de um potente fator humoral, que causava o relaxamento do músculo liso vascular, que eles chamaram de “fator de relaxamento derivado do endotélio”, ou EDRF, porque relaxou o músculo liso vascular subjacente (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980).

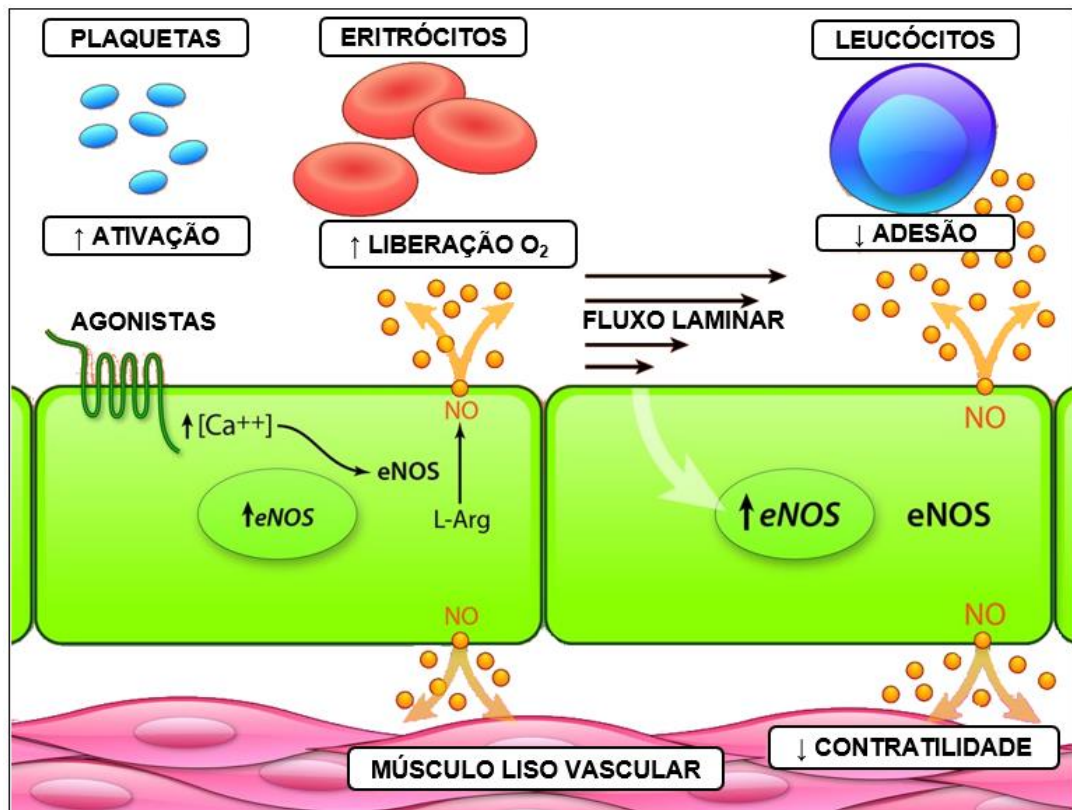
Em 1987, Ignarro e colaboradores verificaram que o EDRF liberado das células endoteliais tinha a capacidade de estimulação da guanilil-ciclase solúvel (GCs) nas células do músculo liso, dando origem a subsequente formação de monofosfato de guanosina cíclico (GMPc) que induzia ao relaxamento e a possível identidade de EDRF como NO foi apontado, um composto caracterizado em 1977 por Ferid Murad que, quando liberado por nitratos, causava relaxamento em células musculares lisas (IGNARRO et al., 1987; KATSUKI et al., 1977). De acordo, Moncada e colaboradores, em estudos com cultura de células endoteliais aórticas de porco, descobriram uma enzima no endotélio vascular, chamada óxido nítrico sintase, que gera NO a partir do aminoácido L-arginina, a especificidade estrita do substrato desta reação levou a concluírem que a L-arginina seria um intermediário instável para a síntese de NO nas células endoteliais. A NOS é uma enzima constitutiva, dependente de cálcio e calmodulina e libera picomoles de NO em resposta à estimulação do receptor. Moncada e colaboradores foram os primeiros a mostrar um inibidor competitivo dessa enzima, o análogo metilado da L-arginina, N^G -monometil-L-arginina, fornecendo uma importante ferramenta para investigar a relevância do NO em processos biológicos (MONCADA; HIGGS, 1993; PALMER; ASHTON; MONCADA, 1988; REES et al., 1989).

O NO é um gás altamente difusível, tem alta afinidade com o heme, encontrado em proteínas intracelulares (óxido nítrico sintase, cicloxigenase e guanilato ciclase) e também se liga a grupos -SH, formando tiol. A produção enzimática do NO a partir do aminoácido L-arginina é mediado por uma família de três isoenzimas, as isoformas endotelial (eNOS) e neuronal (nNOS), possuem mecanismos de ativação constitutivo e geram NO para fins de sinalização celular. São altamente reguladas por mecanismos de transcrição e pós traducionais, incluindo fosforilação, acetilação, interação proteína-proteína, S-nitrosilação e S-glutationa. Por outro lado, iNOS é regulada principalmente através da transcrição gênica sob condições de estresse pró-inflamatório e oxidativo,

induzida por citocinas e agentes inflamatórios resultando na liberação de NO em maiores quantidades durante reações inflamatórias ou imunológicas de defesa e está envolvida no dano tecidual do hospedeiro. O mecanismo clássico de ativação das isoformas constitutivas é dependente do cálcio (Ca^{2+}), enquanto a iNOS independe da elevação das concentrações intracelulares de Ca^{2+} , por causa da alta afinidade da ligação da enzima com a calmodulina (DIAS; NEGRÃO; KRIEGER, 2011; FARAH; MICHEL; BALLIGAND, 2018; MONCADA; ERUSALIMSKY, 2002).

A produção de NO é estritamente regulada nas células endoteliais vasculares, o NO impede não apenas a constrição vascular anormal, que leva a formação de coágulos intraluminais, mas também inibe a agregação de plaquetas, a expressão de moléculas de adesão na superfície das células endoteliais e, portanto, a adesão e penetração do células de defesa. O comprometimento dessa regulação está associado a fatores de risco que comprometem a função endotelial (HAINES et al., 2012; VANHOUTTE et al., 2017).

Figura 4 – NO derivado do endotélio: Produção e Ações biológicas (Adaptada de GIMBRONE; GARCÍA-CARDEÑA, 2016).



3.4 Disfunção endotelial e NO

Como principal regulador da homeostase vascular, o endotélio mantém o equilíbrio entre vasodilatação e vasoconstrição, inibição e promoção da migração e proliferação de células musculares lisas, fibrinólise e trombogênese, bem como prevenção e estimulação da adesão e agregação de plaquetas. Perturbar este equilíbrio rigidamente controlado leva à disfunção endotelial. Embora frequentemente, estudos relatem disfunção endotelial como perda da capacidade vasodilatadora, em resposta a um estímulo de NO, o termo disfunção endotelial abrange um defeito generalizado em todos os mecanismos homeostáticos, implicando reduzida atividade biológica do NO, causada tanto pela redução na síntese como pelo aumento da degradação e consequente diminuição da biodisponibilidade de NO e/ou desequilíbrio na contribuição dos fatores de relaxamento e contração derivados do endotélio. (GIMBRONE; GARCÍA-CARDEÑA, 2016; SENA; PEREIRA; SEIÇA, 2013; VERMA; ANDERSON, 2002).

Quase todas as funções normais das células endoteliais vasculares são dependentes ou afetadas pela atividade biológica do NO. Assim, a perda localizada do revestimento endotelial e consequente comprometimento da produção de NO endotelial é frequentemente um mecanismo patogênico comum pelo qual fatores de risco cardiovasculares como hipercolesterolemia, hipertensão, tabagismo, homocistinemia, inflamação vascular e *diabetes mellitus* promovem seus efeitos deletérios na parede vascular. Quando desafiado com certas citocinas pró-inflamatórias ou produtos bacterianos (por exemplo, endotoxinas), as células endoteliais passam por um programa coordenado de ativação gênica que, reversivelmente, altera muitas dessas propriedades funcionais vitais, logo servindo como uma resposta adaptativa a estímulos potencialmente nocivos (SENA; PEREIRA; SEIÇA, 2013; GIMBRONE; GARCÍA-CARDEÑA, 2016).

A produção de NO endotelial é suportada por reações catalisadas pela eNOS, AsS e AsL, que são componentes centrais do ciclo citrulina-NO (HUSSON et al., 2003). O principal papel da catálise de AsS e AsL está na conversão da citrulina em arginina, o substrato utilizado pela eNOS para produzir NO e citrulina (XIE et al., 2000; XIE; GROSS, 1997). A enzima AsS é limitante no ciclo citrulina-NO e, como tal, é necessário para manter a função endotelial e a viabilidade celular (GOODWIN; SOLOMONSON; EICHLER, 2004).

Em um quadro de disfunção endotelial, a funcionalidade do NO diminui de tal forma que a lesão estrutural e funcional da parede vascular se desenvolve como consequência da

diminuição da vasodilatação, aumento da agregação plaquetária, trombose e inflamação, exacerbando ainda mais a disfunção vascular. Sendo assim, o NO é considerado um regulador chave na manutenção da saúde vascular (HUYNH; CHIN-DUSTING, 2006).

Assim, no ambiente vascular, a redução na biodisponibilidade do NO e acompanhado da disfunção endotelial determinam o início de alterações não adaptativas no fenótipo funcional como alterações no tônus, disfunções trombóticas, proliferação e migração de células musculares lisas, e adesão de leucócitos. Ocorre também o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, que podem reduzir a disponibilidade de NO endotelial por diferentes vias, como inativação direta do NO por superóxido, com formação de peroxinitrito (ONOO⁻); redução na expressão e na atividade das sintases do NO, devido mudanças nos seus substratos ou cofatores, e no aumento dos níveis de dimetilarginina assimétrica (ADMA), inibidor endógeno de NOS; e, ainda, o desacoplamento da NOS endotelial causado pela oxidação aumentada de tetra-hidrobiopterina (BH₄) (DIAS; NEGRÃO; KRIEGER, 2011).

O NO também pode funcionar como um importante mediador em alguns processos patológicos. Em células endoteliais cultivadas, foi demonstrado que LPS de *Escherichia coli* e citocinas inflamatórias são capazes de aumentar a liberação de NO endotelial mediada por agonista, uma vez que o LPS provoca um aumento imediato na liberação de NO das células endoteliais pela ativação da iNOS (GRYGLEWSKI; BOTTING; VANE, 1988; MONCADA; HIGGS, 2006; SALVEMINI et al., 1990; VANE; ÄNGGÅRD; BOTTING, 1990).

Durante uma infecção, macrófagos infectados importam arginina extracelular para, preferencialmente, produzir NO via iNOS gerando o subproduto citrulina. Qualls et al. (2012) apresentaram dados de que ao longo do tempo de infecção, a arginina se torna limitante, e os macrófagos utilizam o metabolismo de citrulina, mediado por AsS para regenerar a arginina como fonte secundária para a produção de NO. A citrulina é então exportada de macrófagos durante os estágios iniciais da produção de NO com retenção de menos de 2% para reciclagem através da via AsS-AsL. Mais tarde, a arginina extracelular é depletada, e a expressão de AsS permite que macrófagos sintetizem arginina a partir de citrulina importada para sustentar a saída de NO.

Os mesmos autores, destacaram ainda que macrófagos deficientes em AsS não conseguem recuperar a citrulina em condições escassas em arginina intracelular, fato já comprovado por Hecker et al. em 1990, levando à sua incapacidade de controlar a infecção. Assim, a arginina extracelular suporta o aumento inicial na produção de NO em macrófagos ativados, e esses realizam a reciclagem de citrulina via AsS e AsL. Assim,

concluíram que a expressão de AsS/AsL funciona como um sistema à prova de falhas para sustentar a produção de NO, caso a arginina extracelular se esgote do meio (QUALLS et al., 2012).

Estudos realizados por Nagasaki et al. (1996), mostraram pela primeira vez que a iNOS, a AsS e a AsL são co-induzidas por LPS *in vivo*. Analisando a expressão da isoenzima iNOS e das enzimas AsS e AsL, em ratos tratados com LPS, estudos demonstraram através de análise imunistoquímica que macrófagos do baço não expressavam iNOS e AsS antes do tratamento com LPS e expressavam fortemente tanto iNOS como AsS após este tratamento. E corroboram com o existência de um retardo na expressão das enzimas AsS e AsL em relação a expressão da isoenzima iNOS relatado por Qualls et al. (2012), onde conseguiram demonstrar que o RNAm da iNOS é induzido rápido e fortemente, aumentando em 2h atingindo quase o máximo em 6 horas de tratamento. E por outro lado, o RNAm da AsS é induzido de forma um pouco mais lenta, começando a aumentar após 2 horas, atingindo seu máximo também após 6 horas de tratamento. O RNAm da AsL foi induzido fracamente e aumentou com uma cinética semelhante à do RNAm da AsS, mostrando que a iNOS, AsS e AsL são co-induzidas por LPS em baço de rato.

Devido ao papel obrigatório da L-arginina na síntese de NO, atenção considerável tem sido focada na importância da disponibilidade de L-arginina na produção vascular de NO. Evidências apontam que a deficiência de L-arginina é a principal etapa limitadora da taxa na síntese de NO. No entanto, a afinidade da eNOS para a L-arginina é baixa ($\sim 2-3 \mu\text{M}$) e a quantidade de L-arginina nas células endoteliais é centenas de vezes maior ($40840 \mu\text{M}$), sugerindo que uma deficiência de substrato seria uma causa unitária improvável de disfunção da eNOS e que mecanismos adicionais de disfunção devem existir (BAYDOUN et al., 1990; CHEN; LUCAS; FULTON, 2013; MCCABE et al., 2000).

