UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ – UFPI

CAMPUS MINISTRO PETRÔNIO PORTELA – CMPP

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE – CCS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS – PPGCF

ESTUDOS *in silico* E *in vitro* DE PEPTÍDEOS ENCONTRADOS NA PEÇONHA DE *Bothrops moojeni*: Seus potenciais antidiabéticos, antioxidantes e vasculares

JOSÉ OTÁVIO CARVALHO SENA DE ALMEIDA

TERESINA – PI

2025

JOSÉ OTÁVIO CARVALHO SENA DE ALMEIDA

ESTUDOS *in silico* E *in vitro* DE PEPTÍDEOS ENCONTRADOS NA PEÇONHA DE *Bothrops moojeni*: Seus potenciais antidiabéticos, antioxidantes e vasculares

Dissertação de mestrado a ser submetida à Universidade Federal do Piauí (UFPI) e apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, como um dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Dias Rufino Arcanjo

Coorientador: Prof. Dr. Michel Muálem de Moraes Alves

TERESINA – PI

2025

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências da Saúde
Serviço de Processos Técnicos

A447e Almeida, José Otávio Carvalho Sena de.
Estudos *in silico* e *in vitro* de peptídeos encontrados na peçonha de *Bothrops moojeni* : seus potenciais antidiabéticos, antioxidantes e vasculares / José Otávio Carvalho Sena de Almeida. – 2025.
83 f. : il. ; color.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Piauí, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Teresina, 2025.
"Orientador: Prof. Dr. Daniel Dias Rufino Arcanjo."
"Coorientador: Prof. Dr. Michel Muálem de Moraes Alves."

1. Peptídeos vasoativos. 2. Reatividade vascular. 3. Equilíbrio redox. 4. Síndrome metabólica. I. Arcanjo, aniel Dias Rufino. II. Alves, Michel Muálem de Moraes. III. Título.

CDD 615.1

Bibliotecário: Gésio dos Santos Barros - CRB3/1469

FOLHA DE APROVAÇÃO

JOSÉ OTÁVIO CARVALHO SENA DE ALMEIDA

ESTUDOS *in silico* E *in vitro* DE PEPTÍDEOS ENCONTRADOS NA PEÇONHA DE *Bothrops moojeni*: Seus potenciais antidiabéticos, antioxidantes e vasculares

Dissertação de mestrado a ser submetida à Universidade Federal do Piauí (UFPI) e apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, como um dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Dias Rufino Arcanjo

Coorientador: Prof. Dr. Michel Muálem de Moraes Alves

Examinada em: 07/03/2025

gov.br Documento assinado digitalmente
DANIEL DIAS RUFINO ARCANJO
Data: 20/03/2025 15:48:14-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Prof. Dr. Daniel Dias Rufino Arcanjo

gov.br Documento assinado digitalmente
JANYERSON DANNYS PEREIRA DA SILVA
Data: 25/03/2025 17:43:13-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Prof. Dr. Janyerson Dannys Pereira da Silva

gov.br Documento assinado digitalmente
RICARDO MARTINS RAMOS
Data: 25/03/2025 10:17:22-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Prof. Dr. Ricardo Martins Ramos

TERESINA – PI

2025

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Profa. Dra. Filadelfia Carvalho de Sena, pelo suporte e apoio sem os quais eu não teria chegado até aqui.

Ao governo e aos cidadãos brasileiros por me fornecerem a estrutura e os recursos que me foram essenciais durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Daniel Dias Rufino Arcanjo, pela disponibilidade e disposição em me aceitar como orientando, além de todos os ensinamentos que me foram repassados por ele.

Aos meus amigos, colegas e parceiros de LAFMOL pelos momentos bons e pelos momentos difíceis que pudemos compartilhar.

Aos professores que tive até aqui e que me ensinaram e serviram de alicerce para minha base pessoal, profissional e moral.

Aos desenvolvedores de software de código aberto, em especial àqueles que ajudaram no desenvolvimento dos programas LibreOffice e Inkscape, sem sua ajuda e disponibilidade esse trabalho não seria feito.

ALMEIDA, J. O. C. S. **ESTUDOS *in silico* E *in vitro* DE PEPTÍDEOS ENCONTRADOS NA PEÇONHA DE *Bothrops moojeni*: Seus potenciais antidiabéticos, antioxidantes e vasculares.** Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Ciências Famacêuticas, CCS/UFPI, 2025.

RESUMO

As disfunções vasculares representam um dos maiores perigos à saúde das populações e encontrar soluções e tratamentos para essas condições é fulcral para a sociedade em se considerando o número de indivíduos acometidos. Tais questões que afetam a saúde apresentam uma grande diversidade etiológica e, portanto, é necessário encontrar terapias que tratem dessas diversas origens e de suas causas. Em virtude de se descobrir novas ferramentas para o tratamento das mais variadas doenças o estudo de peçonhas, venenos, secreções animais e seus derivados se apresenta como uma fonte quase inesgotável de recursos. No Capítulo I foi feita uma revisão integrativa que se propôs a avaliar quais são os achados a respeito dos mecanismos farmacológicos no desenvolvimento das ações antidiabéticas de peptídeos obtidos a partir de venenos, peçonhas e secreções animais. A revisão foi norteada pela seguinte pergunta: “Quais os mecanismos de ação de peptídeos com origem em venenos animais sobre o controle de parâmetros relacionados à condição diabética?” de acordo com a estruturação determinada pelo acrônimo PECo (P, Problema; E, Exposição, Co, Contexto). As bases utilizadas foram Scopus, PubMed e Web of Science e envolveram um recorte temporal dos últimos cinco anos (2020-2024). Os mecanismos envolvidos são bastante variados e estão relacionados ao agonismo de receptores de GLP-1, ao agonismo de receptores de insulina, à inibição de canais de potássio, ao aumento da expressão de transportadores de glicose do tipo 4 (GLUT4), à inibição de alfa-amilases, dentre outros. Assim, tem-se que esses peptídeos são moléculas que apresentam um grande potencial no tratamento do diabetes. No Capítulo II se objetivou demonstrar os efeitos e a capacidade que três peptídeos potencializadores de bradicinina (BPPs) BPP-Bm01, BPP-Bax12 e BPP-13a encontrados na peçonha da jararaca (*Bothrops moojeni*) tem sobre o sistema vascular, sobre o sistema antioxidante e sobre o sistema relacionado ao tratamento do diabetes por metodologias *in silico* e/ou *in vitro*. Os achados do trabalho foram positivos e reforçam a ideia de que tais peptídeos podem ser benéficos para a saúde vascular. Determinando, assim, o potencial desses BPPs sobre os sistemas avaliados e a necessidade de se investigar mais detalhadamente essas moléculas com metodologias mais aprofundadas.

Palavras-chave: Peptídeos vasoativos, reatividade vascular, equilíbrio redox, síndrome metabólica.

ALMEIDA, J. O. C. S. **ESTUDOS *in silico* E *in vitro* DE PEPTÍDEOS ENCONTRADOS NA PEÇONHA DE *Bothrops moojeni*: Seus potenciais antidiabéticos, antioxidantes e vasculares** Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Ciências Famacêuticas, CCS/UFPI, 2025.

ABSTRACT

Vascular dysfunctions represent one of the greatest threats to public health, and finding solutions and therapies for these conditions is crucial for society, given the number of affected individuals. These health issues exhibit significant etiological diversity, making it necessary to develop therapies that address their various origins and causes. In the pursuit of novel tools for treating cardiovascular diseases, the study of venoms, toxins, animal secretions, and their derivatives emerges as an almost inexhaustible resource. In Chapter I, an integrative review was conducted to evaluate findings regarding the pharmacological mechanisms underlying the antidiabetic actions of peptides derived from venoms, toxins, and animal secretions. This review was guided by the following question: "Which animal-derived peptides and their respective mechanisms of action have been studied for the direct treatment of diabetic conditions?" according to the structure defined by the PECo acronym (P: Problem; E: Exposure; Co: Context). The databases Scopus, PubMed, and Web of Science were utilized, with a temporal focus on studies from the last five years (2020-2024). The mechanisms involved are highly diverse and include GLP-1 receptor agonism, insulin receptor agonism, potassium channel inhibition, increased expression of glucose transporter type 4 (GLUT4), alpha-amylase inhibition, among others. These findings indicate that these peptides hold significant potential for diabetes treatment. In Chapter II, the objective was to demonstrate the effects and capabilities of three bradykinin-potentiating peptides (BPPs) BPP-Bm01, BPP-Bax12, and BPP-13a found in the venom of jararaca snake (*Bothrops moojeni*) on the vascular system, antioxidant system, and diabetes-related pathways through in silico and/or in vitro methodologies. The findings were positive and reinforce the notion that these peptides may offer benefits for vascular health. This highlights the potential of these BPPs in the evaluated systems and the need for more detailed investigations using advanced methodologies.

Keywords: Vasoactive peptides, vascular reactivity, redox balance, metabolic syndrome, therapeutic action.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquematização da triagem e seleção de artigos para a revisão.....24
Figura 2 - Esquematização dos mecanismos da ação antidiabética de fármacos no mercado..36
Figura 3 - Esquematização dos mecanismos, segundo os autores originais, da ação antidiabética dos peptídeos apresentados neste trabalho.....44
Figura 4 - Dados obtidos para a atividade da enzima catalase, concentrações de grupamentos sulfidrila não proteicos e atividade da enzima superóxido dismutase em eritrócitos de ratos após o ensaio de estresse oxidativo por hiperglicose.....67
Figura 5 - Representações gráficas do vasorelaxamento mediado pelos peptídeos em ensaio de reatividade vascular em anéis de artéria aorta de ratos com endotélio funcional.....69
Figura 6 - Dados de E_{max} e pD_2 obtidos a partir da regressão não linear das curvas concentração-resposta do ensaio de reatividade vascular para cada um dos peptídeos avaliados.....70

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Resumo dos dados obtidos dos artigos selecionados a respeito do peptídeo estudado, doses utilizadas, metodologias de avaliação, efeitos observados e prováveis mecanismos de ação envolvidos na resposta.....26

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Elementos para a elaboração da pergunta norteadora, baseada na estrutura de problema, exposição, e contexto.....23
Tabela 2 - Estratégias de busca utilizadas nas bases de dados Scopus, PubMed e Web of Science.....23
Tabela 3 - Alvos e ligantes relacionados ao SRAA e suas respectivas energias de interação por ancoragem molecular *in silico*.....62
Tabela 4 - Alvos e ligantes relacionados ao SAC e suas respectivas energias de interação por ancoragem molecular *in silico*.....63
Tabela 5 - Alvos e ligantes relacionados ao tratamento do diabetes e suas respectivas energias de interação por ancoragem molecular *in silico*.....65

LISTA DE SIGLAS E ABREVIAÇÕES

AA - Ácido araquidônico

AC - Adenilato-ciclase

ACh - Acetilcolina

Akt - Proteína quinase B;

AMP - Monofosfato de adenosina;

AMPK - Proteína quinase ativada por AMP;

ASB - Albumina de soro bovino

AT1 - Angiotensina I

AT1R - Receptor de Angiotensina 1

AT2 - Angiotensina II

AT2R - Receptor de Angiotensina 2

ATP - Trifosfato de adenosina

B2R - Receptor de Bradicinina 2

BPPs - Peptídeos potencializadores de bradicinina

Ca^{2+} - Íon cálcio

cAMP - Monofosfato de adenosina cíclico

Cav - Canal de cálcio voltagem dependente

Cav1.2/1.3 - Canais de cálcio voltagem dependentes do tipo L

Complexo 1 - Enzima NADH-ubiquinona oxiredutase

CONCEA - Conselho Nacional de Cuidado e Experimentação Animal

DMSO - Dimetilsulfóxido

DPP-4 - Dipeptidil peptidase 4

DTNB - 5,5'-ditiobis-(ácido 2-nitrobenzóico)

DVC - Doença vascular cerebral

DVP - Doença vascular periférica

ECA - Enzima Conversora de Angiotensina

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

EGTA – Ácido etileno-bis(oxietilenonitrilo)tetracético

E_{max} - Efeito máximo

EROs - Espécies reativas de oxigênio

FEN - Fenilefrina

GCGR - Receptor de glucagon

GIPR - Receptor do polipeptídeo inibidor gástrico

GLP-1 - Peptídeo similar ao glucagon 1

GLP-1R - Receptores do peptídeo similar ao glucagon 1

GLP-1RAs - Agonistas dos receptores do peptídeo similar ao glucagon 1;

GLUT4 - Transportador de glicose do tipo 4

GMPc - Monofosfato cíclico de guanosina

Gpx - Glutationa Peroxidase

GSH - Glutationa

GSSG - Glutationa dissulfeto

H_2O_2 - Peróxido de hidrogênio

HbA1c - Hemoglobina glicada

HEK293T - Linhagem de células renais de embrião humano;

hIR - Receptor humano de insulina;

HK - Cininogêneo de Alto peso molecular

hK_{ATP} - Canal humano de potássio dependente de ATP

HPA - Alfa-amilase pancreática humana

HSA - Alfa-amilase humana salivar

HskMC - Células humanas do músculo esquelético

i.p – Via de administração intraperitoneal

ILPs - Peptídeos similares a insulina

IMC - Índice de massa corporal

IR - Receptor de insulina

IRS - Substrato do receptor de insulina

K_{ATP} - Canal de potássio dependente de ATP

Ki - Constante de inibição

Kir - Canal de potássio retificador de influxo

Kv - Canal de potássio dependente de voltagem

Kv2.1 - Canais de potássio voltagem dependente do tipo 2.1

LDH - Lactato desidrogenase

MAPk - Proteína quinase ativada por mitógeno

MasR - Receptor Mas

MR - Receptor Mineralocorticoide

MTT – Brometo de 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium

Na^+ - Íon sódio

NF-κB - Fator de transcrição nuclear κB

NIH - National Institute of Health

$O_2^{\cdot-}$ - Ânion superóxido

PBS - Tampão fosfato de sódio 300 mOsm pH 7,4

pD_2 - Potência farmacológica

PECo - P, Problema; E, Exposição, Co, Contexto

PG - Prostaglandinas

PIK3 - Fosfatidilinositol 3-quinase

PIP2 - Fosfolipídeos de membrana

PK - Calicreina Plasmática

PKA - Proteína quinase A

PPA - Alfa-amilase suína pancreática

PPARγ - Receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama

RMSD - Raiz quadrada do desvio quadrático médio

RXR - Receptor de ácido 9-cis-retinóico

SAC - Sistemas Antioxidantes Celulares

SGLT-2 - Co-transportadores de sódio e glicose do tipo 2.

SKK - Sistema Calicreina-Cinina

SRAA - Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona

SUR1 - Subunidades receptoras de sulfonilureias

T1DM - Diabetes mellitus tipo 1

T2DM - Diabetes mellitus tipo 2

TCA – Ácido tricloroacético

TRIS - Tris(hidroximetil)aminometano

TZD - Tiazolidinedionas

USOD - Unidade de SOD

β-PCs - Células beta pancreáticas

SUMÁRIO

1 Introdução....16
2 Objetivo....18
2.1 Objetivo Geral....18
2.2 Objetivos Específicos....18
Capítulo I....19
Resumo....20
1 Introdução....21
2 Metodologia....23
3 Resultados....25
4 Discussão....33
4.1 Mecanismos farmacológicos em prática na clínica do tratamento do diabetes....33
4.2 Peptídeos que atuam por mecanismos envolvendo os receptores de GLP-1....37
4.3 Peptídeos que atuam por mecanismos envolvendo o agonismo de receptores de insulina 38
4.4 Peptídeos que atuam por mecanismos envolvendo a inibição de canais de potássio....39
4.5 Peptídeos que atuam por mecanismos envolvendo a inibição de alfa-amilases....41
4.6 Peptídeos que atuam por mecanismos diversos....41
4.7 Dificuldades e considerações pertinentes no estudo dessas substâncias....43
5 Conclusão....46
6 Referências....47
Capítulo II....52
Resumo....53
1 Introdução....54
2 Metodologia....56
2.1 Metodologias *in silico*....56
2.1.1 Obtenção e preparação dos alvos e ligantes....56
2.2 Metodologia *in vitro*....57
2.2.1 Animais, aspectos éticos, eutanásia e dissecção....57
2.2.2 Preparo dos peptídeos....57
2.2.3 Avaliação da reatividade vascular dos peptídeos....58
2.2.4 Avaliação da hematocompatibilidade....58
2.2.5 Estresse oxidativo eritrocitário por altas concentrações de glicose....59

2.2.6 Catalase eritrocitária.....59
2.2.7 Grupamentos sulfidrila não proteicos.....60
2.2.8 Superóxido Dismutase.....60
2.2.9 Análise Estatística.....61
3 Resultados.....62
3.1 Ancoragem molecular *in silico* com alvos do Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona.....62
3.2 Ancoragem molecular *in silico* com alvos do Sistema Antioxidante Celular.....63
3.3 Ancoragem molecular *in silico* com alvos relacionados ao tratamento do diabetes.....64
3.4 Avaliação da hemocompatibilidade.....65
3.5 Sistema antioxidante eritrocitário *in vitro*.....66
3.6 Efeito dos peptídeos sobre a reatividade vascular.....68
4 Discussão.....71
4.1 Ancoragem molecular *in silico* com alvos do Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona.....71
4.2 Ancoragem molecular *in silico* com alvos do Sistema Antioxidante Celular.....72
4.3 Ancoragem molecular *in silico* com alvos relacionados ao tratamento do diabetes.....73
4.4 Sistema antioxidante eritrocitário.....73
4.5 Efeito dos peptídeos sobre a reatividade vascular.....76
5 Conclusão.....77
6 Referências.....78

1 INTRODUÇÃO

Disfunções cardiovasculares como acidente vascular cerebral, aterosclerose, arteriosclerose e tromboembolismo estão entre os processos patológicos mais prevalentes no mundo moderno e estão entre as principais causas de morte nas sociedades industrializadas (Martin *et al*., 2024). Das principais formas de patogênese possíveis do sistema cardiovascular tem-se a hipertensão arterial sistêmica, a depleção dos Sistemas Antioxidantes Celulares (SAC) e o diabetes como sendo consideradas entre as mais pertinentes (Martin *et al*., 2024; Conrad *et al*., 2024; Jomova *et al*., 2024). O cerne farmacológico de tratamento dessas envolve principalmente o controle de parâmetros bioquímicos, como as concentrações de íons inorgânicos, glicose e triglicerídeos na corrente sanguínea, e fisiológicos, como o controle da diurese, mecanismos centrais de controle da pressão arterial, vasodilatação direta e outros (Marzà-Florensa *et al*., 2024; Cong *et al*., 2020). Dentre as diversas maneiras de se regular a pressão arterial, a via do sistema Renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), é uma das mais conhecidas e estudadas. Na clínica médica atual existem as mais variadas classes de medicamentos que buscam atuar sobre pontos regulatórios específicos desta a fim de normalizar essa variável (Ksiazek *et al*., 2024; Ghazi; Drawz, 2017).

O diabetes é caracterizado como sendo uma doença metabólica que causa elevação nos níveis séricos de glicose que leva a hiperglicemia, assim como um distúrbio no metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas e uma maior resistência a ação da insulina (Gupta *et al.*, 2024). Geralmente esta pode ser dividida em até quatro tipos, sendo que dois deles são mais pertinentes ao trabalho aqui presente: O tipo 1 se caracteriza por, geralmente, possuir uma origem autoimune e pela destruição das células beta pancreáticas (β-PCs), o que por sua vez cessa a produção endógena de insulina do organismo; O tipo 2 se determina por um processo cronificado de resistência a insulina e é geralmente mediada por condições e hábitos dos indivíduos, o que leva a um quadro persistente de hiperglicemia que acaba por gerar as outras condições características dessa doença (Reed; Bain; Kanamarlapudi, 2021; Katsarou *et al*., 2017).

Os casos de diabetes atingiram a marca de 828 milhões indivíduos acometidos no mundo em 2022 e chegaram a uma taxa de crescimento ano a ano tão elevados, cerca de 20 milhões de novos diagnósticos, que parte da literatura já considera que o mundo esteja em uma pandemia dessa doença (Zhou *et al*., 2024; Reed; Bain; Kanamarlapudi, 2021). Com o número crescente de indivíduos sendo afligidos por essa condição é crível que parte das

terapias existentes no mercado possam não remediar de forma adequada todos os novos casos que surgem, assim a busca por novas terapias medicamentosas mais eficazes, potentes, seguras e com menos efeitos adversos é essencial (Ghazaee *et al*, 2023; Salmen *et al*., 2022). E, em se tratando de moléculas bioativas eficazes e potentes, os peptídeos encontrados em peçonhas, venenos ou secreções animais apresentam um enorme potencial (Smallwood; Clark, 2021; Bhat; Kumar; Bhat, 2015).

Estas substâncias já são extensamente estudadas na literatura por conta de suas vastas atividades farmacológicas em áreas como manejo da dor, ação antidiabética, antiparasitária, antimicrobiana, anti-inflamatória, anticâncer e anti-hipertensiva (Lodato *et al*., 2023; Oliveira; Soares; Silva, 2023; Ageitos; Torres; Nunez, 2022; Vidya *et al*., 2021). Dessas substâncias cabe salientar os peptídeos vasoativos, em especial os Peptídeos Potencializadores de Bradicinina (BPPs) BPP-Bm01, BPP-Bax12 e BPP-13a que já demonstraram capacidade vasorelaxante direta e potencial efeito sobre a enzima Arginino-Succinato Sintase (Costa *et al*., 2024).

Tomando as metodologias *in silico* como amparo se possibilita a determinação das potencialidades desses BPPs sobre sistemas específicos, como SRAA e SAC, além de alvos para o tratamento de doenças como o diabetes, isso permite uma avaliação sem todo o esforço laboral demandado por estudos *in vivo* e garante uma análise abrangente de mecanismos envolvidos no tratamento de doenças e complicações vasculares (Mursal *et al*., 2024; Agu *et al*., 2023). Assim, o presente trabalho buscou avaliar, por meio de ancoragem molecular, três peptídeos encontrados na peçonha de *Bothrops moojeni* sobre alvos que podem interferir de algum modo na saúde vascular e no diabetes, além de avaliar *in vitro* seus efeitos sobre o SAC, sobre a reatividade vascular e os possíveis mecanismos de ação envolvidos.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

Avaliar, por meio de ancoragem molecular, a interação de três peptídeos encontrados na peçonha de *Bothrops moojeni* (BPP-Bm01, BPP-Bax12 e BPP-13a) sobre o SRAA, sobre o SAC e sobre alvos relacionados ao tratamento do diabetes. Além de avaliar *in vitro* seus efeitos sobre o SAC, sobre a reatividade vascular e os possíveis mecanismos de ação.

