



Universidade de Brasília – UnB
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em
Patologia Molecular

EFEITO HIPOTENSOR E CARDIOVASCULAR DE UM INIBIDOR DE PROTEASES BOWMAN–BIRK E SEUS PEPTÍDEOS DERIVADOS

Linha de Pesquisa: Estrutura e função de proteínas de
interesse patológico

MARIA ALZIRA GARCIA DE FREITAS

Brasília- DF

2020



Universidade de Brasília – UnB
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Patologia
Molecular

EFEITO HIPOTENSOR E CARDIOVASCULAR DE UM INIBITOR DE PROTEASES BOWMAN–BIRK E SEUS PEPTÍDEOS DERIVADOS

MARIA ALZIRA GARCIA DE FREITAS

Orientadora: Profa. Dra. Sônia Maria de Freitas

Coorientador: Prof. Dr. Gustavo Rodrigues Pedrino

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, como parte integrante dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Patologia Molecular.

Brasília- DF

2020

FICHA CATALOGRÁFICA

GM332e Garcia de Freitas, Maria Alzira
Efeito hipotensor e cardiovascular de um inibidor de proteases
Bowman-Birk e seus peptídeos derivados / Maria Alzira Garcia de
Freitas; orientadora Sônia Maria de Freitas; co-orientador Gustavo
Rodrigues Pedrino. -- Brasília, 2020. 216 p.

Tese (Doutorado – Doutorado em Patologia Molecular) --
Universidade de Brasília, 2020.

1. Hipertensão. 2. Cardiovascular. 3. Enzima Conversora de
Angiotensina (ECA). 4. Ratos Espontaneamente Hipertensos
(SHR). 5. Peptídeos Bioativos Bowman-Birk. I. de Freitas, Sônia
Maria, orient. II. Rodrigues Pedrino, Gustavo, co oriente. III. Título.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. SONIA MARIA DE FREITAS (**PRESIDENTE**)

Matrícula 136417 – CPF 184.958.691-87
Laboratório de Biofísica Molecular e Estrutural
Departamento de Biologia Molecular
Instituto de Ciências Biológicas
Universidade de Brasília – UnB

Prof. Dr. GUSTAVO RODRIGUES PEDRINO (**COORIENTADOR**)

CPF 219.150.048-02
Laboratório de Neurociência e Fisiologia Cardiovascular
Departamento de Ciências Fisiológicas
Instituto de Biologia
Universidade de Goiás – UFG

Profa Dra Betania Ferraz Quirino (**EXAMINADORA EXTERNA**)

CPF 584.835.431-68
Laboratório de Genética e Biotecnologia
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa

Profa Dra Izabela M. Dourado B. Charneau (**EXAMINADORA PATOMOL**)

Matrícula 1010859 – CPF 780.209.561-15
Laboratório de Interação Patógeno-Hospedeiro
Departamento de Biologia Molecular
Instituto de Ciências Biológicas
Universidade de Brasília – UnB

Prof. Dr. Aisel Valle Garay (**EXAMINADOR**)

Matrícula 01101013 (FUB) – CPF 233.125.178-93
Laboratório de Biofísica Molecular e Estrutural
Departamento de Biologia Molecular
Instituto de Ciências Biológicas
Universidade de Brasília – UnB

Profa Dra Amanda Araujo Souza (**SUPLENTE**)

Pesquisadora colaborador do PPGBiomol
Matrícula PPG BIOMOL: 01112317 CPF: 012.940.391-13
Laboratório de Biofísica Molecular e Estrutural
Departamento de Biologia Molecular
Instituto de Ciências Biológicas
Universidade de Brasília – UnB

À Ivana, Benjamin, Isis, Lavínia e quem mais vier...
À minha filha Cacilda Joyce F. S. Garcia, eterna companheira de
caminhada

DEDICO

HOMENAGEM

(...) cada vez que me tivesse mostrado suficientemente humilde e disposto a permitir que um ser que não era humano me instrísse, este amigo, quer tivesse quatro patas, seis ou nenhuma, compartilhou comigo uma sabedoria que não tem preço. Todos eles me ensinaram que a perfeita compreensão entre o ser humano e outras formas de vida é possível no momento em que o ser humano cumpre realmente o papel que lhe corresponde." (Boone, J.; *Amigos o parientes*. España : Ediciones Luciérnaga, 1991)

In memoriam

À MSc Sandrielle Aires de Oliveira por seu trabalho de síntese, purificação e determinação da atividade inibitória dos peptídeos derivados do inibidor de proteases BTCI, o que possibilitou o desenvolvimento dos ensaios *in vivo* e *in vitro* nesta tese.

Ao Prof. Dr. Manuel Matheus Ventura, precursor dos estudos biofísicos estruturais do *black-eyed pea trypsin/chymotrypsin inhibitor* (BTCI), por oferecer dados para diversas pesquisas há mais de 45 anos.

AGRADECIMENTOS

À Suprema Energia Criadora que manifestou o momento certo para acontecer este trabalho.

Aos amigos siderais por serem presenças constantes nos momentos desafiadores.

À Profa. Dra. Sonia Maria de Freitas, orientadora competente e amiga que me recebeu com carinho e muita paciência, compreendendo as dificuldades e sempre confiante me conduziu nas tormentas.

À Profa. Dra. Ildinete Silva Pereira pela boa vontade, cooperação e carinho.

Ao Prof. Dr. Gustavo Rodrigues Pedrino responsável pelo Centro de Neurociências e Fisiologia Cardiovascular (UFG) e equipe, que prontamente aceitou, além da coorientação ser responsável pelo ensaio *in vivo*, gerando resultados positivos e riquezas de conhecimentos.

Ao Prof. Dr. Carlos Henrique de Castro, responsável pelo Laboratório Integrado de Fisiopatologia Cardiovascular e Neurológica da Universidade Federal de Goiás (UFG) e sua equipe, por participar e estar à frente dos ensaios da contratilidade ventricular esquerda e pressão de perfusão (vasomotricidade coronariana) que foi de grande valia para o fechamento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Luciano Paulino da Silva, Laboratório de Espectrometria de Massa Embrapa – Recursos Genéticos e Biotecnologia pela colaboração na avaliação da pureza e identificação da massa molecular dos componentes moleculares obtidos nas purificações do BTCl.

Ao Prof. Dr. Marcelo Henrique Soller Ramada, Programa de Pós-graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia da Universidade Católica de Brasília pela também colaboração na avaliação da pureza e identificação da massa molecular dos componentes moleculares obtidos nas purificações do BTCl.

À Profa. Dra. Alice da Cunha Morales Álvares por ser tão maravilhosamente incansável e sempre ao meu lado.

À Dra. Gisele Ferreira Esteves por seu trabalho “Resolução da estrutura tridimensional do inibidor triptico e quimotriptico de *Vigna unguiculata* em complexos binário e ternário” que possibilitou ainda mais a riqueza deste tão sonhado trabalho.

À Dra. Nathalia Oda Amaral minha gratidão pela acolhida no Centro de Neurociência e Fisiologia Cardiovascular (UFG), sua boa vontade, e exímia condução do experimento *in vivo*.

À Profa. Dra. Flávia Tonani, amiga querida, orientadora do meu mestrado, e ao Prof. Dr. Guilherme Benko, ambos da Universidade Federal do Tocantins (UFT), mesmo sem conhecerem a caminheira acreditaram nela.

Ao Gledson Alessandro R. da Silva, secretário da pós-graduação em Patologia Molecular e Isabela Santos de Castro, Assistente em Administração pela capacidade e disposição incansável em ajudar.

Às doutorandas Lara Marques Naves, Amanda de Sá Martins de Bessa, Carolina Nobre Ribeiro Pontes, por imensa boa vontade e participação na continuidade dos experimentos.

Aos queridos colegas de doutorado Danielle Silva Araújo, Juliana Santana De Curcio, Lucas Nojosa Oliveira e Marielle Garcia Silva que tão bem souberam me compreender, e, à medida que percorríamos o caminho a amizade foi solidificando, levando a crer nas palavras de Fernando Brant e Milton Nascimento na Canção das Américas: “Amigo é coisa prá se guardar do lado esquerdo do peito (...).”

Aos colegas da equipe de biofísica, ternos amigos, sempre prontos a me ajudarem.

À equipe do Centro de Neurociências e Fisiologia Cardiovascular, Departamento de Ciências Fisiológicas, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia/GO pela agradável amizade e colaboração durante minha estadia.

Ao técnico de laboratório Francisco, que sempre ajudou a todos com muita competência e boa vontade.

Aos meus filhos, companheiros de navegação e focos de sustentação.

Ao José A. Roberto, antes que genro, irmão e amigo.

À CAPES, FINATEC/UnB/DPP, FAPDF e CNPq – Auxílio Financeiro a Projetos para o Desenvolvimento de Pesquisas de Natureza Científica.

À UnB instituição formadora de consciências livres.

Aos amigos... minha eterna gratidão.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Prevalência de pré-hipertensão.....40
- Figura 2:** Taxa de mortalidade no Brasil por doença cardiovascular e distribuição por causas no ano de 2013.....41
- Figura 3:** Fluxograma. Sistema Renina-Angiotensina demonstrando a atuação da enzima conversora da angiotensina I (ECA) no controle da hipertensão.....50
- Figura 4:** Representação das estruturas dos inibidores com *loops* canônicos e resíduos P1 destacados em vermelho. A estrutura secundária está colorida em azul (folhas- β) e verde (α -hélice).....55
- Figura 5:** Estrutura tridimensional de um inibidor da família BOWMAN BIRK isolado de soja (PDB: 1bbi).....56
- Figura 6:** Estrutura Tridimensional do BTCI representada em bastões e do complexo ternário BTCI com quimotripsina e tripsina, em fitas.....60
- Figura 7:** Modelo computacional do BTCI destacando os sítios ativos dessa molécula.....65
- Figura 8:** BTCI (em verde; fita- β numeradas) em complexo com a tripsina (rosa) e a quimotripsina (ciano) em pH 7,5. Em preto a distância entre a Lisina²⁶ (azul) e Fenilalanina⁵³ (laranja).66
- Figura 9:** Estrutura tridimensional dos peptídeos utilizados nas simulações. Os resíduos estão coloridos de acordo com a polaridade e natureza química: Azul: carregado positivamente; Verde: polares; Brancos: hidrofóbicos; Amarelo: ligação dissulfeto. Note a estrutura cíclica em forma de um anel de ambos os peptídeos. A: peptídeo hidrofílico e carregado, Pep-1. B: peptídeo hidrofóbico, Pep-2.....68

- Figura 10:** Fluxograma. Obtenção da biomolécula BTCl e seus peptídeos derivados (PepTry e PepChy) e estratégias experimentais.....75
- Figura 11:** Fluxograma. Esquema de síntese em fase sólida de peptídeos, segundo estratégia Fmoc.....78
- Figura 12:** Análise do grau de pureza do BTCl por espectrometria de massa. A massa molecular do BTCl foi de 9104,172 kDa e a dupla carga de 4546.371 kDa. Os dados foram obtidos utilizando um espectrômetro de massa MALDI-TOF/TOF UltraFlex III sob controle do programa computacional Flex Control 3.3 (Bruker Daltonics, ALE).....89
- Figura 13:** Purificação e pureza de peptídeos sintéticos PepTry e PepChy. A) e C) Cromatografia de fase reversa de PepTry e PepChy, respectivamente, na coluna C18 Shim-pak VP-ODS usando um gradiente linear (5% - 95%) de acetonitrila. B) e D) EIS-MS espectrometria de massa, identificando o PepTry com massa molecular de 974,5 Da e PepChy de massa molecular de 967,35 Da). As estruturas inseridas correspondem ao PepTry e PepChy.....90
- Figura 14:** Atividades inibitórias de BTCl e seus peptídeos derivados. (A) Atividade residual de tripsina na presença de concentrações crescentes de BTCl e PepTry (B). (C) Atividade residual de quimotripsina na presença de concentrações crescentes de BTCl e PepChy (D).....91
- Figura 15:** Atividades inibitórias de BTCl (■—■), PepChy (○—○) e PepTry (□—□) contra a enzima conversora da angiotensina (ECA). Valores de IC₅₀: BTCl (54,6 ±2,9 µM), PepChy (24,7 ±1,1) e PepTry (24,4 ± 1,1 µM).....92
- Figure 16:** Estruturas tridimensionais dos complexos ECA-PepChy e ECA-PepTry obtidos por *docking*. (A) enzima conversora da angiotensina - ECA (cartoon cinza) em complexo com PepChy (bastões amarelos) e PepTry (bastões verdes). (B) Visualização estéreo do sítio ativo ECA (azul) com o PepChy (amarelo). O sítio reativo de PepChy (P1F3) na interface está em evidência. (C) Visualização estéreo

do sítio ativo ECA (azul) com PepTry (verde). O sítio reativo do PepTry (P1K3) na interface esta em evidência.....93

Figura 17: Parâmetros hemodinâmicos em ratos WR *versus* SHR após administração do BTCI (30,0 mg/Kg). A) Pressão Arterial Sistólica (PAS). B) Pressão Arterial Diastólica (PAD). C) Pressão Arterial Medial (PAM). Valor Basal (VB). Soro Fisiológico (SF).....96

Figura 18: Parâmetros cardiovasculares em ratos WR *versus* SHR após administração do BTCI (30.0 mg/kg). D) Frequência Cardíaca (FC). E) Fluxo Sanguíneo Renal (FSR). F) Fluxo Sanguíneo Aórtico (FSA). Valor Basal (VB). Soro Fisiológico (SF) - ANOVA (*two way*).....98

Figura 19: Parâmetros cardiovasculares em ratos WR *versus* SHR após administração do BTCI (30,0 mg/kg). G) Condutância Vascular Renal (CVR) e H) Condutância Vascular Aórtica (CVA). Valor Basal (VB). Soro Fisiológico (SF).....100

Figura 20: Parâmetros hemodinâmicos em ratos WR *versus* SHR após administração do PeChy (3,3 mg/kg). A) Pressão arterial sistólica (PAS). B) Pressão Arterial Diastólica (PAD). C) Pressão Arterial Medial (PAM). Valor Basal (VB). Soro Fisiológico (SF).....101

Figura 21: Parâmetros cardiovasculares em ratos WR *versus* SHR após administração do PepChy (3,3 mg/kg). D) Frequência Cardíaca (FC). E) Fluxo Sanguíneo Renal (FSR). F) Fluxo Sanguíneo Aórtico (FSA). Valor Basal (VB). Soro Fisiológico (SF).....102

Figura 22: Parâmetros cardiovasculares em ratos WR *versus* SHR após administração do PepChy (3,3 mg/kg). Condutância Vascular Renal (CVR). Condutância Vascular Aórtica (CVA). Valor Basal (VB). Soro Fisiológico (SF).....104

Figura 23: Parâmetros hemodinâmicos em ratos WR *versus* SHR após administração do PepTry (3,3 mg/kg). A) Pressão Arterial Sistólica (PAS). B)

Pressão Arterial Diastólica (PAD). C) Pressão Arterial Medial (PAM). Valor Basal (VB). Soro Fisiológico (SF).....106

Figura 24: Parâmetros cardiovasculares em ratos WR *versus* SHR após administração do PepTry (3,3 mg/kg). D) Frequência Cardíaca (FC). E) Fluxo Sanguíneo Renal (FSR). F) Fluxo Sanguíneo Aórtico (FSA). Valor Basal (VB). Soro Fisiológico (SF).....107

Figura 25: Comparação dos parâmetros cardiovasculares em ratos WR *versus* SHR após administração do PepTry (3,3 mg/kg). G) Condutância Vascular Renal (CVR). H) Condutância Vascular Aórtica (CVA). Valor Basal (VB). Soro Fisiológico (SF).....108

Figura 26: Parâmetros hemodinâmicos de ratos WR submetidos ao uso de BTCI (30,0 mg/kg), PepChy e PepTry (3,3 mg/kg). A) Pressão Arterial Sistólica (PAS). B) Pressão Arterial Diastólica (PAD). C) Pressão Arterial Medial (PAM). Valor Basal (VB). Soro Fisiológico (SF).....110

Figura 27: Parâmetros cardiovasculares, CVR e CVA, de ratos WR submetidos ao uso de BTCI (30,0 mg/kg), PepChy e PepTry (3,3 mg/kg). G) Condutância Vascular Renal (CVR). H) Condutância Vascular Aórtica (CVA). Valor Basal (VB). Soro Fisiológico (SF).....110

Figura 28: Parâmetros hemodinâmicos de ratos SHR submetidos ao uso de BTCI (30,0 mg/kg), PepChy e PepTry (3,3 mg/kg). A) Pressão Arterial Sistólica (PAS). B) Pressão Arterial Diastólica (PAD). C) Pressão Arterial Medial (PAM). Valor Basal (VB). Soro Fisiológico (SF).....111

Figura 29: Parâmetros cardiovasculares CVR e CVA de ratos SHR submetidos ao uso de BTCI (30,0 mg/kg), PepChy e PepTry (3,3 mg/kg). G) Condutância Vascular Renal (CVR). H) Condutância Vascular Aórtica (CVA). Valor Basal (VB). Soro Fisiológico (SF).....112

Figura 30: Resposta máxima induzida com uso de BTCl (30,0 mg/kg) em ratos WR *versus* SHR. A) Pressão Arterial Medial (PAM); B) Pressão Arterial Sistólica (PAS); C) Pressão Arterial Diastólica (PAD). D) Condutância Vascular Renal (CVR); E) Condutância Vascular Aórtica (CVA). Soro Fisiológico. Estatística: Teste *t* de Student – $p < 0,05$113

Figura 31: Resposta máxima induzida por uso de PepChy (3,3 mg/kg) em ratos WR *versus* SHR. A) Pressão Arterial Medial (PAM); B) Pressão Arterial Sistólica (PAS); C) Pressão Arterial Diastólica (PAD). D) Condutância Vascular Renal (CVR); E) Condutância Vascular Aórtica (CVA). Estatística: Teste *t* de Student – $p < 0,05$114

Figura 32: Resposta máxima induzida por PepTry (3,3 mg/kg) em ratos WR *versus* SHR. A) Pressão Arterial Medial (PAM); B) Pressão Arterial Sistólica (PAS); C) Pressão Arterial Diastólica (PAD). D) Condutância Vascular Renal (CVR); E) Condutância Vascular Aórtica (CVA). Soro Fisiológico (SF). Estatística: Teste *t* de Student – $p < 0,05$116

Figura 33: Resposta máxima induzida por uso de BTCl (30,0 mg/kg), PepTry (3,3 mg/kg) e PepChy (3,3 mg/kg) em ratos WR. A) Pressão Arterial Sistólica (PAS); B) Pressão Arterial Diastólica; C) Pressão Arterial Medial (PAM); D) Condutância Vascular Renal (CVR); E) Condutância Vascular Aórtica (CVA). Soro Fisiológico (SF). Estatística: Teste *t* de Student – $p < 0,05$117

Figura 34: Resposta máxima induzida por uso de BTCl (30,0 mg/kg), PepTry (3,3 mg/kg) e PepChy (3,3 mg/kg) em ratos SHR. A) Pressão Arterial Sistólica (PAS); B) Pressão Arterial Diastólica; C) Pressão Arterial Medial (PAM); D) Condutância Vascular Renal (CVR); E) Condutância Vascular Aórtica (CVA). Soro Fisiológico (SF). Estatística: Teste *t* de Student – $p < 0,05$118

Figura 35: Efeitos do BTCl, PepChy e do PepTry nos corações de ratos isolados e do tratamento com o inibidor de sintase do óxido nítrico (L-NAME). (A-C) Efeitos do PepChy, BTCl e do PepTry na Pressão Sistólica Final do Ventrículo Esquerdo (LVESP); (D-F) Taxa máxima de aumento da Pressão Ventricular Esquerda (dP/dt_{max}); (G-I) Taxa máxima de declínio da Pressão Ventricular Esquerda (dP/dt_{min})

e (JL) Pressão de Perfusão. A linha pontilhada representa o começo da infusão dos peptídeos. Os dados são relatados como média \pm EPM. * $p < 0,05$, vs. linha de base, # $p < 0,05$, vs. entre pontos de tempo. ANOVA (*Two-way*) seguida por pós-teste de comparação múltipla de *Sidak*.....120

LISTA DE TABELA

Tabela 1: Classificação de risco no paciente hipertenso de acordo com fatores de risco adicionais, presença de lesão em órgão-alvo e de doença cardiovascular ou renal.....42

(Anexo 1)

Tabela 2: Média padrão das variáveis hemodinâmicas PAM, PAS e PAD utilizando SF (0,9%) e BTCl (30,0 mg/Kg), em escala temporal de 360 minutos, via gavagem, em ratos WR (n=6) - ANOVA (*two way*).....164

Tabela 3: Média padrão das variáveis hemodinâmicas PAM, PAS e PAD utilizando SF (0,9%) e BTCl (30,0 mg/Kg), em escala temporal de 360 minutos, via gavagem, em ratos SHR (n=6) - ANOVA (*two way*).....164

Tabela 4: Média padrão das variáveis cardiovasculares FC, FSR e FSA utilizando SF (0,9%) e BTCl (30,0 mg/Kg), em escala temporal de 360 minutos, via gavagem, em ratos WR (n=6) - ANOVA (*two way*).....165

Tabela 5: Média padrão das variáveis cardiovasculares FC, FSR e FSA utilizando SF (0,9%) e BTCl (30,0 mg/Kg), em escala temporal de 360 minutos, via gavagem, em ratos SHR (n=6) - ANOVA (*two way*).....165

Tabela 6: Média padrão das variáveis cardiovasculares CVR e CVA utilizando SF (0,9%) e BTCl (30,0 mg/Kg) em escala temporal de 360 minutos via gavagem, em ratos WR (n=6) - ANOVA (*two way*).....166

Tabela 7: Média padrão das variáveis cardiovasculares CVR e CVA utilizando SF (0,9%) e BTCl (30,0 mg/Kg) em escala temporal de 360 minutos, via gavagem, em ratos SHR (n=6) - ANOVA (*two way*).....166

Tabela 8: Média padrão das variáveis hemodinâmicas PAM, PAS e PAD utilizando SF (0,9%) e PepChy (3,3 mg/Kg) em escala temporal de 360 minutos, via gavagem, em ratos WR (n=6) - ANOVA (*two way*).....167

Tabela 9: Média padrão das variáveis hemodinâmicas PAM, PAS e PAD utilizando SF (0,9%) e PepChy (3,3 mg/Kg) em escala temporal de 360 minutos, via gavagem, em ratos SHR (n=6) - ANOVA (*two way*).....167

Tabela 10: Média padrão das variáveis cardiovasculares FC, FSR e FSA utilizando SF (0,9%) e PepChy (3,3 mg/Kg), em escala temporal de 360 minutos, via gavagem, em ratos WR (n=6) - ANOVA (*two way*).....168

Tabela 11: Média padrão das variáveis cardiovasculares FC, FSR e FSA utilizando SF (0,9%) e PepChy (3,3 mg/Kg), em escala temporal de 360 minutos, via gavagem, em ratos SHR (n=6) - ANOVA (*two way*).....168

Tabela 12: Média padrão das variáveis cardiovasculares CVR e CVA utilizando SF (0,9%) e PepChy (3,3 mg/Kg) em escala temporal de 360 minutos, via gavagem, em ratos WR (n=6) - ANOVA (*two way*).....169

Tabela 13: Média padrão das variáveis cardiovasculares CVR e CVA utilizando SF (0,9%) e PepChy (3,3 mg/Kg) em escala temporal de 360 minutos, via gavagem, em ratos SHR (n=6) - ANOVA (*two way*).....169

Tabela 14: Média padrão das variáveis hemodinâmicas PAM, PAS e PAD utilizando SF (0,9%) e PepTry (3,3 mg/Kg) em escala temporal de 360 minutos, via gavagem, em ratos WR (n=6) - ANOVA (*two way*).....170

Tabela 15: Média padrão das variáveis hemodinâmicas PAM, PAS e PAD utilizando SF (0,9%) e PepTry (3,3 mg/Kg) em escala temporal de 360 minutos, via gavagem, em ratos SHR (n=6) - ANOVA (*two way*).....170

Tabela 16: Média padrão das variáveis cardiovasculares FC, FSR e FSA utilizando SF 0,9%) e PepTry (3,3 mg/Kg), em escala temporal de 360 minutos, via gavagem, em ratos WR (n=6) – ANOVA (<i>two way</i>).....	171
Tabela 17: Média padrão das variáveis cardiovasculares FC, FSR e FSA utilizando SF (0,9%) e PepChy (3,3 mg/Kg), em escala temporal de 360 minutos, via gavagem, em ratos SHR (n=6) – ANOVA (<i>two way</i>).....	171
Tabela 18: Média padrão das variáveis cardiovasculares CVR e CVA utilizando SF (0,9%) e PepTry (3,3 mg/Kg) em escala temporal de 360 minutos, via gavagem, em ratos WR (n=6 - ANOVA (<i>two way</i>).....	172
Tabela 19: Média padrão das variáveis cardiovasculares CVR e CVA utilizando SF (0,9%) e PepTry (3,3 mg/Kg) em esca temporal de 360 minutos, via gavagem, em ratos SHR (n=6) - ANOVA (<i>two way</i>).....	172
Tabela 20: Média padrão da variável hemodinâmica PAS utilizando SF (0,9%), BTCI (30,0 mg), PepChy e PepTry (3,3 mg/Kg) em escala temporal de 360 minutos, via gavagem, em ratos WR (n=6). ANOVA (<i>two way</i>).....	173
Tabela 21: Média padrão da variável hemodinâmica PAD utilizando SF (0,9%), BTCI (30,0 mg/Kg), PepChy e PepTry (3,3 mg/Kg) em escala temporal de 360 minutos, via gavagem, em ratos WR (n=6). ANOVA (<i>two way</i>).....	173
Tabela 22: Média padrão da variável hemodinâmica PAM utilizando SF (0,9%), BTCI (30,0 mg/Kg), PepChy e PepTry (3,3 mg/Kg) em escala temporal de 360 minutos, via gavagem, em ratos WR (n=6). ANOVA (<i>two way</i>).....	174
Tabela 23: Média padrão das variáveis cardiovasculares CVR e CVA utilizando SF (0,9%), BTCI (30,0 mg/Kg), PepChy e PepTry (3,3 mg/Kg,) em escala temporal de 360 minutos, via gavagem, em ratos WR (n=6). ANOVA (<i>two way</i>).....	174

Tabela 24: Média padrão da variável hemodinâmica PAS utilizando SF (0,9%), BTCl (30,0 mg/Kg), PepChy e PepTry (3,3 mg/Kg) em escala temporal de 360 minutos, via gavagem, em ratos SHR(n=6). ANOVA (*two way*).....175

Tabela 25: Média padrão da variável hemodinâmica PAD utilizando SF (0,9%), BTCl (30,0 mg/Kg), PepChy e PepTry (3,3 mg/Kg) em escala temporal de 360 minutos, via gavagem, em ratos SHR(n=6). ANOVA (*two way*).....175

Tabela 26: Média padrão da variável hemodinâmica PAM utilizando SF (0,9%), BTCl (30,0 mg/Kg), PepChy e PepTry (3,3 mg/Kg) em escala temporal de 360 minutos, via gavagem, em ratos SHR(n=6). ANOVA (*two way*).....176

Tabela 27: Média padrão das variáveis cardiovasculares CVR e CVA utilizando SF (0,9%), BTCl (30,0 mg/Kg), PepChy e PepTry (3,3 mg/Kg,) em escala temporal de 360 minutos, via gavagem, em ratos SHR(n=6). ANOVA (*two way*).....176

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- +E.P.M** = Erro Padrão da Média
- μL** = microLitro
- μM** = microMolar
- Å** = angstrom
- A-I** = Angiotensina I
- A-II** = angiotensina II
- ACN** = acetonitrila
- AVE** = Acidente Vascular Encefálico
- AVCI** = Acidente Vascular Cerebral Isquêmico
- AVE** = Acidente Vascular Encefálico
- BAPNA** = Na-benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida
- BB** = Betabloqueadores
- BBI** = *Bowman-Birk inhibitor*
- BCC** = Bloqueadores dos Canais de Cálcio
- bpm** = batimento por minuto
- BRA** = Bloqueadores do Receptor de Angiotensina
- BTCI** = *Black-eyed pea trypsin and chymotrypsin inhibitor*
- CaCl₂** = Cloreto de Cálcio
- CAN** = Acetonitrila
- CO₂** = Dióxido de Carbono
- CPP** = *Cell-penetrating Peptides* (CPP)
- CV** = Condutância Vascular
- CVA** = Condutância Vascular Aórtica
- CVR** = Condutância Vascular Renal
- Da** = Dalton
- DAP** = Doença Arterial Periférica
- DC** = Débito Cardíaco
- DIU** = Diuréticos
- DCV** = Doença Cardiovascular
- DCbV** = Doença Cerebrovascular
- DH** = Doenças Hipertensivas
- DIC** = Doenças Isquêmicas do Coração

DM = Diabetes *Mellitus*

DMF = 4-metilpiperidina em dimetilformamida

DPOC = Doenças Pulmonares Obstrutivas Crônicas

dP/dt_{max} = declínio da Pressão/declínio do tempo máximo

dP/dt_{min} = declínio da Pressão/declínio do tempo mínimo

DRC = Doença Renal Crônica

ε = Épsilon

ECA = Enzima Conversora de Angiotensina

ECG = Eletrocardiograma

E_{max} = Elevação máxima

eONS = Sintase do Óxido Nítrico endotelial

ESI-MS = Espectrometria de Massa por Ionização por *Electrospray*

FC = Frequência Cardíaca

Fmoc = Fluorenilmetoxicarbonil

FSA = Fluxo Sanguíneo Aórtico

FSR = Fluxo Sanguíneo Renal

GMPc = Proteína Guanosinamono-fosfato cíclica

GPNA = n-glutaril-L-fenilalanina-p-nitroanilida

GTP = Proteína Guanosinatri-fosfato

HA = Hipertensão Arterial

HAS = Hipertensão Arterial Sistêmica

HCl = Ácido clorídrico

HHL = hipuril-L-histidil-L-leucina

Hz = Hertz

IAM = Infarto Agudo do Miocárdio

IC₅₀ = Concentração Inibitória Máxima

IC = Insuficiência Cardíaca

ICC = Insuficiência Cardíaca Congestiva

IECA = Inibidores da Enzima de Conversão da Angiotensina

iONS = Sintase de Óxido Nítrico indutível

iv = intravenoso

KCl = Cloreto de Potássio

kDa = kilo Dalton

KH₂PO₄ = dihidrogenofosfato de potássio

K_i = constante de ionização

KRS = *Krebs-Ringer solution*

L-NAME = NG-nitro-L-arginina metil éster

LOA = Lesão em Órgão-Alvo

LQFM-21 = 5-(1-(3-fluorofenil)-1H-pirazol-4-il)-2H-tetrazole

Lys = Lisina

LVESP = *Left Ventricle end-Sistolic Pressure*

M = Molar

MALDI-TOF/TOF = Ionização e dessorção a laser assistida por matriz acoplada ao tempo de vôo, do inglês *matrix-assisted laser desorption/ionization coupled to time-of-flight*

MM = Massa Molar

mM = miliMolar

mmHg = milímetro de Mercúrio

mol/L = molar/Litro

m/v = massa/volume

m/z = massa (m) sobre a carga (z)

n = número de animais

NaCl = Cloreto de sódio

NaHCO₃ = Bicarbonato de Sódio

nM = nanoMolar

nNOS = Sintase de Óxido Nítrico neural

ON = Óxido Nítrico

NO/GMPc = Óxido Nítrico/Monofosfato cíclico de guanosina

ONS = Sintase Óxido Nítrico

OMS = Organização Mundial de Saúde

ONOO⁻ = Peroxinitrito

p = probabilidade de significância

PA = Pressão Arterial

PAD = Pressão Arterial Diastólica

PAM = Pressão Arterial Média

PAP = Pressão Arterial Pulsátil

PAS = Pressão Arterial Sistólica

PepChy = Peptídeo de interação e inibição de quimotripsina

PepTry = Peptídeo de interação e inibição de tripsina
PD = Pressão Diastólica
PDB = *Protein Data Bank*
pH = potencial Hidrogeniônico
Phe = Fenilalanina
PKG = Proteína quinase dependente de GMPc
PMSF = Fenilmetanosulfonilfluorido
PS = Pressão Sistólica
RP-HPLC = *reversed phase high performance liquid chromatography*
rpm = rotação por minuto
RPT = Resistência Periférica Total
SBR = Sensibilidade do Barorreflexo
SeCap = Selênio do Captopril
Ser = Serina
SHR = *Spontaneous Hypertensive Rats*
SNC = Sistema Nervoso Central
SQM = Mecânica Quântica Semiempírica
SRAA = Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona
SUS = Sistema Único de Saúde
TBTU = 2-(1H-Benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyaminium tetrafluoroborate
TCA = Ácido tricloroacético
TFA = ácido trifluoroacético
Tris HCl = Tris: (hidroximetil)aminometano, N(CH₂OH)₃ HCl: ácido clorídrico
TT = trinitrato de glicerina
WKY = ratos Wistar-Kyoto
WR = ratos Wistar
v/v = volume/volume

RESUMO

As doenças cardiovasculares (DCV) são as principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo. A Organização Mundial de Saúde - 2013 (OMS) ao alertar sobre os fatores de risco de DCV cita a hipertensão como uma das causas. Tem havido um interesse crescente no desenvolvimento de compostos naturais e alimentares que podem servir como alternativas para o tratamento da hipertensão com efeitos colaterais mais baixos que os anti-hipertensivos sintéticos. O objetivo deste trabalho foi analisar o efeito inibitório do BTCl (*black-eyed pea trypsin/chymotrypsin inhibitor*) e de dois peptídeos análogos (PepChy e PepTry) contra a enzima conversora da angiotensina (ECA) e o efeito nos parâmetros hemodinâmicos e cardiovasculares destas moléculas que apresentaram atividade inibitória contra ECA indicada pelos valores de IC₅₀ de 54.6 ±2.9; 24.7 ±1.1; e 24.4 ±1.1 µM, respectivamente, ocluindo o sítio catalítico conforme simulação de docking molecular, principalmente para PepChy e PepTry. As atividades hemodinâmicas e cardiovasculares dessas moléculas foram avaliadas em ratos normotensos e naturalmente hipertensos em ensaios *in vivo* usando o método por gavagem e *ex vivo* em corações isolados. Os ensaios *in vivo* mostram que as três moléculas apresentaram efeitos hipotensivos mediante a diminuição da pressão arterial média, aumento da condutância vascular renal e aórtica, compatível com vasodilatação, no entanto, apresentando fluxo sanguíneo e frequência cardíaca constantes. Em ensaios *ex vivo*, utilizando corações isolados, estas moléculas promoveram mudanças expressivas na contratilidade ventricular esquerda e na vasodilatação coronariana. A redução significativa da pressão sistólica final do ventrículo esquerdo e vasodilatação coronária com redução da pressão de perfusão sem alterar a frequência cardíaca foram observados. Em conjunto, estes resultados indicam um potencial terapêutico de BTCl e seus peptídeos relacionados no tratamento da hipertensão.

Palavras-chaves: Hipertensão. Cardiovascular. Enzima Conversora de Angiotensina (ECA). Ratos Espontaneamente Hipertensos (SHR). Peptídeo Bioativo. Bowman-Birk. Inibidor de Protease. *Vigna unguiculata*.

ABSTRACT

Cardiovascular diseases (CVD) are the main causes of morbidity and mortality worldwide. The World Health Organization - 2013 (WHO) when alerting about the risk factors of CVD cites hypertension as one of the causes. There has been a growing interest in the development of natural and dietary compounds that can serve as alternatives for the treatment of hypertension with lower side effects than synthetic antihypertensives. The objective of this work was to analyze the inhibitory effect of BTCI (black-eyed pea trypsin/chymotrypsin inhibitor) and two analog peptides (PepChy and PepTry) against the angiotensin converting enzyme (ACE) and the effect on hemodynamic and cardiovascular parameters of these molecules that showed inhibitory activity against ACE indicated by the IC₅₀ values of 54.6 ± 2.9 ; 24.7 ± 1.1 ; and 24.4 ± 1.1 μM , respectively, occluding the catalytic site according to molecular docking simulation, mainly for PepChy and PepTry. The hemodynamic and cardiovascular activities of these molecules were evaluated in normotensive and naturally hypertensive rats *in vivo* assays using the gavage method and *ex vivo* in isolated hearts. *In vivo* tests show that the three molecules showed hypotensive effects by decreasing mean arterial pressure, increased renal and aortic vascular conductance, compatible with vasodilation, however, presenting constant blood flow and heart rate. *In ex vivo* trials, using isolated hearts, these molecules promoted significant changes in left ventricular contractility and coronary vasodilation. Significant reductions in left ventricular end systolic pressure and coronary vasodilation with reduced perfusion pressure without altering heart rate were observed. Together, these results indicate a therapeutic potential for BTCI and its related peptides in the treatment of hypertension.

Keywords: Hypertension. Cardiovascular. Angiotensin Converting Enzyme (ACE). Spontaneously Hypertensive Rats (SHR). Bioactive Peptide. Bowman-Birk. Protease inhibitor. *Vigna unguiculata*.

SUMÁRIO

I INTRODUÇÃO	32
II REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	35
II.1 Pressão Arterial (PA) e Sistemas de Regulação.....	35
II.2 Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS).....	37
II.3 Anti-hipertensivos.....	44
II.4 Enzima Conversora de Angiotensina (ECA).....	49
II.5 Plantas bioativas.....	53
II.6 Família de Inibidores Bowman-Birk (BBI).....	54
II.7 O inibidor de proteases BTCl (<i>black-eyed pea trypsin/chymotrypsin inhibitor</i>).....	58
II.8 Peptídeos derivados do BTCl reativos contra tripsina (PepTry - Lys ²⁶) e quimotripsina (PepChy - Phe ⁵³).....	64
III JUSTIFICATIVA	71
IV OBJETIVOS	74
IV.1 Objetivo Geral.....	74
IV.2 Objetivos Específicos.....	74
V MATERIAL E MÉTODOS	75
V.1 Purificação do BTCl	76
V.2 Purificação dos peptídeos, PepTry e PepChy, derivados do BTCl.....	77
V.3 Ensaio contra tripsina e quimotripsina.....	79
V.4 Ensaio de inibição da Enzima Conversora da Angiotensina (ECA).....	80
V.5 Interações de peptídeos com a ECA por procedimento de <i>docking</i>	81
V.6 Ensaio <i>in vivo</i> da atividade hemodinâmica e cardiovascular do BTCl e seus peptídeos derivados.....	82
V.6.1 Modelos experimentais.....	82

V.6.2 Procedimentos cirúrgicos.....	84
V.6.3 Registros dos parâmetros hemodinâmicos e cardiovasculares.....	85
V.7 Ensaios em ratos <i>ex vivo</i> da atividade na contratilidade ventricular esquerda e vasodilatação coronária.....	87
V.7.1 Ensaios sob efeito do BTCl, PepChy e PepTry na contratilidade ventricular esquerda e vasodilatação coronária em ratos <i>ex vivo</i>	87
V.8 Análise estatística.....	88

VI RESULTADOS.....89

VI.1 Purificação do BTCl e peptídeos derivados, PepChy e PepTry	89
VI.2 Ensaio de inibição do BTCl, PepTry e PepChy contra tripsina e Quimotripsina.....	90
VI.3 Atividade inibitória da enzima conversora de angiotensina (ECA) com BTCl e peptídeos derivados, PepChy e PepTry.....	91
VI.4 Ensaios <i>in vivo</i> em ratos WR e SHR utilizando o BTCl e peptídeos por gavagem.....	94
VI.4.1 Análise comparativa dos efeitos do BTCl na PAS, PAD e PAM em ratos WR e SHR.....	95
Efeitos em controles da PAS, PAD e PAM (WR e SHR)	95
Efeitos do BTCl na PAS, PAD e PAM em ratos WR.....	95
Efeitos do BTCl na PAS, PAD e PAM em ratos SHR.....	96
VI.4.2 Análise comparativa dos efeitos do BTCl na FC, FSR e FSA em ratos WR e SHR.....	97
Efeitos em controles na FC, FSR e FSA (WR e SHR).....	97
Efeitos do BTCl na FC, FSR e FSA em ratos WR.....	97
Efeitos do BTCl na FC, FSR e FSA em ratos SHR.....	98
VI.4.3 Análise comparativa dos efeitos do BTCl na CVR e CVA em ratos WR e SHR.....	99
Efeitos em controles na CVR e CVA (WR e SHR).....	99
Efeitos do BTCl na CVR e CVA em ratos WR.....	99

Efeitos do BTCl na CVR e CVA em ratos SHR.....	99
VI.5 Análise comparativa dos efeitos do PepChy em ratos WR e SHR.....	100
VI.5.1 Análise comparativa dos efeitos do PepChy na PAS, PAD e PAM em ratos WR e SHR.....	100
Efeitos do PepChy na PAS, PAD e PAM em ratos WR	100
Efeitos do PepChy na PAS, PAD e PAM em ratos SHR	100
VI.5.2 Análise comparativa dos efeitos do PepChy na FC, FSR e FSA em ratos WR e SHR.....	102
Efeitos do PepChy na FC, FSR e FSA em ratos WR.....	102
Efeitos do PepChy na FC, FSR e FSA em ratos SHR...	103
VI.5.3 Análise comparativa dos efeitos do PepChy na CVR e CVA em ratos WR e SHR.....	103
Efeitos do PepChy na CVR e CVA em ratos WR.....	103
Efeitos do PepChy na CVR e CVA em ratos SHR.....	103
VI.6 Análise comparativa dos efeitos do PepTry em ratos WR e SHR.....	104
VI.6.1 Análise comparativa dos efeitos do PepTry na PAS, PAD e PAM em ratos WR e SHR.....	104
Efeitos do PepTry na PAS, PAD e PAM em ratos WR...	104
Efeitos do PepTry na PAS, PAD e PAM em ratos SHR	105
VI.6.2 Análise comparativa dos efeitos do PepTry na FC, FSR e FSA em ratos WR e SHR.....	106
Efeitos do PepTry na FC, FSR e FSA em ratos WR.....	106
Efeitos do PepTry na FC, FSR e FSA em ratos SHR.....	106
VI.6.3 Análise comparativa dos efeitos do PepTry na CVR e CVA em ratos WR e SHR.....	107
Efeitos do PepTry na CVR e CVA em ratos WR.....	107
Efeitos do PepTry na CVR e CVA em ratos SHR.....	108
VI.7 Análise comparativa dos efeitos hemodinâmicos e cardiovasculares do BTCl e peptídeos derivados em ratos WR e SHR.....	109

VI.7.1	Análise comparativa dos efeitos do BTCl e peptídeos derivados em ratos WR.....	109
VI.7.2	Análise comparativa dos efeitos do BTCl e peptídeos derivados em ratos SHR.....	110
VI.8	Análise da resposta máxima hipotensiva e vasodilatadora induzida por BTCl e peptídeos derivados em ratos WR e SHR.....	112
VI.8.1	Análise da resposta máxima hipotensiva e vasodilatadora induzida por BTCl em ratos WR <i>versus</i> SHR.....	112
VI.8.2	Análise da resposta máxima hipotensiva e vasodilatadora induzida por PepChy em ratos WR <i>versus</i> SHR.....	114
VI.8.3	Análise da resposta máxima hipotensiva e vasodilatadora induzida por PepTry em ratos WR <i>versus</i> SHR.....	115
VI.8.4	Análise da resposta máxima hipotensiva e vasodilatadora induzida por intermédio das três moléculas, BTCl e peptídeos derivados, em ratos WR <i>versus</i> SHR.....	116
VI.9	Análise dos efeitos do BTCl, PepChy e PepTry na contratilidade ventricular esquerda e vasodilatação coronariana.....	119
VII	DISCUSSÃO.....	122
VIII	CONCLUSÃO.....	135
IX	– REFERÊNCIAS.....	137
ANEXO 1	– Tabelas.....	163
ANEXO 2	– Certificados.....	177
ANEXO 3	– Artigo.....	179

I INTRODUÇÃO

O reino vegetal apresenta uma extensa distribuição de proteínas com capacidade de inibir as atividades de proteases tais como: tripsina, quimotripsina e carboxipeptidase (BENDER, 1987; XAVIER-FILHO e CAMPOS, 1989). As serinoproteases são enzimas proteolíticas amplamente estudadas e caracterizadas bioquimicamente. Estão envolvidas em importantes processos fisiológicos, como a digestão e absorção das moléculas alimentares, a cascata de coagulação e a degradação de moléculas da matriz extracelular (NEURATH, 1989; POWERS et al., 2002).

A tripsina é uma serinoprotease do tipo endopeptidase encontrada no aparelho digestivo. É formada por uma cadeia de 223 resíduos de aminoácidos e contém seis ligações dissulfeto (HRUSKA et. al., 1969). A quimotripsina é uma serinoprotease do tipo endopeptidase encontrada no aparelho digestivo de vertebrados, onde atua principalmente na clivagem de proteínas. Estas serinoproteases clivam, predominantemente, cadeias peptídicas no lado carboxila dos aminoácidos carregados positivamente (lisina e arginina) e aromáticos (tirosina, triptofano, fenilalanina), respectivamente (ESTEVES, 2010). Por ser objeto desse estudo, a tripsina e a quimotripsina são aqui consideradas.

As serinoproteases são responsáveis pela catálise de reações de hidrólise em diferentes ligações peptídicas de compostos presentes nos organismos vivos. No entanto, a inibição da atividade das proteases pode ocorrer por meio da interação direta da protease com inibidores específicos que ao bloquearem o sítio catalítico participam da regulação das atividades proteolíticas dessas moléculas (KROWARSCH et al., 2003). Sendo assim, os inibidores específicos de proteases apresentam funções importantes na regulação da proteólise em diversos organismos, que, quando desregulada, pode conduzir a muitos estados de enfermidade, incluindo enfisema, derrame cerebral, câncer, mal de Alzheimer, inflamação e artrite (POWERS et.al., 2002). Para limitar esses danos potenciais, a ação dessas moléculas deve ser estritamente controladas.

Em diversos organismos e, de modo peculiar nos vegetais por não possuírem sistema de defesa inato como os animais padrões moleculares associados a patógenos, como partes de vírus, bactérias e fungos, são fundamentais para ativação de sistemas eficientes de defesa contra invasores. Nas sementes de

plantas, a ação dos inibidores de proteases representa importante estratégia de defesa contra predadores e patógenos, principalmente durante a germinação (ZHANG et al., 2008).

Em 2004, autores como Rawlings et al. descreveram que algumas plantas geneticamente modificadas, expressando inibidores de enzimas proteolíticas digestivas de insetos, pragas e pestes estavam cada vez mais sendo introduzidas em culturas agrícolas com resultados positivos para um vultoso aumento na resistência dessas plantas aos seus agentes agressores. Os inibidores de protease de plantas também estão sendo investigados por seu potencial na prevenção e/ou tratamento de um conjunto diverso de patologias humanas, incluindo doenças neurodegenerativas e cardiovasculares, câncer, atrofia muscular e processos inflamatórios (ARMSTRONG et al., 2000; SHARONY et al., 2010; SAFAVI e ROSTAMI, 2012; MEHDAD et al., 2016).

Ressalta-se ainda a existência de grande variedade de proteínas que são inibidoras de proteases a exemplo deste estudo que envolve um inibidor específico de proteases pertencente à família de inibidores Bowman Birk (BBI), o BTCI (do inglês *black-eyed pea trypsin/chymotrypsin inhibitor*) isolado a partir de sementes de feijão *Vigna unguiculata*. Este inibidor tem sido alvo de estudos biofísicos estruturais há mais de 40 anos no Laboratório de Biofísica Estrutural da Universidade de Brasília-UnB, estudos esses iniciados pelo saudoso Prof. Dr. Manuel Matheus Ventura e conduzidos posteriormente pela Profa. Dra. Sonia Maria de Freitas.

Estudos desenvolvidos por Álvares et al. (2014) mostraram que a inibição dessas serinoproteases pelo BTCI favorece a ação da bradicinina no organismo. Sendo assim, o uso concomitante de inibidores destas enzimas, pode ser uma das maneiras de potencializar a ação da bradicinina *in vivo*. Dados desse trabalho mostraram que o BTCI além de formar complexos com a bradicinina com constante de ligação na ordem de 10^4 M^{-1} pode atuar como carreador de bradicinina e ser uma estratégia para aumentar a meia-vida plasmática deste peptídeo.

Na presente tese, os peptídeos derivados do sítio reativo do BTCI foram sintetizados com base na estrutura do BTCI e testados quanto à atividade inibitória contra as proteases tripsina, quimotripsina e a enzima conversora de angiotensina (ECA). Esta enzima ECA é um componente central do sistema renina-angiotensina que atua no controle da pressão arterial regulando o volume de fluidos no corpo e convertendo angiotensina I em angiotensina II (vaso constritor). Considerando as

características apresentadas pelo BTCl e a semelhança dos peptídeos quanto à atividade inibitória, priorizamos o estudo desses peptídeos visando a caracterização funcional em sistema cardiovascular por meio de ensaios *in vivo* com ratos normotensos e espontaneamente hipertensos e *ex vivo* com corações isolados, em colaboração com Prof. Dr. Gustavo Rodrigues Pedrino e sua equipe (Laboratório de Neurociência e Fisiologia Cardiovascular, Universidade Federal de Goiás - UFG) e Prof. Dr. Carlos Carlos Henrique de Castro e sua equipe (Laboratório Integrativo de Fisiopatologia Cardiovascular e Neurológica, Universidade Federal de Goiás - UFG), respectivamente, que disponibilizaram a infraestrutura e métodos para a realização dos experimentos.

II REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

II.1 Pressão Arterial (PA) e Sistemas de Regulação

A pressão sanguínea foi definida como a pressão transmitida pelo sangue circulante às paredes das artérias e dependente de cinco fatores hemodinâmicos: débito cardíaco (DC) e energia da contração ventricular; quantidade de sangue circulante (volemia); qualidade do sangue e viscosidade sanguínea; elasticidade das artérias (ou resistência central); tonicidade e permeabilidade das arteríolas pré-capilares (ou resistência periférica). Em 1998, Araujo e Acuri afirmaram que a manutenção do aporte de oxigênio necessário aos tecidos e a remoção dos produtos catabólicos garantem a preservação das condições hemodinâmicas. Por isso, a PA (resultante do DC e da resistência dos vasos periféricos) é considerada um parâmetro significativo na avaliação do sistema cardiovascular. E para garantir a nutrição tecidual é necessário que a tensão na parede arterial atinja determinados níveis.

Da mesma forma, Abrams (1988), Scher (1989) e John (2007) relataram que a regulação da pressão sanguínea é um processo que envolve a integração de múltiplos sistemas de regulação do tônus vascular, tais como barorreflexo, vias hormonais, renais, vasculares, sistemas reguladores e regulação intrínseca exercida por mecanismos locais dentro de um tecido. Todos esses mecanismos modificam, no entanto, o débito cardíaco e a resistência vascular periférica são os dois parâmetros principais que mantêm o equilíbrio da pressão arterial sistêmica. Estas duas variáveis hemodinâmicas são fundamentais para o valor da pressão arterial e são definidas como oposição dos vasos sanguíneos que podem estar contraídos ou dilatados à circulação do sangue. Vale lembrar sobre a condutância vascular (CV) ser uma grandeza física relacionada à resistência vascular que aumenta proporcionalmente à quarta potência do diâmetro do vaso.

O conhecimento sobre a hemodinâmica, que é definida como o estudo das forças geradas pelo coração e do fluxo sanguíneo no sistema cardiovascular, com a finalidade de avaliar o desempenho é essencial para desenvolver ferramentas de diagnóstico e tratamento das doenças cardiovasculares. Pode ser subdividida em medidas diretas, efetuadas no paciente, como a frequência cardíaca (FC) palpada ou verificada por eletrocardiograma (ECG), e indiretas calculadas a partir das

variáveis diretas. César (2007) salienta a relação existente entre a FC e a estimulação adrenérgica, e que alterações bruscas na FC, podem desencadear óbito tanto em seres humanos como em animais. Por dificuldade de obtenção de valores *in vivo* de alguns parâmetros hemodinâmicos, tais como a pressão hemodinâmica e as tensões nas paredes de artérias, tem-se utilizado cada vez mais métodos de simulação computacional de fluxo sanguíneo baseados na dinâmica de fluidos (PERKTOLD et al., 1987; LIMA et al., 2017).

O corpo humano possui mecanismos diferentes para a regulação da pressão arterial. Alguns deles atuam rapidamente, outros lentamente. Operam em faixas de pressão baixa, normal e pressão alta. No mecanismo rim-líquidos corporais para o controle da pressão necessita-se de algumas horas antes que ele comece apresentar resposta significativa. Este mecanismo desenvolve resposta de *feedback* com ganho infinito para o controle da PA. O controle de pressão de ganho infinito se baseia no efeito da pressão arterial e da produção renal de água e sal. Na hipertensão, a saída torna-se maior do que a ingestão líquida de água e sal, e o corpo torna-se progressivamente desidratado até que essa desidratação faça com que a pressão volte ao normal, essa resposta é a causa do ganho infinito que irá determinar o nível de longo alcance da pressão arterial (GUYTON, et al., 1972).

A pressão arterial do adulto humano, durante cada dia, raramente se desvia do normal, (de 10% a 15%). Para alcançar tal constância, o corpo possui uma rede de sistemas de controle de pressão, dentre eles, vários são baseados em receptores neurais que respondem em segundos para ajudar na correção da pressão anormal. As atividades desses sistemas são seguidas em poucos minutos pela ativação de controladores hormonais. Dentro de horas ou dias, um sistema de controle da pressão renal é induzido a aumentar o volume de fluido corporal quando ocorre queda da pressão ou então diminuir o volume quando a pressão aumenta. Este sistema de fluido renal é o método dominante para estabelecer o controle de pressão em longo prazo (GUYTON, 1991).

Os autores acima consideram que é observada elevação na PA quando existe um aumento no débito cardíaco ou quando se produz uma vasoconstrição arterial periférica; e a redução da PA é observada quando o DC reduz ou quando produz-se uma vasodilatação arterial periférica. Esta relação pode ser representada como: Pressão Arterial = Débito Cardíaco + Resistência Periférica Total. Em 1985 foi

adicionado o termo da pressão do átrio direito (PAD) à fórmula original: $PA = DC \times RPT + PAD$.

O valor mais elevado e o mais baixo da PA, expressos em milímetros de mercúrio (mmHg), são correspondentes à pressão arterial sistólica (PAS) e à pressão arterial diastólica (PAD), respectivamente (POWERS e HOWLEY, 2017). Em indivíduos normotensos em repouso, a PAS deve ser menor que 140 mmHg e a PAD menor que 90 mmHg (Sociedade Brasileira de Cardiologia – SBC, 2016).

A PAS representa a pressão arterial máxima, e refere-se ao valor medido no momento da sístole ventricular, quando o ventrículo esquerdo se contrai e bombeia o sangue, proporcionando uma estimativa do trabalho do coração e da força que o sangue exerce contra as paredes arteriais durante a sístole. Por outro lado, na diástole avalia-se a PAD que corresponde à pressão arterial mínima. Nesta fase do ciclo cardíaco, o ventrículo esquerdo se relaxa correspondendo à resistência periférica ou a facilidade com que o sangue flui das arteríolas para dentro dos capilares. Também ocorre, durante a diástole, o recuo elástico natural das artérias, o que desencadeia uma pressão contínua, mantendo o fluxo constante de sangue para a periferia, até o próximo ciclo cardíaco (MC ARDLE et al., 2016).

Entretanto, a pressão arterial média (PAM) representa a pressão média exercida pelo sangue quando ele circula por meio das artérias. Ela pode ser estimada a partir da PAD e da PAS da seguinte maneira: $PAM = PAD + [0,333 \times (PAS - PAD)]$ (KENNEY et al., 2013). Em níveis adequados e razoavelmente constantes, Irigoyen et al. (2003) relataram que a PA garante a adequada perfusão dos tecidos corporais, esteja o indivíduo em repouso ou desenvolvendo diferentes atividades, sendo que, mecanismos complexos interagem-se para manter a pressão dentro de uma faixa relativamente estreita de variação.