Assim, a fonte de arginina necessária para sustentar a produção de NO nas células endoteliais foi investigada e debatida. Parte desse debate pareceu estar resolvida em 1997, quando McDonald et al. documentaram a existência de um complexo caveolar entre CAT 1 e eNOS em células endoteliais de artéria pulmonar de porco, complexo que fornecia um mecanismo para uma entrega dirigida do substrato arginina para eNOS. Com a constatação de que o transportador CAT 1, o principal transportador de arginina para células endoteliais, colocalizava-se com eNOS em cavéolas, sugeriu-se que a produção de NO endotelial era mantida através do transporte extracelular de arginina. No entanto, outras evidências

persistiram, demonstrando que a produção endotelial de NO foi limitada pela capacidade de regenerar a arginina da citrulina (GOODWIN; SOLOMONSON; EICHLER, 2004).

A presença de CAT 1 em cavéolas da membrana plasmática e a capacidade de extracelular L-arginina para estimular a liberação de NO em células com níveis abundantes de L-arginina levou à hipótese de que a L-arginina existe em compartimentos subcelulares não intercambiáveis que não atinge eNOS em concentrações suficientes via canalização de metabólitos. Embora existam dados sugestivos para a existência desses pools, faltam evidências diretas e um mecanismo para o seqüestro de L-arginina (CLOSS et al., 2004; SIMON et al., 2003).

As células endoteliais podem manter seus níveis de L-arginina apesar da liberação contínua de NO (MITCHELL et al., 1990), sugerindo a existência de mecanismos para a recuperação do substrato. De fato, a L-citrulina, o subproduto da geração de NO dependente de eNOS, pode ser convertida de volta para L-arginina através das ações seqüenciais da AsS e AsL (HECKER et al., 1990). A co-localização de AsS/AsL com eNOS em caveolae membrana plasmática sugere que a reciclagem da L-arginina a partir de L-citrulina é uma fonte significativa de NO (FLAM et al., 2001; SOLOMONSON et al., 2003).

Para apoiar a proposta de que se a produção de arginina a partir de citrulina, catalisada pelas enzimas AsS e AsL, fornecesse uma fonte essencial de arginina para produção de NO em células endoteliais, uma redução da expressão da proteína AsS resultaria em uma diminuição na quantidade de NO produzida por estimulação, apesar dos níveis saturantes de arginina extracelular. Para tal, foi realizada a análise de RNA de interferência para reduzir seletivamente a expressão de AsS, pelo seu único papel metabólico conhecido em células endoteliais ser a regeneração de L-arginina a partir de L-citrulina. A redução na expressão de AsS resultou em uma diminuição de 56% na produção de NO por estímulo, quando comparado ao controle, demonstrando o papel essencial da AsS na produção de NO endotelial. Esses resultados evidenciam que níveis suficientes de AsS devem ser expressos para manter a produção de NO e que a regeneração de arginina desempenha um papel essencial na produção de NO estimulada nas células endoteliais, mesmo na presença de excesso de arginina (QUALLS et al., 2012).

Evidências anteriores do mesmo grupo, que identificaram a co-localização em cavéolas plasmáticas da NOS, e das enzimas envolvidas na regeneração da arginina, AsS e AsL, mostrou que a citrulina extracelular era tão eficaz como a arginina para a estimulação da produção de NO, mesmo em meios contendo níveis saturantes de arginina. Como os níveis extracelulares de citrulina não tiveram efeito sobre os níveis de arginina intracelular, esses resultados sugeriram

que o aumento da citrulina na produção de NO foi mediado pela regeneração da arginina direcionada à produção de NO (FLAM et al., 2001). E ainda apresentaram, resultados que apoiam fortemente não apenas a existência de um *pool* separado de arginina para a produção de NO, mas também sugeriu a canalização de substratos que exigiriam uma associação funcional entre a produção de NO e regeneração de arginina.

Em outras palavras, Goodwin, Solomonson e Eichler (2004) sugeriram que o aumento da expressão de AsS resultou no aumento da capacidade de fornecer o substrato necessário para sustentar a produção elevada de NO, e demonstrou que um ciclo funcional de citrulina-NO é essencial para a produção de NO endotelial. Portanto, direcionar um aumento na atividade da AsS nas células endoteliais pode fornecer uma alternativa farmacológica para melhora do quadro de disfunção endotelial, embasando-se na hipótese de que a síntese de NO endotelial é dependente da disponibilidade de um *pool* específico de arginina mantido através da conversão de citrulina em arginina pelas enzimas AsS e AsL.

Terapias têm sido estudadas para restaurar a sinalização fisiológica do NO, seja pela restauração da produção e biodisponibilidade do NO ou pela segmentação de elementos de sinalização a jusante da produção de NO. Várias estratégias terapêuticas visam restabelecer a biodisponibilidade do NO) aumentando a sinalização a montante através do uso de agonistas dos receptores β_3 -adrenérgicos, aumentando a atividade da NOS através do uso de um inibidor da arginase, sulfeto de hidrogênio (H_2S), BH_4 , ou folato, ou aumentando a produção de NO através de redução de nitrito. Estratégias alternativas visam a elementos a jusante da via de sinalização NOS-NO aumentando a atividade da guanilato ciclase solúvel (GCs) ou aumentando os níveis de GMPc via inibição da fosfodiesterase (por exemplo, fosfodiesterase tipo 5; PDE5) (FARAH; MICHEL; BALLIGAND, 2018). Seguindo essa linha, esse estudo visa estudar uma outra via para a restauração da produção e biodisponibilidade através da ativação da via responsável pela produção de citrulina, através das enzimas AsS e AsL, que é o precursor para a produção de arginina, o substrato na produção e NO.

3.5 Modelagem molecular

Dado que as interações receptor-ligante têm papel importante em muitas funções biológicas em um organismo vivo, a definição das estruturas dos complexos receptor-ligante envolvidos nestas interações é essencial para revelar os processos biológicos, investigar os mecanismos que interagem entre as proteínas e identificar os resíduos cruciais em interações que são importantes para a descoberta de drogas. A ancoramento receptor-ligante está atraindo cada vez mais atenção na pesquisa de descobertas de possíveis alvos farmacológicos, devido ao seu potencial em prever interações receptor-ligante e identificar resíduos envolvidos em sítios de ligações na interface receptor-ligante (HUANG, 2014)

Estudos envolvendo a interação receptor-ligante tem sido uma ferramenta importante na elucidação de novos fármacos e alvos farmacológicos, uma vez que essa interação participa de vias biológicas extremamente importantes que envolve receptores. Compreender a estrutura física e a função para uma determinada toxina animal é necessária para entender os eventos moleculares na origem da atividade dessa toxina. Uma melhor compreensão do seu papel na toxicidade do veneno e a elucidação de suas estruturas ajudam a entender melhor as interações receptor-ligante, bem como seus receptores/canais iônicos. Desta forma, ferramentas computacionais que são capazes de obter a estrutura proteica de receptores, prever como a ligação ocorre e a energia livre da interação envolvida da ligação receptor-ligante, vêm sendo desenvolvidas com o intuito de entender as interações moleculares relacionadas com a afinidade e especificidade da toxina e também, no intuito de amenizar os custos e complementar informações aos dados experimentais (HUANG, 2014; OJEDA et al., 2017).

A modelagem molecular pode fornecer informações estruturais e compreensão teórica que não são facilmente deriváveis de resultados experimentais. A modelagem molecular consiste na construção e manipulação de moléculas estudadas mais próximas do real e compreende as formas de simular o comportamento de moléculas e sistemas moleculares. Várias técnicas de modelagem molecular são utilizadas para compreender as interações moleculares existentes na origem da afinidade e especificidade da toxina. As abordagens de ancoramento (do inglês, *docking*) usam um algoritmo para produzir um grande número de “posições” ancoradas, isto é, encaixes, que são agrupadas e classificadas usando o conhecimento de experimentos ou com base em uma função de pontuação. Facilitando assim, a interpretação da relação entre a estrutura e atividade

biológica e possibilitando que a química teórica atue como ferramenta de apoio em análises e interpretação de dados experimentais (BIELSKA et al., 2011; OJEDA et al., 2017).

As estratégias de pesquisas de busca nos algoritmos de ancoramento receptor-ligante atualmente disponíveis levam em considerações a amostragem, processo de busca que gera possíveis orientações de ligação e/ou conformações entre duas moléculas; e a pontuação, medição da tensão de ligação e/ou pontuação entre duas moléculas em um modo de ligação. A estratégia de busca no encaixe receptor-ligante utilizado nesta pesquisa é o algoritmo de pesquisa denominado busca aleatória, onde uma proteína é fixa e a outra proteína é colocada aleatoriamente em torno do local de ligação para uma pesquisa local ou em torno de toda a molécula de proteína estática para uma pesquisa global. Em seguida, o panorama da energia de ligação é estudado otimizando a orientação relativa usando algoritmos aleatórios na esperança de encontrar o mínimo global correspondente ao estado de ligação nativo (FIGURA 5) (HUANG, 2014).

Figura 5 – Ilustração de algoritmos de busca aleatória na ancoramento proteína-ligante(Adaptado de Huang, 2014).



A previsão por computador da interação entre enzimas e pequenas moléculas já avançou ao ponto de permitir a previsão precisa de conformações e constantes de ligação. O programa AutoDock é um conjunto de programas que permite prever um ancoramento computacional, com cerca de uma dúzia de graus de liberdade de torção, e o campo de força de energia livre empírica fornece energias previstas. A técnica combina o remodelamento simulado para pesquisa de conformações com um método rápido de avaliação de energia baseado em grade. Para analisar complexos biomoleculares usando ancoramento computacional, o primeiro passo

é preparar os arquivos de coordenadas para a molécula de encaixe e a molécula alvo. O segundo passo é o cálculo da grade de afinidade para a molécula alvo. Na terceira etapa, a molécula de encaixe é encaixada na grade de afinidade e, finalmente, os resultados são analisados (GOODSELL, 2009; GOODSELL; MORRIS; OLSON, 1996).

Existem vários softwares para realização do ancoramento entre ligante-receptor e para ancoramento proteína-proteína. No presente trabalho foram utilizados os softwares AutoDock 4.2, AutoDock Tools (versão 1.5.6), com a finalidade de observar as interações do BPP-BrachyNH₂ e da L-citrulina com a enzima AsS. Identificando assim, a região responsável pela possível atividade da molécula.

4. Material e Métodos

4.1 Síntese do peptídeo

O BPP-BrachyNH₂ foi obtido com colaboração da Prof. Dra. Paula Gomes, do Departamento de Química e Bioquímica da Universidade do Porto (Porto, Portugal), por síntese química em fase sólida, e sua pureza e identidade foram verificadas por MALDI-TOF/TOF MS/MS (ARCANJO et al., 2015, 2017b).

A síntese do BPP-BrachyNH₂ foi realizada manualmente com um padrão químico Fmoc (N-(9-fluorenil)metoxicarbonil) (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%. 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 Animais

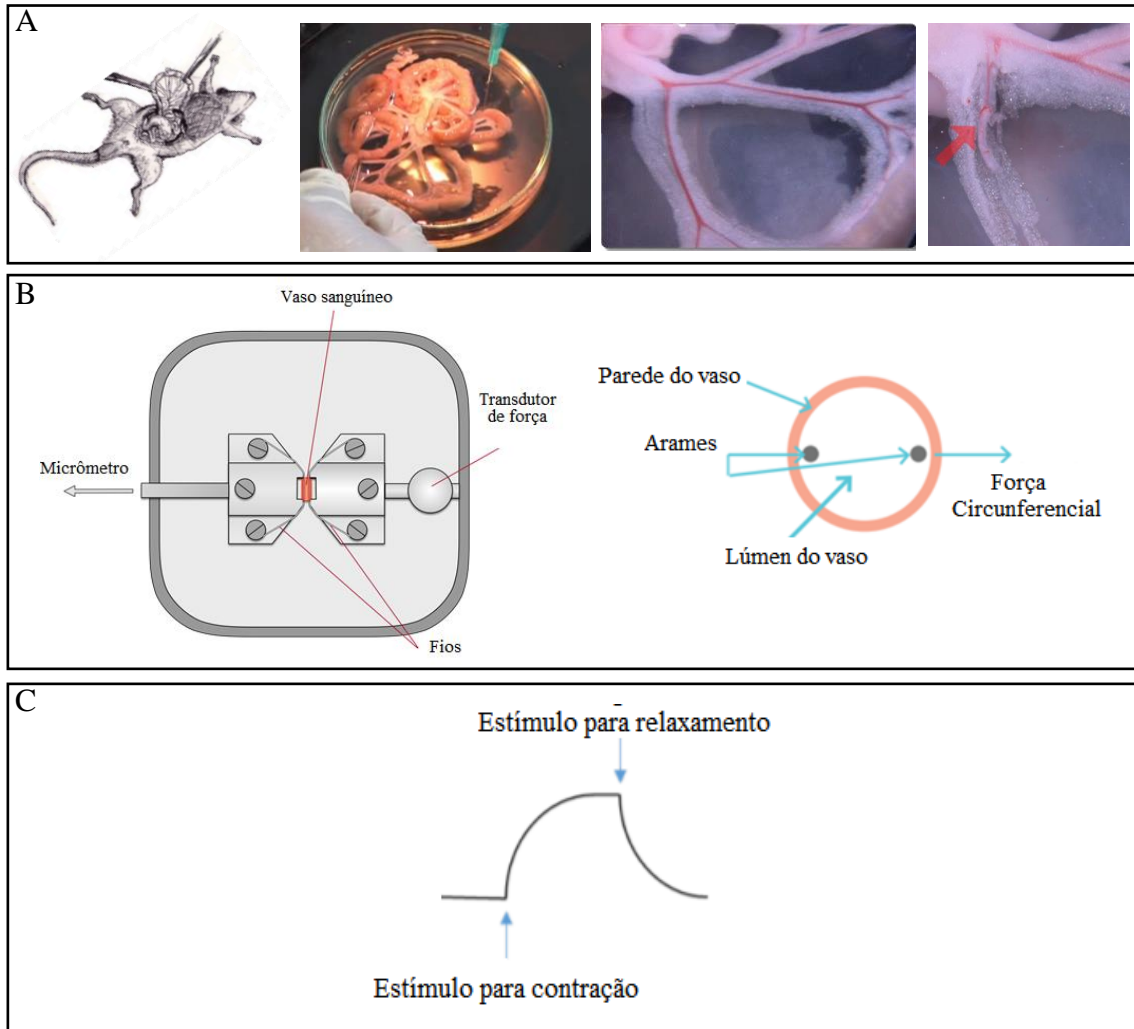
Para os experimentos em artéria mesentérica, foram utilizados ratos Wistar machos (250-300 g, 12-14 semanas) adquiridos comercialmente e mantidos no Biotério do *Bartholin's Building* do Departamento de Biomedicina da Universidade *Aarhus*, Dinamarca. Os animais

foram mantidos em condições controladas de iluminação (ciclo 12h claro/escuro) e temperatura ($21 \pm 2^\circ\text{C}$), com livre acesso a água e alimentação. Os animais foram eutanasiados por decapitação antecedida por anestesia com tiopental sódico (50mg/kg) + lidocaína (10 mg/kg), seguida 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 CO_2 5%, O_2 21% e N_2 74%, e contendo (em mM): NaCl, (119); KCl (4,7); $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1,6); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1,17); NaHCO_3 (25); KH_2PO_4 (1,18); EDTA (0,026); e glicose (5,5) (HEDEGAARD et al., 2016). Os procedimentos de anestesia e eutanásia dos animais foram aprovados pelo Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA) da UFPI (Parecer Nº 457/18) e os experimentos foram realizados de acordo com o Guia ARRIVE (KILKENNY et al., 2010).