2.2 Objetivos Específicos

- Realizar uma revisão integrativa da literatura que elucide quais são os mecanismos mais comuns na ação antidiabética de peptídeos obtidos a partir de venenos, peçonhas e secreções animais;
- Avaliar por meio de metodologias *in silico* quais receptores farmacológicos do SRAA, SAC e de alvos antidiabéticos apresentam melhor interação com os peptídeos em estudo quando em comparação com moléculas padrão para os alvos;
- Avaliar, *in vitro*, a hemocompatibilidade dos peptídeos em análise;
- Avaliar, *in vitro*, a modulação causada nos sistemas antioxidantes eritrocitários pelos peptídeos em análise em modelo de simulação do ambiente hiperglicêmico encontrado no diabetes;
- Avaliar, *in vitro*, a modulação em parâmetros da reatividade vascular da artéria aorta de ratos saudáveis causada pelos peptídeos em análise.

CAPÍTULO I

Peptídeos obtidos de venenos, peçonhas e secreções animais: uma revisão dos seus mecanismos de ação antidiabética

José Otávio Carvalho Sena de Almeida

Daniel Dias Rufino Arcanjo

RESUMO

Peptídeos obtidos a partir de venenos, peçonhas e secreções animais possuem um grande potencial farmacológico para os mais diversos tipos de doenças e em especial para o diabetes, uma doença metabólica que aflige uma larga fração da população mundial. Esta revisão integrativa se propõe a avaliar quais são os achados a respeito dos mecanismos farmacológicos no desenvolvimento das ações antidiabéticas dessas substâncias. A revisão foi norteada pela seguinte pergunta: "Quais os mecanismos de ação de peptídeos com origem em venenos animais sobre o controle de parâmetros relacionados à condição diabética?" de acordo com a estruturação determinada pelo acrônimo PECo (P, Problema; E, Exposição, Co, Contexto). As bases utilizadas foram Scopus, PubMed e Web of Science e envolveram um recorte temporal dos últimos cinco anos, foram encontrados 190 artigos ao todo sendo que apenas 17 foram incluídos. Este estudo foi bem-sucedido em apresentar uma síntese da produção científica recente a respeito dessas moléculas. Observou-se que suas fontes de origem foram anêmonas e caramujos marinhos, aranhas, centopeias, escorpiões e cobras. Os mecanismos envolvidos são bastante variados e estão relacionados ao agonismo de receptores de GLP-1, ao agonismo de receptores de insulina, à inibição de canais de potássio, ao aumento da expressão de transportadores de glicose do tipo 4 (GLUT4), à inibição de alfa-amilases, dentre outros. Percebe-se uma elevada potência farmacológica para estas substâncias visto que os efeitos positivos foram produzidos em doses baixas, na escala de ng/kg ou nmol/kg. Apesar da compreensão de que os venenos animais são tóxicos, os peptídeos isolados destes não apresentaram, em sua maioria, toxicidade. Isso é importante considerando as etapas que uma dessas moléculas precisa ultrapassar para eventualmente ser usada na terapêutica. Assim, tem-se que esses peptídeos são moléculas que apresentam um grande potencial no tratamento do diabetes.

Palavras-chave: Síndrome metabólica; ação terapêutica; insulinotrópicos, secretores de insulina; insulinomiméticos.

1 INTRODUÇÃO

O diabetes é caracterizado como sendo uma doença metabólica que causa elevação nos níveis séricos de glicose que leva a hiperglicemia, assim como um distúrbio no metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas e uma maior resistência a ação da insulina (Gupta *et al.*, 2024). Geralmente esta pode ser dividida em até quatro tipos, sendo que dois deles são mais pertinentes ao trabalho aqui presente: O tipo 1 se caracteriza por, geralmente, possuir uma origem autoimune e pela destruição das células beta pancreáticas (β-PCs), o que por sua vez cessa a produção endógena de insulina do organismo; O tipo 2 se determina por um processo cronificado de resistência a insulina e é geralmente mediada por condições e hábitos dos indivíduos, o que leva a um quadro persistente de hiperglicemia e as condições características dessa doença (Reed; Bain; Kanamarlapudi, 2021; Katsarou *et al*., 2017).

Os casos de diabetes atingiram a marca de 828 milhões indivíduos acometidos no mundo em 2022 e chegaram a uma taxa de crescimento ano a ano tão elevados, cerca de 20 milhões de novos diagnósticos, que parte da literatura já considera que o mundo esteja em uma pandemia dessa doença (Zhou *et al*., 2024; Reed; Bain; Kanamarlapudi, 2021). Com o número crescente de indivíduos sendo afligidos por essa condição é crível que parte das terapias existentes no mercado possam não remediar de forma adequada todos os novos casos que surgem, assim a busca por novas terapias medicamentosas mais eficazes, potentes, seguras e com menos efeitos adversos é essencial (Ghazaee *et al*, 2023; Salmen *et al*., 2022). E, em se tratando de moléculas bioativas eficazes e potentes, os peptídeos encontrados em peçonhas, venenos ou secreções animais apresentam um enorme potencial (Smallwood; Clark, 2021; Bhat; Kumar; Bhat, 2015).

Estas substâncias já são extensamente estudadas na literatura por conta de suas vastas atividades farmacológicas em áreas como manejo da dor, ação antidiabética, antiparasitária, antimicrobiana, anti-inflamatória, anticâncer e anti-hipertensiva (Lodato et al., 2023; Oliveira; Soares; Silva, 2023; Ageitos; Torres; Nunez, 2022; Vidya *et al*., 2021). Além disso algumas já se encontram no mercado, como por exemplo a Exenatida, um medicamento peptídico de origem animal que teve um sucesso considerável no tratamento do diabetes (Parkes; Mace; Trautmann, 2013).

A literatura a respeito da atividade antidiabética dos peptídeos de origem animal é ampla, remonta há muitos anos e envolve estudos clínicos, *in vivo*, *in vitro* e *in silico*. A extensão e a diversidade nas publicações envolvendo esse tema demonstra a necessidade de

uma síntese do que foi produzido nos últimos anos. Dessa forma o presente trabalho se dedica a produzir uma revisão integrativa da literatura capaz de esclarecer quais são os peptídeos de origem animal que foram estudados recentemente e que apresentam atividade antidiabética, sua fonte de obtenção, os mecanismos pelos quais estas substâncias desenvolvem seus efeitos farmacológicos e outras informações pertinentes a uma compreensão mais holística do tema.

2 METODOLOGIA

A pergunta norteadora dessa revisão integrativa foi: “Quais os mecanismos de ação de peptídeos com origem em venenos animais sobre o controle de parâmetros relacionados à condição diabética?”. Sendo que esta foi estruturada de acordo com o acrônimo PECo (P, Problema; E, Exposição, Co, Contexto) (Aguiar *et al*., 2024) (Tabela 1).

Tabela 1 - Elementos para a elaboração da pergunta norteadora, baseada na estrutura de problema, exposição, e contexto.

Abreviação	Descritor	Elementos da questão
P	Problema	Peptídeos de origem em venenos animais e seus respectivos mecanismos de ação
E	Exposição	Condição diabética
Co	Contexto	Estudos clínicos, *in silico*, *in vitro* e *in vivo*

Fonte: Autoria própria baseada em Aguiar *et al*. (2024)

As bases de dados utilizadas foram Scopus, PubMed e Web of Science e envolveram um recorte temporal dos últimos cinco anos (2020-2024). Foram usados como descritores de busca os termos "venom", "antidiabetic", "diabetes mellitus", "diabetes" e "peptide" conectados com os termos booleanos AND e/ou OR de acordo com a Tabela 2.

Tabela 2 - Estratégias de busca utilizadas nas bases de dados Scopus, PubMed e Web of Science.

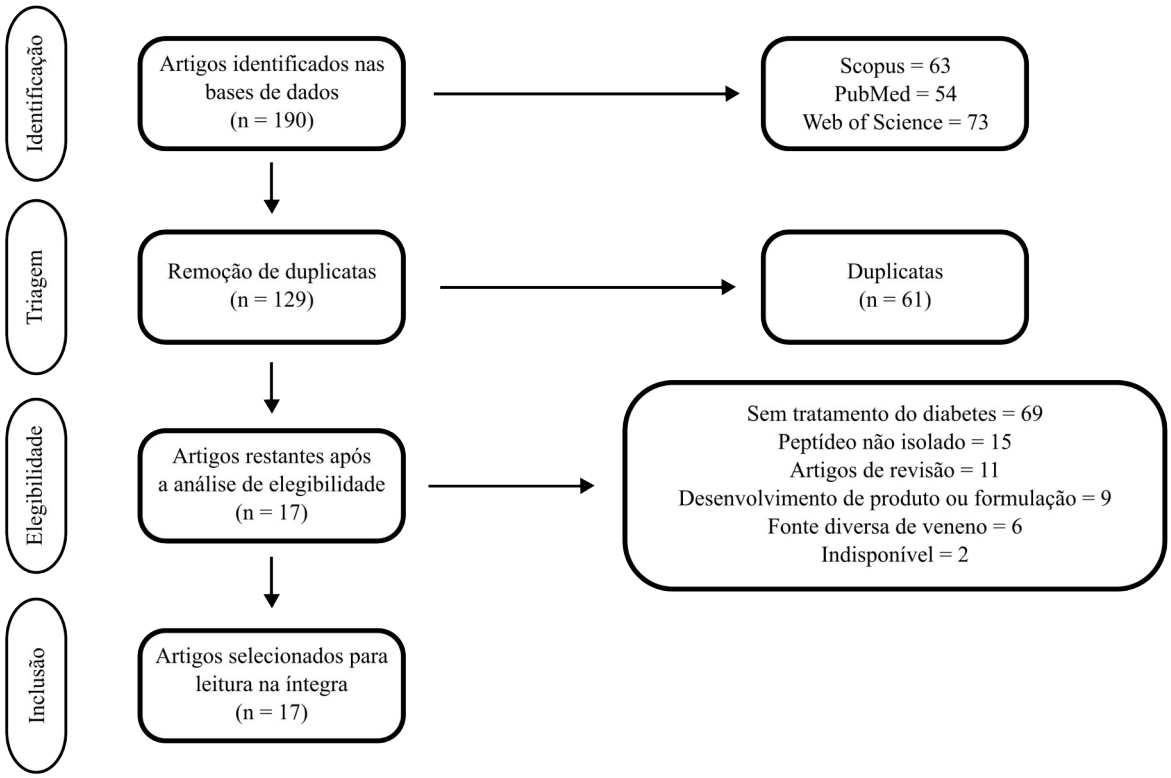
Bases de dados	Estratégias de busca
Scopus	("venom") AND ("antidiabetic" OR "diabetes mellitus" OR "diabetes") AND ("peptide")
PubMed	("venom") AND ("antidiabetic" OR "diabetes mellitus" OR "diabetes") NOT (Review[Publication Type])
Web of Science	("venom") AND ("antidiabetic" OR "diabetes mellitus" OR "diabetes") AND ("peptide")

Fonte: Autoria própria

Após a seleção e identificação dos artigos nas bases de dados, foram excluídos na triagem as duplicatas de artigos previamente encontrados. Procedeu-se então com a análise de elegibilidade com leitura de título e resumo. Nessa fase foram eliminados os trabalhos que: Não apresentassem correlação com o tratamento do diabetes; não tratassem da atividade de

peptídeos isolados e de origem animal, quando em estudos *in silico* ou *in vitro*; fossem artigos de revisão; tratassem do desenvolvimento de um produto ou formulação farmacêutica; não envolvessem veneno, peçonha ou secreção animal; e os que se encontravam indisponíveis por depreciação do link de acesso para leitura. Os restantes seguiram para a leitura na íntegra (Figura 1). O objetivo principal dessa busca foi encontrar estudos na língua inglesa que tivessem como foco a avaliação de peptídeos isolados com origem em venenos, peçonhas ou secreções animais e seus possíveis mecanismos de ação no tratamento direto do diabetes.

Figura 1 - Esquematização da triagem e seleção de artigos para a revisão.



Fonte: Autoria própria

3 RESULTADOS

Dos dezessete artigos, entre aqueles com estudos clínicos, todos avaliavam o medicamento Exenatida, sendo que três deles pesquisavam seus efeitos em populações diabéticas a fim de encontrar quais seriam os desfechos desse tratamento quando comparado com algum placebo (Joubert *et al*., 2021; Ekinci *et al*., 2021; Tamborlane *et al*., 2022). O último estudo clínico se propôs a estudar possíveis efeitos farmacogenômicos envolvidos com a ativação de receptores de GLP-1 através da comparação entre Exenatida e um placebo sobre uma população Amish da Pensilvânia (Taylor *et al*., 2023). Mesmo já havendo outros medicamentos peptídicos com origem de venenos animais no mercado como Ziconotida, Lixisenatida, Bivalirudina e outros, não foi possível encontrar trabalhos que os usassem em suas pesquisas nos últimos cinco anos com relação ao tratamento do diabetes (Bordon *et al*., 2020).

Os trabalhos que não envolviam estudos clínicos utilizaram em sua totalidade peptídeos que foram obtidos por síntese comercial, por extração e purificação a partir de veneno, peçonha ou secreção brutos, por síntese recombinante, por síntese em fase sólida, por síntese automatizada de micro-ondas com formação seletiva de pontes de dissulfeto, ou, quando para a realização de análises *in silico*, por homologia. Estes também tinham relativa diversidade nas suas fontes de origem animal, entre elas anêmonas e caramujos marinhos, aranhas, centopeias, escorpiões e cobras. Os possíveis mecanismos envolvidos na ação antidiabética também são bastante variados e estão relacionados ao agonismo de receptores de GLP-1, ao agonismo de receptores de insulina, à inibição de canais de potássio, ao aumento da expressão de transportadores de glicose do tipo 4 (GLUT4), à inibição de alfa-amilases, dentre outros.

Em se tratando das metodologias utilizadas, se verifica uma predileção pela utilização de camundongos nos ensaios *in vivo*; já para as análises *in vitro* tem-se uma preferência pela avaliação com células BRIN-BD11, NIT-1 e INS-1, além da avaliação da sobre a atividade enzimática de alfa-amilases. As análises *in silico* envolveram estudos de ancoragem molecular com alvos pertinentes ao tratamento do diabetes, como o receptor de peptídeo similar ao glucagon 1 (GLP-1R) e o receptor de insulina (IR). No Quadro 1 é possível encontrar um resumo com mais informações obtidas de cada um dos artigos avaliados.

Quadro 1 - Resumo dos dados obtidos dos artigos selecionados a respeito do peptídeo estudado, doses utilizadas, metodologias de avaliação, efeitos observados e prováveis mecanismos de ação envolvidos na resposta.

Estudo	Peptídeo e Origem animal	Metodologia	Dose ou posologia	Efeito observado	Mecanismo de ação
Joubert *et al*., 2021	Exenatida. Monstro-de-Gila (*Heloderma suspectum*).	- Estudo Clínico.	5 µg duas vezes ao dia por um mês e 10 µg duas vezes ao dia por cinco meses por via subcutânea.	- Redução na HbA1c, no índice de massa corpóreo, no peso e na glicemia pós-prandial; - Sem diferença quanto a risco hipoglicêmico ou qualidade de vida.	Agonismo do receptor de GLP-1.
Tamborlane *et al*. 2022	Exenatida. Monstro-de-Gila (*Heloderma suspectum*).	- Estudo Clínico.	2 mg uma vez por semana por 24 semanas (injeções sem via de administração explicitada).	- Redução na HbA1c e na dose de insulina de indivíduos tratados	Agonismo do receptor de GLP-1.
Ekinci *et al*., 2021	Exenatida. Monstro-de-Gila (*Heloderma suspectum*).	- Estudo Clínico.	2 mg uma vez por semana por 20 semanas (injeções sem via de administração explicitada).	- Melhora no manejo da HbA1c.	Agonismo do receptor de GLP-1.
Taylor *et al*., 2023	Exenatida. Monstro-de-Gila (*Heloderma suspectum*).	- Estudo Clínico.	Administração subcutânea única de 5 µg.	- Secreção de insulina aumentada; - Taxa de desaparecimento da glicose correlacionada com o efeito de secreção da insulina.	Agonismo do receptor de GLP-1.
Gunta *et al*., 2023	Citotoxina 2a; Citotoxina 7; Citotoxina 10.	- Ancoragem e dinâmica molecular *in*	N.A.	- Interação menos favorável	Possível interação com o GLP-1R.

	Cobras.	*silico* com o GLP-1R.		entre os peptídeos e o receptor do que para as moléculas controle.	
Ahorukomeye *et al*., 2019	Con-Ins G1; Con-Ins G3; Con-Ins T1A; Con-Ins T1B; Con-Ins T2; Con-Ins K1; Con-Ins K2. Caramujo marinho (*Conus geographus; C. tulipa; C. Kinoshitai*).	- Modelo de diabetes com zebrafish; - Ensaio *in vitro* de interação com o hIR; - Imunoensaio da via de sinalização da insulina em fibroblasto de camundongo NIH 3t3t; - Modelo de diabetes em camundongos (CBA/CaJ and C57BL/6J).	- Aplicação única de 65 ng/g em zebrafish; - Aplicação única a 1x, 10x e 20x da dose de insulina humana nos camundongos (1 UI/kg) (sem via explícita de administração).	- Redução na glicemia em zebrafish; - Menor potência de interação entre os peptídeos e o hIR-B do que a insulina; - Sugestão de características estruturais que permitem a ativação do receptor após a ligação ao mesmo; - Em uma dose 10x maior que a de insulina se reverte o quadro hiperglicêmico de camundongos diabéticos.	Ligação direta com receptores de Insulina.
Guo *et al*., 2024	ILP-Ap04. Anemona marinha (*Exaiptasia diaphana*).	- Modelo de diabetes em zebrafish ; - Ancoragem molecular i*n silico*.	- aplicação i.p única de 65 ng/g.	- Redução significativa da glicemia; - Boa interação com o hIR.	Agonismo do receptor de insulina.
Coulter-Parkhill *et al*., 2023a	Jingzhaotoxina IX; Jingzhaotoxina XI. Tarantula chinesa (*Chilobrachys jingzhao*).	- Ensaio de citotoxicidade, avaliação de potencial de membrana, avaliação de cálcio intracelular e avaliação de proliferação e	- Administração i.p única de 25 nmol/kg ou 75 nmol/kg *in vivo*.	- Sem impactos na viabilidade celular; - Aumento significativo na secreção de insulina *in vitro*; - Influxo	Inibição dos canais Kv2.1 de maneira independente de glicose.

		proteção contra a apoptose em β-PCs BRIN BD11; - Avaliação das concentrações de glicose no sangue, secreção de insulina e supressão de apetite em camundongos C57BL/6.		intracelular de cálcio; - Proliferação, crescimento e inibição da apoptose de β-PCs; - Melhora na secreção de insulina e controle da glicose *in vivo* sem efeitos sobre o apetite.	
Coulter-Parkhill *et al*., 2024	Δ-theraphotoxin-Ac1-OH (Δ-TRTX-Ac1-OH); Δ-theraphotoxin-Ac1- NH_2 (Δ-TRTX-Ac1-NH_2). Tarantula (*Aphonopelma chalcodes*).	- Teste de tolerância à glicose, sensibilidade à insulina, análise dos níveis de insulina e glucagon, e análise de histologia e imunohistoquímica em modelo de diabetes em camundongos C57BL/6J.	- administração i.p de 25 nmol/kg duas vezes ao dia por 28 dias	- Sem alterações na glicemia e nos níveis de insulina e glucagon; - Sem alterações na sensibilidade à insulina; - Redução no peso corporal e na demanda energética; - Melhora na tolerância a glicose; - Aumento nos níveis de insulina pancreática e redução nos de glucagon; - Aumento no tamanho das ilhotas pancreáticas e das β-PCs.	Ação insulinotrópica mediada por envolvimento de canais K_{ATP}.
Coulter-Parkhill *et al*., 2023b	Δ-theraphotoxin-Ac1 (Δ-TRTX-Ac1). Tarantula (*Aphonopelm*	- Ensaio de estabilidade plasmática; - Citotoxicidade, efeitos	- Administração i.p única de 25, 75 ou 250 nmol/kg	- Estabilidade plasmática de até 12h ; - Ausência de citotoxicidade, com efeitos	Ação insulinotrópica mediada por envolvimento de canais K_{ATP}.

	a chalcodes).	proliferativos e anti-apoptóticos em β-PCs BRIN-BD11; - Secreção *in vitro* de insulina; - Regulação da glicemia e secreção de insulina em camundongos C57BL/6.		proliferativos e anti-apoptóticos em BRIN-BD11; - Aumento *in vivo* na secreção *in vivo* de insulina com melhor tolerância a glicose.	
Ramu *et al*., 2022	SpTx1. Centopeia (*Scolopendra polymorpha*).	- Homeostase da glicose em camundongos selvagens; - Secreção de insulina e ensaio eletrofisiológico em β-PCs de camundongos do tipo selvagem; - Ensaio eletrofisiológico de β-PCs de camundongos expressando canal Kir6.2 humano; - Ensaio eletrofisiológico e ensaio de secreção de insulina em β-PCs de camundongos com a mutação V108E; -Modelo de diabetes em camundongos com a mutação	- Injeção intravenosa única de 1 mg/kg	- Sem efeitos na glicemia, secreção de insulina ou sobre a despolarização da membrana de células pancreáticas de camundongos do tipo selvagem; - Supressão de correntes de potássio através do canal hK_{ATP}; - Secreção de insulina e despolarização de membrana de β-PCs de camundongos com a mutação V108E; - Redução da glicemia e aumento da secreção de insulina em modelo de diabetes em	Inibição de canais K_{ATP} por bloqueio do poro condutor de íons.