II.2 Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS)

Conforme parâmetros da Organização Mundial de Saúde – OMS (2013), define-se a hipertensão arterial por valores pressóricos acima de 140 x 90 mmHg. Em agosto de 2004 foi apresentada pelo *The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure* uma nova categoria de pressão arterial: a pré-hipertensão. A pré-hipertensão e a pressão arterial “normal alta” são definidas pela *European Society of*

Hypertension and the European Society of Cardiology (PAS: 130-139 mmHg ou PAD: 85-89 mmHg) como precursoras da HA.

Fatores diversos como irregularidades na homeostasia de sódio também podem causar aumento da pressão arterial. Mesmo com a patogênese da hipertensão ainda por esclarecer, o consumo de sal é considerado uma das principais causas (COSTA et al., 1997; ITO et al., 1999; CONTRERAS et al., 2000; SACKS et al., 2001; RODRIGUEZ-ITURBE e VAZIRI, 2007; GOTTLIEB et al., 2008). Nota-se, na atualidade, expressivo aumento dos fatores de riscos associados ao desenvolvimento das doenças cardiovasculares, como o ritmo estressante da vida moderna; alimentações do tipo *fast foods* ricas em gordura, açúcar e sódio; o uso disseminado do tabaco e do álcool; além de diversas atividades profissionais que levam a longos períodos de inatividade física/sedentarismo. Nos dias atuais já não é novidade dizer que ao longo do tempo a elevação da pressão arterial poderá afetar órgãos como o coração e os rins, além de outros.

Estudos confirmam que, a resistência cardíaca seria maior com a pressão sanguínea elevada, pois, o estado de hipertensão acarreta um aumento da frequência e da força contrátil do músculo cardíaco, podendo comprometer a função cardíaca com o passar do tempo (ZILE, 2002; CINGOLANI et al., 2003; CHEN-IZU et al., 2007). Irigoyen et al. (2005) complementam estas informações ao relatarem que a maioria das alterações em diversos órgãos como os rins, cérebro e pâncreas estariam associadas à hipertensão arterial, e que são desencadeadas por mecanismos compensatórios secundários à elevação pressórica crônica.

Ainda que a ontogênese da hipertensão ainda não se encontra completamente elucidada, estudos tem demonstrado a influência do sistema nervoso central (SNC) no desenvolvimento da HA em humanos e em modelos animais (BERGAMASCHI et al., 1995; BERGAMASCHI et al., 1999; ITO et al., 2000; ALLEN, 2002; DAMPNEY et al., 2003; GUYENET, 2006). Dampney et al. (2003) e Guyenet (2006) ainda acrescentam que a ação do SNC na origem e manutenção da hipertensão provavelmente envolve a divisão simpática do sistema nervoso autônomo responsável pela inervação do coração, vasos, rins e a glândula adrenal. Alegação esta, ratificada pelos estudos de Tan et al. (2010) e Oliveira-Sales et al. (2014), que afirmaram sobre os distúrbios simpáticos estarem ligados ao aumento da PA.

Sabe-se que as características fisiopatológicas essenciais da hipertensão envolvem, além de outros fatores, aumento da resistência periférica total (BERNATOVA, 2014). De fato, alguns estudos demonstraram disfunção endotelial no tônus vascular em modelos animais hipertensos com a participação do óxido nítrico em diferentes modelos de hipertensão experimental (TOROK, 2008).

Dados epidemiológicos

Embora a hipertensão arterial sistêmica tenha sido identificada no final dos anos 50 como fatores de riscos primários, no início do século 21 ainda representa um desafio global de saúde pública, e estima-se que seja responsável em torno de 45% das mortes no mundo (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE – OMS, 2013).

Mozaffarian et al. (2016) desenvolveram dados epidemiológicos sobre a hipertensão arterial em pacientes norte-americanos com prevalência da HAS em 69% dos pacientes com primeiro episódio de infarto agudo do miocárdio (IAM) – necrose miocárdica resultante de obstrução aguda de uma artéria coronária – causando bloqueio do fluxo sanguíneo para o músculo cardíaco. Em 77% dos casos de acidente vascular encefálico (AVE) produzido por oclusão ou ruptura de um vaso sanguíneo que irriga o cérebro, um deles é o acidente vascular encefálico isquêmico derivado da oclusão de um vaso sanguíneo por coágulo, que pode se originar do próprio vaso obstruído (trombo) ou do coração ou de outro vaso (êmbolo); já o acidente vascular encefálico hemorrágico acontece após a ruptura de um vaso sanguíneo cerebral que pode acontecer tanto em um vaso contíguo ou junto ao cérebro, ou nas substâncias do cérebro. Em 75% com insuficiência cardíaca (IC) consequente do mau funcionamento do músculo cardíaco quando não consegue bombear ou ejetar adequadamente o sangue para fora do coração (sistólica), e também dos músculos do coração que ao enrijecerem não permitem com eficiência que as câmaras cardíacas sejam preenchidas com o sangue das veias pulmonares e cavas. E ainda 60% com doença arterial periférica (DAP) que resulta em diminuição do fluxo sanguíneo.

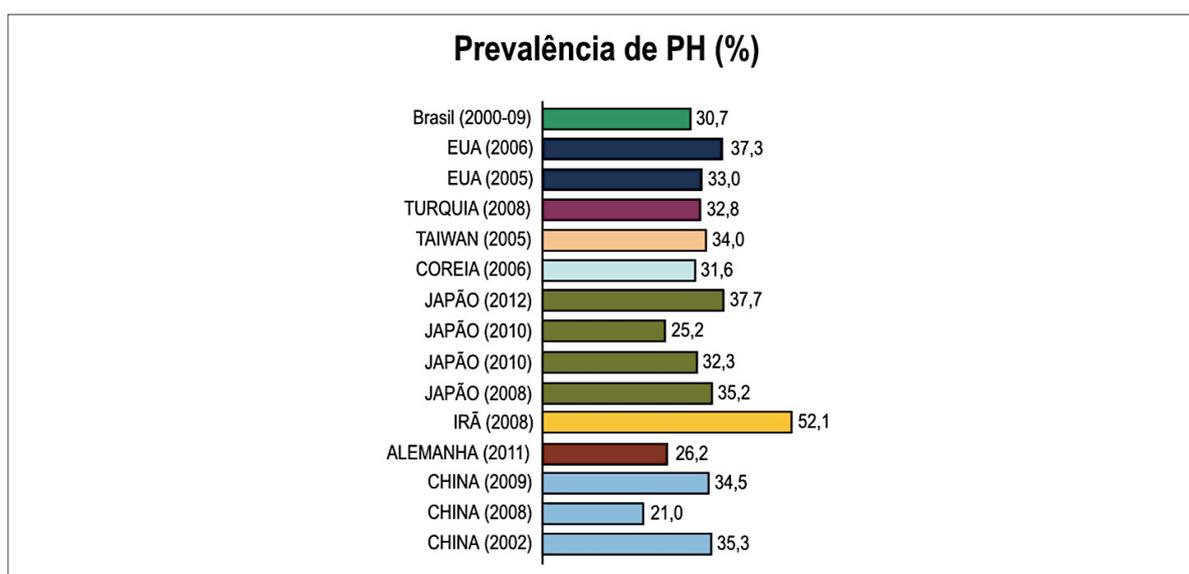
Quanto a HA e DCV no Brasil, Moreira e Paola (2015) evidenciaram que a HA atingiu em indivíduos adultos 32,5%, e nos idosos mais de 60%, e que a HA contribui, de forma direta ou indiretamente, em 50% das mortes por doenças cardiovasculares. As complicações nas modalidades cardíacas, renais e AVE,

causariam, em consequência da perda de produtividade do trabalho e da renda familiar, impacto elevado estimado em US\$ 4,18 bilhões entre 2006 e 2015.

Do total de óbitos ocorridos no Brasil em 2016, 57% corresponderam às dez principais causas de morte. As duas primeiras causas de morte mais frequentes no Brasil e no Mundo foram: doença cardíaca isquêmica (DCI), seguida pelo acidente cérebro vascular (ACV). Sendo que no Brasil a taxa bruta sobre o total de óbitos foi de 89,9% e 52,2%, respectivamente. A diabete *mellitus* ficou em 7º lugar no Brasil (27.6%) e no mundo (SAÚDE BRASIL, 2019).

Em estudos de base populacional, a prevalência mundial da pré-hipertensão variou entre 21% a 37,7%, com exceção do Irã que atingiu uma faixa de 52,1%, conforme demonstrado na figura 1 (CHOBANIAN et al., 2003; LIM et al., 2012; EGAN e STEVENS-FABRY, 2015; Revista Brasileira de Hipertensão, 2017).

Figura 1: Prevalência da pré-hipertensão.

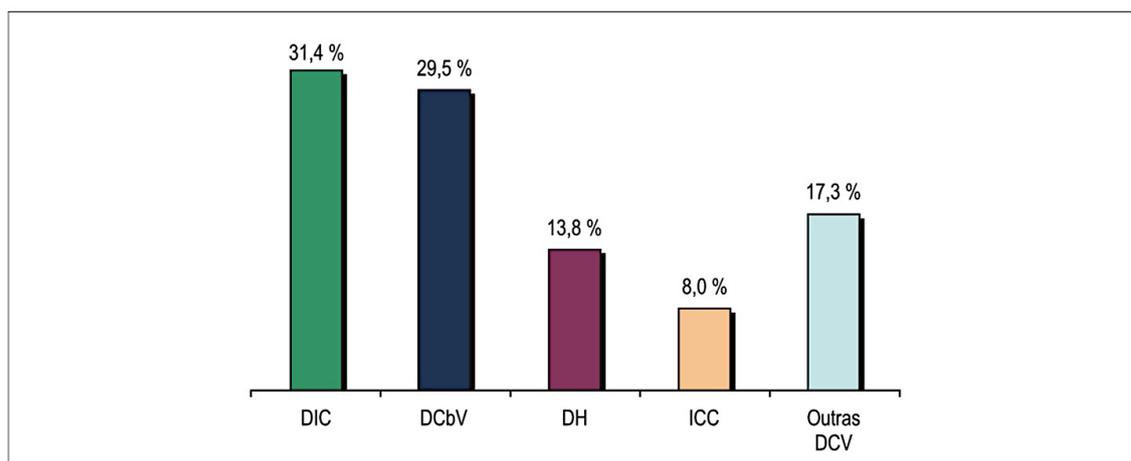


Fonte: **Revista Brasileira de Hipertensão**. Vol. 24, N° 1, p 12-17. 2017.

As DCV's são ainda responsáveis por alta frequência de internações com custos socioeconômicos elevados. A figura 2 mostra a taxa de mortalidade no Brasil por DCV's e a distribuição por causas no ano de 2013. Foram registrados 1.138.670 óbitos, 339.672 dos quais (29,8%) decorrentes de DCV's que é considerada a principal causa de morte no país (Revista Brasileira de Hipertensão, 2017) e que apenas uma pequena minoria de pacientes hipertensos apresenta somente uma elevação da PA. Lessa (2001) em seu artigo informa que no Brasil, a hipertensão

arterial representa a morbidade mais comum na população adulta e nos serviços de emergência.

Figura 2: Taxa de mortalidade no Brasil por doença cardiovascular e distribuição por causas no ano de 2013. DIC: doenças isquêmicas do coração; DCbV: doença cerebrovascular; DH: doenças hipertensivas; ICC: insuficiência cardíaca congestiva.



Fonte: **Revista Brasileira Hipertensão**. Vol. 24, Nº 1, p 12-17. 2017.

Patogenias

A pré-hipertensão e a pressão arterial “normal alta” são definidas pela *European Society of Hypertension and the European Society of Cardiology* (PAS: 130-139 mmHg ou PAD: 85-89 mmHg) como precursoras da HA conforme demonstram vários estudos a exemplo do de Abegunde et al. (2007) e Sanjuliani (2009) ao enfatizarem sobre a pré-hipertensão e a pressão “normal alta” estarem associadas ao aumento de riscos cardiovasculares e da mortalidade decorrente deles, além de estarem relacionadas ao aumento da incidência de diabetes tipo 2 (*Mellitus*) caracterizada por produção insuficiente de insulina ou por incapacidade do organismo de utilizar a insulina produzida pelo pâncreas de forma eficiente, e da síndrome metabólica, um conjunto de doenças quando associadas poderão levar ao aumento do risco de problemas cardiovasculares. Dados publicados pela OMS (2013) informam sobre as DCV's ser a causa mais prevalente de mortalidade e morbidade no mundo.

Autores acima informam sobre a pré-hipertensão e a pressão “normal alta” estarem associadas ao aumento de riscos cardiovasculares além de estarem

relacionadas ao aumento da incidência de diabetes tipo 2 (*Mellitus*). Já Lewington et al. (2003) e Weber et al. (2014) complementam sobre a hipertensão arterial ser considerada condição clínica multifatorial, pois encontra-se associada a distúrbios metabólicos, alterações funcionais e/ou estruturais de órgãos-alvo, com repercussões clínicas piores quando associada a outros fatores de risco, como dislipidemia, obesidade abdominal, intolerância à glicose e diabetes *mellitus*. Na tabela 1 está incluído apenas risco baixo, moderado e alto.

Tabela 1 – Classificação de risco no paciente hipertenso de acordo com fatores de risco adicionais, presença de lesão em órgão-alvo e de doença cardiovascular ou renal.

	PAS 130-139 ou PAD 85-89	HAS Estágio 1 PAS 140-159 ou PAD 90-99	HAS Estágio 2 PAS 160-179 ou PAD 100-109	HAS Estágio 3 PAS ≥ 180 ou PAD ≥ 110
Sem fator de risco	Sem Risco Adicional	Risco Baixo	Risco Moderado	Risco Alto
1-2 fatores de risco	Risco Baixo	Risco Moderado	Risco Alto	Risco Alto
≥ 3 fatores de risco	Risco Moderado	Risco Alto	Risco Alto	Risco Alto
Presença de LOA, DCV, DRC ou DM	Risco Alto	Risco Alto	Risco Alto	Risco Alto

PAS: pressão arterial sistólica; PAD: pressão arterial diastólica; HAS: hipertensão arterial sistêmica; DCV: doença cardiovascular; DRC: doença renal crônica; DM: diabetes *mellitus*; LOA: lesão em órgão-alvo.

Fonte: **Revista Brasileira de Hipertensão**. Vol. 24, N° 1, p 12-17. 2017.

Quanto à hipertensão arterial de longa duração e sem tratamento adequado, Chaddad Neto (2016) é reticente em afirmar que provoca alterações na superfície interna das artérias, facilitando a penetração das gorduras na parede arterial, contribuindo para o processo de arteriosclerose, com redução do diâmetro dos vasos e consequente *déficit* de irrigação sanguínea. Pode ocorrer ainda lesão isquêmica nos mais diversos órgãos, sendo mais comum no tecido cerebral, denominado Acidente Vascular Cerebral Isquêmico (AVCI). E, prossegue o autor, quando as lesões isquêmicas são múltiplas, desencadeiam quadros de demências.

Tomassoni et al. (2004) afirmam que, na vigência de HAS, o cérebro além de sofrer mudanças vasculares fica propenso a microaneurismas e isquemias, bem como podendo ocorrer redução no volume cerebral, aumento no volume dos ventrículos e perda neuronal. Portanto, a hipertensão compromete milhões de

peças em todo o mundo causando morbidade e mortalidade (CARRETERO e OPARIL, 2000; GUPTA et al., 2010).

Ainda que a HAS seja facilmente diagnosticada e controlada por meio de intervenções farmacológicas, algumas drogas disponíveis para o tratamento da hipertensão são ineficazes e/ou apresentam efeitos colaterais acentuados (ERLUND et al., 2008; SHUKLA et al., 2010) que, associados a alguns desses medicamentos pode causar limitações para alguns pacientes.

Substâncias usadas em tratamentos para HAS

O pirazol é uma substância tóxica, usada como agente quelante e em síntese orgânica. Mas, Grosse et al. (2014); Liu et al. (2014) e Mascia et al. (2014) são unânimes ao afirmarem que o pirazol apresenta propriedades analgésicas, anti-inflamatórias, antimicrobianas, anticonvulsivantes, antioxidantes, antitumorais e hipoglicêmicas. Estudos foram realizados com derivados de pirazol como inibidores da sintase de óxido nítrico neural e da sintase de óxido nítrico indutível (nONS e iONS); pirazóis como inibidores do canal de cálcio do tipo N 2,4,5,6-tetrahidrociclopenta [c] (WINTERS et al., 2014); vasorelaxante e inibidor da fosfodiesterase (FOLLMANN et al., 2013). Já o derivado sintético do pirazol 5-(1-(3-fluorofenil)-1H-pirazol-4-il)-2H-tetrazole (LQFM-21) apresenta atividade vasorelaxante (MARTINS, 2012).

Trindade et al. (2018) avaliaram os efeitos, via intravenoso e por cateter intragástrico, do LQFM-21 na pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC), condutância vascular renal (CVR), condutância vascular arterial (CVA), sensibilidade do barorreflexo (SBR) e reatividade vascular. A sensibilidade barorreflexo também foi analisada como uma razão de mudanças na FC e na PAM.

Esses autores constataram com a administração intravenosa aguda (iv) do LQFM-21 (0,05; 0,1; 0,2 e 0,4 mg kg⁻¹) reduziu a PAM e a FC, e aumentou a CVR e a CVA. A administração oral de LQFM-21 (15 mg kg⁻¹) por 15 dias reduziu a PAM sem alterar a SBR. O bloqueio dos receptores muscarínicos e a sintase do óxido nítrico por meio de infusão intravenosa de atropina e L-NAME (NG-nitro-L-arginina metil ester), respectivamente, atenuou os efeitos cardiovasculares do LQFM-21. Esses achados sugerem o envolvimento do receptor muscarínico e da via ON/GMPc (Óxido Nítrico/Monofosfato cíclico de guanosina) nos efeitos anti-hipertensivos e

vasodilatadores do LQFM-21. Os experimentos *ex vivo* mostraram que o LQFM-21 induziu um relaxamento dependente do endotélio em anéis aórticos isolados dos SHR's. Este efeito foi bloqueado pelo inibidor da guanilina ciclase (ODQ) e pelo L-NAME, levando Trindade et al. a concluir que esses achados sugerem o envolvimento do receptor muscarínico e da via ON/GMPc nos efeitos anti-hipertensivos e vasodilatadores do LQFM-21.

A HAS é facilmente diagnosticada e pode ser controlada por meio de intervenções farmacológicas. A maioria das classes de medicamentos anti-hipertensivos, em combinação ou não, e em doses baixas proporciona vários benefícios nas terapias anti-hipertensivas e em prevenção de doenças renais, cardiovasculares e não vasculares como a glaucoma e diabetes (LAW et al., 2009). Mas, Erlund et al. (2008) e Shukla et al. (2010) são claros ao dizerem que algumas drogas disponíveis no mercado para o tratamento da hipertensão são ineficazes e/ou possuem efeitos colaterais adversos.

Tem havido um interesse crescente no desenvolvimento de compostos naturais e alimentares que podem servir como alternativas para o tratamento da hipertensão com efeitos colaterais mais baixos que os anti-hipertensivos (ALUKO, 2015; MANSO et al., 2015). Estudos atestam que as plantas medicinais tem uma longa história no uso para o tratamento da hipertensão. São conhecidas por induzir hipotensão com efeitos colaterais mínimos (CHAN et al., 2000; CHEN et al., 2009; GREENWAY et al., 2011). Assim, é importante identificar novas moléculas com potencial terapêutico para o tratamento da hipertensão e outras doenças cardiovasculares.

II.3 Anti-hipertensivos

Dentre os princípios gerais para o uso do tratamento medicamentoso na HAS, e por recomendações da Sociedade Brasileira de Cardiologia – SBC (2016) e visando o bem estar do enfermo, destaca-se que a adesão ao tratamento e o mínimo de efeitos colaterais dos medicamentos estão na escolha de anti-hipertensivo adequado a cada paciente, assim como avaliação criteriosa para indicar a associação de anti-hipertensivos em hipertensos classificados como estágio 2 quando a Pressão Sístólica (PS) estiver variando entre 160-179 mmHg e a Pressão

Diastólica (PD) entre 100-109 mmHg; e como estágio 3: PS = 180 mmHg e PD 110 mmHg.

Agindo na musculatura da parede vascular, os vasodilatadores diretos contribuem para o relaxamento muscular, influenciando a redução da resistência vascular periférica e a vasodilatação arterial. Provocam, assim, uma retenção hídrica e taquicardia reflexa. Por isso, geralmente são usados em associação com diuréticos e/ou betabloqueadores, e contraindicados como monoterapia anti-hipertensiva. As classes de anti-hipertensivos atualmente consideradas preferenciais para o controle da PA em monoterapia inicial são diuréticos (DIU), inibidores da enzima de conversão da angiotensina (IECA), bloqueadores dos canais de cálcio (BCC), bloqueadores do receptor de angiotensina (BRA) e betabloqueadores (BB) conforme descritos abaixo.

Os DIU's exercem ação anti-hipertensiva mediante redução da volemia e atuam diretamente nos néfrons que são as unidades funcionais dos rins. Promovem a excreção de sódio e potássio, diminuindo a osmolaridade plasmática com consequente redução do volume plasmático. Podem ser classificados de acordo com os efeitos predominantes em diferentes pontos do néfron. Cada categoria, em função de intensidade de efeito diurético e das propriedades farmacocinéticas é usada preferencialmente em determinadas patologias.

Conforme esclarece a Sociedade Brasileira de Cardiologia (2016), os DIU's de alça, tiazídicos (que atuam no rim) e poupadores de potássio são os anti-hipertensivos preferencialmente utilizados no tratamento da HAS. Os efeitos colaterais estão diretamente relacionados à dosagem utilizada, e destaca-se: hipopotassemia (baixa concentração de íon potássio no sangue), arritmias ventriculares secundárias à hipomagnesemia (deficiência nutricional caracterizada por níveis sanguíneos (séricos) de magnésio), intolerância à glicose e disfunção sexual dentre outros.

Os inibidores adrenérgicos (atuam em receptores β -adrenérgicos e α -adrenérgicos, pré e pós-sinápticos) de ação central com atuação estimulativa no sistema nervoso central nos receptores α -2-adrenérgicos pré-sinápticos, reduzindo o tônus simpático. Geralmente como monoterapia apresenta efeito hipotensor discreto. Contudo, tem demonstrado grande utilidade quando usados em associação com medicamentos de outros grupos, principalmente quando há evidência de hiperatividade simpática. Tem como principais reações adversas sonolência, boca

seca, fadiga e disfunção sexual. Dependendo do inibidor de ação central usado pelo paciente poderá provocar anemia hemolítica (ruptura das hemácias) e lesão hepática (Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2016).

O mecanismo anti-hipertensivo dos β -bloqueadores envolve a redução inicial do débito cardíaco e das catecolaminas, além de readaptação dos barorreceptores e redução da secreção de renina, acionando o sistema renina-angiotensina-aldosterona nos rins. Os β -bloqueadores de 3ª geração também desencadeiam uma vasodilatação sistêmica. São eficazes em monoterapia anti-hipertensiva, sendo a primeira opção em pacientes hipertensos que apresentam doenças coronarianas e/ou arritmias cardíacas associadas. São contraindicados para asmáticos, portadores de doenças pulmonares obstrutivas crônicas (DPOC) e bloqueio atrioventricular grave. Podem causar, mais frequentemente, intolerância à glicose e dislipidemias (DULIN e ABRAHAM, 2004; PEDERSEN e COCKCROFT, 2007).

Segundo Doumas et al. (2006), os α -bloqueadores, como monoterapia, apresentam a longo prazo efeito hipotensor discreto, necessitando, para melhor efeito, de associações com outros anti-hipertensivos. Apresentam tolerância medicamentosa, sendo necessário ajustes crescentes de doses. Oferecem melhora discreta no metabolismo lipídico e glicídico e também nos sintomas de hipertrofia prostática benigna. Em suas reações adversas estão palpitações, astenia (perda ou diminuição das forças físicas) e alguns podem contribuir para insuficiência cardíaca congestiva, não sendo um medicamento de primeira escolha para hipertensos.

Os antagonistas dos canais de cálcio apresentam ação anti-hipertensiva devido a redução na resistência vascular periférica, pois reduzem a concentração de cálcio nas células musculares lisas vasculares. Stassen et al. (1997); Hansson et al. (1999); Neal et al. (2000) e Dahlof et al. (2005) consideram os bloqueadores dos canais de cálcio, anti-hipertensivos eficazes por reduzirem tanto a morbidade como a mortalidade cardiovasculares. Mas, Lubsen et al. (2005) ponderam utilizar, de preferência, os BCC de longa duração e com ação específica ou por formulação galênica (medicamentos preparados com plantas), que permita uma liberação controlada do medicamento continuamente por 24 horas, de forma que o paciente não precise tomar comprimidos várias vezes ao dia. Ainda enfatizam a eficácia, a tolerabilidade e a segurança do uso dessa classe de medicamentos no tratamento da HAS em coronariopatas. Relata-se cefaléia, rubor facial, tontura, obstipação

intestinal, depressão miocárdica e bloqueio atrioventricular como efeitos colaterais possíveis dentre outros.

Os inibidores da enzima conversora da angiotensina (IECA) atuam inibindo a ECA, componente central do sistema renina-angiotensina, impedindo que a angiotensina I transforme em angiotensina II no sangue e nos tecidos, embora outros fatores possam estar envolvidos nesse mecanismo de ação. Diversos autores respaldam a eficácia do IECA no tratamento de pacientes com insuficiência cardíaca, HAS e na prevenção secundária do acidente vascular encefálico (Medical Research Council Working Party, 1985; GARG e YUSSUF, 1995; HANSSON et al., 1999; HANSSON et al., 1999; FLATCHER et al., 2000; Progress Collaborative Group, 2001; WHITE, 2007). Já em 1993 Lewis et al., e em 1997 Giatra et al., afirmaram que quando os IECA são administrados a longo prazo pode acontecer retardamento no declínio da função renal em pacientes com nefropatia diabética ou de outras etiologias. Outras reações adversas seriam alteração do paladar, tosse seca, hiperpotassemia (aumento excessivo da taxa de potássio no sangue), danos ao feto intra-útero dentre outras.

Os bloqueadores dos receptores AT1 da angiotensina II são considerados eficazes no tratamento da hipertensão arterial, principalmente em populações com alto risco cardiovascular ou comorbidades associadas à HAS (DAHLOF et al., 2002; LINDHOLM et al., 2002; The Ontarget Investigators, 2008). Estudos corroboram o benefício desses bloqueadores na insuficiência cardíaca congestiva e na prevenção de acidente vascular cerebral (HANSSON et al., 1999; COHN e TOGNONI, 2001; LINDHOLM et al., 2002; SCHRADER, 2003; PAPADEMETRIOU, 2004; KONSTAM et al., 2009). Comparações entre estudos recentes (metanálise) abalizam que entre bloqueadores do receptor de angiotensina II e IECA existe equivalência na redução de eventos coronarianos, quanto à proteção cerebrovascular (STRAUSS, 2005; CHEUNG, 2006; REBOLDI et al., 2008). Foram relatadas como principais reações diversas, tontura e muito raramente reação de hipersensibilidade cutânea (*rash*), apresentando bom perfil de tolerabilidade. As precauções para seu uso são semelhantes às descritas para os IECA (Sociedade Brasileira de Cardiologia – SBC, 2016).

O aliscireno (ou alisquireno), inibidor da renina, promove uma inibição direta na ação desta, ocasionando redução na formação de angiotensina I e, conseqüentemente, reduzindo os níveis de angiotensina II que é um potente

vasoconstritor. Assim, ocorre uma vasodilatação sistêmica, com posterior redução da PA (MÜLLER et al., 2008; WUERZNER E AZIZI, 2008). Além de ativo por via oral, o aliscireno é considerado como melhor opção quando se deseja o bloqueio na ação do sistema renina-angiotensina-aldosterona com menos eventos adversos (MATHIAS et al., 2003; CAGNONI et al., 2010). Estudos confirmam que o tratamento com aliscireno pode originar pequenas reduções de hemoglobina e do hematócrito, mas não existem relatos de anemia (FISHER e HOLLENBERG, 1995; WOOD et al., 2003). Entre os efeitos adversos do aliscireno, citam-se crises de nasofaringite, cefaléias, tonturas, fadiga, distúrbios gastrointestinais e erupção cutânea, além de hiperpotassemia e até comprometimento da função renal em pacientes com doenças nefrovasculares (BROWN, 2008).

Sobre a administração de polifármacos simultaneamente e em tratamento prolongado (mais de 3 meses) ao paciente, Muniz et al. (2017) citam os resultados de entrevistas a 239 idosos. Revelam que os problemas de saúde totalizaram em 955 diferentes doenças, sendo que, a hipertensão arterial foi a mais prevalente em 167 (43,2%) dos entrevistados. Ao serem questionados informaram sobre os medicamentos consumidos que totalizaram em 1358 diferentes espécies. Entre os idosos entrevistados, 232 (97,1%) fizeram uso de algum tipo de medicamento nos quinze dias que antecederam a entrevista, sendo que 150 (62,8%) consomem cinco ou mais medicamentos. Os medicamentos mais usados para o sistema cardiovascular aparecem com mais frequência (30,2%), sendo os anti-hipertensivos os mais utilizados (8,10%).

Manso et al. (2015) alertam sobre o prejuízo à saúde com o uso indiscriminado de polifármacos, pois a ingestão de fármacos exige mudança comportamental que requer maior determinação, tanto do idoso como da equipe de saúde, tornando relevante citar Pinto (2013) ao mencionar que as principais barreiras para o controle da HAS é a dificuldade para se implementar motivação adequada para o paciente aderir ao tratamento, assim como o desenvolvimento de ações que resultem em mudança de hábitos e estilo de vida. Acresce ainda que as dificuldades econômicas para a aquisição de medicamentos são determinantes, além da escassez de medicamentos diversificados em farmácias populares.

Por causarem efeitos colaterais negativos e desagradáveis em alguns pacientes esses medicamentos anti-hipertensivos tem contribuído para redução da adesão ao tratamento medicamentoso prescrito (BREMNER, 2002; LAW et al., 2009;

TAMARGO et al., 2015); levando a crer sobre a importância de identificar novas moléculas, como compostos naturais e sintéticos ou modificados para o desenvolvimento de fármacos com potencial terapêutico para o tratamento da hipertensão e outras doenças cardiovasculares (MANSO et al., 2015; WRÓBLEWSKA et al., 2013).

Desse modo, os compostos obtidos a partir de plantas medicinais, em diferentes formas, podem apresentar bons índices de custo-benefício com relação aos efeitos hipotensivos e vasodilatadores, contribuindo para o tratamento de doenças cardiovasculares, bem como podem representar uma alternativa para o tratamento da HAS (ERLUND et al., 2008; SHUKLA et al., 2010). Neste contexto, os peptídeos bioativos, geralmente encriptografados na estrutura primária de proteínas de origem de alimentos e inativos até serem liberados por hidrólise enzimática, tem sido alvo de estudos nesta área (ALUKO, 2015).

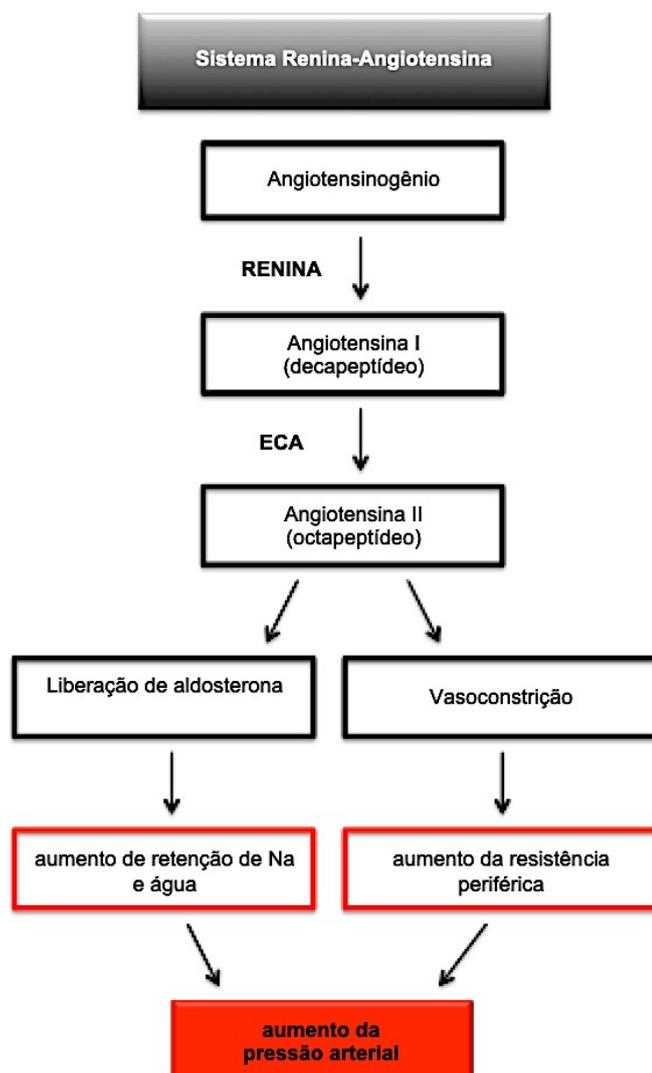
II.4 Enzima Conversora de Angiotensina (ECA)

Dentre os mecanismos mais eficientes para controle da PA destaca-se o sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA). Conforme afirmação de Sanjuliani et al. (2011), o SRAA exibe ação mais lenta porém, mais prolongada, pois quando ocorre a redução de concentrações de sódio nos rins e no coração – a hipoperfusão renal e/ou hipotensão sistêmica, a enzima glicoproteolítica (denominada renina) é liberada no sangue pelas células justaglomerulares das arteríolas aferentes dos rins a partir da pró-renina, seu precursor inativo que é constituída por 43 resíduos de aminoácidos que, após hidrólise por enzimas tipo tripsina como a calicreína, ativa a renina.

A renina cliva a angiotensinogênio, uma glicoproteína secretada sobretudo pelo fígado, liberando o decapeptídeo angiotensina I (A-I). A enzima conversora de angiotensina (ECA) produzida principalmente pelas células endoteliais do pulmão, age sobre a A-I excluindo dois aminoácidos da porção carboxiterminal, liberando o octapeptídeo angiotensina II (A-II) com potente propriedade vasoconstritora. A angiotensina II age sobre o córtex da adrenal, levando à produção de aldosterona, que, por sua vez atua nos túbulos renais estimulando a retenção e absorção de sódio. Assim, por mecanismos osmóticos, a água também tem sua absorção

aumentada e, como consequência desta cascata de reações, ocorre aumento da volemia e hipertensão arterial (Figura 3).

Figura 3: Fluxograma. Sistema Renina-Angiotensina demonstrando a atuação da enzima conversora da angiotensina I (ECA) no controle da hipertensão.



A ECA leva à diminuição da pressão arterial diminuindo a bradicinina, responsável pela liberação de prostaciclina e óxido nítrico nos vasos sanguíneos (PEACH, 1977; NATESH et al., 2003; BEUSCHLEIN, 2013). Os IECA's são amplamente utilizados para o tratamento da hipertensão, insuficiência cardíaca, enfarto do miocárdio, nefropatia diabética e na prevenção secundária do acidente vascular encefálico (Medical Research Council Working Party, 1985; GARG e YUSSUF, 1995; HANSSON et al., 1999; HANSSON et al., 1999; FLATCHER et al., 2000; Progress Collaborative Group, 2001; WHITE, 2007; AKIF et al., 2011).

Estudos sugerem que a hipertensão e o estresse oxidativo são interdependentes (ALEXANDER, 1995; KUNSCH, C. e MEDFORD, 1999). Assim sendo, os IECA's com propriedades antioxidantes são considerados benéficos para o tratamento da hipertensão (AKIF et al., 2011). Também constatou-se que os compostos de selênio exibem melhor comportamento antioxidante que os análogos de enxofre (MUGESH et al., 2001; KUMAR et al., 2007), do mesmo modo que os pesquisadores Cushman et al. e Ondetti et al. apresentaram em 1977 vários análogos de selênio do captopril (SeCap), inibidor da ECA. Foi também demonstrado que os análogos de SeCap além de inibir a atividade da ECA também pode eliminar o oxidante peroxinitrito (ONOO^-) (BHUYAN e MUGESH, 2011). As mesmas interações desempenham um papel importante na estabilização da interface dos análogos de ECA-lisinopril e selênio dos complexos de captopril (NATESH et al., 2003; AKIF et al., 2011).

Em 1998, Gödecke et al. asseguraram, sobre a hemodinâmica coronariana na sintase do ON endotelial em ratos nocauteados, que existe o envolvimento da via da eNOS/ON no tônus vascular das artérias coronárias. Essa afirmação também é respaldada por Souza et al. (2013) no estudo sobre o bloqueio do receptor tipo 1 da angiotensina II, onde os autores afirmam que, com o bloqueio restaura-se a vasodilatação coronária induzida pela angiotensina (1-7), fato comprovado em corações hipertróficos de ratos.

O papel modulador da sintase endotelial do óxido nítrico na contração e relaxamento é avaliado à luz de outros estudos que também mostraram o envolvimento do ON na contratilidade miocárdica (MASSION e BALLIGAND, 2003; ZHANG et al., 2014). Já a ativação da proteína quinase dependente de GMPc (PKG) acontece por meio de um ciclo que a partir do aminoácido arginina ocorrerá a ativação da enzima ON sintase, formando o ON, e ativando assim, a enzima guanililciclase para converter a guanosinatrifosfato (GTP) em guanosinamonomofosfato cíclico (GMPc) que, com a concentração aumentada tem efeito vasodilatador. Essa GMPc, quando aumenta a concentração, ativa a PKG que abrirá canais para potássio. A ativação da PKG também promove o relaxamento ao abrir os canais para potássio. Souza et al. (2013) corroboram quando afirmam que a ativação da PKG pode bloquear os canais de Ca^{2+} tipo L na membrana plasmática do cardiomiócito e reduzir a contratilidade ventricular.

Alguns peptídeos contendo resíduos carregados (arginina e/ou lisina), hidrofóbicos (valina, isoleucina, prolina) e principalmente aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina) foram identificados como inibidores potentes da ECA e agentes anti-hipertensivos (NAKAMURA et al., 1995; IWANIAK et al., 2014). Da mesma forma, Yang et al. (2004) e Aluko (2015) também afirmaram sobre alguns peptídeos bioativos terem capacidade de modular o sistema renina-angiotensina diminuindo a atividade da renina ou da ECA que são consideradas como as duas principais enzimas que regulam a pressão sanguínea dos mamíferos e da via de síntese do ON. Entre eles, os peptídeos com alta potência anti-hipertensiva foram projetados com base na posição de clivagem de aminoácidos da cadeia lateral. Alguns deles contendo resíduos carregados (arginina e/ou lisina), hidrofóbicos (valina, isoleucina, prolina) e principalmente aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina) foram identificados como potentes inibidores da ECA e agentes anti-hipertensivos (NAKAMURA et al., 1995; IWANIAK e DAREWICZ; 2014).

Hernández-Ledesma e Hsieh (2013) sugeriram que a carga positiva da lisina e arginina, como resíduos da região carboxi-terminal, deve contribuir para o potencial inibitório desta enzima. Cian et al. (2015), ao analisarem as propriedades antioxidantes e anti-hipertensivas de hidrolisados de glúten de trigo, mostraram atividades anti-hipertensivas de um peptídeo de massa molecular de 5,5 kDa. Adicionalmente, Yang et al. (2011) identificaram no germe de trigo quatro peptídeos (VEV, NPPSV, QV, AMY) e um aminoácido (W) com propriedade anti-hipertensiva.

Esses peptídeos anti-hipertensivos também podem aumentar a via eSON para aumentar o nível de óxido nítrico dentro das paredes vasculares e promover vasodilatação. Os mesmos podem bloquear as interações entre os receptores da angiotensina II (vasoconstritor) e da angiotensina, que podem contribuir para a redução da pressão arterial. Uma base de dados BIOPEP de peptídeos biologicamente ativos, incluindo os inibidores da ECA, e a sequência de aminoácidos está disponível em <http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/pl/biopep> (IWANIAK et al., 2016). As plantas que fazem parte da dieta dos seres humanos contêm diversas moléculas com potencial anticarcinogênico sem efeitos colaterais severos. Dados epidemiológicos sugerem que o consumo regular de plantas da família Leguminosae a exemplo de feijões, ervilhas e soja está associado a baixas taxas de incidência e mortalidade por câncer, notadamente contra os cânceres de mama, cólon e próstata (KENNEDY, 1998).

Assim, é importante identificar novas moléculas com potencial terapêutico para o tratamento da hipertensão. Neste sentido, este estudo pretendeu contribuir para a pesquisa de novos compostos naturais (peptídeos derivados do BTC1 da família BBI) capazes de minimizar efeitos colaterais e possibilitar opções de tratamentos menos dispendiosos para portadores de HAS a partir da análise de parâmetros hemodinâmicos e cardiovasculares.

II.5 Plantas bioativas

Em 1962 Balbach já alertava sobre o homem que desde os mais remotos tempos, já experimentava espécies e diferentes partes dos vegetais buscando a cura para as doenças. Segundo este autor, pesquisadores e historiadores afirmam que esse é um costume tão antigo quanto o aparecimento do homem.

Na década de 50 surgiram diversas pesquisas como a dos radicais livres que contribuiu para avançar nos conceitos sobre saúde e doença, onde as plantas medicinais são a essência para uma vida saudável (MORAIS, 2001). Esse *boom* contribuiu para ressurgência do interesse e potencial resgate das plantas bioativas associadas ao resgate cultural, social e econômico. Schiedeck (2006) conceitua como sendo plantas bioativas as espécies vegetais que têm ação sobre outros seres vivos, seja pelo efeito de sua presença num espaço, ou por uso direto da extração de suas substâncias.

O interesse em conhecer e empregar as plantas na saúde humana vem sendo estimulado pela OMS que recomenda políticas públicas para o uso da medicina complementar nos sistemas de saúde. A constituição brasileira observa esta orientação ao dispor sobre a integralidade da atenção no Sistema Único de Saúde (SUS), por meio da portaria 971(03/05/2206), que aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no SUS, considerando a Fitoterapia como recurso terapêutico caracterizado pelo uso de plantas medicinais em suas diferentes formas farmacêuticas e que tal abordagem incentiva o desenvolvimento comunitário, a solidariedade e a participação social.

Nesta perspectiva, cada vez mais surgem pesquisas com plantas bioativas como a título de exemplo, o presente estudo que pesquisou novos compostos naturais, peptídeos derivados do BTC1, capazes de minimizar efeitos colaterais e possibilitar opções de tratamentos menos dispendiosos para portadores de HAS.

II.6 Família de Inibidores Bowman-Birk (BBI)

Os inibidores de proteases são moléculas fundamentais no controle de vários processos celulares além de constituir um mecanismo inato de defesa em plantas protegendo-as de ataque de microrganismos e insetos. A classificação das proteases é baseada em sua função, especificidade, estrutura tridimensional, comparação dos sítios ativos e mecanismo catalítico (GRZONKA et.al., 2001; POWERS et.al., 2002). Em 2005, Cai et al. afirmaram ser em seis famílias a classificação das proteases: serina, treonina, cisteína, aspártico, metaloproteases e proteases de ácido glutâmico.

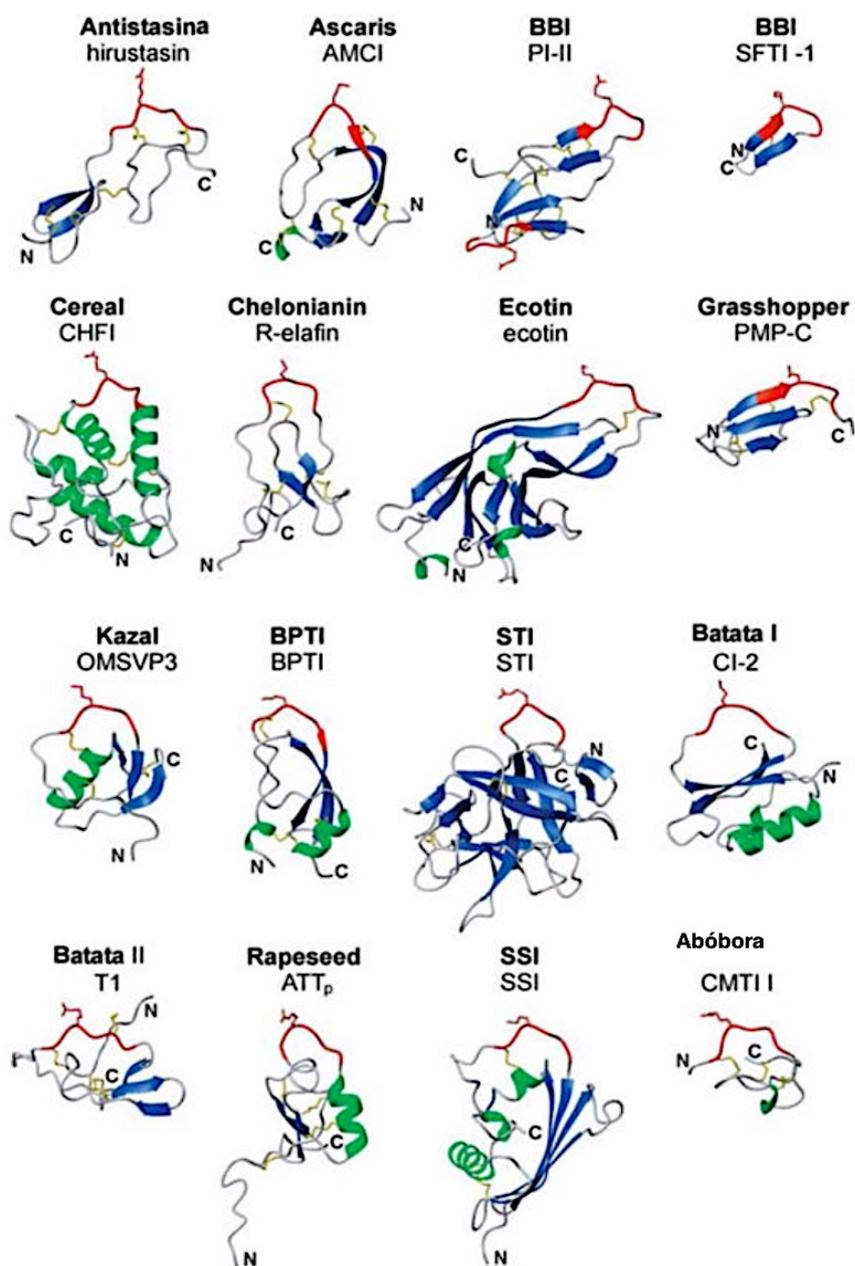
As proteínas inibidoras de proteinases, denominadas BBI, contêm duas regiões inibitórias, cada uma das quais é encapsulada dentro de *loop* com nove resíduos ligados por ponte de dissulfeto. Em 1992, Chen et al informam que por seu número de resíduos de aminoácidos; número de ligações dissulfeto; e possuírem dois domínios homólogos e simétricos, a família dos BBI distinguem de outras famílias. Odani e Ikenaka em 1973 declararam em seus estudos que os inibidores BBI poderiam, sem perder a atividade inibitória ser, fracionados em duas porções inibitórias.

Sobre a evolução convergente de proteína estão os inibidores de proteases com estruturas canônicas, pois, várias vezes, uma função biológica semelhante foi efetuada durante a evolução ao preservar a conformação do *loop* canônico em muitas proteínas independentes (LASKOWSKI e QASIM, 2000). Dobramentos diferentes de estruturas inibitórias em diferentes famílias são normalmente encontrados em plantas como abóbora e batata tipos I e II, BBI, Kunitz tipo STI e Rapeseed podem ser observados na figura 4 em uma adaptação de Esteves (2010). As famílias encontradas em animais são: Antistatina, Ascaris, Chelonianian, Grasshopper, Kazal e Kunitz tipo BPTI. Já a família Ecotin é encontrada em microorganismos (KROWARSCH et al., 2003).

As serinoproteases possuem um sítio ativo que é envolvido por duas alças flexíveis em forma de bolsão que permite o acesso de substratos ou inibidores com formas complementares.

Figura 4: Representação das estruturas dos inibidores com *loops* canônicos e resíduos P1 destacados em vermelho. A estrutura secundária está colorida em azul

(folhas- β) e verde (α -hélice). Nome da família do inibidor em negrito e nome do representante indicado logo abaixo.



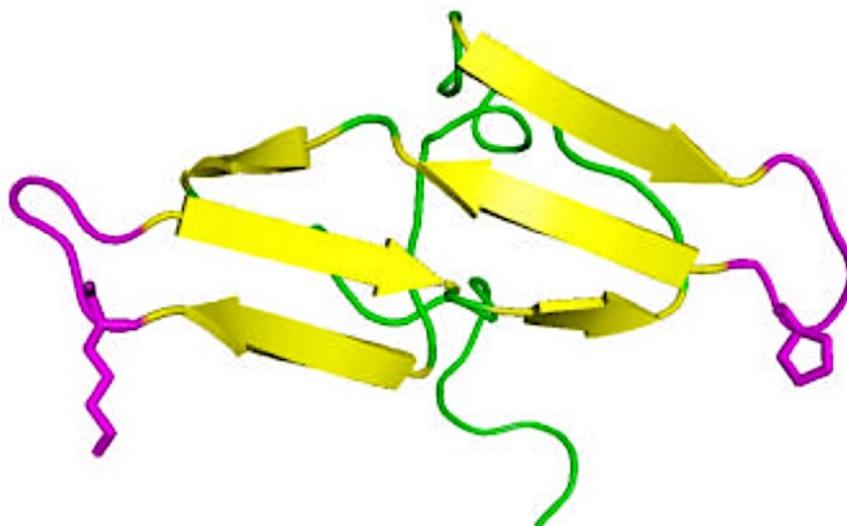
Fonte: KROWARSCH, D.; CIERPICKI, T.; JELEN, F.; OTLEWSKI, J. Canonical protein inhibitors of serine proteases. **Cellular Molecular Life Science**. Vol. 60, p 2427-2444. 2003. Adaptação de Esteves, 2010.

Em 1992, Bode e Huber asseguraram que formação desses sítios acontece por meio dos resíduos de aspartato, serina e histidina (tríade catalítica) e estão envolvidos com a hidrólise das ligações peptídicas. Schecthe e Berger em 1967 demonstraram que os aminoácidos que formam a ligação peptídica a ser hidrolisada

por essas enzimas são designadas como P₁ e P₁', e os outros resíduos que interagem com a enzima na região de especificidade são denominados como P₄ e P₂ (região N-terminal) e como P₂' e P₄' (região C-terminal).

A caracterização inicial dos BBI aconteceu em sementes de soja isoladas e caracterizadas por Bowman em 1946 e Birk et al. em 1963. O BBI é amplamente distribuído tanto em sementes de leguminosas (NORIOKA e IKENAKA, 1983) como de gramíneas (ODANI et.al., 1986), em cereais e em folhas e caules danificados (ROHRMEIER e LEHLE, 1993; McGURL et. al., 1995; RAKWAL et. al., 2001). Laskowski e Qasim (2000) citam que dentre os inibidores de proteases alguns dos mais estudados são aqueles pertencentes à família BBI, a exemplo do inibidor Bowman-Birk isolado da soja que é o mais estudado membro dessa família, sendo referenciado como "BBI clássico". A estrutura tridimensional de um BBI isolado de soja está disponível figura 5 com os dois sítios reativos P1, lisina e tirosina.

Figura 5: Estrutura tridimensional de um inibidor da família Bowman Birk isolado de soja (PDB: 1bbi). Em magenta, os dois sítios reativos P1, lisina (à esquerda) e tirosina (à direita).



Fonte: ESTEVES, Gisele F. **Resolução da estrutura tridimensional do inibidor trípico e quimotríptico de vigna unguiculata em complexos binário e ternário.** 2010. 163 f. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) – Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, Brasília/DF. 2010.

Os BBI possuem proteínas altamente estáveis contendo de 60 a 90 resíduos de aminoácidos e com a massa molecular de 8 a 10 kDa. São constituídos por uma cadeia polipeptídica com duas ou mais regiões internas repetidas. Essas proteínas

possuem como característica a tendência à formação de dímeros (LASKOWSKI e KATO 1980; BIRK, 1985; KUMAR e RAO, 2004; RAO e SURESH, 2007).

Fisiologicamente, os BBI estão associados em suas principais funções com a regulação de proteínas endógenas, reserva de aminoácidos sulfurados (RICHARDSON, 1977) e defesa contra o ataque de patógenos e insetos. No último caso, os BBI parecem atuar inibindo a atividade proteolítica das enzimas digestivas desses organismos, interferindo em seu desenvolvimento e reprodução (TANAKA et. al., 1996; POMPER MAYER et. al., 2001; TIFFIN e GAUT, 2001).

O BBI demonstrou capacidade para suprimir atividade antitumoral em células *in vitro* e em sistemas modelos. Da mesma forma, em estudos realizados com animais, a ingestão do inibidor de protease específico derivado da soja foi atestada como potente efeito antiinflamatório (KENNEDY, 1993; TIKHONOVA et. al., 1994; KENNEDY, 1998). Já Sampath e Padmanabhan (2008) expandiram o potencial da aplicação dos BBI para reproduzir um importante efeito inibitório na protease viral NS3 que é essencial para a replicação do vírus da dengue.

Joanitti et al. (2006) descrevem que o BBI, isolado de sementes de soja, é considerado inibidor com potencial para aplicações na obtenção de plantas geneticamente modificadas e em estudos biomédicos. Xavier-Filho (1992) acrescenta que inibidores da família BBI são amplamente estudados por serem parte do mecanismo de defesa que as plantas usam contra microrganismos e ataque de insetos. Esses inibidores apresentam capacidade de inibição contra a tripsina e/ou quimotripsina simultaneamente utilizando dois sítios ativos independentes (LASKOWSKI e KATO, 1980; RICHARDSON, 1981; FREITAS et al., 1999).

As áreas, cardiovascular; inflamatória; doenças infecciosas e o câncer são as de maiores interesses para terapias com o uso de inibidores de proteases. O BBI tem sido utilizado com resultados promissores nessas áreas. Do mesmo modo, a participação dos inibidores de proteases tem acontecido em estudos farmacológicos que objetivam a terapia das doenças neurodegenerativas. Vale dizer que o BBI derivado da soja quando testado também mostrou resultados em estudos da esclerose múltipla (GRAN et al., 2006; TOUIL et al., 2008).

Kennedy (1998) descreve em seu estudo que os BBI de leguminosas exibem uma extraordinária atividade anticarcinogênica e radioprotetora. Estas afirmações são corroboradas no estudo de Dell'aica et al. (2007), que acrescentam que

possivelmente o referido efeito anticarcinogênico pode ser resultado da inibição proteolítica gerada pelas células modificadas que necessitam das proteases para que ocorra metástase; angiogênese tumoral; crescimento tumoral e proliferação. Estudos *in vivo* demonstraram a capacidade dos BBI em prevenir e até mesmo suprimir o desenvolvimento de alguns tipos histológicos de cânceres de cólon, esôfago e pulmão em diferentes modelos de animais que foram induzidos por diferentes agentes carcinogênicos (LOSSO, 2008).

Ressalva-se que os pesquisadores Sweeney, H. Lee; Morris, Carl A. e Kennedy, Ann R., por meio dos resultados obtidos com o trabalho *Bowman-birk inhibitor compositions for treatment of muscular atrophy and degenerative muscle disease*, depositaram a patente com registro na Canadian patent N° CA 2534358/2005. Esta patente foi obtida com base em uma composição formada por um inibidor Bowman-Birk (BBI), ou um derivado do mesmo, que apresentaram efeitos no tratamento e/ou prevenção de atrofia muscular esquelética, aliviando sintomas e/ou promovendo a lenta progressão da degeneração do músculo esquelético.