4.3 Isolamento das artérias, preparação dos anéis e normalização

Segmentos dos terceiros ramos da artéria mesentérica superior de ratos foram livres de tecido perivascular e isolados com auxílio de estereomicroscópio (FIGURA 6), 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 CO_2 5%, O_2 21% e N_2 74%. Após 30 minutos de estabilização, as preparações foram submetidas a procedimento de normalização, onde as artérias foram tensionadas em 90% de CI_{100} (CI_{90}), 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 CI_{90} foram realizados pelo aplicativo DMT Normalization (Danish MyoTechnology, Aarhus, Dinamarca), parte integrante do software LabChart 5.0 (ADInstruments, Sydney, Austrália).

Figura 6 – (A) Leito mesentérico dissecado; (B) Montagem do miógrafo (imagens adaptadas de BRIDGES et al., 2011) e ilustração da circunferência interna da artéria e (C) Gráfico representativo da resposta do vaso a estímulos de contração e relaxamento.

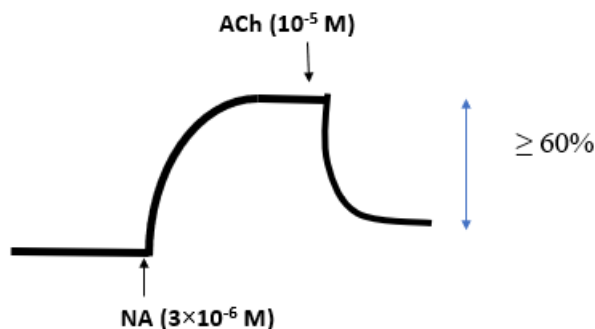


4.4 Teste de viabilidade funcional das artérias mesentéricas

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} M) em preparações pré-contraídas com noradrenalina (NA 3×10^{-6} M). 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). Em todos os estudos, apenas preparações com endotélio funcional foram utilizadas,

considerando estudo prévio de Arcanjo et al. (2015), que reporta efeito vasorrelaxante do BPP-BrachyNH₂ em preparações de artéria aorta de ratos apenas na presença de endotélio funcional.

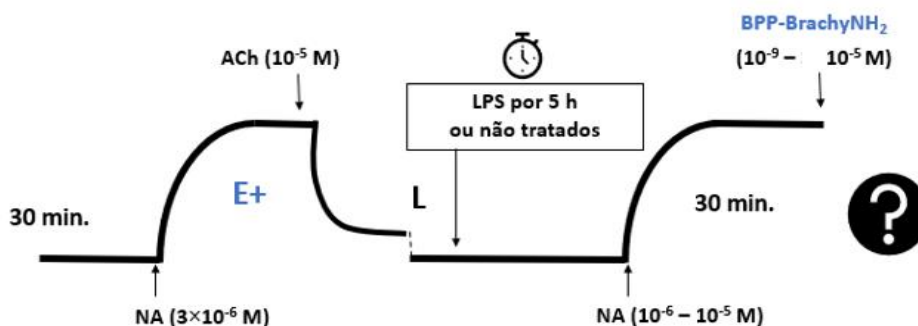
Figura 7 – Desenho experimental do protocolo de presença de endotélio funcional das artérias mesentéricas.



4.5 Investigação do efeito vasorrelaxante do BPP-BrachyNH₂ em preparações estimuladas com LPS

Uma vez determinada a presença de endotélio, os anéis foram contraídos com NA e após um patamar estável foi alcançado, uma curva de concentração-resposta cumulativa para BPP-BrachyNH₂ foi realizada na ausência e na presença de LPS. Assim, preparações com endotélio funcional foram incubadas com LPS de *Escherichia coli*, sorotipo 055:B5 (LPS 10 μ g/mL) durante 5 horas (HERNANZ et al., 2004). Em seguida, preparações pré-tratadas ou não tratadas com LPS foram pré-contraídas com adição cumulativa de noradrenalina (NA 10^{-6} - 10^{-5} M). Após 30 minutos, concentrações cumulativas de BPP-BrachyNH₂ (10^{-9} - 10^{-5} M) foram adicionadas em intervalos entre 4-5 min. Os resultados foram expressos como resposta vasorrelaxante (%) em função do logaritmo da concentração do BPP-BrachyNH₂.

Figura 8 – Desenho experimental do protocolo de investigação do efeito vasorrelaxante do BPP-BrachyNH₂ em preparações pré-tratadas ou não tratadas com LPS.



4.6 Participação da cicloxigenase (COX) e da NOS induzível (iNOS) no efeito do BPP-BrachyNH₂

Para avaliar se o efeito do BPP-BrachyNH₂ depende da produção de metabólitos vasorrelaxantes derivados do ácido araquidônico, isto é, o papel de prostanóides na resposta induzida por BPP-BrachyNH₂, anéis de artéria mesentérica pré-tratados com LPS (10 µg/mL) foram incubados por 20 min com indometacina (INDO, 3×10⁻⁶ M), inibidor competitivo reversível não seletivo da cicloxigenase.

Para avaliar se a inibição da via do iNOS interfere no mecanismo vasorrelaxante induzido pelo BPP-BrachyNH₂, anéis de artéria mesentérica pré-tratados com LPS (10 µg/mL) foram incubados por 20 min com o fármaco 1400W (10⁻⁵ M), um inibidor seletivo da iNOS.

Então, as preparações foram pré-contraídas com adição cumulativa de noradrenalina (NA 10⁻⁶ - 10⁻⁵ M). Após 30 minutos, e uma curva de resposta ao BPP-BrachyNH₂ foi cumulativamente adicionado (10⁻⁹ - 10⁻⁶ M).

4.7 Participação da via NO/GMPc no efeito do BPP-BrachyNH₂

Para investigar se a inibição da via do NOS/GCs participa do mecanismo vasorrelaxante induzido pelo BPP-BrachyNH₂, preparações pré-tratadas com LPS (10 µg/mL) foram incubadas por 20 min com N^G-Nitro-L-arginina (L-NNA, 10⁻⁴ M), um inibidor competitivo reversível não seletivo da NOS, ou ODQ (3×10⁻⁶ M), um inibidor competitivo reversível seletivo da guanilil ciclase solúvel.

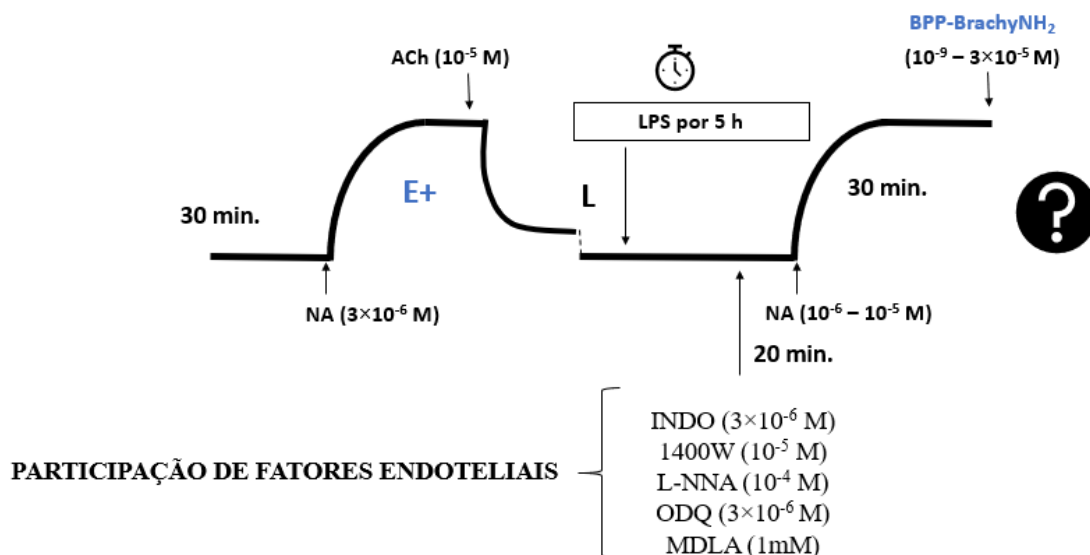
Então, as preparações foram pré-contraídas com adição cumulativa de noradrenalina (NA 10⁻⁶ - 10⁻⁵ M). Após 30 minutos, BPP-BrachyNH₂ (10⁻⁹ - 10⁻⁶ M) foi cumulativamente adicionado.

4.8 Participação da argininosuccinato sintetase (AsS) no efeito do BPP-BrachyNH₂

Para investigar se a inibição da enzima AsS participa do mecanismo vasorrelaxante induzido por BPP-BrachyNH₂, preparações pré-tratadas com LPS (10 µg/mL) foram incubadas por 20 min com ácido alfa-metil-DL-aspártico (MDLA 1 mM), um inibidor competitivo reversível seletivo da argininosuccinato sintase (AsS). Então, as preparações foram pré-

contraídas com adição cumulativa de noradrenalina (NA 10^{-6} - 10^{-5} M). Após 30 minutos, BPP-BrachyNH₂ (10^{-9} - 10^{-6} M) foi cumulativamente adicionado.

Figura 9 – Desenho experimental do protocolo de investigação da participação de fatores endoteliais.



4.9 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 significados quando $p < 0,05$. Os gráficos e as análises estatísticas foram obtidos com o software Graph Pad Prism 5,02TM (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, EUA).

4.10 Estudos de interação da AsS-ligantes *in silico*

4.10.1 Configuração de AsS e ligantes

A sequência da proteína AsS, número de acesso P00966, foi recuperada do banco de dados UniProt (<https://www.uniprot.org/uniprot/P00966>), e estruturas 3D empíricas homólogas de AsS foram exploradas no RCSB Protein Data Bank (PDB) ([http:](http://)

[//www.rcsb.org/pdb/home/home.do](http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do)). Após a análise da estrutura 3D da proteína sintase de argininosuccinato humano (PDB ID: 2NZ2, resolução de 2,4 Å, 99% de identidade de sequência e 99% de resíduos conservados) foi observada falta de alguns aminoácidos, então foi criado um modelo para AsS humano por modelagem de homologia.

A estrutura 3D da L-citrulina foi baixada do PubChem Open Chemistry Database (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) com o código PubChem CID 9750. Todos os cálculos e desenhos foram realizados usando métodos de mecânica molecular de pacotes Gaussian 09W versão 7.0 (Gaussian 09, 2009). A estrutura inicial do peptídeo BPP-BrachyNH₂ foi construída pelo construtor molecular de Gauss View versão 5.0.8 (STEWART, 1990) implementado no pacote computacional Gaussian 09W versão 7.0. As estruturas moleculares dos ligantes (L-citrulina e peptídeo) foram totalmente otimizadas pelo método semi-empírico de PM3, sem impor restrições simétricas (STEWART, 1990). Todos os cálculos de ligantes no trabalho foram realizados em vácuo. O comportamento da carga na estrutura molecular foi calculado pelas cargas atômicas de Mulliken usando o Gaussian 09W. As topologias de ligantes, necessárias para simulações de dinâmica molecular, foram geradas a partir das coordenadas atômicas pré-otimizadas com o programa PRODRG (<http://davapc1.bioch.dundee.ac.uk/cgi-bin/prodrg>) (SCHÜTTELKOPF; VAN AALTEN; IUCR, 2004). Cargas atômicas geradas a partir de PRODRG foram substituídas por cargas atômicas calculadas com Gaussian 09W.

4.10.2 Modelagem de Homologia

Modelos estruturais de AsS foram gerados por modelagem de homologia no software MODELLER 9v18 (<https://salilab.org/modeller/>) (ESWAR et al., 2006; ŠALI; BLUNDELL, 1993). O primeiro passo foi procurar por proteínas homólogas de humanos AsS cujas estruturas experimentais estão disponíveis no Banco de Dados de Proteína (PDB). Depois de selecionar as estruturas cristalográficas (modelos), cem modelos foram gerados independentemente. O modelo com o valor mais negativo para a função de energia protéica discreta otimizada (DOPE) (PLÁCIDO et al., 2017; SHEN; SALI, 2006) foi escolhido para uma análise mais detalhada.