		V108E com avaliação na homeostase da glicose e secreção de insulina.		camundongos com a mutação V108E.	
Tang *et al*., 2021	SsTx-4; SsTx-4-K14A; SsTx-4-P15A; SsTx-4-Y16A. Centopeia (*Scolopendra subspinipes mutilans*).	- Ensaios eletrofisiológicos em células HEK293T transfectadas com plasmídeos para diversos tipos de canais Kir.	N.A.	- Inibição dos canais Kir6.2/SUR1, Kir1.1 e Kir4.1 de maneira dose-dependente.	Inibição de canais Kir.
Sintsova *et al*. 2019	Magnificamida. Anemona marinha (*Heteractis magnifica*)	- Análise de inibição de alfa-amilases de mamíferos. (Alfa-amilase humana salivar (HSA) e alfa-amilase suína pancreática(PPA))	N.A.	- Constantes de inibição muito pequenas para as enzimas avaliadas.	Inibição direta de alfa-amilases de mamíferos.
Sintsova *et al*., 2023	Magnificamida. Anemona marinha (*Heteractis magnifica*)	- Ensaio de inibição da alfa-amilase pancreática humana (HPA); - Tolerância oral ao amido em modelo de diabetes de camundongos (CD-1); - Titulação isotérmica calorimétrica da magnificamida com HSA e HPA.	- Administração oral única de 0,1; 0,01; 0,005; 0,0025 e 0,001 mg/kg	- Inibição potente da HPA; - Formação de complexos estáveis entre o peptídeo e as enzimas; - Bloqueio eficaz da degradação do amido e ausência de hiperglicemia pós-prandial *in vivo*.	Inibição direta de alfa-amilases de mamíferos.
Setayesh-Mehr *et al*., 2023	HL-7; HL-10. Escorpião (*Hemiscorpiu*	- Ensaio de secreção de insulina em	- Injeções i.p diárias de 3 ou 6 mg/kg	- Captura de glicose por HSkMC;	Aumento na expressão de GLUT4 por

	s lepturus).	células INS-1; - Captação de glicose em HSkMC; - Expressão dos genes para GLUT4, Akt, e AMPK; - Análises em modelo de diabetes em camundongos; - Ancoragem molecular com o fator nuclear κB (NF-κB).	por uma semana	- Secreção significativa de insulina em INS-1; - Aumento na expressão de GLUT4, AMPK e Akt; - Redução da glicemia, aumento da secreção de insulina e aumento da expressão de GLUT4 *in vivo*; - Elevada interação *in silico* com NF-κB.	inibição do NF-κB.
Lugo-Fabres *et al*., 2021	s-cal14.2b. Caramujo marinho (*Californicon us californicus*)	- Citotoxicidad e e secreção de insulina em células NIT-1; - Ensaio eletrofisiológi co em β-PCs de ratos; - Homeostasia da glicose em camundongos BALB/cAnN Hsd; - Biodistribuiçã o em ratos.	- Injeção i.p única de 65, 75, 85 ou 100 µg por 20 g	- Redução da viabilidade celular; - Liberação de insulina em células NIT-1; - Aumento significativo das amplitudes de correntes através dos canais Cav1.2/1.3; - Relação dose dependente com a tolerância a glicose; - Distribuição peripancreátic a dos peptídeos administrados .	Possível efeito metabotrópico .
Conlon *et al*., 2020	Cytotoxina-1; Cytotoxina-2; Cytotoxina-4;	- Estudos de citotoxicidade e liberação de	N.A.	- Cytotoxina-1, Cytotoxina-2, Cytotoxina-	Ação de fosfolipases sobre

	PLA_2-1N; PLA_2-2N. Cobra-cuspideira (*Naja nigricollis*)	insulina em células BRIN BD11.		4, PLA_2-1N e PLA_2-2N estimulam a liberação de insulina.	fosfolipídeos de membrana e suas vias de sinalização.

Nota: N.A.: Não se aplica; HbA1c: Hemoglobina glicada; hIR: Receptor humano de insulina; NIH: National Institute of Health; β-PCs: Células beta pancreáticas; i.p: Intraperitoneal; GLP-1: Peptídeo similar ao glucagon 1; K_{ATP}: Canal de potássio dependente de ATP; hK_{ATP}: Canal humano de potássio dependente de ATP; Kir: Canal de potássio retificador de influxo; Kv: Canal de potássio voltagem dependente; HEK293T: Linhagem de células renais de embrião humano; Cav: Canal de cálcio voltagem dependente; HskMC: Células humanas do músculo esquelético; Akt: Proteína quinase B; GLUT4: Transportadores de glicose tipo 4; AMPK: Proteína quinase ativada por AMP; NF-κB: Fator nuclear κB.
Fonte: Autoria própria.

4 DISCUSSÃO

4.1 Mecanismos farmacológicos em prática na clínica do tratamento do diabetes

Para compreender de maneira mais completa os mecanismos envolvidos no tratamento do diabetes é preciso ter como base os conceitos fisiológicos que regulam o metabolismo da glicose no organismo. Em vista disso, é importante saber quais são as moléculas responsáveis por essa regulação, como se dá a ação das mesmas, sua liberação no corpo, assim como os principais tipos celulares envolvidos na sua resposta.

Antes de a glicose chegar a corrente sanguínea é preciso que esta seja digerida e absorvida no trato gastrointestinal a partir dos amidos obtidos pela alimentação. O processo de digestão desses polissacarídeos se inicia na boca e continua até o intestino delgado, essas moléculas são quebradas em subunidades de carboidratos menores até chegarem à glicose por intermédio das enzimas alfa-amilases e este açúcar, por sua vez, é prontamente absorvido no trato gastro intestinal através de transportadores específicos (Lu *et al*., 2023). Saliente-se que a glicose é depurada na urina e recaptada pelos co-transportadores de sódio e glicose do tipo 2 (SGLT2) presentes no glomérulo, em condições diabéticas, entretanto, essa recaptação passa a ser deletéria e inibidores desse co-transportador são úteis na terapêutica (Fonseca-Correa; Correa-Rotter, 2021).

Tem-se que as β-PCs são sensíveis às concentrações de glicose do organismo, estas moléculas, por sua vez, adentram nessas células e são fosforiladas, tornando a sua saída inviável e as encaminhando para o ciclo de Krebs. Disso as concentrações intracelulares de trifosfato de adenosina (ATP) aumentam e levam ao bloqueio de canais de potássio dependentes de ATP (K_{ATP}), este evento leva à facilitação da despolarização da membrana, à abertura de canais de cálcio voltagem dependentes e a um prolongamento do período de despolarização. Esses eventos desencadeiam uma série de respostas que acabam na fusão de vesículas repletas de insulina com a membrana celular e assim se tem a liberação desse hormônio na corrente sanguínea (Campbell; Newgard, 2021; Fu; Gilbert; Liu, 2013).

Os agonistas dos receptores do peptídeo similar ao glucagon 1 (GLP-1RAs), por sua vez, atuam sobre este e ativam a via de transdução de sinal da proteína G_s que acarreta a ativação da adenilato-ciclase (AC), com elevação das concentrações intracelulares de monofosfato de adenosina cíclico (cAMP) e ativação da proteína quinase A (PKA), que por sua vez leva a despolarização da membrana através da abertura de canais de sódio e canais de cálcio, favorecendo a secreção de insulina (Sheikh, 2013). Esses medicamentos apresentam

maior utilidade no tratamento de diabetes tipo 2 (T2DM) em seus estados iniciais, já que eles atuam por facilitar a secreção desse hormônio, enquanto que no diabetes tipo 1 (T1DM) e tipo 2 em estágio avançado já não há mais possibilidade disso sem antes haver algum tipo de reversão na funcionalidade das β-PCs (Khin *et al*., 2023; Mukherjee *et al*., 2021; Halban *et al*., 2014). As sulfonilureias, por exemplo, também agem sobre as β-PCs a fim de causar a secreção de insulina, estas atuam sobre os K_{ATP}, mais especificamente nas subunidades receptoras de sulfonilureias (SUR1) e inibem a abertura desses canais, o que prolonga o tempo de repolarização celular (Sola *et al*., 2015; Ashcroft, 1996).

Fisiologicamente, hormônios como insulina, glucagon e peptídeo semelhante ao glucagon 1 (GLP-1) são de grande relevância na regulação do metabolismo. Portanto, o controle de suas concentrações no organismo deve ser preciso. Do ponto de vista terapêutico a enzima dipeptidil peptidase 4 (DPP-4) é responsável pela degradação do GLP-1 e assim se destaca no tratamento do diabetes por ser um alvo que pode ser inibido facilmente, isto causa o aumento das concentrações séricas de GLP-1 premitindo que a molécula possa continuar a desenvolver sua atividade como um insulinotrópico no organismo e regular a glicemia (Thornberry; Gallwitz, 2009).

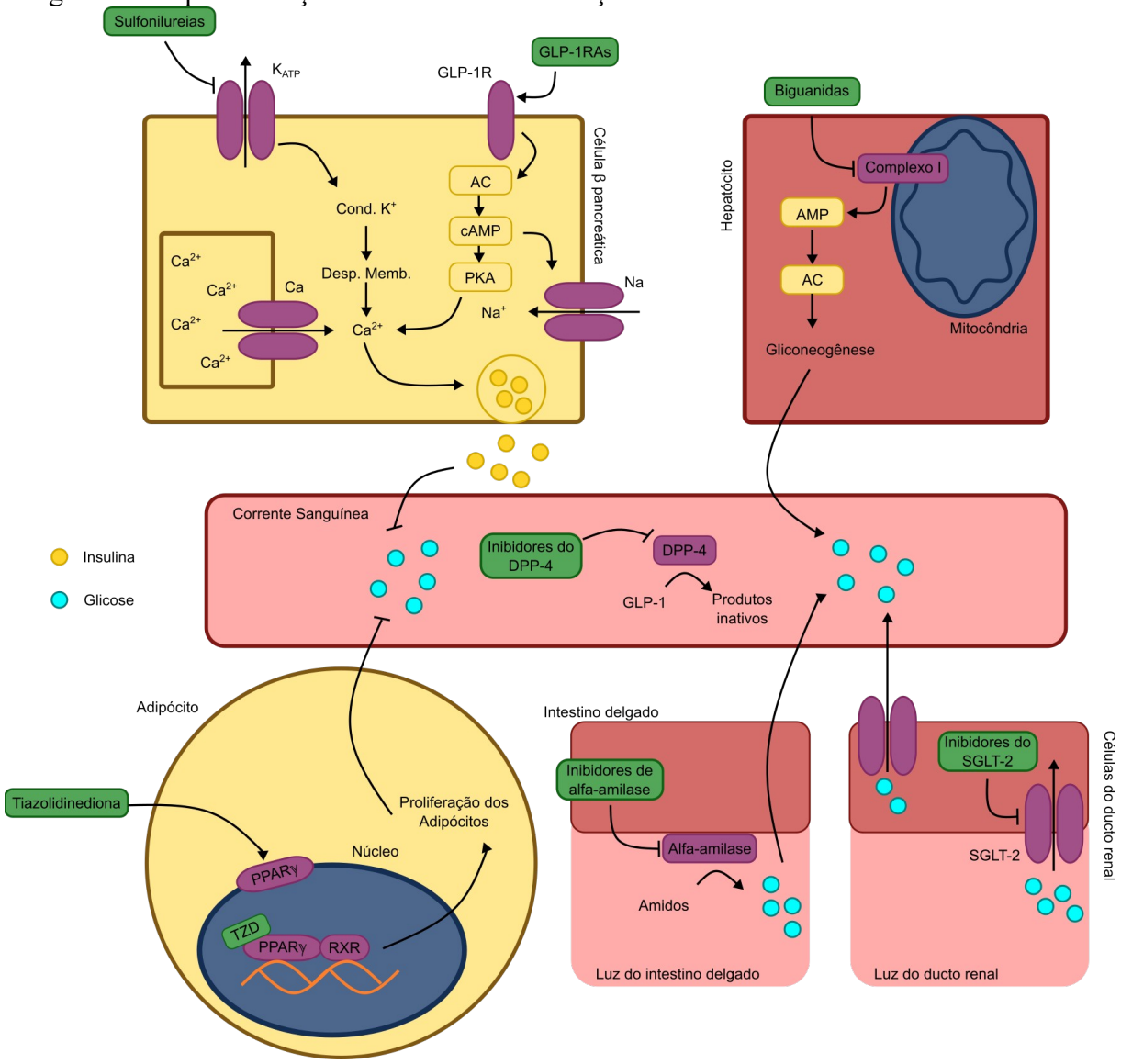
Com a insulina presente na corrente sanguínea observa-se a atuação da mesma sobre diversos tipos celulares, entre eles hepatócitos, adipócitos e células musculares esqueléticas de modo que a ativação dos IR, que são do tipo tirosina-quinase, leva a transdução do sinal pela via que envolve fosfatidilinositol 3-quinases (PIK3) e proteína quinase B (Akt) causando a fusão de vesículas contendo transportadores de glicose tipo 4 (GLUT4) com a membrana celular (Le *et al*., 2023; Arneth; Arnteth; Shams, 2019). A presença do transportador na membrana celular aumenta significativamente a captação de glicose circulante e esta, então, passa a participar de processos anabólicos como a síntese de triglicerídeos e glicogênio (Thompson; Bielska, 2019; Richter; Hargreaves, 2013). Uma classe de fármacos que também promove o anabolismo é o das tiazolidinedionas, estas agem sobre os adipócitos por interagir com o receptor ativado por proliferador de peroxissoma (PPARγ) de modo a expressar genes responsáveis pela síntese de triglicerídeos e proliferação adipocitária resultando em maior controle da glicemia (Pastromas; Koulouris, 2006).

Os hepatócitos e células musculares são muito relevantes no controle da glicemia, os primeiros em especial também funcionam como uma reserva de glicogênio que pode suprir as necessidades momentâneas de glicose do organismo (Hargreaves; Spriet, 2020; Zhang *et al*., 2019; Jensen *et al*., 2011). Assim as biguanidas são uma classe de medicamentos que se

aproveitam da capacidade desse tecido para regular a glicemia capilar. Seu mecanismo de ação envolve a inibição da enzima NADH-ubiquinona oxiredutase (Complexo 1), o que leva a um aumento nas concentrações de monofosfato de adenosina (AMP), inibição da AC com redução dos níveis de cAMP e isto, por fim, leva a inibição do processo de gliconeogênese e melhora o controle glicêmico em pacientes diabéticos (Magno *et al*., 2022).

Todos estes mecanismos apresentam relevância no tratamento do diabetes e portanto são guias que podem melhorar a compreensão e o entendimento dos mecanismos potencialmente envolvidos na ação de novas moléculas com capacidades antidiabéticas. Um resumo ilustrado dos mesmos se encontra na Figura 2.

Figura 2 - Esquematização dos mecanismos da ação antidiabética de fármacos no mercado.



Nota: K_{ATP}: Canais de potássio dependentes de ATP; GLP-1RAs: Agonistas dos receptores do peptídeo similar ao glucagon 1; GLP-1R: Receptores do peptídeo similar ao glucagon 1; GLP-1: Peptídeo similar ao glucagon 1; AC: Adenilato-ciclase; cAMP: Monofosfato de adenosina cíclico; AMP: Monofosfato de adenosina; PKA: Proteína quinase A; Cond. K^+: Condutância ao íon potássio; Desp. Memb.: Despolarização da membrana; Ca: Canais de cálcio; Ca^{2+}: Íon cálcio; Na: Canais de sódio; Na^+: Íon sódio; DPP-4: dipeptidil peptidase 4; PPARγ: Receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama; TZD: Tiazolidinedionas; RXR: Receptor de ácido 9-cis-retinóico; SGLT-2: Co-transportadores de sódio e glicose do tipo 2.

Fonte: Autoria própria baseada em Le *et al*. (2023); Lu *et al*. (2023); Magno *et al*. (2022); Fonseca-Correa e Correa-Rotter (2021); Sheikh (2013); Sola *et al*. (2015); Thornberry e Gallwitz (2009); Pastromas e Koulouris (2006); Ashcroft (1996).

4.2 Peptídeos que atuam por mecanismos envolvendo os receptores de GLP-1

A maioria dos trabalhos que avaliaram a capacidade de gerar um efeito através de uma ação mediada pelos receptores de GLP-1 envolviam os estudos clínicos que utilizaram a Exenatida. Aqueles que estudavam a ação sobre indivíduos diabéticos conseguiram observar uma redução significativa no parâmetro de hemoglobina glicada (HbA1c) (redução entre 0,36% até 3,1%), entretanto, outras vantagens da utilização de agonistas do receptor GLP-1 (GLP-1RA) como redução do peso corporal, do índice de massa corporal (IMC) e da glicemia capilar não foram consistentes (Joubert *et al*., 2021; Ekinci *et al*., 2021; Tamborlane *et al*., 2022). Trabalhos clínicos de longo prazo são extremamente difíceis de serem realizados e umas das hipóteses levantadas para a ausência de certas vantagens atribuídas a esta classe de medicamentos é o curto espaço temporal de avaliação, uma vez que os tratamentos se estenderam por em torno de 24 semanas e esses efeitos só são costumeiramente percebidos com tratamentos mais prolongados (Ebrahimi *et al*., 2024; Djurisic *et al*., 2017). Um ponto positivo é a utilização de regimes posológicos que envolvem a administração semanal do medicamento, isso é notável pois se sabe da importância que a comodidade representa no tratamento medicamentoso, um menor número de intervenções, portanto, representa menos empecilhos ao paciente, o que promove a continuidade adequada do tratamento (Maxwell, 2016; Lam e Fresco, 2015). A co-administrção de Exenatida não causou elevação no risco hipoglicêmico, porém notou-se certa elevação do número de eventos gastro-intestinais.

Taylor *et al*. (2023) priorizou o estudo de indivíduos não diabéticos e reparou que a administração de Exenatida foi capaz de aumentar a secreção de insulina em quase duas vezes e acelerar a taxa de redução da glicose na corrente sanguínea. Os efeitos sobre as concentrações de insulina e glicose se desenvolveram de maneira bifásica e sugere-se que a causa da redução na glicose desse modo foi diretamente mediada pela ação e liberação de insulina de maneira similar. Alguns fármacos apresentam a capacidade de potencializar a interação de outras substâncias com um receptor específico, porém a Exenatida não exerce esse tipo de efeito sobre a insulina já que não se notou alteração à sensibilidade do organismo a esse hormônio. Percebeu-se grande diferença inter-individual no efeito do medicamento, porém não foi possível associar essa diferença aos genótipos homozigóticos para o receptor de glucagon (GCGR) (p.G40S; rs850763) ou para o receptor do polipeptídeo inibidor gástrico (GIPR) (p.E354Q; rs1800437) encontrados nas populações Amish estudadas. Tais genes estão relacionados com a expressão de formas diferentes do GLP1-R e do GIPR e são considerados na literatura como possíveis responsáveis pela variação encontrada na resposta de GLP-1RAs,

entretanto o estudo em questão não encontrou evidências suficientes para eliminar a hipótese do envolvimento desses genes. Assim, trabalhos com um número maior de indivíduos homozigotos, ou até novos estudos com heterozigotos, são sugeridos.

Gunta *et al*. (2023) analisou *in silico* quatro peptídeos com peso molecular entre 6 e 8 mil Daltons encontrados na peçonha de cobras. Seus resultados revelaram interação na ancoragem molecular com o GLP-1R menos favorável que a de substâncias que conhecidamente se ligam com esse receptor como Liraglutida, Semaglutida, Exenatida e Lixisenatida. Enquanto que as avaliações de dinâmica molecular com um dos peptídeos testados (P86538) e o GLP-1R determinou alta estabilidade conformacional do alvo. As conclusões do artigo salientam que as moléculas são promissoras e dignas de análises mais aprofundadas. Com base nesses achados se sugere, entretanto, que futuras avaliações com estas moléculas não sejam desenvolvidas com foco em mecanismos relacionados apenas com GLP-1R, uma vez que tais resultados não são robustos o suficiente para garantir ação por esta via e que outro estudo já descreveu extensa variação conformacional do receptor por dinâmica molecular na presença de agonistas reconhecidos e amplamente utilizados (Deganutti *et al*., 2022).

4.3 Peptídeos que atuam por mecanismos envolvendo o agonismo de receptores de insulina

Uma das grandes dificuldades no desenvolvimento de insulinas de ação rápida é a formação de dímeros e hexâmeros dessas moléculas quando distribuídas no organismo, para que esse hormônio desenvolva sua ação de forma plena e veloz é preciso que este se encontre em sua forma monomérica (Maikawa *et al*., 2020; Brange *et al*., 1990). Portanto o estudo de peptídeos similares a insulina (ILPs) obtidos de venenos animais é relevante, pois estes podem servir de ponte no desenvolvimento de conhecimentos necessários à produção de insulinas monomericas ou de novos fármacos.

Ahorukomeye *et al*. (2019) a estudaram sete peptídeos encontrados no veneno de caramujo marinho (*Conus geographus*), e todos demonstraram capacidade de reduzir a glicemia capilar em um modelo de T1DM em Zebra Fish, sendo que três desses peptídeos (Con-Ins G1, Con-Ins T1A e Con-Ins K1) desencadearam efeitos hipoglicemiantes em modelo T1DM em camundongo. Apesar desse efeito em mamíferos ainda se averiguou a capacidade dessas substâncias em se ligar a receptores humanos de insulina (hIRs). A ativação do hIR não era uma certeza já que as moléculas em questão não apresentavam uma porção de

aminoácidos na porção C-terminal da cadeia B consideradas essenciais para a sua ação, porém os resultados foram positivos. Tais achados corroboram a noção de que com o estudo mais aprofundado de ILPs será possível se desenvolver insulinas monoméricas e/ou até mais estáveis em meios biológicos.

Guo *et al*., (2024) avaliaram o peptídeo ILP-Ap04 obtido da anemona marinha (*Exaiptasia diaphana*) e assim como observado nas moléculas de Ahorukomeye *et al*. (2019) se notou ausência de uma sequência de aminoácidos considerada essencial. Após determinar efeito hipoglicemiante em modelos de T1DM em Zebra Fish foram realizadas análises de ancoragem molecular *in silico* com o hIR, encontrando elevada interação envolvendo a formação de pontes de hidrogênio com o alvo. Percebe-se que de certa forma estes dois trabalhos podem vir a complementar os achados um do outro no que tange as metodologias realizadas, enquanto um aponta de fato a ligação e ativação dos hIRs pelos ILPs o outro explana a forma de interação pelo qual estas substâncias podem se ligar a seu receptor.

4.4 Peptídeos que atuam por mecanismos envolvendo a inibição de canais de potássio

Ambos Tang *et al*. (2021) e Ramu *et al*. (2022) se dedicaram a estudar peptídeos obtidos de centopeias do gênero *Scolopendra*. As substâncias analisadas (SsTx-4, SsTx-4-K14A, SsTx-4-P15A, SsTx-4-Y16A e SpTx1) revelaram-se inibidoras dos canais de potássio (Kir6.2/SUR1) responsáveis por parte do potencial de membrana das células beta pancreáticas. Estas moléculas causam um bloqueio do poro do canal a partir da ligação ao vestíbulo exterior do mesmo, as alterações causadas por essa inibição costumeiramente levam à secreção de insulina (Doupnik, 2017). As análises *in vivo* de Ramu *et al*. (2022) apontaram uma função de secretagogo secundário de insulina por parte de SpTx1, ou seja, dependente de concentrações elevadas de glicose. Este achado pode vir a ter significância clínica resguardada na hipótese de que, por esse mecanismo, eventos hipoglicêmicos severos no tratamento do diabetes seriam menos prováveis. Cabe salientar que os achados *in vivo* foram encontrados mediante a utilização de uma linhagem mutante de camundongos com a alteração de um aminoácido nas subunidades Kir6.2 (^{ENDO}mKir6.2^{V108E}) do canal a fim de garantir a mesma sensibilidade à SpTx1 determinada para subunidade humana do receptor em questão. À luz desses achados se verifica a extrema especificidade dessas substâncias uma vez que pequenas modificações na proteína alvo medeiam com intensidade a sensibilidade e atividade dessas moléculas.