Forrest et al. (2016), relataram a existência de uma ligação fundamental entre uma protease quimotríptica (a subtilisina), secretada pela bactéria ambiental *Bacillus subtilis*, e a protease quimotripsina de mamífero. Estas proteases contribuíram para diminuição dos níveis de expressão do gene de deleção de carcinoma colorretal (DCC) e da proteína neogenina nas células. Os autores observaram que estas duas serinoproteases podem regular a DCC e a expressão de neogenina nas células, aumentando a migração celular. Observaram ainda que a reversibilidade das mudanças na adesão e na expressão proteica seria importante para as células que migram do tecido de origem para formar metástases em outros lugares. A inibição das enzimas do tipo quimotripsina, por inibidores de Bowman-Birk de plantas, pode explicar os efeitos protetores neste processo carcinogênico. Estes dados mostram a eficácia dos compostos dietéticos de BBI, como inibidores da subtilisina e da quimotripsina, o que pode levar ao aumento do seu uso como proteção contra o câncer (FORREST et al., 2016).

II.7 O inibidor de proteases BTCl (*black-eyed pea trypsin/chymotrypsin inhibitor*)

O BTCl é um inibidor de proteases da família BBI purificado de sementes de *Vigna unguiculata* (L.) que inibe simultaneamente tripsina e quimotripsina. Apresenta massa molecular baixa (9071 kDa) (VENTURA et al., 1975; MORHY e VENTURA,

1987). É composto por uma única cadeia peptídica de 83 resíduos de aminoácidos que foi determinada por Morhy e Ventura em 1987 (VENTURA e XAVIER-FILHO, 1966; VENTURA et al., 1971; MORHY et al., 1987; FREITAS et al., 1999; JOANITTI et al., 2010). Inclui em si um resíduo de triptofano, um de tirosina e três de fenilalanina. A estrutura nativa exibe sete (7) ligações dissulfeto responsáveis por sua estabilidade e pela conformação canônica de *loop* onde estão contidos os dois sítios reativos desse inibidor contra proteases (FACHETTI et al., 1984; FREITAS et al., 1997; FREITAS et al., 1999; SILVA et al., 2001; BARBOSA et al., 2007).

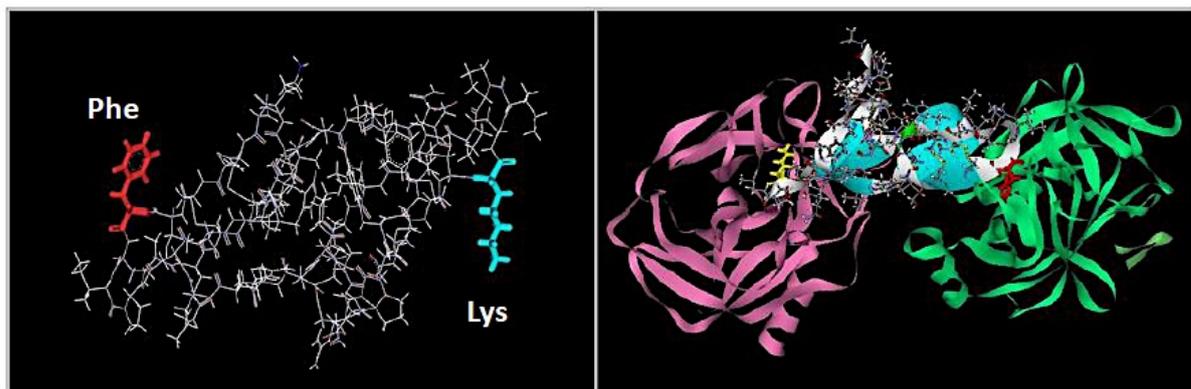
A inibição para tripsina e quimotripsina no BTCI acontece por meio dos sítios Lisina²⁶-Serina²⁷ e Fenilalanina⁵³-Serina⁵⁴, respectivamente (FREITAS et al., 1997). Em 1982, Mizuta et al., asseguraram que, caso haja rompimento da ligação dissulfeto ocorrerá uma alteração significativa da conformação deste inibidor que possui além da baixa massa molecular apresenta a superfície hidrofóbica. Esse inibidor de proteases apresenta alta estabilidade e atividades entre pH 3 a 11. Com elevado grau de estabilidade térmica (até 95 °C) por 60 minutos o BTCI consegue manter sua atividade de inibição constante perdendo apenas 4% de suas propriedades inibitórias (SILVA et al., 2001; FREITAS et al., 1999; SILVA et al., 2005). Estudo conformacional por dicroísmo circular indicou que esta proteína não apresenta estrutura do tipo α -hélice, enquanto que, espectros de infravermelho sugerem a ocorrência de estruturas desordenadas, folhas betas antiparalelas e grampos betas (ARAGÃO e VENTURA, 1986; FREITAS e VENTURA, 1996; BARBOSA et al., 2007).

Por apresentar uma superfície parcialmente hidrofóbica em solução, o BTCI, por meio de mecanismos de associação e dissociação consegue se organizar espontaneamente em estruturas multiméricas (monômeros, dímeros, trímeros e hexâmeros) em equilíbrio entre si (VENTURA et al., 1981; VENTURA et al., 1984; SILVA et al., 2005). Quanto as estruturas cristalográficas do complexo deste inibidor com a β -tripsina e o complexo ternário com a quimotripsina e tripsina, as mesmas foram resolvidas por Barbosa et al. (2007) e depositadas no Protein Data Bank (códigos 2G81 e 3RU4).

As propriedades bioquímicas e biofísicas de BTCI são largamente caracterizadas (BARBOSA et al., 2007; VENTURA E XAVIER-FILHO, 1966), sendo objeto de desenvolvimento biotecnológico em várias linhas de pesquisas (Figura 6). Brumana (2015), da equipe do Laboratório de Biofísica Estrutural, em sua

dissertação assinala que tais características físico-químicas podem favorecer o potencial farmacológico do BTCl.

Figura 6: Estrutura Tridimensional do BTCl representada em bastões e do complexo ternário BTCl com quimotripsina e tripsina, em fitas. À esquerda: Molécula de BTCl com sítios inibidores para quimotripsina (Phe⁵³) e para tripsina (Lys²⁶). À direita, o complexo ternário do BTCl (azul) com a tripsina (rosa) e a quimotripsina (verde) (pdb 3RU4).



Fonte: OLIVEIRA, Sandriele A. **Síntese e caracterização de sistemas nanoestruturados contendo o inibidor de proteinases e peptídeos derivados.** 2012. 108 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular) – Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília/DF, 2012.

A associação do BTCl com a tripsina foi caracterizada por meio da constante de inibição K_i em ordem de 10^{-8} M e por um processo endotérmico devido ao aumento significativo da entropia. Esse processo é ocasionado pela liberação de moléculas de água que estão localizadas na região de contato entre as duas proteínas (FACHETTI et. al., 1984). Quanto a ligação da quimotripsina ao BTCl, a constante de inibição K_i foi estimada na ordem de 10^{-7} M (FACHETTI et. al., 1984), sendo um processo entropicamente favorável (FREITAS et. al., 1999). Os autores, utilizando de outras técnicas conseguiram caracterizar a ligação da tripsina e da quimotripsina ao BTCl sendo, portanto, um processo endotérmico, espontâneo, exergônico e entrópico.

Resultados da constante de inibição K_i :

- BTCl contra tripsina = $0,59 \pm 0,03 \times 10^{-8}$ M (FACHETTI et al., 1984)
- BTCl contra quimotripsina = $1,19 \pm 0,04 \times 10^{-7}$ M (FACHETTI et al., 1984)

Por outro lado, Barbosa et al. (2007), em seus estudos de microscopia de força atômica, observaram que a alça onde localiza o subdomínio da atividade anti-tripsina, graças a sua especificidade é rígida, e a que corresponde ao sítio anti-quimotríptico tem a flexibilidade como característica, favorecendo assim na tendência à autoassociação desse inibidor. Este inibidor de serinoproteases foi estudado em amplos aspectos, conforme descrito a seguir.

Estudos anticancerígenos

Estudos têm demonstrado os efeitos citotóxicos induzidos por BTCl em células de câncer da mama MCF-7 com efeitos associados a alterações morfológicas do núcleo e das mitocôndrias, tornando expressivo o aumento do número de células com potencial reduzido da membrana mitocondrial (JOANITTI et al., 2010). Portanto, o BTCl foi caracterizado por esses pesquisadores como agente anticarcinogênico de câncer da mama.

Com intuito de observar os efeitos pleiotrópicos do BTCl, Mehdad et al. (2016) comprovaram que o BTCl induz parada mitótica e morte das células no câncer de mama invasivo. Segundo esses autores, o BTCl induziu a despolarização da membrana mitocondrial, produzindo estresse oxidativo e aumento da atividade da caspase-3. Observaram ainda que a expressão do gene alvo de NF-kB foi alterada em ambas as linhas celulares de câncer da mama e também no aumento da expressão gênica observada nas células de câncer da interleucina-8 (IL-8).

Ao estudarem a citotoxicidade induzida por BTCl em células de adenocarcinoma da mama Mehdad et al. (2016) observaram que os resultados do ensaio MTT demonstraram um efeito citotóxico de BTCl em linhas celulares de câncer da mama de uma maneira dependente da dose e ausente em células epiteliais mamárias normais. Esses autores citam ainda estudo anterior em que ratificam o BTCl com forte atividade antitumoral (testado *in vitro*) devido a sua capacidade para induzir a apoptose em relação à diferentes células de câncer da mama. Concluindo que o BTCl pode inibir a função das células cancerosas diretamente bloqueando a cavidade do núcleo do proteossoma 20S, e indiretamente, por geração de moléculas intermediárias responsáveis por stresse oxidativo. Ainda afirmam que o BTCl é seguro, de baixo custo e pode ser usado como parte de uma dieta diária. Assim, o potencial de BTCl para terapias combinadas para o câncer da

mama é promissor.

Conforme Chen et al (2005), Souza et al. (2014) e Mehdad et. Al (2016) o BBI (inibidor de soja) e o BTCl foram caracterizados como potentes agentes anticarcinogênicos, e parte desse efeito foi atribuído à inibição do proteassoma 20S.

Meneghetti (2018), em estudos por fluorescência, calorimetria e ultracentrifugação analítica, caracterizou os parâmetros físico-químicos, termodinâmicos e estruturais na formação do complexo BTCl-proteassoma 20S de *Saccharomyces cerevisiae*. A formação do complexo BTCl-proteassoma 20S ocorreu com estequiometria de quatro (4) moléculas do inibidor para uma molécula de proteassoma.

Outros estudos com BTCl

Análises computacionais das interfaces BTCl-quimotripsina e BTCl-tripsina previamente encontradas por cristalografia de raios X (BARBOSA et al, 2007) foram trabalhadas por Honda et al. (2018) que aplicaram dois métodos de mecânica quântica semiempírica (SQM) corrigidos, PM6-D3H4X (ŘEZÁČ e HOBZA, 2012; STEWART, MOPAC, 2016,) e SCC-DFTB3-D3H4X (ELSTNER et al., 2001; PECINA et al. 2018) juntamente com o tratamento implícito de solvente COSMO calculado no nível de PM6 (PALANISAMY et al., 2010; PECINA et al., 2016; AJANI et al., 2017) para descrever quantitativamente a força de todas as interações não covalentes na interface dos complexos moleculares.

Usando o protocolo de “varredura de glicina virtual”, Honda et al. (2018) identificaram características estruturais e contribuições de energia de resíduos de aminoácidos nas interfaces BTCl-tripsina e BTCl-quimotripsina. Ao aplicarem o esquema de fragmentação para verificar a convergência da energia global de interação, concluíram que é possível reduzir o sistema de BTCl-quimotripsina em 2076 átomos e reduzir o sistema BTCl-tripsina em 1619 átomos (redução até 48% e 40%, respectivamente) sem comprometer o valor da energia de ligação na interface dos complexos. Esses autores identificaram com sucesso em ambos os métodos semiempíricos a importância do resíduo de aminoácido fenilalanina (Phe⁵³) no BTCl e serina (Ser¹⁹⁵) na quimotripsina no processo de inibição como os resíduos mais importantes que contribuem para a energia de interação BTCl e quimotripsina reunindo 25 kcal mol⁻¹ (ou 41% da energia total de interação), calculada via SCC-

DFTB3 - Nível D3H4X acoplado ao COSMO no nível PM6, ou 22,3 kcal mol⁻¹ (ou 36% da energia total de interação. No caso do BTCl-tripsina, os métodos semiempíricos identificaram e quantificaram o papel predominante das cadeias laterais Lys²⁶, Ser¹⁹² e Ser¹⁸⁷, embora a classificação dos aminoácidos fosse diferente.

O coleóptero *Anthonomus grandis* é uma praga em áreas tropicais e subtropicais. A digestão deste coleóptero é facilitada por níveis elevados de serinoproteases, acarretando graves danos às lavouras de algodão ao alimentar-se dos frutos e botões florais e usando-os como *habitat* oportuno, protegendo assim seu desenvolvimento larval endofítico totalmente isolado de inseticidas (HAYNES e SMITH, 1992; ALVES et al., 1993). Objetivando reduzir a atividade proteolítica de enzimas digestivas do coleóptero *A. grandis*, os efeitos de BTCl foram analisados por Franco et al. (2003) na fase larval e adulta. Após o uso do BTCl, os autores constataram inibição na atividade proteolítica, e nas larvas de *A. grandis* incubadas com BTCl observaram modificações morfológicas que impediram seu desenvolvimento, demonstrando o potencial deste inibidor como efeito antinutricional e controle dessa praga. Os resultados obtidos motivaram os pesquisadores a ressaltarem que “esse potente inibidor pode também ser utilizado como importante estratégia no desenvolvimento de plantas transgênicas resistentes ao ataque de pragas”.

Peptídios geralmente são removidos da circulação renal por meio da filtração glomerular e pela degradação tubular proximal. Considerando a estrutura do peptídeo a hidrólise ocorrerá após o contato com a membrana da borda da escova. Para os peptídeos complexos (via não filtrante) a hidrólise ocorrerá após a internalização. A guanilina é um peptídeo linear pequeno (15 resíduos de aminoácidos) e as proteases contidas na borda da escova podem desempenhar um papel importante no metabolismo renal de guanilina. Segundo Forte et al. (2000), a proguanilina, a forma principal de guanilina encontrada no plasma, pode sofrer degradação por proteases semelhantes à quimotripsina que se encontram presentes nas membranas das bordas das escovas renais.

Com o objetivo de verificar se a guanilina é degradada por proteases do tipo quimotripsina presentes nas bordas das escovas nas membranas renais, Carvalho et al. (2008) administraram doses de BTCl e peptídeo guanilina em rim isolado de rato perfundido (Wistar-Kyoto adultos de ambos os sexos) pesando 250-300 g. Ficou

demonstrado nos resultados desse estudo que a presença do inibidor (BTCI) intensificou e prolongou a natriurese induzida por gualinina por meio de um grande aumento no fluxo de urina, excreção de Na^+ e taxa de filtração glomerular. Observou-se ainda que os ensaios de perfusão revelaram o efeito natriurético do BTCI mesmo com a ausência da guanilina. Ou seja, o BTCI aumenta a natriurese induzida por guanilina e promove efeitos renais glomerulares e tubulares. Mesmo não conhecendo as vias de ação do BTCI no metabolismo renal, esses pesquisadores afirmaram ser possível que esse inibidor promova a proteção de peptídeos envolvidos na regulação da homeostase, levando a crer, conforme outros autores, no potencial do BTCI no desenho de novas drogas para hipertensão.

Além disso, a infusão intravenosa de BTCI mostrou um efeito protetor sobre a bradicinina em relação à clivagem de proteases de serina no plasma, bem como vasodilatação aórtica renal aumentada induzida por bradicinina. Equivale mencionar que o complexo BTCI-Bradicinina induziu a contração do músculo liso induzida pela bradicinina de maneira responsiva à concentração (ALVARES et al., 2014).

Levando-se em conta os amplos benefícios dos inibidores de Bowman-Birk (CARVALHO et al., 2008; CLEMENTE et al., 2012; SAFAVI, 2012; ALVARES et al., 2014; CLEMENTE e ARQUES MDEL, 2014) à saúde a exemplo das vantagens dos peptídeos bioativos de plantas na biodistribuição e a liberação de fármaco, o presente estudo investigou os efeitos do inibidor BTCI e os seus peptídeos derivados na pressão sanguínea utilizando ratos normotensos e espontaneamente hipertensos.

II.8 Peptídios derivados do BTCI reativos contra tripsina (PepTry - Lys²⁶) e quimotripsina (PepChy - Phe⁵³)

Os peptídeos derivados do BTCI são provenientes a partir dos resíduos de aminoácidos que formam as alças β , sendo que, cada um, apresenta nove resíduos de aminoácidos. A alça que apresenta o resíduo Lys²⁶ é responsável por interagir e inibir a tripsina e a alça que apresenta o resíduo Phe⁵³ é responsável pela interação e inibição de quimotripsina. Os peptídeos que apresentam os resíduos Lys²⁶ e Phe⁵³ são denominados PepTry e PepChy, respectivamente (Figura 7) (FREITAS et al., 1997; BARBOSA et al., 2007), e são estabilizados por uma ligação dissulfeto.

Figura 7: Modelo computacional do BTCl destacando os sítios ativos da molécula



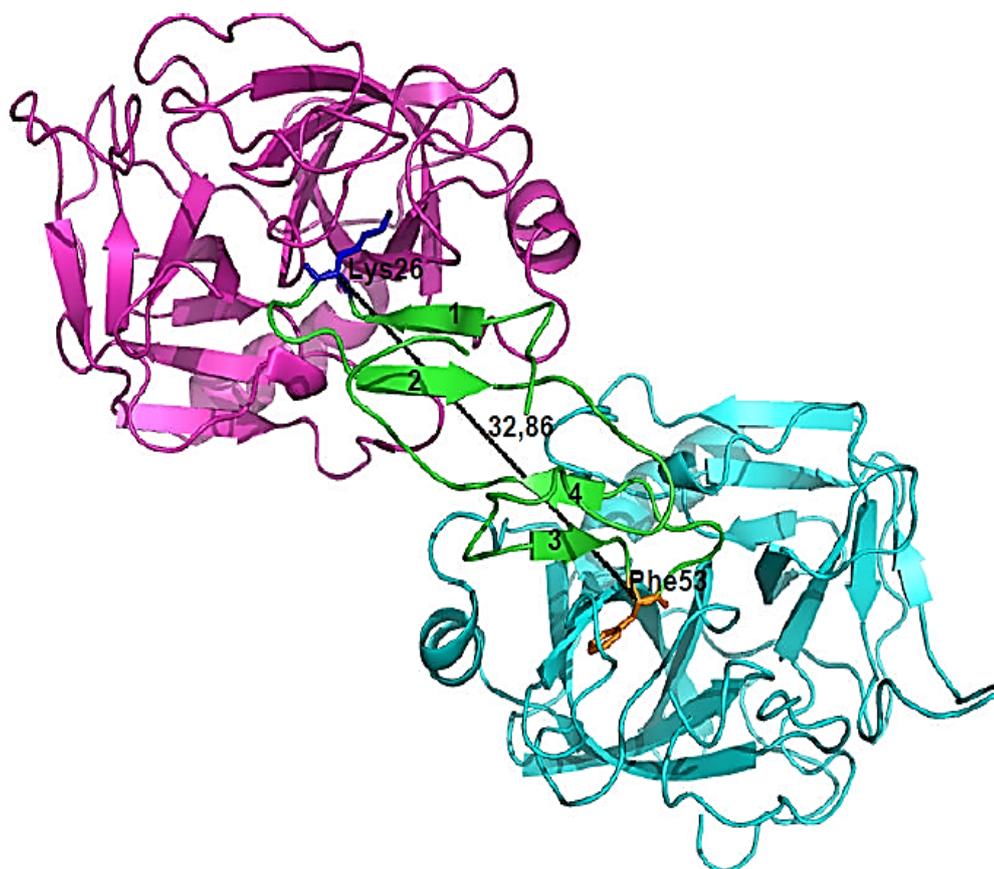
Fonte: FREITAS, S. M.; MELLO, L. V.; SILVA, M. C; VRIEND, G.; NESHICH, G.; VENTURA, M. M. Analysis of the black-eyed pea trypsin and chymotrypsin inhibitor-alpha-chymotrypsin complex. **FEBS Letters**. Vol. 409, p 121-127. 1997.

Mesmo com medicamentos anti-hipertensivos podendo causar efeitos colaterais adversos que contribuem para diminuir a eficácia do tratamento medicamentoso, e com o aumento do interesse em desenvolver produtos naturais e alimentares com efeitos colaterais mais baixos que os anti-hipertensivos, Law et al. (2009) relatam que, atualmente, drogas para pressão arterial, como tiazidas, bloqueadores β , inibidores da enzima de conversão da angiotensina, antagonistas dos receptores da angiotensina e bloqueadores dos canais de cálcio, têm sido utilizados no controle da pressão arterial, a fim de prevenir ataques cardíacos e derrames. No entanto, autores como Yang et al., (2004), Chen et al., (2009) e Aluko (2008) afirmam que tem sido amplamente explorado os peptídeos bioativos de plantas ou até mesmo peptídeos sintéticos de potencial biotecnológico, do ponto de vista nutracêutico e farmacológico, especialmente aqueles utilizados no tratamento da hipertensão.

Sabe-se que os peptídeos cíclicos curtos que retém o motivo de nove resíduos com ponte de dissulfeto tem atividade inibidora e podem ser utilizados como modelos da proteína inibidora natural. Dois fatores são importantes para determinar a eficácia de tais peptídeos inibidores: o valor da constante de inibição e a taxa a que o peptídeo inibidor é hidrolisado pela proteinase (NISHINO et al., 1975; GARIANI e LEATHERBARROW, 1997).

A distância entre os sítios reativos (32,5 Å) permite que a inibição às serinoproteases seja simultânea (Figura 8). A formação desse complexo binário (PepTry e PepChy) não provoca alteração conformacional no restante da molécula de BTCl (BARBOSA et al., 2007).

Figura 8: BTCl (em verde; fita- β numeradas) em complexo com a tripsina (rosa) e a quimotripsina (ciano) em pH 7,5. Em preto a distância entre a Lisina²⁶ (azul) e Fenilalanina⁵³ (laranja).



Fonte: ESTEVES, Gisele F. **Resolução da estrutura tridimensional do inibidor tríptico e quimotríptico de *Vigna unguiculata* em complexos binário e ternário.** 2010. 163 f. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) – Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, Brasília/DF. 2010.

Importantes avanços foram alcançados na identificação de compostos dietéticos que podem contribuir para a saúde cardiovascular. Entre esses compostos, os peptídeos com propriedades anti-hipertensivas receberam atenção especial nos últimos anos, sendo que, a maioria desses peptídeos, a exemplo dos derivados de alimentos tiveram suas propriedades demonstradas por meio de ensaios *in vitro* e *in vivo* (em modelos animais e humanos) de suas atividades na

redução da pressão arterial, seu mecanismo de ação e a biodisponibilidade dos mesmos (MARTÍNEZ-MAQUEDA et al. 2012; KOYAMA, M. et al., 2013). E autores como McBride et al. (2002) observam que são encontrados na literatura diversos exemplos de peptídeos derivados de inibidores de serinoproteases da família BBI que preservam função inibitória e estrutura semelhante à molécula de origem.

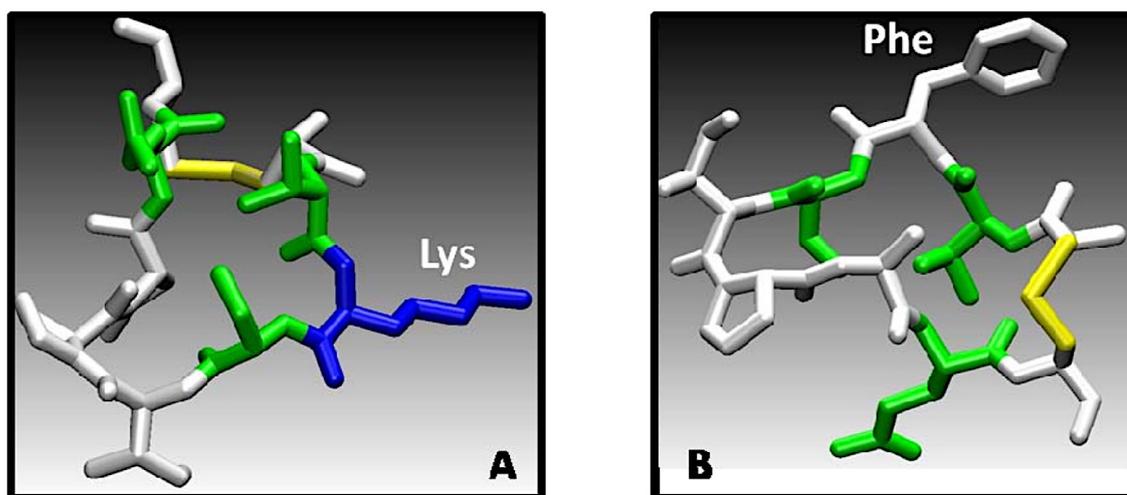
Com objetivo analisar os efeitos de proteases da família BBI (BTCI) e de seus peptídeos sintéticos derivados em células de câncer de mama (MCF-7), *in vitro*, Joanitti (2008) obteve resultados com os peptídeos derivados do BTCI demonstrando que estes conservam a capacidade inibitória em relação às enzimas tripsina e quimotripsina, e também os efeitos anticarcinogênicos do inibidor contra células de câncer de mama MCF-7. Em outro estudo, como inibidor natural, esses peptídeos derivados demonstraram a capacidade de inibir o proteossoma, o que indicaria uma atuação dos mesmos no ciclo celular (SOUZA, 2010).

Em 2009, Pinheiro desenvolveu estudo computacional para analisar a interação desses peptídeos visando compreender como essas moléculas protéicas podem particionar na membrana e a sua dependência das propriedades físico-química do sistema. Em ambos os casos, o passo limitante para o processo de inserção é a transposição dos peptídeos pela região da cabeça polar (Figura 9). Os resultados obtidos indicaram que as moléculas predominantemente hidrofílicas tendem a se associarem fortemente à região interfacial água/lipídio, já as hidrofóbicas tendem a se estabilizarem no centro da bicamada. O autor então concluiu que há uma grande influência das propriedades físico-químicas de cada uma das moléculas protéicas no modo como os peptídeos se inserem na membrana. Observou ainda que esse transporte ocorre na ausência de barreira energética e independente de receptores ou carreadores de membrana, agindo de forma semelhante aos peptídeos conhecidos com peptídeos que penetram nas células (CPP) (em inglês, *Cell-penetrating Peptides*).

Esse conhecimento é importante para a engenharia biotecnológica, tendo em vista a obtenção de propriedades desejáveis para o transporte de moléculas específicas. Nessas propriedades incluem: maior estabilização dessas moléculas no interior da membrana; aumento de velocidade da inserção e estabilização de agregados, reforçando que seria de grande proveito para o desenvolvimento de veículos para entrega de drogas no interior da célula (PINHEIRO, 2009). Por serem pequenas sequências, e por meio de motivos ricos em resíduos carregados

positivamente, os peptídeos conseguem rapidamente se translocar por intermédio da membrana celular, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (LINDSAY, 2002).

Figura 9. Estrutura tridimensional dos peptídeos utilizados nas simulações. Os resíduos estão coloridos de acordo com a polaridade e natureza química: Azul: carregado positivamente; Verde: polares; Brancos: hidrofóbicos; Amarelo: ligação dissulfeto. Note a estrutura cíclica em forma de um anel de ambos os peptídeos. A: peptídeo hidrofílico e carregado, Pep-1. B: peptídeo hidrofóbico, Pep-2.



Fonte: PINHEIRO, Cristiano G. A. **Interações moleculares de peptídeos com membranas fosfolipídicas**. 2009. 71 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular) – Instituto de Biologia. Universidade de Brasília, Brasília/DF, 2009.

Nesta pesquisa, os peptídeos cíclicos sintéticos denominados PepChy e PepTry foram projetados para conter a mesma sequência de aminoácidos dos dois sítios reativos presentes na estrutura tridimensional do BTC1 (BARBOSA et al., 2007). Enfatizando que os mesmos locais reativos do BTC1 (K26 e F53) responsáveis pela inibição da tripsina e quimotripsina, respectivamente, e também das proteases do tipo tripsina e quimotripsina. Recentemente, em sua tese, Fernandes (2019) teve como um dos objetivos a resolução da estrutura tridimensional do PepTry em complexo com tripsina, sendo resolvida com resolução de 1,15 Å (código PDB 6EAT). Similar ao BTC1 (código PDB 2G81) (BARBOSA et al., 2007), esse complexo é formado principalmente por interações eletrostáticas envolvendo o local reativo à lisina do PepTry.

O nosso estudo é o primeiro a relatar uma pesquisa sobre o PepChy e a explorar novas atividades do PepTry. Descreve a influência dos inibidores de protease do BBI no controle da pressão arterial. Além disso, o PepTry e o PepChy

são moléculas novas que apresentam, assim como os peptídeos de domínios funcionais, propriedades semelhantes às proteínas parentais, como BTCl. Essa novidade por si só representa uma abordagem interessante para obter moléculas menores e funcionais. No entanto, esse trabalho apresenta três novas moléculas que agem regulando a pressão sanguínea e poderiam ser estudadas ainda mais por seus mecanismos de ação e no desenvolvimento futuro de medicamentos. Vale ressaltar que os peptídeos cíclicos também foram escolhidos com base em nossos estudos anteriores, nos quais o BTCl foi caracterizado como:

- Intensificador da natriurese induzida por guanilina, inibindo sua degradação por proteases do tipo quimotripsina em rim isolado de rato (Carvalho et al., 2008);
- Agente anticarcinogênico em células de câncer de mama, inibindo as proteases do proteassoma 20S do tipo tripsina, quimotripsina e caspase, nas células invasivas do câncer de mama MDA-MB-231 e células do câncer de mama MCF-7, além de apresentar nenhum efeito nas células epiteliais mamárias do MCF-10A (JOANITTI et al., 2010; MEHDAD et al., 2016);
- Potencial agente anti-hipertensivo pelos efeitos hemodinâmicos e cardiovasculares e sua ação protetora na degradação proteolítica da bradicinina e peptídeos derivados em ratos Wistar, via administração intravenosa, atribuídos à sua capacidade de inibir as proteases do tipo tripsina e quimotripsina (ALVARES et al., 2014).

Além disso, existem amplos benefícios e vantagens no uso de peptídeos bioativos de plantas e peptídeos sintéticos, como distribuição biológica, administração de medicamentos, baixos efeitos colaterais e geralmente apresentam alta especificidade e atividade de amplo espectro. Esses peptídeos (PepTry e PepChy) foram capazes de inibir as proteases com menos afinidade que o BTCl como indicado pelas constantes de inibição, K_i :

- BTCl contra tripsina = $0,59 \pm 0,03 \times 10^{-8}$ M (FACHETTI et al., 1984)
- BTCl contra quimotripsina = $1,19 \pm 0,04 \times 10^{-7}$ M (FACHETTI et al., 1984)
- PepTry contra tripsina = $1,19 \pm 0,04 \times 10^{-7}$ M (FREITAS et al., 1999)
- PepChy contra quimotripsina = $1,21 \pm 0,26 \times 10^{-4}$ M (FREITAS et al., 1999)

Na presença de BTCI e seus peptídeos, observa-se um declínio gradual nas atividades das proteases. O BTCI com aproximadamente 6 μM e 40 μM inibe as proteases tripsina e quimotripsina, respectivamente, 10 vezes mais que PepTry (60 μM) e PepChy (400 μM). Comparativamente, a menor afinidade dos peptídeos pode ser devida à falta de regiões estruturais, como as que estabilizam toda a *interface* do complexo BTCI-protease. Isso está de acordo com dados relatados anteriormente, nos quais, peptídeos cíclicos da família BBI com resíduos de aminoácidos adicionais após a ligação dissulfeto apresentam uma atividade inibitória mais alta contra as proteases (NISHINO et al., 1975; GARIANI e LEATHERBARROW, 1997).

Quanto a absorção intestinal dos peptídios por gavagem pelos animais, a literatura descreve que a membrana intestinal é capaz de absorver aminoácidos, di- ou tri-peptídeos. De fato, vários estudos sugeriram que peptídeos bioativos da dieta, além de possivelmente os peptídeos grandes (~ 6-20kDa), podem acessar os tecidos da corrente sanguínea e o sistema portal hepático após administração oral por enterócitos (BLOCH et al., 1988; GARDNER, 1988; MINER-WILLIAMS et al., 2014; SHEN e MATSUI, 2017; ZIV e BENDAYAN, 2000).

Projetos associados a esses peptídeos visando aplicações biotecnológicas precisam ser ampliados para investigar, juntamente com as moléculas de interesse, o PepTry e o PepChy, aumentando a eficiência do transporte intracelular (SCHWARZE et al., 2000) e como consequência, favorecendo a entrega em tecidos alvos, ou até mesmo verificar o efeito cardiovascular em modelos de hipertensão. Neste sentido, este trabalho consistiu em analisar o efeito cardiovascular e hipotensor do BTCI e de peptídeos derivados na presença de serinoproteases, e foi desenvolvido usando os laboratórios de Biofísica Estrutural (UnB); Centro de Neurociências e Fisiologia Cardiovascular (UFG) e Laboratório Integrado de Fisiopatologia Cardiovascular e Neurológica (UFG).

III JUSTIFICATIVA

O mecanismo de ação dos inibidores de serinoproteases é alvo de várias investigações científicas. Também já foram resolvidas as estruturas tridimensionais de alguns inibidores da família Bowman-Birk tanto em forma livre (WERNER e WEMMER, 1992; SUZUKI et. al., 1993; CATALANO et. al., 2003) como em complexo com a tripsina (PARK et. al., 2004, BARBOSA et. al., 2007). Já foi comprovado potencial anticarcinogênico de um dos inibidores da família BBI, o BTCI, que apresentou efeitos citostáticos e citotóxicos em linhagem carcinogênica, associados à indução de apoptose e da permeabilização da membrana de lisossomos em células de câncer de mama (JOANITTI et al., 2010).

O BTCI é uma molécula com grande potencial de aplicação biotecnológica: sua atividade já foi comprovada por Honda et al. (2018) em análises computacionais das interfaces BTCI-quimotripsina e BTCI-tripsina. Além do mais, o BTCI foi caracterizado por Álvares et al. (2014) como potencializador do efeito hipotensor de bradicininas e análogos, bem como apresentou propriedades cardiovasculares quando testado *in vivo* em ratos por meio de infusão intravenosa.

Com o aumento do interesse em desenvolver compostos naturais e alimentares que possam servir como alternativas para a terapia da hipertensão com menores efeitos colaterais do que os anti-hipertensivos (CHEN et al., 2009; MANSO et al., 2015) os pesquisadores estão aumentando cada vez mais o interesse em explorarem amplamente os peptídeos vegetais bioativos ou peptídeos sintéticos de potencial biotecnológico do ponto de vista nutracêutico e farmacológico, especialmente naqueles utilizados no tratamento da hipertensão (YANG et al., 2004; ALUKO, 2008; CHEN et al., 2009). O uso dos peptídeos derivados do BTCI apresentam diversas vantagens em vários tipos de aplicações tecnológicas como a facilidade de síntese; a obtenção em grandes quantidades; baixos custos; facilidade de entrega nos tecidos alvos; aumento da eficiência no transporte, dentre outros.

Resultados recentes com peptídeos derivados do inibidor de serinoproteases BTCI mostraram que estes conservam a capacidade inibitória em relação às enzimas tripsina e quimotripsina, e também os efeitos anticarcinogênicos do inibidor contra células de câncer de mama MCF-7 (JOANITTI, 2008). Em outro estudo, como inibidor natural, observou-se que os peptídeos derivados demonstraram a

capacidade de inibir o proteassoma, o que indicaria uma atuação destes peptídeos no ciclo celular (SOUZA, 2014).

O BTCl e seus peptídeos derivados, administrados por gavagem, podem sofrer a ação das enzimas digestivas provenientes dos sucos gástrico, entérico e pancreático. Dessa forma, podem ser absorvidos na segunda porção do duodeno, local em que atravessam as microvilosidades do revestimento entérico e alcançam os capilares sanguíneos.

Este inibidor, o BTCl, é alvo de estudos biofísicos estruturais há mais de 40 anos no Laboratório de Biofísica Estrutural da Universidade de Brasília. Estudos esses iniciados pelo saudoso Prof. Matheus Ventura e hoje conduzidos e supervisionados pela Profa. Dra. Sonia Maria de Freitas. Este estudo faz parte de uma linha de pesquisa multidisciplinar coordenada pela Profa. Dra. Sonia Maria de Freitas. Os dados aqui obtidos, em conjunto com outras características físico-químicas e estruturais, determinadas com o desenvolvimento de pesquisas do grupo de Biofísica estrutural, foram essenciais para caracterização funcional do BTCl.

Este inibidor (BTCl) foi caracterizado funcionalmente em três áreas específicas, tais como, agente anticarcinogênico de câncer da mama; atividade antitumoral devido a sua capacidade de induzir a apoptose em relação a diferentes células de câncer da mama; capacidade de inibir o proteassoma 20S (MEHDAD et al., 2016); formação do complexo BTCl-proteassoma 20S com uma estequiometria de quatro (4) moléculas de inibidor para cada proteassoma (MENEHETTI, 2018); agentes defensivos contra ataque de predadores em plantas (FRANCO et al., 2003); potencial de promover a proteção de peptídeos envolvidos na regulação da homeostase (CARVALHO et al., 2008); efeito protetor sobre a bradicinina em relação à clivagem de serinoproteases no plasma, bem como vasodilatação aórtica renal aumentada induzida por bradicinina (ÁLVARES et al., 2014).

Vários peptídeos derivados de alimentos, denominados de peptídeos bioativos, apresentaram atividade na redução da pressão arterial em modelos animais e humanos (MARTÍNEZ-MAQUEDA et al. 2012; KOYAMA, M. et al., 2013; NAKAMURA et al., 1995; IWANIAK e DAREWICZ; 2014). Os peptídeos derivados do BTCl apresentaram efeitos anticarcinogênicos contra células de câncer de mama MCF-7 (JOANITTI, 2008) e capacidade de inibir o proteassoma, indicando ação dos mesmos no ciclo celular (SOUZA, 2010).

Em estudos prévios, a ação hipotensora do BTCl e de derivados de bradicinina foi avaliada e demonstrada mediante administração intravenosa. Visando avaliar a ação destas moléculas em microambiente gastrointestinal, submetendo-as a enzimas digestivas e outras ações digestórias, no presente estudo, a ação cardiovascular e hipotensora do BTCl e seus peptídeos derivados foi avaliada

mediante a administração por gavagem. O método de gavagem representa a possibilidade de, no futuro, o BTC1 e seus peptídeos serem testados por administração oral em ensaios pré-clínicos, como a maioria dos antiipertensivos comercializados na atualidade.

IV OBJETIVOS

IV.1 Objetivo Geral

Avaliar a ação fisiológica hipotensora e cardiovascular do BTCl e peptídeos derivados em sistemas *ex vivo* e *in vivo* em ratos normotensos e espontaneamente hipertensos.

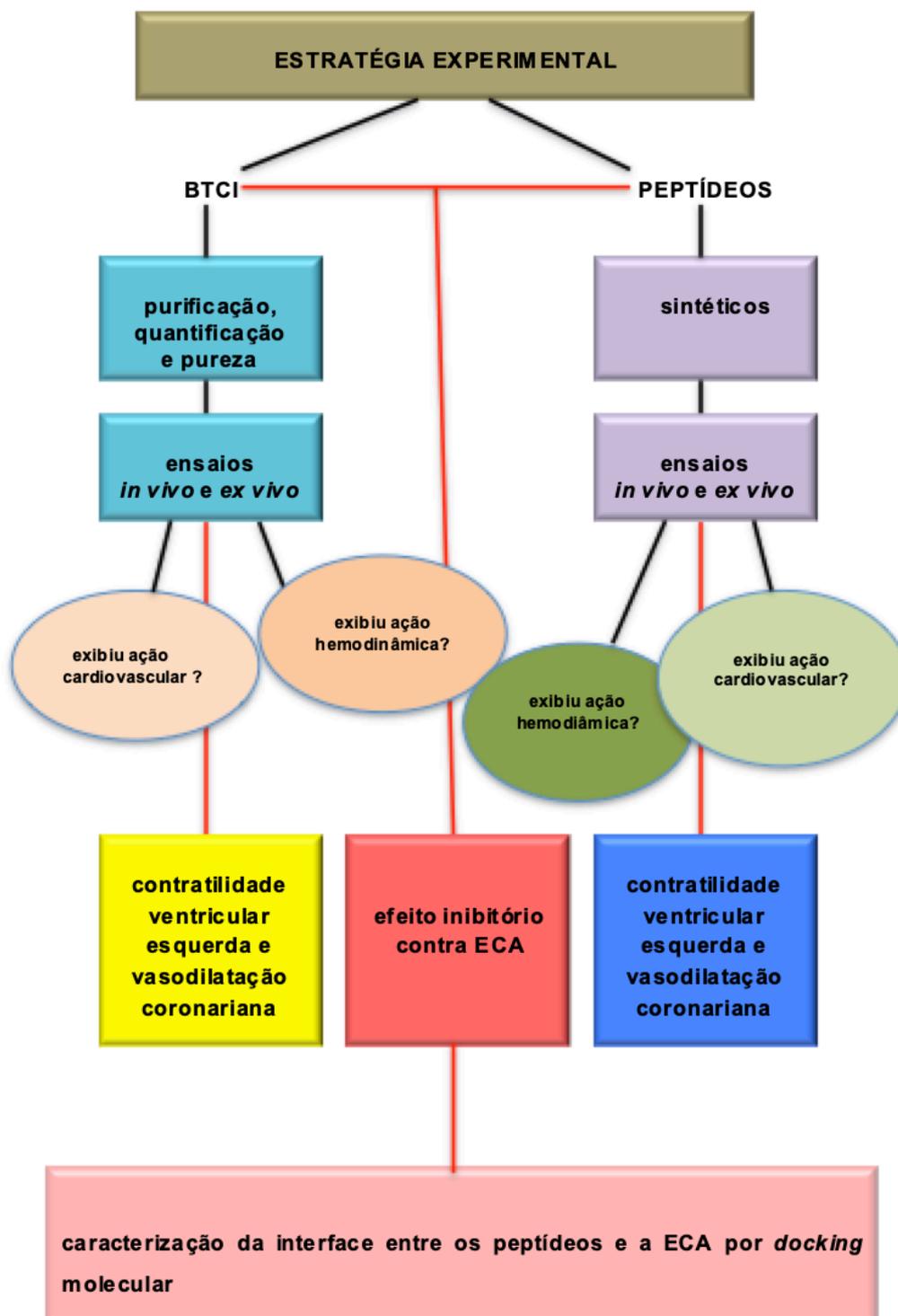
IV.2 Objetivos Específicos

1. Purificar o BTCl de sementes de *V. unguiculata* e análise da sua pureza.
2. Avaliar em ensaios *in vivo* a ação do BTCl, PepTry e PepChy em ratos normotensos e espontaneamente hipertensos, a partir dos parâmetros hemodinâmicos e cardiovascular.
3. Determinar a ação inibitória do BTCl e peptídeos derivados contra a enzima conversora de angiotensina (ECA).
4. Estimar quantitativamente a afinidade dos inibidores para enzimas tripsina e quimotripsina, por meio das constantes de inibição, K_i e a ECA por meio dos valores de IC_{50} .
5. Avaliar a interface de interação com os peptídeos com a ECA por *docking* molecular.
6. Analisar os efeitos do BTCl e do PepChy na contratilidade ventricular esquerda e na vasodilatação coronariana.

V MATERIAIS E MÉTODOS

O fluxograma para obtenção do BTCI e seus peptídeos derivados em conjunto com as estratégias experimentais se encontram na figura 10.

Figura 10: Fluxograma. Obtenção das biomoléculas BTCI e seus peptídeos derivados (PepChy e PepTry) e estratégias experimentais.



V.1 Purificação do BTCl

Para obtenção do BTCl usou-se sementes de feijão de corda orgânico da espécie *Vigna unguiculata* que foram coletadas na Estação de Biologia Experimental da Universidade de Brasília, secadas e trituradas até completa formação de pó.

De acordo com protocolo preestabelecido no laboratório de Biofísica Estrutural-UnB utilizou-se quinhentos gramas do feijão para extração das proteínas. Para incubação desse material usou-se 2 L de água destilada e 200 mM de fenilmetanosulfonilfluorido-PMSF (inibidor de protease sintético) por 12 horas a 4 °C, seguido da precipitação das proteínas com TCA (ácido tricloroacético PA – C₂HCCl₃O₂) (Sigma Aldrich, USA) a 2,5% (v/v), e com sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄) 50% (m/v). O material foi centrifugado a 8.000g por 40 minutos a 4 °C. O precipitado foi dissolvido e dialisado contra água destilada. O BTCl foi purificado por cromatografia de troca iônica utilizando resina DEAE-celulose, previamente ativada. O BTCl foi eluído utilizando tampão fosfato 10 mM, pH 7,3 e gradiente linear de Cloreto de Sódio (NaCl) (0 a 800 mM). As frações correspondentes ao pico de extração do BTCl foram dialisadas e liofilizadas.

A análise da pureza e a identificação da massa molecular dos componentes moleculares obtidos das purificações foram analisadas em um espectrômetro de massa MALDI-TOF/TOF UltraFlex III sob controle do programa computacional Flex Control 3.3 (Bruker Daltonics, ALE). A amostra foi dissolvida em água ultrapura (10-20 µL). Utilizando parafilme como suporte para as gotas de cada mistura, 1,0 µL de cada amostra foi misturado em 3 µL em uma solução de matriz saturada de ácido α-cyano-4-hidroxicinâmico contendo 5 mg de ácido α-cyano-4-hidroxicinâmico, 200 µL de água ultrapura, 250 µL de acetonitrila e 50 µL de ácido trifluoroacético). Um µL da mistura foi depositado em triplicata em uma placa de MTP AnchorChip 600/384. Após a secagem completa das amostras a temperatura ambiente, as análises por meio de espectrometria de massa foram realizadas.

Os espectros foram adquiridos a partir de 200 disparos de laser tipo *Smart Beam* à frequência de 100 Hz em modo linear e positivo. Para essas análises foi realizada calibração externa com uma mistura padrão de proteínas em uma faixa m/z 700 a 4000 e 4000 a 20000. Essas faixas de massas moleculares dos calibrantes compreendem as massas moleculares nominais dos componentes das

amostras de interesse conforme relatado anteriormente (VENTURA e XAVIER, 1966; VENTURA e MORHY, 1975; MORHY e VENTURA, 1987).

Para quantificar o BTCl usou-se da concentração (C) do BTCl em solução, utilizou-se o espectrofotômetro Biochrom Libra S 12 (Biochrom Libra Instruments, EUA) em 280 nM e da equação (1) descrita abaixo. Sendo o valor da absorbância (A) de 1% de BTCl a 280 nm ($A^{1\%}$) é 8,23:

Equação (1)

$$C \text{ (mg/mL)} = \frac{A_{280 \text{ nM}} \cdot 10}{A^{1\%}_{280 \text{ nm}}}$$

A purificação de BTCl de sementes de *V. unguiculata*, após o processo de síntese e a análise de sua pureza foram realizadas antes dos ensaios *in vivo* e *ex vivo*.

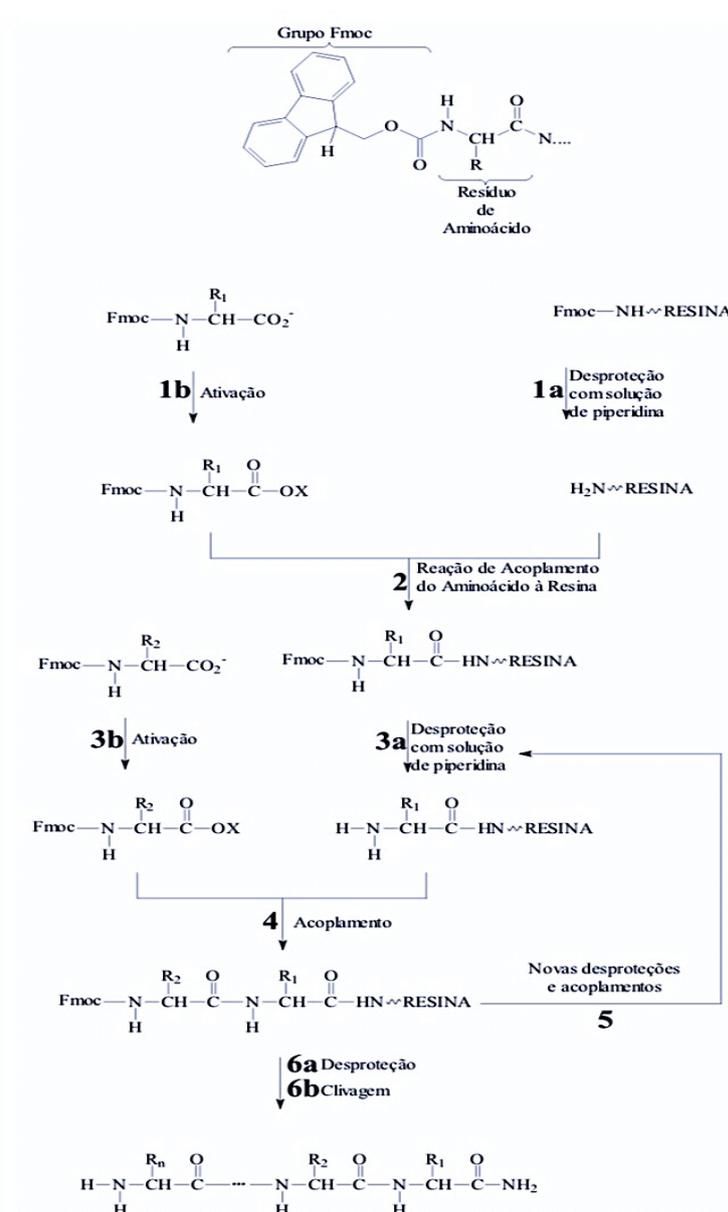
V.2 Purificação dos peptídeos, PepTry e PepChy, derivados do BTCl

O PepTry (CTKSIPPQC-OH; SS em Cys 1-9) e o PepChy (CTFSIPAQC-OH; SS em Cys 1-9) foram adquiridos da AminoTech Research and Development (São Paulo, SP, Brasil), os quais foram sintetizados por método de fase sólida padrão usando a estratégia FMOC (Figura 11) (FIELDS e NOBLE, 1990; BARANY e MERRIFIELD, 1995). A purificação dos mesmos, após o processo de síntese e a análise de sua pureza foram realizadas antes dos ensaios *in vivo* e *ex vivo*.

A síntese foi realizada através de etapas de desproteção do grupo FMOC utilizando 20% (v/v) de 4-metilpiperidina em dimetilformamida (DMF). A ligação peptídica foi formada usando 2-(1H-Benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyaminium tetrafluoroborate (TBTU) em 4-metilpiperidina em dimetilformamida (DMF) à temperatura ambiente. O peptídeo completo ligado à resina foi obtido após sucessivos ciclos de remoção dos grupos FMOC e acoplamento com os aminoácidos subsequentes (KAISER et al., 1970). O peptídeo foi clivado da resina em 92,5% (v/v) de ácido trifluoroacético (TFA), 2,5% (v/v) de thioanisole, 2,5% (v/v)

de 1,2-ethanedithiol, 2,5% (v/v). O peptídeo foi precipitado usando diisopropiléter (-20 °C) e coletado por filtração, solubilizado usando 50% (v/v) de acetonitrila (ACN) e depois liofilizado. A formação de ligações dissulfeto foi conseguida em solução diluída tamponada, ajustada com NH₄OH ao pH 8.

Figura 11: Fluxograma. Esquema de síntese em fase sólida de peptídeos, segundo estratégia Fmoc.



RESENDE, Jarbas Magalhães. **Estudos estruturais e das interações com membranas de peptídeos antimicrobianos por RMN em solução e em fase sólida. Análise conformacional e cálculos *ab-initio* de tensores de blindagem.** 2008. 179 f. Tese (Doutorado em Ciências – Química) - Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte/MG 2008.

Os peptídeos foram sintetizados quimicamente e purificados por cromatografia eluída de alta eficiência semi-preparada (do inglês *reversed phase high performance liquid chromatography* – RP-HPLC) (Classe LC-20A da Shimadzu Corp., Kyoto, Japão), utilizando coluna com semi-preparativo C18 Shim-pak VP-ODS (5 µm, 4,6 x 250 mm) (Shimadzu Corp., Kyoto, Japão) com um gradiente linear (5% - 45%) de ACN. A coluna foi lavada com 95% de acetonitrila - ACN e 0,1% de ácido trifluoroacético - TFA e equilibrada com 5% de ACN e 0,1% de TFA. Extrato de peptídeo bruto foi aplicado em coluna submetida a um gradiente linear (5 a 95%) de ACN durante 90 minutos a uma taxa de fluxo de 1,0 mL/min. O perfil cromatográfico foi seguido pela leitura da absorbância a 220 nM.

A pureza e a massa molecular dos peptídeos foram analisadas por espectrometria de massa por ionização por *electrospray* (ESI-MS) num sistema LCMS-2020 (Shimadzu Corp., Kyoto, Japão) sob modo refletor positivo com calibração externa. Os intervalos de massa molecular dos calibradores compreendem as massas moleculares dos peptídeos de cerca de 950 Da. Já a quantificação dos peptídeos hipotensores purificados foi estimada utilizando absorbância a 205 nM, 215 nM e 225 nM e conforme o método de Murphy e Kies (1960), como se segue nas equações 2, 3 e 4:

Equação (2)

$$C (\mu\text{g/mL}) = \frac{(X + Y) \cdot \text{fator de diluição}}{2}$$

Sendo que,

Equação (3)

$$X = (A_{215\text{nM}} - A_{225\text{nM}}) \cdot 144$$

Equação (4)

$$Y = A_{205\text{ nM}} \cdot 31$$

V.3 Ensaios contra tripsina e quimotripsina

As atividades inibitórias do BTCI, PepTry e PepChy, contra as atividades de tripsina e quimotripsina foram avaliadas utilizando os substratos Na-benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida (BAPNA) e n-glutaril-L-fenilalanina-p-nitroanilida (GPNA), respectivamente, (Sigma) (ERLANGER et al., 1961). Os ensaios enzimáticos foram realizados em Tris-HCl 50 mM, CaCl₂ 20 mM, pH 7,6 para quimotripsina ou pH 8,2 para tripsina. Foram incubados 40 µL de BTCI e PepTry (0 a 20 µM), e BTCI e PepChy (0 a 50 µM) com 40 µL de tripsina e quimotripsina, respectivamente, em uma placa de 96 poços à temperatura ambiente por 15 minutos. Então, 200 M de BAPNA (0,064 mg/M) ou GPNA (0,8 mg/mL) foram adicionados. A reação foi interrompida pela adição de 30 µL de ácido acético a 30%. A hidrólise enzimática do substrato foi avaliada registrando a absorvância a 410 nM. Na presença dos inibidores, as atividades residuais das enzimas foram estimadas considerando a atividade enzimática livre como sendo 100%. Sabe-se que a constante de ionização usada para calcular a quantidade da concentração molar (mol/L) dos íons presentes em uma solução preparada por intermédio da dissolução de um composto iônico em água. As constantes de inibição dos complexos enzima-inibidor, K_i , foram calculadas a partir das curvas de inibição ajustadas (MORRISON, 1982) utilizando o programa GRAFIT versão 3 (Erithacus Software, Horley, Surrey, Reino Unido).

V.4 Ensaio de inibição da Enzima Conversora da Angiotensina (ECA)

As atividades inibitórias dos peptídeos PepTry/PepChy e do BTCI contra a ECA foram realizadas utilizando-se o substrato sintético hipuril-L-histidil-L-leucina (HHL) (HAYAKARI et al., 1978). De modo conciso, a solução estoque da ECA foi obtida a partir do substrato de pulmão de coelho em tampão de fosfato de sódio 10 mM em pH 8,3, e as soluções de estoque de BTCI e peptídeos (m/v) foram preparadas em água MilliQ. A concentração do BTCI foi estimada a partir da absorvância espectrofotométrica a 280 nM com base em $A_{280}^{1\%} = 8,23$ (equação 1).