4.10.3 Ancoramento molecular

Todos os procedimentos de ancoramento utilizaram o software Autodock 4.2 (GOODSELL, 2009; GOODSELL; MORRIS; OLSON, 1996; MORRIS; HUEY; OLSON,

2008). Proteína (AsS) e ligantes foram preparados para simulações de ancoramento com AutoDock Tools (ADT), versão 1.5.6 (SANNER, 1999). O receptor foi considerado rígido enquanto que cada ligante foi considerado flexível (GASTEIGER; MARSILI, 1980), cargas parciais foram calculadas após a adição de todos os hidrogênios. Átomos de hidrogênio não polares de proteína e ligante foram subsequentemente fundidos. Uma caixa cúbica de 60x60x60 pontos com um espaçamento de 0,35 Å entre os pontos da grade foi gerada para o alvo da proteína inteira. A caixa de grade foi centrada no Asn123 de AsS. O algoritmo genético Lamarckiano (LGA) (MORRIS et al., 1998) e os métodos de busca local pseudo-Solis e Wets (SOLIS; WETS, 1981) foram aplicados na pesquisa de docking. Cada ligante foi submetido a 100 execuções independentes de simulações de ancoramento. O restante dos parâmetros de encaixe foi definido como os valores padrão. As conformações ancoradas resultantes foram agrupadas em famílias de acordo com o RMSD. As coordenadas iniciais dos complexos AsS para simulações de dinâmica molecular foram escolhidas usando o critério de menor conformação de encaixe do cluster com menor energia combinada com inspeção visual.

4.10.4 Simulações por dinâmica molecular (DM)

Simulações de dinâmica molecular foram realizadas usando o campo de força GROMOS96 53a6 (OOSTENBRINK et al., 2004) implementado no pacote GROMACS versão 5.1.4 (D. VAN DER SPOEL, E. LINDAHL, 2014). Todos os sistemas foram simulados em conjunto NPT (em que o número de partículas, pressão e temperatura são todos constantes) e condições de contorno periódicas (cúbicas). As dimensões da caixa central foram escolhidas de tal forma que a distância mínima de qualquer átomo de proteína para a parede da caixa mais próxima era de 12 Å. As simulações foram realizadas usando moléculas explícitas de solvente de água descritas pelo modelo de carga pontual simples (SPC) (BERENDSEN et al., 1981). A carga total dos sistemas foi de +6 para os três complexos (AsS_BPP-BrachyNH₂, AsS_Lcitrulina e AsS_BPP-BrachyNH₂_Lcitrulina). Os íons Cl foram adicionados para neutralizar cada sistema. Inicialmente, a estrutura proteica de cada sistema foi submetida a um máximo de 50000 ps de maior minimização de energia de descida. Para relaxar fortes interações solvente-solvente e proteína-ligação não solvente, 100ps de simulação DM foram realizadas restringindo a estrutura da proteína. As velocidades iniciais foram atribuídas de acordo com a distribuição de Maxwell. As simulações foram realizadas por 10 ns usando um ps de tempo de integração de 2 fs. Cada sistema foi aquecido com incrementos graduais nas seguintes

temperaturas: 100 K (10 ps), 150 K (5 ps), 200 K (5 ps) e 250 K (5 ps). Após essas etapas, as temperaturas dos sistemas foram ajustadas para 310 K. Os primeiros 6 ns de cada simulação foram considerados como parte das etapas de aquecimento (0,025 ns) e de equilíbrio (5,975 ns) e não foram utilizados na análise dos dados. As temperaturas do solvente e solutos (proteína, ligantes, água e íons de sódio) foram independentemente acopladas a um banho térmico com um tempo de relaxação de 0,1 ps utilizando o termostato V-rescale. A pressão nos sistemas foi fracamente acoplada a um banho de pressão com 2 ps de tempo de relaxamento usando o barostato de Parrinello-Rahman (NOSÉ; KLEIN, 1983; PARRINELLO; RAHMAN, 1981). Comprimentos de ligação foram constrangidos usando o algoritmo LINCS (HESS et al., 1997) com expansão de quarta ordem. As interações eletrostáticas entre os átomos não-ligantes foram avaliadas pelo método PME (Particle Mesh Ewald) (DARDEN; YORK; PEDERSEN, 1993) com um espaçamento de carga de aproximadamente 1,0 Å. A grade de carga foi interpolada em uma grade cúbica com a tolerância de soma direta definida. As interações de Lennard-Jones foram avaliadas usando um ponto de corte de 14 Å. A lista de pares foi atualizada a cada dez etapas. Para aumentar a amostragem, todas as simulações do complexo DM do ligante AsS foram executadas três vezes por 10 ns usando diferentes velocidades atômicas iniciais, assumindo uma distribuição Maxwelliana. Um total de nove simulações foram realizadas. Os dados gerados durante os últimos 4 ns de cada sistema de simulação, o período definido como o estágio de produção, foram utilizados para análise. Um total de 123 quadros de registro, cada um tomado a cada 100 ps, foram obtidos para cada complexo durante a fase de produção. Onde aplicável, as interações detalhadas foram calculadas usando o programa LigPlot⁺ (LASKOWSKI; SWINDELLS, 2011). Uma frequência mínima de 50% dos contatos (soma das interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio) nos quadros analisados foi estabelecida como critério de eficiência de ligação (SILVA et al., 2017). Das três simulações de cada complexo foram selecionadas para análise com simulação do programa g_mmpbsa (seção 2.5) com mais contatos tanto por pontes de hidrogênio quanto por interações hidrofóbicas (ARCANJO et al., 2015).

4.10.5. Mecânica Molecular Poisson-Boltzmann área de superfície MM-PBSA

A energia de ligação MM/PBSA foi calculada com o programa g_mmpbsa (http://rashmikumari.github.io/g_mmpbsa/) nos últimos 4 nano segundos de simulações DM (KUMARI et al., 2014). Neste trabalho, o programa g_mmpbsa utilizou o software GROMACS

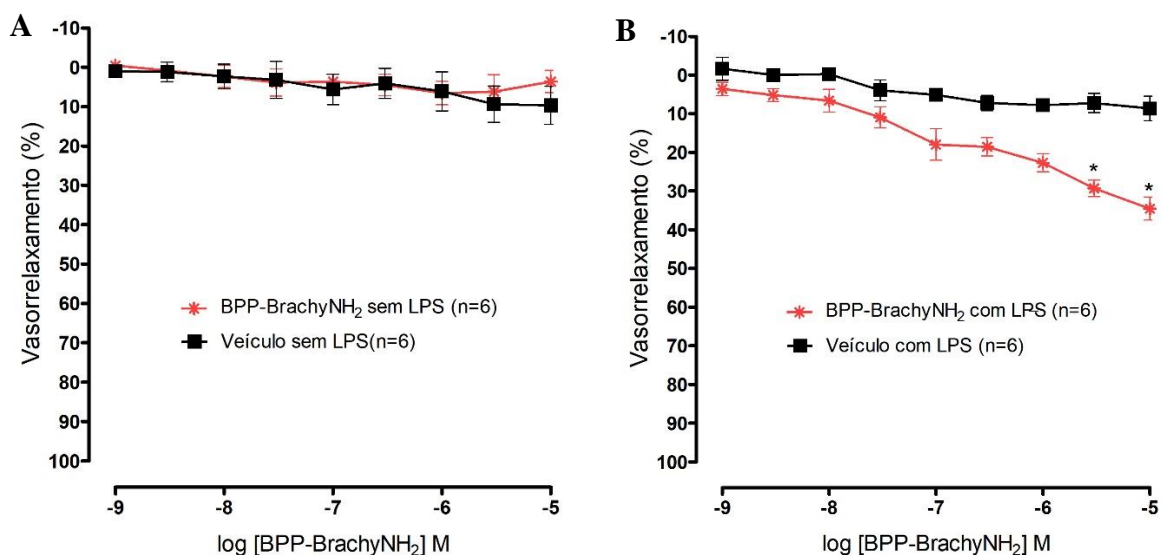
versão 5.1.4 e APBS (Adaptive Poisson-Boltzmann Solver) versão 1.4.1 (BAKER et al., 2001). A energia de ligação consiste em três termos energéticos, energia potencial no vácuo, energia de solvatação polar e energia de dissolução não polar. As constantes dielétricas de vácuo, solvente e soluto foram fixadas em 1, 80 e 2, respectivamente. O cálculo da energia de solvatação não polar foi baseado no modelo SASA. A contribuição da entropia não foi incluída no cálculo da energia de ligação.

5. Resultados

5.1 Investigação do efeito vasorrelaxante do BPP-BrachyNH₂ em preparações não estimuladas e estimuladas com LPS

Preparações não tratadas com LPS, foram pré-contraídas com adição cumulativa de noradrenalina, e a adição cumulativa do peptídeo BPP-BrachyNH₂ não induziu nenhum efeito vasorrelaxante quando comparado com o veículo ($E_{máx} = 6,579\%$ e $9,701\%$, respectivamente) (FIGURA 10-A). Por sua vez, em preparações pré-tratadas com LPS, o efeito vasorrelaxante induzido por BPP-BrachyNH₂ ocorreu de modo dependente da concentração ($E_{máx} = 34,56\%$) em relação ao veículo ($E_{máx} = 8,638\%$) (FIGURA 10-B).

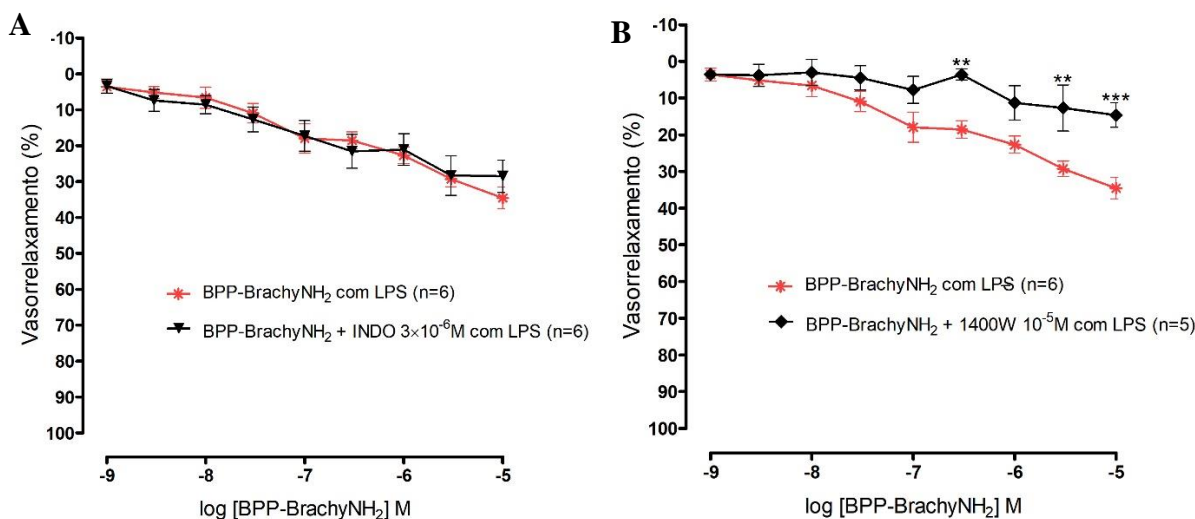
FIGURA 10 – Efeito vasorrelaxante induzido por BPP-BrachyNH₂ (10^{-9} – 10^{-5} M) na ausência (A) ou presença (B) de LPS ($10 \mu\text{g/mL}$) por 5 h em anéis de artéria mesentérica de resistência isolada de ratos, com endotélio funcional (E+). As preparações foram pré-contraídas cumulativamente com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



5.2 Avaliação da participação da enzima cicloxigenase (COX) e da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) no efeito vasorrelaxante do BPP-BrachyNH₂

A inibição não seletiva da COX, expressa constitutivamente nas células endoteliais, avaliada em anéis de artéria mesentérica de rato pré-incubados com indometacina (INDO), não promoveu alteração significativa do efeito vasorrelaxante induzido pelo BPP-BrachyNH₂ em comparação ao seu efeito nas preparações controle (Figura 10) ($E_{m\acute{a}x} = 34,56\%$ nos anéis do grupo controle para % nos anéis tratados com INDO) ($E_{m\acute{a}x} = 21,1 \pm 4,4\%$) (FIGURA 11-A). O contrário foi observado na presença de 1400W, onde o relaxamento induzido por BPP-BrachyNH₂ foi significativamente atenuado, e o efeito máximo obteve uma redução de aproximadamente 20% em comparação ao seu efeito nas preparações controle ($E_{m\acute{a}x} = 34,56\%$ nos anéis do grupo controle para 14,68% nos anéis tratados com 1400W) (FIGURA 11-B).

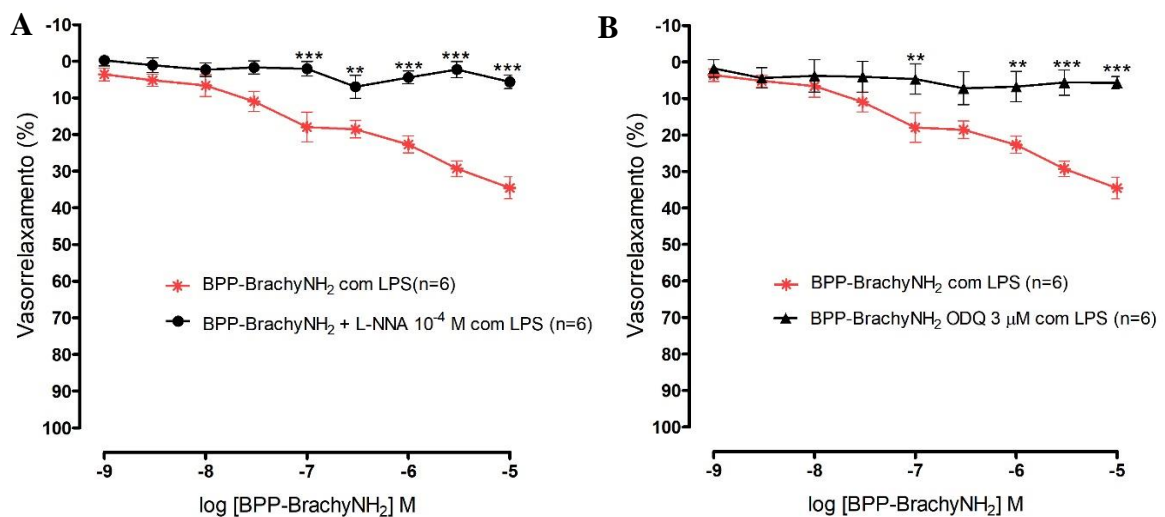
Figura 11 – Efeito da do INDO (A), do 1400W (B) sobre a resposta vasorrelaxante induzida por BPP-BrachyNH₂ ($10^{-9} - 3 \times 10^{-5}$ M) na presença de LPS ($10 \mu\text{g/mL}$) por 5 h em anéis de artéria mesentérica de resistência isolada de ratos, com endotélio funcional (E+). Os agentes foram incubados por 20 min, seguidos de pré-contração cumulativa com NA ($10^{-6} - 10^{-5}$ M), 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; $^{*}p < 0,01$ e $^{***}p < 0,001$ vs. BPP-BrachyNH₂ com LPS.