Já em relação ao peptídeo Δ-theraphotoxin-Ac1 teve-se uma ação secretagoga de insulina em células BRIN BD11 mediada tanto por canais K_{ATP} como por canais de cálcio voltagem dependentes (Coulter-Parkhill *et al*., 2024). Através de utilização de ferramentas farmacológicas capazes de inibir a ação das ciclases (adenilil e guanilil-ciclase) foi possível notar a potenciação dos efeitos do peptídeo, isto sugere que além da regulação dos canais pode haver uma regulação das vias de sinalização relacionada com a atividade desses canais. A secreção de insulina mediada por Δ-theraphotoxin-Ac1 se manifestou dependente das concentrações de glicose e foi capaz de regular a glicemia capilar de camundongos que receberam estreptozotocina e que foram alimentados com dieta com alta concentração de gordura (HFF/STZ), modelo este que desenvolve parâmetros similares ao T2DM nos animais em questão (Coulter-Parkhill *et al*., 2024; Coulter-Parkhill *et al*., 2023b). A avaliação farmacocinética em camundongos saudáveis desse peptídeo demonstrou alta distribuição hepática, renal e, especialmente, pancreática após administração i.p, além de distribuição através da barreira hemato-encefálica, fato que pode explicar outros efeitos do peptídeo, como supressão do apetite, por ação em um mecanismo central de resposta.

Coulter-Parkhill *et al*. (2023a) estudaram os peptídeos Jingzhaotoxina IX e Jingzhaotoxina XI e através de métodos com células beta pancreáticas BRIN-BD11 conseguiram notar aumento na secreção de insulina mediado pela elevação nas concentrações de cálcio intracelular e prolongamento no tempo de repolarização desse tipo celular, tais achados sugerem atividade por interação com os canais de potássio voltagem dependente (Kv2.1). Ao contrário do que foi percebido para peptídeos que atuam sobre outros tipos de canais de potássio discutidos anteriormente, as Jingzhaotoxinas desenvolvem seu efeito insulinotrópico sem mediação por parte das concentrações de glicose, isto, por sua vez, levanta a hipótese de uma ação secretagoga primária e mais capaz de induzir efeitos hipoglicemiantes severos (Ramu *et al*., 2022; Tang *et al*., 2021). A determinação da capacidade das Jingzhaotoxinas em provocar o crescimento, proliferação e impedir a apoptose das células beta é muito fortuita ao se considerar que a piora dos prognósticos de T2DM está relacionada com a morte das células beta e redução na secreção de insulina (Khin *et al.*, 2023; Mukherjee *et al*., 2021; Halban *et al*., 2014). Entretanto, ao se analisar as suas propriedades *in vivo* se notou um redução dos seus efeitos sobre as concentrações de glicose da corrente sanguínea quando comparado com um controle que recebeu Exenatida. Tais resultados revelam uma limitação na transposição de achados *in vitro* para os *in vivo*, essas substâncias encaram sérias dificuldades farmacocinéticas relacionadas, em geral, com a sua estabilidade em meios biológicos (Reveret *et al*., 2023; Diao e Meibom, 2013).

4.5 Peptídeos que atuam por mecanismos envolvendo a inibição de alfa-amilases

A Magnificamida foi capaz de inibir a atividade enzimática de três alfa-amilases, a alfa-amilase suína pancreática (PPA), a alfa-amilase salivar humana (HSA) e alfa-amilase pancreática humana (HPA), apresentando valores muito reduzidos para a constante de inibição (Ki) o que por sua vez indica uma elevada potência em impedir a ação catalitica desse enzima na quebra das ligações glicosídicas presentes nos sacarídeos e amidos obtidos na dieta (Sintsova *et al*., 2019; Sintsova *et al*., 2023). A magnificamida é tão potente na inibição das alfa-amilases que quando comparada com a acarbose, um inibidor amplamente utilizado, se notou um Ki três a quatro ordens de magnitude menor, entretanto esses são achados *in vitro* e, portanto, devem ser tomados com cautela (Sintsova *et al*., 2019).

Na transposição para estudos *in vivo* se encontra uma dificuldade, para que os inibidores da alfa-amilase produzam efeitos notáveis sobre a glicemia capilar é preciso que estes atuem na luz do trato gastrointestinal e as condições físico-químicas desse meio são extremamente dificultosas a ação de peptídeos (Reveret *et al*., 2023; Diao; Meibom, 2013). Mesmo com essa dificuldade Sintsova *et al*. (2023) foram capazes de demonstrar redução na glicemia capilar de camundongos em um modelo T1DM, tais efeitos foram obtidos com doses muito baixas de magnificamida quando comparadas com a dose de inibidores de alfa-amilase padrão.

4.6 Peptídeos que atuam por mecanismos diversos

Os cinco peptídeos obtidos da partir da cobra *Naja nigricollis* e avaliados por Conlon *et al*. (2020) manifestaram capacidade insulinotrópica, entretanto para três deles, Citotoxina-1, Citotoxina-2 e Citotoxina-4, as concentrações capazes de induzir a secreção desse hormônio também causaram a liberação de lactato desidrogenase (LDH) nas linhagens celulares analisadas e isso sugere o desencadeamento de toxicidade e morte celular. Por sua vez PLA_2-1N e PLA_2-2N puderam aumentar a taxa de secreção da insulina em até seis vezes do valor basal sem alterar as concentrações de marcadores de toxicidade. Avaliações de mecanismos ou potência farmacológica não puderam ser realizados em virtude da baixa quantidade de peptídeos disponível, mas a literatura sugere que estas fosfolipases desenvolvem sua ação secretagoga através da lise de fosfolipídeos de membrana (PIP2) com formação de ácido aracdônico e prostaglandina, produtos esses que por suas vias de transdução de sinal podem

vir a atuar sobre canais de potássio, AC, guanilato-ciclase, bem como proteínas-quinases e outros (Fagundes *et al*., 2011).

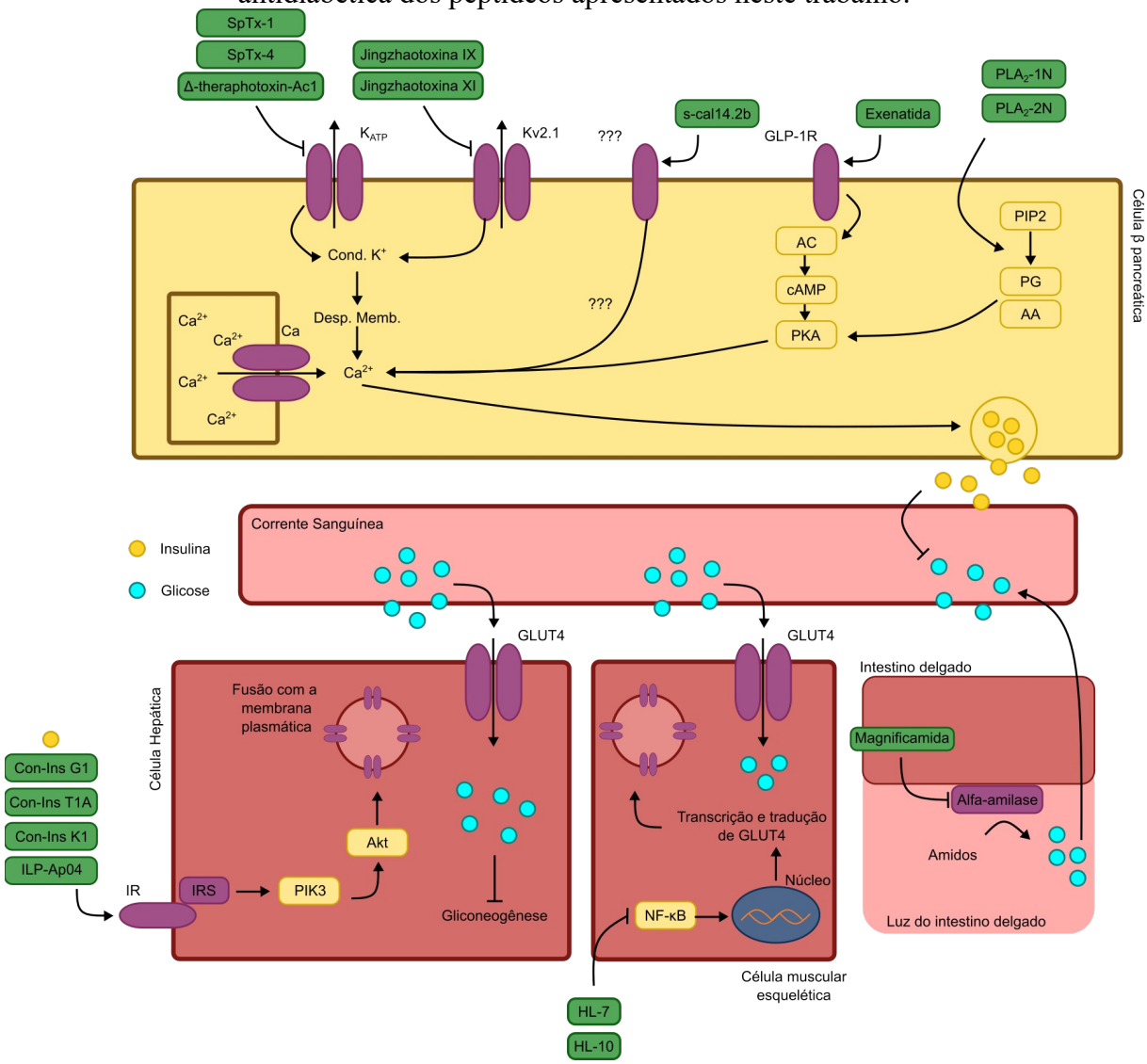
Lugo-Farbes *et al*. (2021) determinaram que o peptídeo s-cal14.2b obtido a partir do veneno de caramujos marinhos (*Californiconus californicus*) é capaz de induzir a secreção de insulina e regular as concentrações de glicose capilar em um teste de tolerância oral a glicose em camundongos BALB/cAnNHsd. Testes realizados em células beta pancreáticas de ratos revelaram que este peptídeo muito provavelmente atua sobre algum receptor metabotrópico por ser capaz de regular a condutância de cálcio em canais de cálcio voltagem dependentes do tipo L de maneira independente do potencial de membrana (Cav1.2/1.3). Estes achados corroboram a compreensão de que s-cal14.2b tem potencial para o tratamento de T2DM nos seu estágios mais iniciais.

Os peptídeos sintéticos HL-7 e HL-10 obtidos a partir do veneno de escorpião (*Hemiscorpius lepturus*) induzem a expressão do transportador GLUT4 em células humanas de músculo esquelético (HSkMC), com a secreção de insulina em β-PCs da linhagem INS-1 de maneira dependente e independente de glicose, além de se induzir a expressão de mRNA para GLUT4 em células musculares do sóleo (Setayesh-Mehr *et al*., 2023). Os autores chegaram a conclusão que a expressão de GLUT4 está correlacionado com a capacidade dessas substâncias em inibir o fator de transcrição nuclear κB (NF-κB), entretanto as únicas análises confirmatórias para essa afirmação envolvem um ensaio de ancoragem molecular indicando boa interação entre os peptídeos em análise e o respectivo fator de transcrição. Sugere-se outra hipótese quanto a possíveis mecanismo de ação, no caso envolvendo a ação metabotrópica dos peptídeos sobre os receptores de insulina, os argumentos para tal envolvem os resultados obtidos nas análises de western blot que observaram um padrão de expressão de Akt, proteína quinase ativada por mitógeno (MAPk) e GLUT4 muito similar aos mecanismos e vias de transdução de sinal reconhecidos na ação da insulina (Campbell; Newgard, 2021; Fu; Gilbert; Liu, 2013).

4.7 Dificuldades e considerações pertinentes no estudo dessas substâncias

Como exposto na Figura 3 os peptídeos possuem uma diversa gama de mecanismos de ação, esses, por vezes, não se encontram no rol de mecanismos dos fármacos que já são comercializados e isso pode vir a dificultar a sua exploração de maneira mais aprofundada. Isso se dá pois pesquisadores podem se encontrar sem ferramentas adequadas às avaliações necessárias ou com acesso mais dificultado às mesmas e isso prejudica o estudo dessas substâncias (Salavert *et al*., 2016; Kiel; Serrano, 2012).

Figura 3 - Esquematização dos mecanismos, segundo os autores originais, da ação antidiabética dos peptídeos apresentados neste trabalho.



Nota: K_{ATP}: Canais de potássio dependentes de ATP; Kv2.1: Canais de potássio voltagem dependente do tipo 2.1; ???: Receptores ou vias de transdução de sinais incertas; GLP-1R: Receptores do peptídeo similar ao glucagon 1; AC: Adenilato-ciclase; cAMP: Monofosfato de adenosina cíclico; PKA: Proteína quinase A; Cond. K^+: Condutância ao íon potássio; Desp. Memb.:Despolarização da membrana; Ca: Canais de cálcio; Ca^{2+}: Íon cálcio; Na: Canais de sódio; Na^+: Íon sódio; PIP2: Fosfolipídeos de membrana; PG: Prostaglandinas; AA: Ácido araquidônico; GLUT4: Transportador de glicose do tipo 4; IR: Receptor de insulina; IRS: Substrato do receptor de insulina; PIK3: Fosfatidilinositol 3-quinase; Akt: Proteína quinase B; NF-κB: Fator de transcrição nuclear κB. Fonte: Autoria própria baseada em Coulter-Parkhill *et al*. (2023a); Le *et al*. (2023); Lu *et al*. (2023); Setayesh-Mehr *et al*. (2023); Ramu *et al*. (2022); Lugo-Farbes *et al*. (2021); Tang *et al*. (2021); Arneth, Arnteth e Shams (2019); Sheikh (2013); Fagundes *et al*. (2011).

A obtenção dos peptídeos não envolve processos simples ou pouco dispendiosos, a maioria envolve reagentes e aparelhos caros durante sua síntese, o que acaba por dificultar a produção em escalas maiores dessas moléculas (Mueller *et al*., 2020; Isidro-Llobet *et al*., 2019). Portanto o desenvolvimento de trabalhos que envolvem o tratamento *in vivo* por tempo prolongado, e que consequentemente precisam de quantidades maiores dessas substâncias, são escassos, dessa forma tem-se uma situação que é prejudicial ao desenvolvimento científico em

especial no que tange o diabetes. As alterações metabólicas e de parâmetros fisiológicos relacionadas a esse distúrbio vão além da glicemia capilar e envolvem hemoglobina glicada, triglicerídeos, distúrbios nos sistemas antioxidantes, reações inflamatórias, peso corporal, dentre outros que só se alteram depois de um tempo prolongado de doença e que levam um tempo igualmente longo para sua regularização após o início do tratamento (Martín-Carro et al., 2023).

Com o passar do tempo se observa uma progressão nos estudos de um mesmo peptídeo a partir de avaliações *in silico* ou *in vitro* nos trabalhos mais antigos para avaliações *in vivo* nos trabalhos mais recentes. Além disso demonstrar confiança no potencial desses substâncias no tratamento do diabetes, em alguns casos se percebe certa decepção com os resultados obtidos. Entretanto, como apontado por Ramu *et al*. (2022), a perda de eficácia na resposta dessas moléculas não significa necessariamente uma perda na viabilidade dessas substâncias, mas talvez a interação com tipos de receptores diferentes por exemplo. Muitos dos ensaios *in vitro* preliminares são realizados com linhagens celulares humanas e, portanto, apresentam receptores farmacológicos humanos, enquanto que a transposição para estudos *in vivo* majoritariamente envolvem modelos com roedores, mais especificamente camundongos, que não possuem necessariamente os mesmos tipos de receptores. As discrepâncias encontradas nos resultados, dessa forma, possuem explicações que não se limitam a dificuldades farmacocinéticas dessas substâncias, mas também com relações farmacodinâmicas (Yadav et al., 2021). Estudos que se proponham a realizar análises com animais geneticamente modificados que expressem receptores humanos ou mais similares aos humanos, apesar de serem mais complexos, tendem a ser mais fidedignos à resposta de estudos clínicos.

Por fim muitos desses peptídeos são obtidos de animais com origem em países em desenvolvimento, entretanto a produção acadêmica sobre os mesmos não se encontra necessariamente nesses países, mas sim em Estados setentrionais que possuem estrutura e financiamento por muitas vezes ordens de magnitude maior. E isso levanta questionamentos sobre ética em pesquisa, biopirataria, e neocolonialismo (Efferth et al., 2019; Merson, 2000).

5 CONCLUSÃO

Apresentou-se uma síntese dos últimos cinco anos de produção científica a respeito de peptídeos de origem animal e seus respectivos mecanismos de ação antidiabética. Determinou-se que a ação dessas substâncias é desenvolvida principalmente de quatro formas: (1) Agonismo dos receptores de GLP-1; (2) Agonismo dos receptores de insulina; (3) Inibição de canais de potássio dependentes de ATP Kir6.2/SUR1, por mecanismo semelhante àquele das sulfonilureias; (4) Inibição das alfa-amilases. Essas informações foram obtidas principalmente através de métodos *in vitro* e *in vivo*, com alguns métodos *in silico* para tentar elucidar como se davam as interações entre alvos e receptores. Verifica-se uma elevada potência farmacológica para estas substâncias dados os efeitos positivos em doses tão reduzidas, na escala de ng/kg ou nmol/kg. Apesar da compreensão de que os venenos animais são tóxicos, os peptídeos isolados destes não apresentaram, em sua maioria, toxicidade nas doses testadas. Isso é importante considerando as etapas que uma dessas moléculas precisam ultrapassar para eventualmente serem usadas na terapêutica. O estudo em si dessas substâncias, entretanto, não precisa gerar um medicamento inovador baseado em sua estrutura química para ser de grande valor, esta pode, simplesmente, vir a fornecer os novas perspectivas necessários ao desenvolvimento de novas moléculas que utilizariam de certas características desses peptídeos para desenvolver a sua ação. Assim, tem-se que esses peptídeos são moléculas que apresentam um grande potencial no tratamento do diabetes.

6 REFERÊNCIAS

AGEITOS, L.; TORRES, M. D. T.; DE LA FUENTE-NUNEZ, C. Biologically active peptides from venoms: Applications in antibiotic resistance, cancer, and beyond. **International journal of molecular sciences**, v. 23, n. 23, 2022.

AGUIAR, A. J. F. C. *et al*. Peptides evaluated in silico, in vitro, and in vivo as therapeutic tools for obesity: A systematic review. **International journal of molecular sciences**, v. 25, n. 17, 2024.

AHORUKOMEYE, P. *et al*. Fish-hunting cone snail venoms are a rich source of minimized ligands of the vertebrate insulin receptor. **eLife**, v. 8, 2019.

ARNETH, B.; ARNETH, R.; SHAMS, M. Metabolomics of type 1 and type 2 diabetes. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 10, 2019.

ASHCROFT, F. Mechanisms of the glycaemic effects of sulfonylureas. **Hormone and metabolic research**, v. 28, n. 09, p. 456–463, 1996.

BHAT, Z. F.; KUMAR, S.; BHAT, H. F. Bioactive peptides of animal origin: a review. **Journal of food science and technology**, v. 52, n. 9, p. 5377–5392, 2015.

BORDON, K. DE C. F. *et al*. From animal poisons and venoms to medicines: Achievements, challenges and perspectives in drug discovery. **Frontiers in pharmacology**, v. 11, 2020.

BRANGE, J. et al. Monomeric insulins and their experimental and clinical implications. **Diabetes care**, v. 13, n. 9, p. 923–954, 1990.

CAMPBELL, J. E.; NEWGARD, C. B. Mechanisms controlling pancreatic islet cell function in insulin secretion. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 22, n. 2, p. 142–158, 2021.

CONLON, J. M. *et al*. Isolation and characterization of cytotoxic and insulin-releasing components from the venom of the black-necked spitting cobra Naja nigricollis (Elapidae). **Toxicon: X**, v. 6, n. 100030, 2020.

COULTER-PARKHILL, A. *et al*. A novel peptide isolated from Aphonopelma chalcodes tarantula venom with benefits on pancreatic islet function and appetite control. **Biochemical pharmacology**, v. 212, n. 115544, 2023b.

COULTER-PARKHILL, A. *et al*. Peptides originally derived from Chilobrachys jingzhao tarantula venom possess beneficial effects on pancreatic beta cell health and function. **European journal of pharmacology**, v. 954, 2023a.

COULTER-PARKHILL, A. *et al*. Sustained metabolic benefits of ΔTRTX-Ac1, a tarantula venom-derived peptide, when administered together with exenatide in high-fat fed mice. **Diabetes, obesity & metabolism**, v. 26, n. 1, p. 329–338, 2024.

DEGANUTTI, G. et al. Dynamics of GLP-1R peptide agonist engagement are correlated with kinetics of G protein activation. **Nature communications**, v. 13, n. 1, 2022.

DIAO, L.; MEIBOHM, B. Pharmacokinetics and pharmacokinetic–pharmacodynamic correlations of therapeutic peptides. **Clinical pharmacokinetics**, v. 52, n. 10, p. 855–868, 2013.

DJURISIC, S. et al. Barriers to the conduct of randomised clinical trials within all disease areas. **Trials**, v. 18, n. 1, 2017.

DOUPNIK, C. A. Venom-derived peptides inhibiting Kir channels: Past, present, and future. **Neuropharmacology**, v. 127, p. 161–172, 2017.

EBRAHIMI, H. et al. Barriers to clinical trial implementation among community care centers. **JAMA network open**, v. 7, n. 4, 2024.

EFFERTH, T. et al. Biopiracy versus One-World Medicine–From colonial relicts to global collaborative concepts. **Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, v. 53, p. 319–331, 2019.