A concentração de PepTry e PepChy foi estimada de acordo com a equação 2. Considerou-se a cubeta de 1 cm de trajeto óptico e $\epsilon=5253 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. O BTCI e os peptídeos foram diluídos em 10 mM de tampão de fosfato de sódio com pH 8.3 para obter a concentração variando entre 0 e 600 µM. Foram pré-incubadas 10 µL de soluções peptídicas com 10 µL de ECA contendo 0,5 M de NaCl a 37 °C por 10 minutos. A mistura foi então incubada com 10 µL do substrato de pulmão de coelho

contendo 12,5 mM de HHL em 10 mM de tampão fosfato de sódio com pH 8,3 e 300 mM de NaCl a 37 °C durante 45 minutos.

A reação enzimática foi concluída adicionando uma mistura contendo 550 µL de fosfato de sódio – 100 mM com pH 8.3, e 332,5 µL de trinitrato de glicerina (TT) a 3% (m/v) (em dioxano). A mistura foi incubada durante 5 minutos a temperatura ambiente e depois centrifugado a 1000 g durante 10 minutos a 4 °C. Os valores de absorvância dos sobrenadantes contendo ácido hipúrico liberado de HHL foram registados a 382 nM utilizando o Espectrofotômetro Jasco V-530 (Jasco Analytical Instruments, Tóquio, Japão).

Para obter os dados quantitativos de cada inibidor testado foi usada nesse ensaio a concentração inibitória máxima (IC₅₀) que induz uma resposta na metade entre a taxa inicial e a máxima após um tempo especificado. Os valores de IC₅₀ para peptídeos e BTCl foram então calculados ajustando os dados numa regressão não linear a partir de um gráfico da atividade residual da ECA (%) *versus* concentração de inibidores (BTCl, PepTry e PepChy) (µM), utilizando o software Origin (OriginLab Corporation, EUA). O controle foi preparado contendo apenas o substrato sem solução enzimática. O ensaio foi realizado em triplicata.

V.5 Interações de peptídeos com a ECA por procedimento de *docking*

A ligação dos peptídeos ao sítio ativo da ECA foi realizada utilizando o Algoritmo Evolutivo para Acoplamento (EADock) (GROSDIDIER et al., 2007), um algoritmo evolucionário híbrido com duas funções de adequação, em interface com o pacote CHARMM para cálculos de energia e manipulação de coordenadas. As coordenadas tridimensionais da proteína alvo (ECA) (NATESH et al. 2003 - pdb code 1O8A) e ligantes, PepTry e PepChy, derivados da estrutura de BTCl (Barbosa et al. (2007) - pdb code 3RU4), foram consideradas para o procedimento de *docking*.

As coordenadas tridimensionais dos ligantes foram preparadas usando o programa Pymol (DeLano Scientific LLC) e convertidas em um formato de arquivo MOL2 com todos os hidrogênios usando o programa OpenBabelGUI (O'BOYLE et al., 2011) versão 2.4.1. O melhor modelo foi classificado de acordo com a posição dos ligantes mais próximos ao sítio ativo da ECA, bem como os *escores* de ancoragem (FullFitness) e os valores estimados de energia livre de Gibbs mais favoráveis para o processo de ligação do peptídeo ECA.

V.6 Ensaio *in vivo* da atividade hemodinâmica e cardiovascular do BTCl e seus peptídeos derivados.

O protocolo deste ensaio foi desenvolvido pelo Professor Dr. Gustavo Rodrigues Pedrino e equipe, no Laboratório de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Goiás-UFG. Os procedimentos experimentais foram concebidos com estrita observância às diretrizes do Instituto Nacional de Saúde para cuidado e uso de animais de laboratório aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Goiás (número de protocolo 013/2016), de acordo com o disposto na Lei nº. 11.794 de 08/10/2008, e Resolução Normativa nº. 01, de 09/07/2010 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal-CONCEA.

V.6.1 Modelos experimentais

O Instituto Wistar, na Filadélfia, desenvolveu uma linhagem albina – os ratos Wistar – derivada da espécie *Rattus norvegicus*. O fisiologista Dr. Henry Donaldson, a embriologista Dra. Helen Dean King e Dr. Milton Greenman, em 1906, foram os responsáveis pelas realizações de minuciosas pesquisas na linhagem de ratos Wistar considerados normotensos, para a obtenção de dados de curvas de crescimento, tanto do esqueleto e dos órgãos como do cérebro. Estes estudos foram fundamentais para a ampla utilização desta linhagem, a mais utilizada mundialmente em pesquisas laboratoriais (THE WISTAR INSTITUTE, 2007).

A cepa de ratos espontaneamente hipertensos *Spontaneous Hypertensive Rats* (SHR) descendeu dos ratos normotensos Wistar-Kyoto (WKY) por meio de reprodução genética entre irmãos desta linhagem, após a 6ª geração de cruzamento (NATIONAL RESEARCH COUNCIL – U.S.A. 1976). Devido a similaridade fisiopatológica com a hipertensão essencial do ser humano (pressão arterial média de 120-140mmHg), o modelo de hipertensão espontânea em ratos (SHR) tem sido utilizado em estudos de hipertensão arterial (TRIPPODO e FROHLICH, 1981).

Os SHR quando nascem não são portadores de hipertensão arterial e esta aparece a partir da 5ª semana de vida. Entre a 7ª e a 15ª semanas os níveis da PA são considerados hipertensivos, atingindo o platô hipertensivo entre a 20ª a 28ª semana (YAMORI, 1984). Esta cepa foi então introduzida em 1963 por Okamoto e Aoki.

Nos dias atuais, os ratos Wistar (WR) também são usados como controle dos SHR tanto quanto o WKY (FRITZ e RINALDI, 2008; OYAMA et al., 2010). Estes estudos foram fundamentais para a ampla utilização desta linhagem considerada a mais utilizada mundialmente em pesquisas laboratoriais (THE WISTAR INSTITUTE, 2007).



Características

Espécie: *Rattus norvegicus*

Família: Muridae

Raça: Wistar

Fonte: SDCFMUSP

Existem vários fatores que contribuem para escolha de somente ratos machos para diversos experimentos laboratoriais, dentre eles, a possibilidade da fêmea ter de três a seis ninhadas por ano com duração de 21 dias cada gestação e os níveis elevados de hormônios femininos... É preciso também levar em conta que os machos disputam permanentemente entre si pelo domínio do grupo, o que pode gerar variações entre animais.

Nos experimentos para os ensaios dos parâmetros hemodinâmicos e cardiovasculares foram utilizados ratos machos adultos (250-350 g) da linhagem WR e SHR, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Goiás - UFG. Os animais foram mantidos em salas climatizadas (temperatura 22-24 °C) e tiveram acessos *ad libitum* à água de torneira e ração.

Para encontrar a fração correta do BTCl usou-se diluído em 0,5 mL de soro fisiológico (0,9%):

0,5 mg/kg; 1,0 mg/kg; 2,0 mg/kg; 3,0 mg/kg;

5,0 mg/kg; 10,0 mg/kg; 15,0 mg/kg;

20,0 mg/kg; 25,0 mg/kg e 30,0 mg/kg (volume usado)

Para encontrar a fração correta do PepTry e PepChy em relação ao BTCl uso-se dos seguintes cálculos:

MM Pep's/MM BTCI

Massa Molar (MM) do BTCI → 9,1 kDa

Massa Molar do PepTry → 973,43 Da

Massa Molar do PpeChy → 966,39 Da

PepTry = 973,43/91000 => 10,70%

PepChy= 966,39/91000 => 10,62%

Foram usados 11% (por aproximação) de PepTry e PepChy para encontrar a fração necessária, conforme a equação (5):

Equação (5)

(BTCI) 100% ----- 30,0 mg/kg

(PepTry/PepChy) 11% ----- X = 3,3 mg/kg

Com os sinais vitais dos ratos estabilizados foi administrado, após diluir em 0,5 mL de soro fisiológico (0,9%), via gavagem, a proteína BTCI (30,0 mg/kg), ou seus peptídeos derivados para Quimotripsina (PepChy – 3,3 mg/kg) e para Tripsina (PepTry – 3,3 mg/kg). Sendo, logo em seguida, analisadas as reações fisiológicas dos animais ao longo de seis horas.

V.6.2 Procedimentos cirúrgicos

Para a realização dos procedimentos cirúrgicos, os animais foram anestesiados inicialmente com halotano (2% em O₂ 100%; Tanohalo; Cristália, Itapira-SP, Brasil). A veia femoral direita foi canulada para a infusão do anestésico intravenoso uretana (1,2 mg.kg⁻¹, iv.); Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). A artéria femoral foi canulada para o registro da pressão arterial.

Posteriormente foi realizada a traqueostomia, técnica na qual ocorre a implantação de uma cânula na traqueia do animal com o objetivo de diminuir o esforço respiratório. Para o registro do eletrocardiograma (ECG) foram implantados subcutaneamente dois eletrodos de cobre, um na região dorsal próximo ao membro superior esquerdo e o outro eletrodo próximo ao membro inferior direito. Em seguida, os animais foram colocados em decúbito ventral em um aparelho estereotáxico (David Kopf Instruments, Tujunga, CA, EUA) e o dorso foi aberto, expondo o rim

esquerdo, a veia femoral esquerda e a artéria aorta para aferição do fluxo sanguíneo renal (FSR) e do fluxo sanguíneo aórtico (FSA).

Uma sonda em miniatura (probe 1RB, Transonic Systems, Inc., Ithaca, NY, EUA) foi implantada ao redor da artéria renal esquerda para o registro do fluxo sanguíneo renal (FSR). Uma segunda sonda em miniatura (probe 2RB, Transonic Systems, Inc., Ithaca, NY, EUA) foi implantada ao redor da artéria aorta abdominal para o registro do fluxo sanguíneo aórtico (FSA). Ambas as sondas registraram, se com o uso dos inibidores que estavam sendo testados, houve ou não Interferência nos respectivos fluxos. Durante todo o experimento, a temperatura corporal foi mantida entre 36 °C e 37 °C com o auxílio de uma mesa térmica.

V.6.3 Registros dos parâmetros hemodinâmicos e cardiovasculares

A pressão arterial pulsátil (PAP) foi obtida conectando a cânula arterial a um transdutor de pressão (MLT0380, ADInstruments, Bella Vista, Austrália) acoplado a um amplificador (Bridge Amp, ML221, ADInstruments, Bella Vista, Austrália). Os dados foram digitalizados em uma frequência de 1000 amostras.s⁻¹, utilizando um conversor analógico digital (PowerLab 4/25, ML845, ADInstruments, Bella Vista, Austrália) e registrados em um computador por meio do software LabChart 7 (ADInstruments, Bella Vista, Austrália). A PAM foi calculada a partir da integral do sinal da PAP (PowerLab 4/25, ML845, ADInstruments, Bella Vista, Austrália). Os sinais analógicos do ECG foram obtidos por meio do posicionamento dos eletrodos no membro superior esquerdo e membro inferior direito. Os sinais foram digitalizados em uma frequência de 2.000 amostras por segundo utilizando-se um conversor analógico digital (PowerLab 8/25, ML845, ADInstruments, Bella Vista, Austrália). A FC foi calculada como frequência instantânea a partir do sinal digitalizado do ECG (Chart Pro, versão 5.5.6; ADInstruments, Bella Vista, Austrália).

O FSR e FSA foram registrados por fluxometria de tempo de trânsito como representado por Welch et al. (1995). Para isso, a sonda em miniatura foi conectada a um fluxômetro T206 (Transonic Systems, Inc., Ithaca, NY, EUA), que permite determinar o fluxo em valores absolutos (mL.min⁻¹). Os sinais obtidos foram enviados ao sistema de aquisição e análise de dados (PowerLab 4/25, ML845, ADInstruments, Bella Vista, Austrália). Os dados foram digitalizados em uma frequência de 1000 amostras.s⁻¹. A variação do FSR foi calculada usando da razão

percentual correlacionada com o valor basal (%FSR) de conformidade com a equação abaixo:

Equação (6)

$$\%FSR = \frac{(FSR_{final} - FSR_{basal})}{FSR_{basal}} \cdot 100$$

A variação do FSA também foi calculada tendo a razão percentual relacionada ao valor basal (%FSA) conforme equação (7):

Equação (7)

$$\%FSA = \frac{(FSA_{final} - FSA_{basal})}{FSA_{basal}} \cdot 100$$

A condutância vascular renal (CVR) foi obtida usando a razão entre o FSR e PAM, concomitantemente. Na equação (8) a variação da CVR foi calculada:

Equação (8)

$$\%CVR = \frac{(CVR_{final} - CVR_{basal})}{CVR_{basal}} \cdot 100$$

Da mesma forma, a condutância vascular aórtica (CVA) foi obtida pela razão entre o FSA e PAM, respectivamente. As variações da CVA foram calculadas como variação percentual em relação ao valor basal (%CVA), utilizando-se a seguinte equação (9):

Equação (9)

$$\%CVA = \frac{(CVA_{final} - CVA_{basal})}{CVA_{basal}} \cdot 100$$

Os parâmetros hemodinâmicos e cardiovasculares, PAS; PAD; PAM; FC; FSR; FSA; CV

V.7 Ensaios em ratos *ex vivo* da atividade na contratilidade ventricular esquerda e vasodilatação coronária

O protocolo deste ensaio foi desenvolvido pelo Professor Dr. Carlos Henrique de Castro e equipe, no Laboratório Integrado de Fisiopatologia Cardiovascular e Neurológica da Universidade Federal de Goiás-UFG. Os procedimentos experimentais foram concebidos com estrita observância às diretrizes do Instituto Nacional de Saúde para cuidado e uso de animais de laboratório aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Goiás (número de protocolo 013/2016), de acordo com o disposto na Lei nº. 11.794 de 08/10/2008, e Resolução Normativa nº. 01, de 09/07/2010 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal-CONCEA.

V.7.1 Ensaios sob efeito do BTCl, PepChy e PepTry na contratilidade ventricular esquerda e vasodilatação coronária em ratos *ex vivo*

A contratilidade ventricular esquerda corresponde à força externa do músculo. Sendo esta força diretamente proporcional à pressão e ao volume de ejeções ventriculares, independente de variações na resistência arterial e na pré-carga ventricular.

O suprimento sanguíneo para o miocárdio provém das artérias que são autoreguladoras e, por mecanismo de vasodilatação se adequam às variações pressóricas, mantendo um fluxo sanguíneo constante e adequado ao bom desempenho do miocárdico.

Nesse ensaio também foram usados ratos machos WR e SHR pesando 250 g a 350 g. Para avaliar o efeito cardíaco do BTCl e PepChy, corações isolados foram perfundidos de acordo com a técnica de Langendorff (BELL et al., 2011). Os animais foram decapitados 10 a 15 minutos após uma injeção intraperitoneal com 200 U.I. de heparina. O tórax foi aberto e o coração foi cuidadosamente dissecado e conectado no sistema Langendorff por meio do coto aórtico.

Os corações foram perfundidos com solução de Krebs-Ringer contendo 118,4 mM de NaCl, 4,7 mM de KCl, 1,2 mM de KH_2PO_4 , 1,2 mM de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,25 mM de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 11,7 mM de glucose e 26,5 mM de NaHCO_3 . Além disso, adicionou-se albumina (0,2 mg/mL) à solução de Krebs Ringer para evitar a agregação do

BTCl e dos peptídeos no material de vidro do sistema. O sistema foi mantido com fluxo de perfusão constante de 10 ± 2 mL/minuto, a 37°C e oxigenação constante (5% CO_2 e 95% O_2). Um balão foi inserido no ventrículo esquerdo por meio do átrio esquerdo para gravações isovolumétricas das pressões ventriculares esquerdas. A pressão de perfusão coronária foi aferida com um transdutor de pressão, ajustado para pressão intraventricular diastólica de 10 ± 2 mmHg, conectada à cânula aórtica.

Após um período basal (30 a 40 minutos) os corações foram perfundidos durante 10 minutos com *Krebs-Ringer solution* (KRS), mantendo o equilíbrio hidroeletrólítico, contendo: BTCl (1 nM); PepChy (1 nM) ou PepTry (1 nM). Para avaliar o possível envolvimento do óxido nítrico nos efeitos dos inibidores trabalhados, os corações foram perfundidos com KRS contendo o inibidor da sintase do óxido nítrico NG-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME; $1\ \mu\text{M}$) por 15 minutos antes da perfusão com BTCl, PepChy ou PepTry. Os dados foram analisados *on-line* utilizando um sistema de aquisição de dados (DATAQ Instruments, Akron, OH, EUA).

V.8 Análise estatística

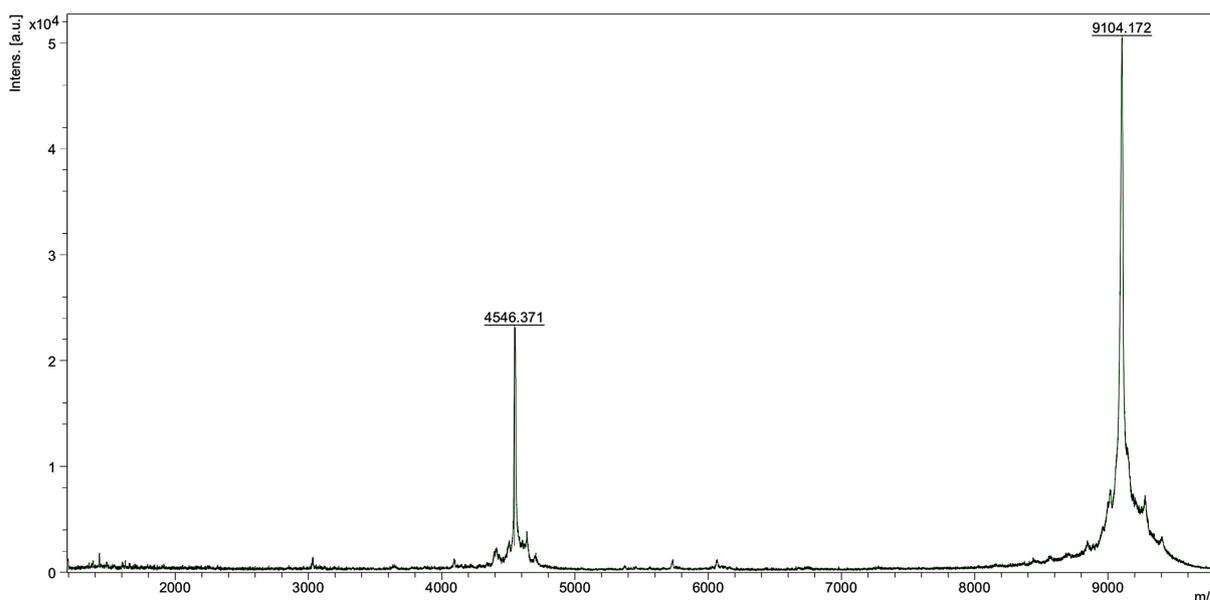
A análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prism (v 6.03). Os parâmetros cardiovasculares foram expressos como média \pm E.P.M (Erro Padrão de Média). As variações da PAS, PAD, CVR e CVA foram analisadas por meio de análise da variância bidirecional (ANOVA two way) seguida do pós-teste de *Tukey*. A resposta máxima após a administração de BTCl, PepChy e PepTry foi analisada pelo teste *t* de Student. A análise de variância de duas vias seguida pelo pós-teste de *Sidak* foi usada para comparar os resultados obtidos com os corações isolados. O valor de $p < 0,05$ foi considerado para denotar uma diferença significativa.

VI RESULTADOS

VI.1 Purificação do BTCI e peptídeos derivados, PepChy e PepTry

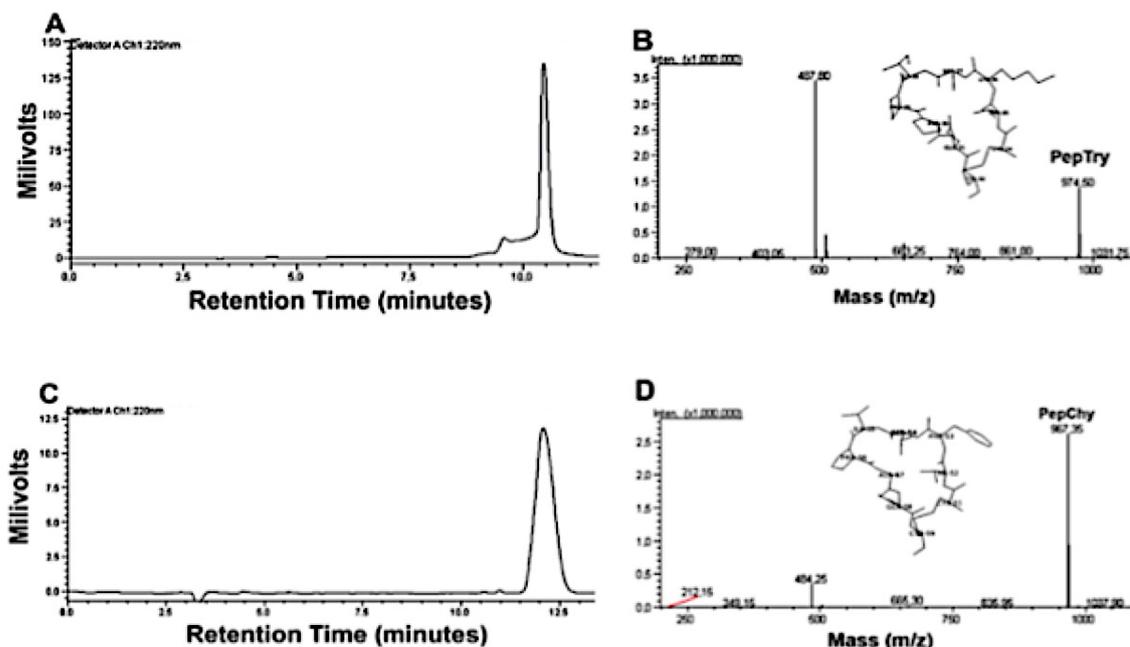
A purificação do BTCI de sementes de *V. unguiculata*, dos peptídeos e a análise da sua pureza foram realizadas antes dos ensaios *in vivo* e *ex vivo*. O BTCI apresentou alto grau de pureza e massa molecular de 9104.172 kDa (Figura 12).

Figura 12: Análise do grau de pureza do BTCI por espectrometria de massa. A massa molecular do BTCI foi de 9104,172 kDa e a dupla carga de 4546.371 kDa. Os dados foram obtidos utilizando um espectrômetro de massa MALDI-TOF/TOF UltraFlex III sob controle do programa computacional Flex Control 3.3 (Bruker Daltonics, ALE).



Os peptídeos foram sintetizados quimicamente e purificados por *Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography* (RP-HPLC). O perfil de RP-HPLC dos peptídeos coletados aos 10,5 minutos (PepTry) e aos 12,0 minutos (PepChy) estão apresentados na Figura 13 A e C, respectivamente. A massa molecular e a pureza dos peptídeos foram confirmadas por espectrometria ESI-MS conforme indicado por um único espectro para cada peptídeo (Figura 13 B e D). A massa molecular do PepTry foi de 974,5 Da e a dupla carga de 487,80 Da e do PepChy foi de 967,35 Da e dupla carga de 484,25 Da.

Figura 13: Purificação e pureza de peptídeos sintéticos PepTry e PepChy. A) e C) Cromatografia de fase reversa de PepTry e PepChy, respectivamente, na coluna C18 Shim-pak VP-ODS usando um gradiente linear (5% - 95%) de acetonitrila. B) e D) EIS-MS espectrometria de massa, identificando o PepTry com massa molecular de 974,5 Da e PepChy de massa molecular de 967,35 Da). As estruturas inseridas correspondem ao PepTry e PepChy.



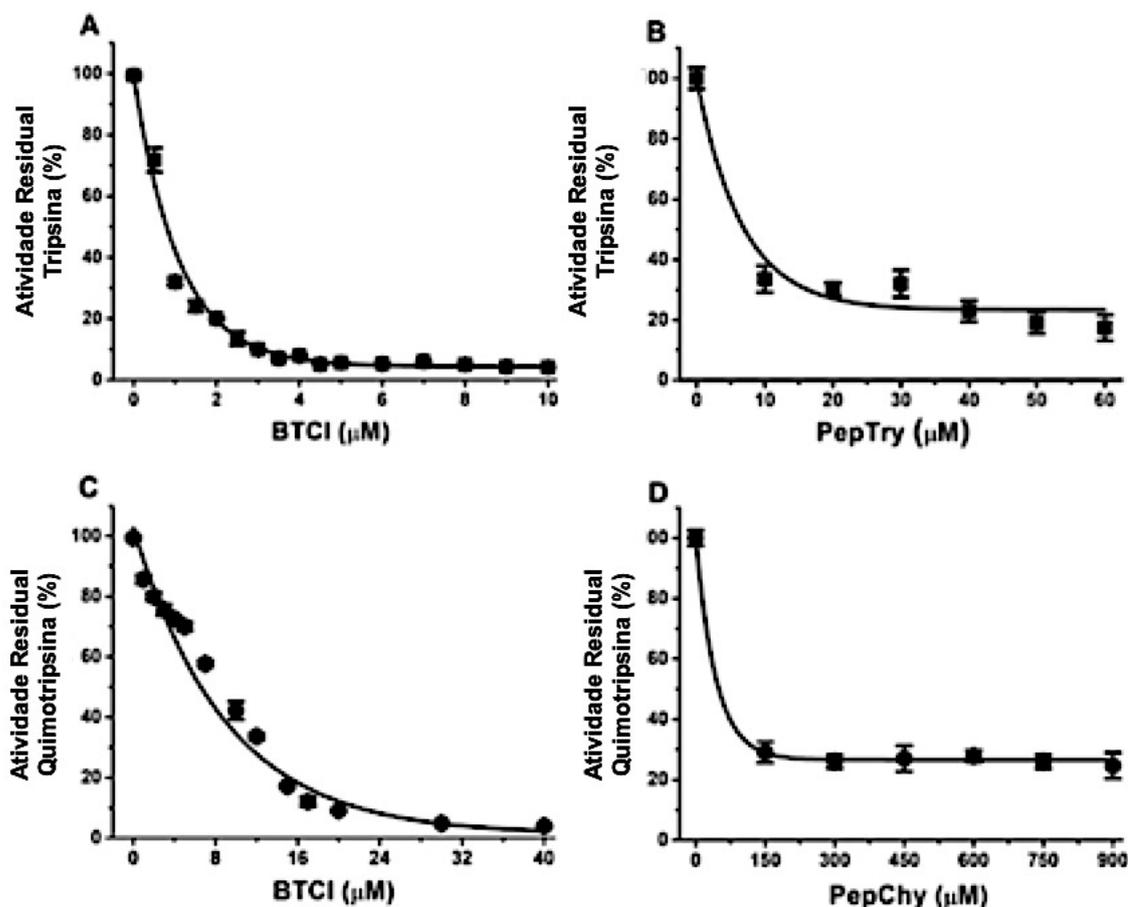
VI.2 Ensaio de inibição de BTCl, PepTry e PepChy contra tripsina e quimotripsina

A atividade inibitória de BTCl e seus peptídeos derivados, PepChy e PepTry, foi avaliada por meio da atividade enzimática residual de serinoproteases, tripsina e quimotripsina, na presença de concentrações crescentes de BTCl e seus peptídeos derivados (Figura 14).

Na ausência de BTCl e peptídeos, as proteases clivam substratos BAPNA/GPNA liberando o produto p-nitroanilida de cor amarela correspondente à atividade enzimática de 100% (ERLANGER, 1961). Na presença de BTCl e dos peptídeos, observa-se um declínio gradual das atividades das proteases. O BTCl com aproximadamente 6 μM e 40 μM inibe as proteases tripsina e quimotripsina, respectivamente, 10 vezes mais que PepTry (60 μM) e PepChy (400 μM). O ensaio inibitório mostrou que PepTry e PepChy requeriam uma concentração de cerca de 6 e 8 vezes mais alta que o BTCl para dar uma inibição total de tripsina e quimotripsina, respectivamente. Comparativamente, a menor afinidade dos

peptídeos pode ser devida à falta de regiões estruturais, como as que estabilizam toda a *interface* do complexo BTCl-protease.

Figura 14: Atividades inibitórias de BTCl e seus peptídeos derivados. (A) Atividade residual de tripsina na presença de concentrações crescentes de BTCl e PepTry (B). (C) Atividade residual de quimotripsina na presença de concentrações crescentes de BTCl e PepChy (D).

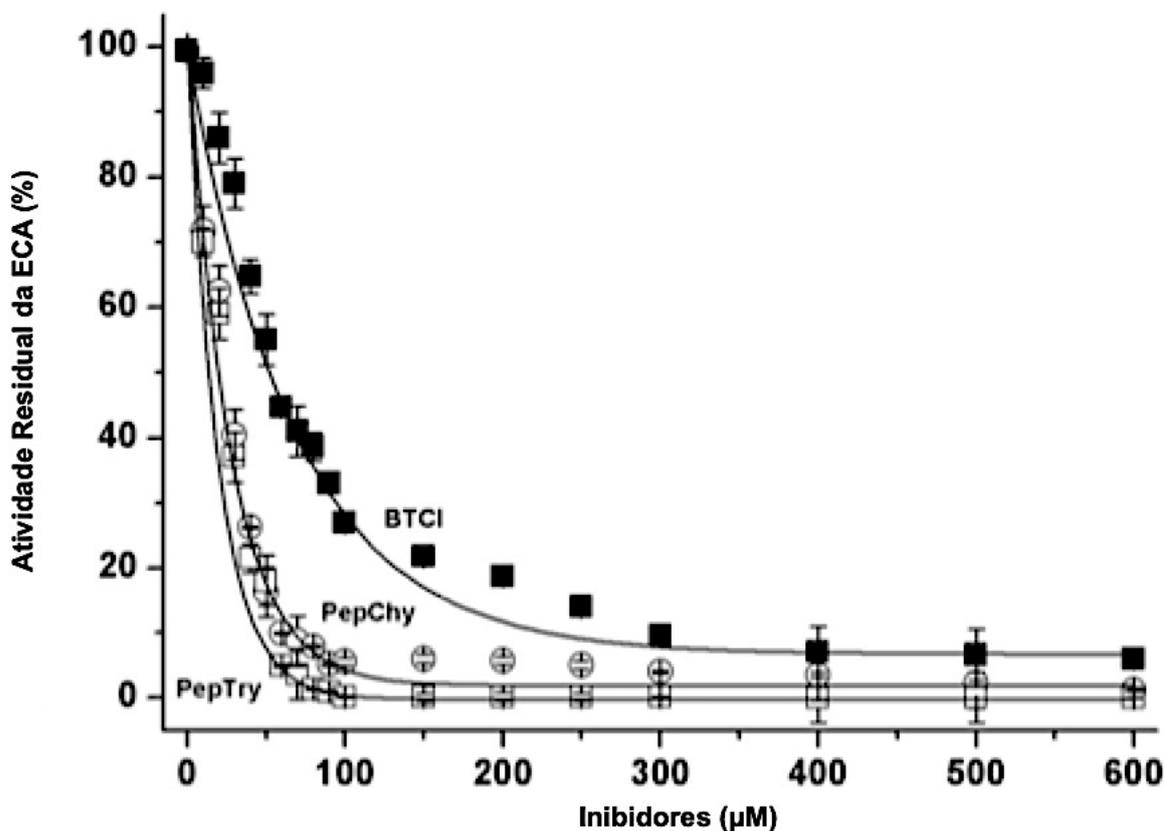


VI.3 Atividade inibitória da enzima conversora de angiotensina (ECA) com BTCl e peptídeos derivados, PepChy e PepTry

A atividade inibitória da ECA no BTCl e seus peptídeos derivados, PepChy e PepTry, foi avaliada em diferentes concentrações (0-600 μM), como mostrado na Figura 15. A atividade inibidora da ECA aumentou em um padrão dose-dependente. O maior valor inibitório de 98% foi para PepTry e PepChy a 100 μM , enquanto que cerca de 94% foi para o BTCl a 300 μM . As curvas de inibição da ECA foram ajustadas por um método não linear a partir do qual os valores IC_{50} para BTCl, PepChy e PepTry foram estimados como $54,6 \pm 2,9 \mu\text{M}$; $24,7 \pm 1,1 \mu\text{M}$ e $24,4 \pm 1,1$

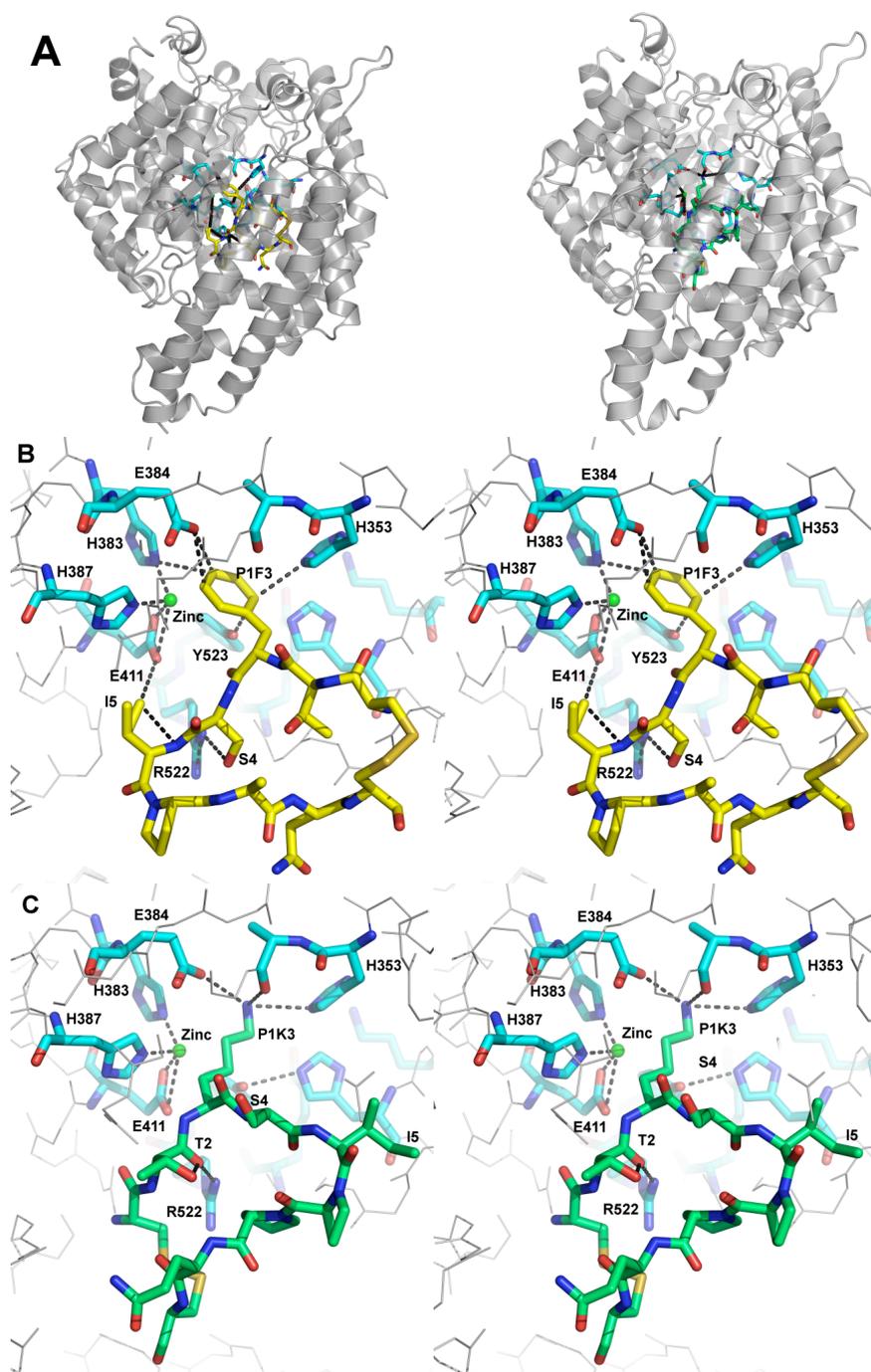
μM , respectivamente. Além disso, os valores de IC_{50} de BTCI, PepChy e PepTry estão de acordo com os peptídeos inibidores da ECA de várias proteínas depositadas no banco de dados BIOPEP (NAKAMURA et al., 1995 – [http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/en/bio pep](http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/en/bio%20pep)). Essas atividades inibitórias contra a ECA podem ser devido principalmente à presença dos aminoácidos básicos (lisina) e hidrofóbicos (fenilalanina) nas alças reativas do BTCI e os peptídeos derivados que também determinam a potência da inibição destas moléculas contra as proteases de tripsina e quimotripsina.

Figura 15: Atividades inibitórias de BTCI (■—■), PepChy (○—○) e PepTry (□—□) contra a enzima conversora da angiotensina (ECA). Valores de IC_{50} : BTCI ($54,6 \pm 2,9 \mu\text{M}$), PepChy ($24,7 \pm 1,1$) e PepTry ($24,4 \pm 1,1 \mu\text{M}$).



Os modelos tridimensionais dos complexos da ECA com os peptídeos, ECA-PepChy e ECA-PepTry, obtidos por *docking* estão apresentados na figura 16, com a representação da ECA em *cartoon* cinza, do PepChy em bastões amarelos e do PepTry em bastões verdes.

Figure 16: Estruturas tridimensionais dos complexos ECA-PepChy e ECA-PepTry obtidos por *docking*. (A) enzima conversora da angiotensina - ECA (cartoon cinza) em complexo com PepChy (bastões amarelos) e PepTry (bastões verdes). (B) Visualização estéreo do sítio ativo ECA (azul) com o PepChy (amarelo). O sítio reativo de PepChy (P1F3) na interface está em evidência. (C) Visualização estéreo do sitio ativo ECA (azul) com PepTry (verde). O sítio reativo do PepTry (P1K3) na interface esta em evidência.



Os efeitos inibitórios da ECA pelos peptídeos PepChy e PepTry são corroborados pelos dados obtidos na simulação de *docking* molecular. Essa metodologia foi utilizada para prever a formação dos complexos e identificar as interações entre os peptídeos e a ECA. As melhores posições dos ligantes com a região próxima ao sítio catalítico da ECA foram selecionadas (Figura 19: A-C) baseando-se nas energias de ligação (ΔG) de cerca de -11,0 kcal/mol. A maioria das ligações de hidrogênio foi observada entre o PepChy e a ECA (Figura 19: B) envolvendo três resíduos de aminoácidos no PepChy (F3, S4 e I5) e seis resíduos de aminoácidos na ECA (R522, E411, Y523, H383, E384 e H353). Para o PepTry (Figura 19: B), a maioria das ligações de hidrogênio foram observadas entre dois resíduos de aminoácidos no PepTry (T2 e K3) e três resíduos de aminoácidos na ECA (R522, E384 e A354).

Os resíduos reativos e em interação do tipo ligações de hidrogênio estão mostrados para o PepChy (P1F3) e PepTry (P1K3). Os átomos de oxigênio estão representados em vermelho, os nitrogênio em azul, o íon de zinco como esfera verde e as ligações de hidrogênio no complexo da interface como linhas pontilhadas. As estruturas cristalográficas utilizadas para o *docking* foram: ECA código PDB 1O8A (NATESH et.al., 2003), PepTry e PepChy e BTCl código PDB 2G81 (BARBOSA et al., 2007).

Além disso, foram observadas interações eletrostáticas entre PepTry (K3) e ECA (E384) e a interação de π - π em forma de T entre os anéis fenólicos de Y523 na ECA e F3 no PepChy que estabilizam o complexo formado. Vale ressaltar que os resíduos de aminoácidos H387, H383, E384 e E411 envolvidos na coordenação do zinco no sítio ativo da ECA também interagem com PepChy e PepTry (Figura 19: B-C). Portanto, todos os resultados indicaram que a interação entre a ECA e os peptídeos ocorreram nas proximidades do sítio catalítico, levando à inibição da enzima, corroborando com os valores de IC_{50} estimados a partir das curvas mostradas na Figura 18.

VI.4 Ensaios *in vivo* em ratos WR e SHR utilizando o BTCl e peptídeos por gavagem

Os efeitos cardiovasculares e hemodinâmicos foram avaliados na concentração equimolar (3,31 mM) para todas as moléculas, correspondendo às doses de BTCl (30,0 mg/kg), PepTry (3,3 mg/kg) e PepChy (3,3 mg / kg) ou NaCl a

0,9% (veículo). Os dados obtidos a partir dos registros *in vivo*, e as variáveis do estudo (i) modelo de ratos normotensos (WR) e naturalmente hipertensos (SHR), (ii) moléculas ativas – BTCl, PepChy e PepTry e (iii) controle – soro fisiológico (SF), estão descritos a seguir.

Todas as tabelas contendo os resultados destes ensaios *in vivo* estão apresentadas no Anexo 1.

VI.4.1 Análise comparativa dos efeitos do BTCl na PAS, PAD e PAM em ratos WR e SHR

Efeitos em controles da PAS, PAD e PAM (WR e SHR)

Os dados obtidos para o controle dos ensaios foram registrados após a administração por gavagem de SF (0,9%) em ratos adultos WR e SHR (controle). Os valores dos parâmetros hemodinâmicos registrados nos ratos WR aos 360 minutos foram próximos aos valores basais (Tabela 2 anexo 1; Figura 21).

Nos ratos WR a PAS e a PAD observadas foram $143,2 \pm 4,2$ mmHg (valor basal $142,3 \pm 1,1$ mmHg) e $91,6 \pm 4,1$ mmHg (valor basal $96,3 \pm 1,3$ mmHg), respectivamente. A média obtida para a PAM foi $108,7 \pm 4,1$ mmHg, sendo o valor basal $111,6 \pm 0,8$ mmHg. (Tabela 2 anexo 1; Figura 21).

Nos ratos SHR os valores foram: PAS $172,6 \pm 5,2$ mmHg (valor basal $177,0 \pm 3,3$ mmHg); PAD $98,6 \pm 3,7$ mmHg (valor basal $117,8 \pm 2,1$ mmHg); e PAM $123,1 \pm 4,0$ mmHg (valor basal $137,6 \pm 2,0$ mmHg) (Tabela 3 anexo 1; Figura 21).

Efeitos do BTCl na PAS, PAD e PAM em ratos WR

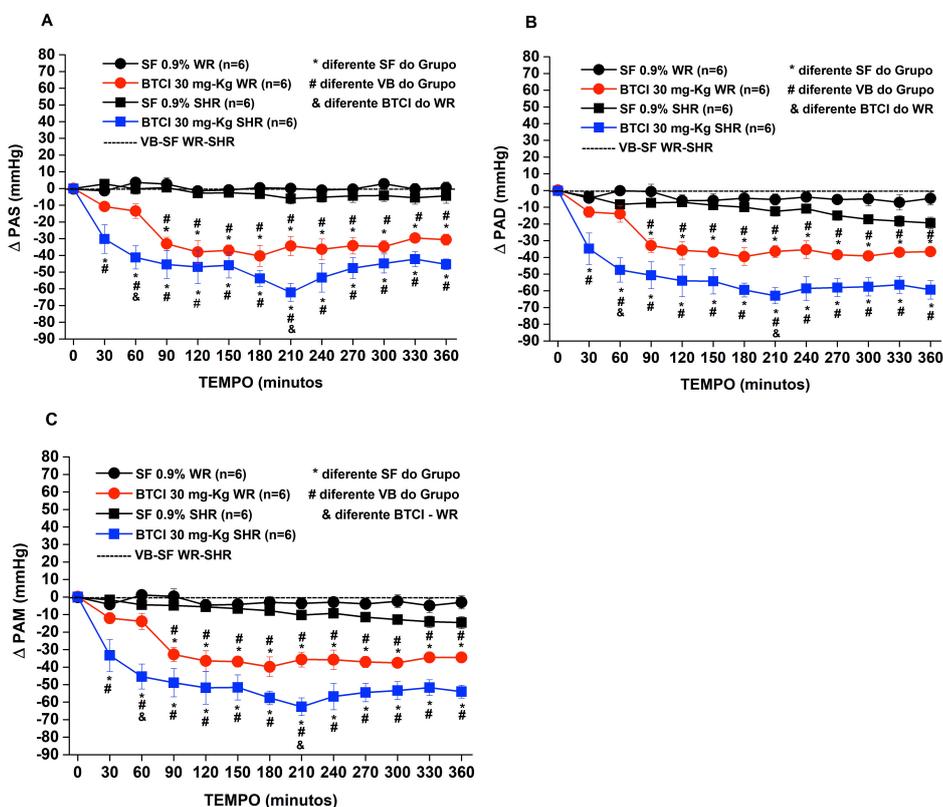
Para os ratos WR os valores dos parâmetros hemodinâmicos PAS, PAD e PAM, após administração do BTCl (30,0 mg/kg), diminuíram gradativamente sendo estabilizados em aproximadamente 180-360 minutos. Os valores atingidos aos 180 minutos foram: PAS $99,7 \pm 5,4$ mmHg (valor basal $140,1 \pm 1,3$ mmHg e SF $143,0 \pm 2,9$ mmHg); PAD $51,7$ mmHg $\pm 3,5$ (valor basal $91,5$ mmHg $\pm 3,0$ e SF $91,7$ mmHg $\pm 3,3$); PAM $67,6 \pm 4,1$ mmHg (valor basal $107,7 \pm 2,3$ mmHg e SF $108,7 \pm 3,1$ mmHg). Essa redução em relação ao valor basal foi gradativa até os 360 minutos em

28,1%, 67,9% e 47,8%, respectivamente (Tabela 2 anexo 1; Figura 17). Comprovando assim a hipotensão com a utilização da molécula BTCl, via gavagem.

Efeitos do BTCl na PAS, PAD e PAM em ratos SHR

Após a administração de BTCl (30,0 mg/kg), foi observada aos 30 minutos, em relação ao valor basal, a redução dos parâmetros hemodinâmicos PAS e PAD em 30,6% e 59,4% e redução da PAM de 31,3%, comparados ao valor basal e ao SF (23,9%, 26,7% e 27,4%, respectivamente). A maior queda da pressão arterial nos SHR ocorreu aos 210 minutos em 54,8% (PAS), 102,7% (PAD) e 80,6% (PAM). Os valores obtidos neste tempo foram: PAS $113,3 \pm 4,8$ mmHg (valor basal $175,4 \pm 2,5$ mmHg e SF $171,0 \pm 3,8$ mmHg); PAD $59,9 \pm 4,1$ mmHg (valor basal $121,4 \pm 3,0$ mmHg e SF $105,5 \pm 4,0$ mmHg); PAM $77,7 \pm 3,7$ mmHg (valor basal $140,3 \pm 2,5$ mmHg e SF $127,4 \pm 3,6$ mmHg) (Tabela 3 anexo 1; Figura 17).

Figura 17: Parâmetros hemodinâmicos em ratos WR *versus* SHR após administração do BTCl (30,0 mg/Kg). A) Pressão Arterial Sistólica (PAS). B) Pressão Arterial Diastólica (PAD). C) Pressão Arterial Medial (PAM). Valor Basal (VB). Soro Fisiológico (SF).



Essa redução em relação ao valor basal foi gradativa até os 360 minutos em 34,8%, 93,7% e 62,7%, respectivamente. Os valores mais altos registrados para a PAM nos modelos SHR indicam que o maior efeito hipotensivo ocorreu nos SHR.

Nas primeiras duas horas observa-se que os valores dos decréscimos registrados foram de aproximadamente 3,5 vezes maior nos ratos SHR. A maior queda da PAM para WR foi de $-39,8 \pm 5,6$ mmHg aos 180 minutos enquanto que para os SHR o valor foi $-57,6 \pm 3,9$ mmHg. Resultados semelhantes foram obtidos comparando os valores da PAS e PAD para os dois modelos dos ratos citados. Aos 210 minutos a queda dos valores obtidos para os SHR nos três parâmetros analisados foram maiores do que para os WR, demonstrando que o BTCl apresentou maior efeito hipotensor nos ratos SHR do que nos WR (Tabelas 2 e 3 anexo 1; Figura 17).

VI.4.2 Análise comparativa dos efeitos do BTCl na FC, FSR e FSA em ratos WR e SHR

Alterações bruscas na FC podem desencadear óbito tanto em seres humanos como em animais. Quanto menor o porte animal, maior a frequência cardíaca e conseqüentemente, menor a expectativa de vida (CÉSAR et. al., 2007). Em nossos ensaios, dentro dos parâmetros cardiovasculares observados foi monitorado, além da FC, os fluxos sanguíneos da artéria renal e aórtica para certificar se ocorreu ou não vasodilatação com os inibidores usados.

Efeitos em controles na FC, FSR e FSA (WR e SHR)

A média dos parâmetros cardiovasculares FC, FSR e FSA registrada nos controles em WR, aos 360 minutos, foi de valores próximos dos basais: FC $358,8 \pm 21,7$ bpm (valor basal $380,7 \pm 13,4$ bpm); FSR $97,9\% \pm 3,3$ (valor basal $99,6\% \pm 0,4$) e FSA $95,1\% \pm 1,4$ (valor basal $100,3\% \pm 0,3$) (Tabela 4 anexo 1; Figura 18).

Resultados similares foram obtidos para os SHR: FC $371,2 \pm 7,0$ bpm (valor basal $377,9 \pm 10,4$ bpm); FSR $104,9\% \pm 7,9$ (valor basal $99,8\% \pm 0,6$) e FSA $104,1\% \pm 3,6$ (valor basal $99,8\% \pm 0,2$) (Tabela 5 anexo 1; Figura 18).

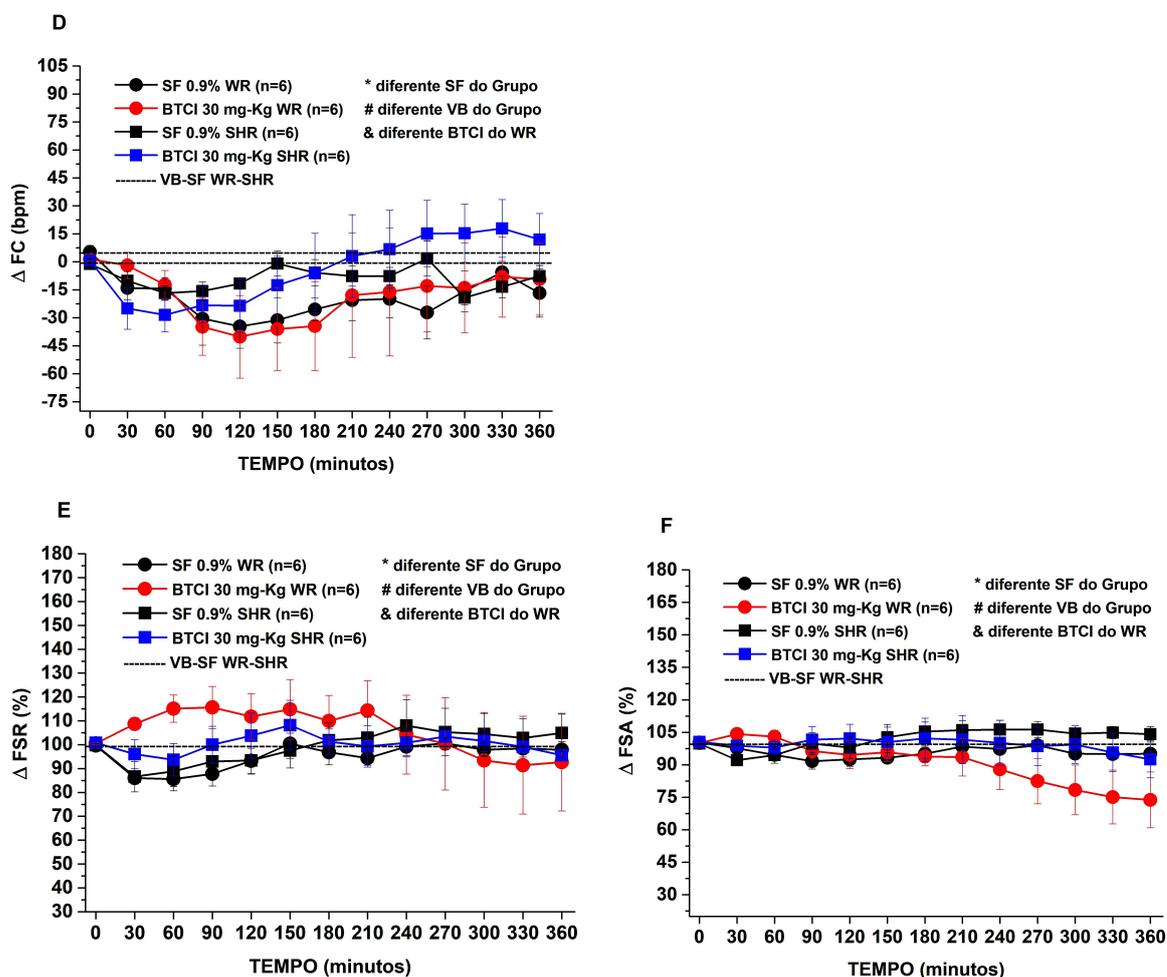
Efeitos do BTCl na FC, FSR e FSA em ratos WR

Após o uso do BTCl (30 mg/kg), a FC, o FSR e o FSA dos WR não apresentaram diferenças significativas em relação ao valor basal e ao SF, apesar da redução leve do valor da FC (12,7%) aos 120 minutos e elevação leve da FSR aos 90 minutos (15,1%) e FSA (4,2%) aos 30 minutos em relação ao basal (Tabela 4 anexo 1; Figura 18).

Efeitos do BTCl na FC, FSR e FSA em ratos SHR

Os parâmetros cardiovasculares FC, FSR e FSA dos SHR não apresentaram diferenças significativas em relação ao valor basal e ao SF, mesmo com discreta redução do bpm da FC (8,4%) aos 60 minutos e discreta elevação (3,8%) aos 270 minutos em relação ao basal (Tabela 5 anexo 1; Figura 18).

Figura 18: Parâmetros cardiovasculares em ratos WR *versus* SHR após administração do BTCl (30.0 mg/kg). D) Frequência Cardíaca (FC). E) Fluxo Sanguíneo Renal (FSR). F) Fluxo Sanguíneo Aórtico (FSA). Valor Basal (VB). Soro Fisiológico (SF) - ANOVA (*two way*).



VI.4.3 Análise comparativa dos efeitos do BTCi na CVR e CVA em ratos WR e SHR

Efeitos em controles na CVR e CVA (WR e SHR)

WR: Para CVR e CVA os valores foram semelhantes aos valores basais: CVR 100,7% \pm 2,1 (valor basal 99,7% \pm 0,5) e a CVA 98,2% \pm 2,8 (valor basal 100,4% \pm 0,4) (Tabela 6 anexo 1; Figura 19).

SHR: Para CVR e CVA os valores foram semelhantes aos valores basais: CVR 119,2% \pm 12,0 (valor basal 99,8% \pm 0,6) e CVA 117,4% \pm 6,4 e (valor basal 99,9% \pm 0,2) (Tabela 7 anexo 1; Figura 19).

Efeitos do BTCi na CVR e CVA em ratos WR

Os valores da CVR e da CVA, após a administração do BTCi (30,0 mg/kg) em ratos WR indicam vasodilatações das artérias renal e aórtica, sendo que, em relação ao valor basal, os picos máximos ocorreram em aproximadamente 180 minutos: 74,7% e 50,6%, respectivamente (Tabela 6 anexo 1; Figura 19).