5.3 Participação da via NO/GMPc no efeito do BPP-BrachyNH₂

O papel da NOS, foi avaliado em anéis de artéria mesentérica de rato pré-incubados com L-NNA, onde o BPP-BrachyNH₂ teve seu efeito vasorrelaxante abolido, quando comparado com o controle (de 34,56% nos anéis do grupo controle para 5,643% nos anéis tratados com L-NNA) (Figura 12A). Sobre o papel da guanilil ciclase solúvel, o efeito vasorrelaxante induzido pelo BPP-BrachyNH₂ foi significativamente atenuado em anéis pré incubados com ODQ (Figuras 12B), quando comparado com o controle (de 34,56% nos anéis do grupo controle para 5,689% nos anéis tratados com ODQ).

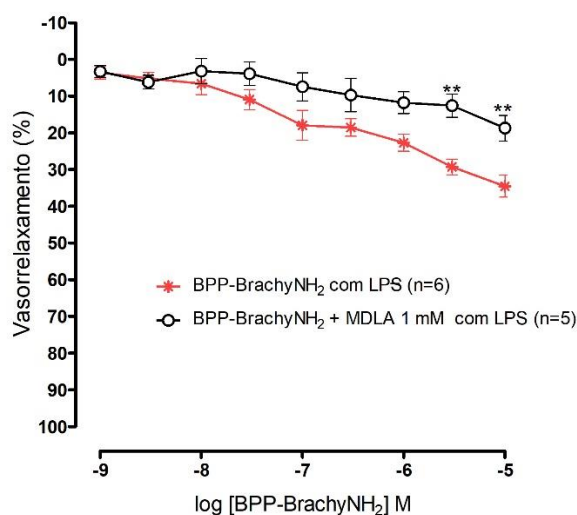
Figura 12 – Efeito do L-NNA (A) e ODQ (B) sobre a resposta vasorrelaxante induzida por BPP-BrachyNH₂ (10⁻⁹ – 10⁻⁵ M) na presença de LPS (10 µg/mL) por 5 h em anéis de artéria mesentérica de resistência isolada de ratos, com endotélio funcional (E+). O agente foi incubado por 20 min, seguido de pré-contracção cumulativa com NA (10⁻⁶ – 10⁻⁵ M), 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*<0,01 e ****p*<0,001 vs. BPP-BrachyNH₂ com LPS.



5.4 Participação da argininosuccinato sintetase (AsS) no efeito do BPP-BrachyNH₂

A investigação de um possível envolvimento da enzima AsS no efeito vasorrelaxante de BPP-BrachyNH₂, preparações pré-tratadas com LPS foram incubadas com o inibidor seletivo da AsS (MDLA) e pré-contraídas com NA antes da adição cumulativa de BPP-BrachyNH₂. As preparações pré-incubadas com MDLA também apresentaram significativa atenuação do relaxamento induzido por BPP-BrachyNH₂ (FIGURA 13) (de 34,56% nos anéis do grupo controle para 18,73% nos anéis tratados com MDLA).

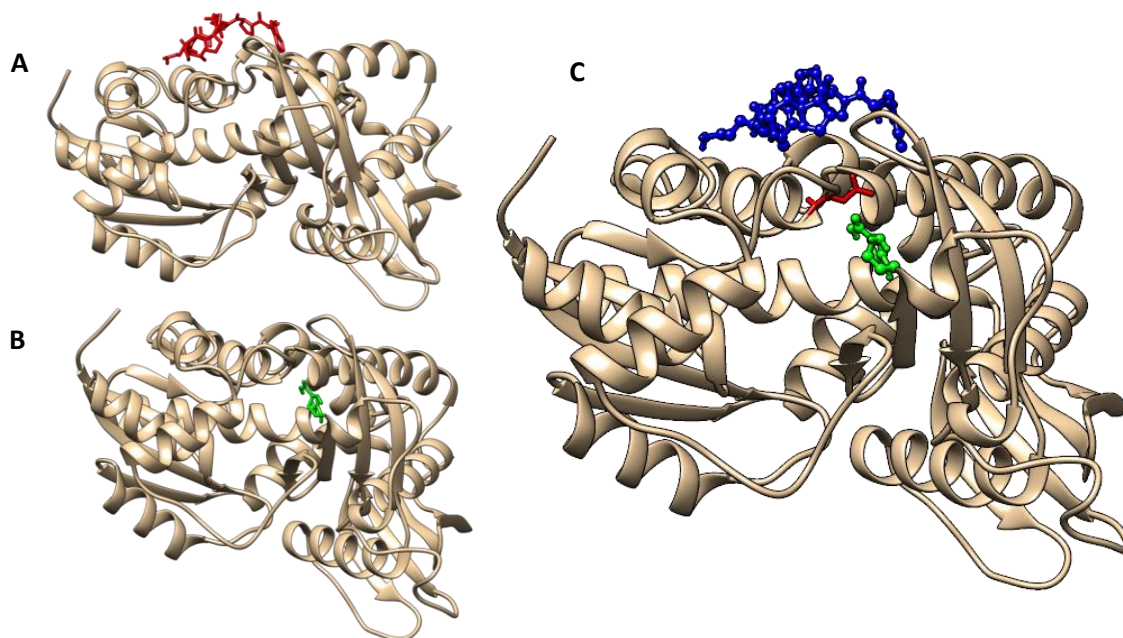
Figura 13 – Efeito do MDLA sobre a resposta vasorrelaxante induzida por BPP-BrachyNH₂ (10^{-9} – 10^{-5} M) na presença de LPS (10 µg/mL) por 5 h em anéis de artéria mesentérica de resistência isolada de ratos, com endotélio funcional (E+). O agente foi incubado por 20 min, seguido de pré-contracção cumulativa com NA (10^{-6} – 10^{-5} M), e então BPP-BrachyNH₂ foi cumulativamente adicionado. Os resultados foram expressos como média ± EPM. ANOVA de duas vias, seguida do pós-teste de Bonferroni; ** $p < 0,01$ vs. BPP-BrachyNH₂ com LPS.



5.5 Estudos de interação *in silico* com Argininosuccinato Sintase Humana (AsS)

Para a criação do modelo AsS foram escolhidas estruturas proteicas homólogas como modelos: Argininosuccinato Sintase humana (PDB ID: 2NZ2, resolução de 2,4 Å, 99% de identidade de sequência e 99% de resíduos conservados) e Argininosuccinato Sintetase de *Thermus thermophilus* (PDB ID : 1KH1, resolução de 2,3 Å, 95% de identidade de sequência e 70% de resíduos conservados). O modelo 1KH1 foi usado porque tinha informações estruturais para os aminoácidos que estavam faltando na estrutura 3D do AsS humano. Os aminoácidos Met1, Ser2, Ser3, Gly156, Met377, Lys408, Val409, Thr410, Ala411 e Lys412 foram adicionados ao modelo.

Figura 14 - Representação esquemática da estrutura do A) BPP-BrachyNH₂ (bastão vermelho) com a enzima AsS (em fita), B) L-citrulina (bastão verde) com a enzima AsS (em fita) e C) BPP-BrachyNH₂_L-citrulina_AoS (representadas em bastão azul e bola, bastão verde e bola e fitas, respectivamente) e Asn123 (bastão vermelho). Figuras foram geradas usando UCSF Chimera (<https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>).



Os ancoramentos moleculares de ligantes (BPP-BrachyNH₂ e L-citrulina) com o modelo da AsS foram baseados em Asn123 (o resíduo do sítio ativo). A Tabela 1 mostra os resultados do encaixe.

Tabela 1. Parâmetros de afinidade do ancoramento molecular.

Complexo (Proteína-ligando)	$\Delta G_{\text{ligação}}^a$ (kcal/mol)	K_i^b (uM)	Número de corridas de encaixe independentes	Aminoácidos que interagem através de ligações de hidrogênio ^c	Aminoácidos que fazem interações hidrofóbicas ^c
AsS_BPP-BrachyNH ₂	-7.35	4.07	100	Gly120, Glu129, Glu139	Gly122, Gln125, Val126, Arg146, Leu325, Tyr322, Tyr83, Arg272, Thr323, Tyr133, Lys121, Ile274, Met276
AsS_Lcitrulina	-6.24	26.78	100	Arg272, Asn123, Arg127, Ser92, Tyr87, Glu191	Gly122, Tyr322, Thr91, Tyr282, Glu270, Ser189

^a Energia de ligação da melhor conformação ^b K_i representa a constante de inibição ^c Obtido com o software Ligplot +.

Com as conformações resultantes da ancoramento foram realizadas três simulações MD para cada complexo (AsS_BPP-BrachyNH₂, AsS_Lcitrulina e AsS_BPP-BrachyNH₂_Lcitrulina) dando origem a um total de nove simulações. As interações de AsS com o peptídeo (AsS_BPP-BrachyNH₂), L-citrulina (AsS_Lcitrulina) e os dois ligantes simultaneamente (AsS_BPP-BrachyNH₂_Lcitrulina) foram estudadas para analisar a interação de L-citrulina na presença do peptídeo. A figura 2 mostra a frequência de contatos de ligantes com o AsS. As interações foram calculadas para os quadros extraídos dos últimos 4 ns das simulações DM usando o programa LigPlot⁺. Foi estabelecida uma eficiência de critério de um mínimo de 50% de contatos (soma de interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio) nos quadros analisados.

A Tabela 2 mostra os resultados das energias de ligação do complexo obtido por g_mmpbsa. Observa-se que a energia de ligação do peptídeo com AsS aumentou de -131.534 ± 16.270 kJ/mol para -150.985 ± 17.556 kJ/mol na presença de L-citrulina. Para a L-citrulina e a energia de ligação com AsS diminuiu de 30.631 ± 19.523 kJ/mol para 2.411 ± 18.587 kJ/mol na presença de BPP-BrachyNH₂. A energia de ligação para L-citrulina e apresentou resultados positivos (30.631 ± 19.523 kJ/mol) devido à contribuição para a energia de solvatação polar. Estes resultados estão de acordo com os mapas de contato da Fig. 15.

Figura 15 - Contatos identificados entre os ligantes e AsS calculados para os últimos 4,0 ns de simulações DM. (A) BPP-Brachy₂, (B) L-citrulina, (C) BPP-BrachyNH₂ na presença de L-citrulina e (D) L-citrulina na presença de BPP-BrachyNH₂. Sistema de cor: interações hidrofóbicas (verde) e ligações de hidrogênio (laranja). Os números nas barras indicam a porcentagem de contatos para cada resíduo de aminoácido. Contatos avaliados em instantâneos tirados a cada 100 ps do estágio de produção.

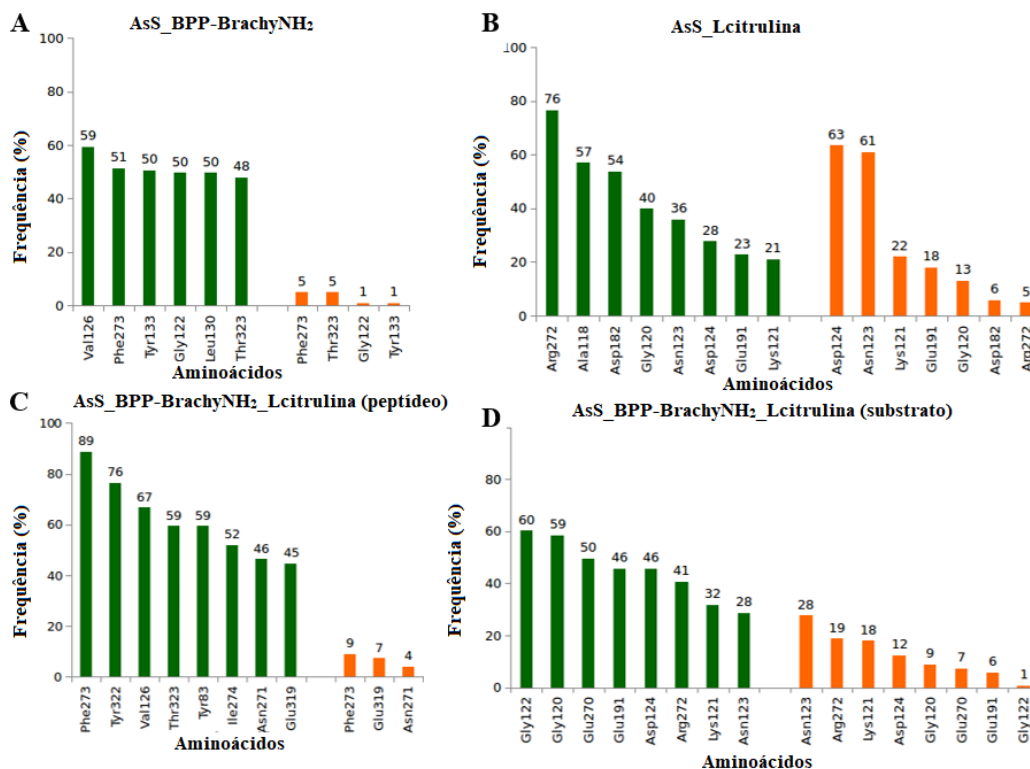


Tabela 2. Energias de ligação de complexos proteína-ligante obtidos por g_mmpbsa.