EKINCI, E. I. et al. Feasibility of once weekly exenatide-LAR and enhanced diabetes care in Indigenous Australians with type 2 diabetes (Long-acting-Once-Weekly-Exenatide laR-SUGAR, 'Lower SUGAR' study). **Internal medicine journal**, v. 51, n. 9, p. 1463–1472, 2021.

FONSECA-CORREA, J. I.; CORREA-ROTTER, R. Sodium-Glucose Cotransporter 2 inhibitors mechanisms of action: A review. **Frontiers in medicine**, v. 8, 2021.

FU Z.; GILBERT, E. R.; LIU D. Regulation of insulin synthesis and secretion and pancreatic Beta-cell dysfunction in diabetes. **Currente diabetes reviews**. v. 9, n. 1. p. 25-53, 2013.

GHAZAEE, S. P. *et al*. A review of the novel antidiabetic medications: Efficacy, safety and innovation. **Emirates medical journal**, v. 4, n. 1, 2023.

GUNTA, U. *et al*. Investigating the binding efficacy of snake venom proteins as GLP-1 analogs for diabetes mellitus management: An in silico study. **Oriental journal of chemistry**, v. 39, n. 3, p. 581–591, 2023.

GUO, Q. *et al*. Synthesis and hypoglycemic effect of insulin from the venom of sea anemone Exaiptasia diaphana. **Marine drugs**, v. 22, n. 3, p. 111, 2024.

GUPTA, S. *et al*. Diabetes: a review of its pathophysiology, and advanced methods of mitigation. **Current medical research and opinion**, v. 40, n. 5, p. 773–780, 2024.

H.R. FAGUNDES, F. *et al*. A Catalytically Inactive Lys49 PLA2 Isoform from Bothrops jararacussu venom that Stimulates Insulin Secretion in Pancreatic Beta Cells. **Protein and peptide letters**, v. 18, n. 11, p. 1133–1139, 2011.

HALBAN, P. A. *et al*. B-cell failure in type 2 diabetes: Postulated mechanisms and prospects for prevention and treatment. **Diabetes care**, v. 37, n. 6, p. 1751–1758, 2014.

HARGREAVES, M.; SPRIET, L. L. Skeletal muscle energy metabolism during exercise. **Nature metabolism**, v. 2, n. 9, p. 817–828, 2020.

ISIDRO-LLOBET, A. *et al*. Sustainability challenges in peptide synthesis and purification: From R&D to production. **The Journal of organic chemistry**, v. 84, n. 8, p. 4615–4628, 2019.

JENSEN, J. *et al*. The role of skeletal muscle glycogen breakdown for regulation of insulin sensitivity by exercise. **Frontiers in physiology**, v. 2, 2011.

JOUBERT, M. *et al*. Efficacy and safety of exenatide as add-on therapy for patients with type 2 diabetes with an intensive insulin regimen: A randomized double-blind trial. **Diabetes, obesity & metabolism**, v. 23, n. 2, p. 374–381, 2021.

KATSAROU, A. *et al*. Type 1 diabetes mellitus. **Nature reviews. Disease primers**, v. 3, n. 1, 2017.

KHIN, P. P.; LEE, J. H.; JUN, H.-S. Pancreatic beta-cell dysfunction in type 2 diabetes. **European journal of inflammation**, v. 21, 2023.

KIEL, C.; SERRANO, L. Challenges ahead in signal transduction: MAPK as an example. **Current opinion in biotechnology**, v. 23, n. 3, p. 305–314, 2012.

LAM, W. Y.; FRESCO, P. Medication adherence measures: An overview. **BioMed research international**, v. 2015, p. 1–12, 2015.

LE, T. K. C. *et al*. Insulin signaling and its application. **Frontiers in endocrinology**, v. 14, 2023.

LODATO, M. *et al*. Venom peptides, polyphenols and alkaloids: Are they the next antidiabetics that will preserve β-cell mass and function in type 2 diabetes? **Cells (Basel, Switzerland)**, v. 12, n. 6, 2023.

LU, H. *et al*. Alpha-glucosidase inhibitory peptides: Sources, preparations, identifications, and action mechanisms. **Nutrients**, v. 15, n. 19, 2023.

LUGO-FABRES, P. H. *et al*. Potential therapeutic applications of synthetic conotoxin s-cal14.2b, derived from Californiconus californicus, for treating Type 2 diabetes. **Biomedicines**, v. 9, n. 8, 2021.

MAGNO, L. *et al*. The mechanism of action of biguanides: New answers to a complex question. **Cancers**, v. 14, n. 13, 2022.

MAIKAWA, C. L. *et al*. Stable monomeric insulin formulations enabled by supramolecular PEGylation of insulin analogues. **Advanced therapeutics**, v. 3, n. 1, 2020.

MARTÍN-CARRO, B. *et al*. Experimental models to study diabetes mellitus and its complications: Limitations and new opportunities. **International journal of molecular sciences**, v. 24, n. 12, 2023.

MAXWELL, S. R. J. Rational prescribing: the principles of drug selection. **Clinical medicine (London, England)**, v. 16, n. 5, p. 459–464, 2016.

MERSON, J. Bio-prospecting or bio-piracy: Intellectual property rights and biodiversity in a colonial and postcolonial context. **Osiris**, v. 15, p. 282–296, 2000.

MUELLER, L. K. *et al*. Challenges and perspectives in chemical synthesis of highly hydrophobic peptides. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, v. 8, 2020.

MUKHERJEE, N. *et al*. B-cell death in diabetes: Past discoveries, present understanding, and potential future advances. **Metabolites**, v. 11, n. 11, 2021.

OLIVEIRA, A. N.; SOARES, A. M.; DA SILVA, S. L. Peptides from animal venom and poisons. **International journal of peptide research and therapeutics**, v. 29, n. 5, 2023.

PARKES, D. G.; MACE, K. F.; TRAUTMANN, M. E. Discovery and development of exenatide: the first antidiabetic agent to leverage the multiple benefits of the incretin hormone, GLP-1. **Expert opinion on drug discovery**, v. 8, n. 2, p. 219–244, 2013.

PASTROMAS, S.; KOULOURIS, S. Thiazolidinediones: antidiabetic drugs with cardiovascular effects. **Hellenic journal of cardiology**. v. 47, n. 6, p. 352-60, 2006.

RAMU, Y. *et al*. Blocking Kir6.2 channels with SpTx1 potentiates glucose-stimulated insulin secretion from murine pancreatic β cells and lowers blood glucose in diabetic mice. **eLife**, v. 11, 2022.

REED, J.; BAIN, S.; KANAMARLAPUDI, V. A review of current trends with type 2 diabetes epidemiology, aetiology, pathogenesis, treatments and future perspectives. **Diabetes, metabolic syndrome and obesity: targets and therapy**, v. 14, p. 3567–3602, 2021.

REVERET, L. *et al*. Pharmacokinetics, biodistribution and toxicology of novel cell-penetrating peptides. **Scientific reports**, v. 13, n. 1, 2023.

RICHTER, E. A.; HARGREAVES, M. Exercise, GLUT4, and skeletal muscle glucose uptake. **Physiological reviews**, v. 93, n. 3, p. 993–1017, 2013.

SALAVERT, F. *et al*. Actionable pathways: interactive discovery of therapeutic targets using signaling pathway models. **Nucleic acids research**, v. 44, n. W1, p. W212–W216, 2016.

SALMEN, T. *et al*. Non-insulin novel antidiabetic drugs mechanisms in the pathogenesis of COVID-19. **Biomedicines**, v. 10, n. 10, 2022.

SETAYESH-MEHR, Z. *et al*. Upregulation of GLUT4 expression and glucose homeostasis by synthetic peptides HL-7 and HL-10 in in-vitro and in-vivo diabetic models. **International journal of peptide research and therapeutics**, v. 29, n. 3, 2023.

SHEIKH, A. Direct cardiovascular effects of glucagon like peptide-1. **Diabetology & metabolic syndrome**, v. 5, n. 1, 2013.

SINTSOVA, O. *et al*. Control of postprandial hyperglycemia by oral administration of the sea anemone mucus-derived α-amylase inhibitor (magnificamide). **Biomedecine & pharmacotherapie [Biomedicine & pharmacotherapy]**, v. 168, 2023.

SINTSOVA, O. *et al*. Magnificamide, a β-defensin-like peptide from the mucus of the sea anemone Heteractis magnifica, is a strong inhibitor of mammalian α-amylases. **Marine drugs**, v. 17, n. 10, 2019.

SMALLWOOD, T. B.; CLARK, R. J. Advances in venom peptide drug discovery: where are we at and where are we heading? **Expert opinion on drug discovery**, v. 16, n. 10, p. 1163–1173, 2021.

SOLA, D. *et al*. State of the art paper Sulfonylureas and their use in clinical practice. **Archives of medical science: AMS**, v. 4, p. 840–848, 2015.

TAMBORLANE, W. V. et al. Once-weekly exenatide in youth with type 2 diabetes. **Diabetes care**, v. 45, n. 8, p. 1833–1840, 2022.

TANG, D. *et al*. Molecular mechanisms of centipede toxin SsTx-4 inhibition of inwardly rectifying potassium channels. **The journal of biological chemistry**, v. 297, n. 3, 2021.

TAYLOR, S. I. *et al*. Acute pharmacodynamic responses to exenatide: Drug-induced increases in insulin secretion and glucose effectiveness. **Diabetes, obesity & metabolism**, v. 25, n. 9, p. 2586–2594, 2023.

THOMPSON, C. B.; BIELSKA, A. A. Growth factors stimulate anabolic metabolism by directing nutrient uptake. **The journal of biological chemistry**, v. 294, n. 47, p. 17883–17888, 2019.

THORNBERRY, N. A.; GALLWITZ, B. Mechanism of action of inhibitors of dipeptidyl-peptidase-4 (DPP-4). **Bailliere's best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism**, v. 23, n. 4, p. 479–486, 2009.

VIDYA *et al*. Venom peptides – A comprehensive translational perspective in pain management. **Current research in toxicology**, v. 2, p. 329–340, 2021.

YADAV, J. *et al*. Recent developments in*in vitro*and*in vivo*models for improved translation of preclinical pharmacokinetics and pharmacodynamics data. **Drug metabolism reviews**, v. 53, n. 2, p. 207–233, 2021.

ZHANG, X. *et al*. Unraveling the regulation of hepatic gluconeogenesis. **Frontiers in endocrinology**, v. 9, 2019.

ZHOU, B. *et al*. Worldwide trends in diabetes prevalence and treatment from 1990 to 2022: a pooled analysis of 1108 population-representative studies with 141 million participants. **Lancet**, v. 404, n. 10467, p. 2077–2093, 2024.

CAPÍTULO II

ESTUDOS *in silico* E *in vitro* DE PEPTÍDEOS ENCONTRADOS NA PEÇONHA DE *Bothrops moojeni*: Seus potenciais antidiabéticos, antioxidantes e vasculares

José Otávio Carvalho Sena de Almeida

José Moreira Tavares Neto

Joyce Lopes Macedo

Bianca Soriano dos Anjos

Mércia Maria Santos Figueredo

Daniel Dias Rufino Arcanjo

RESUMO

As disfunções vasculares representam um dos maiores perigos à saúde das populações e encontrar soluções e terapias para essas condições é fulcral para a sociedade em se considerando o número de indivíduos acometidos. Tais questões que afetam a saúde apresentam uma grande diversidade etiológica e, portanto, é necessário encontrar terapias que tratem dessas diversas origens e de suas causas. Em virtude de se descobrir novas ferramentas no tratamento das doenças cardiovasculares o estudo de peçonhas, venenos, secreções animais e seus derivados se apresenta como uma fonte quase inesgotável de recursos. Dentre estes cabe salientar os peptídeos potencializadores de bradicinina (BPPs) como moléculas de interesse por conta da sua atividade farmacológica. Considerando o que foi expresso anteriormente, o objetivo do trabalho foi de demonstrar os efeitos e a capacidade que três BPPs (BPP-Bm01, BPP-Bax12, BPP-13a) tem sobre o sistema vascular, sobre o sistema antioxidante e sobre os alvos relacionados ao tratamento do diabetes por metodologias *in silico* e/ou *in vitro*. As avaliações *in silico* de ancoragem molecular revelaram que para cada um dos alvos analisados pelo menos um dos peptídeos em estudo conseguiu obter energias de interação mais alta que o respectivo ligante cristalográfico (ou fármaco padrão) do alvo, exceto para o receptor mineralocorticoide. A avaliação *in vitro* dessas substâncias corroborou os achados *in silico* em vista da capacidade vasorelaxante em aorta de ratos (E_{max}: BPP-Bm01 = 37,40 ± 4,88%; BPP-Bax12 = 32,85 ± 2,84% e BPP-13a = 18,34 ± 2,31. pD_2: BPP-Bm01 = 4,68 ± 0,15%; BPP-Bax12 = 4,60 ± 0,09% e BPP-13a = 1,94 ± 0,51.) e regulação do estresse oxidativo causado por altas concentrações de glicose em eritrócitos. Estes achados reforçam a ideia de que tais peptídeos podem ser benéficos para a saúde vascular. Determinando, assim, o potencial desses BPPs sobre os sistemas avaliados e a necessidade de se investigar mais detalhadamente essas moléculas com metodologias mais aprofundadas.

Palavras-chave: Peptídeos vasoativos, reatividade vascular, sistema renina-angiotensina-aldosterona, equilíbrio redox.

1 INTRODUÇÃO

Disfunções cardiovasculares como acidente vascular cerebral, aterosclerose, arteriosclerose e tromboembolismo são alguns dos processos patológicos mais prevalentes no mundo moderno e estão entre as principais causas de morte nas sociedades industrializadas (Martin *et al*., 2024). Das principais formas de patogênese possíveis do sistema cardiovascular tem-se a hipertensão arterial sistêmica, a depleção dos Sistemas Antioxidantes Celulares (SAC) e o diabetes como sendo consideradas entre as mais pertinentes (Martin *et al*., 2024; Conrad *et al*., 2024; Jomova *et al*., 2024). O cerne farmacológico de tratamento dessas envolve principalmente o controle de parâmetros bioquímicos, como as concentrações de íons inorgânicos, glicose e triglicerídeos na corrente sanguínea, e fisiológicos, como o controle da diurese, mecanismos centrais de controle da pressão arterial, vasodilatação direta e outros (Marzà-Florensa *et al*., 2024; Cong *et al*., 2020). Existem diversas maneiras de se regular a pressão arterial e uma das maneiras mais conhecidas e estudadas envolve a via do Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (SRAA). Na clínica médica atual existem as mais variadas classes de medicamentos que buscam atuar sobre pontos regulatórios específicos desta a fim de normalizar a pressão arterial (Ksiazek *et al*., 2024; Ghazi; Drawz, 2017).

Outro quadro que está bastante associado ao surgimento e piora de disfunções vasculares é o diabetes. O diabetes é caracterizado como sendo uma doença metabólica que causa elevação nos níveis séricos de glicose que leva a hiperglicemia, assim como um distúrbio no metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas e uma maior resistência a ação da insulina (Gupta *et al.*, 2024). Indivíduos com diabetes mellitus podem apresentar problemas de visão (retinopatia), doença renal (nefropatia) e lesão neuronal (neuropatias), que são as chamadas complicações microangiopáticas, há, também, risco aumentado de ocorrência das complicações ditas macroangiopáticas, com chances duas a quatro vezes maiores de morte por doença cardíaca, doença vascular periférica (DVP) e doença vascular cerebral (DVC) (Queiroz *et al.*, 2011). Além disso, elevações agudas e crônicas na glicemia capilar podem resultar na liberação de espécies reativas de oxigênio (EROs) durante o diabetes mellitus, enquanto se sugere que o tratamento com antioxidantes pode prevenir ou remediar o surgimento de doenças cardiovasculares durante essa síndrome metabólica (Maiese, 2015).

Peçonhas, venenos e secreções de animais são fontes muito pertinentes de moléculas bioativas e, portanto, a avaliação bem direcionada das mesmas tem muito potencial. Existem diversos estudos na literatura que trabalham com peptídeos bioativos com essa origem

específica e estes possuem as mais variadas atividades farmacológicas como manejo da dor, ação antidiabética, antiparasitária, antimicrobiana, anti-inflamatória, anticâncer e anti-hipertensiva (Díaz-Gómez *et al*., 2024; Oliveira; Soares; Silva, 2023; Ageitos; Torres; Nunez, 2022; Vidya *et al*., 2021). Dessas substâncias cabe salientar os peptídeos vasoativos, em especial os Peptídeos Potencializadores de Bradicinina (BPPs) BPP-Bm01, BPP-Bax12, BPP-13a que já demonstraram capacidade vasorelaxante direta por ensaio de reatividade vascular em artéria aorta de ratos com potencial efeito sobre a enzima Arginino-Succinato Sintase (Costa *et al*., 2024).

Tomando as metodologias *in silico* como amparo se possibilita a determinação das potencialidades desses BPPs sobre sistemas específicos, como SRAA e SAC, além de alvos para o tratamento de doenças como o diabetes, isso permite uma avaliação sem todo o esforço laboral demandado por estudos *in vivo* e garante uma análise abrangente de mecanismos envolvidos no tratamento de doenças e complicações vasculares (Mursal *et al*., 2024; Agu *et al*., 2023). Assim, o presente trabalho buscou avaliar, por meio de ancoragem molecular, três peptídeos encontrados na peçonha de *Bothrops moojeni* sobre alvos que podem interferir de algum modo na saúde vascular e no diabetes, além de avaliar *in vitro* seus efeitos sobre o SAC, sobre a reatividade vascular e os possíveis mecanismos de ação envolvidos.

2 METODOLOGIA

2.1 Metodologias *in silico*

2.1.1 Obtenção e preparação dos alvos e ligantes

O ancoramento molecular foi realizado com alvos farmacológicos envolvidos com o SRAA, SAC e com alvos relacionados ao tratamento do diabetes selecionados a partir da literatura (Ksiazek *et al*., 2024; Jena *et al*., 2023; Le *et al*., 2023; Lu *et al*., 2023; Magno *et al*., 2022; Shen; Zhang, 2022; Fonseca-Correa; Correa-Rotter, 2021; Magalhães *et al*., 2021; Povlsen *et al*., 2020; Karnik *et al*., 2017; Ghazi; Drawz, 2017; Sheikh, 2013; Sola *et al*., 2013; Thornberry; Gallwitz, 2009; Pastromas; Koulouris, 2006; Ashcroft, 1996). Após essa seleção se procedeu com a busca desses mesmos alvos na plataforma Protein Data Bank, alvo(s) relacionados aos sistemas e pertinentes ao estudo que não se encontrassem presentes nesta também foram pesquisados na plataforma Google AlphaFold (Varadi *et al*., 2024; https://alphafold.ebi.ac.uk/).

Após obtenção da estrutura quaternária dos respectivos alvos, estes foram importados no programa Molegro Virtual Docker 6.0 (Bitencourt-Ferreira; De Azevedo, 2019; http://molexus.io/molegro-virtual-docker/) e se prosseguiu com a preparação dessas proteínas por intermédio da remoção das moléculas de água. Demais grupamentos não proteicos que faziam parte do documento de extensão .pdb, como íons inorgânicos e cofatores, foram mantidos. As localizações onde se encontravam fármacos ou ligantes endógenos cristalografados com a respectiva proteína alvo em questão foram consideradas como o sítio de maior relevância farmacodinâmica e esta foi utilizada na ancoragem das moléculas teste. Nos alvos que não apresentavam ligante cristalográfico ideal para definição do sítio para ancoragem se determinou o mesmo pelo cálculo de até cinco cavidades na proteína alvo, foi escolhido o sítio que apresentasse o maior volume de cavidade em virtude do tamanho elevado dos ligantes em estudo. Nesse software quanto mais negativo for o valor da energia de interação calculada, mais favorável é a interação entre ligante e receptor.

Os ligantes utilizados como controles foram obtidos da plataforma PubChem (Kim *et al*., 2021; https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/), enquanto que os peptídeos que estão sendo avaliados foram desenhados no programa ChemSketch 2023.2.3 (Hunter, 1997; https://www.acdlabs.com/resources/free-chemistry-software-apps/chemsketch-freeware/) a partir de sua sequência de aminoácidos, considerando a estereoquímica dos resíduos utilizados na sua síntese. Feito isso, se procedeu com o ancoramento molecular seguindo

configurações que fornecessem uma raiz quadrada do desvio quadrático médio (RMSD) menor que 2 para a molécula controle da respectiva ancoragem (Magalhães *et al*., 2021).

2.2 Metodologia *in vitro*

2.2.1 Animais, aspectos éticos, eutanásia e dissecção

Ratos Wistar machos (*Rattus novergicus*) com peso corporal entre 230-270 g e idade de 3 a 6 meses, provenientes do biotério Central da Universidade Federal do Piauí (UFPI) foram o modelo animal de estudo do trabalho. Estes foram mantidos no Biotério Setorial de Experimentação II, localizado no Departamento de Biofísica e Fisiologia (DBFis/CCS-UFPI) em gaiolas com dieta de manutenção (ração padrão NUVILAB para roedores) e água *ad libitum*. Além disso, foram mantidos em sala climatizada com temperatura ambiente de 25±2 ºC e fotoperíodo de 12 horas de claro/escuro. Todos os procedimentos experimentais foram realizados após prévia submissão e aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFPI processo 478/2018. Os procedimentos seguiram os princípios éticos de acordo com a resolução do 13/2013 – CONCEA (Conselho Nacional de Cuidado e Experimentação Animal).

A eutanásia seguiu o estabelecido na Resolução Normativa CONCEA nº 37 de 22/02/2018, onde os animais foram anestesiados conforme protocolo para roedores, com Tiopental (150 mg/kg i.p). O sangue necessário para avaliação de hematocompatibilidade e estresse oxidativo eritrocitário por hiperglicose *in vitro* foi coletado por punção da veia porta hepática. Em seguida, o segmento aórtico foi dissecado, seccionado em anéis e utilizado para os ensaios de reatividade vascular.

2.2.2 Preparo dos peptídeos

Os BPPs foram obtidos por síntese em fase sólida utilizando uma resina polimérica (2-chlorotrityl-L-Pro-Fmoc) com purificação por cromatografia de alta eficiência de fase reversa seguida por espectrometria de massas e ressonância magnética nuclear de hidrogênio (Costa et al., 2024). A diluição dessas moléculas foi feita em tampão fosfato de sódio pH 7,4 300 mOsm de forma a se produzir diluições seriadas de 10 mM, 1 mM, 100 μM, 10 μM e 1 μM que foram utilizadas nos métodos *in vitro*.