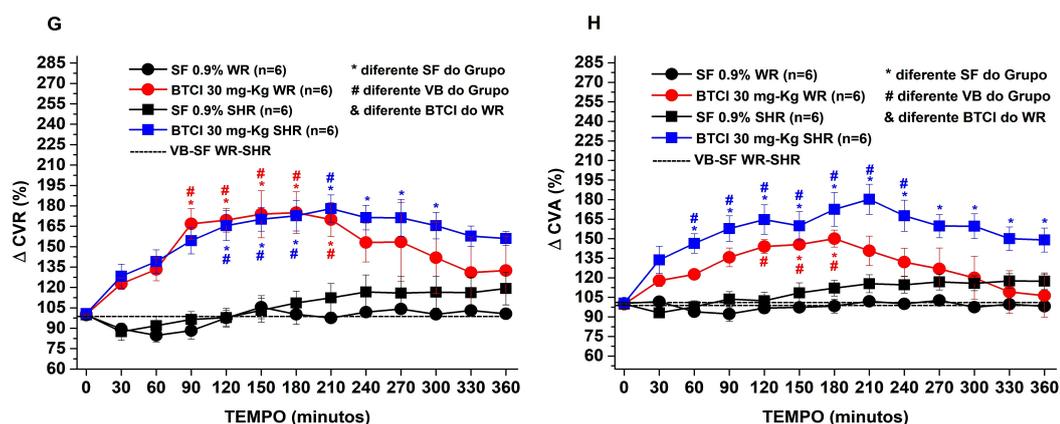
Efeitos do BTCi na CVR e CVA em ratos SHR

A tabela 7 anexo 1 e figura 19 mostram os dados obtidos para a vasodilatação das artérias renal e aórtica em ratos SHR. Aos 90 minutos até os 300 minutos do ensaio registrou-se aumento expressivo na CVR e na CVA em relação ao valor basal e ao SF. Aos 210 minutos foram registrados os maiores valores de 76,6% e 79,5%, respectivamente, também em relação ao valor basal. Estes valores foram mais expressivos neste modelo do que nos WR (Tabela 6 anexo 1; Figura 19), e indicaram a vasodilatação das artérias o que contribuiu para a hipotensão observada.

Os resultados apresentados na figura 19 mostram que em relação ao valor basal, aos 180 minutos os valores da condutância renal e aórtica aumentaram significativamente nos WR (74,7% e 50,6%, respectivamente) e nos SHR (71,4% e 71,7%), todos eles compatíveis com efeitos de vasodilatações das respectivas artérias. Comparando os dois modelos estudados, observa-se que até 180 minutos os valores mensurados na CVR foram semelhantes (76,6%), e diferiram até os 360

minutos. Nos SHR o valor máximo da CVA (79,5%) foi maior do que em WR, aos 210 minutos (Figura 19).

Figura 19: Parâmetros cardiovasculares em ratos WR *versus* SHR após administração do BTCl (30,0 mg/kg). G) Condutância Vascular Renal (CVR) e H) Condutância Vascular Aórtica (CVA). Valor Basal (VB). Soro Fisiológico (SF).



VI.5 Análise comparativa dos efeitos do PepChy em ratos WR e SHR

VI.5.1 Análise comparativa dos efeitos do PepChy na PAS, PAD e PAM em ratos WR e SHR

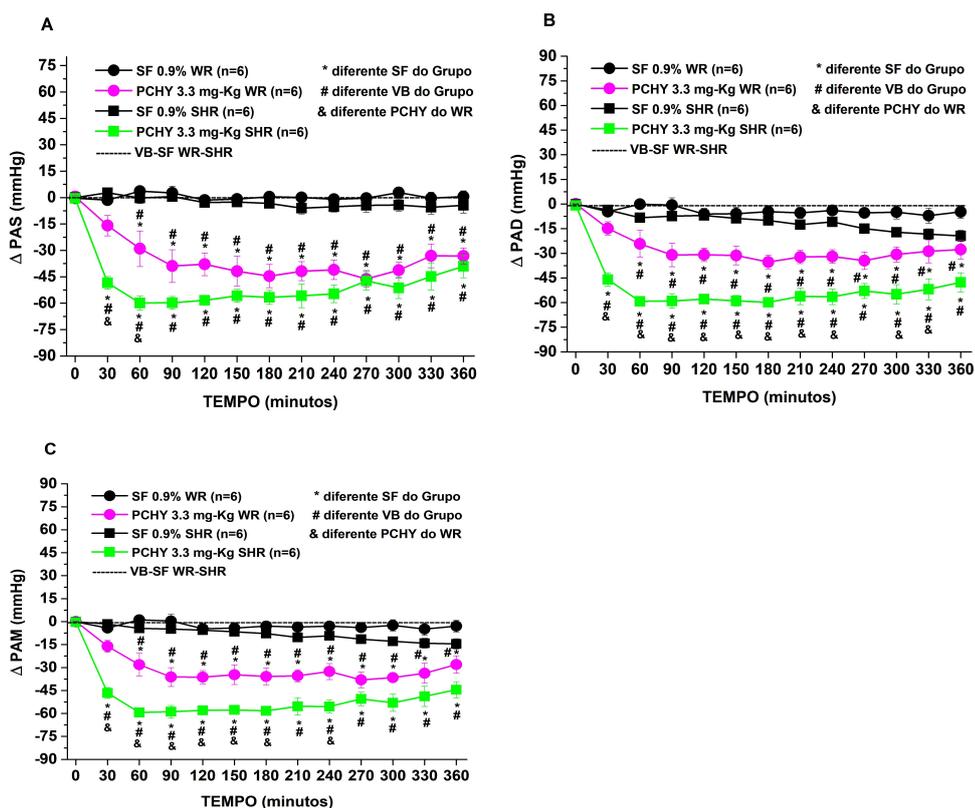
Efeitos do PepChy na PAS, PAD e PAM em ratos WR

A redução dos valores da PAS, PAD e PAM aos 270 minutos da administração do PepChy (3,3 mg/kg) registrou seu ponto máximo em comparação ao valor basal 44,1%, 63,8% e 53,9%, respectivamente) e ao SF (39,4%, 64,2% e 51,7%, respectivamente). Essa redução foi gradativa até os 360 minutos em relação ao valor basal (38,8%, 43,0% e 34,7%, respectivamente) (Tabela 8 anexo 1; Figura 20). Comparativamente, a maior redução da PAM, em relação ao valor basal foi registrada para os ratos WR que receberam BTCl aos 180 minutos (80,6%; Tabela 2 anexo 1; Figura 17) do que aqueles que receberam o PepChy aos 270 minutos (53,9%).

Efeitos do PepChy na PAS, PAD e PAM em ratos SHR

A administração do PepChy (3,3 mg/kg), via gavagem, em ratos SHR promoveu quedas relevantes dos parâmetros hemodinâmicos, PAS, PAD e PAM durante os 360 minutos do ensaio em comparação ao valor basal (26,5%, 66,5% e 46,2%, respectivamente) e ao SF (18,1%, 40,1% e 28,7%, respectivamente). A queda máxima em comparação ao valor basal ocorreu aos 60 minutos conforme os valores 47,5%, 99,7% e 73,2%, respectivamente (Tabela 9 anexo 1; Figura 20). Comparativamente, a maior queda da PAM ocorreu para os SHR que receberam BTCl ($77,7 \pm 3,7$ mmHg – 210 minutos – Tabela 3; Figura 17) do que aqueles que receberam o PepChy ($84,9 \pm 4,5$ mmHg – 210 minutos) que teve a maior queda aos 60 minutos ($80,8 \pm 2,4$ mmHg).

Figura 20: Parâmetros hemodinâmicos em ratos WR versus SHR após administração do PeChy (3,3 mg/kg). A) Pressão arterial sistólica (PAS). B) Pressão Arterial Diastólica (PAD). C) Pressão Arterial Medial (PAM). Valor Basal (VB). Soro Fisiológico (SF).



O maior decréscimo da PAM foi observado aos 270 minutos com declínio de $-38,1 \pm 5,1$ mmHg para os WR e $-50,5 \pm 4,4$ mmHg para SHR que tiveram a maior expressão em 60 minutos ($-59,3 \pm 3,0$ mmHg). Resultados semelhantes foram obtidos comparando os valores da PAS e PAD para os dois modelos dos ratos

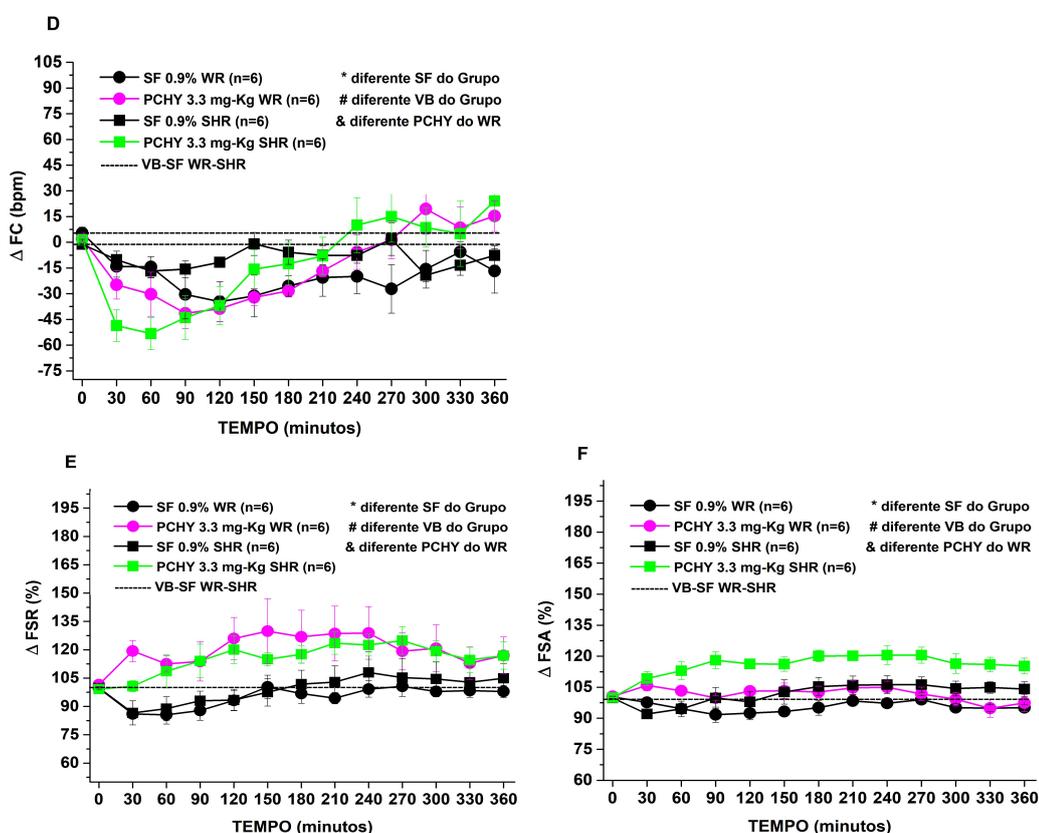
citados. Foi também observado nas primeiras duas horas os valores dos decréscimos de aproximadamente 3,5 vezes maior nos ratos SHR, demonstrando que o PepChy apresentou maior efeito hipotensor nos ratos SHR do que nos WR (Figura 20).

VI.5.2 Análise comparativa dos efeitos do PepChy na FC, FSR e FSA em ratos WR e SHR

Efeitos do PepChy na FC, FSR e FSA em ratos WR

Os valores da FC, FSR e FSA não apresentaram diferenças significativas em relação ao valor basal e ao SF, excetuando discreta redução do bpm da FC (11,9%) aos 120 minutos se comparado ao valor basal (Tabela 10 anexo 1; Figura 21).

Figura 21: Parâmetros cardiovasculares em ratos WR *versus* SHR após administração do PepChy (3,3 mg/kg). D) Frequência Cardíaca (FC). E) Fluxo Sanguíneo Renal (FSR). F) Fluxo Sanguíneo Aórtico (FSA). Valor Basal (VB). Soro Fisiológico (SF).



Efeitos do PepChy na FC, FSR e FSA em ratos SHR

Os parâmetros cardiovasculares FC, FSR e FSA dos SHR não apresentaram diferenças significativas em comparação ao valor basal e ao SF, sob efeito do PepChy. No entanto, observou-se discreto aumento para o FSR aos 120 minutos (22,1%) em comparação ao valor basal. Portanto, os efeitos na FC, FSR e FSA foram semelhantes para os dois modelos de ratos (Tabela 11 anexo 1; Figura 21).

VI.5.3 Análise comparativa dos efeitos do PepChy na CVR e CVA em ratos WR e SHR

Efeitos do PepChy na CVR e CVA em ratos WR

Os dados da tabela 12 anexo 1 e figura 22 mostram o aumento da CVR e CVA sob efeito do PepChy comparados com os valores basal e SF. A CVR apresentou pico máximo aos 150 minutos (89,7%), enquanto que o aumento da CVA ocorreu de 60 até 330 minutos, com pico máximo aos 270 minutos (57,8%), ambas em relação ao valor basal. Os WR apresentaram maiores valores de CRV e CVA com o uso do PepChy do que com o uso do BTCI (Tabela 6 anexo 1; Figura 19). Os resultados indicam vasodilatação das artérias renal e aórtica com utilização tanto do BTCI quanto do PepChy, o que contribui para a hipotensão observada.

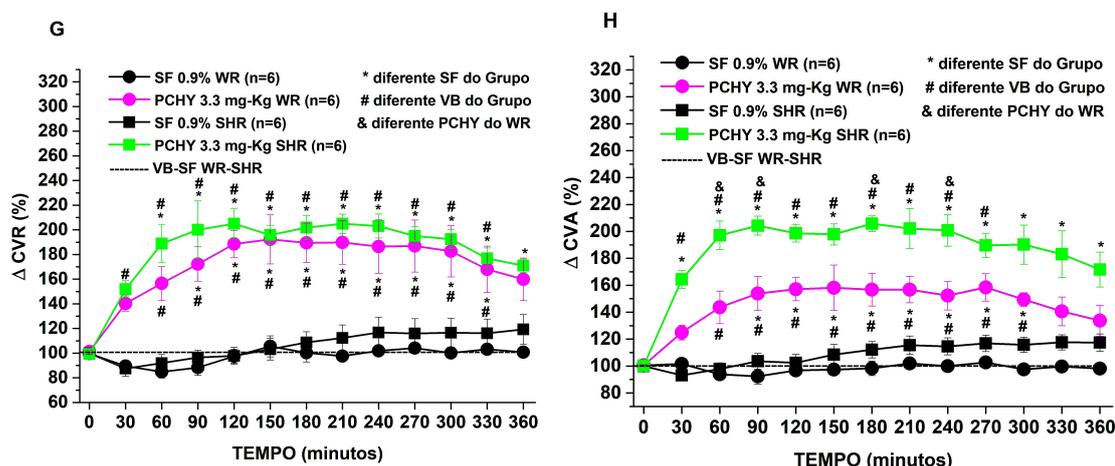
Efeitos do PepChy na CVR e CVA em ratos SHR

Se comparados ao valor basal, os dados da tabela 13 anexo 1 e figura 22 mostram o aumento dos valores da CVR e CVA compatíveis com a vasodilatação das artérias renal e aórtica em ratos SHR. De 60 a 330 minutos registrou-se aumento expressivo na CVR, com maior elevação em 120 minutos (106,3%). No caso da CVA aumentos relevantes ocorreram ao longo dos 360 minutos de ensaio, sendo o pico mais relevante em 180 minutos (105,4%). Os valores da CVR e a CVA nos SHR com uso do PepChy foram mais expressivos do que para aqueles que receberam o BTCI tabela 7 anexo 1 e figura 19. No entanto, para ambos os casos, comparados ao valor basal, os resultados indicam que a vasodilatação arterial renal e aórtica contribuiu para a hipotensão observada.

Os resultados apresentados na figura 22 mostram que os maiores valores da CVR e CVA nos ensaios com o PepChy para os WR foram 89,7% e 57,5% - 150

minutos respectivamente, e para os SHR foram $\pm 97,0\%$ e $\pm 97,5\%$, respectivamente. Comparando os dois modelos estudados, após 60 minutos os valores mensurados na CVR e na CVA diferiram até os 360 minutos. Vale ressaltar que aos 60 minutos observou-se na CVA dos SHR diferenças significativas em relação aos WR (42,9%). Adicionalmente, ao tempo de 360 minutos, os valores para os ratos WR diminuíram atingindo praticamente o nível basal. No entanto, os valores dos parâmetros analisados permaneceram constantes para os ratos SHR, o que indica maior efeito de vasodilatação nos SHR.

Figura 22: Parâmetros cardiovasculares em ratos WR *versus* SHR após administração do PepChy (3,3 mg/kg). Condutância Vascular Renal (CVR). Condutância Vascular Aórtica (CVA). Valor Basal (VB). Soro Fisiológico (SF).



VI.6 Análise comparativa dos efeitos do PepTry em ratos WR e SHR

VI.6.1 Análise comparativa dos efeitos do PepTry na PAS, PAD e PAM em ratos WR e SHR

Efeitos do PepTry na PAS, PAD e PAM em ratos WR

A redução dos valores da PAS, PAD e PAM, em confronto ao valor basal e SF (0,9%), aconteceu após 60 minutos da administração do PepTry (3,3 mg/kg) até os 360 minutos. A maior redução foi aos 150 minutos quando confrontada com o valor basal (35,9%, 54,7% e 45,6%, respectivamente) e ao SF (30,3%, 57,6% e 44,6%,

respectivamente) (Tabela 14 anexo 1; Figura 23). A redução desses valores foram proporcionais ao tempo.

Comparativamente, as maiores quedas da PAM ocorreram, em ordem decrescente, para os ratos WR que receberam BTCl (30,0 mg/Kg) aos 180 minutos (67,6 ±4,1 mmHg) (Tabela 2 anexo 1; Figura 17), PepChy aos 270 minutos (71,0 ±3,6 mmHg) (Tabela 8 anexo 1; Figura 20) e PepTry aos 150 minutos (74,4 ±3,3 mmHg).

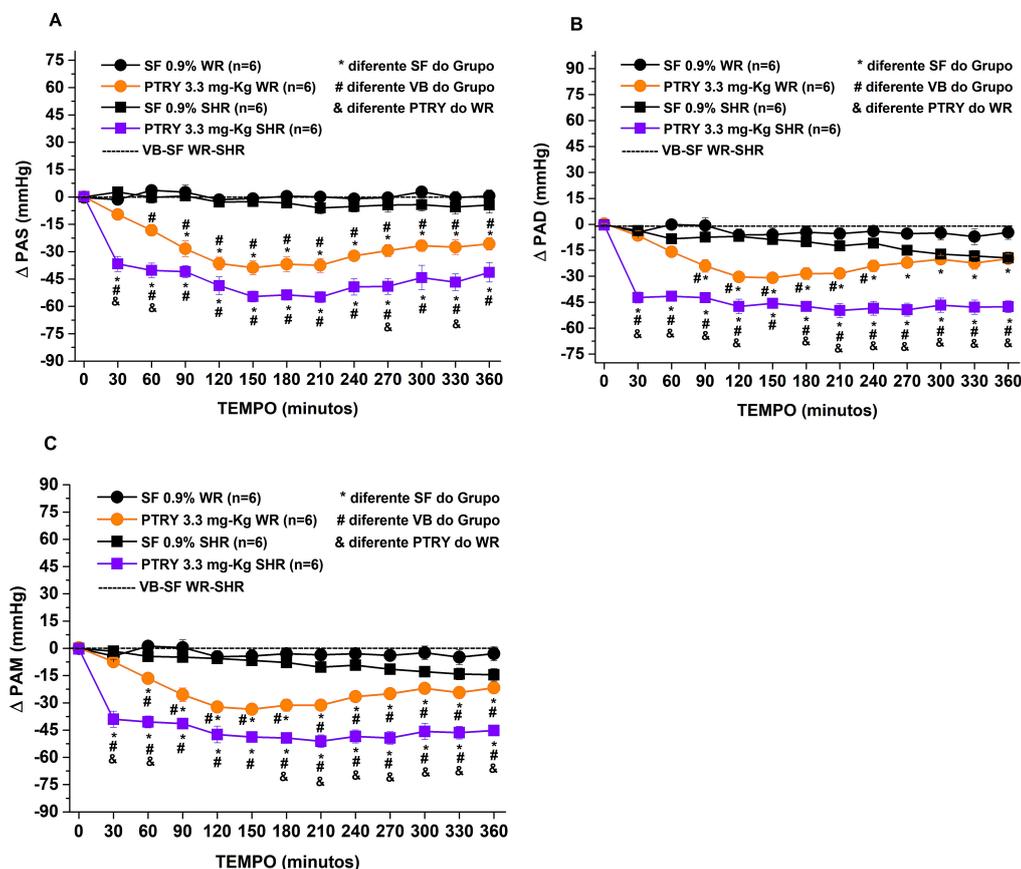
Efeitos do PepTry na PAS, PAD e PAM em ratos SHR

A administração do PepTry (3,3 mg/kg) e SF (0,9%), via gavagem, em ratos SHR promoveu queda máxima dos parâmetros hemodinâmicos, PAS, PAD e PAM, aos 210 minutos em relação com o valor basal (44,9%, 75,6% e 59,8%, respectivamente) e ao SF (39,0%, 61,4% e 49,9%, respectivamente). As quedas dos referidos parâmetros foram relevantes durante os 360 minutos. Os valores foram: PAS 123,1 ±4,2 mmHg (valor basal 178,3 ±2,0 mmHg e SF 171,0 ±3,8 mmHg); PAD 65,4 ±3,3 mmHg (valor basal 114,8 ±1,2 mmHg e SF 105,5 ±4,0 mmHg); PAM 85,0 ±3,5 mmHg (valor basal 135,8 ±0,7 mmHg e SF 127,4 ±3,6 mmHg) (Tabela 15 anexo 1; Figura 23).

Em comparação com o valor basal, as quedas da PAM mais relevantes na hipotensão entre os ratos WR para as três moléculas foram: BTCl 59,4% - 180 minutos (Figura 17: C); PepChy 53,9% - 270 minutos (Figura 20: C); PepTry 45,6% - 150 minutos (Figura 23: C). Para os ratos SHR estes valores foram: BTCl 80,6% - 210 minutos (Figura 17: C); PepChy 73,2% - 60 minutos (Figura 20: C); PepTry 59,8% - 210 minutos (Figura 23: C).

A maior queda da PAM com o Peptry aconteceu com os SHR (-51,1 ±3,5 mmHg) comparada com os WR (-33,5 ±2,6 mmHg). Resultados semelhantes foram obtidos comparando-se os valores da PAS e PAD para os dois modelos dos ratos analisados. Nas primeiras duas horas observa-se que os valores dos decréscimos registrados foram aproximadamente 2,6 vezes maiores nos ratos SHR. Considerando todos os parâmetros hemodinâmicos, conclui-se que o PepTry apresentou maior efeito hipotensor nos SHR do que nos WR (Figura 23).

Figura 23: Parâmetros hemodinâmicos em ratos WR *versus* SHR após administração do PepTry (3,3 mg/kg). A) Pressão Arterial Sistólica (PAS). B) Pressão Arterial Diastólica (PAD). C) Pressão Arterial Medial (PAM). Valor Basal (VB). Soro Fisiológico (SF).



VI.6.2 Análise comparativa dos efeitos do PepTry na FC, FSR e FSA em ratos WR e SHR

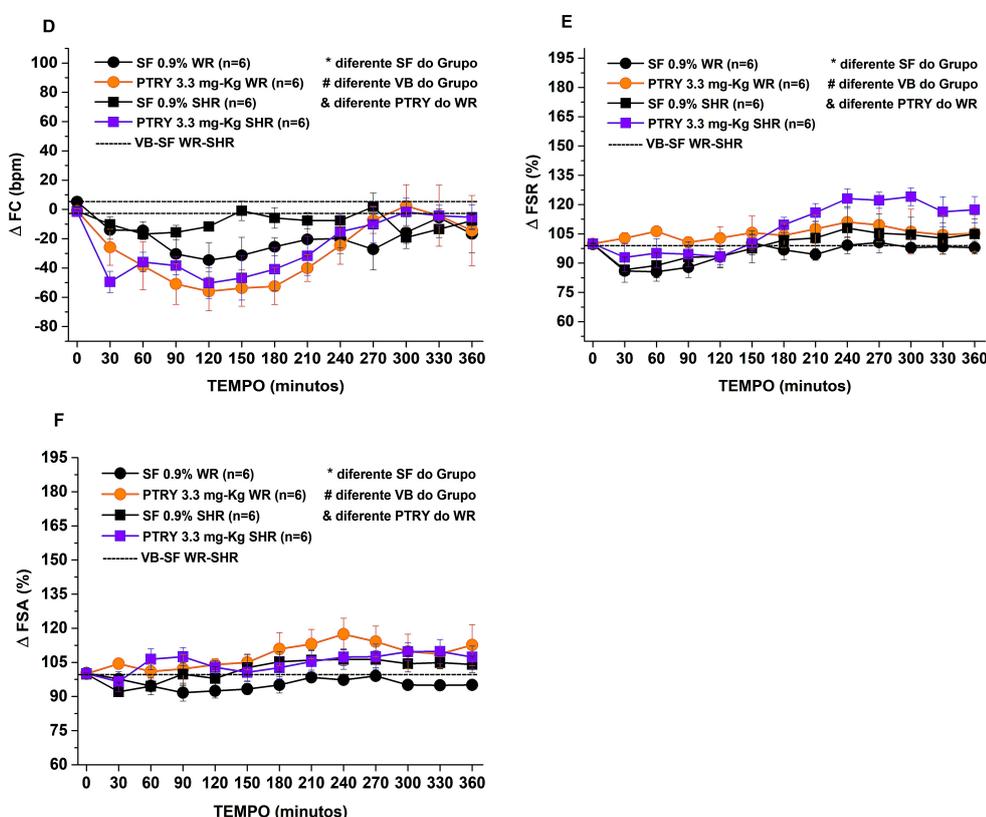
Efeitos do PepTry na FC, FSR e FSA em ratos WR

Os parâmetros cardiovasculares, FC, FSR e FSA, após a utilização do PepTry nos WR não apresentaram diferenças significativas, mesmo com a discreta elevação da FC (0,9%) aos 300 minutos; e da mesma forma, o FSR e o FSA aos 240 minutos em 11,0% e 17,4%, respectivamente (Tabela 16 anexo 1; Figura 24).

Efeitos do PepTry na FC, FSR e FSA em ratos SHR

Os parâmetros cardiovasculares FC, FSR e FSA dos SHR não apresentaram diferenças significativas em relação ao valor basal e ao SF. Diferenças mínimas foram observadas aos 30 e 120 minutos com elevações da FC de 14.8% e 15.0%, respectivamente (Tabela 17 anexo 1; Figura 24). Portanto, os efeitos na FC, FSR e FSA foram semelhantes para os dois modelos de ratos.

Figura 24: Parâmetros cardiovasculares em ratos WR *versus* SHR após administração do PepTry (3,3 mg/kg). D) Frequência Cardíaca (FC). E) Fluxo Sanguíneo Renal (FSR). F) Fluxo Sanguíneo Aórtico (FSA). Valor Basal (VB). Soro Fisiológico (SF).



VI.6.3 Análise comparativa dos efeitos do PepTry na CVR e CVA em ratos WR e SHR

Efeitos do PepTry na CVR e CVA em ratos WR

Os dados da tabela 18 anexo 1, figura 25 demonstram o aumento dos valores da CVR e CVA compatível com a vasodilatação das artérias renal e aórtica. Estes valores foram expressivamente diferentes do valor basal e SF para a CVR de 120

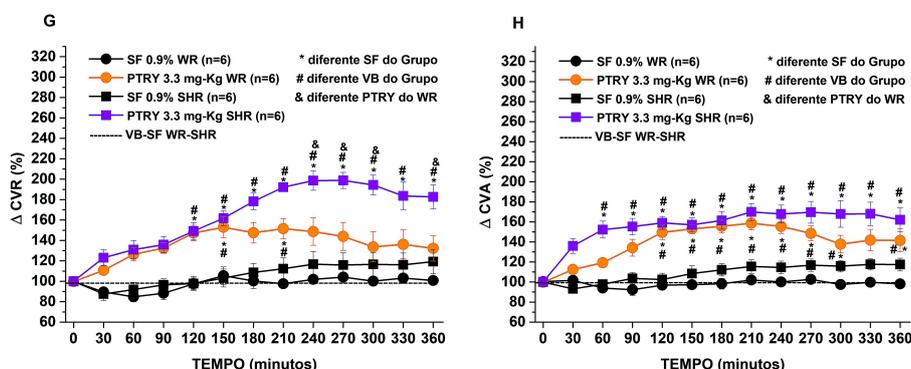
até 240 minutos, sendo que o valor máximo ocorreu aos 150 minutos (53,4%) em relação ao valor basal e 45,0% ao SF. Valores expressivamente diferentes do valor basal e SF para a CVA aconteceram aos 90 até 360 minutos, tendo como valor máximo aos 210 minutos em relação ao valor basal 59.2% e 62,7 ao SF.

Comparando as três moléculas, os maiores valores nos WR da CRV e CVA, em ordem decrescente foram para o uso do PepChy, BTCl e PepTry na CVR e PepTry, PepChy e BTCl na CVA. Estes valores foram para CVR: PepChy 89,7% - 150 minutos (Figura 22: G); BTCl 74,7% - 180 minutos (Figura 19: G) e PepTry 53,4% - 150 minutos (Figura 25: G). Para CVA os valores foram: PepTry 59,2% - 210 minutos (Figura 25: H); PepChy 57,8% - 150 minutos (Figura 22: H) e BTCl 50,6% - 180 minutos (Figura 19: H). Os resultados das vasodilatações renal e aórtica indicam que a maior contribuição para a hipotensão observada nos WR foi com o uso do PepChy (CVR) e PepTry (CVA).

Efeitos do PepTry na CVR e CVA em ratos SHR

Os parâmetros cardiovasculares CVR e CVA sob o efeito do PepTry (3,3 mg/kg) nos ratos SHR foram expressivamente diferentes do valor basal e SF (0,9%) dos 120 minutos até os 360 minutos (CVR) e dos 60 aos 360 minutos (CVA). Em comparação ao valor basal os valores máximos ocorreram em 270 minutos para CVR (98,5%) e em 210 minutos para CVA (69,4%); (Tabela 19 anexo 1; Figura 25).

Figura 25: Comparação dos parâmetros cardiovasculares em ratos WR versus SHR após administração do PepTry (3,3 mg/kg). G) Condutância Vascular Renal (CVR). H) Condutância Vascular Aórtica (CVA). Valor Basal (VB). Soro Fisiológico (SF).



Confrontando os dois modelos estudados, em contraposição ao valor basal observa-se que os valores máximos da CVR e CVA para os WR foram 53,4% e

59,2%, respectivamente; enquanto que para os SHR os valores foram bem maiores, 98,5% e 69,4%, respectivamente. Estes resultados mostram que os efeitos de vasodilatação renal e aórtica, promovida pelo PepTry foram maiores nos SHR (Figura 25).

Os valores máximos para CVR e CVA nos ratos SHR para as três moléculas em relação ao valor basal foram: CVR: PepChy 106,3% (Figura 22: G); PepTry 98,5% (Figura 25; G) e BTCl 76,6% (Figura 19: G). CVA os valores foram: PepChy 105,4% (Figura 22: H); BTCl 79,5% (Figura 19: H) e PepTry 69,4% (Figura 25: H). Portanto, estes resultados indicam vasodilatação das artérias renal e aórtica que contribuiu para a hipotensão observada após a administração oral das três moléculas.

VI.7 Análise comparativa nos efeitos hemodinâmicos e cardiovasculares do BTCl e peptídeos derivados em ratos WR e SHR

Foram avaliados os efeitos da concentração equimolar (3,31 mM) para todas as moléculas, as doses foram BTCl (30,0 mg/kg), PepTry (3,3 mg/kg) e PepChy (3,3 mg/kg) ou NaCl a 0,9% (veículo). Conforme descrito na metodologia, os dados numéricos obtidos a partir dos registros da realização dos experimentos *in vivo*, e as variáveis do estudo (i) modelo de ratos normotensos (WR) e naturalmente hipertensos (SHR), (ii) moléculas ativas – BTCl, PepChy e PepTry e (iii) controle – soro fisiológico (SF).

VI.7.1 Análise comparativa dos efeitos do BTCl e peptídeos derivados em ratos WR

O BTCl e seus peptídeos derivados promoveram queda de pressão arterial até os 360 minutos (Tabelas 20, 21 e 22 anexo 1; Figura 26) em ratos WR. Os resultados comparados mostram que o efeito do BTCl sobre a pressão arterial foi maior do que para os peptídeos. As maiores quedas da PAM foram, em ordem decrescente, para aqueles que receberam BTCl (59,4%), o PepChy (53,9%) e o PepTry (45,6%).

A vasodilatação máxima no WR ocorreu devido ao aumento máximo da CVR e da CVA, em ordem decrescente para, PepChy (89,7% e 57,8%, respectivamente), BTCl (74,7% e 50,6%, respectivamente) e PepTry (53,4% e 59,2%,

respectivamente). Apesar das diferenças observadas, todos os valores de CVR e CVA são compatíveis com a vasodilatação das artérias renal e aórtica, o que contribui para a hipotensão (Tabela 23 anexo 1; Figura 27).

Figura 26: Parâmetros hemodinâmicos de ratos WR submetidos ao uso de BTCl (30,0 mg/kg), PepChy e PepTry (3,3 mg/kg). A) Pressão Arterial Sistólica (PAS). B) Pressão Arterial Diastólica (PAD). C) Pressão Arterial Medial (PAM). Valor Basal (VB). Soro Fisiológico (SF).

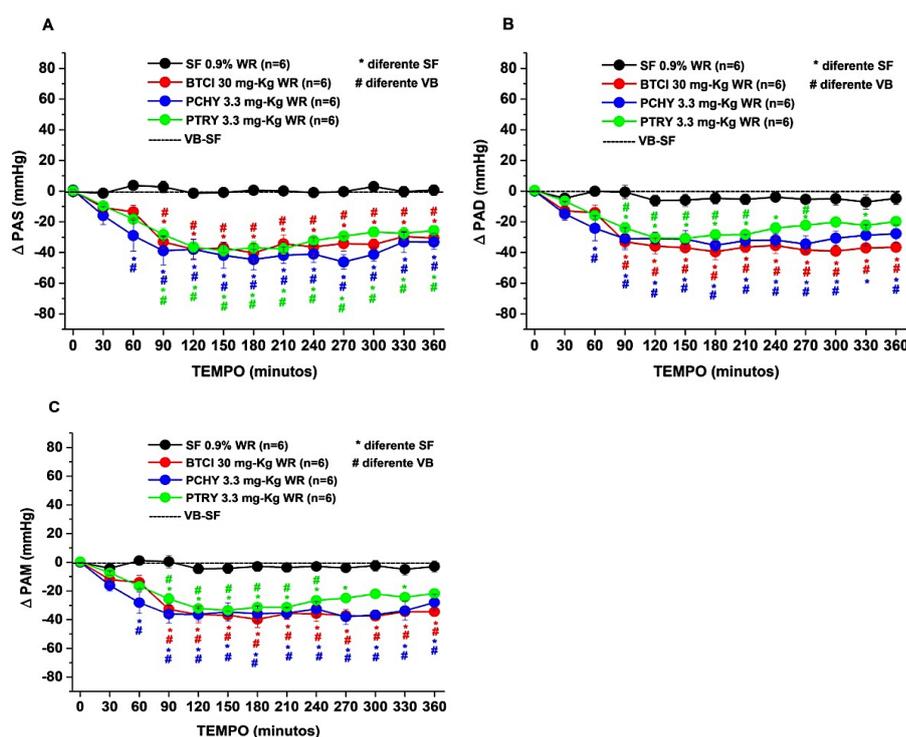
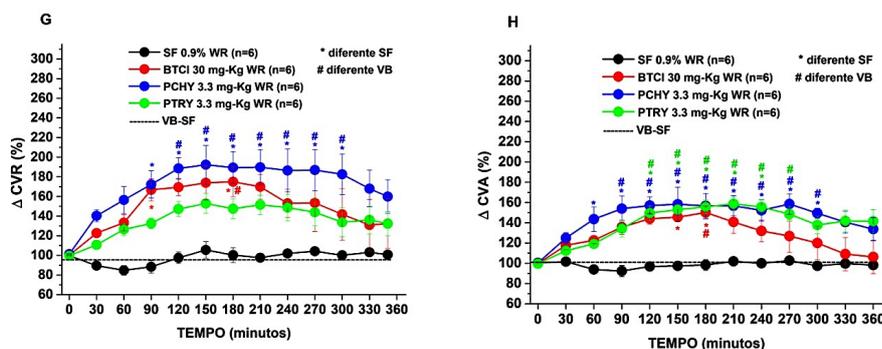


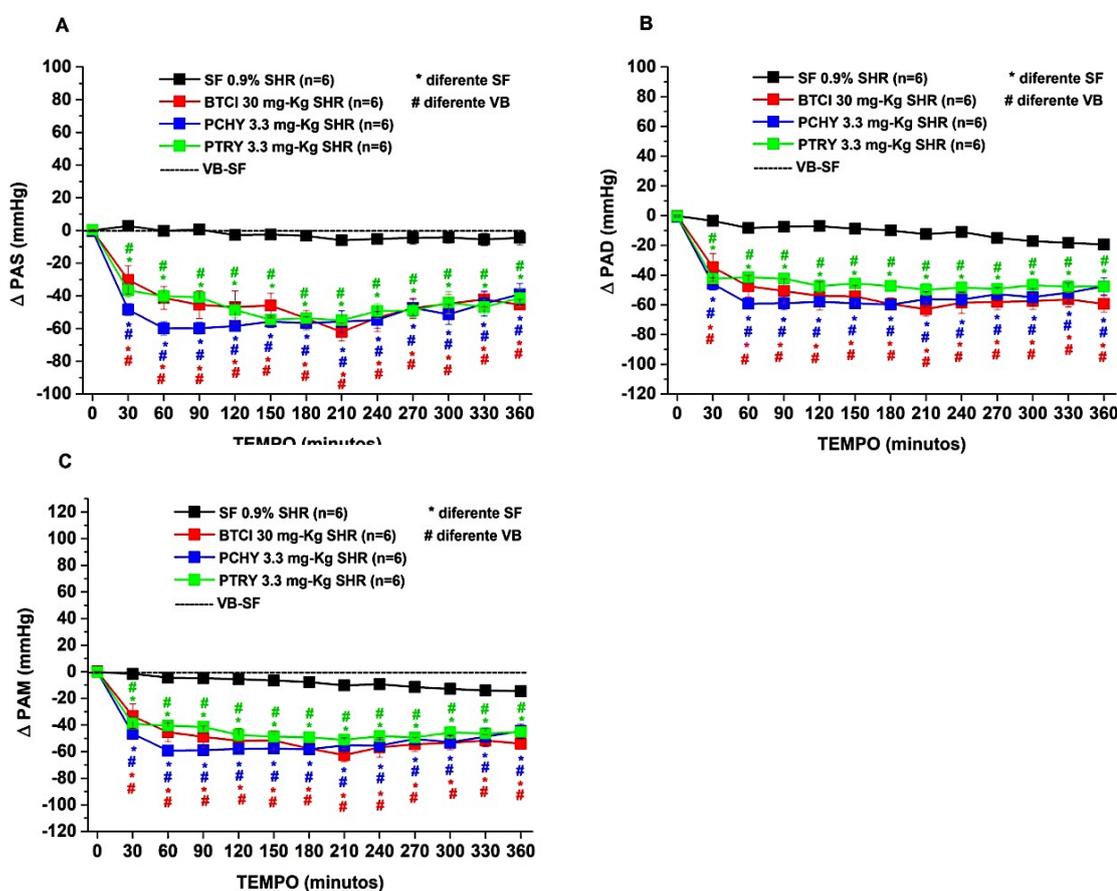
Figura 27: Parâmetros cardiovasculares, CVR e CVA, de ratos WR submetidos ao uso de BTCl (30,0 mg/kg), PepChy e PepTry (3,3 mg/kg). G) Condutância Vascular Renal (CVR). H) Condutância Vascular Aórtica (CVA). Valor Basal (VB). Soro Fisiológico (SF).



VI.7.2 Análise comparativa dos efeitos BTCl e peptídeos derivados em ratos SHR

As tabelas 24, 25 e 26 anexo 1 e a figura 28 mostram os ensaios utilizando ratos SHR. Há uma semelhança nos valores de redução da PAS, PAD e PAM, após a administração do BTCl e peptídeos derivados. A redução da pressão arterial foi maior para os SHR que receberam, em ordem decrescente, PepChy (60,0%), BTCl (50,0%) e PepTry (40,0%).

Figura 28: Parâmetros hemodinâmicos de ratos SHR submetidos ao uso de BTCl (30,0 mg/kg), PepChy e PepTry (3,3 mg/kg). A) Pressão Arterial Sistólica (PAS). B) Pressão Arterial Diastólica (PAD). C) Pressão Arterial Medial (PAM). Valor Basal (VB). Soro Fisiológico (SF).

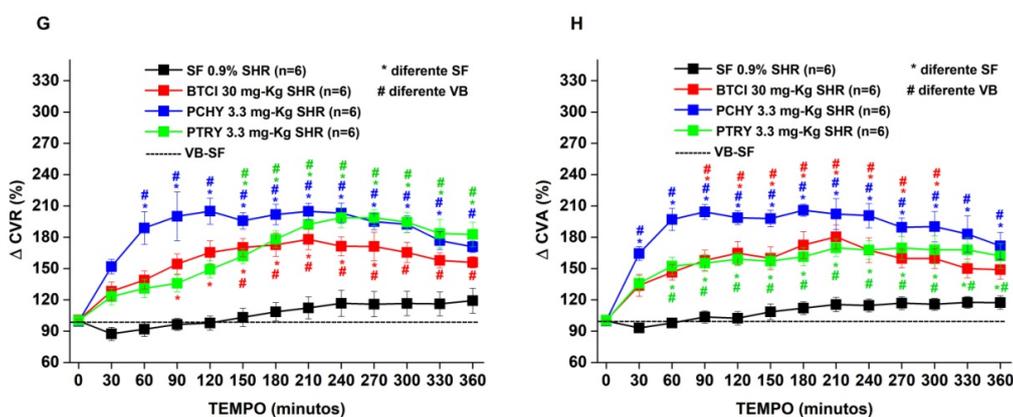


A vasodilatação máxima nos SHR ocorreu devido ao aumento máximo da CVR e da CVA, em ordem decrescente, para PepChy (106,3% e 105,4%, respectivamente); PepTry (98,5% e 70,0, respectivamente) e BTCl (76,6% e 79,5%, respectivamente). Os resultados mostram que o maior efeito na vasodilatação das duas artérias foi para o PepChy, bem como para o PepTry no caso do valor máximo da CVR. Apesar das diferenças observadas, todos os valores de CVR e CVA são

compatíveis com a vasodilatação renal e aórtica, que contribui para a hipotensão (Tabela 27 anexo 1; Figura 29).

Portanto, todas as respostas hemodinâmicas e parâmetros cardiovasculares nos ratos WR e SHR foram significativamente alteradas, como diminuição da pressão arterial e aumento da condutância arterial renal e aórtica. Estes resultados indicaram que o maior efeito hipotensor foi nos ratos SHR com a utilização do PepChy.

Figura 29: Parâmetros cardiovasculares CVR e CVA de ratos SHR submetidos ao uso de BTCl (30,0 mg/kg), PepChy e PepTry (3,3 mg/kg). G) Condutância Vascular Renal (CVR). H) Condutância Vascular Aórtica (CVA). Valor Basal (VB). Soro Fisiológico (SF).



VI.8 Análise da resposta máxima hipotensiva e vasodilatadora induzida por BTCl e peptídeos derivados em ratos WR e SHR

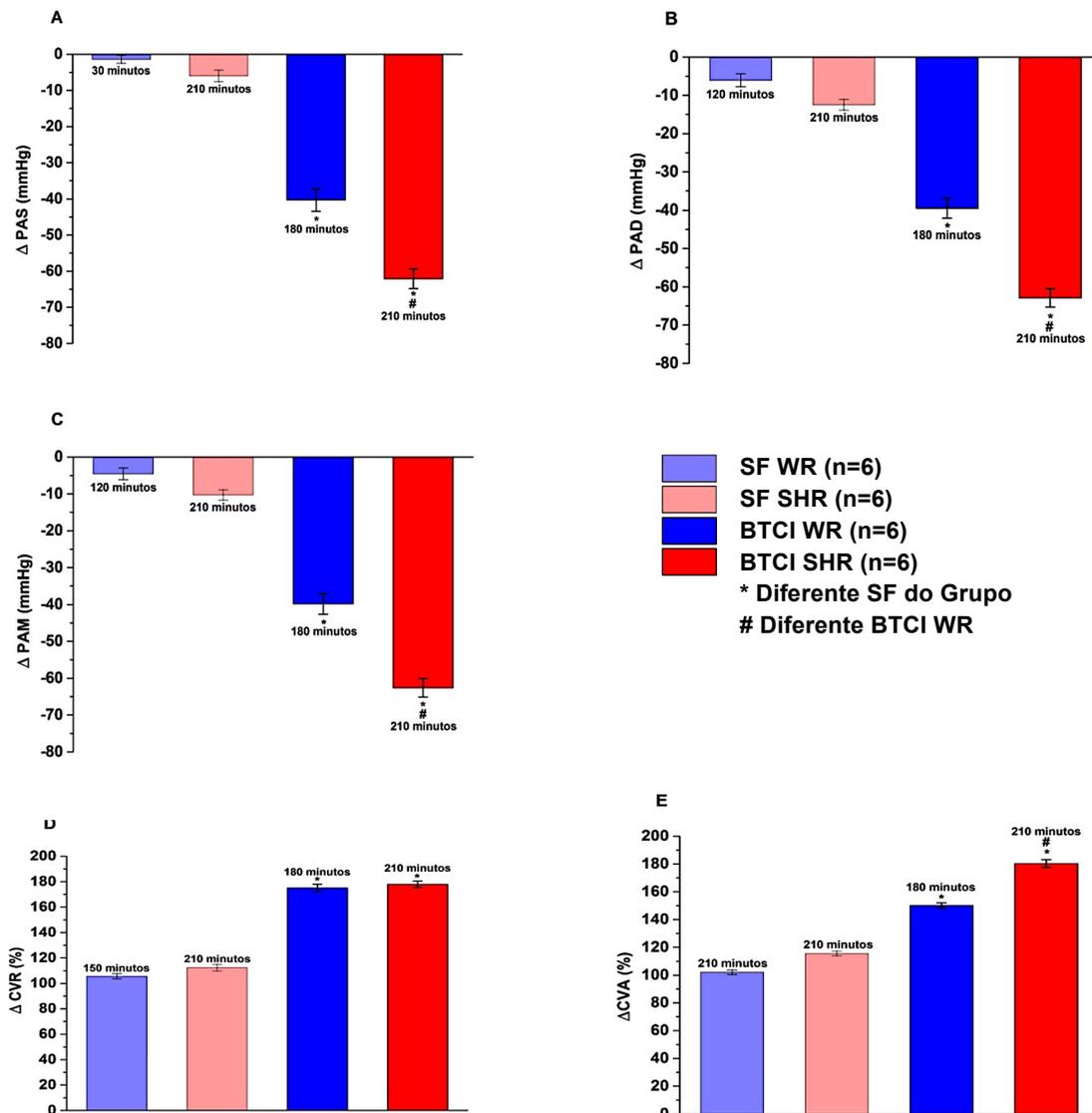
Para estimar a resposta máxima hipotensiva e vasodilatadora induzida pela administração, via gavagem, de BTCl (30,0 mg/kg), PepTry (3,3 mg/kg) e PepChy (3,3 mg/kg) em ratos WR (n=6) e ratos SHR (n=6) anestesiados foi usado teste *t* de Student.

VI.8.1 Análise da resposta máxima hipotensiva e vasodilatadora induzida por BTCl em ratos WR versus SHR

O BTCl apresentou maior ação hipotensiva aos 180 minutos nos dois modelos de animais. Os valores foram WR: PAS -40,3%; PAD -39,5% e a PAM -39,8%; SHR: PAS -53,8%; PAD -59,5% e PAM -57,6% (Figura 30). No entanto a

maior ação hipotensora ocorreu no SHR aos 210 minutos (-62,1%, -62,9%, e 62,6%) (Figura 30: A, B e C).

Figura 30: Resposta máxima induzida com uso de BTCl (30,0 mg/kg) em ratos WR *versus* SHR. A) Pressão Arterial Medial (PAM); B) Pressão Arterial Sistólica (PAS); C) Pressão Arterial Diastólica (PAD). D) Condutância Vascular Renal (CVR); E) Condutância Vascular Aórtica (CVA). Soro Fisiológico. Estatística: Teste t de Student – $p < 0,05$.



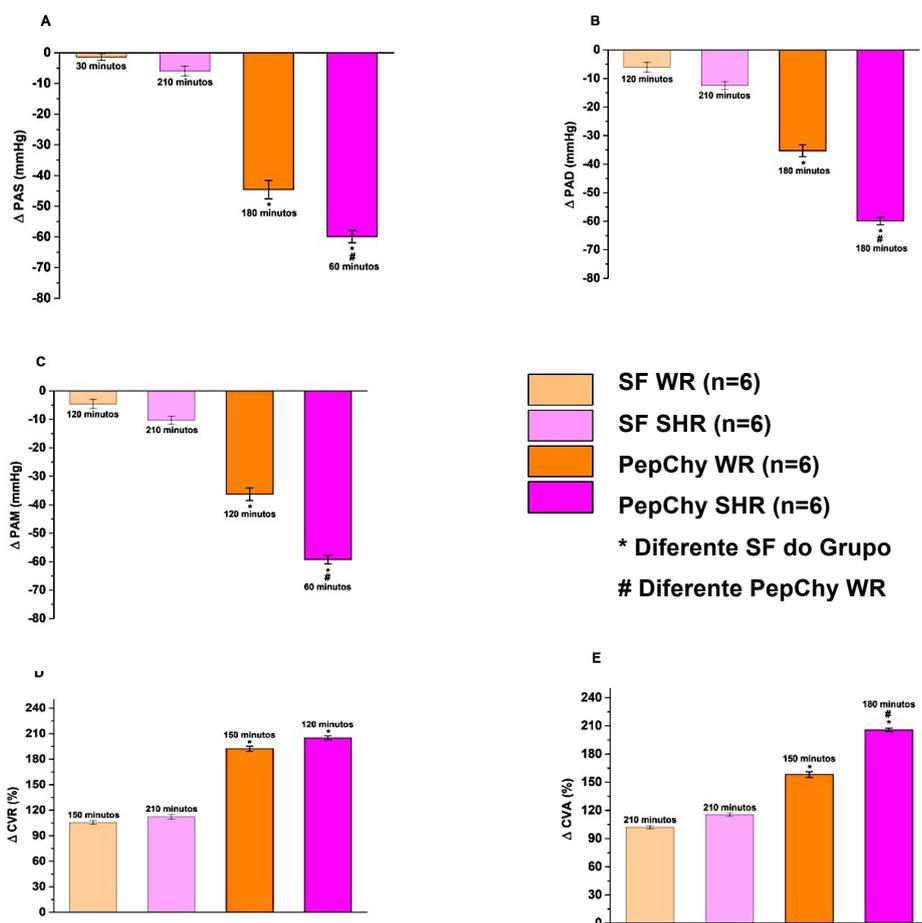
A resposta máxima da CVR no WR foi aos 180 minutos (175,0%) e no SHR aos 210 minutos (178,0%) (Figura 30: D e E). A diferença entre o WR e SHR foi de 3,0%, estatisticamente considerada insignificante. A resposta máxima da CVA no WR ocorreu aos 180 minutos (150,1%) e SHR aos 210 minutos (180,3%), sendo a diferença entre o WR e SHR de $\pm 30,2\%$. Conforme mostrado, a melhor resposta

máxima para vasodilatação aórtica induzida por administração de BTCl foi em ratos SHR.

VI.8.2 Análise da resposta máxima hipotensiva e vasodilatadora induzida por PepChy em ratos WR *versus* SHR

Nos animais WR, o PepChy apresentou maior ação hipotensora aos 180 minutos referente aos valores de PAS e PAD (-44,6% e -35,3%), enquanto que para a PAM a maior ação hipotensora ocorreu aos 210 minutos (-36,3%). Nos animais SHR estes valores foram: PAS -56,7%, PAD -59,9% e PAM -58,0%. A maior ação hipotensora nos SHR (PAS e PAM -59,9% e -59,3%) ocorreu aos 60 minutos e a PAD aos 180 minutos (-59,9%). Portanto, a resposta máxima para hipotensão, induzida por administração de PepChy, foi em ratos SHR (Figura 31: A, B e C).

Figura 31: Resposta máxima induzida por uso de PepChy (3,3 mg/kg) em ratos WR *versus* SHR. A) Pressão Arterial Medial (PAM); B) Pressão Arterial Sistólica (PAS); C) Pressão Arterial Diastólica (PAD). D) Condutância Vascular Renal (CVR); E) Condutância Vascular Aórtica (CVA). Estatística: Teste t de Student – $p < 0,05$.



Os gráficos da figura 31: D e E estão apresentados os maiores índices de vasodilatação renal nos WR (192,3%) aos 150 minutos, e nos SHR (205,0%) aos 120 minutos, sendo portanto a diferença entre os WR e SHR de 12,7%.

Ao analisar a vasodilatação aórtica observou-se maior condutância de 158,2% (150 minutos) nos WR e de 205,8% (180 minutos) nos SHR, totalizando a diferença significativa de 47,6% entre os dois modelos avaliados. Portanto, a melhor resposta máxima para vasodilatação aórtica induzida por administração de PepChy foi em ratos SHR (Figura 31: D e E).

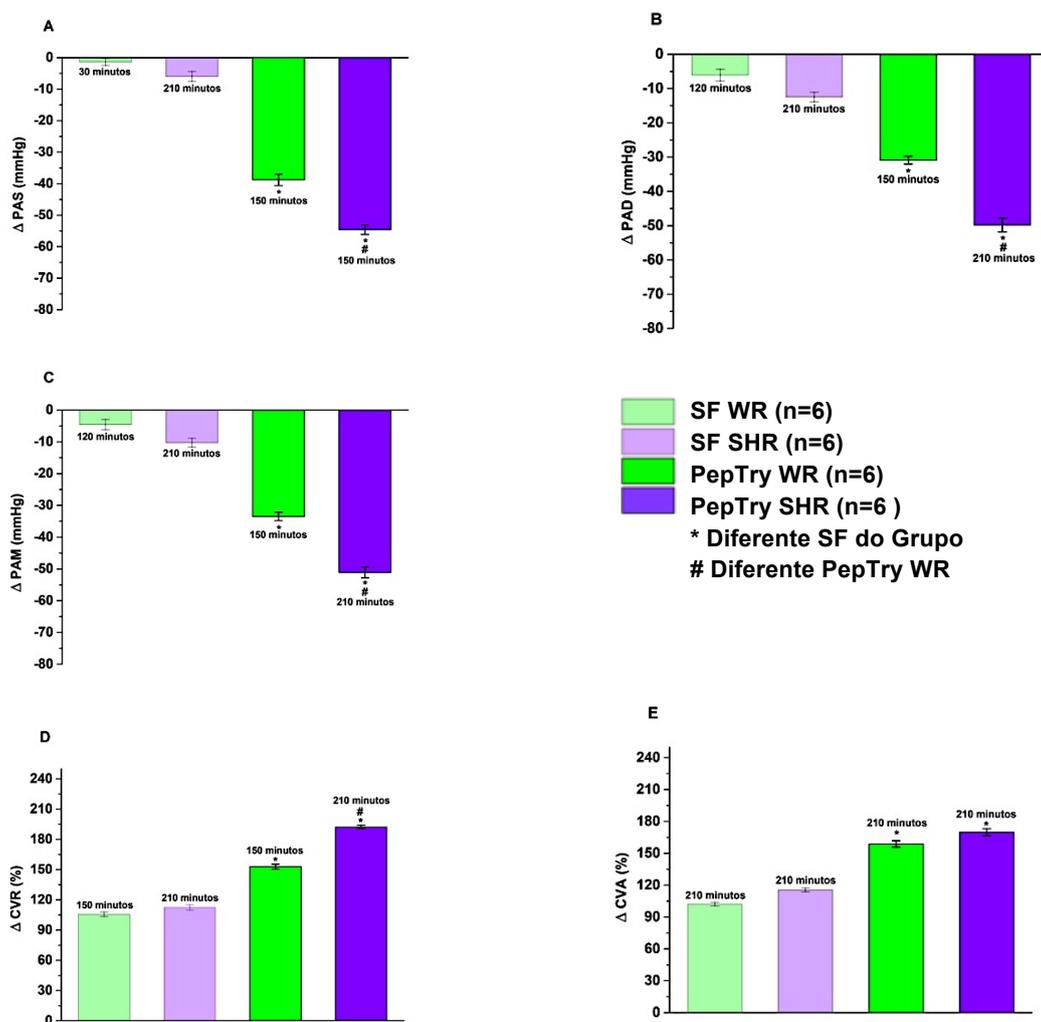
VI.8.3 Análise da resposta máxima hipotensiva e vasodilatadora induzida por PepTry em ratos WR *versus* SHR.