Complexo (Proteína-ligante)	ΔE_{vdWa}	ΔE_{elec}	ΔG_{polar}	$\Delta G_{n\tilde{a}opolar}$	$\Delta G_{ligação}$
AsS_BPP-BrachyNH ₂	-183.735 ±15.091	-73.899 ±14.467	146.399 ±18.353	-20.299 ±1.710	-131.534 ±16.270
AsS_Lcitrulina	-79.627 ±10.722	-96.953 ±18.658	218.869 ±31.037	-11.659 ±0.719	30.631 ±19.523
AsS_BPP- BrachyNH ₂ _Lcitrulina (Peptídeo)	-211.591 ±16.762	-49.803 ±15.937	133.532 ±26.088	-23.123 ±1.987	-150.985 ±17.556
AsS_BPP_Lcitrulina (Substrato)	-89.374 ±10.812	-92.821 ±16.472	196.092 ±27.365	-11.486 ±0.650	2.411 ±18.587

^a ΔE_{Wa} , ΔE_{elec} , ΔG_{polar} e $\Delta G_{n\tilde{a}opolar}$ são componentes energéticos de ligação de van der Waals, energias de solvência eletrostática, polar e não polar, respectivamente. $\Delta G_{ligação}$ é a energia de ligação total. A unidade de energia é kJ/mol.

6. Discussão

O principal achado do presente estudo refere-se ao efeito vasorrelaxante do BPP-BrachyNH₂ em modelo de disfunção endotelial induzido por endotoxina e a identificação da enzima AsS como um novo alvo funcional do peptídeo no mecanismo de aumento da produção de NO.

As modificações da homeostasia vascular na disfunção endotelial decorrem do desequilíbrio endógeno da produção local e/ou sistêmica de vasodilatadores (como por exemplo, o NO e prostaglandinas) e vasoconstritores (como por exemplo, catecolaminas, angiotensina II, fator ativador de plaquetas, tromboxano A₂ e endotelinas), que são consequências da severa disfunção endotelial causada por exemplo, por endotoxina (TERLUK, 2005).

Estudos demonstraram que o LPS e certas citocinas estimulam a produção de NO via expressão tanto da isoforma induzível da NOS como a enzima AsS, acreditando-se que o desequilíbrio no metabolismo do NO, especialmente no endotélio, desempenhe um papel crucial no desenvolvimento dos distúrbios endoteliais relacionados a endotoxina (NUSSLER et al., 1994; XIE; GROSS, 1997). Hattori, Campbell e Gross (1994) descreveram que a indução da enzima AsS por LPS e IFN- γ é responsável pela habilidade das CMLVs em reciclarem a citrulina como única fonte de substrato para a produção de NO. A medida em que a síntese de NO requer um fornecimento contínuo de substrato, é importante identificar onde e como esta arginina se origina.

No presente estudo, com o propósito de avaliar o efeito do BPP-BrachyNH₂ foi utilizado um modelo de disfunção endotelial induzida por LPS, em preparações de artérias mesentéricas de ratos com endotélio funcional, pré-tratadas ou não-tratadas com LPS. O presente estudo demonstra que o efeito vasorrelaxante promovido pelo BPP-BrachyNH₂, foi dependente de concentração e apenas em anéis mesentéricos pré-tratados com LPS. Em contraste, não foi observado efeito vasorrelaxante induzido pelo BPP-BrachyNH₂ em relação aos anéis não-tratados com LPS, onde nenhum efeito foi observado em relação ao veículo, sugerindo-se que a presença de um quadro de comprometimento endotelial com necessidade da produção de NO aumentada para que haja uma regulação positiva dessa disfunção, causando assim a resposta vasodilatadora acentuada de forma significativa na presença do BPP-BrachyNH₂.

A resposta desigual encontrada na ausência e presença de LPS concordam com os achados de Ianzer et al. (2007) e Guerreiro et al. (2009), uma vez que obtiveram também

respostas diferente à *Bj*-BPP-10c encontrada em ratos espontaneamente em comparação com ratos normotensos, uma vez que a produção aumentada de arginina regula positivamente a produção de NO por células produtoras de NO, um fenômeno conhecido por ser reduzido em ratos geneticamente hipertensos, devido a redução da biodisponibilidade de NO e consequente comprometimento endotelial no metabolismo da L-arginina. Este quadro de disfunção endotelial, também alcançado nas preparações tratadas com LPS, apoiam a hipótese de que o comprometimento do sistema de reciclagem de arginina a partir de citrulina utilizado para produção de NO fornece menos arginina para a produção de NO. Atribuindo esse resultado, às diferenças no metabolismo do NO entre anéis tratados e não tratados com LPS.

O envolvimento do NO no efeito vasorrelaxante induzido por BPP-BrachyNH₂ em preparações pré-tratadas com LPS foi confirmada pela adição de dois inibidores de NOS, um inibidor não seletivo, L-NNA, e um inibidor seletivo para iNOS, 1400W. A vasodilatação dependente de BPP-BrachyNH₂ foi praticamente abolida, quando comparada com o controle, após o bloqueio da síntese de NO com L-NNA nas artérias mesentéricas incubadas com LPS, podendo demonstrar o envolvimento da via NOS/NO no efeito vasorrelaxante do peptídeo.

Na presença de 1400W, o relaxamento induzido por BPP-BrachyNH₂ foi significativamente atenuado. Estes resultados indicam que o comprometimento seletivo ocasionado por LPS no relaxamento dependente do endotélio induzido por BPP-Brachy-NH₂ corrobora com os achados da droga anterior, que atenuação do vasorelaxamento é causado pela diminuição da liberação de NO endotelial. Sabendo-se que o comprometimento da produção de metabólitos do NO induzida pelo L-NNA, confirma o envolvimento da NOS no aumento da produção de metabólitos de NO do BPP-BrachyNH₂ (GUERREIRO et al., 2009). A não completa abolição do relaxamento apresentado, pode ser explicado pelas possíveis diferentes fontes de produção de NO vascular, independente da NOS (CHIEN et al., 2014; ZHAO; VANHOUTTE; LEUNG, 2015).

Estudos de Hernanz et al. (2004) foi observado que a incubação de anéis de artéria mesentérica superior de ratos com LPS induziu a expressão de iNOS na parede vascular e a indução de iNOS foi acompanhada por diminuição da contração induzida por noradrenalina, levando a concluir que o NO derivado da iNOS ou substância contendo NO desempenha um papel na redução da evocação do LPS na contração por noradrenalina. Assim, permitindo levar a conclusão que a hiporreatividade vascular induzida por LPS, envolve a expressão da iNOS, assim como a ativação da forma constitutiva eNOS (O'BRIEN et al., 2001). No mesmo ano, Heneka e colaboradores estudando a expressão da AsS e iNOS em neurônios de cérebros de

pacientes com doença de Alzheimer demonstraram que a expressão de AsS em neurônios aumenta paralelamente à expressão da iNOS na doença de Alzheimer. E como um suprimento adequado de L-arginina é indispensável para geração prolongada de NO, a co-indução de ASS permite que as células mantenham a geração de NO durante a doença de Alzheimer repondo o suprimento necessário de L-arginina.

Portanto, o pronunciado relaxamento causado pelo BPP-BrachyNH₂ no presente estudo reflete a indução da NOS induzível na artéria mesentérica de rato após a incubação do LPS e, assim, aumento da conversão da L-arginina em NO para produzir relaxamento. Além disso, a incubação com 1400W inverteu parcialmente o aumento da resposta do BPP-BrachyNH₂ anéis de artéria mesentérica de ratos pré-tratados com lipopolissacarídeo. Isto é consistente com o efeito inibitório proposto do 1400W na NOS induzível.

A endotoxina é conhecida por induzir a expressão de outras enzimas, incluindo a cicloxigenase do tipo II (COX-2) sugerindo que mecanismos adicionais provavelmente contribuirão para mudanças induzidas por endotoxinas na reatividade vascular. Contudo, em relação ao papel dos prostanóides, nenhuma alteração significativa no efeito vasorrelaxante induzido pelo BPP-BrachyNH₂ foi observada na presença da indometacina, um inibidor não seletivo da COX, levando-nos a concluir que o papel dos prostanóides no efeito vasorrelaxante não foi significativo.

Devido a sua atividade, a CG é considerada o alvo mais importante da molécula sinalizadora NO, quando em baixas concentrações (IGNARRO et al., 1986). Uma vez formado, o NO pode estimular a CGs, resultando no relaxamento do músculo liso vascular através da formação de GMPc. Portanto, o uso de substâncias que modulam a atividade desta enzima constitui uma forma bastante eficaz para a investigação sobre a sua participação no efeito vasorrelaxante induzido por diversos compostos. Por conseguinte, o ODQ, um inibidor seletivo da CGs, foi utilizado na avaliação dos efeitos mediados pelo NO e foi observado que a pré-incubação com ODQ praticamente aboliu o efeito vasorrelaxante em anéis de artéria mesentérica pelo BPP-BrachyNH₂. Consistente com isso, a inibição da NOS ou guanilil ciclase solúvel mostrou reverter a hiporreatividade vascular, parcialmente ou completamente, sugerindo que o vasorrelaxamento provocado por este nitrato é decorrente de possível ativação da via NO/GMPc (O'BRIEN et al., 2001; YUNDE ZHAO et al., 2000).

Estes resultados, sugerem que a via do NO tem papel fundamental na resposta vasodilatadora dependente do endotélio de BPP-BrachyNH₂. Corroborando com os relatos de Arnold et al. (1977); Katsuki et al. (1977); Zhao et al. (2000), os quais concluíram que os

nitratos orgânicos causam vasodilatação via ativação da enzima guanilato ciclase (CG), mediada pelo NO, com aumento dos níveis de GMPc dependente da dose.

O relaxamento evocado pelo BPP-BrachyNH₂ foi inibido tanto pelos inibidores da NOS, L-NMMA e 1400W, quanto pelo inibidor da guanilato ciclase, ODQ. Estes dados mostram que o relaxamento induzido pelo BPP-BrachyNH₂ é devido à formação de GMPc acoplado a NOS e, assim, sugerem a ativação da via L-arginina-NO-GMPc na artéria mesentérica.

Embora a produção de NO esteja diretamente relacionada à enzima NOS, como demonstrado nos resultados acima, a produção global de NO pelas células endoteliais mostra-se dependente de um ciclo funcional da citrulina-NO. A capacidade das células endoteliais de sustentar a produção de NO é severamente limitada, não apenas pela baixa regulação da eNOS mas também pela disponibilidade de arginina proporcionada pela AsS através do ciclo de citrulina-NO (GOODWIN et al., 2007).

Devido a esses achados, observamos se o BPP-BrachyNH₂, conhecido por promover a produção de NO e a vasodilatação (ARCANJO, 2016; ARCANJO et al., 2015), pode afetar a eficiência do ciclo citrulina-NO via expressão AsS em células endoteliais vasculares apoiando a produção de NO endotelial vascular, pelo menos em parte, através da regulação da expressão da AsS, ou se o aumento na produção de NO foi simplesmente devido a efeitos estabelecidos sobre a ativação da eNOS.

A AsS é reconhecida como um importante participante do ciclo de citrulina-NO que representa um passo limitante para a síntese de NO. Guerreiro e colaboradores (2009) demonstraram que a AsS é o principal ligante ao *Bj*-PRO-10c no citosol do rim. Este peptídeo aumentou o nível plasmático de arginina e provocou um efeito anti-hipertensivo sustentado em SHR, mas não em ratos normotensos. Neste mesmo estudo, um inibidor específico do AsS reduziu a atividade anti-hipertensiva do *Bj*-BPP-10c em SHR. Da mesma forma, nossos resultados mostraram que *Bj*-PRO-10c induziu vasorelaxamento em anéis aórticos de Wistar e SHR, mas a pré-incubação com o inibidor de AsS, MDLA, bloqueou esse efeito apenas em SHR. Assim, é possível que a AsS seja diferencialmente expressa em ratos normotensos e hipertensos, semelhando a enzima NOS, que apresenta expressão/presença reduzida de eNOS em SHR adultos e idosos, ocasionando uma redução na produção de NO (CHOU et al., 1998; TANG; VANHOUTTE, 2008).

Mediante os resultados anteriores obtidos, buscando confirmar a relação AsS/BPP-BrachyNH₂ no mecanismo de produção de NO, os segmentos pré-tratados com LPS foram

incubados com MDLA, um inibidor da AsS, e apresentaram significativa atenuação do relaxamento induzido por BPP-BrachyNH₂, indicando a possível participação da AsS na resposta vasorrelaxante. Esses achados corroboram estudos que demonstraram o possível envolvimento da AsS na recuperação dos níveis de L-arginina e NO como mecanismo envolvido no vasorrelaxamento induzido por BPPs (CAMARGO et al., 2012; GUERREIRO et al., 2009; MORAIS et al., 2013).

Nossos resultados fornecem evidências que apoiam a necessidade de regeneração de arginina para produção de NO. Como a produção de NO celular é absolutamente dependente da disponibilidade de arginina, que doa átomos de nitrogênio para NOS-dependente na formação de NO (NUSSLER et al., 1994), a descoberta de um peptídeo que aumente a atividade da enzima AsS nas células endoteliais, que resulta no aumento da capacidade de fornecer o substrato necessário para sustentar a produção de NO, pode fornecer uma alternativa farmacêutica para melhorar a disfunção endotelial.

Nos estudos de interação *in silico* com a AsS, o complexo AsS_BPP-BrachyNH₂ apresentou melhores resultados para energia de ligação ($\Delta G_{\text{ligação}} = -7.35$ kcal/mol), constante de inibição ($K_i = 4.07$) e 13 interações hidrofóbicas comparado ao complexo AsS_Lcitrulina ($\Delta G_{\text{ligação}} = -6.24$ kcal/mol, $K_i = 26.78$ e 6 interações hidrofóbicas, respectivamente). No entanto, o complexo formado AsS_Lcitrulina seis interações ligações de hidrogênio (Arg272, Asn123, Arg127, Ser92, Tyr87, Glu191), enquanto que o complexo de AsS_BPP-BrachyNH₂ formado apenas três (Gly120, Glu129, Glu139). Observou-se também que a L-citrulina permaneceu na região do sítio ativo, interagindo por ligação de hidrogênio com o aminoácido Asn123, que está de acordo com a literatura, enquanto o peptídeo permaneceu na superfície do AsS.