2.2.3 Avaliação da reatividade vascular dos peptídeos

Após a perda do reflexo corneal se realizou uma laparotomia no animal a fim de permitir a coleta dos materiais biológicos e dissecção da porção torácica da artéria aorta. Disso se procedeu com a remoção do tecido perivascular, gordura e tecido conjuntivo da mesma, para então se realizar cortes transversais nesta e se obter os segmentos da aorta com comprimento entre 2,0 a 3,0 mm. Estes anéis foram montados em banho de órgãos sob solução de Krebs (em mM: NaCl, 118.0; KCl, 4.6; $CaCl_2.2H_2O$, 2.5; $MgSO_4.7H_2O$, 5.7; $NaHCO_3$, 25.0; $KH_2PO_4.H_2O$, 1.1; e D-glicose, 11.0) pH 7,4 a 37°C, continuamente aerados com ar atmosférico sob uma tensão de estabilização de 1 gf (Arcanjo *et al.*, 2015). A presença de endotélio funcional foi determinada pelo relaxamento de 70% após a aplicação de acetilcolina (ACh) (10 μM) em segmentos aórticos previamente contraídos com fenilefrina (FEN) (1 μM).

Em anéis de artéria aorta com endotélio funcional e previamente contraídas com FEN 3 μM foram testadas concentrações cumulativas (1 nM, 3nM, 10 nM, 30nM, 100 nM, 300 nM, 1 μM e 10 μM) dos três peptídeos avaliados, BPP-Bm01, BPP-Bax12 e BPP-13a. Curvas concentração-resposta foram construídas com os dados obtidos, desses também se realizou uma regressão não linear a fim de se obter valores para a potência farmacológica (pD_2) e efeito máximo (E_{max}) dessas substâncias. Em virtude de se comparar a ação dos peptídeos montou-se preparações de anéis que, ao invés de receberem os BPPs, simplesmente receberam o veículo das diluições, tampão fosfato de sódio pH 7,4 300 mOsm, nos mesmos intervalos de tempo.

2.2.4 Avaliação da hematocompatibilidade

Todo o procedimento de avaliação da hemocompatibilidade dos peptídeos envolveu a avaliação da razão de hemólise baseado na metodologia de Sæbø *et al.* (2023). Após a coleta do sangue, por punção na veia porta hepática, este foi centrifugado a 3500 rpm por 5 minutos. Com os eritrócitos obtidos dessa centrifugação se realizaram três lavagens com tampão fosfato de sódio 300 mOsm pH 7,4 (PBS). Após as lavagens, parte dos eritrócitos obtidos foram transferidos em volume suficiente de PBS a fim de obter uma suspensão de eritrócitos a 1%. Em 990 μL dessa suspensão se adiciona a 10 μL da solução de peptídeo a ser testada. Para o controle negativo se utilizam 10 μL de eritrócitos e 990 μL de PBS, enquanto que para o controle positivo utilizou-se 10 μL de eritrócitos e 990 μL de Triton-X a 10%. Tendo-se

essas soluções se prosseguiu para a incubação das mesmas em banho-maria a 37°C por 60 minutos. Ao fim desse tempo as amostras foram centrifugadas a 3900 rpm por 5 minutos e então se transfereiu 100 μL do sobrenadante para uma placa de 96 poços para uma posterior avaliação espectrofotométrica a 405 nm. Através de uma relação matemática entre a absorbância da amostra, do controle negativo e do controle positivo é possível obter a razão de hemólise em porcentagem. Cada amostra foi realizada em triplicata e as concentrações de peptídeos testadas foram de 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 μM, 10 μM e 100 μM.

2.2.5 Estresse oxidativo eritrocitário por altas concentrações de glicose

Sangue total foi centrifugado a 1500 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e os eritrócitos lavados com PBS, este processo de lavagem foi então repetido mais duas vezes. As amostras foram preparadas pela adição de 1 mL de eritrócitos em 1 mL do meio de incubação, composto por PBS com albumina de soro bovino (ASB) a 1% (p/v) e glicose a 2% (p/v), por 5 horas a 37 °C sob leve agitação. Já as amostras do grupo controle receberam este meio de incubação sem a adição de glicose. Foram formados grupos de tratamento com aminoguanidina a 50 μM, um conhecido agente antiglicação, e grupos com duas concentrações distintas dos respectivos peptídeos em estudo (50 e 100 μM). Após a incubação os eritrócitos foram centrifugados e lavados com PBS três vezes, disso os eritrócitos obtidos foram aliquotados para realização das análises referentes ao sistema antioxidante (Silva *et al*., 2022; Thornalley, 2003; Hou *et al*., 1998).

2.2.6 Catalase eritrocitária

A determinação da atividade da enzima catalase seguiu o método de Aebi (1984), quantificando a velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O meio de reação foi preparado adicionando-se 0,34 ml de peroxido de hidrogênio à 30% em 100 ml de tampão fosfato de sódio e potássio 50mM pH 7,0. Da amostra de eritrócitos preparou-se um lisado na proporção de 1:5 com água destilada, posteriormente o sobrenadante deste foi diluído na proporção de 1:500, utilizando-se o tampão do meio de reação como diluente. Prepara-se um branco para cada amostra (1 mL da diluição, 0,5 mL de tampão fosfato de sódio e potássio 50 mM pH 7,0) a fim de zerar o espectrofotômetro. Duas leituras espectrofotométricas foram feitas em 240 nm (espectrofotômetro modelo Bioespectro SP220), uma imediatamente após a mistura de 1 mL do lisado diluído junto a 0,5 mL do meio de reação e outra após 30 segundos. Para cálculo da atividade da catalase eritrocitária é

necessário determinar também os valores de hemoglobina das amostras, inicialmente foi preparado um lisado 1:5 com água destilada. Desse lisado 20 µL foram misturados com 5 ml da solução de Drabkin, realizou-se então uma leitura a 540 nm dessa solução e então se calculou a concentração de hemoglobina da amostra. Com todas essas informações se procede com o cálculo da atividade de catalase eritrocitária por miligrama de hemoglobina.

2.2.7 Grupamentos sulfidrila não proteicos

Foram misturados 60 µL dos eritrócitos em 1,8 mL de uma solução estabilizante e hemolisante composta por 450 µM de EDTA e EGTA. Dessa solução, 1800 µL foram acidificados pela adição de 115 µL de TCA 60% (p/v) para precipitação de proteínas presentes na amostra. Disso as amostras foram centrifugadas a 5000 rpm por 5 minutos. Tranfere-se 1800 µL de sobrenadante para um novo eppendorf e se reajusta o pH dessa solução pela adição de 250 µL de TRIS a 2M. Adicionou-se então volume suficiente de uma solução de DTNB, 3 mM em tampão fosfato de potássio 0,2 M pH 6,2, a 1 mL do sobrenadante previamente alcalinizado, de forma a garantir uma concentração final de 10 µM, para então se realizar uma leitura espectrofotométrica a 412 nm em espectrofotômetro modelo Bioespectro SP220. Os valores para a concentração dos grupamentos sulfidrila não proteicos (GSNP) foram obtidos pela correlação linear obtida de uma curva de calibração produzida com soluções seriadas de cisteína no lugar da amostra (Giustarini *et al.*, 2014).

2.2.8 Superóxido Dismutase

Eritrócitos foram diluídos na proporção de 1:6 com Triton – X a 2%. Este lisado foi centrifugado e o sobrenadante foi posteriormente diluído na proporção de 1:200 em água destilada. Apenas 20 µL dessa amostra foram transferidos para micro-placa de 96 poços e sobre estas se adicionou 80 µL do meio de reação composto por PBS, pirogalol 0,2 mM e MTT a 5 mg/mL (66:10:4). O branco e o padrão do experimento são produzidos da seguinte forma. Branco: 96 µL do PBS e 4 µL de MTT. Padrão: 86 µL do PBS, 10 µL de pirogalol e 4 µL de MTT. Disso se realizou a incubação em banho maria por 5 minutos a 37° C. Após esse período se interrompe a reação pela adição de 100 µL de dimetil sulfóxido (DMSO) e realiza-se uma leitura espectrofotométrica em espectrofotômetro Glomax® Discover Microplate Reader a 560 nm. Para o cálculo do resultado considera-se que uma unidade de SOD (USOD) é capaz de evitar a autoxidação de 50% de pirogalol do padrão. O resultado será expresso em

unidades de atividade da SOD por μL de eritrócito e em unidades de SOD por mg de tecido (Furtado *et al*., 2022).

2.2.9 Análise Estatística

Valores foram expressos como média mais ou menos o erro padrão da média. Os dados de pD_2 e E_{max} foram obtidos a partir da regressão não-linear dos dados obtidos na reatividade vascular. Para as análises previamente mencionadas e para as análises antioxidantes em eritrócitos se utilizou o teste estatístico de análise de variância de uma via com pós-teste de Bonferroni. Para os dados obtidos de vasorelaxamento se realizou análise de variância de duas vias com o mesmo pós-teste utilizado na análise previamente descrita. Foi considerada diferença estatística significativa para valores de p inferiores a 0,05 nos testes realizados.

3 RESULTADOS

3.1 Ancoragem molecular *in silico* com alvos do Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona

Os resultados para a energia de interação entre os alvos e os ligantes pelo método de ancoragem molecular estão apresentados na Tabela 3. Obteve-se para os receptores Enzima Conversora de Angiotensina (ECA), Renina, e Receptor de Angiotensina 1 (AT1R) energia de interação mais negativa com os peptídeos em estudo do que com suas respectivas moléculas controle. Já para Receptor de Angiotensina 2 (AT2R), Receptor de Bradicinina 2 (B2R), enzima Carboxipeptidase M, e Receptor Mas (MasR) apenas uma ou duas moléculas teste atingiram valores ligeiramente mais negativos que os respectivos controles. Já para o Receptor Mineralocorticoide (MR) notou-se que todas as moléculas obtiveram interações sensivelmente menos favoráveis com o alvo da espironolactona, fármaco padrão do alvo em questão.

Tabela 3 - Alvos e ligantes relacionados ao SRAA e suas respectivas energias de interação por ancoragem molecular *in silico*.

Alvo	Ligante	Energia de interação(kcal/mol)
ECA (Corradi *et al*., 2006)	Lisinopril	-159,953
	BPP-Bm01	-212,825*
	BPP-Bax12	-177,754*
	BPP-13a	-267,128*
Renina (Rahuel *et al*., 2000)	Alisquireno	-142,011
	BPP-Bm01	-201,987*
	BPP-Bax12	-165,755*
	BPP-13a	-227,968*
Receptor mineralocorticoide (Hasui *et al*., 2011)	Espironolactona	-161,436
	BPP-Bm01	-61,392
	BPP-Bax12	-18,403
	BPP-13a	-53,687
Receptor AT1 (Zhang *et al*., 2015)	Olmesartana	-145,382
	BPP-Bm01	-205,033*
	BPP-Bax12	-177,738*
	BPP-13a	-222,367*

	Composto 1	-205,935
Receptor AT2 (Zhang *et al*., 2017)	BPP-Bm01	-182,704
	BPP-Bax12	-154,607
	BPP-13a	-209,993*
	Bradicinina	-169,574
Receptor B2 (Shen *et al*., 2022)	BPP-Bm01	-203,026*
	BPP-Bax12	-168,093
	BPP-13a	-209,934*
	Bradicinina	-181,335
Carboxipeptidase M (Reverter *et al*., 2004)	BPP-Bm01	-175,657
	BPP-Bax12	-169,460
	BPP-13a	-195,741*
	Ang-(1-7)	-170,941
Receptor Mas (Google AlphaFold)	BPP-Bm01	-173,150*
	BPP-Bax12	-157,810
	BPP-13a	-158,599

Nota: (*): Valor de energia de interação mais negativo que aquele da respectiva molécula controle; (Composto 1): N-benzyl-N-(2-ethyl-4-oxo-3-{[2'-(2H-tetrazol-5-yl)[1,1'-biphenyl]-4-yl]methyl}-3,4-dihydroquinazolin-6-yl)thiophene-2-carboxamide é um agonista do receptor AT2.
Fonte: Autoria própria.

3.2 Ancoragem molecular *in silico* com alvos do Sistema Antioxidante Celular

Para todos os alvos do SAC estudados houve uma maior energia de interação entre os peptídeos estudados do que entre a molécula controle, a (+)-Catequina (Cianidol). As energias de interação estão descritas na Tabela 4.

Tabela 4 - Alvos e ligantes relacionados ao SAC e suas respectivas energias de interação por ancoragem molecular *in silico*.

Alvo	Ligante	Energia de interação(kcal/mol)
Catalase Eritrocitária (Putnam *et al*., 2000)	Catequina	-91,082
	BPP-Bm01	-235,454*
	BPP-Bax12	-251,164*
	BPP-13a	-273,503*
γ-Glutamilcisteina Sintase (Hibi *et al*., 2004)	Catequina	-92,311
	BPP-Bm01	-232,460*

	BPP-Bax12	-199,357*
	BPP-13a	-244,024*
	Catequina	-80,841
Glutationa Sintase (Matsuda *et al*., 1996)	BPP-Bm01	-162,927*
	BPP-Bax12	-191,480*
	BPP-13a	-236,597*
	Catequina	-107,099
Glutationa Redutase (Savvides e Kraplus, 1996)	BPP-Bm01	-241,597*
	BPP-Bax12	-192,366*
	BPP-13a	-241,813*
	Catequina	-63,351
Glutationa Peroxidase 5 (Kavanagh *et al*., 2006)	BPP-Bm01	-166,173*
	BPP-Bax12	-142,345*
	BPP-13a	-175,067*
	Catequina	-115,556
Superóxido Dismutase Cu/Zn (Strange *et al*., 2003)	BPP-Bm01	-220,001*
	BPP-Bax12	-259,546*
	BPP-13a	-222,521*
	Catequina	-77,258
Superóxido Dismutase Mn (Zhang *et al*., 2023)	BPP-Bm01	-194,042*
	BPP-Bax12	-205,421*
	BPP-13a	-213,589*

Nota: (*): Valor de energia de interação mais negativo que aquele da respectiva molécula controle.
Fonte: Autoria própria.

3.3 Ancoragem molecular *in silico* com alvos relacionados ao tratamento do diabetes

Dentre os alvos avaliados se notou que todos, com exceção do receptor de insulina, demonstravam interação mais elevadas com os peptídeos em estudo do que com as moléculas padrão de acordo com o exposto na Tabela 5.

Tabela 5 - Alvos e ligantes relacionados ao tratamento do diabetes e suas respectivas energias de interação por ancoragem molecular *in silico*.

Alvo	Ligante	Energia de interação(kcal/mol)
Co-transportador de sódio e glicose do tipo 2 (Niu *et al*., 2022)	Empaglifozina	-169,566
	BPP-Bm01	-217,892*
	BPP-Bax12	-203,740*
	BPP-13a	-225,527*
Receptor de GLP-1 (Griffith *et al*., 2022)	*Pequeno agonista*	-212,855
	BPP-Bm01	-230,399*
	BPP-Bax12	-211,159
	BPP-13a	-246,877*
Receptor de sulfoniluréia do tipo 1 (Martin *et al*. 2019)	Repaglinida	-153,169
	BPP-Bm01	-255,829*
	BPP-Bax12	-198,964*
	BPP-13a	-228,668*
Dipeptidil peptidase 4 (Pissarnitski *et al*., 2016)	Sitagliptina	-124,874
	BPP-Bm01	-223,720*
	BPP-Bax12	-172,622*
	BPP-13a	-210,796*
Receptor de Insulina (Uchikawa *et al*., 2019)	Insulina	-759,698
	BPP-Bm01	-141,586
	BPP-Bax12	-130,217
	BPP-13a	-162,324
Receptor ativado por proliferador de peroxissoma γ (Liberato *et al*., 2012)	Rosiglitazona	-136,052
	BPP-Bm01	-177,948*
	BPP-Bax12	-190,968*
	BPP-13a	-170,552*

Nota: (*): Valor de energia de interação mais negativo que aquele da respectiva molécula controle; (Pequeno agonista): ácido 2-[(4-{6-[(2,4-difluorophenyl) methoxy] pyridin-2-yl} piperidin-1-yl) methyl]-1-[(1-ethyl-1H-imidazol-5-yl) methyl]-1H-benzimidazole-6-carboxílico é um agonista do receptor de GLP-1.
Fonte: Autoria própria.

3.4 Avaliação da hemocompatibilidade

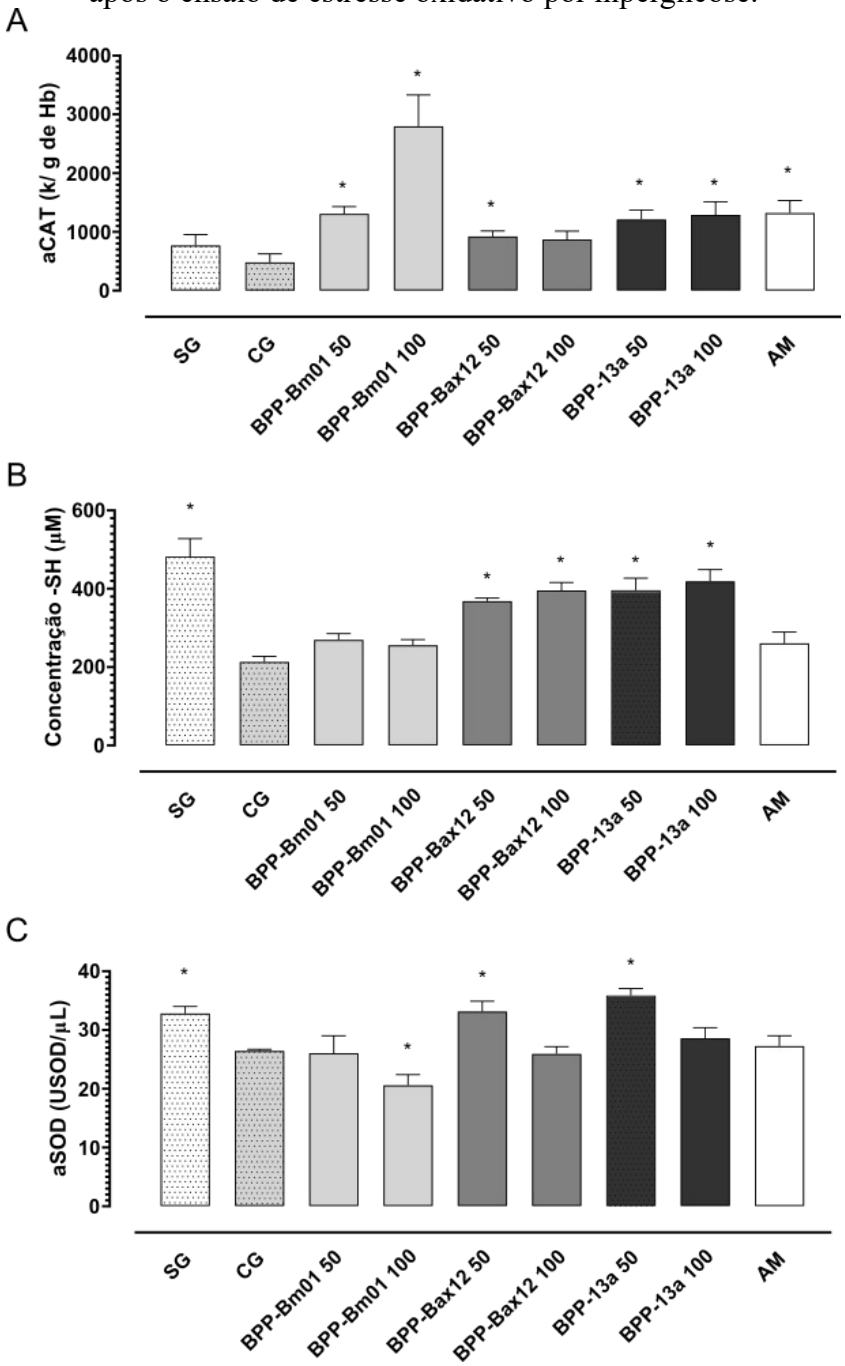
Previamente a realização dos estudos de estresse oxidativo eritrocitário por hiperglicose, os BPPs foram avaliados quanto a sua hemocompatibilidade e em nenhuma das concentrações testadas (1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 μM, 10 μM e 100 μM) se observou

hemólise. Tal achado fornece segurança suficiente para se prosseguir com análises envolvendo eritrócitos.

3.5 Sistema antioxidante eritrocitário *in vitro*

As análises *in vitro* de eritrócitos expostos ao estresse oxidativo por hiperglicose evidenciaram o que está exposto na Figura 4. Todos os grupos teste para atividade da catalase apresentaram-se significativamente elevados quando em comparação com o grupo controle com glicose (CG), com exceção para o grupo controle sem glicose (SG) e o grupo que foi trado com o peptídeo BPP-Bax12 a 100 μM. Para a análise de GSNP todos os grupos teste, exceto o grupo controle aminoguanidina a 50 μM (AM) e os grupos do peptídeo BPP-Bm01 a 50 e 100 μM, apresentaram elevação significativa desses parâmetros quando em comparação com o grupo CG. Para a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) percebe-se que houve aumento significativo da atividade dessa enzima quando em comparação com o grupo CG para os grupos SG, para os grupos BPP-Bax12 e BPP-13a a 50 μM, cabe salientar que para o grupo BPP-Bm01 a 100 μM houve uma redução significativa quando em comparação com o grupo CG.

Figura 4 - Dados obtidos para a atividade da enzima catalase, concentrações de grupamentos sulfidrila não proteicos e atividade da enzima superóxido dismutase em eritrócitos de ratos após o ensaio de estresse oxidativo por hiperglicose.