Na figura 32 estão apresentadas as alterações da pressão arterial induzidas por PepTry nos modelos WR e SHR.

Nos animais WR, o PepTry apresentou maior resposta (maior queda) aos 150 minutos da PAS (-38,8%), PAD (-30,9%) e PAM (-33,5%) e nos SHR o valor da PAS foi de -54,6%, maior que nos WR. Os valores máximos para a PAD e PAM nos SHR ocorreram aos 210 minutos e foram -49,8% e -51,1%, respectivamente. As diferenças destes valores foram significativas, sendo a PAS 15,8%, a PAD 18,9% e a PAM 17,6%, maiores nos SHR. Conseqüentemente, a resposta máxima mais expressiva para hipotensão, induzida por administração de PepTry, foi em ratos SHR (Figura 32: A, B e C).

Nos gráficos da figura 32: D e E estão apresentados os maiores valores de vasodilatação renal nos WR (152,9%) aos 150 minutos, e nos SHR (192,2%), aos 210 minutos, sendo a diferença entre estes de 39,3%. Quanto à vasodilatação aórtica nos WR e SHR, observou-se maiores valores aos 210 minutos (158,7% e 169,9%), sendo a diferença entre os dois modelos de 11,2%. Desse modo, a melhor resposta máxima para vasodilatação aórtica induzida por administração de PepTry foi em ratos SHR.

Figura 32: Resposta máxima induzida por PepTry (3,3 mg/kg) em ratos WR *versus* SHR. A) Pressão Arterial Medial (PAM); B) Pressão Arterial Sistólica (PAS); C) Pressão Arterial Diastólica (PAD). D) Condutância Vascular Renal (CVR); E) Condutância Vascular Aórtica (CVA). Soro Fisiológico (SF). Estatística: Teste *t* de Student – $p < 0,05$.



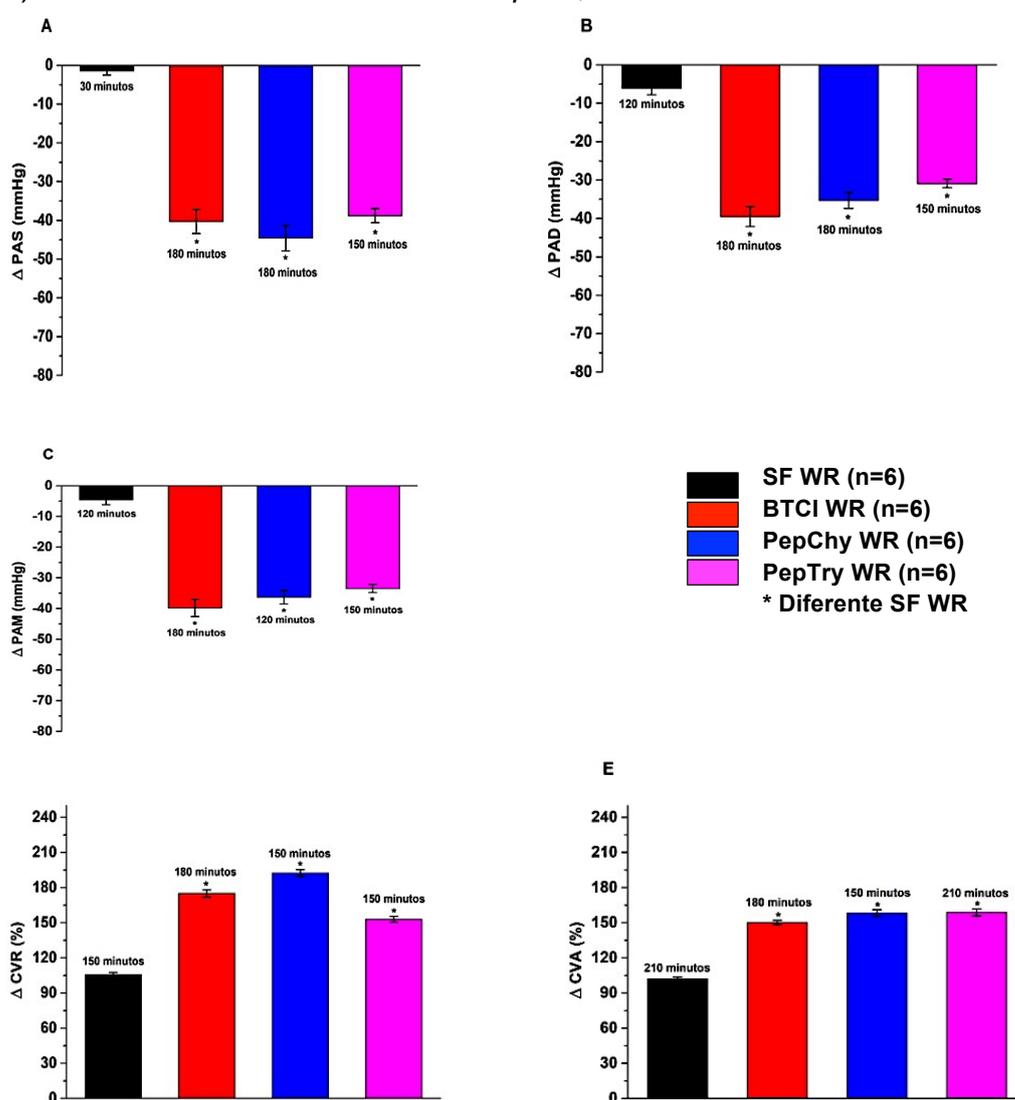
VI.8.4 Análise da resposta máxima hipotensiva e vasodilatadora induzida por intermédio das três moléculas, BTCI e peptídeos derivados, em ratos WR *versus* SHR

As respostas máximas hipotensiva e vasodilatadora induzidas por meio das três moléculas nos ratos WR estão apresentadas na figura 33: A, B e C.

A maior redução dos valores dos parâmetros hemodinâmicos PAS, PAD e PAM na presença de BTCI foram 40.3%, 39.5% e 39,8%, respectivamente (180 minutos). Do PepChy as respostas máximas hipotensivas foram: PAS (44.6%) e

PAD (35,3%) (180 minutos) e PAM (36,3%) (120 minutos). Com o PepTry a redução máxima ocorreu aos 150 minutos (38,8%, 30,9% e 33,5%, respectivamente). A queda da pressão arterial sistólica foi maior com o PepChy (44.6%) e a pressão arterial diastólica com o BTCl (39.5%).

Figura 33: Resposta máxima induzida por uso de BTCl (30,0 mg/kg), PepTry (3,3 mg/kg) e PepChy (3,3 mg/kg) em ratos WR. A) Pressão Arterial Sistólica (PAS); B) Pressão Arterial Diastólica; C) Pressão Arterial Medial (PAM); D) Condutância Vascular Renal (CVR); E) Condutância Vascular Aórtica (CVA). Soro Fisiológico (SF). Estatística: Teste *t* de Student – $p < 0,05$.

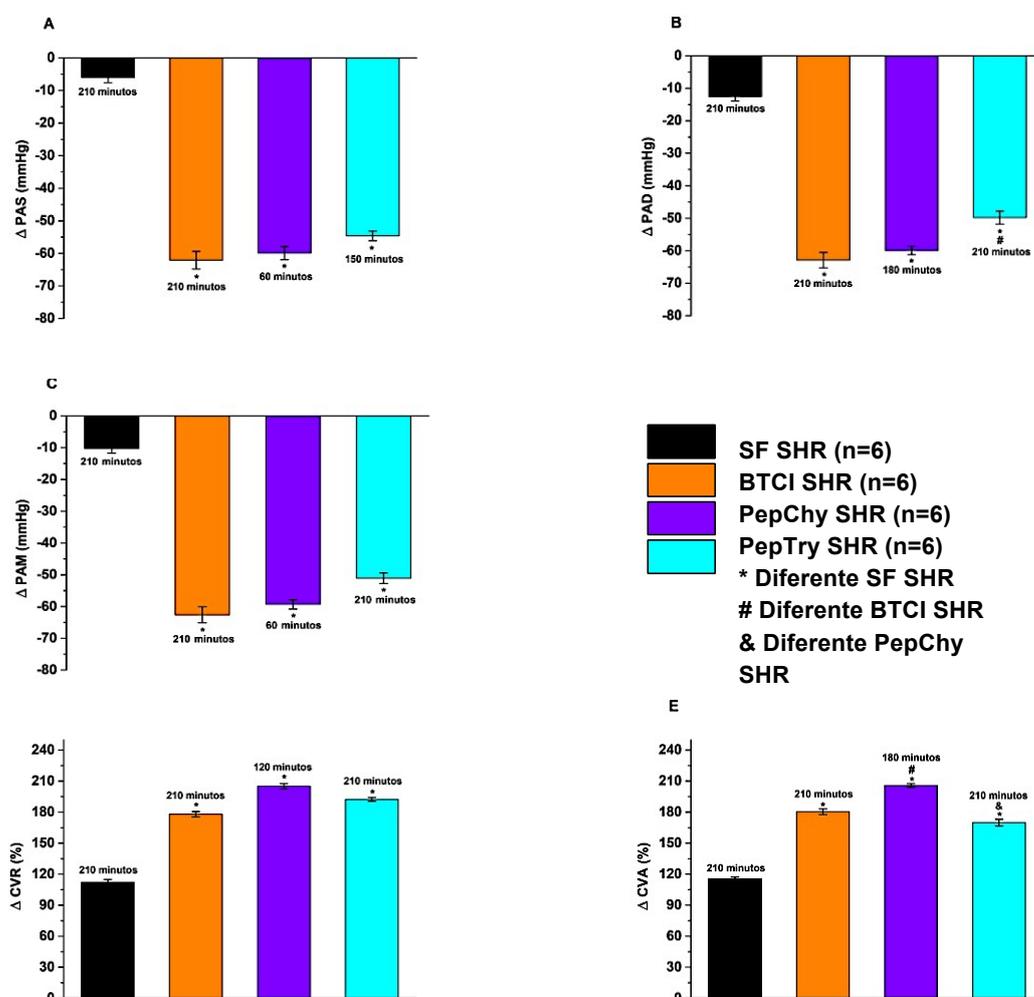


Os valores de CVR e CVA aumentaram após a administração de BTCl (175,0% e 150,1%) aos 180 minutos; de PepChy (192,3% e 158,2%) aos 150 minutos; e PepTry, CVR de 152,9% (150 minutos) e a CVA 158,7% (210 minutos). O

maior valor da condutância vascular renal foi com o uso do PepChy (192,3%) e os valores da condutância vascular aórtica foram semelhantes para todos as moléculas (Figura 33: D e E).

As respostas máximas hipotensiva e vasodilatadora induzidas pelas três moléculas nos ratos SHR estão apresentadas na figura 34: A, B e C. A maior redução dos valores de parâmetros hemodinâmicos na presença do BTCl foram 62,1%, 62,9% e 62,5%, respectivamente (210 minutos).

Figura 34: Resposta máxima induzida por uso de BTCl (30,0 mg/kg), PepTry (3,3 mg/kg) e PepChy (3,3 mg/kg) em ratos SHR. A) Pressão Arterial Sistólica (PAS); B) Pressão Arterial Diastólica; C) Pressão Arterial Medial (PAM); D) Condutância Vascular Renal (CVR); E) Condutância Vascular Aórtica (CVA). Soro Fisiológico (SF). Estatística: Teste *t* de Student – *p* < 0,05.



Com o PepChy a resposta máxima hipotensiva PAS 59,9% e PAM 59,3% foi aos 60 minutos, enquanto que a resposta máxima para a PAD (59,9%) ocorreu aos 180 minutos. Com o PepTry a redução máxima da PAS aconteceu aos 150 minutos

(54,6%), mas na PAD (49,8%) e na PAM (51,1%) foi aos 210 minutos. A queda da pressão arterial sistólica e diastólica foi maior com o uso do BTCl.

A resposta máxima da CVR com uso do BTCl e do PepTry ocorreu aos 210 minutos (178,0%, 192,2%, respectivamente) e com o uso do PepChy (205,0%) aos 120 minutos. Na CVA a resposta máxima com uso do BTCl e do PTRY ocorreu aos 210 minutos (180,3% e 169,9%, respectivamente) e com o uso do PepChy (205,8%) aos 180 minutos. A maior vasodilatação tanto da artéria renal como da artéria aórtica ocorreu na presença do PepChy (Figura 34: D e E).

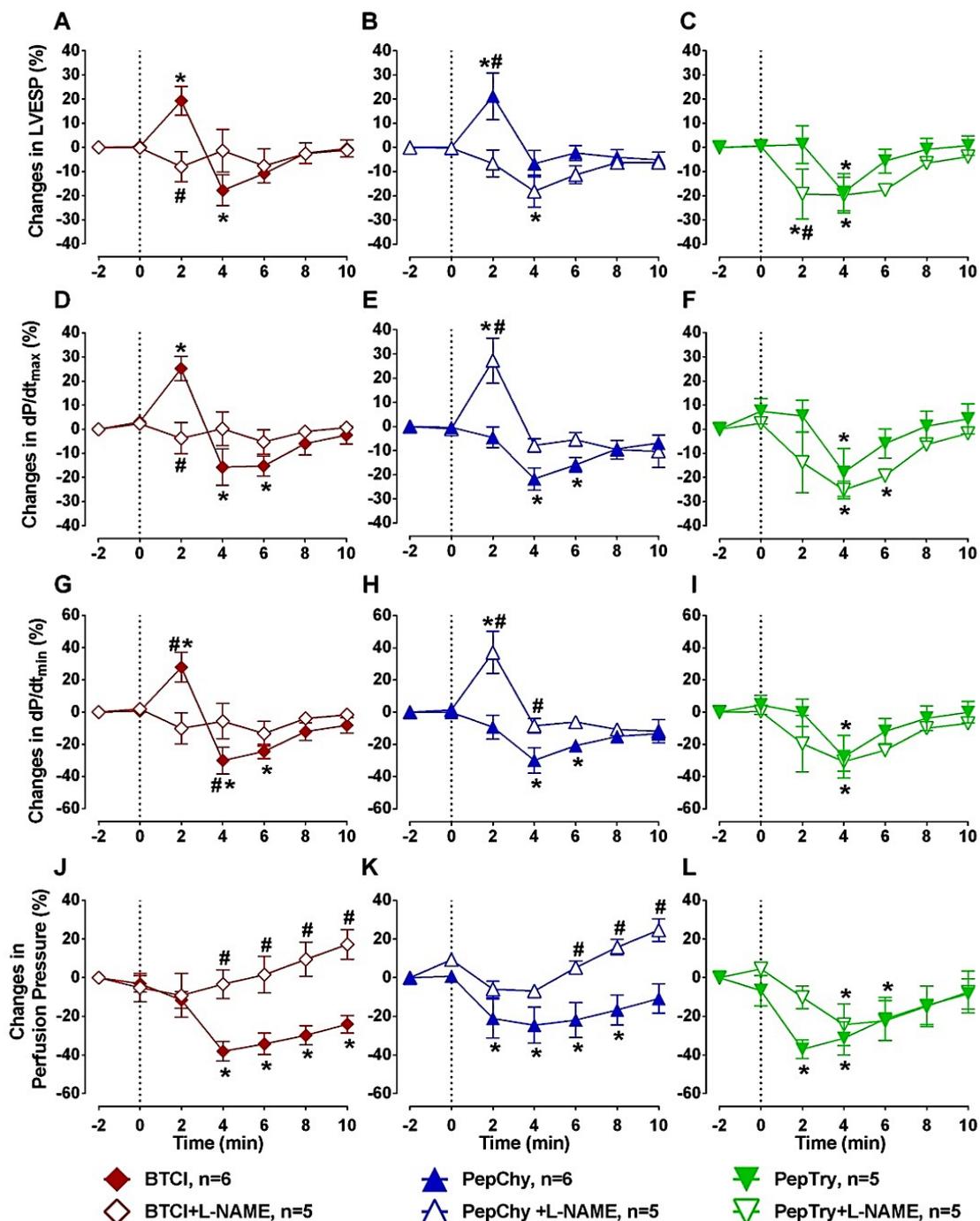
VI.9 Análise dos efeitos do BTCl, PepChy e PepTry na contratilidade ventricular esquerda e vasodilatação coronariana

Os efeitos de BTCl, PepChy e PepTry na contratilidade ventricular esquerda e vasomotricidade coronariana nos corações isolados são apresentados na figura 35: A-L. Todas as moléculas mostraram mudanças expressivas na contratilidade ventricular esquerda e na vasodilatação coronariana.

A infusão de BTCl promoveu aumento transitório seguido de redução significativa da pressão sistólica final do ventrículo esquerdo (LVESP, E_{max} : $-17,83 \pm 4,34\%$, $p < 0,05$) com taxa máxima de aumento da pressão ventricular esquerda (dP/dt_{max} , E_{max} : $-15,73 \pm 5,22\%$, $p < 0,05$) e taxa máxima de declínio da pressão ventricular esquerda (dP/dt_{min} , E_{max} : $-30,15 \pm 7,21\%$, $p < 0,05$) (Figura 35: A, D e G). O BTCl promoveu vasodilatação coronária observada pela redução da pressão de perfusão (E_{max} : $-38,08 \pm 5,77\%$, $p < 0,05$) (Figura 35: J) sem alterar a frequência cardíaca. O pré-tratamento com L-NAME atenuou os efeitos cardíacos do BTCl.

Da mesma forma que o BTCl, o PepChy induziu redução significativa no LVESP (E_{max} : $-18,13 \pm 2,38\%$, $p < 0,05$), dP/dt_{max} (E_{max} : $-21,73 \pm 3,03\%$, $p < 0,05$) e dP/dt_{min} (E_{max} : $-29,95 \pm 4,08\%$, $p < 0,05$) (Figura 35: B, E e H). Esse peptídeo também promoveu uma redução da pressão de perfusão (E_{max} : $-24,59 \pm 3,94\%$, $p < 0,05$) (Figura 35: K). Mas, o pré-tratamento com L-NAME aboliu esses efeitos. Inesperadamente, o PepChy promoveu um aumento transitório no LVESP, dP/dt_{max} e dP/dt_{min} , e dt/dt_{max} e dP/dt_{min} na presença de L-NAME (Figura 35: B, E e H). A frequência cardíaca não foi alterada pelo PepChy.

Figura 35: Efeitos do BTCl, PepChy e do PepTry nos corações de ratos isolados e do tratamento com o inibidor de sintase do óxido nítrico (L-NAME). (A-C) Efeitos do PepChy, BTCl e do PepTry na Pressão Sistólica Final do Ventrículo Esquerdo (LVESP); (D-F) Taxa máxima de aumento da Pressão Ventricular Esquerda (dP/dt_{max}); (G-I) Taxa máxima de declínio da Pressão Ventricular Esquerda (dP/dt_{min}) e (JL) Pressão de Perfusão. A linha pontilhada representa o começo da infusão dos peptídeos. Os dados são relatados como média \pm EPM. * $p < 0,05$, vs. linha de base, # $p < 0,05$, vs. entre pontos de tempo. ANOVA (*Two-way*) seguida por pós-teste de comparação múltipla de *Sidak*.



A perfusão com PepTry resultou na redução significativa no LVESP (E_{\max} : $-18,55 \pm 2,70\%$, $p < 0,05$), dP/dt_{\max} (E_{\max} : $-17,89 \pm 3,29\%$, $p < 0,05$) e dP/dt_{\min} (E_{\max} : $-27,78 \pm 4,15\%$, $p < 0,05$) (Figura 35: C, F e I). Esse peptídeo também induziu a diminuição significativa na pressão de perfusão (E_{\max} : $-37,09 \pm 5,12\%$, $p < 0,05$) (Figura 35: L). Nenhuma alteração foi observada no coração. O tratamento com L-NAME apenas atenuou a redução da LVESP promovida pelo PepTry (Figura 35: C), mas não inibiu os efeitos sobre dP/dt_{\max} , dP/dt_{\min} ou pressão de perfusão (Figura 35: F, I e L).

VII DISCUSSÃO

Inicialmente, as características físico-químicas e funcionais do inibidor BTCI foram apresentadas visando a contextualização histórica dos estudos realizados com este inibidor há mais de quarenta anos atrás. Estes estudos iniciaram com o isolamento e purificação em 1976 e posteriormente a caracterização estrutural e funcional, até os dias atuais, incluindo, principalmente estudos relacionados com o tema desta tese, a hipertensão arterial.

A pressão sanguínea é a força do sangue circulante às paredes das artérias (GUYTON, 1984; PORTO, 2013). Araújo e Acuri (1998) aprofundam a importância da manutenção do oxigênio ser necessária aos tecidos, e a remoção dos produtos catabólicos garante a preservação das condições hemodinâmicas. A pressão arterial é resultante do débito cardíaco e da resistência dos vasos periféricos, sendo considerada um parâmetro significativo na avaliação do sistema cardiovascular. Para garantir a nutrição tecidual é necessário que a tensão na parede arterial atinja determinados níveis e, conseqüentemente, a pressão arterial seja mantida estável e constante.

Mundialmente, a hipertensão arterial sistêmica (HAS) está associada às principais causas de óbitos, a morbimortalidade cardiovascular, além de doenças renais. A World Health Organization – WHO (2013) reforça ao informar que a HAS representa um desafio global de saúde pública, e estima-se que seja responsável por pelo menos 45% das mortes no mundo. Já Abegunde e colaboradores em 2007 alertaram sobre a HAS estar associada com diabetes *mellitus* e suas complicações nas modalidades cardíacas, renais e acidente vascular encefálico (AVE), bem como sobre o impacto na produtividade do trabalho e da renda familiar.

É muito importante frisar que, quando a HAS é considerada um caso leve é tratada com mudança no estilo de vida, alimentação equilibrada e atividades físicas. Já nos casos mais agudos/crônicos é necessário o uso de medicamentos vasodilatadores que contribuem para o relaxamento muscular que irá influenciar na redução da resistência vascular periférica e na vasodilatação arterial. O que nos remete aos pesquisadores Law et al. (2009) quando relatam sobre a maioria das classes de medicamentos em combinação e em doses baixas, proporcionarem vários benefícios médicos em terapias anti-hipertensivas, assim como a prevenção

de doenças renais, cardiovasculares e não vasculares, a exemplo de glaucoma e diabetes.

Outros pesquisadores como Bremner (2002); Erlund et al. (2008); Law et al. (2009); Shukla et al. (2010) e Tamargo et al. (2015) previnem que mesmo que a HAS seja facilmente diagnosticada e possa ser controlada por meio de intervenções farmacológicas, algumas drogas disponíveis para o tratamento da hipertensão são ineficazes e/ou apresentam efeitos colaterais adversos em alguns pacientes, e têm sido responsáveis por limitações e redução da adesão dos tratamentos atuais.

Acrescenta-se aqui as dificuldades econômicas para a aquisição dos medicamentos, além da escassez de medicamentos diversificados em farmácias populares. Assim, é importante identificar novas moléculas, como compostos naturais e sintéticos ou modificados para o desenvolvimento de fármacos com potencial terapêutico para o tratamento da hipertensão e outras doenças cardiovasculares (MANSO et al., 2015; WRÓBLEWSKA et al., 2013). Esses autores vão de encontro à Organização Mundial da Saúde (OMS) que recomenda políticas públicas para o uso da medicina complementar nos sistemas de saúde, abrindo oportunidades para, cada vez mais, pesquisadores se interessarem em conhecer e estudar as plantas com potencial farmacológico na saúde humana. Esses dados apoiam Esteves (2010) quando afirma em sua tese que as proteases são consideradas alvos em potencial por estarem associadas a doenças crônicas, e são, portanto, juntamente com os inibidores de proteases, campos de grande interesse para as indústrias farmacêuticas.

Chan et al. (2000) e Greenway et al. (2011) reforçam que as plantas medicinais têm uma longa história de uso para o tratamento da hipertensão, e são conhecidas por induzir hipotensão com efeitos colaterais mínimos; como é o caso da família de inibidores *Bowman-Birk* que tem sido utilizada com resultados promissores nas áreas: cardiovascular (ÁLVARES et al. 2014), inflamatória, doenças infecciosas e o câncer. Já Gran et al. (2006) e Touil et al. (2008) afirmam que os derivados de BBI quando testados em estudos da esclerose múltipla mostraram resultados positivos. E Sampath e Padmanabhan (2008), expandiram o potencial da aplicação dos derivados de BBI para reproduzir um importante efeito inibitório na protease viral NS3 que é essencial para a replicação do vírus da dengue.

Do mesmo modo, Kennedy (1993), Tikhonova et al. (1994) e Kennedy (1998) são unânimes ao afirmarem sobre os inibidores BBI de leguminosas que vêm

demonstrando capacidade antitumoral, suprimindo a transformação de células *in vitro* e em sistemas modelos, ou seja, exibem uma extraordinária atividade anticarcinogênica e radioprotetora. Além disso, Losso (2008) em estudos *in vivo* demonstrou a capacidade dos inibidores BBI em prevenir e, até mesmo suprimir, o desenvolvimento de alguns tipos histológicos de cânceres de cólon, esôfago e pulmão. De antemão, Dell'aica *et al.* (2007) acrescentam que, possivelmente, o referido efeito anticarcinogênico pode ser resultado da inibição proteolítica gerada pelas células modificadas que necessitam das proteases para que ocorra metástase, angiogênese, crescimento tumoral e proliferação.

Joanitti *et al.* (2010) também demonstraram os efeitos citotóxicos induzidos por BTCl em células de câncer da mama MCF-7 com os efeitos associados às alterações morfológicas do núcleo e das mitocôndrias. Inclusive, Mehdad *et al.* (2016) com intuito de observar os efeitos pleiotrópicos do BTCl, comprovaram que o mesmo induz parada mitótica e morte de células apoptóticas no câncer de mama invasivo; indução a despolarização da membrana mitocondrial; citotoxicidade em células de adenocarcinoma da mama, mas de um modo dependente da dose, estando ausente em células epiteliais mamárias normais.

Conforme citações de vários autores, o BTCl, que é um dos inibidores da família BBI, pode inclusive inibir a função das células cancerosas. Mehdade *et al.* (2016) citam estudo anterior onde ratificam o BTCl como forte atividade antitumoral (testado *in vitro*) devido a sua capacidade para induzir a apoptose em relação a diferentes células de câncer da mama. Estes dados permitiram concluir que o BTCl pode inibir a função das células cancerosas diretamente, bloqueando a cavidade do núcleo do proteassoma 20S, e indiretamente, por geração de moléculas intermediárias responsáveis por estresse oxidativo. Mehdad *et al.* afirmam ainda que o BTCl é seguro, de baixo custo e pode ser usado como parte de uma dieta diária. Assim, o potencial do BTCl para terapias combinadas para o câncer da mama é promissor.

Já Meneghetti (2018) em estudos por fluorescência, calorimetria e ultracentrifugação analítica caracterizou e analisou ensaios físico-químicos, termodinâmicos e estruturais do complexo BTCl-proteassoma 20S de *Saccharomyces cerevisiae* que sugeriram a formação do complexo BTCl-proteassoma 20S com uma estequiometria de 4.2 moléculas de inibidor para cada proteassoma.

O BTCl foi caracterizado físico-quimicamente e estruturalmente como um inibidor de protease de "cabeça dupla" que inibe a tripsina e a quimotripsina de forma independente e simultânea por meio de seus dois locais reativos específicos (P1), Lys²⁶ e Phe⁵³, respectivamente (VENTURA e MORHY (1975); FACHETTI e VENTURA (1984); FREITAS et al. (1997); BARBOSA et al. (2007); Esteves et al. (2007). Brumana (2015), da equipe do Laboratório de Biofísica Estrutural da UnB, em sua dissertação assinala que tais características físico-químicas podem favorecer o potencial farmacológico do BTCl. Barbosa et al. (2007) e Ventura e Xavier-Filho (1966) afirmam que as propriedades bioquímicas e biofísicas do BTCl são largamente caracterizadas sendo objeto de desenvolvimento biotecnológico em várias linhas de pesquisas como as citadas abaixo.

Em análises computacionais das interfaces BTCl-quimotripsina e BTCl-tripsina, Honda et al. (2018) aplicaram dois métodos de mecânica quântica semiempírica (SQM) corrigidos para descrever quantitativamente a força de todas as interações não covalentes na interface dos complexos moleculares. Os métodos usados por eles identificaram com sucesso a importância no processo de inibição da F⁵³ e S¹⁹⁵ como sendo os resíduos mais importantes que contribuem para a energia de interação BTCl e quimotripsina.

O BTCl também foi testado como defensivo em lavouras. Conforme dito anteriormente, o coleóptero *Anthonomus grandis* é uma praga muito conhecida em áreas tropicais e subtropicais. Ao se alimentar dos frutos e botões florais dos algodoeiros acarreta graves danos às lavouras (HAYNES e SMITH, 1992; ALVES et al., 1993). Por isso, objetivando reduzir a atividade proteolítica de enzimas digestivas desse coleóptero, os efeitos de BTCl foram analisados por Franco et al. (2003), tanto na fase larval e na adulta. Foi constatado que a inibição na atividade proteolítica e modificações morfológicas nas larvas incubadas com BTCl, impediram seu desenvolvimento, demonstrando assim o potencial desse inibidor como efeito antinutricional e controle dessa praga.

Como propriedades anti-hipertensivas *in vivo* e *in vitro*, o papel potencial dessas moléculas na redução da pressão arterial foi o propósito do presente estudo, que por sua vez foi motivado pelos efeitos inibitórios do BTCl relacionados aos seus efeitos natriuréticos no modelo do sistema renal de ratos Wistar, conforme relatos de Carvalho et al. (2008). Nesse estudo, esses autores demonstraram que o BTCl aumenta a natriurese induzida pela guanilina por meio de um grande aumento no

fluxo de urina; na excreção de sódio (Na^+); na taxa de filtração glomerular. Álvares et al. (2014) em experimento com administração intravenosa em ratos, mostrou um efeito protetor sobre a bradicinina em relação à clivagem das serinoproteases plasmáticas, bem como a redução da resistência vascular com consequente hipotensão. É digno de nota ressaltar que nos dados de Carvalho et al. (2008) o BTCl com a guanilina também induziu aumento expressivo na liberação osmolar.

Destaca-se ainda que, os resultados das alterações na excreção renal de sódio e água/urina (pressão-natriurese) promovida pelo BTCl (Carvalho et al., 2008) podem, conforme relado por Guyton et al. (1972) e Guyton (1991), proporcionar um efeito compensatório na redução da pressão arterial, diminuindo a resistência vascular periférica.

Considerando todas estas propriedades funcionais do BTCl, no presente trabalho de tese foi priorizado o estudo do efeito hemodinâmico e cardiovascular deste inibidor e seus peptídeos derivados, PepChy e PepTry. Estas moléculas foram testadas, *in vivo*, via gavagem, em ratos normotensos e naturalmente hipertensos, visando avaliar as propriedades hipotensora e vasodilatadora. Adicionalmente, foi avaliado o possível mecanismo de ação destas moléculas, subjacente aos seus efeitos hipotensores.

Ao comparar os resultados obtidos e considerando todos os parâmetros hemodinâmicos neste estudo envolvendo o BTCl e os ratos WR e SHR machos, pode-se afirmar que os efeitos mais expressivos foram nos SHR. Nestes ensaios, nas duas primeiras horas, os dois modelos de ratos estudados, apresentaram um decréscimo acentuado dos valores hemodinâmicos. Quanto aos resultados dos parâmetros cardiovasculares, como FC, FSR e FSA, ao serem analisados e comparados ao final dos ensaios, estatisticamente não foram considerados significativos. Nas condutâncias vasculares renal e aórtica, o efeito do BTCl nos WR foi maior em menos tempo de experimento, em concordância com os resultados obtidos por Álvares et al. (2014). Em contraste, os efeitos de vasodilatação renal e aórtica foi maior nos SHR.

Quanto aos peptídeos derivados do BTCl, PepChy e PepTry, se torna importante citar o ensaio de Pinheiro (2009) sobre o deslocamento na bicamada lipídica na presença desses peptídeos. Os resultados obtidos por ele indicam que as moléculas predominantemente hidrofílicas tendem a se associarem fortemente à região interfacial água/lipídeo, já as hidrofóbicas tendem a se estabilizarem no

centro da bicamada. Esses dados indicam que há uma grande influência das propriedades físico-químicas de cada um dos peptídeos e no modo como estes se inserem na membrana. O autor ainda diz que esse conhecimento é importante para a engenharia biotecnológica, tendo em vista a obtenção de propriedades desejáveis para o transporte de moléculas específicas, além de maior estabilização dessas moléculas no interior da membrana; aumento de velocidade da inserção e estabilização de agregados, reforçando o que seria relevante para o desenvolvimento de veículos para entrega de drogas no interior da célula. Lindsay em 2002 afirmou que, por serem pequenas sequências, e por meio de motivos ricos em resíduos carregados positivamente, essas moléculas conseguem rapidamente se translocar por intermédio da membrana celular, tanto *in vitro* quanto *in vivo*.

Além do mais, torna-se relevante dizer que os peptídeos derivados de alimentos e com propriedades anti-hipertensivas receberam atenção especial nos últimos anos, sendo que, a maioria desses peptídeos tiveram seus mecanismos e propriedades demonstradas por ensaios *in vitro* e *in vivo* em modelos animais e humanos (MARTÍNEZ-MAQUEDA et al., 2012).

Assim, neste estudo, os peptídeos bioativos derivados de BTCl foram projetados para conter locais reativos para quimotripsina (PepChy) e tripsina (PepTry) e foram capazes de inibir as proteases com menor afinidade que o BTCl como indicado pelas constantes de inibição estimadas neste trabalho. Comparativamente, a menor afinidade dos peptídeos pode ser devida à falta de regiões estruturais, como as que estabilizam toda a interface do complexo BTCl-protease. Isso está de acordo com dados relatados anteriormente, nos quais peptídeos cíclicos da família BBI com resíduos de aminoácidos adicionais após a ligação dissulfeto apresentaram uma atividade inibitória mais alta contra as proteases (NISHINO et al., 1975; GARIANI e LEATHERBARROW, 1997).

O que leva a considerar que na presença de BTCl e PepChy foi observado nos ratos WR e SHR declínio gradual em todos os parâmetros hemodinâmicos, e o maior efeito hipotensor foi observado nos ratos SHR. As alterações nos parâmetros cardiovasculares FC, FSR e FSA, de ambas espécies estudadas, não foram consideradas significativas. Já na CVR e CVA ficou demonstrado maior efeito positivo nos modelos SHR. Os resultados obtidos neste estudo são consistentes com os dados da literatura onde ensaios com peptídeos bioativos são descritos por Yang et al. (2004) e Aluko (2015) como agentes redutores da pressão arterial por

atividades decrescentes de renina ou enzima conversora de angiotensina (ECA), e pela regulação da via de síntese do óxido nítrico.

Resultados similares, como o declínio gradual dos parâmetros hemodinâmicos, foram obtidos na presença do PepTry, sendo constatado que o maior efeito hipotensor ocorreu nos ratos SHR. Da mesma forma, as alterações dos parâmetros cardiovasculares FC, FSR e FSA, tanto nos WR's e nos SHR's não foram consideradas estatisticamente significativas. Mas, os WR's e os SHR's tiveram com o uso do PepTry, aumentos significativos compatíveis com efeitos de vasodilatações das artérias renal e aórtica. Sendo evidenciado o maior efeito de vasodilatação (CVR e CVA) no SHR. Os resultados obtidos com o PepChy e o PepTry corroboram os de McBride et al. (2002) quando enfatizam ser encontrados na literatura diversos exemplos de peptídeos derivados de inibidores de serinoproteases da família Bowman-Birk que preservam função inibitória semelhante à molécula de origem.

Sabe-se também que os peptídeos cíclicos com nove resíduos de aminoácidos estabilizados por uma ligação dissulfeto, que é o caso do PepTry e PepChy, podem ser testados e utilizados como um inibidor natural da protease, considerando-se as atividades inibitórias contra tripsina e quimotripsina por intermédio dos sítios reativos de Lys²⁶ e Phe⁵³, respectivamente, bem como a rigidez estrutural e estabilidade dessas moléculas (GARIANI E LEATHERBARROW, 1997; NISHINO et al., 1975). Portanto, com base nas propriedades estrutural e inibitória do BTCl e seus peptídeos, bem como os efeitos natriuréticos e hemodinâmicos do BTCl, os efeitos hipotensores por meio da resistência vascular periférica e síntese endotelial do óxido nítrico (eNOS)/óxido nítrico (NO) (eNOS/NO) *in vivo* e *ex vivo*, respectivamente, foram também investigados no presente estudo.

Como pode ser observado nos dados coletados, esses peptídeos promoveram relaxamento vascular e consequentes efeitos hipotensores *in vivo*. Destaca-se ainda os efeitos do PepChy, uma vez que esse peptídeo promoveu expressiva vasodilatação aórtica em ratos SHR (Figura 24: H). As respostas hipotensivas, mediante administração de peptídeos via gavagem, foram mais expressivas em SHR do que em WR. Em resumo, os resultados obtidos *in vivo*, via gavagem do BTCl e seus peptídeos relacionados foram os seguintes: 1) O BTCl e os peptídeos relacionados promoveram diminuição da PAS e PAD e vasodilatação renal e aórtica em ratos WR e SHR; 2) A diminuição na PAS, PAD e vasodilatação

aórtica promovidas por BTCl e PepChy são mais expressivas em SHR que em WR; 3) A redução na PAS, PAD e vasodilatação renal causadas pela administração do PTRY são mais expressivas em SHR que em WR. Estes resultados demonstram que o BTCl e os peptídeos relacionados têm efeitos anti-hipertensivos e vasodilatadores. Além disso, os presentes achados destacam o possível potencial terapêutico desses compostos no tratamento da hipertensão.

Os peptídeos bioativos têm sido descritos por Yang et al. (2004) e Aluko (2015) como agentes redutores da pressão arterial por atividades decrescentes de renina ou enzima conversora de angiotensina (ECA), e pela regulação da via de síntese do NO. Em 1995 e 2014, Nakamura et al. e Iwaniak et al., respectivamente, destacaram que os peptídios bioativos com alta potência anti-hipertensiva foram projetados com base na posição de clivagem de aminoácidos da cadeia lateral. Alguns deles contendo resíduos carregados (arginina e/ou lisina), hidrofóbicos (valina, isoleucina, prolina) e principalmente aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina) foram identificados como inibidores potentes da ECA e agentes anti-hipertensivos. Em 2016, Iwaniak et al., reportaram sobre uma base de dados BIOPEP (<http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/pl/biopep>) de peptídeos biologicamente ativos onde estão incluídos inibidores da ECA e o sequenciamento de aminoácidos. No entanto, até o momento, os peptídeos cíclicos derivados de BBI's, como os do BTCl, que possuem sítios reativos formados por resíduos de aminoácidos com carga aromática e positiva, não foram investigados como agentes anti-hipertensivos e nem constam nesse banco de dados.

Como observado, a concentração máxima de ECA na inibição de BTCl foi maior (300 μM) em comparação com a inibição de tripsina e quimotripsina (6 μM e 40 μM , respectivamente), indicando que o BTCl é um inibidor mais potente contra a tripsina e quimotripsina do que a ECA. Portanto, as diferenças máximas de concentração para inibir a ECA pelo BTCl em comparação com essas proteases podem ser atribuídas a diferenças conformacionais do sítio ativo da ECA levando a impedimentos estéricos que evitam ou dificultam a interação ideal entre as moléculas de BTCl e ECA.

Yang et al. (2004) e Aluko (2015) acrescentam que, geralmente os efeitos redutores da pressão sanguínea de drogas ou compostos químicos e peptídeos bioativos estão relacionados com a capacidade de modular o sistema renina-angiotensina por intermédio de inibição da renina ou da enzima conversora da

angiotensina. Nos ensaios *in vitro* desenvolvidos neste trabalho de tese foi demonstrada a ação inibidora da ECA pelo BTCI, PepChy e PepTry em um padrão dose-dependente, apresentando valores de IC_{50} estimados como $54,6 \pm 2,9 \mu\text{M}$; $24,7 \pm 1,1 \mu\text{M}$ e $24,4 \pm 1,1 \mu\text{M}$, respectivamente.

Essas atividades inibitórias de BTCI e peptídeos contra a ECA pode ser principalmente devido à presença dos aminoácidos básicos (lisina) e hidrofóbicos (fenilalanina) nas alças reativas que também determinam a potência de inibição de proteínas e peptídeos de proteases de tripsina e de quimotripsina. Nas três moléculas, BTCI e peptídeos, o grupo ϵ -amina com carga positiva derivado da lisina (K^{26}), e a oclusão do local ativo por interações com fenilalanina (F^{53}), podem ter fechado para o local ativo da ECA.

É digno de nota que os peptídeos contendo tirosina C-terminal, fenilalanina, triptofano, prolina, lisina, isoleucina, valina, leucina e arginine, carregados positivamente e alguns hidrofóbicos (prolina, isoleucina, valina e leucina), como o BTCI foram caracterizados como fortes inibidores da ECA e agentes anti-hipertensivos (IWANIAK et al., 2014). Além disso, os valores IC_{50} de BTCI, PepChy e PepTry estão de acordo com os peptídeos inibidores da ECA, derivados de várias proteínas, e depositados no banco de dados BIOPEP (IWANIAK et al., 2016).

Os efeitos inibitórios da ECA pelo PepChy e PepTry foram consistentes com os dados da simulação computacional por *docking* molecular. Como observado na Figura 20, a fenilalanina hidrofóbica e a lisina, nos dois inibidores, fazem as mais importantes interações hidrofóbicas e eletrostáticas, respectivamente, no sítio ativo da ECA, e são responsáveis, portanto, por inibir a atividade enzimática da ECA.

A simulação de acoplamento molecular mostrou que a interação entre os dois peptídeos e a ECA ocorre com os principais resíduos de aminoácidos dentro do sítio catalítico da enzima que consiste em E411, Y523, V518, H353, H513, E384, A354, Y520, E384, bem como com o íon Zn^{2+} . A estabilidade da interação dos peptídeos na ECA é representada pelos valores da energia de ligação, que é dependente do número de ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e eletrostáticas, bem como interação com o íon Zn^{2+} . Normalmente, a alta estabilidade está relacionada com a inibição, representada pelo menor valor de IC_{50} .

Os melhores resultados foram obtidos para PepChy e PepTry no local ativo da ECA, próximo ao íon Zn^{2+} . Conforme dados de *docking* molecular e de IC_{50} , os menores valores de energias de ligação foram cerca de $-11,0 \text{ kcal/mol}$ e IC_{50} $24,0$

μM , respectivamente, os quais são compatíveis com a alta estabilidade do complexo ECA-peptídeos.

Os peptídeos se ligam à bolsa do sítio ativo da ECA por intermédio de ligações de hidrogênio, forças hidrofóbicas e eletrostáticas. Os aminoácidos dos peptídeos PepChy e o PepTry também estão ligados por meio de F3 e K3, respectivamente, com cadeias laterais específicas de aminoácidos da ECA responsáveis pela coordenação do zinco, como E411, H383, E384, por interações íon-dipolo e eletrostática. Tem sido relatado que essas mesmas interações desempenham papel importante na estabilização da interface dos complexos de ECA com captopril e análogos, como o enalapril, lisinopril e selênio (NATESH et al., 2003; AKIF et al., 2011). Portanto, esses resultados sugerem que essas interações contribuem para a estabilização do complexo ECA-peptídeo, o que leva à atividade inibitória da ECA. Finalmente, esses resultados apontam as importantes propriedades anti-hipertensivas *in vitro* e *in vivo* e um papel potencial dessas moléculas na redução da pressão arterial.

Além da ação antihipertensiva relacionada com a inibição da renina ou da enzima conversora da angiotensina (ECA), Yang et al. (2004) e Aluko (2015), ainda ressaltam que os efeitos redutores da pressão sanguínea de drogas ou compostos químicos e peptídeos bioativos estão relacionados também com o aumento de óxido nítrico produzido pelo aumento da atividade da sintase endotelial de óxido nítrico (eONS), o que promovem o alargamento dos vasos sanguíneos nos músculos.

Os dados resultantes desta pesquisa evidenciaram que a administração por gavagem de BTCl e seus peptídeos derivados promoveu diminuição de PAS e PAD e aumento de CVR e CVA em ratos WR e SHR, que indicam vasodilatação das artérias renal e aórtica, responsáveis pela hipotensão observada. Todos os resultados são consistentes com os dados obtidos anteriormente por Álvares et al. (2014) que, por administração intravenosa, demonstrou que o BTCl tem um efeito protetor sobre a bradicinina em relação à clivagem das proteases de serina no plasma e promoveu vasodilatação e respostas hipotensoras em ratos WR's.

Vale lembrar que os resultados aqui obtidos são consistentes com os reportados para peptídeos bioativos, proteínas hidrolisadas e compostos comerciais que reduzem a PAS e a PAD e aumentam a vasodilatação renal e aórtica (YANG et al., 2004; MARTÍNEZ-MAQUEDA et al., 2012; IWANIAK et al., 2014). Conforme dito acima e em parágrafos anteriores, os primeiros relatos do efeito *in vivo* natriurético,

glomerular na excreção renal de sódio e água e o efeito hipotensor de inibidores de proteases da família Bowman-Birk, especificamente o BTCI, foram feitos em 2008 e 2014 pelo nosso grupo, envolvendo professores/pesquisadores da UnB (grupo de biofísica molecular e grupo de toxicologia) e colaboração científica de professores/pesquisadores da UFC (Fortaleza/CE), Universidade Presbiteriana Mackenzie (São Paulo/SP), UFG (Goiânia/Go) (grupo de neurociência e fisiologia cardiovascular) (Carvalho et al., 2008; Álvares et al., 2014). Adicionalmente, o presente trabalho de tese é o primeiro relato do efeito hipotensor, por administração *in vivo* por gavagem, de inibidores e de peptídeos derivados de um inibidor da família Bowman-Birk, especificamente o BTCI.

O PepTry e o PepChy também promoveram relaxamento vascular e consequentes efeitos hipotensores *in vivo*. Também ficou demonstrado que as respostas hipotensivas observadas pela administração de peptídeos foram mais expressivas em SHR que em WR. Destacam-se os efeitos PepChy, uma vez que esse peptídeo promoveu vasodilatação aórtica expressiva em SHR. Relacionados ao tratamento da hipertensão, esses resultados apontam para um possível potencial terapêutico do BTCI e seus peptídeos.

É notório o conhecimento sobre o sistema renina-angiotensina (SRA) desempenhar um papel determinante tanto na regulação da pressão arterial como na homeostase eletrolítica. Peach (1977); Natesh et al. (2003) e Beuschlein (2013) são unânimes sobre a ECA catalisar a degradação da pressão arterial, diminuindo a bradicinina que é responsável pela liberação de prostaciclina e óxido nítrico (ON) nos vasos sanguíneos. Esse sistema de liberação de óxido nítrico foi testado em ensaios *ex vivo* para BTCI, PepChy e PepTry, considerando seus efeitos hipotensivos expressivos observados em ensaios *in vivo*. Esses peptídeos foram capazes de promover vasodilatação coronariana, observada pela redução na pressão de perfusão dos corações isolados. Esses achados estão de acordo com o aumento da condutância vascular observada nos ensaios *in vivo*. Além de que, observou-se a vasodilatação coronária induzida por BTCI ou PepChy foi atenuada pela inibição da óxido nítrico sintase. Entretanto, o pré-tratamento com L-NAME não alterou a redução da pressão de perfusão induzida pelo PepTry.

Assim, a vasodilatação coronária induzida por PepTry parece ser mediada por uma via independente do óxido nítrico. Mais investigações são necessárias para entender melhor esse efeito. Além disso, observou-se que o BTCI e o PepChy

promoveram efeito inotrópico negativo em corações isolados que foi inibido pelo inibidor não seletivo de ONS, denominado L-NAME.

O envolvimento da via da eONS/ON no tônus vascular das artérias coronárias, na contratilidade miocárdica tem sido relatado em estudos anteriores (GÖDECKE et al., 1998; SOUZA et al., 2013; MASSION e BALLIGAND, 2003; ZHANG et al., 2014). A alta concentração do ON pode aumentar a produção da cGMP ativando a guanilina ciclase, resultando na ativação de uma proteína quinase dependente de GMPc (PKG). A ativação da PKG pode bloquear os canais de Ca^{2+} tipo L na membrana plasmática do cardiomiócito e reduzir a contratilidade ventricular (MASSION e BALLIGAND, 2003; SOUZA et al., 2013). Acresce assim uma ressalva sobre o pré-tratamento com L-NAME que não foi capaz de atenuar os efeitos do PTRY sobre a contratilidade cardíaca, sugerindo novamente que o óxido nítrico não está envolvido nos efeitos provocados por esse peptídeo.

Além de afirmarem que geralmente, os efeitos redutores da pressão sanguínea de drogas ou compostos químicos e peptídeos bioativos estão relacionados com a capacidade de modular o sistema renina-angiotensina pela inibição da renina ou da enzima conversora da angiotensina (ECA), (Yang et al. (2004) e Aluko (2015) acrescentam: e também pelo aumento da via endotelial sintase do óxido nítrico (eONS) para aumentar o ON.

Como é de conhecimento, o efeito dos medicamentos para baixar a pressão arterial, reduzindo o risco de doenças cardiovasculares e AVC, está associado à redução da pressão arterial sistólica ou diastólica, além da ação no sistema relacionado à atividade da ECA e da ONS. Da mesma forma, os dados acima demonstram que a administração de BTCl e peptídeos promoveu diminuição de PAS e PAD e aumento de CVR e CVA em ratos WR e SHR, inibiu a atividade enzimática da ECA e, o BTCl e o PepChy promoveram efeito inotrópico negativo (diminuição da força de contração) em corações isolados, que foi inibido pelo inibidor não seletivo de ONS, L-NAME. Estes resultados indicam que estas moléculas, principalmente o BTCl e PepChy, promoveram vasodilatação das artérias renal e aórtica, o que possivelmente leva à hipotensão observada.

Todos os resultados deste trabalho são consistentes com outros dados que demonstraram o aumento a natriurese induzida pela guanilina mediante aumento no fluxo de urina, na excreção de Na^+ e taxa de filtração glomerular (Carvalho et. al., 2008) e a modulação da ação hipotensora da bradicinina e de análogos, Bk_1 e Bk_2 ,

na presença do BTCI, que potencializou o efeito destes peptídeos inibindo a clivagem destes por serinoproteases plasmáticas (ALVARES et al., 2014). Evidencia-se ainda que os resultados obtidos nesse estudo são consistentes com os mencionados para peptídeos bioativos, proteína hidrolisada e compostos comerciais que reduzem a PAS e PAD, do mesmo modo que o aumento da vasodilatação renal e aórtica (YANG et al., 2004; MARTINEZ-MAQUEDA et al., 2012; KOYAMA, M. et al., 2013).

VIII CONCLUSÃO

Ao comparar os resultados obtidos nesse estudo, via gavagem, e considerando todos os parâmetros hemodinâmicos e cardiovasculares envolvendo o BTCl e seus peptídeos derivados e os ratos WR e SHR, pode-se concluir:

- O BTCl e os peptídeos relacionados promoveram relaxamento vascular e consequentes efeitos hipotensores *in vivo* em concordância com os resultados obtidos, via intravenoso, de BTCl por Álvares et al. (2014) e os ensaios com peptídeos bioativos descritos por Yang et al. (2004) e Aluko (2015) como agentes redutores da pressão arterial. Comprovando assim efeitos anti-hipertensivos e vasodilatadores e possível potencial terapêutico dos compostos analisados no tratamento da hipertensão.
- Infere-se que o BTCl é um inibidor mais potente contra a tripsina e quimotripsina do que a ECA. As diferenças máximas de concentração para inibir a ECA pelo BTCl em comparação com essas proteases podem ser atribuídas a diferenças conformacionais do sítio ativo da ECA levando a impedimentos estéricos que evitam ou dificultam a interação ideal entre as moléculas de BTCl e ECA.
- Os resultados obtidos com o PepChy e o PepTry corroboram os resultados de McBride et al. (2002) sobre os peptídeos derivados de inibidores de serinoproteases da família Bowman-Birk preservar função inibitória semelhante à molécula de origem.
- Os peptídeos pesquisados foram capazes de inibir as proteases com menor afinidade. Comparativamente, essa menor afinidade pode ser devida à falta de regiões estruturais como aquelas que estabilizam a interface do complexo BTCl-protease.
- Deduz-se ainda que os dados obtidos por *docking* molecular e nos ensaios *in vitro* onde foi demonstrada a ação inibidora da ECA pelo BTCl, PeChy e PepTry em um padrão dose-dependente, levando a crer que essas atividades

inibitórias do BTC1 e peptídeos contra a ECA pode ser principalmente devido à presença dos aminoácidos básicos (lisina) e hidrofóbicos (fenilalanina) nas alças reativas que também determinam a potência de inibição de proteínas e peptídeos de proteases de tripsina e de quimotripsina.

- A vasodilatação coronária induzida por BTC1 ou PepChy foi atenuada pela inibição da óxido nítrico sintase. Entretanto, o pré-tratamento com L-NAME não alterou a redução da pressão de perfusão induzida pelo PepTry. Subentendendo que a vasodilatação coronária induzida por PepTry parece ser mediada por uma via independente do óxido nítrico. Mais investigações são necessárias para entender melhor esse efeito.

Conclui-se ainda que, em conjunto, os resultados obtidos no presente trabalho mostram que tanto o BTC1 como os peptídeos derivados, PepChy e PepTry, promoveram hipotensão e vasodilatação coronariana, e também reduziram a contratilidade ventricular esquerda. Esses efeitos se assemelham aos de drogas anti-hipertensivas a exemplo dos bloqueadores dos canais de cálcio ou dos peptídeos que aumentam a atividade da via do óxido nítrico.

Perspectivas

Diante desses resultados, outros estudos são necessários para elucidar completamente o mecanismo desse efeito anti-hipertensivo, incluindo, por exemplo, a ação sobre o potencial na aplicação destas moléculas em recepto(s) de membrana acoplados à proteína G, envolvido na transdução de sinais celulares; a toxicidade; os efeitos colaterais cardiovasculares por meio de tratamento a longo prazo e os efeitos combinados dos dois peptídeos em questão.

IX REFERÊNCIAS

ABEGUNDE, D. O.; MATHERS, C. D.; ADAM, T. Ortegon, M.; Strong, K. The burden and costs of chronic diseases in low-income and middle-income countries. **The Lancet**, Vol. 370, N° 9603, p 1929-1938. 2007.

ABRAMS, W. B. Pathophysiology of hypertension in older persons. **The American Journal of the Medical Sciences**. Vol. 85, p 7-12. 1988.

AJANI, H.; PECINA, A.; EYRILMEZ, S. M.; FANFRLÍK, J.; HALDAR, S.; ŘEZÁČ, J.; HOBZA, P.; LEPŠÍK, M. Superior Performance of the SQM/COSMO Scoring Functions in Native Pose Recognition of Diverse Protein-Ligand Complexes in Cognate Docking. **ACS Omega**. Vol. 2, N° 7, p 4022-4029. 2017.