Observa-se que a L-citrulina_AsS (Fig. 15B) obteve maior quantidade de contatos hidrofóbicos (8 aminoácidos) e pontes de hidrogênio (7 aminoácidos) em relação ao BPP-BrachyNH₂_AsS (Fig. 15A) que obtiveram 6 e 4, respectivamente. Após as simulações de DM, a L-citrulina permaneceu na região do sítio ativo do AsS fazendo 97% de interações com o aminoácido Asn123 (36% dos contatos hidrofóbicos e 61% por pontes de hidrogênio).

Com relação ao complexo AsS com os dois ligantes simultaneamente, observou-se que houve um aumento nas interações BPP-BrachyNH₂ em contato com a L-citrulina e AsS (Fig. 15C) em relação ao BPP-BrachyNH₂ (Fig. 15A) sem a presença de L-citrulina; houve uma diminuição nas interações da L-citrulina em contato com o BPP-BrachyNH₂ (Fig. 15D) em relação a L-citrulina (Fig. 15B) sem a presença de BPP-BrachyNH₂. Além disso, houve uma

mudança na quantidade de interações de aminoácidos da região do sítio ativo, Asp124 com um total de 91% diminuiu para 58% e Asn123 com um total de 97% diminuiu para 56%, que pode estar relacionada a formação do produto da reação que a enzima AsS catalisa, o arginosuccinato, mas será necessário mais estudos para essa conclusão.

7. Considerações finais e Perspectivas

A partir dos resultados obtidos, foi possível concluir que:

A atenuação significativa do efeito do BPP-BrachyNH₂ na presença de MDLA, inibidor seletivo da enzima AsS, indica o envolvimento de um possível aumento na biodisponibilidade de L-arginina, substrato para síntese de NO, em modelo de disfunção endotelial induzida por LPS.

Estudos *in silico* de ancoramento e dinâmica molecular entre AsS e BPP-BrachyNH₂ corroboraram com o envolvimento desta enzima no efeito vasorrelaxante induzido pelo peptídeo.

Esses resultados reforçam a importância da atividade do BPP-BrachyNH₂ em estudos relacionados à investigação de outras vias envolvidas nesta resposta, reforçando potencial aplicação em modelos fisiopatológicos complementares de disfunção endotelial, sugerindo utilização em tratamentos de doenças cardiovasculares. Como perspectivas futuras, segue:

- Investigação do papel do efeito do BPP-BrachyNH₂ no vasorelaxamento induzido por L-citrulina em artérias mesentéricas pequenas de rato tratadas com LPS;
- Determinação bioquímica da atividade e da expressão da enzima AsS sobre o efeito do BPP-BrachyNH₂;
- Investigar a atividade da enzima AsS em outros modelos de disfunção endotelial, como nova proteína-alvo para o tratamento de condições fisiopatológicas decorrentes de deficiência de NO, como diabetes;
- Contribuir com o fortalecimento das potenciais aplicações terapêuticas dos PRO em doenças relacionadas à deficiência de NO e de seus possíveis alvos farmacológicos envolvidos.

8. Referências

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. 1–19, 2015.

ARCANJO, D. D. R. **Caracterização e aplicações cardiovasculares de um novo peptídeo rico em prolina obtido da secreção cutânea de *Brachycephalus ephippium***. 2016. 135f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Rede Nordeste de Biotecnologia, Universidade Federal do Piauí. Teresina, 2016.

ARCANJO, D. D. R. et al. Structure-function studies of BPP-BrachyNH₂ and synthetic analogues there of with Angiotensin I-Converting Enzyme. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 139, p. 401–411, 2017a.

ARCANJO, D. D. R. et al. *In Silico*, *In vitro* and *In vivo* Toxicological assessment of BPP-BrachyNH₂, a vasoactive proline-rich oligopeptide from *Brachycephalus ephippium*. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 23, n. 3, p. 323–331, 2017b.

ARNOLD, W. P. et al. Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 74, p. 3203–3207, 1977.

BAKER, N. A. et al. Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 18, p. 10037–41, 2001.

BAYDOUN, A. R. et al. Substrate-dependent regulation of intracellular amino acid concentrations in cultured bovine aortic endothelial cells. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 173, n. 3, p. 940–8, 1990.

BERENDSEN, H. J. C. et al. Interaction Models for Water in Relation to Protein Hydration. In: **The Jerusalem Symposia on Quantum Chemistry and Biochemistry**. Springer, Dordrecht, p. 331–342.1981.

BIELSKA, E. et al. Virtual screening strategies in drug design – methods and applications. **BioTechnologia**, v. 92, n. 3, p. 249–264, 2011.

BRIDGES, L. E. et al. Mesenteric artery contraction and relaxation studies using automated wire myography. **Journal of visualized experiments : JoVE**, n. 55, 2011.

BYERS, L. D.; WOLFENDEN, R. A Potent reversible inhibitor of carboxypeptidase A. **J. Biol. Chem**, v. 247, n. 2, p. 606–608, 1972.

CAMARGO, A. C. M. et al. Bradykinin-potentiating peptides: Beyond captopril. **Toxicon**, v. 59, p. 516–523, 2012.

- CAMARGO, A.; FERREIRA, S. H. Action of bradykinin potentiating factor (BPF) and dimercaprol (BAL) on the responses to bradykinin of isolated preparations of rat intestines. **British Journal of Pharmacology**, v. 42, p. 305–307, 1971.
- CAMPBELL, D. J. Bradykinin Peptides. In: **Handbook of Biologically Active Peptides**. 2ed. Academic Press, p. 1386–1393, 2013.
- CHEN, F.; LUCAS, R.; FULTON, D. The subcellular compartmentalization of arginine metabolizing enzymes and their role in endothelial dysfunction. **Frontiers in Immunology**, v. 4, p. 184, 2013.
- CHI, C. W. et al. Structure-function studies on the bradykinin potentiating peptide from Chinese snake venom (*Agkistrodon halys Pallas*). **Peptides**, v. 6 Suppl 3, p. 339–42, 1985.
- CHIEN, S.-J. et al. Two different approaches to restore renal nitric oxide and prevent hypertension in young spontaneously hypertensive rats: l-citrulline and nitrate. **Translational Research**, v. 163, n. 1, p. 43–52, 2014.
- CHOU, T. C. et al. Alterations of nitric oxide synthase expression with aging and hypertension in rats. **Hypertension**, v. 31, n. 2, p. 643–8, 1998.
- CINTRA, A. C.; VIEIRA, C. A.; GIGLIO, J. R. Primary structure and biological activity of bradykinin potentiating peptides from *Bothrops insularis* snake venom. **Journal of protein chemistry**, v. 9, n. 2, p. 221–7, 1990.
- CLOSS, E. I. et al. Plasma membrane transporters for arginine. **The Journal of Nutrition**, v. 134, n. 10, p. 2752S–2759S, 2004.
- 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. 515–523, 2007.
- CORBIN, K. **Multi-level regulation of argininosuccinate synthase: Significance for endothelial nitric oxide production**. 2008. 228f. Tese (Doutorado em Filosofia) – College of Medicine, University of South Florida. Florida, 2008.
- CORBIN, K. D. et al. Phosphorylation of argininosuccinate synthase by protein kinase A. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 377, n. 4, p. 1042–1046, 2008.
- COTTON, J. et al. Selective inhibition of the C-domain of angiotensin I converting enzyme by bradykinin potentiating peptides. **Biochemistry**, v. 41, p. 6065–6071, 2002.
- CUSHMAN, D. W. et al. Design of potent competitive inhibitors of angiotensin-converting enzyme. Carboxyalkanoyl and mercaptoalkanoyl amino acids. **Biochemistry**, v. 16, n. 25, p. 5484–5491, 1977.
- CUSHMAN, D. W.; ONDETTI, M. A. Design of angiotensin converting enzyme inhibitors. **Nature Medicine**, v. 5, n. 10, 1999.

D. VAN DER SPOEL, E. LINDAHL, B. H. **the GROMACS development team**, 2014.

DARDEN, T.; YORK, D.; PEDERSEN, L. Particle mesh Ewald: An $N \cdot \log(N)$ method for Ewald sums in large systems. **The Journal of Chemical Physics**, v. 98, n. 12, p. 10089–10092, 1993.

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

DIAS, R. G.; NEGRÃO, C. E.; KRIEGER, M. H. Nitric oxide and the cardiovascular system: cell activation, vascular reactivity and genetic variant. **Arq Bras Cardiol**, v. 96, n. 1, p. 68–75, 2011.

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

ESWAR, N. et al. Comparative protein structure modeling using Modeller. **Current protocols in bioinformatics**, Chapter 5, Unit-5.6, 2006.

FARAH, C.; MICHEL, L. Y. M.; BALLIGAND, J.-L. Nitric oxide signalling in cardiovascular health and disease. **Nature Reviews Cardiology**, 2018.

FÉLÉTOU, M. **The Endothelium**. Morgan & Claypool Life Sciences, 2011.

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

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

FERREIRA, S. H. Um fator potenciador da bradicinina no veneno de *Bothrops jararaca*. **British Journal Pharmacology**, v. 24, p. 163–169, 1965b.

FERREIRA, S. H. et al. Activity of various fractions of bradykinin potentiating factor against angiotensin I converting enzyme. **Nature**, v. 225, n. 5230, p. 379–380, 1970.

FERREIRA, S. H. Aspectos históricos da hipertensão: Do fator de potencialização da bradicinina (BPF) aos inibidores da ECA. **HiperAtivo**, v. 5, n. 1, 1998.

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, 1970.

FERREIRA, S. H.; ROCHA E SILVA, M. Potentiation of bradykinin and eledoisin by BPF (bradykinin potentiating factor) from *Bothrops jararaca* venom. **Experientia**, v. 21, n. 6, p. 347–349, 1965.

- FERREIRA, S. H.; SILVA, M. R. E. Potentiation of bradykinin by dimercaptopropanol (BAL) and other inhibitors of its destroying enzyme in plasma. **Biochemical Pharmacology**, v. 11, n. 12, p. 1123–1128, 1962.
- FLAM, B. R. et al. Caveolar localization of arginine regeneration enzymes, argininosuccinate synthase, and lyase, with endothelial nitric oxide synthase. **Nitric Oxide**, v. 5, p. 187–197, 2001.
- FONTANA DE OLIVEIRA, E. et al. Enhancement of the citrulline-nitric oxide cycle in astrogloma cells by the proline-rich peptide-10c from *Bothrops jararaca* venom. 2010.
- FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v. 288, p. 373–376, 1980.
- GASTEIGER, J.; MARSILI, M. Iterative partial equalization of orbital electronegativity—a rapid access to atomic charges. **Tetrahedron**, v. 36, n. 22, p. 3219–3228, 1980.
- GAVRAS, H. et al. An angiotensin converting-enzyme inhibitor to identify and treat vasoconstrictor and volume factors in hypertensive patients. **New England Journal of Medicine**, v. 291, n. 16, p. 817–821, 1974.
- GIMBRONE, M. A.; GARCÍA-CARDEÑA, G. Endothelial cell dysfunction and the pathobiology of atherosclerosis. **Circulation research**, v. 118, n. 4, p. 620–36, 2016.
- 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, 2007.
- GOODSELL, D. S. Computational docking of biomolecular complexes with AutoDock. **Cold Spring Harbor protocols**, v. 2009, n. 5, 2009.
- GOODSELL, D. S.; MORRIS, G. M.; OLSON, A. J. Automated docking of flexible ligands: applications of AutoDock. **Journal of molecular recognition : JMR**, v. 9, n. 1, p. 1–5, 1996.
- GOODWIN, B. L. et al. Tumor necrosis factor- α reduces argininosuccinate synthase expression and nitric oxide production in aortic endothelial cells. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 293, n. 2, p. H1115–H1121, 2007.
- GOODWIN, B. L.; SOLOMONSON, L. P.; EICHLER, D. C. Argininosuccinate synthase expression is required to maintain nitric oxide production and cell viability in aortic endothelial cells. **The Journal of biological chemistry**, v. 279, n. 18, p. 18353–60, 2004.
- GREENE; LEWIS 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, p. 62–71, 1972.
- GREENE, L. J.; STEWART, J. M.; FERREIRA, S. H. Bradykinin-potentiating peptides from the venom of *Bothrops jararaca*. Springer, Boston, MA, p. 81–87, 1970.

GRYGLEWSKI, R. J.; BOTTING, R. M.; VANE, J. R. Mediators produced by the endothelial cell. **Hypertension**, v. 12, n. 6, p. 530–48, 1988.

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, 2009.

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

HAINES, R. J. et al. Protein kinase C α phosphorylates a novel argininosuccinate synthase site at serine 328 during calcium-dependent stimulation of endothelial nitric-oxide synthase in vascular endothelial cells. **The Journal of biological chemistry**, v. 287, n. 31, p. 26168–76, 2012.

HAINES, R. J.; PENDLETON, L. C.; EICHLER, D. C. Argininosuccinate synthase: at the center of arginine metabolism. **International Journal Biochemistry Molecular Biology**, v. 2, p. 8–23, 2010.

HAO, G.; XIE, L.; GROSS, S. S. Argininosuccinate synthetase is reversibly inactivated by S-nitrosylation *in vitro* and *in vivo*. **The Journal of biological chemistry**, v. 279, n. 35, p. 36192–200, 2004.

HATTORI, Y.; CAMPBELL, E. B.; GROSS, S. S. Argininosuccinate synthetase mRNA and activity are induced by immunostimulants in vascular smooth muscle. Role in the regeneration or arginine for nitric oxide synthesis. **The Journal of biological chemistry**, v. 269, n. 13, p. 9405–8, 1994.

HATTORI, Y.; SHIMODA, S.; GROSS, S. S. Effect of lipopolysaccharide treatment *in vivo* on tissue expression of argininosuccinate synthetase and argininosuccinate lyase mRNAs: Relationship to nitric oxide synthase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 215, n. 1, p. 148–153, 1995.