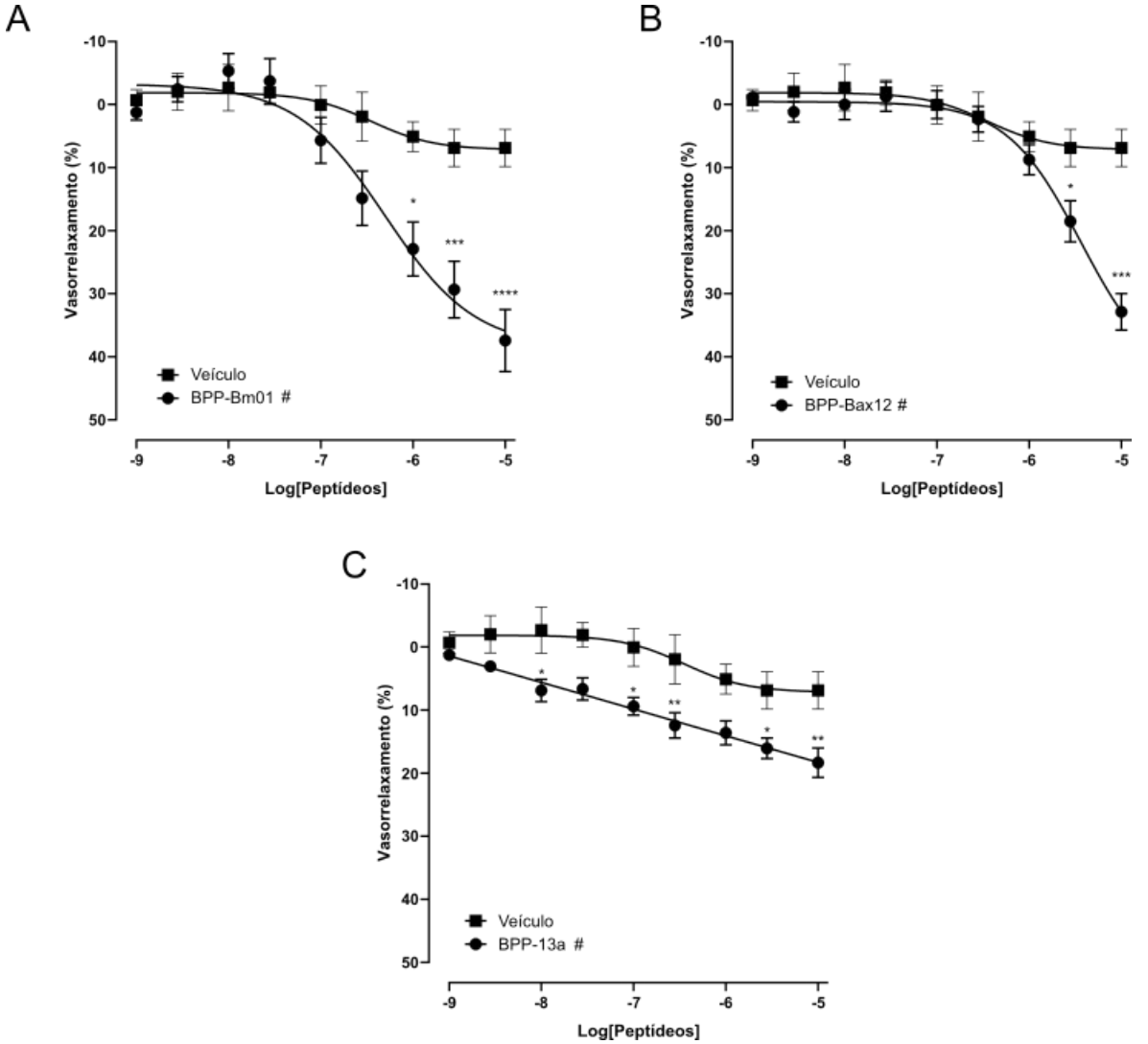
Nota: A: Gráfico da atividade da enzima catalase, valores expressos em atividade da enzima por miligrama de hemoglobina; B: Gráfico da concentração de grupos sulfidrila não proteicos, valores expressos em concentração em µM de grupamentos sulfidrila (-SH); C: Gráfico da enzima superóxido dismutase, valores expressos em atividade da enzima por µL de amostra; SG: Grupo incubado em PBS com 1% de ASB; CG: Grupo incubado em PBS com 1% de ASB, 2% de glicose; BPP-Bm01 50: Grupo incubado em PBS com 1% de ASB, 2% de glicose e 50 µM de BPP-Bm01; BPP-Bm01 100: Grupo incubado em PBS com 1% de ASB, 2% de glicose e 100 µM de BPP-Bm01; BPP-Bax12 50: Grupo incubado em PBS com 1% de ASB, 2% de glicose e 50 µM de BPP-Bax12; BPP-Bax12 100: Grupo incubado em PBS com 1% de ASB, 2% de glicose e 100 µM de BPP-Bax12; BPP-13a 50: Grupo incubado em PBS com 1% de ASB, 2% de glicose e 50 µM de BPP-13a; BPP-13a 100: Grupo incubado PBS com 1% de ASB, 2% de glicose e 100 µM de BPP-13a; AM: Grupo incubado em PBS com 1% de ASB, 2% de glicose e 50 µM de Aminoguanidina. (a): Diferença significativa entre o respectivo grupo e CG ($p<0,05$).

Fonte: Autoria própria.

3.6 Efeito dos peptídeos sobre a reatividade vascular

Ao se comparar as curvas concentração-resposta dos peptídeos em estudo com os efeitos causados pelo veículo se verificam diferenças significativas, assim como para os valores de efeito máximo para todos os peptídeos em estudo quando comparados com o veículo. Cabe salientar que o efeito máximo obtido para BPP-Bm01 e BPP-Bax12 foram semelhantes entre si, enquanto que o BPP-13a obteve um valor inferior ao dos outros dois para esse parâmetro. Em relação a potência farmacológica sobre o parâmetro de vasorelaxamento direto nota-se que BPP-13a é menos potente que os outros dois BPPs e que nenhuma das moléculas em estudo apresentou diferença com o veículo (Figura 5 e 6).

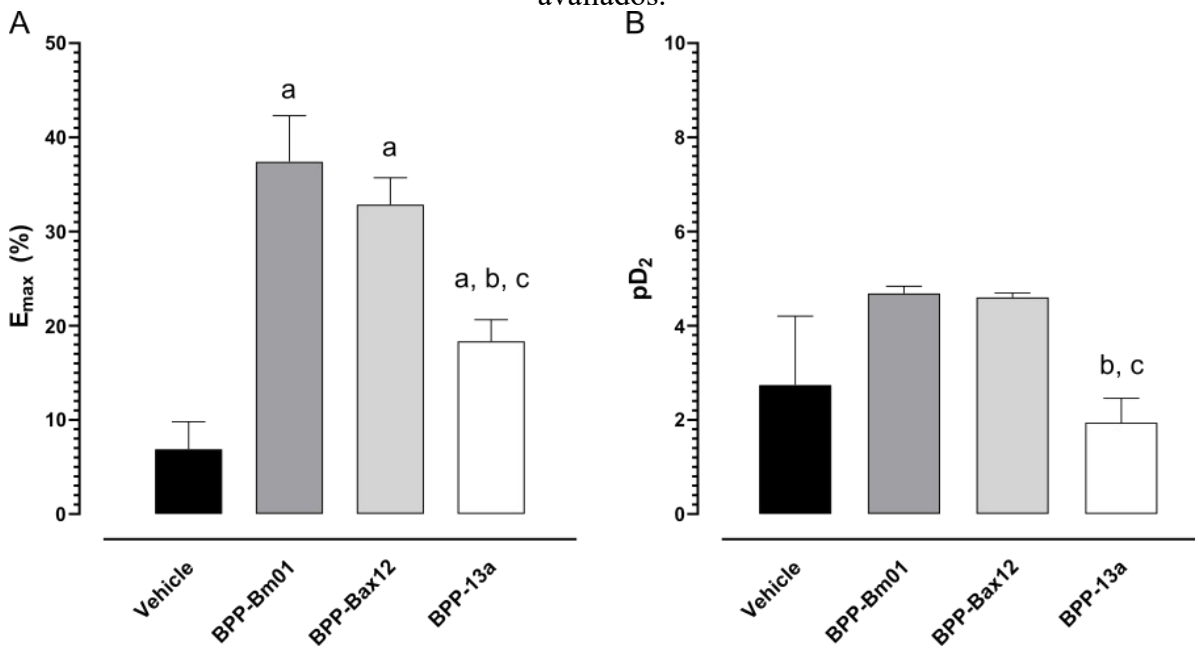
Figura 5 - Representações gráficas do vasorelaxamento mediado pelos peptídeos em ensaio de reatividade vascular em anéis de artéria aorta de ratos com endotélio funcional.



Nota: A: Comparação gráfica do vasorelaxamento mediado pelo peptídeo BPP-Bm01 e o veículo; B: Comparação gráfica do vasorelaxamento mediado pelo peptídeo BPP-Bax12 e o veículo; C: Comparação gráfica do vasorelaxamento mediado pelo peptídeo BPP-B13a e o veículo; (#): diferença com o veículo ($p<0,0001$); (*): diferença ponto a ponto com a curva veículo ($p<0,05$); (**): diferença ponto a ponto com a curva veículo ($p<0,01$); (***): diferença ponto a ponto com a curva veículo ($p<0,001$); (****): diferença ponto a ponto com a curva veículo ($p<0,0001$).

Fonte: Autoria própria.

Figura 6 - Dados de E_{max} e pD_2 obtidos a partir da regressão não linear das curvas concentração-resposta do ensaio de reatividade vascular para cada um dos peptídeos avaliados.



Nota: A: Gráfico com os dados de E_{max}; B: Gráfico com os dados de pD_2; (a): diferença significativa com o grupo veículo ($p<0,01$); (b): diferença significativa com o grupo BPP-Bm01 ($p<0,01$); (c): diferença significativa com o grupo BPP-Bax12 ($p<0,001$).
Fonte: Autoria própria.

4 DISCUSSÃO

4.1 Ancoragem molecular *in silico* com alvos do Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona

O SRAA exerce sua função a partir da ação de várias enzimas, hormônios e receptores. Sendo um sistema bastante regulado em que disrupções específicas sobre as moléculas que participam desses sistema pode alterar vários parâmetros, em especial a recaptação de sódio (Na^+) e água, e estes acabam por controlar a pressão arterial (Ksiazek *et al*., 2024; Shen; Zhang, 2022; Povlsen *et al*., 2020; Karnik *et al*., 2017; Ghazi; Drawz, 2017).

Resumidamente tem-se que a redução da pressão arterial é percebida pelas células renais justaglomerulares que expressam a renina, enzima essa responsável pela conversão do Angiotensinogênio em Angiotensina I (AT1). A AT1 é convertida a Angiotensina II (AT2) por intermédio da ECA nos pulmões. Este produto desenvolve sua ação por intermédio da interação sobre as glândulas suprarrenais e as estimula a liberar Aldosterona. Este hormônio suprarrenal atua sobre as células do ducto coletor cortical através do MR e causa maior retenção de sódio e água no organismo. A retenção dessas substâncias leva ao aumento da pressão arterial e o organismo retorna ao seu equilíbrio (Ksiazek *et al*., 2024; Shen; Zhang, 2022; Povlsen *et al*., 2020; Karnik *et al*., 2017; Ghazi; Drawz, 2017). Dessa descrição do sistema já é possível determinar os alvos farmacológicos mais pertinentes que controlam de alguma forma a pressão arterial, entre eles tem-se a Renina, a ECA, o AT1R e o MR. Os dados de ancoragem molecular demonstram que os peptídeos em estudo apresentam elevada interação para todos, exceto MR (Tabela 3). A razão de se observar uma interação não favorável provavelmente tem relação com o volume muito reduzido da cavidade do sítio ortostérico do receptor, assim, a incompatibilidade entre o tamanho do sítio e o tamanho dos ligantes em estudo provavelmente dificulta a interação.

Cabe salientar que a AT2 age também sobre os AT2R que são conhecidamente responsáveis por ações envolvendo a redução da pressão arterial, que envolvem a via do óxido nítirico/ monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) e ativação da óxido nítrico sintase por quinases (Shen; Zhang, 2022; Fatima; Patel; Hussaim, 2021; Carey, 2016). Percebe-se que apenas o peptídeo BPP-13a apresentou energia de interação comparável ao controle. A AT2 pode ainda ser degradada em angiotensina-(1-7) pela ECA2 e este produto de degradação por sua vez pode atuar sobre o MasR, conhecido por atividades vasorelaxantes, antiproliferativas, anti-fibrose e antioxidante (Povlsen *et al*., 2020; Karnik *et al*., 2017). Note-se que apenas

BPP-Bm01 apresentou energia de interação similar ao controle e isso pode ser um indicativo de interação *in vivo* com o receptor.

A respeito de vias paralelas ao SRAA e que podem desenvolver certo controle sobre esta se tem o Sistema Calicreina-Cinina (SKK). Este pode ser resumido da seguinte forma. O fígado sintetiza e libera na corrente sanguínea o Cininogêneo de Alto peso molecular (HK), a molécula da bradicinina é liberada do HK por mediação da Calicreina Plasmática (PK). Estando na corrente sanguínea, a bradicinina é capaz de atuar sobre vários receptores farmacológicos de interesse, entretanto, por conta da ação de enzimas como a ECA2 e a Carboxipeptidase M, a sua meia-vida no organismo é curta e isso impede o desenvolvimento de sua ação. Portanto para que a bradicinina exerça seus efeitos é necessário analisar substâncias que prolonguem sua meia-vida através da inibição das enzimas que a degradam, substâncias ditas potencializadoras de bradicinina. Parte da ação anti-hipertensiva desse peptídeo endógeno ocorre mediante a ativação de Receptores de Bradicinina 2 (B2R), nas células endoteliais estes causam a ativação da óxido nítrico sintase o que leva a liberação de óxido nítrico e eventualmente vasorelaxamento (Shen; Zhang, 2022). Salienta-se, então, as funções da carboxipeptidase M e do B2R, e se observa que os peptídeos em estudo tem uma interação boa com os alvos, principalmente com B2R (Tabela 3). Uma vez que a resposta de um agosnista sobre B2R no leito vascular mesentério e aórtico de ratos é o vasorelaxamento (Siltari; Korpela; Vapaatalo, 2016; Wirth *et al*., 1996) e que os peptídeos em estudo já mostraram atividade vasorelaxante em modelo de reatividade vascular de aorta (Costa *et al*., 2024), sugere-se que estes possam atuar por essa via de resposta.

4.2 Ancoragem molecular *in silico* com alvos do Sistema Antioxidante Celular

O SAC atua a partir da presença de algumas substâncias e da atividade de certas enzimas. Resumidamente tem-se que Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), em especial ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), são neutralizadas pela ação das enzimas SOD tanto no citoplasma como nas mitocôndrias. Entretanto, o produto dessa neutralização, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ainda é deletério em concentrações muito elevadas e precisa ser decomposto em substâncias menos reativas. Deste ponto a via pode seguir duas rotas, a primeira delas envolve a enzima Glutationa Peroxidase (GPx) que decompõe o H_2O_2 em oxigênio e água as custas de duas moléculas de Glutationa (GSH) formando a Glutationa dissulfeto (GSSG). Compreendendo o GSH como uma espécie de molécula sacrificial é interessante avaliar as enzimas envolvidas na sua síntese, entre elas a γ-Glutamil-cisteína sintase, a Glutationa

sintase e a Glutationa redutase. Já a segunda rota envolve a degradação do H_2O_2 em água e oxigênio pela enzima catalase (Jena *et al*., 2023).

Sobre a avaliação do SAC os peptídeos em estudo obtiveram energias de interação consideravelmente mais altas que a molécula controle para todos os alvos estudados *in silico* (Tabela 4) e isso pode ser muito importante a depender do tipo de resposta mediada nos sistemas de avaliação *in vivo* discutidos mais a frente.

4.3 Ancoragem molecular *in silico* com alvos relacionados ao tratamento do diabetes

A inibição de SGLT2, a ativação de receptores de GLP-1, a inibição de canais de potássio nas células beta pancreáticas (β-PCs), a inibição da enzima DPP-4, a ativação de receptores de insulina e a ativação de PPARγ são fatores que regulam a glicemia capilar (Le *et al*., 2023; Lu *et al*., 2023; Fonseca-Correa; Correa-Rotter, 2021; Campbell; Newgard, 2021; Arneth; Arnteth; Shams, 2019; Fu; Gilbert; Liu, 2013; Sheikh, 2013; Sola *et al*., 2013; Thornberry; Gallwitz, 2009; Pastromas; Koulouris, 2006; Ashcroft, 1996). E ao se avaliar a energia de interação desses alvos com os peptídeos se encontrou valores de energia mais reduzidos do que aqueles obtidos para as moléculas cristalográficas, com exceção do IR. Estes dados são positivos pois sugerem uma ação antidiabética dessas substâncias por uma multitude de mecanismos reconhecidos na terapêutica usual do diabetes. Entretanto, diferentemente de outros peptídeos obtidos a partir de venenos animais, BPP-Bm01, BPP-Bax12 e BPP-13a não apresentaram interação com o IR, isso se dá muito provavelmente por conta dessas substâncias não apresentarem uma sequência de aminoácidos específica da cadeia B da insulina, não sendo possível, dessa forma, determinar uma interação adequada entre esse alvo e os ligantes do teste (Guo et al., 2024; Ahorukomeye et al., 2019).

A eventual ação sobre alvos eficazes no tratamento do diabetes sugere que, além da atuação sobre SRAA, os peptídeos podem ser benéficos para a saúde vascular por sua possível capacidade em mediar a glicemia. Indicando que, em indivíduos diabéticos, seus prováveis efeitos sobre a regulação metabólica podem ser positivos para a saúde vascular.

4.4 Sistema antioxidante eritrocitário

O metabolismo eritrocitário é um fator essencial para o entendimento do quadro oxidativo dessas células, isso se dá porque a maior parte da energia consumida por esse tipo celular é produzido pela glicólise (D'Alessandro *et al*., 2023). Essa via de obtenção de energia

em condições normais não costuma produzir tantos EROs ou radicais livres, entretanto em condições com altas concentrações de glicose a via da glicólise passa a manifestar de forma mais intensa sua inter-relação com vias aberrantes (via da proteína quinase C, via dos poliois, via da hexosamina e etc.) de consumo e metabolismo desse carboidrato que envolvem a formação significativa de EROs (González *et al*., 2023). Com os dados obtidos para essas análises é possível perceber que o estresse oxidativo causado pelo meio rico em glicose foi capaz de induzir por si só mudanças em apenas dois dos três parâmetros estudados, GSNP e atividade da SOD (Figura 4), muito provavelmente mediado pela ativação dessas vias aberrantes do metabolismo da glicose.

Apesar de não se ter o meio rico em glicose como um fator determinante de alteração na atividade da catalase se demonstrou algo muito pertinente, para todos os grupos incubados com os peptídeos, exceto para BPP-Bax12 a 100 μM, houve aumento significativo da atividade dessa enzima. O aumento desta está correlacionado com a maior degradação do H_2O_2 intracelular, substância que apresenta efeitos deletérios aos sistemas orgânicos quando em concentrações elevadas (Daryabor *et al*., 2020; Tehrani; Moosavi-Movahedi, 2018). Portanto, ao comparar os dados obtidos na ancoragem molecular com os resultados obtidos para a catalase eritrocitária, pode-se sugerir que a ancoragem é um bom método preditivo para a interação dos peptídeos em estudo com a respectiva enzima nesse modelo de estresse oxidativo por hiperglicose. Isso pode ser justificado por conta das energias de interação obtidas na ancoragem para os peptídeos de maneira concomitante ao aumento da atividade da catalase eritrocitária (Tabela 4 e Figura 4). Com esses dois resultados é possível sugerir que a interação *in silico* está associada a um processo de indução enzimática *in vitro* quando em concentrações elevadas de glicose, entretanto ainda não se pode sugerir o mesmo em condições normais. Esse processo de indução enzimática pode ser interessante considerando a função fisiológica da enzima e a regulação das concentrações de H_2O_2.

A avaliação de GSNP é uma forma indireta de se avaliar as concentrações de glutationa (GSH). Esta por si atua de maneira sacrificial, sendo oxidada a glutationa dissulfeto (GSSG) e permitindo que moléculas importantes da maquinaria celular não sejam afetadas por espécies reativas e venham a perder a sua função. Altas concentrações de glicose por cinco horas em eritrócitos levaram à queda dos níveis de GSNP e portanto de GSH. Isso sugere que as altas concentrações de glicose levaram a formação de EROs e H_2O_2. Este último, por a ação da enzima GPX, reagiria com o GSH presente nas células eritrocitárias o que levaria a uma redução da sua concentração. Quando na presença de BPP-Bax12 e BPP-13a, em ambas as concentrações estudadas, verifica-se que não houve uma redução das concentrações de GSNP

e isso pode sugerir o seguinte: (1) Os próprios peptídeos podem impedir de alguma forma a produção de EROs e H_2O_2 que levam ao consumo do GSH ou de alguma forma sequestrar os mesmos; (2) Os peptídeos atuam sobre os sistemas enzimáticos de síntese e reciclagem de GSH.

A primeira hipótese é pertinente uma vez que já se notou que os peptídeos foram capazes de aumentar a atividade enzimática da catalase, responsável pra lise do H_2O_2, além de também aumentar a atividade da SOD, responsável pela dismutação de ânion superóxido. Como é indicado por Juan *et al*. (2021), peptídeos são sensíveis à degradação oxidativa tanto pela oxidação de resíduos amino, como clivagem de ligações peptídicas e pela agregação entre as proteínas. Isso sugere que também é possível haver um conjunto de reações que envolvam o sequestro de EROs e H_2O_2 por parte dos peptídeos presentes.

Analisando a segunda hipótese levantada tem-se que os peptídeos, em especial BPP-Bax12 e BPP-13a, poderiam agir sobre as enizmas γ-Glutamilcisteina Sintase, Glutationa Redutase, Glutationa Sintase, e GPx a fim de manter as concentrações de GSH elevadas. Comparando esses dados com as análises *in silico* é possível considerar que provavelmente existe uma correlação (Tabela 4). De qualquer modo esses dados mostram que os peptídeos conseguiram de certa forma mediar a respostar estressora do meio rico em glicose.

Ao analisar a atividade da SOD para os BPPs se percebeu uma atividade maior nos grupos com as menores concentrações. Esse é um padrão um tanto incomum já que se espera que as respostas às moléculas bioativas, como os peptídeos em questão, seja diretamente proporcional a sua concentração. Isto pode ter relação com o chamado efeito de hormese em que, segundo Bondy (2023), moléculas levemente estressoras passam a causar efeitos deletérios em concentrações mais elevadas e, entretanto, em concentrações mais baixas passam a causar efeitos benéficos através de uma forma de pré-condicionamento ao estresse. Tal efeito é observado, como descrito anteriormente, em moléculas levemente estressoras e esse poderia ser o caso desses peptídeos obtidos a partir da peçonha da jararaca. A análise de ancoragem dos peptídeos com a SOD também revelou que há interação entre ambos, analisando esses dados conjuntamente se pode concluir que a interação favoreceria a indução enzimática de forma preferencial em concentrações mais baixas.

A metodologia de indução de estresse oxidativo mediado por glicose se mostrou capaz de induzir alterações para dois dos três parâmetros avaliados e a presença de peptídeos durante a incubação também foi capaz de promover alterações positivas nos três parâmetros. Isto evidencia mais claramente os eventuais benefícios desses peptídeos sobre a saúde

vascular, que é bastante sensível a alterações no SAC, além da capacidade desses em mediar efeitos pró-oxidantes causados por um quadro diabético.