AKIF, M.; MASUYER, G.; SCHWAGER, S. L. U.; BHUYAN, B. J.; MUGESH, G.; ISAAC, R. E.; STURROCK, E. D.; ACHARYA, K. R. Structural characterization of angiotensin I-converting enzyme in complex with a selenium analogue of captopril. **The Febs Journal**. Vol. 278, N° 19, p 3644-3650, DOI: 10.1111/j.1742-4658.2011.08276.x. 2011.

ALEXANDER, R. W. Hypertension and the pathogenesis of atherosclerosis – oxidative stress and the mediation of arterial inflammatory response: a new perspective. PubMed – **Hypertension**. Vol. 25, p 155-161.1995.

ALLEN, A. M. Inhibition of the hypothalamic paraventricular nucleus in spontaneously hypertensive rats dramatically reduces sympathetic vasomotor tone. **Hypertension**. Vol. 39, p 275-280. 2002.

ALUKO, R. E. Determination of nutritional and bioactive properties of peptides in enzymatic pea, chickpea, and mung bean protein hydrolysates. **Journal AOAC International**. Vol. 91, N° 4, p 947-956. 2008.

ALUKO, R. E. Antihypertensive peptides from food proteins. **Annual review of food science and technology**. Vol. 6, p 235-262, DOI:10.1146/annurev-food-022814-0155 20. 2015.

ÁLVARES, A. C. M.; SCHWARTZ, E. F.. AMARAL, N. O.; TRINDADE, N. R.; PEDRINO, G. R.; SILVA, L. P.; FREITAS, S. M. Bowman-Birk protease inhibitor from *Vigna unguiculata* seeds enhances the action of bradykinin-related peptides. **Molecules (Basel, Switzerland)**. Vol. 19, p 17536-17558. 2014.

ALVES, P. M. P.; RAMALHO, A. R.; TEIXEIRA, C. A. D. Monitoramento do algodão (*Anthonomus grandis*, Coleóptero, Curculionidae) em Rondônia. **Reunião Nacional do Algodão/EMBRAPA- CNPA**, Cuiabá-MT, 139. 1993.

ARAGÃO, J. B.; VENTURA, M. M. An Infrared Spectroscopic Study on the Secondary Structure of the Black-Eyed Pea Trypsin and Chymotrypsin Inhibitor – amide I – III and V Bands. **Anais Academia Brasileira de Ciências**. Vol. 58, N° 3, p 339-343. 1986.

ARAUJO, T. L.; ACURI, E. A. M. Influência de fatores anátomo-fisiológicos na medida indireta da pressão arterial: identificação do conhecimento dos enfermeiros. **Revista Latino-Americana Enfermagem**. Vol.6, N° 4. Ribeirão Preto/SP, 1998. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-11691998000400004 – Acesso: 21/08/2019.

ARMSTRONG, W. B.; WAN, X. S.; KENNEDY, A. R. Clinical modulation of oral leukoplakia and protease activity by Bowman-Birk inhibitor concentrate in a phase IIa chemoprevention trial. **Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research**. Vol. 6, N° 12, p 4684-4691. 2000.

BALBACH, A. **As plantas curam**. Ed. A Verdade Presente, p 423. 1962.

BARANY, G.; MERRIFIELD, R. B. **Solid-Phase Peptide Synthesis**. Peptides: Synthesis, Structures, and Applications, p 93-169. 1995.

BARBOSA, J. A.; SILVA, L. P.; TELES, R. C.; ESTEVES, G. F.; AZEVEDO, R. B.; VENTURA, M. M.; FREITAS, S. M. Crystal structure of the Bowman-Birk Inhibitor from *Vigna unguiculata* seeds in complex with beta-trypsin at 1.55 Å resolution and its structural properties in association with proteinases. **Biophysical Journal**. Vol. 92, p 1638-1650. 2007.

BELL, R. M.; MOCANU, M. M. e YELLON, D. M. Retrograde heart perfusion: the Langendorff technique of isolated heart perfusion. **Journal of molecular and cellular cardiology**. Vol. 50, pp 940-950, doi:10.1016/j.yjmcc.2011.02.018. 2011.

BENDER, A. E. Effects on nutritional balance: antinutrients. In: WATSON, D.H. Natural toxicants in food: progress and prospects. London: **Ellis Horwood International Publishers**, p 110-124. 1987.

BERGAMASCHI C. T.; CAMPOS, R. R.; SCHOR, N.; LOPES, O. U. Role of the rostral ventrolateral medulla in maintenance of blood pressure in rats with Goldblatt hypertension. **Hypertension**. Vol. 26, p 1117-1120. 1995.

BERGAMASCHI, C. T.; CAMPOS, R. R.; LOPES, O. U. Rostral ventrolateral medulla : A source of sympathetic activation in rats subjected to long-term treatment with L- NAME. **Hypertension**. Vol. 34, p 744-747. 1999.

BERNATOVA, I. Endothelial dysfunction in experimental models of arterial hypertension: cause or consequence? **Biomed Research**. DOI: 10.1155/2014/598271. Electronic publication. 2014.

BEUSCHLEIN, F. Regulation of aldosterone secretion: from physiology to disease. **European journal of endocrinolog**. Vol. 168, p R85-93. ISSN 0804-4643, DOI:10.1530/eje-13-0263. 2013.

BHUYAN, B. J.; MUGESH, G. Synthesis, characterization and antioxidant activity of angiotensin converting enzyme inhibitors. **Organic & Biomolecuar Chemistry**. Vol. 9, N° 5, DOI: 10.1039/c0ob00823k, p 1356-1365. 2011.

BIRK, Y.; GERTLER, A.; KHALEF, S. A pure trypsin inhibitor from soya beans. **Biochemical Journal**. Vol. 87, N° 2, p 281-284. 1963.

BIRK, Y. The bowman-birk inhibitor - trypsin-inhibitor and chymotrypsin-inhibitor from soybeans. **International Journal of Peptide and Protein Research**. Vol. 25, N° 2, p 113-131. 1985.

BLOCH, K. J.; WRIGHT, J. A.; BISHARA, S. M.; BLOCH, M. B. Uptake of polypeptide fragments of proteins by rat intestine in vitro and in vivo. **Gastroenterology**. Vol. 95, N° 5, p 1272-1278. 1988.

BODE, W.; HUBER, R. Natural protein proteinase-inhibitors and their interaction with proteinases. **European Journal of Biochemistry**. Vol. 204, N° 2, p 433-451. 1992.

BOWMAN, D. E. Differentiation of soy bean antitryptic factors. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**. Vol. 63, N° 3, p 547-550. 1946.

BREMNER, A. D. Antihypertensive medication and quality of life--silent treatment of a silent killer?. **Cardiovascular drugs and therapy**. Vol. 16, p 353-364. 2002.

BROWN, M. Aliskiren. **Circulation**. Vol. 118, pp 773-784. 2008.

BRUMANA, Giselle X. R. **Efeitos do inibidor de proteases black-eyed pea trypsin chymotrypsin inhibitor (BTCI) na viabilidade e proliferação de células mda-mb-231 de adenocarcinoma mamário**. 2015. 54 f. Dissertação (Mestre em Patologia Molecular) – Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília/DF, 2015.

CAGNONI, F., NJWE, C. A. N.; ZANINELLI, A.; RICCI, A. R.; DAFFRA, D.; D'OSPINA, A.; PRETI, P.; DESTRO, M. Blocking the RAAS at different levels: an update on the use of the direct renin inhibitors alone and in combination. **Vascular Health and Risk Management**. Vol. 6, p 549-559. 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20730071> Acesso: 30/07/2018.

CAI, S. H.; DOLE, V. S.; BERGMEIER, W.; SCAFIDI, J.; FENG, H. P.; WAGNER, D. D.; DAVIS, A. E. A direct role for C1 inhibitor in regulation of leukocyte adhesion. **Journal of Immunology**. Vol. 174, N° 10, p 6462-6466. 2005.

CARRETERO, O. A.; OPARIL, S. Essential hypertension: part I: definition and etiology. **Circulation**. Vol.101, p 329-335. 2000.

CARVALHO, A. F.; SANTOS-NETO, M. S.; MONTEIRO, H. S. A.; FREITAS, S. M.; MORHY, L.; NASCIMENTO, N. R. F.; FONTELES, M. C. BTC1 enhances guanylin-induced natriuresis and promotes renal glomerular and tubular effects. **Brazilian Journal of Biology**. Vol. 68, N° 1, São Carlos/SP. DOI: dx.doi.org/ 10.1590/S1519-69842008000 100021, p149-154. 2008.

CATALANO, M.; RAGONA, L.; MOLINARI, H.; TAVA, A.; ZETTA, L. Anticarcinogenic Bowman Birk inhibitor isolated from snail medic seeds (*Medicago scutellata*): Solution structure and analysis of self-association behavior. **Biochemistry**. Vol. 42, N° 10, p 2836-2846. 2003.

CÉSAR, L. A. M. Frequência cardíaca e risco cardiovascular. Instituto do Coração (InCor) do HC – FMUSP. **Revista Associação Médica Brasileira**. Vol. 53, N° 5, p 456-459. 2007.

CHADDAD NETO, F. Hipertensão afeta o cérebro. **PLURICON – Comunicação Integrada**. 2016.

CHAN, P.; TOMLINSON, B.; CHEN, Y. J.; LIU, J. C.; HSIEH, M. H.; CHENG, J. T. A double-blind placebo-controlled study of the effectiveness and tolerability of oral stevioside in human hypertension. **British Journal of Clinical Pharmacology**, Vol. 50, N° 3, p 215-220. 2000.

CHEN, P.; ROSE, J.; LOVE, R.; WEI, C. H.; WANG, B. C. Reactive sites of an anticarcinogenic Bowman-Birk proteinase inhibitor are similar to other trypsin inhibitors. **Journal of Biological Chemistry**. Vol. 267, p 1990–1994. 1992.

CHEN, Y. W.; HUANG, S.; LIN-SHIAU, S.; LIN, J. Bowman–Birk inhibitor abates proteasome function and suppresses the proliferation of MCF-7 breast cancer cells through accumulation of MAP kinase phosphatase-1. **Carcinogenesis**. Vol. 26, N° 7, p 1296–1306. 2005.

CHEN, Z. Y.; JIAO, R.; YANG, N.; PENG, C.; WONG, Y. M.; HUANG, Y. Anti-hypertensive nutraceuticals and functional foods. **Journal of agricultural and food chemistry**. Vol. 57, p 4485-4499, DOI:10.1021/jf900803r. 2009.

CHEN-IZU, Y.; CHEN, L.; BÁNYÁSZ, T.; McCULLE, S. L.; NORTON, B.; SCHARF, S. M.; AGARWAL, A.; PATWARDHAN, A.; IZU, L. T.; BALKE, C.W. Hypertension-induced remodeling of cardiac excitation-contraction coupling in ventricular myocytes occurs prior to hypertrophy development. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**. Vol. 293, p 3301-3310, DOI: 10.1152/ajpheart.00259. 2007.

CHEUNG, B. M.; CHEUNG, G. T.; LAUDER, I. J.; LAU, C. P.; Kumana, C. R. Meta-analysis of large outcome trials of angiotensin receptor blockers in hypertension. **Journal of Human Hypertension**. Vol. 20, p 37-43. 2006.

CHOBANIAN, A. V.; BAKRIS, G. L.; BLACK, H. R.; CUSHMAN, W. C.; GREEN, L. A.; IZZO, J. L.; JONES, D.W.; MATERSON, B. J.; OPARIL, S.; WRIGHT, J. T. Jr.; ROCELLA, E. J.; NATIONAL HEART, LUNG, e Blood Institute Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure; National High Blood Pressure Education Program Coordinating Committee. The seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure: **The JNC 7 Reports Hypertension**. 289(19); p 1206-1252. 2003.

CIAN, R. E.; VIOQUE, J.; DRAGO, S. R. Structure-mechanism relationship of antioxidant and ACE I inhibitory peptides from wheat gluten hydrolysate fractionated by pH. **Food Research International**, v. 69, p. 216–223, 2015.

CINGOLANI, O. H.; YANG, X. P.; CAVASIN, M. A.; CARRETERO, O. A. Increased Systolic Performance with diastolic dysfunction in adult spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**. Vol. 41, p 249–254. DOI: 10.1161/01.HYP.0000052832.96564.0B. 2003.

CLEMENTE, A.; CARMEN MARIN-MANZANO, M.; JIMENEZ, E.; CARMEN ARQUES, M.; DOMONEY, C. The anti-proliferative effect of TI1B, a major Bowman-Birk isoinhibitor from pea (*Pisum sativum* L.), on HT29 colon cancer cells is mediated through protease inhibition. **The British journal of nutrition 108 Suppl 1**, p 135-144, DOI:10.1017/s000711451200075x. 2012.

CLEMENTE, A.; ARQUES MDEL, C. Bowman-Birk inhibitors from legumes as colorectal chemopreventive agents. **World journal of gastroenterology**. Vol. 20, p 10305-10315, DOI:10.3748/wjg.v20.i30.10305. 2014.

COHN, I. N.; TOGNONI, G. on behalf of Valsartan Heart Failure Trial Investigators. A randomized trial of the angiotensin receptor blocker valsartan in chronic heart failure. **New England Journal of Medicine**. Vol. 345, p167-175. 2001.

CONTRERAS, R. J.; WONG, D. L.; HENDERSON, R.; CURTIS, K. S.; SMITH, J. C. High dietary NaCl early in development enhances mean arterial pressure of adult rats. **Physiology & Behavior**. Vol. 71, p 173–181, DOI: 10.1016/S0031-9384(00)00331-0. 2000.

COSTA LIMA, N. K.; LIMA, F. B.; SANTOS, E. A.; OKAMOTO, M. M.; MATSUSHITA, D. H.; HELL, N. S.; HEIMAN, J. C. Chronic salt overload increases blood pressure and improves glucose metabolism without changing insulin sensitivity. **American Journal Hypertension**. Vol.10, p 720–727, DOI: 10.1016/S0895-7061(97)00090-3. 1997.

CUSHMAN, D. W.; CHEUNG, H. S.; SABO, E. F.; ONDETTI, M. A. Design of potent competitive inhibitors of angiotensin-converting enzyme. Carboxyalkanoyl and mercaptoalkanoyl amino acids. **Biochemistry**. Vol. 16, N° 25, p 5484-5491. 1977.

DAHLÖF, B.; DEVEREUX, R. B.; KJELDSEN, S. E.; JULIUS, S.; BEEVERS, G.; DE FAIRE, U.; FYHRQUIST, F.; IBSEN, H.; KRISTIANSSON, K.; LEDERBALLE-PEDERSEN, O.; LINDHOLM, L. H.; NIEMINEN, M. S.; OMVIK, P.; OPARIL, S.; WEDEL, H. Cardiovascular morbidity and mortality in the losartan intervention for end point reduction in hypertension study (LIFE): a randomized trial against atenolol. **The Lancet**. Vol. 359, p 995-1003. 2002.

DAHLÖF, B.; SEVER, P. S.; POULTER, N. R.; WEDEL, H.; BEEVERS, D. G.; CAULFIELD, M.; COLLINS, R.; KJELDSEN, S. E.; KRISTIANSSON, A.; McINNES, G. T.; MEHISEN, J.; NIEMINEN, M.; O'BRIEN, E.; OSTERGREN, J.; ASCOT Investigators. Prevention of cardiovascular events with an antihypertensive regimen of amlodipine adding perindopril as required versus atenolol adding bendro umethiazide as required, in the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial-Blood Pressure Lowering Arm (ASCOT-BPLA): a multicentre randomised controlled trial. **The Lancet**. 366(9489):p 895-906. 2005.

DAMPNEY, R. A.; HORIUCHI, J.; TAGAWA, T.; FONTES, M. A.; POTTS, P. D.; POLSON, J. W. Medullary and supramedullary mechanisms regulating sympathetic vasomotor tone. **Acta Physiologica Scandinavica**. Vol. 177, p 209-218. 2003.

DELL'AICA, I.; CANIATO, R.; BIGGIN, S.; GARBISA, S. Matrix proteases, green tea, and St. John's wort: Biomedical research catches up with folk medicine. **Clinical Chimical Acta**. Vol. 381, p 69-77. 2007.

DOUMAS, M.; TSAKIRIS, A. K.; DOUMA, S.; GRIGORAKIS, A.; PAPADOPOULOS, A.; HOUNTA, A.; GIAMARELLOU, H. et al. Beneficial effects of switching from beta-blockers to nebivolol on the erectile function of hypertensive patients. **Asian Journal of Andrology**. Vol. 8, N° 2, p 177-182. DOI:10.1111/j.1745-7262.2006.00076.x. 2006.

DULIN, B.; ABRAHAM, W. T. Pharmacology of carvedilol. **American Journal of Cardiology**. Vol. 93(9A):3B-6B. 2004.

DU VIGNEAUD, V. Hormones of the posterior pituitary gland: oxytocin and vasopressin. **Harvey Lecture**. Vol. 50, p1-26. 1954.

EGAN, B. M.; STEVENS-FABRY, S. Prehypertension-prevalence, health risks, and management strategies. **Nature Reviews Cardiology**. Vol. 12, N° 5, p 289-300. 2015.

ELSTNER, M.; HOBZA, P.; FRAUENHEIM, T.; SUHAI, S.; KAXIRAS, E. Hydrogen bonding and stacking interactions of nucleic acid base pairs: A density-functional-theory based treatment. **The Journal Chemistry Physics**. Vol. 114, p 5149-5155. 2001.

ERLANGER, B. F.; KOKOWSKY, N.; COHEN, W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. **Archives of biochemistry and biophysics**. Vol. 95, p 271-278. 1961.

ERLUND, I.; KOLI, R.; G. ALFTHAN et al. Favorable effects of berry consumption on platelet function, blood pressure, and HDL cholesterol. **The American Journal of Clinical Nutrition**. Vol. 87, N° 2, p 323-331. 2008.

ESTEVEZ, Gisele F. **Resolução da estrutura tridimensional do inibidor trípico e quimotríptico de vigna unguiculata em complexos binário e ternário**. 2010. 163 f. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) – Programa de Biologia Molecular. Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, Brasília/DF. 2010.

FACHETTI, H. C. S.; MIZUTA, K.; VENTURA, M. M. Thermodynamics of the black-eyed pea trypsin and chymotrypsin inhibitor. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. Vol. 56, p 311-317. 1984.

FERNANDES, João Paulo C. **Estrutura cristalográfica e atividade dos peptídeos derivados do inibidor de proteases de *Vigna unguiculata* em complexo com tripsina**. 2019. 86 f. Tese (doutorado em Biologia Molecular) – Programa de Biologia Molecular. Instituto de Biologia. Universidade de Brasília, Brasília/DF. 2019.

FIELDS, G. B.; NOBLE, R. L. Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxy carbonyl amino acids. **International journal of peptide and protein research**. Vol. 35, p 161-214. 1990.

FIELDS, G. B.; NOBLE, R. L. Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxy carbonyl amino acids. **International journal of peptide and protein research**. Vol. 35, p 161-214. 1990.

FISHER, N.; HOLLENBERG, N. Renal vascular responses to renin inhibition with zankiren in men. **Journal of Clinical Pharmacology**. Vol. 57, p 342-348. 1995.

FLATHER, M. D.; YUSUF, S.; KOBER, L.; PFEFFER, M.; HALL, A.; MURRAY, G.; TORP-PEDERSEN, C.; BALL, S.; POGUE, J.; MOYÉ, L.; BRAUNWALD, E. Long term ACE-inhibitor therapy in patients with heart failure or left ventricular dysfunction: a systematic overview of data from individual patients. ACE-Inhibitor Myocardial Infarction Collaborative Group. **The Lancet**. Vol. 355(9215):p1575-1581. 2000.

FOLLMANN, M.; GRIEBENOW, N.; HAHN, M. G.; HARTUNG, I.; MAIS, F. J.; MITTENDORF, J.; SCHÄFER, M.; SCHIROK, H.; STASCH, J. P.; STOLL, F.; STRAUB, A. The chemistry and biology of soluble guanylate cyclase stimulators and activators. **Angewandte Chemie International Edition in English**. Vol. 52, N° 36, p 9442-9462. DOI: 10.1002/anie.201302 588. Electronic publication. 2013.

FORTE, L. R.; LONDON, R. M.; KRAUSE, W. J.; FREEMAN, R. H. Mechanism of guanylin action via cyclic GMP in the kidney. Review. **Annual Review of Physiology**. Vol. 62, p 673-695. 2000.

FORREST, C. M.; McNAIR, K.; VINCENTEN, M. C. J.; DARLINGTON, L. G.; STONE T. W. Selective depletion of tumour suppressors Deleted in Colorectal Cancer (DCC) and neogenin by environmental and endogenous serine proteases: linking diet and cancer. **BMC Cancer**. 16:772. DOI 10.1186/s12885-016-2795-y; p 19. 2016.

FRANCO, O. L.; SANTOS, R.C.; BATISTA, J. A.N.; MENDES, A. C. M.; ARAÚJO, M. A. M.; MONNERAT, R. G.; DE SÁ, M. F. G.; FREITAS, S. M. Effects of black-eyed pea trypsin inhibitor on proteolytic activity and on development of *Anthonomus grandis*. **Phytochemistry**. Vol. 63, p 343-349. 2003.

FREITAS, S. M.; VENTURA, M. M. Vibrational Analysis of the Secondary Structure of the Black-Eyed Pea (Cowpea) Trypsin/Chimotrypsin Inhibitor (BTCI) by Fourier Transform Infrared Spectroscopy. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Vol. 68, N° 2, p 165-174. 1996.

FREITAS, S. M.; MELLO, L. V.; SILVA, M. C; VRIEND, G.; NESHICH, G.; VENTURA, M. M. Analysis of the black-eyed pea trypsin and chymotrypsin inhibitor-alpha-chymotrypsin complex. **FEBS Letters**. Vol. 409, p 121-127. 1997.

FREITAS, S. M.; IKEMOTO, H.; VENTURA, M. M. Thermodynamics of the binding of chymotrypsin with the black-eyed pea trypsin and chimotrypsin inhibitor (BTCI). **Journal of Protein Chemistry**. Vol. 18, p 307-313. 1999.

FRITZ, M.; RINALDI, G. Blood pressure measurements with the tail-cuff method in Wistar and Spontaneously hypertensive rats: influence of adrenergic- and nitric oxide-mediated vasomotion. **Journal Pharmacol Toxicol Methods**. Vol. 58, p 215-220. 2008.

GARDNER, M. L. G. Gastrointestinal Absorption of Intact Proteins. **Annual Review of Nutrition**. Vol. 8, p 329–350. 1988.

GARG. R.; YUSSUF, S. Collaborative Group on ACE-inhibitor Trials. Overview of randomized trials of angiotensin converting enzyme inhibitors on mortality and morbidity in patients with heart failure. **The Latest Medical Research, Reviews and Guidelines** – JAMA. Vol. 273, p 1450-1456. 1995.

GARIANI, T.; LEATHERBARROW, R. J. Stability of protease inhibitors based on the Bowman-Birk reactive site loop to hydrolysis by proteases. **The journal of peptide research: official journal of the American Peptide Society**, Vol. 49, N° 6, p 467-475. 1997.

GIATRA, I.; LAU, J.; LEVEY, A. S. Effect of angiotensin-converting enzyme inhibitors on the progression of non-diabetic renal disease: a meta-analysis of randomized trials. **Annals of Internal Medicine**. Vol. 127, p 337-345. 1997.

GÖDECKE, A.; DECKING, U. K.; DING, Z.; HIRCHENHAIN, J.; BIDMON, H. J.; GÖDECKE, S.; SCHRADER, J. Coronary hemodynamics in endothelial NO synthase knockout mice. **Circulation research**. Vol. 82, N° 2, p 186-194. 1998.

GOTTLIEB, M. G. V., CRUZ, I. B. M.; BODANESE, L. C. Origin of the metabolic syndrome: genetic evolutionary and nutritional aspects. **Scientia Medica**. Vol. 18, p 31-38. 2008.

GRAN, B.; TABIBZADEH, N.; MARTIN, A.; VENTURA, E. S.; WARE, J. H.; ZHANG, G. X.; PARR, J. L.; KENNED, A. R.; ROSTAMI, A. M. The protease inhibitor, Bowman-Birk Inhibitor, suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis: a potential oral therapy for multiple sclerosis. **Multiple Sclerosis**. Vol. 12, N° 6, p 688-697. 2006.

GREENWAY, F.; LIU, Z.; YU, Y.; GUPTA, A. A clinical trial testing the safety and efficacy of a Standardized Eucommia ulmoides oliver bark extract to treat hypertension Alternative. **Medicine Review**. Vol. 16, p 338-347. 2011.

GROSDIDIER, A.; ZOETE, V.; MICHIELIN, O. EADock: docking of small molecules Into protein active sites with a multiobjective evolutionary optimization. PubMed – **Proteins**. Vol. 67, p 1010-1025, doi:10.1002/prot.21367. 2007.

GROSSE, J.; HEFFRON, H.; BURLING, K.; AKHTER HOSSAIN, M.; HABIB, A. M.; ROGERS, G. J.; RICHARDS, P.; LARDER, R.; RIMMINGTON, D.; ADRIAENSSENS, A. A.; PARTON, L.; POWELL, J.; BINDA, M.; COLLEDGE, W. H.; DORAN, J.; TOYODA, Y.; WADE, J. D.; APARICIO, S.; CARLTON, M.B.; COLL, A. P.; REIMANN, F.; O'RAHILLY, S.; GRIBBLE, F. M. Insulin-like peptide 5 is an orexigenic gastrointestinal hormone. **Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)**. Vol. 111, N° 30, p 11133-11138, DOI: 10.1073/pnas. 1411413111. Electronic publication. 2014.

GRZONKA, Z.; JANKOWSKA, E.; KASPRZYKOWSKI, F.; KASPRZYKOWSKA, R.; LAMKIEWICZ, L.; WICZK, W.; WIECZERZAK, E.; CIARKOWSKI, J.; DRABIK, P.; JANOWSKI, R.; KOZAK, M.; JASKOLSKI, M.; GRUBB, A. Structural studies of cysteine proteases and their inhibitors. **Acta Biochim Polonica**. Vol. 48, N° 1, p 1-20. 2001.

GUPTA, A. K.; GREENWAY, M. F. L.; JOHNSON, W. D. Prehypertension in disease-free adults: a marker for an adverse cardiometabolic risk profile. **Hypertension Research**. Vol. 33, p 905-910. 2010.

GUYENET, P. G. The sympathetic control of blood pressure. **Nature Reviews Neuroscience**. Vol. 7, p 335-346. 2006.

GUYTON, A. C.; COLEMAN, T. G.; COWLEY, A. W.; SCHEEL, K. W.; MANNING, R. D.; NORMAN, R. A. Arterial pressure regulation: Overriding dominance of the kidneys in long-term regulation and in hypertension. **The American Journal of Medicine**. Vol. 52, N° 5, p 584-594. 1972.

GUYTON, A. C. Blood pressure control-special role of the kidneys and body fluids. **Science** (New York/ N.Y.). Vol. 252, p 1813-1816. 1991.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. Tradução da 13ª ed., ISBN: 978-1-4557-7005-2, Ed. Elsevier, SP/SP, p 3333. 2017.

HANSSON, L.; LINDHOLM, L. H.; EKBOM, T.; DAHLÖF, B.; LANKE, J.; WESTER, P. O.; HEDNER, T.; FAIRE, U. Randomized trial of old and new antihypertensive drugs in elderly patients: cardiovascular mortality and morbidity. The Swedish Trial in Old Patients with Hypertension-2 study. **The Lancet**. 354(9192); p 1751-1756. 1999.

HANSSON, L.; LINDHOLM, L. H.; NISKANEN, L.; LANKE, J.; HEDNER, T.; NIKLASON, A.; LUOMANMÄKI, K.; DAHLÖF, B.; FAIRE, U.; MÖRLIN, C.; KARLBERG, B. E.; WESTWE, P. O.; BJÖRCK, J. E. Effect of angiotensin converting enzyme inhibition compared with conventional therapy on cardiovascular morbidity and mortality on hypertension: the Captopril Prevention Project (CAPPP) randomized trial. **The Lancet**. Vol. 353(9153): p 611-616. 1999.

HAYAKARI M.; KONDO, Y.; IZUMI, H. A rapid and simple spectrophotometric assay of angiotensin-converting enzyme. **Analytical Biochemistry**, VOL. 84, pp 361-369. 1978.

HAYNES, J. W.; SMITH, J. W. Longevity of laboratory reared boll weevils (Coleóptero: Curculionidae) offered honey bee-collected pólen and plants unrelated to cotton. **Journal of Entomological Science**. Vol. 27, N° 4, p 366-374. 1992.

HERNÁNDEZ-LEDESMA, B.; HSIEH, C. **Bioactive food peptides in health and disease**. Ed. InTech, 276 p., 2013.

HONDA, D. E.; MARTINS, J. B. L.; VENTURA, M. M.; EYRILMEZ, S. M.; LEPŠÍK, M.; HOBZA, P.; PECINA, A.; FREITAS, S. M. Interface Interactions of the Bowman–Birk Inhibitor BTC1 in a Ternary Complex with Trypsin and Chymotrypsin Evaluated by Semiempirical Quantum Mechanical Calculations. **European Journal of Organic**

Chemistry. p 10. DOI: 10.1002/ejoc.201800754. 2018.

HRUSKA, J. F.; LAW, J. H.; KEZDY, F. J. Differential Titration Of Trypsin-Like Enzymes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. Vol. 36, N° 2, p 272-290. 1969.

IRIGOYEN, M. C.; ANGELIS, K. DE; SCHAAN, D. B.; FIORINO, P.; MICHELINI, L. C. Exercício físico no diabetes melito associado à hipertensão arterial sistêmica. **Revista Brasileira de Hipertensão**. Vol. 10, N° 2, p 109-117. 2003.

IRIGOYEN, M. C.; FIORINO, P.; DE ANGELIS, K.; KRIEGER, E. M. Sistema nervoso simpático e hipertensão arterial: reflexos cardiocirculatórios. **Revista Brasileira de Hipertensão**. Vol. 12, N° 4, p 229-234. 2005.

ITO, S.; GORDON, F. J.; SVED, A. F. Dietary salt intake alters cardiovascular responses evoked from the rostral ventrolateral medulla. **American Journal Physiology**. Vol. 276, p 1600-1607. 1999.

ITO, S.; KOMATSU, K.; TSUKAMOTO, K.; SVED, A. F. Excitatory amino acids in the rostral ventrolateral medulla support blood pressure in spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**. Vol. 35, p 413-417. 2000.

IWANIAK, A.; MINKIEWICZ, P.; DAREWICZ, M. Food-Originating ACE Inhibitors, Including Antihypertensive Peptides, as Preventive Food Components in Blood Pressure Reduction. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**. Vol. 13, p 114-134, DOI: 10.1111/1541-4337.12051. 2014.

IWANIAK, A.; MINKIEWICZ, P.; DAREWICZ, M.; SIENIAWSKI, K.; STAROWICZ, P. BIOPEP database of sensory peptides and amino acids. **Food research international** (Ottawa, Ont.). Vol. 85, p 155-161, DOI:10.1016/j.foodres. 2016.

JOANITTI, G. A.; FREITAS, S. M.; SILVA, L. P. Proteinaceous Protease Inhibitors: Structural Features and Multiple Functional Faces. **Current Enzyme Inhibition**. Vol. 2, N° 3, p 199-217. 2006.

JOANITTI, Graziella A. **Efeitos citostáticos e citotóxicos do inibidor de proteases-BTCI e peptídeos derivados em células de câncer de mama (mcf-7)**. 2008. 102 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) – Instituto de Biologia. Universidade de Brasília, Brasília/DF, 2008.

JOANITTI, G. A.; AZEVEDO, R. B.; FREITAS, S. M. Apoptosis and lysosome membrane permeabilization induction on breast cancer cells by an anticarcinogenic Bowman-Birk protease inhibitor from *Vigna unguiculata* seeds. **Cancer letters**. Vol. 293, pp 73-81. 2010.

JOHN, H. C. Landmarks in understanding the central nervous control of the cardiovascular system. **Experimental Physiology**. N° 92, p 3-18. 2007.

KAISER, E.; COLESCOTT, R. L.; BOSSINGER, C. D.; COOK, P. I. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. **Analytical biochemistry**. Vol. 34, p 595-598. 1970.

KENNEDY, A. R. Cancer prevention by protease inhibitors. **Preventive Medicine**. Vol. 22, N° 5, p 796-811. 1993.

KENNEDY, A. R. Chemopreventive agents: Protease inhibitors. **Pharmacology and Therapeutics**. Vol. 78, p 167-209. 1998.

KENNEY, W. L. WILMORE, J. H.; COSTILL, D. L. **Fisiologia do esporte e do exercício**. 5ª ed., ISBN: 9788520434710. p 644, Ed. Manole, SP/SP. 2013.

KONSTAM, M. A.; NEATON, J. D.; DICKSTEIN, K.; DREXLER, H.; KOMAJDA, M.; MARTINEZ, F. A.; RIEGGER, G. A.; MALBECQ, W.; SMITH, R. D.; GUPTHA, S.; POOLE-WILSON, P. A.; HEAAL INVESTIGATORS. Effects of high-dose versus low-dose losartan on clinical outcomes in patients with heart failure (HEAAL study): a randomised, double-blind trial. **The Lancet**. Vol. 374, p 1840-1848. DOI:10.1016/S0140-6736(09)61913-9. Electronic publication. 2009.

KOYAMA, M.; NARAMOTO, K.; NAKAJIMA, T.; AOYAMA, T.; WATANABE, M.; NAKAMURA, K. Purification and identification of antihypertensive peptides from fermented buckwheat sprouts. **Journal of agricultural and food chemistry**. Vol. 61, p 3013-3021. DOI:10.1021/jf305157y. 2013.

KROWARSCH, D.; CIERPICKI, T.; JELEN, F.; OTLEWSKI, J. Canonical protein inhibitors of serine proteases. **Cellular Molecular Life Science**. Vol. 60, p 2427-2444. 2003.

KUMAR, P.; RAO, A. G. A.; HARIHARAPUTRAN, S.; CHANDRA, N.; GOWDA, L. R. Molecular mechanism of dimerization of Bowman-Birk inhibitors - Pivotal role of Asp(76) in the dimerization. **Journal of Biological Chemistry**. Vol. 279, N° 29, p 30425-30432. 2004.

KUMAR, S.; ENGMAN, L.; VALGIMIGLI, L.; AMORATI, R.; FUMO, M. G.; PEDULLI, G. F. Antioxidant profile of ethoxyquin and some of its S, Se, and Te analogues. **The Journal Organic Chemistry**. Vol. 72, N° 16, p 6046-6055. 2007.

KUNSCH, C.; MEDFORD, R. M. Oxidative stress as a regulator of gene expression in the vasculature. **Circulation Research**. Vol. 85, N° 8, pp 753 – 766. 1999.

LASKOWSKI, M. e KATO, I. Protein inhibitors of proteinases, Department of Chemistry, Purdue University, West Lafayette, Indiana 47907. **Annual Reviews Biochemistry**. Vol. 49, p 593-626. 1980.

LASKOWSKI, M.; QASIM, M. A. What can the structures of enzyme-inhibitor complexes tell us about the structures of enzyme substrate complexes? **Biochimica et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology**. 1477 (1-2), p 324-337. 2000.

LAW, M. R.; MORRIS, J. K.; WALD, N. J. Use of blood pressure lowering drugs in the prevention of cardiovascular disease: meta-analysis of 147 randomised trials in the context of expectations from prospective epidemiological studies. **British Medical Journal** (Clinical Research ed.). Vol. 338, b1665, DOI:10.1136/bmj.b1665. 2009.

LESSA, I. Epidemiologia da hipertensão arterial e insuficiência cardíaca no Brasil. **Revista Brasileira Hipertensão**. Vol. 8, p 383-392. 2001.

LEWINGTON, S.; CLARKE, R.; QIZILBASH, N.; PETO, R.; COLLINS, R. Prospective Studies Collaboration. Age-specific relevance of usual bloodpressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. **The Lancet**. Vol. 361. 2003.

LEWIS, E. J.; HUNSICKER, L. G.; BAIN, R. P.; ROHDE, R. D. The effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition on diabetic nephropathy. The Collaborative Study Group. **The New England Journal of Medicine**. Vol. 329, p 1456-1562. 1993.

LIM, S. S.; VOS, T.; FLAXMAN, A. D.; DANAEI, G.; SHIBUYA, K.; ADAIR-ROHANI, H.; AMANN, M.; ANDERSON, H. R.; ANDREWS, K. G.; ARYEE, M.; ATKINSON, C.; BACCHUS, L. J.; BAHALIM, A. N.; BALAKRISHNAN, K.; BALMES, J.; BARKER-COLLO, S.; BAXTER, A.; BELL, M. L.; BLORE, J. D.; BLYTH, F.; et al. A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. **The Lancet**. Vol. 380(9859): p2224-2260. DOI: 10.1016/S0140-6736(12)61766-8. 2012.

LIMA, A. C. S.; Martins, L. C. G.; LOPES, M. V. O.; ARAÚJO, T. L.; LIMA, F. E. T.; AQUINO, P. S.; MOURA, E. R. F. Influence of hormonal contraceptives and the occurrence of stroke: integrative review. **Revista Brasileira de Enfermagem**. Vol. 70, Nº 3, p 647-655. DOI: 10.1590/0034-7167-2016-0056. 2017.

LINDHOLM, L. H.; IBSEN, H.; DAHLÖF, B.; DEVEREUX, R. B.; BEEVERS, G.; DE FAIRE, U.; FYHRQUIST, F.; JULIUS, S.; KJELDSSEN, S. E.; KRISTIANSSON, K.; LEDERBALLE-PEDERSEN, O.; NIEMINEN, M. S.; OMVIK, P.; OPARIL, S.; WEDEL, H.; AURUP, P.; EDELMAN, J.; SNAPINN, S. Cardiovascular morbidity and mortality in patients with diabetes in the Losartan Intervention for endpoint

reduction in hypertension study (LIFE): a randomized trial against atenolol. **The Lancet**. Vol. 359, p 1004-1010. 2002.

LINDSAY, M. A. Peptide-mediated cell delivery: application in protein target validation. **Current Opinion in Pharmacology**. Vol. 2, N° 5, p 587-594, DOI: 10.1016/S1471-4892(02)00199-6. 2002.

LIU, Y.; CHEN, H.; LIU, D. Mechanistic perspectives of calorie restriction on vascular homeostasis. **Science China Life Science**. Vol. 57, N° 8, p 742-754. 2014.

LOSSO, J. N. The biochemical and functional food properties of the Bowman-Birk inhibitor. **Critical Review of Food Science and Nutrition**. Vol. 48, p 94-118. 2008.

LUBSEN, J.; WAGENER, G.; KIRWAN, B. A.; BROUWER, S.; POOLE-WILSON, P. A. ACTION (A Coronary disease Trial Investigating Outcome with Nifedipine GITS) investigators. Effect of long-acting nifedipine on mortality and cardiovascular morbidity in patients with symptomatic stable angina and hypertension: the ACTION trial. **Journal Hypertension**. Vol. 23, N° 3, p 641-648. 2005.

MAFFUD, C. E.; PICCOLI, J. P.; ERNANDES, J. R.; NAKAIE, C. R.; JUBILUT, G. N. Síntese de Peptídeos, cap. 5, Reações de clivagem ácida de aminoácidos e peptídeos ligados a polímeros: relevância para a metodologia de síntese de peptídeo. **Biotecnologia Aplicada à Agro & Indústria**, pp 173-196. 2016. Disponível em: <http://pdf.blucher.com.br/s3-sa-east1.amazonaws.com/openaccess/9788521211150/05.Pdf> – Acesso: 11/03/2019.

MANSO, M. E. G.; BIFFI, E. C. A.; GERARDI, T. J. Prescrição inadequada de medicamentos a idosos portadores de doenças crônicas em um plano de saúde no município de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**. Vol. 18, p 151-164, DOI: 10.1590/1809-9823.2015.14056. 2015.

MARTINS, Daniella R. **Avaliação do relaxamento vascular induzido por um novo derivado pirazólico protótipo a fármaco (LQFM 021), possível inibidor de fosfodiesterase**. 2012. 89 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás/UFG, Goiânia, 2012.

MARTÍNEZ-MAQUEDA, D.; MIRALLES, B.; RECIO, I.; HERNÁNDEZ-LEDESMA, B. Antihypertensive peptides from food proteins: a review. **Food e Function**, Vol. 3, N° 4, DOI: 10.1039/c2fo10192k, p 350-361. 2012.

MASCIA, M. B.; PAILLER, S.; KRITHIVASAN, R. et al. Protected area downgrading, down-sizing, and degazettement (PADDD) in Africa, Asia, and Latin America and the Caribbean, 1900–2010. **Biological Conservation**. Vol. 169, p 355-361. 2014.

MASSION, P. B.; BALLIGAND, J. L. Modulation of cardiac contraction, relaxation and rate by the endothelial nitric oxide synthase (eNOS): lessons from genetically modified mice. **The Journal of physiology**. Vol. 546, p 63-75. 2003.

MATHIAS, W. Jr.; TSUTSUI, J. M.; ANDRADE, J. L.; KOWATSCH, I.; LEMOS, P. A.; LEAL, S. M.; KHANDHERIA, B. K.; RAMIRES, J. F. Value of rapid beta-blocker injection at peak dobutamine-atropine stress echocardiography for detection of coronary artery disease. PubMed - **Journal of the American College of Cardiology**. Vol. 41, N° 9, p 1583-1589. 2003.

McARDLE, W. D; KATCH, F. I; KATCH, V. L. Consumo de energia humana durante o repouso e a atividade física. **In: Fisiologia do exercício: energia, nutrição e desempenho humano**. 8ª ed., Ed. Guanabara Koogan, RJ/RJ. 2016.

McBRIDE, J. D.; WATSON, E. M.; BRAUER, A. B.; JAULENT, A. M.; LEATHERBARROW, R. J. Peptide mimics of the Bowman-Birk inhibitor reactive site loop. **Biopolymers**. Vol. 66, p 79-92. 2002.

McGURL, B.; MUKHERJEE, S.; MICHAEL, K.; RYAN, C. A. Characterizations of 2 proteinase inhibitor (ATI) CDNAS from alfafa leaves (*Medicago sativa* Var. Vernema) – the expression of ATI genes in response to wounding and soil microorganisms. **Plant Molecular Biology**. Vol. 27, N° 5, p 995-1001. 1995.

MEDICAL RESEARCH COUNCIL WORKING PARTY. MRC trial of treatment of hypertension: principal results. **British Medical Journal**, Vol. 291, p 97-104. 1985.

MEHDAD, A.; BRUMANA, G.; SOUZA, A. A.; BARBOSA, J. A. R. G.; VENTURA, M. M.; FREITAS, S. M. A. Bowman–Birk inhibitor induces apoptosis in human breast adenocarcinoma through mitochondrial impairment and oxidative damage following proteasome 20S inhibition. **Cell Death Discovery**. Vol. 2, N° 15067, p 10. DOI: 10.1038/cddiscovery.2015.67. 2016.

MENEGHETTI, Luisa. **Proteassoma 20S de *Saccharomyces cerevisiae* em complexo com o inibidor de serinoproteases BTCl de *Vigna unguiculata***. 2018. 98 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular) – Programa Biologia Molecular. Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, Brasília/DF, 2018.

MERRIFIELD, R. B. Solid-phase Peptide Synthesis. 3. An Improved Synthesis of Bradykinin. **Biochemistry**. Vol. 3, p 1385-1390. 1964.

MINER-WILLIAMS, W. M.; STEVENS, B. R.; MOUGHAN, P. J. Are intact peptides absorbed from the healthy gut in the adult human?. **Nutrition Research Reviews**. Vol. 27, p 308–329. 2014.

MIZUTA, K.; IKEMOTO, H.; VENTURA, M. M. Redution and Reoxidation of the Sisulfide Bonds of the Black-Eyed Pea Trypsin and Chymotrypsin Inhibitor. **Anais Academia Brasileira de Ciências**. Vol. 54, p 449-456. 1982.

MORAIS, D. Importância das plantas medicinais em terapêutica popular. In: Assembléia Legislativa – Fórum pela vida: projeto plantas vivas. Porto Alegre/RS. 2001.

MOREIRA, S. M.; PAOLA, A. V. **Sociedade Brasileira de Cardiologia**. Livro Texto da Sociedade Brasileira de Cardiologia. 2ª ed., p 780-785. 2015.

MORHY, L. e VENTURA, M. M. The complete amino acid sequence of the *Vigna unguiculata* (L.) Walp. seed trypsin and chymotrypsin inhibitor. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. Vol. 59, pp 71-81. 1987.

MORRISON, J. F. The slow-binding and slow, tight-binding inhibition of enzyme catalyzed reactions. **Trends in Biochemical Sciences**. Vol. 7, p 102–105.1982.

MOZAFFARIAN, D.; BENJAMIN, E. J.; GO, A. S.; ARNETT, D. K.; BLAHA, M. J.; CUSHMAN, M.; DAS, S. R.; FERRANTE, S.; DESPRÉS, J. P.; FULLERTON, H.J. et al. American Heart Association Statistics Committee; Stroke Statistics Subcommittee. Heart disease and stroke statistics-2017: update a report from the American Heart Association. **Circulation**, 133(4):E38-360. DOI: 10.1161/CIR.00000 00000000350. 2016.

MUGESH, G.; DU MONT, W. W.; SIES, H. Chemistry of biologically important synthetic organoselenium compounds. PubMed – **Chemical Reviews**. Vol. 101, N° 7, p 2125-2179. 2001.

MÜLLER, D. N.; DERER, W.; DECHEND, R. Aliskiren–Mode of action and preclinical data. **Journal of Molecular Medicine**. Vol. 86, N° 6, p 659-662. 2008.

MUNIZ, E. C. S.; GOULART, F. C.; LAZARINI, C. A.; MARIN, M. J. S. Análise do uso de medicamentos por idosos usuários de plano de saúde suplementar. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**. Vol, 20, N° 3, RJ/RJ. 2017. Disponível em <http://dx.doi.org/10.1590/1981-22562017020.160111> - Acesso: 20/01/2019

MURPHY, J. B.; KIES, M. W. Note on spectrophotometric determination of proteins in dilute solutions. **Biochimica et Biophysica Acta**. Vol. 45, p 382-384. 1960.

NAKAMURA, Y.; YAMAMOTO, N.; SAKAI, K.; TAKANO, T. Antihypertensive effect of sour milk and peptides isolated from it that are inhibitors to angiotensin I-converting enzyme. **Journal of dairy science**. Vol. 78, N° 6, p 1253-1257, DOI:10.3168/jds.S0022-0302(95)76745-5. 1995. Disponível em: <https://pdf.Sciencedirectassets.com> – Acesso: 19/07/2018.

NATESH, R.; SCHWAGER, S. L.; STURROCK, E. D.; ACHARYA, K. R. Crystal structure of the human angiotensin-converting enzyme-lisinopril complex. **Nature**. Vol. 421, p 551-554, DOI:10.1038/nature01370. 2003.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - U.S.A. Committee on care and use of spontaneous hypertensive rats (SHR). Spontaneous hypertensive rats: guidelines for breeding, care and use. **Institute of Laboratory Animal Resources (ILAR) News**. Vol.19, N° 3, p 1-20, 1976.

NEAL, B.; MACMAHON, S.; CHAPMAN, N. Blood Pressure Lowering Trialists' Collaboration. Effects of ACE inhibitors, calcium antagonists and other blood-pressure-lowering drugs: results of prospectively designed overviews of randomized trials. **The Lancet**, Vol. 356, p 1955-1964. 2000.

NEURATH, H. Proteolytic processing and physiological regulation. **Trends Biochemistry Science**. Vol.14, p 268-271. 1989.

NISHINO, N.; AOYAGI, H.; KATO, T.; IZUMIYA, N. Synthesis and activity of nonapeptide fragments of soybean Bowman-Birk inhibitor. **Springer Nature**, Vol. 31, N° 4, p 410-412. 1975.

NORIOKA, S.; IKENAKA, T. Aminoacid sequence of a trypsin chymotrypsin inhibitor B-III, of peanut (*Arachis hypogaea*). **Journal of Biochemistry**. Vol. 93, N° 2, p 479-485. 1983.

O'BOYLE, N. M.; BANCK, M.; JAMES, C. A.; MORLEY, C.; VANDERMEERSCH, T.; HUTCHISON, G. R. Open Babel: An open chemical toolbox. **Journal of Cheminformatics**. Vol.3, N° 33, DOI:10.1186/1758-2946-3-33. 2011.

ODANI, S.; IKENAKA, T. Studies on soybean trypsin inhibitors. **The Journal of Biochemistry** (Tokyo). Vol. 74, p 697-715. 1973.

ODANI, S.; KOIDE, T.; ONO, T. Wheat-germ trypsin inhibitors – isolation and structural characterization of single-headed and double headed inhibitors of the bowman-birk type. **Journal of Biochemistry**. Vol. 100, N° 4, p 975-983. 1986.

OKAMOTO, K.; AOKI, K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. **Japanese Circulation Journal**. Vol. 27, p 282-293. DOI: 10.1253/jcj.27.282. 1963.

OLIVEIRA, Sandrielle A. **Síntese e caracterização de sistemas nanoestruturados contendo o inibidor de proteinases e peptídeos derivados**. 2012. 108 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular) – Programa Biologia Molecular. Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, Brasília/DF, 2012.

OLIVEIRA-SALES, E. B.; TOWARD, M. A.; CAMPOS, R. R.; PATON, J. F. Revealing the role of the autonomic nervous system in the development and maintenance of Goldblatt hypertension in rats. **Autonomic Neuroscience**. Vol. 183, p 23-29. DOI: 10.1016/j.autneu.2014.02.001. 2014.

ONDETTI, M. A.; RUBIN, B.; CUSHMAN, D. W. Design of specific inhibitors of angiotensin-converting enzyme: new class of orally active antihypertensive agents. **Science**. Vol. 196, p 441-444. 1977.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). **World Health Day**. A global briefing on hypertension, p 40. 2013.

OYAMA, N.; YAGITA, Y.; SASAKI, T.; OMURA-MATSUOKA, E.; TERASAKI, Y.; SUGIYAMA, Y.; SAKODA, S.; KITAGAWA, K. An angiotensin II type 1 receptor block can preserve endothelial function and attenuate brain ischemic damage in spontaneously hypertensive rats. **Journal Neuroscience Research**. Vol. 88, p 2889-2898. 2010.

PALANISAMY D.; FANFRLÍK, J.; BRONOWSKA, A. K.; ŘEZÁČ, J.; PŘENOSIL, O.; KONVALINKA, J.; HOBZA, P. Quantum Chemistry-based Docking and Scoring for Design of Protein Kinase Inhibitors. **The Journal of Physical Chemistry B**. Vol. 114, p 12666-12678. 2010.

PAPADEMETRIOU, V.; FARSANG, C.; ELMFELDT, D.; HOFMAN, A.; LITHELL, H.; OLOFSSON, B.; SKOOG, I.; TRENKWALDER, P.; ZANCHETTI, A. Study on Cognition and Prognosis in the Elderly study group. Stroke prevention with the angiotensin II type-1 receptor blocker candesartan in elderly patients with isolated systolic hypertension: the Study on Cognition and Prognosis in Elderly (SCOPE). **Journal of the American College of Cardiology**. Vol. 44, p 1175-1180. 2004.

PARK, E. Y.; KIM, J. A.; KIM, H. W.; KIM, Y. S.; SONG, H. K. Crystal structure of the Bowman-Birk inhibitor from barley seeds in ternary complex-with porcine trypsin. **Journal of Molecular Biology**. Vol. 343, N^o 1, p 173-186. 2004.

PEACH, M. J. Renin-angiotensin system: biochemistry and mechanisms of action. **Physiological reviews**. Vol. 57, p 313-370, DOI:10.1152/physrev.1977.57.2.313. 1977.

PECINA, A.; MEIER, R.; FANFRLÍK, J.; LEPŠÍK, M.; ŘEZÁČ, J.; HOBZA, P.; BALDAUF, C. The SQM/COSMO filter: reliable native pose identification based on the quantum-mechanical description of protein–ligand interactions and implicit COSMO solvation†. **Chemical Communications**. Vol. 52, p 3312-3315. 2016.

PECINA, A.; BRYNDA, J.; VRZAL, L.; GNANASEKARAN, R.; HOŘEJŠÍ, M.; EYRILMEZ, S. M.; ŘEZÁČ, J.; LEPSÍK, ŘEZÁČOVÁ, M.; P.; HOBZA, P.; MAJER, P.;

VEVERKA, V.; FANFRLÍK, J. Ranking Power of the SQM/COSMO Scoring Function on Carbonic Anhydrase II-Inhibitor Complexes. **ChemPhysChem**. Vol. 19, N° 7, p 873-879, DOI: 10.1002/cphc.201701104. 2018.

PEDERSEN, M. E.; COCKCROFT, J. R. The vasodilatory beta-blockers. **Current Hypertension Reports**. Vol. 9, N° 4, p 269-277. 2007.

PERKTOLD, K.; FLORIAN, H.; HILBERT, D. Analysis of pulsatile blood flow: A carotid siphon model. **Journal of Bio-medical Engineering**. Vol. 9, p 46-53. 1987.

PINHEIRO, Cristiano G. A. **Interações moleculares de peptídeos com membranas fosfolipídicas**. 2009. 71 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular) – Programa Biologia Molecular. Instituto de Biologia. Universidade de Brasília, Brasília/DF, 2009.

PINTO, Alexandra A. S. **Inibidores da Renina - Uma Nova Opção Terapêutica**. 2013. 66 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Fernando Pessoa, Cidade do Porto/Portugal., 2013.

POMPER MAYER, P.; LOPES, A. R.; TERRA, W. R.; PARRA, J. R. P.; FALCO, M. C.; SILVA-FILHO, M. C. Effects of soybean proteinase inhibitor on development, survival and reproductive potential of the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**. Vol. 99, N° 1, p 79-85. 2001.

POWERS, J. C.; ASGIAN, J. L.; EKICI, O. D.; JAMES, K. E. Irreversible inhibitors of serine, cysteine, and threonine proteases. **Chemical Reviews**. Vol.102, N° 12, p 4639-4750. 2002.

POWERS, S. K.; HOWLEY, E. T. **Fisiologia do exercício: teoria e aplicação ao condicionamento físico e ao desempenho**. 9ª ed., Ed. Manole, SP/SP. 2017.

PROGRESS COLLABORATIVE GROUP. Randomized trial of a perindopril-based-blood pressure-lowering regimen among 6,105 individuals with previous stroke or transient ischaemic attack. **The Lancet**. Vol. 35, p 1033-1041. 2001.

RAKWAL, R.; AGRAWAL, G. K.; JWA, N. S. Characterization of a rice (*Oryza sativa* L.) Bowman-Birk proteinase inhibitor: tightly light regulated induction in response to cut, jasmonic acid, ethylene and protein phosphatase 2A inhibitors. **Gene**. 263 (1-2), p 189-198. 2001.

RAO, K. N.; SURESH, C. G. Bowman-Birk protease inhibitor from the seeds of *Vigna unguiculata* forms a highly stable dimeric structure. **Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics**. 1774, p 1264-1273. 2007.

RAWLINGS, N. D.; TOLLE, D. P.; BARRETT, A. J. Evolutionary families of peptidase

inhibitors. **Biochemistry Journal**. Vol. 378, p 705-716. 2004.

REBOLDI, G.; ANGELI, F., CAVALLINI, C.; GENTILE, G.; MANCIA, G.; VERDECCHIA, P. Comparison between angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin receptor blockers on the risk of myocardial infarction, stroke and death: a meta-analysis. **Journal Hypertension**. Vol. 26, N° 7, p 1282-1289. 2008.

RESENDE, Jarbas Magalhães. **Estudos estruturais e das interações com membranas de peptídeos antimicrobianos por RMN em solução e em fase sólida. Análise conformacional e cálculos *ab-initio* de tensores de blindagem**. 2008. 179 f. Tese (Doutorado em Ciências – Química) - Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte/MG 2008.

REVISTA BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO. Vol. 24, N° 1, p 12-17, 2017.

ŘEZÁČ, J.; HOBZA, P. J. **Chemical Theory and Computation**. Vol. 8, p 141-151. 2012.