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, p. 969–977, 2003.

HAYASHI, M. A. F.; CAMARGO, A. C. M. The Bradykinin-potentiating peptides from venom gland and brain of *Bothrops jararaca* contain highly site specific inhibitors of the somatic angiotensin-converting enzyme. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 1163–1170, 2005.

HECKER, M. et al. The metabolism of L-arginine and its significance for the biosynthesis of endothelium-derived relaxing factor: cultured endothelial cells recycle L-citrulline to L-arginine. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, n. 21, p. 8612, 1990.

HEDEGAARD, E. R. et al. Involvement of potassium channels and calcium-independent mechanisms in hydrogen sulfide-induced relaxation of rat mesenteric small arteries. **The Journal of Pharmacology Therapeutics**, v. 356, p. 53–63, 2016.

HENEKA, M. T. et al. Neuronal and glial coexpression of argininosuccinate synthetase and inducible nitric oxide synthase in alzheimer disease. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**, v. 60, n. 9, p. 906–916, 2001.

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

HESS, B. et al. LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations. **Journal of Computational Chemistry**, v. 18, n. 12, p. 1463–1472, 1997.

HUANG, S.-Y. Search strategies and evaluation in protein–protein docking: principles, advances and challenges. **Drug Discovery Today**, v. 19, n. 8, p. 1081–1096, 2014.

HUSSON, A. et al. Argininosuccinate synthetase from the urea cycle to the citrulline-NO cycle. **European Journal of Biochemistry**, v. 270, n. 9, p. 1887–1899, 2003.

HUYNH, N. N.; CHIN-DUSTING, J. Amino acids, arginase and nitric oxide in vascular health. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 33, n. 1–2, p. 1–8, 2006.

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, p. 1085–1092, 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, p. 795–805, 2007.

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

IGNARRO, L. J. et al. Activation of soluble guanylate cyclase by NO-hemoproteins involves NO-heme exchange. Comparison of heme-containing and heme-deficient enzyme forms. **The Journal of biological chemistry**, v. 261, n. 11, p. 4997–5002, 1986.

IGNARRO, L. J. et al. Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. **Circulation research**, v. 61, p. 866–879, 1987.

KATSUKI, S. et al. Stimulation of guanylate cyclase by sodium nitroprusside, nitroglycerin and nitric oxide in various tissue preparations and comparison to the effects of sodium azide and hydroxylamine. **Journal of cyclic nucleotide research**, v. 3, p. 23–35, 1977.

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

KRIEGER, E. M. et al. Potential screening test for detection of overactivity of renin-angiotensin system. **The Lancet**, v. 297, n. 7693, p. 269–271, 1971.

- KUMARI, R. et al. *g_mmpbsa* —A GROMACS Tool for High-Throughput MM-PBSA Calculations. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 54, n. 7, p. 1951–1962, 2014.
- LAMEU, C.; ULRICH, H. Applications of snake venom proline-rich oligopeptides (*Bj*-PROs) in disease conditions resulting from deficient nitric oxide production. **Drug Discovery**, 2013.
- LASKOWSKI, R. A.; SWINDELLS, M. B. LigPlot⁺: Multiple ligand–protein interaction diagrams for drug discovery. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 51, n. 10, p. 2778–2786, 2011.
- LEWIS, R. J.; GARCIA, M. L. Therapeutic potential of venom peptides. **Nature reviews. Drug Store**, v. 2, n. 10, p. 790–802, 2003a.
- MCCABE, T. J. et al. Enhanced electron flux and reduced calmodulin dissociation may explain calcium-independent eNOS activation by phosphorylation. **The Journal of biological chemistry**, v. 275, n. 9, p. 6123–8, 2000.
- MCDONALD, K. K. et al. A caveolar complex between the cationic amino acid transporter 1 and endothelial nitric-oxide synthase may explain the “arginine paradox”. **The Journal of biological chemistry**, v. 272, n. 50, p. 31213–6, 1997.
- MEKI, A. R.; 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. 1359–65, 1995.
- MITCHELL, J. A. et al. Cultured endothelial cells maintain their L-arginine level despite the continuous release of EDRF. **European journal of pharmacology**, v. 182, n. 3, p. 573–6, 17 1990.
- MONCADA, S.; ERUSALIMSKY, J. D. Does nitric oxide modulate mitochondrial energy generation and apoptosis? **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 3, p. 214–220, 2002.
- MONCADA, S.; HIGGS, A. The L-Arginine-Nitric Oxide Pathway. **New England Journal of Medicine**, v. 329, p. 2002–2012, 1993.
- MONCADA, S.; HIGGS, E. A. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. **British journal of pharmacology**, v. 147, p. 193–201, 2006.
- 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, 2011.
- MORAIS, K. L. P. et al. Proline rich-oligopeptides: Diverse mechanisms for antihypertensive action. **Peptides**, v. 48, n. 1, p. 124–133, 2013.
- MORRIS, G. M. et al. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. **Journal of Computational Chemistry**, v. 19, n. 14, p. 1639–1662, 1998.

MORRIS, G. M.; HUEY, R.; OLSON, A. J. Using AutoDock for ligand-receptor docking. In: **Current Protocols in Bioinformatics**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., v. 24p. 8.14.1-8.14.40. 2008.

MUELLER, S. et al. Potentiation of bradykinin actions by analogues of the bradykinin potentiating nonapeptide BPP9a. **Peptides**, v. 26, p. 1235–1247, 2005.

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

NAGASAKI, A. et al. Coinduction of nitric oxide synthase, argininosuccinate synthetase, and argininosuccinate lyase in lipopolysaccharide-treated rats. RNA blot, immunoblot, and immunohistochemical analyses. **The Journal of biological chemistry**, v. 271, n. 5, p. 2658–62, 1996.

NOSÉ, S.; KLEIN, M. L. Constant pressure molecular dynamics for molecular systems. **Molecular Physics**, v. 50, n. 5, p. 1055–1076, 1983.

NUSSLER, A. K. et al. Coinduction of nitric oxide synthase and argininosuccinate synthetase in a murine macrophage cell line. Implications for regulation of nitric oxide production. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, p. 1257–1261, 1994.

O'BRIEN, A. J. et al. Temporal variation in endotoxin-induced vascular hyporeactivity in a rat mesenteric artery organ culture model. **British journal of pharmacology**, v. 133, n. 3, p. 351–60, 2001.

OJEDA, P. et al. Computational studies of snake venom toxins. **Toxins**, v. 10, n. 1, p. 8, 22 2017.

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, 1971.

ONDETTI, M. A.; CUSHMAN, D. W. Inhibition of the renin-angiotensin system. A new approach to the therapy of hypertension. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 24, p. 355–361, 1981.

OOSTENBRINK, C. et al. A biomolecular force field based on the free enthalpy of hydration and solvation: The GROMOS force-field parameter sets 53A5 and 53A6. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, n. 13, p. 1656–1676, 2004.

PALMER, R. M. J.; ASHTON, D. S.; MONCADA, S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. **Nature**, v. 333, n. 6174, p. 664–666, 1988.

PARRINELLO, M.; RAHMAN, A. Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method. **Journal of Applied Physics**, v. 52, n. 12, p. 7182–7190, 1981.

PEIGNEUR, S.; TYTGAT, J. Toxins in drug discovery and pharmacology. **Toxins**, v. 10, n. 3, p. 126, 2018.

PLÁCIDO, A. et al. Cry1A(b)16 toxin from *Bacillus thuringiensis* : Theoretical refinement of three-dimensional structure and prediction of peptides as molecular markers for detection of genetically modified organisms. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 85, n. 7, p. 1248–1257, 2017.

QUALLS, J. E. et al. Sustained generation of nitric oxide and control of mycobacterial infection requires argininosuccinate synthase 1. **Cell Host & Microbe**, v. 12, n. 3, p. 313–323, 2012.

QUEROBINO, S. M.; RIBEIRO, C. A. J.; ALBERTO-SILVA, C. Bradykinin-potentiating PEPTIDE-10C, an argininosuccinate synthetase activator, protects against H₂O₂ -induced oxidative stress in SH-SY5Y neuroblastoma cells. **Peptides**, v. 103, p. 90–97, 2018.

RAGHAVAN, S. A. .; DIKSHIT, M. L-Citrulline mediated relaxation in the control and lipopolysaccharide-treated rat aortic rings. **European Journal of Pharmacology**, v. 431, n. 1, p. 61–69, 2001.

REES, D. D. et al. A specific inhibitor of nitric oxide formation from L-arginine attenuates endothelium-dependent relaxation. **British journal of pharmacology**, v. 96, p. 418–424, 1989.

ROCHA E SILVA, M.; BERALDO, W. T. Um novo princípio auto-farmacológico (Bradicinina) liberado do plasma sob ação de venenos de cobra e da tripsina. **Ciência e Cultura**, v. 1, n. 1–2, p. 32–35, 1949.

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. **American Journal Physiology**, v. 156, p. 261–273, 1949.

ŠALI, A.; BLUNDELL, T. L. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. **Journal of Molecular Biology**, v. 234, n. 3, p. 779–815, 1993.

SALVEMINI, D. et al. Immediate release of a nitric oxide-like factor from bovine aortic endothelial cells by *Escherichia coli* lipopolysaccharide. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, p. 2593–2597, 1990.

SANNER, M. F. Python: a programming language for software integration and development. **Journal of molecular graphics & modelling**, v. 17, n. 1, p. 57–61, 1999.

SCHÜTTELKOPF, A. W.; VAN AALTEN, D. M. F.; IUCR. PRODRG: a tool for high-throughput crystallography of protein–ligand complexes. **Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography**, v. 60, n. 8, p. 1355–1363, 2004.

SCIANI, J. M.; PIMENTA, D. C. The modular nature of bradykinin- potentiating peptides isolated from snake venoms. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 23, p. 45, 2017.

SENA, C. M.; PEREIRA, A. M.; SEIÇA, R. Endothelial dysfunction — A major mediator of diabetic vascular disease. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1832, p. 2216–2231, 2013.

SHEN, M.-Y.; SALI, A. Statistical potential for assessment and prediction of protein structures. **Protein science : a publication of the Protein Society**, v. 15, n. 11, p. 2507–24, 2006.

SILVA, C. A. et al. Tissue distribution in mice of BPP 10c, a potent proline-rich anti-hypertensive peptide of *Bothrops jararaca*. **Toxicon**, v. 51, n. 4, p. 515–523, 2008.

SILVA, R. H. M. et al. Antinociceptive activity of *Borreria verticillata*: *in vivo* and *in silico* studies. **Frontiers in pharmacology**, v. 8, p. 283, 2017.

SIMON, A. et al. Role of neutral amino acid transport and protein breakdown for substrate supply of nitric oxide synthase in human endothelial cells. **Circulation Research**, v. 93, n. 9, p. 813–820, 2003.

SMITH, C. G.; VANE, J. R. The discovery of captopril. **The FASEB Journal**, v. 17, p. 788–789, 2003.

SOLIS, F. J.; WETS, R. J.-B. Minimization by random search techniques. **Mathematics of Operations Research**, v. 6, n. 1, p. 19–30, 1981.

SOLOMONSON, L. P. et al. The caveolar nitric oxide synthase/arginine regeneration system for NO production in endothelial cells. **The Journal of Experimental Biology**, v. 206, p. 2083–2087, 2003.

STEWART, J. J. MOPAC: a semiempirical molecular orbital program. **Journal of computer-aided molecular design**, v. 4, n. 1, p. 1–105, 1990.

TANG, E. H. C.; VANHOUTTE, P. M. Gene expression changes of prostanoid synthases in endothelial cells and prostanoid receptors in vascular smooth muscle cells caused by aging and hypertension. **Physiological Genomics**, v. 32, n. 3, p. 409–418, 2008.

TERLUK, M. R. **Respostas vasculares mediadas pelo óxido nítrico: Efeitos de agentes oxidantes na hiporeatividade à fenilefrina e no relaxamento induzido por tóis**. 2005. 142f. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2005.

VALLEE, B. L. The active catalytic site: an approach through metalloenzymes. **Federation proceedings**, v. 20(3)Pt 2, p. 71–80, 1961.

VANE, J. R.; ÄNGGÅRD, E. E.; BOTTING, R. M. Regulatory functions of the vascular endothelium. **New England Journal of Medicine**, v. 323, p. 27–36, 1990.

VANHOUTTE, P. M. et al. Endothelial dysfunction and vascular disease - a 30th anniversary update. **Acta Physiologica**, v. 219, n. 1, p. 22–96, 2017.

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, 2008.

VERMA, S.; ANDERSON, T. J. Fundamentals of endothelial function for the clinical cardiologist. **Circulation**, v. 105, p. 546–549, 2002.

VERMA, S.; BUCHANAN, M. R.; ANDERSON, T. J. Endothelial function testing as biomarker of vascular disease. **Circulation**, v. 108, p. 2054–2059, 2003.

WIJNANDS, K. A. P. et al. Citrulline a more suitable substrate than arginine to restore NO production and the microcirculation during endotoxemia. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. e37439, 2012.

WU, G.; MORRIS, S. M. Arginine metabolism : nitric oxide and beyond. **Biochem. J**, v. 336, p. 1–17, 1998.

XIE, L. et al. The preferred source of arginine for high-output nitric oxide synthesis in blood vessels. **Seminars in Perinatology**, v. 24, n. 1, p. 42–45, 2000.

XIE, L.; GROSS, S. S. Argininosuccinate synthetase overexpression in vascular smooth muscle cells potentiates immunostimulant-induced NO production. **The Journal of biological chemistry**, v. 272, n. 26, p. 16624–30, 1997.

YUNDE ZHAO et al. Inhibition of soluble guanylate cyclase by ODQ. **Biochemistry**, v. 39, n. 35, p. 10848–10854, 2000.

ZHAO, Y.; VANHOUTTE, P. M.; LEUNG, S. W. S. Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 129, n. 2, p. 83–94, 2015.

ANEXO