4.5 Efeito dos peptídeos sobre a reatividade vascular

Existem diferenças significativas com as curvas concentração-resposta do peptídeos e a resposta do veículo. Já existem, na literatura, informações acerca da capacidade vasodilatadora de outros peptídeos ricos em prolina envolvendo a via do óxido nítrico/guanilil ciclase/monofosfato cíclico de guanosina (NO/GC/GMPc) e a atividade de indução da enzima Arginino-Succinato-Sintase (Costa et al., 2024; Nunes *et al*., 2018; Arcanjo *et al*., 2015). É bem possível que as moléculas estudadas no presente trabalho também atuem sobre tais vias.

Apesar do vasorelaxamento desenvolvido pelas moléculas em estudo não abolir completamente a contração causada pela FEN se percebe que estas desenvolvem uma resposta de eficácia similar a outros peptídeos de origem animais (Savergnini *et al*., 2010; Verano-Braga et al., 2008). Apesar de a maioria deles ter este tipo de resposta, a ação anti-hipertensiva não necessariamente é mediada apenas pela vasodilatação causada pela interação com a AsS, mas envolve também a potencialização de bradicinina, efeitos centrais no controle da pressão, melhora na função renal com aumento da excreção de água e sódio, e alteração nas concentrações intracelulares de cálcio (Péterfi *et al*., 2019). Isto é promissor uma vez que as avaliações *in silico* realizadas sugerem que existem outros possíveis alvos que expliquem a resposta vasodilatadora, em especial a alta energia de interação caulculada entre os ligantes e os alvos AT1R, AT2R, receptor B2 e receptor Mas (Tabela 3).

A simples resposta sobre o leito vascular não pode ser desatrelada a priori do desenvolvimento de uma resposta tóxica, entretanto notou-se que os valores obtidos de pD_2 para os BPPs, apesar de serem baixos, estavam na casa de concentrações em que não desenvolveram respostas tóxicas em eritrócitos como visto nos testes de avaliação da hemocompatibilidade. Uma vez que as vias parenterais são as mais recomendadas para os peptídeos, a ausência de hemotoxicidade nessas concentrações permite o entendimento de que tais moléculas são boas candidatas a administração por estas vias.

5 CONCLUSÃO

O trabalho foi bem-sucedido em avaliar, por meio de ancoragem molecular, as possíveis interações entre alvos do SRAA, do SAC e do tratamento do diabetes e os peptídeos BPP-Bm01, BPP-Bax12 e BPP-13a. Estes achados sugerem mecanismos de ação para o controle da pressão arterial, regulação da atividade de enzimas antioxidantes e controle glicêmico. A avaliação *in vitro* dessas substâncias consolidou os achados *in silico* com a observação de capacidade vasorelaxante direta e regulação do estresse oxidativo causado por altas concentrações de glicose em eritrócitos. Estes achados reforçam a ideia de que tais peptídeos podem ser benéficos para a saúde vascular. Como perspectiva futura se tem-se a necessidade de realização de análises *in vitro* que corroborem o potencial antidiabético apresentado neste trabalho, como, por exemplo, análises de inibição de enzimas alfa amilase e DPP-4 ou até mesmo ensaios de liberação de insulina, a fim de se avançar com o estudo *in vivo* dessas substâncias. Em suma, são evidentes o potencial desses BPPs sobre os sistemas avaliados e a necessidade de aprofundamento no estudo dessas moléculas com metodologias mais pertinentes.

6 REFERÊNCIAS

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 121-126, 1984.

AGEITOS, L.; TORRES, M. D. T.; NUNEZ. C. F. Biologically Active Peptides from Venoms: Applications in Antibiotic Resistance, Cancer, and Beyond. **Int. J. Mol. Sci**. v. 23, 2022.

AGU, P. C.; AFUKWA, C. A.; ORJI, O. U.; EZEH, E. M.; OFKE, I. H.; OGBU, C. O.; UGWUJA, E. I.; AJA, P. M. Molecular docking as a tool for the discovery of molecular targets of nutraceuticals in diseases management. **Sci. Rep**. v. 13, 2023.

AHORUKOMEYE, P. *et al*. Fish-hunting cone snail venoms are a rich source of minimized ligands of the vertebrate insulin receptor. **eLife**, v. 8, 2019.

ARCANJO, D. D. R. *et al*. A novel vasoactive proline-rich oligopeptide from the skin secretion of the frog Brachycephalus ephippium. **PLoS One**, v. 10, n. 12, p. e0145071, 2015.

ARNETH, B.; ARNETH, R.; SHAMS, M. Metabolomics of type 1 and type 2 diabetes. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 10, p. 2467, 2019.

ASHCROFT, F. Mechanisms of the glycaemic effects of sulfonylureas. **Hormone and metabolic research**, v. 28, n. 09, p. 456–463, 1996.

BITENCOURT-FERREIRA, G.; DE AZEVEDO, W. F., Jr. Molegro Virtual Docker for docking. **Methods in molecular biology**, v. 2053, p. 149–167, 2019.

BONDY, S. C. The Hormesis Concept: Strength and Shortcomings. **Biomolecules**. v. 13, 2023.

CAMPBELL, J. E.; NEWGARD, C. B. Mechanisms controlling pancreatic islet cell function in insulin secretion. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 22, n. 2, p. 142–158, 2021.

CAREY, R. M. AT2 receptors: Potential therapeutic targets for hypertension. **American journal of hypertension**, v. 30, n. 4, p. 339–347, 2017.

CONG, L.; *et al*. Use of Cardiovascular Drugs for Primary and Secondary Prevention of Cardiovascular Disease Among RuralDwelling Older Chinese Adults. **Front. Pharmacol**. v. 11, 2020.

CONRAD, N.; *et al*. Trends in cardiovascular disease incidence among 22 million people in the UK over 20 years: population based study. **BMJ**. v. 385, 2024.

CORRADI, H. R.; SCHWAGER, S. L. U.; NCHINDA, A. T.; STURROCK, E. D.; ACHARYA, R. Crystal Structure of the N Domain of Human Somatic Angiotensin I-converting Enzyme Provides a Structural Basis for Domain-specific Inhibitor Design. **J. Mol. Biol**. v. 357, p. 964-974, 2006.

COSTA, S. R.; *et al*. Structural Characterization and Rat Aortic Vascular Reactivity of 2 Bradykinin-Potentiating Peptides (BPPs) from the Snake Venom of 3 *Bothrops moojeni* from Delta do Parnaíba Region, Brazil. **Journal of Natural Products**. v. 11, 2024.

D'ALESSANDRO, A.; ANASTASIADI, A. T.; TZOUNAKAS, V. L.; NEMKOV, T.; REISZ, J. A.; KRIEBARDIS, A. G.; ZIMRING, J. C.; SPITALNIK, S. L.; BUSCH, M. P. Red Blood Cell Metabolism In Vivo and In Vitro. **Metabolites**. v. 13, 2023.

DARYABOR, G. *et al*. The effects of type 2 diabetes mellitus on organ metabolism and the immune system. **Frontiers in immunology**, v. 11, 2020.

DÍAZ-GÓMEZ, J. L..; ESTAL, M. I.; ABOYTES, E. R.; MU^NÍZ, R. A. G.; GARZA, C. A. P.; LARA, S. G.; TORRES, F. C. Biomedical applications of synthetic peptides derived from venom of animal origin: A systematic review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. v. 170, 2024.

FATIMA, N.; PATEL, S. N.; HUSSAIN, T. Angiotensin II type 2 receptor: A target for protection against hypertension, metabolic dysfunction, and organ remodeling. **Hypertension**, v. 77, n. 6, p. 1845–1856, 2021.

FONSECA-CORREA, J. I.; CORREA-ROTTER, R. Sodium-Glucose Cotransporter 2 inhibitors mechanisms of action: A review. **Frontiers in medicine**, v. 8, 2021.

FU Z.; GILBERT, E. R.; LIU D. Regulation of insulin synthesis and secretion and pancreatic Beta-cell dysfunction in diabetes. **Currente diabetes reviews**. v. 9, n. 1. p. 25-53, 2013.

FURTADO, M. M. *et al*. Effects of ω-3 PUFA-Rich Oil Supplementation on Cardiovascular Morphology and Aortic Vascular Reactivity of Adult Male Rats Submitted to an Hypercholesterolemic Diet. **Biology** 2022, 11, 202. doi: https://doi.org/10.3390/biology11020202

GHAZI, L.; DRAWZ, P. Advances in understanding the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) in blood pressure control and recent pivotal trials of RAAS blockade in heart failure and diabetic nephropathy. **F1000Research**. v. 6, 2017.

GIUSTARINI, D.; FANTI, P.; MATTEUCCI, E.; ROSSI, R. Micro-method for the determination of glutathione in human blood. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.** v. 964, p. 191–194, 2014.

GONZÁLEZ, P.; LOZANO, P.; ROS, G.; SOLANO, F.; Hyperglycemia and Oxidative Stress: An Integral, Updated and Critival Overview of Theis Metabolic Intervonnections. **Int. Jour. Mol. Sci**. v. 24, 2023.

GRIFFITH, D. A. *et al*. A small-molecule oral agonist of the human glucagon-like peptide-1 receptor. **Journal of medicinal chemistry**, v. 65, n. 12, p. 8208–8226, 2022.

GUO, Q. *et al*. Synthesis and hypoglycemic effect of insulin from the venom of sea anemone Exaiptasia diaphana. **Marine drugs**, v. 22, n. 3, p. 111, 2024.

GUPTA, S. *et al*. Diabetes: a review of its pathophysiology, and advanced methods of mitigation. **Current medical research and opinion**, v. 40, n. 5, p. 773–780, 2024.

HASUI, T.; *et al*. Identification of Benzoxazin-3-one Derivatives as Novel, Potent, and Selective Nonsteroidal Mineralocorticoid Receptor Antagonists. **Journal of Medicinal Chemistry**. v. 54, p. 8616-8631, 2011.

HIBI, T.; NII, H.; NAKATSU, T.; KIMURA, A.; KATO, H.; HIRATAKE, J.; ODA, J. Crystal structure of gamma-glutamylcysteine synthetase: insights into the mechanism of catalysis by a key enzyme for glutathione homeostasis. **Proc Natl Acad Sci**. v. 101, p. 15052-15057. 2004.

HOU, F. F.; BOYCE, J.; CHERTOW, G. M.; KAY, J.; OWEN, W. F. Aminoguanidine inhibts advanced glycation endproducts formation on beta2-microglobulin. **J. Am. Soc. Nephrol.** v. 9(2), p. 2777-283, 1998.

HUNTER, A. D. ACD/ChemSketch 1.0 (freeware); ACD/ChemSketch 2.0 and its Tautomers, Dictionary, and 3D Plug-ins; ACD/HNMR 2.0; ACD/CNMR 2.0. **Journal of chemical education**, v. 74, n. 8, p. 905, 1997.

JENA, A. B.; SAMAL, R. R.; BHOL, N. K.; DUTTAROY, A. K. Cellular Red-Ox system in health and disease: The latest update. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. v. 162, 2023.

JOMOVA, K. ALOMAR, S. Y.; NEPOVIMOVA, E.; KUKA, K.; VALKO, M. Several lines of antioxidant defense against oxidative stress: antioxidant enzymes, nanomaterials with multiple enzyme-mimicking activities, and low-molecular-weight antioxidants. **Archives of Toxicology**. v. 98, p. 1323-1367, 2024.

JUAN, C. A.; LASTRA, J. M. P.; PLOU, F. J.; PÉREZ-LEBEÑA, E.; The Chemistry of Reactive Oxygen Species (ROS) Revisited: Outlining Their Role in Biological Macromolecules (DNA, Lipids and Proteins) and Induced Pathologies. **Int. Jour. Mol. Sci**. v. 22, 2021.

KARNIK, S. S.; SINGH, K. D.; TIRUPULA, K.; UNAL, H. Significance of angiotensin 1–7 coupling with MAS1 receptor and other GPCRs to the reninangiotensin system: IUPHAR Review 22. **British Journal of Pharmacology**. v. 174, p. 737-753, 2017.

KAVANAGH, K. L.; *et al*. Crystal structure of human glutathione peroxidase 5.PDB DOI: https://doi.org/10.2210/pdb2i3y/pdb

KIM, S. et al. PubChem in 2021: new data content and improved web interfaces. **Nucleic acids research**, v. 49, n. D1, p. 1388–1395, 2021.

KSIAZEK, S. H.; *et al*. Renin–Angiotensin–Aldosterone System: From History to Practice of a Secular Topic. **Int J Mol Sci**. v. 25, p. 4035, 2024.

LE, T. K. C. *et al*. Insulin signaling and its application. **Frontiers in endocrinology**, v. 14, 2023.

LIBERATO, M. V. *et al*. Medium chain fatty acids are selective peroxisome proliferator activated receptor (PPAR) γ activators and pan-PPAR partial agonists. **PloS one**, v. 7, n. 5, p. e36297, 2012.

LU, H. *et al*. Alpha-glucosidase inhibitory peptides: Sources, preparations, identifications, and action mechanisms. **Nutrients**, v. 15, n. 19, p. 4267, 2023.

MAGALHÃES, C. F. C. B.; GOMES, J. G. F.; ANDRADE, W. T. B.; NASCIMENTO, Y. G.; LEITE, N. F. B. Avaliação *in silico* do potencial antiinflamatório de alcaloides indólicos presentes nas sementes de *Couroupita guianensis*. **Research, Society and Development**. v. 10, n. 2, 2021.

MAGNO, L. *et al*. The mechanism of action of biguanides: New answers to a complex question. **Cancers**, v. 14, n. 13, p. 3220, 2022.

MAIESE K. New Insights for Oxidative Stress and Diabetes Mellitus. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. Volume 2015.

MARTIN, G. M. *et al*. Mechanism of pharmacochaperoning in a mammalian KATP channel revealed by cryo-EM. **eLife**, v. 8, 2019.

MARTIN, S. S.; *et al*. 2024 Heart Disease and Stroke Statistics: A Report of US and Global Data From the American Heart Association. **American Heart Association**. v. 149, i. 8, p. 347-913, 2024.

MARZÀ-FLORENSA, A.; DROTOS, E.; GULAYIN, P.; GROBBEE, D. E.; IRAZOLA, V.; KLIPSTEIN-GROBUSH, K.; VAARTJES, I. Prevalence of Cardioprotective Medication Use in Coronary Heart Disease Patients in South America: Systematic review and Meta-Analysis. **Global Heart**. v. 17, p. 37-58, 2022.

MATSUDA, K.; MIZUGUCHI, H.; NISHIOKA, T.; KATO, H.; GO, N.; ODA, J. Crystal structure of glutathione synthetase at optimal pH: domain architecture and structural similarity with other proteins. **Protein Eng**. v. 9, p. 1083-1092, 1996.

MURSAL, M. *et al*. Navigating the computational seas: A comprehensive overview of molecular docking software in drug discovery. In: **Unravelling Molecular Docking - From Theory to Practice [Working Title]**. [s.l.] IntechOpen, 2024. http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.1004802

NIU, Y. *et al*. Structural basis of inhibition of the human SGLT2–MAP17 glucose transporter. **Nature**, v. 601, n. 7892, p. 280–284, 2022.

NUNES, A. D. C.; ALVES, P. H.; MENDES, E. P.; IANZER, D.; CASTRO, C. H. BJ-PRO-7A and BJ-PRO-10V Induce Vasodilatation and Inotropic Effects in Normotensive and Hypertensive Rats: Role of Nitric Oxide and Muscarinic Receptors. **Peptides**. v. 110, p. 1-9, 2018.

OLIVEIRA, A. N.; SOARES, A. M., SILVA, S. L. Peptides from animal venom and poisons. **International Journal of Peptide Research**. v. 29, n. 5, 2023.

PASTROMAS, S.; KOULOURIS, S. Thiazolidinediones: antidiabetic drugs with cardiovascular effects. **Hellenic journal of cardiology**. v. 47, n. 6, p. 352-60, 2006.

PÉTERFI, O. *et al*. Hypotensive snake venom components—A mini-review. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 24, n. 15, p. 2778, 2019.

PISSARNITSKI, D. A. *et al*. Scaffold-hopping from xanthines to tricyclic guanines: A case study of dipeptidyl peptidase 4 (DPP4) inhibitors. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 24, n. 21, p. 5534–5545, 2016.

POVLSEN, A. L.; GRIMM, D.; WEHLAND, M.; INFANGER, M.; KRÜGER, M. The VasoactiveMas Receptor in Essential Hypertension. **Journal of Clinical Medicine**. v. 9, p.267-279, 2020.

PUTNAM, C. D.; ARVAI, A. S.; BOURNE, Y.; TAINER, J. A. Active and Inhibited Human Catalase Structures: Ligand and NADPH Binding and Catalytic Mechanism. **J. Mol. Biol**. v. 296, p. 295-309, 2000.

QUEIROZ P. C., AGUIAR D. C., PINHEIRO R. P., MORAES C. C., PIMENTEL I. R. S., FERRAZ C. L. H., FERRAZ T. M. B. L. Prevalência das complicações micro e macrovasculares e de seus fatores de risco em pacientes com diabetes mellitus e síndrome metabólica. **Rev Bras Clin Med**. v. 9, n. 4, p. 254-258, 2011.

RAHUEL, J.; *et al*. Structure-based drug design: the discovery of novel nonpeptide orally active inhibitors of human renin. **Chemitry & Biology**. v. 7, p. 493-504, 2000.

REVERTER, D.; MASKOS, K.; TAN, F.; SKIDGEL, R. A.; BODE, W. Crystal Structure of Human Carboxypeptidase M, A Membrane-bound Enzyme that Regulates Peptide Hormone Activity. **J. Mol. Biol**. v. 338, p. 257-296, 2004.

SÆBØ, I. P.; BJØRÅS, M.; FRANZYK, H.; HELGESEN, E.; BOOTH, J. A. Optimization of the Hemolysis Assay for the Assessment of Cytotoxicity. **Int. J. Mol. Sci**. v. 24, p. 2914-2934, 2023.

SAVERGNINI, S. Q. *et al*. Vascular relaxation, antihypertensive effect, and cardioprotection of a novel peptide agonist of the Mas receptor. **Hypertension**, v. 56, n. 1, p. 112–120, 2010.

SAVVIDES, S. N.; KARPLUS, P. A. Kinetics and Crystallographic Analysis of Human Glutathione Reductase in Complex with a Xanthene Inhibitor. **J. Biol. Chem**. v. 271, n. 14, p. 8101-8107, 1996.

SHEIKH, A. Direct cardiovascular effects of glucagon like peptide-1. **Diabetology & metabolic syndrome**, v. 5, n. 1, 2013.

SHEN, J. K.; ZHANG, H. T. Function and structure of bradykinin receptor 2 for drug discovery. **Acta Pharmacologica Sinica**. v. 44, p. 489-498, 2022.

SHEN, J.; ZHANG, D.; FU, Y.; CHEN, A.; YANG, X; HAITAO, Z. Cryo-EM structures of human bradykinin receptor-Gq proteins complexes. **Nature Communications**. v. 13, 2022.

SILTARI, A.; KORPELA, R.; VAPAATALO, H. Bradykinin –induced vasodilatation: Role of age, ACE1-inhibitory peptide, mas- and bradykinin receptors. **Peptides**, v. 85, p. 46–55, 2016.

SILVA, M. V. B.; ALET, A. I.; CASTELLINI, H. V.; RIQUELME, B. D. Methods: A new protocol for in vitro red blood cell glycation. **Comparative Biochemistry and Physiology.** v. 264, 2022.

SOLA, D. *et al*. State of the art paper Sulfonylureas and their use in clinical practice. **Archives of medical science: AMS**, v. 4, p. 840–848, 2015.

STRANGE, R. W.; ANTONYUK, S.; HOUGH, M. A.; DOUCETTE, P. A.; RODRIGUEZ, J. A.; HART, P. J.; HAYWARD, L. J.; VALENTINE, J. S.; HASNAIN, S. S. The Structure of Holo and Metal-deficient Wild-type Human Cu, Zn Superoxide Dismutase and its Relevance to Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis. **J. Mol. Biol**. v. 328, i. 4, p. 877-891, 2003.

TEHRANI, H.; MOOSAVI-MOVAHEDI, A. A. Catalase and its mysteries. **Progress in biophysics and molecular biology**, v. 140, p. 5–12, 2018.

THORNALLEY, P. J. Use of aminoguanidine (Pimagedine) to prevent the formation of advanced glycation endproducts. **Arch Biochem Biophys.** v. 419(1), p. 31-40, 2003.

THORNBERRY, N. A.; GALLWITZ, B. Mechanism of action of inhibitors of dipeptidyl-peptidase-4 (DPP-4). **Bailliere's best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism**, v. 23, n. 4, p. 479–486, 2009.

UCHIKAWA, E. *et al*. Activation mechanism of the insulin receptor revealed by cryo-EM structure of the fully liganded receptor–ligand complex. **eLife**, v. 8, 2019.

VARADI, M. et al. AlphaFold Protein Structure Database in 2024: providing structure coverage for over 214 million protein sequences. **Nucleic acids research**, v. 52, n. D1, p. 368–375, 2024.

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.

VIDYA, V.; ACHAR, R. R.; HIMATHI, M. U.; SKSHITA, N. SOMAYATY, T. Y.; KAMESHWAR, V. H.; BYRAPPA, K.; RAMADA, D. Venom peptides – A comprehensive translational perspective in pain management. **Currente Research in Toxicoly**. p. 329-340, 2021.

WIRTH, K. *et al*. Differences in acetylcholine- and bradykinin-induced vasorelaxation of the mesenteric vascular bed in spontaneously hypertensive rats of different ages. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 354, n. 1, 1996.

ZHANG, H.; *et al*. Structural basis for selectivity and diversity in angiotensin II receptors. **Nature**. v. 544, 2017.

ZHANG, H.; UNAL, H.; DESNOYER, R.; HAN, G. W.; PATEL, N.; KATRITCH, V.; KARNIK, S. S.; CHEREZOV, V.; STEVENS, R. C. Structural Basis for Ligand Recognition and Functional Selectivity at Angiotensin Receptor. **J Biol Chem**. v. 290, i. 49, p. 29127-29139, 2015.

ZHANG, Z.; TRINGIDES, M. L.; MORGAN, C. E.; MIYAGU, M.; MEARS, J. A.; HOPPEL, C. L.; YU, E. W. High-Resolution Structural Proteomics of Mitochondria Using the 'Build and Retrieve' Methodology. Mol Cell Proteomics. v. 22, 2023.