RICHARDSON, M. Proteinase-inhibitors of plants and microorganisms. **Phytochemistry**. Vol. 16, N° 2, p 159-169. 1977.

RICHARDSON, M. Protein inhibitors of enzymes. **Food Chemistry**. Vol. 6, p 235-253. 1981.

RODRIGUEZ-ITURBE, B.; VAZIRI, N. D. Salt-sensitive hypertension—update on novel findings. **Nephrology Dialysis Transplantation**, Vol. 22, p 992–995. DOI: 10.1093/ndt/gfl757. 2007.

ROHRMEIER, T.; LEHLE, L. WIP1 A wound inducible gene from Maize with homology to bowman birk proteinase inhibitors. **Plant Molecular Biology**. Vol. 22, N° 5, p 783-792. 1993.

SACKS, F. M.; SVETKEY, L. P.; VOLLMER, W. M.; APPEL, L. J.; BRAY, G. A.; HARSHA, D.; OBARZANEK, E.; CONLIN, P.R.; MILLER, E. R. 3rd; SIMONS-MORTON, D.G.; KARANJA, N.; LIN, P. H.; DASH-Sodium Collaborative Research Group. Effects on blood pressure of reduced dietary sodium and the dietary approaches to stop hypertension (DASH) diet. DASH-Sodium collaborative research group. **The New England Journal of Medicine**. Vol. 344, N° 1, p 3-10. DOI: 10.1056/NEJM200101043440101. 2001.

SAFAVI, F.; ROSTAMI, A. Role of serine proteases in inflammation: Bowman-Birk protease inhibitor (BBI) as a potential therapy for autoimmune diseases. **Experimental and Molecular Pathology**. Vol. 93, N° 3, p 428-433. DOI: 10.1016/j.yexmp.2012.09.014. 2012.

SAMPATH, A.; PADMANABHAN, R. Molecular targets for flavivirus drug discovery. **Antiviral Research**. Vol. 81, p 124-132. 2008.

SANJULIANI, A. F. Pré-hipertensão e risco cardiovascular global. **Revista Brasileira Hipertensão**, Vol.16, N° 2, p 103-107, 2009.

SANJULIANI, A. F.; NEVES, M. F. T.; OIGMAN, W. Hipertensão arterial. **Revista do HUPE – Brazilian Journal of Health and Biomedical Sciences**. Vol. 10, N° 3. 2011.

SAÚDE BRASIL 2018 – Uma análise da situação de saúde e das doenças e agravos crônicos: desafios e perspectivas, cap. 4, p 76. **Ministério da Saúde**. Brasília/DF. 2019.

SCHECHTE, I.; BERGER, A. On size of active site in proteases .i. Papain. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. Vol. 27, N° 2, p 157-167. 1967.

SCHER, A. Textbook of physiology, circulation, respiration, body fluids, metabolism, and endocrinology. **W. B. Saunders Company** (Philadelphia). p 972-990. 1989.

SCHIEDECK, G. Aproveitamento da biodiversidade regional de plantas bioativas para a sustentabilidade dos agricultores de base ecológica na região sul do RS. Projeto de Pesquisa do Macroprograma 6 – Apoio ao Desenvolvimento da Agricultura Familiar e à Sustentabilidade do Meio Rural. **EMBRAPA Clima Temperado**. Pelotas/RS. 2006.

SCHRADER, J.; LÜDERS, S.; KULSCHEWSKI, A.; BERGER, J.; ZIDEK, W.; TREIB, J.; EINHÄUPL, K.; DIENER, H. C.; DOMINIAK, P. on behalf of the ACCESS Study Group. Evaluation of acute candesartan cilexetil therapy in stroke survivors. **Stroke**. Vol. 34, p 1699-1703, DOI: 10.1161/01.STR.0000075777.18006.89. 2003.

SCHWARZE, S. R., DOWDY, S. F. *In vivo* protein transduction: intracellular delivery of biologically active proteins, compounds and DNA. **Trends in Pharmacological Sciences**. Vol. 21, p 45-48. 2000.

SCHWYZER, R.; SIEBER, P. Total Synthesis of Adrenocorticotrophic Hormone. **Nature**. Vol. 199, p 172-174. 1963.

SHARONY, R.; Y. P.; PARK J; GALLOWAY A. C.; MIGNATTI, P.; PINTUCCI, G. Protein targets of inflammatory serine proteases and cardiovascular disease. **Journal of Inflammation** (Lond). Vol. 7, N° 45, p 17, DOI: 10.1186/1476-9255-7-45. 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2936362/pdf/1476-9255-7-45.pdf> - Acesso: 23/06/2018.

SHEN, W.; MATSUI, T. Current knowledge of intestinal absorption of bioactive peptides. **Food & Function**. Vol. 8, p 4306–4314. 2017.

SHUKLA, S. K.; GUPTA, S.; OJHA, S. K.; SHARMA, S. B. Cardiovascular friendly natural products: a promising approach in the management of CVD. **Natural Product Research**. Vol. 24, N° 9, p 873-898. 2010.

SILVA, L. P.; LEITE, J. R. S. A.; BLOCH Jr. C.; FREITAS, S. M. Thermal stability of a black eyed pea trypsin/chymotrypsin inhibitor (BTCI). **Protein & Peptide Letters**. Vol. 8, p 397-401. DOI: 10.2174/0929866013409715. 2001.

SILVA, L. P.; AZEVEDO, R. B.; MORAIS, P. C.; VENTURA, M. M.; FREITAS, S. M. Oligomerization states of Bowman-Birk inhibitor by atomic force microscopy and computational approaches. **Proteins: Structure, Function and Bioinformatics**. 15;61(3) p 642-648. 2005.

SITE: www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=10116 - Acesso: 10/10/2019.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA – SBC. 7ª Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial, capítulos 1 e 7. Arquivos Brasileiros de Cardiologia. **Revista Brasileira de Cardiologia**. Vol. 107, N° 3, supl. 3. 2016. Disponível em: http://publicacoes.cardiol.br/2014/diretrizes/2016/05_HIPERTENSAO_ARTERIAL.pdf - Acesso: 30/07/2018.

SOUZA, Larissa da C. **Associação entre o proteassoma e o inibidor de protease btcI: caracterização físico-química e efeitos moleculares em células de câncer de mama (MCF-7)**. 2010. 123 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular) – Programa Biologia Molecular. Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, Brasília/DF, 2010.

SOUZA, A. P.; SOBRINHO, D. B.; ALMEIDA, J. F.; ALVES, G. M.; MACEDO, L. M.; PORTO, J. E.; VÊNIO, E. F.; COLUGNATI, D. B.; SANTOS, R. A.; FERREIRA, A. J.; MENDES, E. P.; CASTRO, C. H. Angiotensin II type 1 receptor blockade restores angiotensin-(1-7)-induced coronary vasodilation in hypertrophic rat hearts. **Clinical science** (London, England), Vol. 125, N° 9, p 449-459, DOI: 10.1042/CS20120519, 2013.

SOUZA, L. C.; CAMARGO, R.; DEMAS, M.; SANTANA, J. M.; SÁ, C. M.; FREITAS, S. M. Effects of an Anticarcinogenic Bowman-Birk Protease Inhibitor on Purified 20S Proteasome and MCF-7 Breast Cancer Cells. PubMed. **PLOS ONE**. Vol. 9, N° 1:e86600, p 10. DOI: 10.1371/journal.pone.0086600. eCollection 2014. 2014.

STASSEN, J. A.; FAGARD, R.; THIJS, L. Randomized double-blind comparison of placebo and active treatment for older patients with isolated systolic hypertension.

The Systolic hypertension in Europe (SYST-EUR). **The Lancet**, Vol. 350, p 757-764. 1997.

STEWART, J. J. P. **MOPAC** (Molecular Orbital PACKage) semiempirical quantum chemistry program based on Dewar and Thiel's NDDO approximation. 2016, 000-000. Disponível em: <http://openmopac.net> - Acesso: 26/11/2019.

STRAUSS, M. H.; LONN, E. M.; VERMA, S. Is the jury out? Class specific differences on coronary outcomes with ACE-Inhibitors and ARBs: insight from meta-analysis and the Blood Pressure Lowering Treatment Trialist Collaboration. **European Heart Journal**. Vol. 26, p 2351-2353. 2005.

SUZUKI, A.; YAMANE, T.; ASHIDA, T.; NORIOKA, S.; HARA, S.; IKENAZKA, T. Crystallographic refinement of Bowman-Birk type protease inhibitor A-II from peanut at 2,3 angstrom resolution. **Journal of Molecular Biology**. Vol. 234, N° 3, p 722-734. 1993.

TAMARGO, J.; DUARTE, J.; RUILOPE, L. M. New antihypertensive drugs under development. **Current medicinal chemistry**. Vol. 22, p 305-342. 2015.

TAN, Z. Y.; LU, Y.; WHITEIS, C. A.; SIMMS, A. E.; PATON, J. F.; CHAPLEAU, M. W. et al. Chemoreceptor hypersensitivity, sympathetic excitation, and overexpression of ASIC and TASK channels before the onset of hypertension in SHR. **Circulation Research**. Vol.106, p 536-545, DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.109.206946. 2010.

TANAKA, A. S.; SAMPAIO, M. U.; MENTELE, R.; AUERSWALD, E. A.; SAMPAIO, C. A. M. Sequence of a new Bowman-Birk inhibitor from *Torresea acreana* seeds and comparison with *Torresea cearensis* trypsin inhibitor (TcTI2). **Journal of Protein Chemistry**. Vol. 15, N° 6, p 553-560. 1996.

THE ONTARGET INVESTIGATORS. Telmisartan, Ramipril, or Both in Patients at High Risk for Vascular Events. **The New England Journal of Medicine**. DOI: 10.1056/NEJMoa0801317. 2008.

The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. National High Blood Pressure Education Program. Bethesda (MD): National Heart, Lung, and Blood Institute (US). Report. N° 04-5230. 2004.

THE WISTAR INSTITUTE: History. **The Wistar Institute**. 2007. Disponível em: www.ncbi.nlm.nih.gov.

TIFFIN, P.; GAUT, B. S. Molecular evolution of the wound-induced serine protease inhibitor wip1 in *Zea* and related general. **Molecular Biology and Evolution**. Vol. 18, N° 11, p 2092-2101. 2001.

TIKHONOVA, T. V.; GLADYSHEVA, I. P.; KAZANSKAYA, N. F.; LARIONOVA, N. I. Hydrolysis of elastin by human-leukocyte elastase and cathepsin-g - inhibition by Bowman-Birk-type soybean inhibitor. **Biochemistry-Moscow**. Vol. 59, N° 11, p 1295-1299. 1994.

TOMASSONI, D.; TRAINI, E.; VITAIOLI, L.; AMENTA, F. Morphological and conduction changes in the sciatic nerve of spontaneously hypertensive rats. **Neuroscience Letters**. Vol. 362, p 131-135. 2004.

TOROK, J. Participation of nitric oxide in different models of experimental hypertension. **Physiological research**. Vol. 57, p 813-825. 2008.

TOUIL, T.; CIRIC, B.; VENTURA, E.; SHINDLER, K. S.; GRAN, B.; ROSTAMI, A. Bowman-Birk inhibitor suppresses autoimmune inflammation and neuronal loss in a mouse model of multiple sclerosis. **Journal of the Neurological Sciences**. 271 (1-2), p 191- 202. 2008.

TRINDADE, N. R.; LOPES, P. R.; NAVES, L. M.; FAJEMIROYE, J. O.; ALVES, P. H.; AMARAL, N. O.; LIÃO, L. M.; REBELO, A. C. S.; CASTRO, C. H.; BRAGA, V. A.; MENEGATTI, R. M.; PEDRINO, G. R. The Newly Synthesized Pyrazole Derivative 5-(1-(3 Fluorophenyl)-1H- Pyrazol-4-yl)-2H-Tetrazole Reduces Blood Pressure of Spontaneously Hypertensive Rats via NO/cGMP Pathway. **Frontiers in Physiology**. Vol. 9, N° 1073, p 10, DOI: 10.3389/fphys.2018.01073. 2018.

TRIPPODO, N. C.; FROHLICH, E. D. Similarities of genetic (spontaneous) hypertension. Man and rat. **Circulation research**. Vol. 48, N° 3, p 309–319. 1981.
VENTURA, M. M.; XAVIER-FILHO, J. Trypsin and chymotrypsin inhibitor from black-eyed pea (*V. Sinensis* L.) I. Purification and partial characterization. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. Vol. 38 (3-4), p 553–566. 1966.

VENTURA, M. M.; XAVIER-FILHO, J.; MOREIRA, R. A.; AQUINO, A. M.; Pinheiro, P. A. A trypsin and chymotrypsin inhibitor from black-eyed pea (*Vigna sinensis* L.). II. Further studies on its characterization and a reevaluation of earlier results. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. Vol. 43, N° 1, p 233–242. 1971.

VENTURA, M. M.; MARTIN, C. O.; MORHY, L. A trypsin and chymotrypsin inhibitor from black eyed pea (*Vigna sinensis* L.). VI. Isolation and properties of complexes with trypsin and chymotrypsin. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. Vol. 47, pp 335-346. 1975.

VENTURA, M. M.; MIZUTA, K.; IKEMOTO, H. Self-association of the black-eyed pea trypsin and chymotrypsin inhibitor in solution—a study by light-scattering. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. Vol. 53, pp 195–201, 1981.

VENTURA, M. M.; MIZUTA, K.; IKEMOTO, H. Solvent perturbation and surface accessibility of the tryptophyl and tyrosyl groups in black-eyed pea trypsin and

chymotrypsin inhibitor. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. Vol. 56, pp 217-220, 1984.

WEBER, M. A.; SCHIFFRIN, E. L.; WHITE, W. B.; MANN, S.; LINDHOLM, L. H.; KENERSON, J. G.; FLACK, J. M.; CARTER, B. L.; RAM, C. V.; COHEN, D. L. et al.. Clinical practice guidelines for the management of hypertension in the community: a statement by the American Society of Hypertension and the International Society of Hypertension. **Journal of Clinical Hypertension**. Vol. 16, N° 1, p 14-26. DOI: 10.1111/jch.12237. 2014.

WERNER, M. H.; WEMMER, D. E. 3-dimensional structure of soybean trypsin chymotrypsin bowman-birk inhibitor in solution. **Biochemistry**. Vol. 31, N° 4, p 999-1010. 1992.

WHITE, W. B. Angiotensin-converting enzyme inhibitors in the treatment of hypertension: an update. **The Journal of Clinical Hypertension** (Greenwich). Vol. 9, N° 11, p 876-882. 2007. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17978595> - Acesso: 30/07/2018.

WINTERS, E.; PIZZOL, C.; FILLIPIN-MONTEIRO, F. B.; BRONDANI, P.; SILVA, A. M. P. W.; SILVA, A. H.; BONACORSO, H. G.; MARTINS, M. A. P.; ZANATTA, N.; CRECZYNSKI-PASA, T. B. Antitumoral activity of a trichloromethyl pyrimidine analogue: molecular cross-talk between intrinsic and extrinsic apoptosis. **Chemical Research in Toxicology**. Vol. 27, N° 6, pp 1040-1049. 2014.

WOOD, J. M.; MAIBAUM, J.; RAHUEL, J.; GRÜTER, M. G.; COHEN N. C.; RASETTI, V.; RÜGER, H.; GÖSCHKE, R.; STUTZ, S.; FUHER, W.; SCHILLING, W.; RIGOLLIER, P.; YAMAGUCHI, Y.; CUMIN, F.; BAUM, H. P.; SCHNELL, C. R.; HEROLD, P.; MAH, R.; JENSEN, C.; O'BRIEN, E.; STANTON, A.; BEDIGIAN, M. P. Structure-based design of aliskiren, a novel orally effective renin inhibitor. **Biochemical of Biophysical Research Communications**. Vol. 308, N° 4, p 698-705. 2003. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12927775> – Acesso: 31/07/2018.

WRÓBLEWSKA, M.; KASPRZYK, J.; SĄCZEWSKI, F.; KORNICKA, A.; BOBLEWSKI, K.; LEHMANN, A.; RYBCZYŃSKA, A.; Marsanidine and 7-Me-marsanidine, the new hypotensive imidazolines augment sodium and urine excretion in rats. **Pharmacological Reports**, Vol. 65, N° 4, p 1025-1032. 2013.

WUERZNER, G.; AZIZI, M. Renin inhibition with aliskiren. **Clinical and Experimental Pharmacol Physiology**. Vol. 35, N° 4, p 426-430. 2008.

XAVIER-FILHO, J.; CAMPOS, F. A. P. Proteinase inhibitors. In: CHEEK, P. R. Toxicants of plant origin. Boca Raton: CRC Press. Vol. 3, p 1-27. 1989.

XAVIER-FILHO, J. The biological roles of serine and cysteine proteinase inhibitors in plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**. Vol. 4, N° 1, p 1-6. 1992.

YAMORI, Y. The development of Spontaneously Hypertensive Rat (SHR) and of various spontaneous rat models, and their implications. **In: Handbook of Hypertension**. Vol. 4. Experimental and genetic models of hypertension. Jong W, ed. Amsterdam, New York, Oxford: Elsevier, p 224-239, 1984.

YANG, H. Y.; YANG, S. C.; CHEN, J. R.; TZENG, Y. H.; HAN, B. C.. Soyabean protein hydrolysate prevents the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. **British Journal of Nutrition**. Vol. 92, N° 3, p 507-512. 2004.

YANG, R.; ZOU, Y.; YU, N.; GU, Z. Accumulation and identification of angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides from wheat germ. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Vol. 59, N° 8, p 3598–3605. 2011.

ZAGO, A. S.; ZANESCO, A. Nitric oxide, cardiovascular disease and physical exercise. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* - **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. Vol. 87, p 264-270. 2006. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/26516> – Acesso: 10/05/2018.

ZHANG, Y.; KOUZUMA, Y.; MIYAJI, T.; YONEKURA, M. Purification, characterization, and cDNA cloning of a Bowman-Birk type trypsin inhibitor from *Apios americana* Medikus tubers. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**. Vol. 72, N° 1, p 171-178. DOI: 10.1271/bbb.70531. 2008.

ZHANG, Y. H.; JIN, C. Z.; JANG, J. H.; WANG, Y. Molecular mechanisms of neuronal nitric oxide synthase in cardiac function and pathophysiology. **The Journal of physiology** (London). Vol. 592, N° 15, p 3189–3200, DOI:10.1113/jphysiol.2013.270306. 2014.

ZILE, M. R. New concepts in diastolic dysfunction and diastolic heart failure: part II: causal mechanisms and treatment. **Circulation**. Vol. 105, p 1503-1508. DOI: 10.1161/hc1202.105290. 2002.

ZIV, E.; BENDAYAN, M. Intestinal absorption of peptides through the enterocytes. **Microscopy Research and Technique**. Vol. 49, p 346–352. 2000.

ANEXO 1

Tabela 2: Média padrão das variáveis hemodinâmicas PAM, PAS e PAD utilizando SF (0,9%) e BTCl (30,0 mg/Kg), em escala temporal de 360 minutos, via gavagem, em ratos WR (n=6) - ANOVA (two way).

BTCl (30.0 mg/Kg); SF (0,9%)						
TEMPO (minutos)	PAM (mmHg)		PAS (mmHg)		PAD (mmHg)	
	BTCl	SF	BTCl	SF	BTCl	SF
Basal1 =-10	107.4 ±2.4	111.7 ±0.9	140.0 ±1.5	142.6 ±1.0	91.1 ±3.1	96.2 ±1.3
Basal 2 = 0	107.7 ±2.3	111.6 ±0.8	140.1 ±1.3	142.3 ±1.1	91.5 ±3.0	96.3 ±1.3
30	95.3 ±2.4	107.5 ±1.7	129.2 ±1.9	141.1 ±2.4	78.3 ±3.1	91.6 ±2.1
60	93.5 ±4.3	112.9 ±2.7	126.5 ±4.1	146.3 ±3.0	77.1 ±4.7	96.1 ±2.5
90	74.6 ±3.6	112.0 ±4.4	107.0 ±3.6	145.2 ±4.7	58.2 ±3.7	95.6 ±4.3
120	70.9 ±5.3	107.1 ±3.2	102.0 ±6.3	141.2 ±3.6	55.3 ±4.9	90.1 ±3.0
150	70.5 ±2.7	107.5 ±3.6	103.1 ±3.0	141.8 ±3.5	54.2 ±2.7	90.3 ±3.7
180	67.6 ±4.1	108.7 ±3.1	99.7 ±5.4	143.0 ±2.9	51.7 ±3.5	91.7 ±3.3
210	71.7 ±4.4	108.1 ±3.1	105.6 ±5.6	142.7 ±3.4	54.7 ±3.8	90.8 ±3.0
240	71.6 ±5.9	108.8 ±2.8	103.6 ±6.5	141.6 ±3.0	55.8 ±5.8	92.3 ±2.8
270	70.4 ±3.0	107.8 ±2.2	105.8 ±4.2	142.3 ±2.2	52.7 ±2.7	90.8 ±2.1
300	69.8 ±2.9	109.3 ±3.9	105.2 ±3.4	145.4 ±4.0	52.0 ±3.1	91.2 ±3.8
330	72.9 ±3.7	106.8 ±4.1	110.4 ±4.0	142.2 ±4.2	54.2 ±3.7	89.1 ±4.1
360	72.9 ±4.1	108.7 ±4.1	109.4 ±4.2	143.2 ±4.2	54.5 ±4.3	91.6 ±4.1

±EPM

Tabela 3: Média padrão das variáveis hemodinâmicas PAM, PAS e PAD utilizando SF (0,9%) e BTCl (30,0 mg/Kg), em escala temporal de 360 minutos, via gavagem, em ratos SHR (n=6) – ANOVA (two way).

BTCl (30 mg/Kg); SF (0.9%)						
TEMPO (minutos)	PAM (mmHg)		PAS (mmHg)		PAD (mmHg)	
	BTCl	SF	BTCl	SF	BTCl	SF
Basal 1=-10	140.2 ±2.4	137.7 ±1.8	175.4 ±2.9	177.0 ±3.2	121.3 ±2.7	118.0 ±2.0
Basal 2=0	140.3 ±2.5	137.6 ±2.0	175.4 ±2.5	177.0 ±3.3	121.4 ±3.0	117.8 ±2.1
30	106.9 ±9.0	136.1 ±1.4	145.2 ±8.5	179.8 ±2.5	90.3 ±11.3	114.4 ±2.0
60	94.9 ±5.8	133.3 ±2.3	134.3 ±6.3	176.8 ±3.6	76.2 ±7.1	109.7 ±3.3
90	91.4 ±6.6	132.9 ±1.6	130.0 ±7.5	177.6 ±2.8	72.4 ±7.7	110.6 ±2.0
120	88.4 ±7.5	132.1 ±2.2	128.6 ±8.6	174.2 ±2.3	70.6 ±8.5	111.0 ±2.8
150	88.7 ±5.3	131.1 ±2.6	129.5 ±5.8	174.6 ±2.5	70.3 ±6.0	109.2 ±3.3
180	82.6 ±2.0	129.9 ±2.9	121.6 ±2.4	173.7 ±3.4	64.4 ±2.4	108.0 ±3.1
210	77.7 ±3.7	127.4 ±3.6	113.3 ±4.8	171.0 ±3.8	59.9 ±4.1	105.5 ±4.0
240	83.5 ±6.1	128.4 ±3.2	122.2 ±7.5	171.8 ±4.5	65.8 ±6.6	107.1 ±3.3
270	85.8 ±3.4	126.2 ±3.2	127.9 ±3.7	172.6 ±3.9	66.7 ±3.4	103.0 ±3.3
300	86.9 ±4.2	124.8 ±3.1	130.7 ±5.2	172.8 ±4.0	65.3 ±5.1	100.7 ±3.1
330	88.6 ±2.9	123.6 ±3.8	133.3 ±2.9	171.5 ±4.3	66.8 ±4.0	99.7 ±3.7
360	86.2 ±2.9	123.1 ±4.0	130.1 ±2.9	172.6 ±5.2	62.7 ±5.2	98.6 ±3.7

±EPM

Tabela 4: Média padrão das variáveis cardiovasculares FC, FSR e FSA utilizando SF (0,9%) e BTCl (30,0 mg/Kg), em escala temporal de 360 minutos, via gavagem, em ratos WR (n=6) - ANOVA (*two way*).

TEMPO (minutos)	BTCl (30.0 mg/Kg); SF (0,9%)					
	FC (bpm)		FSR (%)		FSA (%)	
	BTCl	SF	BTCl	SF	BTCl	SF
Basal 1 = -10	368.6 ±19.1	375.4 ±12.0	100.0 ±0.0	100.0 ±0.0	100.0 ±0.0	100.0 ±0.0
Basal 2 = 0	370.1 ±19.4	380.7 ±13.4	100.5 ±0.5	99.6 ±0.4	100.0 ±0.3	100.3 ±0.3
30	366.7 ±15.5	361.4 ±7.5	108.7 ±2.6	86.0 ±2.5	104.2 ±2.3	97.7 ±1.4
60	356.3 ±15.8	361.0 ±14.5	115.1 ±5.7	85.6 ±4.9	103.0 ±2.9	94.6 ±2.4
90	333.9 ±11.9	345.0 ±19.3	115.6 ±8.8	87.8 ±5.1	96.3 ±3.2	91.7 ±3.7
120	328.5 ±10.6	340.9 ±17.3	111.8 ±9.6	93.2 ±5.3	94.6 ±6.4	92.5 ±3.2
150	332.7 ±11.2	344.2 ±19.2	114.8 ±12.5	100.4 ±6.1	95.8 ±4.2	93.3 ±2.4
180	334.2 ±10.8	349.9 ±12.5	109.9 ±10.7	96.8 ±5.2	93.8 ±4.3	95.1 ±3.6
210	350.7 ±15.5	354.9 ±18.6	114.3 ±12.5	94.4 ±3.0	93.5 ±8.7	98.4 ±2.1
240	352.5 ±16.7	355.6 ±18.9	104.2 ±16.5	99.2 ±4.3	87.9 ±9.4	97.3 ±1.4
270	355.6 ±12.2	348.2 ±20.6	100.4 ±19.4	100.6 ±2.5	82.5 ±10.5	99.0 ±1.9
300	354.7 ±14.3	359.7 ±18.5	93.4 ±19.6	97.9 ±2.8	78.4 ±11.5	95.1 ±2.1
330	360.5 ±16.2	369.8 ±16.8	91.4 ±20.5	98.4 ±3.6	75.1 ±12.4	94.9 ±1.6
360	359.3 ±17.4	358.8 ±21.7	92.7 ±20.5	97.9 ±3.3	73.8 ±12.9	95.1 ±1.4

± EPM

Tabela 5: Média padrão das variáveis cardiovasculares FC, FSR e FSA utilizando SF (0,9%) e BTCl (30,0 mg/Kg), em escala temporal de 360 minutos, via gavagem, em ratos SHR (n=6) – ANOVA (*two way*).

TEMPO (minutos)	BTCl (30.0 mg/Kg); SF (0,9%)					
	FC (bpm)		FSR (%)		FSA (%)	
	BTCl	SF	BTCl	SF	BTCl	SF
Basal 1 = -10	375.1 ± 8.0	378.9 ±9.7	100.0 ±0.0	100.0 ±0.0	100.0 ±0.0	100.0 ±0.0
Basal 2 = 0	375.9 ±8.1	377.9 ±10.4	100.8 ±0.4	99.8 ±0.6	100.6 ±0.2	99.8 ±0.2
30	350.2 ±9.3	368.9 ±6.4	96.0 ±6.1	86.6 ±6.4	98.8 ±2.2	92.1 ±2.2
60	346.6 ±7.9	362.1 ±12.0	93.7 ±6.8	88.8 ±6.4	97.9 ±3.4	94.5 ±3.8
90	351.9 ±4.2	363.2 ±10.1	100.0 ±7.7	93.0 ±5.1	101.6 ±6.0	99.8 ±5.1
120	351.6 ±9.4	367.2 ±9.2	103.8 ±9.5	93.4 ±5.7	102.2 ±6.5	97.9 ±5.1
150	362.7 ±9.5	378.1 ±11.5	108.2 ±10.4	97.5 ±7.3	100.5 ±6.9	102.7 ±5.9
180	369.1 ±15.9	373.1 ±9.8	101.3 ±5.3	101.8 ±7.4	102.2 ±9.3	105.3 ±4.4
210	378.2 ±15.9	371.3 ±7.3	99.3 ±8.7	102.9 ±8.6	101.6 ±11.1	106.0 ±4.4
240	382.0 ±15.1	371.3 ±6.0	100.8 ±5.4	108.0 ±10.9	100.1 ±10.4	106.3 ±4.3
270	390.3 ±12.7	380.7 ±11.6	103.4 ±4.4	105.3 ±10.0	98.6 ±8.9	106.3 ±3.7
300	390.4 ±12.2	359.8 ±8.8	101.6 ±4.5	104.5 ±9.0	99.3 ±8.7	104.4 ±3.6
330	393.0 ±12.0	365.5 ±8.0	99.1 ±2.6	102.8 ±8.0	95.7 ±8.9	104.9 ±2.8
360	387.1 ±15.3	371.2 ±7.0	95.6 ±2.4	104.9 ±7.9	92.5 ±8.5	104.1 ±3.6

±EPM

Tabela 6: Média padrão das variáveis cardiovasculares CVR e CVA utilizando SF (0,9%) e BTCl (30,0 mg/Kg) em escala temporal de 360 minutos, via gavagem, em ratos WR (n=6) - ANOVA (*two way*).

BTCl (30.0 mg/Kg); SF (0,9%)				
TEMPO (minutos)	CVR (%)		CVA (%)	
	BTCl	SF	BTCl	SF
Basal 1 = -10	100.0 ±0.0	100.0 ±0.0	100.0 ±0.0	100.0 ±0.0
Basal 2 = 0	100.2 ±0.5	99.7 ±0.5	99.7 ±0.3	100.4 ±0.4
30	122.7 ±4.3	89.5 ±3.4	117.8 ±4.5	101.7 ±2.5
60	133.3 ±8.4	84.8 ±4.9	122.7 ±3.3	93.9 ±3.6
90	166.8 ±11.3	88.3 ±6.3	135.7 ±7.2	92.3 ±5.6
120	169.5 ±8.8	97.5 ±5.7	144.0 ±5.4	96.8 ±4.2
150	173.9 ±17.3	105.5 ±8.5	145.6 ±2.8	97.4 ±3.5
180	175.0 ±15.3	100.3 ±7.5	150.1 ±6.5	98.3 ±5.3
210	169.9 ±12.5	97.6 ±2.8	140.7 ±11.3	102.0 ±3.2
240	153.0 ±14.3	101.9 ±3.8	132.0 ±10.8	100.0 ±1.3
270	153.5 ±29.1	104.1 ±1.1	126.8 ±16.1	102.7 ±2.5
300	141.8 ±26.3	100.2 ±1.7	120.0 ±16.6	97.5 ±2.7
330	130.9 ±26.3	103.1 ±2.2	109.1 ±16.4	99.7 ±3.0
360	132.4 ±25.3	100.7 ±2.1	106.3 ±16.4	98.2 ±2.8

± EPM

Tabela 7: Média padrão das variáveis cardiovasculares CVR e CVA utilizando SF (0,9%) e BTCl (30,0 mg/Kg) em escala temporal de 360 minutos, via gavagem, em ratos SHR (n=6) - ANOVA (*two way*).

BTCl (30.0 mg/Kg); SF (0,9%)				
TEMPO (minutos)	CVR (%)		CVA (%)	
	BTCl	SF	BTCl	SF
Basal 1 = -10	100.0 *±0.0	100.0 ±0.0	100.0 ±0.0	100.0 ±0.0
Basal 2 = 0	100.8 ±0.5	99.8 ±0.6	100.5 ±0.2	99.9 ±0.2
30	128.2 ±9.0	87.4 ±6.3	133.8 ±10.5	93.1 ±2.4
60	139.0 ±8.7	91.9 ±7.0	146.4 ±7.4	97.8 ±4.6
90	154.4 ±9.7	96.5 ±5.8	157.8 ±9.8	103.6 ±5.8
120	165.5 ±11.0	97.8 ±6.9	164.7 ±11.3	102.4 ±6.4
150	170.1 ±8.7	103.2 ±8.8	159.9 ±10.9	108.5 ±7.6
180	172.7 ±11.2	108.6 ±8.8	172.5 ±12.9	112.1 ±6.1
210	178.0 ±10.1	112.3 ±10.6	180.3 ±11.5	115.5 ±6.9
240	171.4 ±9.0	116.7 ±12.5	167.6 ±11.9	114.6 ±6.3
270	171.2 ±13.7	115.9 ±12.1	159.7 ±8.9	116.8 ±6.1
300	165.5 ±9.8	116.5 ±11.7	159.6 ±9.6	115.8 ±5.7
330	157.8 ±7.4	116.1 ±11.5	150.0 ±9.1	117.6 ±5.6
360	156.0 ±5.3	119.2 ±12.0	149.0 ±9.2	117.4 ±6.4

*± EPM

Tabela 8: Média padrão das variáveis hemodinâmicas PAM, PAS e PAD utilizando SF (0,9%) e PepChy (3,3 mg/Kg) em escala temporal de 360 minutos, via gavagem, em ratos WR (n=6) - ANOVA (two way)

TEMPO (minutos)	PCHY (3.3 mg/Kg); SF (0,9%)					
	PAM (mmHg)		PAS (mmHg)		PAD (mmHg)	
	PCHY	SF	PCHY	SF	PCHY	SF
Basal1 =-10	109.1 ±2.2	111.7 ±0.9	146.7 ±2.0	142.6 ±1.0	90.6 ±2.5	96.2 ±1.3
Basal 2 = 0	109.2 ±2.2	111.6 ±0.8	147.1 ±2.0	142.3 ±1.1	90.5 ±2.5	96.3 ±1.3
30	93.0 ±3.2	107.5 ±1.7	130.6 ±5.0	141.1 ±2.4	74.1 ±2.5	91.6 ±2.1
60	81.0 ±6.3	112.9 ±2.7	116.7 ±8.4	146.3 ±3.0	63.2 ±5.3	96.1 ±2.5
90	72.9 ±5.6	112.0 ±4.4	106.6 ±7.6	145.2 ±4.7	55.8 ±4.9	95.6 ±4.3
120	72.8 ±4.6	107.1 ±3.2	106.3 ±6.7	141.2 ±3.6	55.8 ±3.9	90.1 ±3.0
150	74.4 ±6.2	107.5 ±3.6	107.2 ±9.0	141.8 ±3.5	57.7 ±5.0	90.3 ±3.7
180	73.3 ±5.3	108.7 ±3.1	107.5 ±6.7	143.0 ±2.9	56.1 ±4.8	91.7 ±3.3
210	73.7 ±3.7	108.1 ±3.1	106.4 ±6.5	142.7 ±3.4	57.2 ±3.2	90.8 ±3.0
240	76.5 ±3.9	108.8 ±2.8	109.5 ±6.1	141.6 ±3.0	59.9 ±3.1	92.3 ±2.8
270	71.0 ±3.6	107.8 ±2.2	102.1 ±5.4	142.3 ±2.2	55.3 ±2.9	90.8 ±2.1
300	72.5 ±1.0	109.3 ±3.9	102.8 ±3.6	145.4 ±4.0	56.9 ±2.0	91.2 ±3.8
330	75.4 ±5.7	106.8 ±4.1	110.5 ±7.3	142.2 ±4.2	57.9 ±5.1	89.1 ±4.1
360	81.1 ±4.2	108.7 ±4.1	116.0 ±5.2	143.2 ±4.2	63.3 ±4.0	91.6 ±4.1

± EPM

Tabela 9: Média padrão das variáveis hemodinâmicas PAM, PAS e PAD utilizando SF (0,9%) e PepChy (3,3 mg/Kg) em escala temporal de 360 minutos, via gavagem, em ratos SHR (n=6) – ANOVA (two way).

TEMPO (minutos)	PCHY (3.3 mg/Kg); SF (0.9%)					
	PAM (mmHg)		PAS (mmHg)		PAD (mmHg)	
	PCHY	SF	PCHY	SF	PCHY	SF
Basal 1=-10	140.1 ±1.4	137.7 ±1.8	185.2 ±1.9	177.0 ±3.2	118.0 ±2.2	118.0 ±2.0
Basal 2=0	139.9 ±1.3	137.6 ±2.0	184.8 ±2.0	177.0 ±3.3	117.2 ±2.2	117.8 ±2.1
30	93.6 ±3.3	136.1 ±1.4	136.8 ±3.6	179.8 ±2.5	72.0 ±3.8	114.4 ±2.0
60	80.8 ±2.4	133.3 ±2.3	125.3 ±4.2	176.8 ±3.6	58.7 ±2.2	109.7 ±3.3
90	81.3 ±3.2	132.9 ±1.6	125.4 ±4.6	177.6 ±2.8	59.0 ±2.6	110.6 ±2.0
120	82.2 ±1.3	132.1 ±2.2	126.8 ±2.3	174.2 ±2.3	60.1 ±0.9	111.0 ±2.8
150	82.5 ±1.3	131.1 ±2.6	129.3 ±3.5	174.6 ±2.5	59.0 ±1.5	109.2 ±3.3
180	81.8 ±1.2	129.9 ±2.9	128.5 ±4.0	173.7 ±3.4	58.0 ±1.4	108.0 ±3.1
210	84.9 ±4.5	127,4 ±3.6	129.4 ±6.8	171.0 ±3.8	61.8 ±3.4	105.5 ±4.0
240	84.7 ±3.1	128.4 ±3.2	130.5 ±4.7	171.8 ±4.5	61.5 ±3.1	107.1 ±3.3
270	89.7 ±3.5	126.2 ±3.2	137.9 ±4.5	172.6 ±3.9	65.1 ±3.8	103.0 ±3.3
300	87.2 ±4.3	124.8 ±3.1	133.9 ±5.7	172.8 ±4.0	63.1 ±4.2	100.7 ±3.1
330	91.4 ±5.6	123.6 ±3.8	140.4 ±6.4	171.5 ±4.3	66.1 ±5.4	99.7 ±3.7
360	95.7 ±4.4	123.1 ±4.0	146.2 ±5.2	172.6 ±5.2	70.4 ±4.9	98.6 ±3.7

± EPM

Tabela 10: Média padrão das variáveis cardiovasculares FC, FSR e FSA utilizando SF (0,9%) e PepChy (3,3 mg/Kg), em escala temporal de 360 minutos, via gavagem, em ratos WR (n=6) - ANOVA (two way).

PCHY (3.3 mg/Kg); SF (0,9%)						
TEMPO (minutos)	FC (bpm)		FSR (%)		FSA (%)	
	PCHY	SF	PCHY	SF	PCHY	SF
Basal 1 = -10	379.6 ±18.8	375.4 ±12.0	100.0 ±0.0	100.0 ±0.0	100.0 ±0.0	100.0 ±0.0
Basal 2 = 0	381.7 ±18.8	380.7 ±13.4	101.5 ±0.9	99.6 ±0.4	100.6 ±0.5	100.3 ±0.3
30	354.9 ±16.5	361.4 ±7.5	119.3 ±5.6	86.0 ±2.5	105.9 ±2.5	97.7 ±1.4
60	349.3 ±16.4	361.0 ±14.5	112.5 ±4.3	85.6 ±4.9	103.3 ±2.2	94.6 ±2.4
90	338.1 ±14.4	345.0 ±19.3	113.8 ±10.4	87.8 ±5.1	99.8 ±1.0	91.7 ±3.7
120	341.0 ±14.8	340.9 ±17.3	126.0 ±11.1	93.2 ±5.3	103.1 ±0.9	92.5 ±3.2
150	347.6 ±16.9	344.2 ±19.2	129.9 ±17.1	100.4 ±6.1	103.3 ±3.7	93.3 ±2.4
180	351.2 ±18.0	349.9 ±12.5	126.9 ±14.0	96.8 ±5.2	102.7 ±2.8	95.1 ±3.6
210	362.8 ±17.4	354.9 ±18.6	128.6 ±14.5	94.4 ±3.0	104.7 ±3.4	98.4 ±2.1
240	374.0 ±15.8	355.6 ±18.9	128.9 ±13.9	99.2 ±4.3	105.0 ±3.0	97.3 ±1.4
270	381.1 ±10.8	348.2 ±20.6	119.2 ±9.9	100.6 ±2.5	101.8 ±3.3	99.0 ±1.9
300	399.0 ±14.6	359.7 ±18.5	120.8 ±12.4	97.9 ±2.8	99.2 ±3.2	95.1 ±2.1
330	388.1 ±7.1	369.8 ±16.8	112.9 ±8.6	98.4 ±3.6	94.8 ±4.3	94.9 ±1.6
360	394.9 ±10.9	358.8 ±21.7	117.0 ±9.8	97.9 ±3.3	97.4 ±4.1	95.1 ±1.4

± EPM

Tabela 11: Média padrão das variáveis cardiovasculares FC, FSR e FSA utilizando SF (0,9%) e PepChy (3,3 mg/Kg), em escala temporal de 360 minutos, via gavagem, em ratos SHR (n=6) - ANOVA (two way).

PCHY (3.3 mg/Kg); SF (0.9%)						
TEMPO (minutos)	FC (bpm)		FSR (%)		FSA (%)	
	PCHY	SF	PCHY	SF	PCHY	SF
Basal 1=-10	378.4 ±12.2	378.9 ±9.7	100.0 ±0.0	100.0 ±0.0	100.0 ±0.0	100.0 ±0.0
Basal 2=0	378.7 ±12.4	377.9 ±10.4	99.2 ±0.8	99.8 ±0.6	100.0 ±0.1	99.8 ±0.2
30	328.8 ±11.8	368.9 ±6.4	100.7 ±2.9	86.6 ±6.4	109.2 ±3.4	92.1 ±2.2
60	325.2 ±9.2	362.1 ±12.0	108.6 ±8.9	88.8 ±6.4	113.0 ±4.3	94.5 ±3.8
90	333.7 ±8.0	363.2 ±10.1	114.1 ±8.9	93.0 ±5.1	118.1 ±4.1	99.8 ±5.1
120	344.0 ±6.9	367.2 ±9.2	120.1 ±7.4	93.4 ±5.7	116.3 ±2.2	97.9 ±5.1
150	368.0 ±11.3	378.1 ±11.5	115.0 ±3.5	97.5 ±7.3	116.2 ±3.5	102.7 ±5.9
180	372.3 ±14.4	373.1 ±9.8	117.6 ±4.6	101.8 ±7.4	120.1 ± 2.8	105.3 ±4.4
210	373.8 ±13.4	371.3 ±7.3	123.5 ±5.9	102.9 ±8.6	120.2 ±2.0	106.0 ±4.4
240	393.3 ±20.6	371.3 ±6.0	122.5 ±5.8	108.0 ±10.9	120.5 ±4.5	106.3 ±4.3
270	399.1 ±20.9	380.7 ±11.6	124.9 ±7.3	105.3 ±10.0	120.5 ±3.9	106.3 ±3.7
300	388.8 ±20.5	359.8 ±8.8	119.2 ±5.5	104.5 ±9.0	116.4 ±4.8	104.4 ±3.6
330	384.6 ±26.5	365.5 ±8.0	114.6 ±6.7	102.8 ±8.0	116.0 ±3.5	104.9 ±2.8
360	407.8 ±20.4	371.2 ±7.0	116.9 ±7.2	104.9 ±7.9	115.3 ±3.8	104.1 ±3.6

±EPM

Tabela 12: Média padrão das variáveis cardiovasculares CVR e CVA utilizando SF (0,9%) e PepChy (3,3 mg/Kg) em escala temporal de 360 minutos, via gavagem, em ratos WR (n=6) - ANOVA (*two way*).

PCHY (3.3 mg/Kg); SF (0,9%)				
TEMPO (minutos)	CVR (%)		CVA (%)	
	PCHY	SF	PCHY	SF
Basal 1 = -10	100.0 ±0.0	100.0 ±0.0	100.0 ±0.0	100.0 ±0.0
Basal 2 = 0	101.4 ±0.9	99.7 ±0.5	100.5 ±0.6	100.4 ±0.4
30	140.3 ±6.1	89.5 ±3.4	124.9 ±5.4	101.7 ±2.5
60	156.5 ±13.9	84.8 ±4.9	143.6 ±12.1	93.9 ±3.6
90	172.3 ±14.0	88.3 ±6.3	153.9 ±12.6	92.3 ±5.6
120	188.5 ±10.9	97.5 ±5.7	157.1 ±8.6	96.8 ±4.2
150	192.3 ±19.9	105.5 ±8.5	158.2 ±16.8	97.4 ±3.5
180	189.5 ±16.0	100.3 ±7.5	156.7 ±12.2	98.3 ±5.3
210	189.8 ±17.8	97.6 ±2.8	156.8 ±9.8	102.0 ±3.2
240	186.4 ±21.8	101.9 ±3.8	152.3 ±10.6	100.0 ±1.3
270	186.9 ±21.1	104.1 ±1.1	158.5 ±10.2	102.7 ±2.5
300	182.6 ±20.8	100.2 ±1.7	149.4 ±5.0	97.5 ±2.7
330	168.0 ±18.8	103.1 ±2.2	140.6 ±10.7	99.7 ±3.0
360	159.9 ±17.2	100.7 ±2.1	133.7 ±11.5	98.2 ±2.8

± EPM

Tabela 13: Média padrão das variáveis cardiovasculares CVR e CVA utilizando SF (0,9%) e PepChy (3,3 mg/Kg) em escala temporal de 360 minutos, via gavagem, em ratos SHR (n=6) - ANOVA (*two way*).

PCHY (3.3 mg/Kg); SF (0.9%)				
TEMPO (minutos)	CVR (%)		CVA (%)	
	PCHY	SF	PCHY	SF
Basal 1=-10	100.0 ±0.0	100.0 ±0.0	100.0 ±0.0	100.0 ±0.0
Basal 2=0	99.4 ±0.7	99.8 ±0.6	100.2 ±0.2	99.9 ±0.2
30	151.8 ±7.0	87.4 ±6.3	164.4 ±6.7	93.1 ±2.4
60	188.9 ±15.6	91.9 ±7.0	197.1 ±10.6	97.8 ±4.6
90	200.1 ±23.4	96.5 ±5.8	204.3 ±7.1	103.6 ±5.8
120	205.0 ±12.5	97.8 ±6.9	198.7 ±6.6	102.4 ±6.4
150	195.8 ±7.9	103.2 ±8.8	197.8 ±7.8	108.5 ±7.6
180	201.8 ±9.8	108.6 ±8.8	205.8 ±5.8	112.1 ±6.1
210	204.9 ±7.8	112.3 ±10.6	202.2 ±14.9	115.5 ±6.9
240	203.1 ±9.7	116.7 ±12.5	200.7 ±11.6	114.6 ±6.3
270	195.0 ±7.8	115.9 ±12.1	189.6 ±9.0	116.8 ±6.1
300	192.5 ±7.8	116.5 ±11.7	190.2 ±14.5	115.8 ±5.7
330	176.8 ±8.6	116.1 ±11.5	183.1 ±17.4	117.6 ±5.6
360	170.9 ±5.4	119.2 ±12.0	171.7 ±12.9	117.4 ±6.4

±EPM

Tabela 14: Média padrão das variáveis hemodinâmicas PAM, PAS e PAD utilizando SF (0,9%) e PepTry (3,3 mg/Kg) em escala temporal de 360 minutos, via gavagem, em ratos WR (n=6) - ANOVA (two way).

PTRY (3.3 mg/Kg); SF (0.9%)						
TEMPO (minutos)	PAM (mmHg)		PAS (mmHg)		PAD (mmHg)	
	PTRY	SF	PTRY	SF	PTRY	SF
Basal 1=-10	107.9 ±1.2	111.7 ±0.9	147.7 ±1.9	142.6 ±1.0	88.2 ±1.3	96.2 ±1.3
Basal 2=0	108.3 ±1.1	111.6 ±0.8	147.9 ±1.8	142.3 ±1.1	88.6 ±1.4	96.3 ±1.3
30	100.6 ±2.6	107.5 ±1.7	138,1 ±3.1	141.1 ±2.4	81.8 ±2.5	91.6 ±2.1
60	91.4 ±2.4	112.9 ±2.7	129,5 ±2.8	146.3 ±3.0	72.4 ±2.6	96.1 ±2.5
90	82.5 ±3.2	112.0 ±4.4	119,2 ±3.7	145.2 ±4.7	64.1 ±3.2	95.6 ±4.3
120	75.6 ±2.7	107.1 ±3.2	111.2 ±3.8	141.2 ±3.6	57.8 ±2.4	90.1 ±3.0
150	74.4 ±3.3	107.5 ±3.6	108.9 ±4.4	141.8 ±3.5	57.3 ±2.7	90.3 ±3.7
180	76.6 ±2.2	108.7 ±3.1	110,7 ±2.7	143.0 ±2.9	59.7 ±2.2	91.7 ±3.3
210	76.6 ±1.9	108.1 ±3.1	110,1 ±2.2	142.7 ±3.4	59.7 ±1.9	90.8 ±3.0
240	81.3 ±1.9	108.8 ±2.8	115,4 ±1.7	141.6 ±3.0	64.2 ±2.3	92.3 ±2.8
270	82.9 ±1.9	107.8 ±2.2	118.3 ±3.0	142.3 ±2.2	66.0 ±2.4	90.8 ±2.1
300	86.0 ±1.7	109.3 ±3.9	120.9 ±2.3	145.4 ±4.0	68.1 ±1.9	91.2 ±3.8
330	83.6 ±3.1	106.8 ±4.1	120.2 ±3.0	142.2 ±4.2	65.8 ±3.5	89.1 ±4.1
360	86.3 ±2.3	108.7 ±4.1	122.0 ±3.0	143.2 ±4.2	68.4±2.3	91.6 ±4.1

±EPM

Tabela 15: Média padrão das variáveis hemodinâmicas PAM, PAS e PAD utilizando SF (0,9%) e PepTry (3,3 mg/Kg) em escala temporal de 360 minutos, via gavagem, em ratos SHR (n=6) - ANOVA (two way).

PTRY (3.3 mg/Kg); SF (0.9%)						
TEMPO (minutos)	PAM (mmHg)		PAS (mmHg)		PAD (mmHg)	
	PTRY	SF	PTRY	SF	PTRY	SF
Basal 1=-10	136.1 ±0.7	137.7 ±1.8	178.0 ±2.6	177.0 ±3.2	115.2 ±1.1	118.0 ±2.0
Basal 2=0	135.8 ±0.7	137.6 ±2.0	178.3 ±2.0	177.0 ±3.3	114.8 ±1.2	117.8 ±2.1
30	97.2 ±4.1	136.1 ±1.4	141.3 ±4.8	179.8 ±2.5	72.9 ±2.3	114.4 ±2.0
60	95.6 ±3.0	133.3 ±2.3	137.8 ±4.7	176.8 ±3.6	73.6 ±1.9	109.7 ±3.3
90	94.7 ±2.4	132.9 ±1.6	137.1 ±3.3	177.6 ±2.8	72.9 ±2.0	110.6 ±2.0
120	88.7 ±4.3	132.1 ±2.2	129.4 ±4.8	174.2 ±2.3	67.9 ±3.7	111.0 ±2.8
150	87.3 ±2.4	131.1 ±2.6	123.4 ±4,6	174.6 ±2.5	69.5 ±1.8	109.2 ±3.3
180	86.8 ±1.7	129.9 ±2.9	124.3 ±2.2	173.7 ±3.4	67.8 ±1.9	108.0 ±3.1
210	85.0 ±3.5	127.4 ±3.6	123.1 ±4.2	171.0 ±3.8	65.4 ±3.3	105.5 ±4.0
240	87.6 ±3.3	128.4 ±3.2	128.7 ±4.1	171.8 ±4.5	66.7 ±3.1	107.1 ±3.3
270	86.8 ±3.0	126.2 ±3.2	129.0 ±4.3	172.6 ±3.9	65.9 ±2.6	103.0 ±3.3
300	90.5 ±4.0	124.8 ±3.1	133.8 ±5.4	172.8 ±4.0	68.5 ±3.5	100.7 ±3.1
330	89.7 ±3.3	123.6 ±3.8	131.3 ±3.2	171.5 ±4.3	67.4 ±3.6	99.7 ±3.7
360	90.9 ±2.5	123.1 ±4.0	136.7 ±3.7	172.6 ±5.2	67.6 ±2.6	98.6 ±3.7

±EPM

Tabela 16: Média padrão das variáveis cardiovasculares FC, FSR e FSA utilizando SF (0,9%) e PepTry (3,3 mg/Kg), em escala temporal de 360 minutos, via gavagem, em ratos WR (n=6) – ANOVA (two way).

PTRY (3.3 mg/Kg); SF (0.9%)						
TEMPO (minutos)	FC (bpm)		FSR (%)		FSA (%)	
	PTRY	SF	PTRY	SF	PTRY	SF
Basal 1=-10	405.9 ±22.4	375.4 ±12.0	100.0 ±0.0	100.0 ±0.0	100.0 ±0.0	100.0 ±0.0
Basal 2=0	404.9 ±22.2	380.7 ±13.4	100.0 ±0.0	99.6 ±0.4	100.0 ±0.0	100.3 ±0.3
30	380.1 ±14.5	361.4 ±7.5	102.8 ±2.9	86.0 ±2.5	104.4 ±1.9	97.7 ±1.4
60	367.3 ±10.0	361.0 ±14.5	106.3 ±2.3	85.6 ±4.9	101.0 ±3.4	94.6 ±2.4
90	354.9 ±17.7	345.0 ±19.3	100.7 ±2.8	87.8 ±5.1	102.1 ±6.2	91.7 ±3.7
120	349.9 ±16.8	340.9 ±17.3	102.9 ±5.8	93.2 ±5.3	104.0 ±2.6	92.5 ±3.2
150	352.1 ±18.4	344.2 ±19.2	105.6 ±8.5	100.4 ±6.1	105.0 ±3.2	93.3 ±2.4
180	353.3 ±18.3	349.9 ±12.5	104.2 ±6.2	96.8 ±5.2	110.9 ±7.2	95.1 ±3.6
210	365.8 ±20.7	354.9 ±18.6	107.5 ±7.4	94.4 ±3.0	113.0 ±6.5	98.4 ±2.1
240	381.3 ±14.7	355.6 ±18.9	111.0 ±8.0	99.2 ±4.3	117.4 ±7.0	97.3 ±1.4
270	398.6 ±16.3	248.2 ±20.6	109.5 ±8.6	100.6 ±2.5	114.1 ±6.8	99.0 ±1.9
300	408.3 ±17.3	359.7 ±18.5	106.1 ±11.5	97.9 ±2.8	109.8 ±7.6	95.1 ±2.1
330	401.7 ±19.3	369.8 ±16.8	104.5 ±10.0	98.4 ±3.6	108.7 ±6.4	94.9 ±1.6
360	391.4 ±15.3	358.8 ±21.7	105.2 ±9.5	97.9 ±3.3	112.6 ±9.0	95.1 ±1.4

±EPM

Tabela 17: Média padrão das variáveis cardiovasculares FC, FSR e FSA utilizando SF (0,9%) e PepChy (3,3 mg/Kg), em escala temporal de 360 minutos, via gavagem, em ratos SHR (n=6) – ANOVA (two way).

PTRY (3.3 mg/Kg); SF (0,9%)						
TEMPO (minutos)	FC (bpm)		FSR (%)		FSA (%)	
	PTRY	SF	PTRY	SF	PTRY	SF
Basal 1 = -10	373.2 ±9.3	375.4 ±12.0	100.0 ±0.0	100.0 ±0.0	100.0 ±0.0	100.0 ±0.0
Basal 2 = 0	371.5 ±9.2	380.7 ±13.4	100.0 ±0.0	99.6 ±0.4	100.1 ±0.1	100.3 ±0.3
30	323.6 ±8.1	361.4 ±7.5	92.9 ±7.2	86.0 ±2.5	96.5 ±4.5	97.7 ±1.4
60	337.2 ±8.5	361.0 ±14.5	95.1 ±7.4	85.6 ±4.9	106.4 ±4.6	94.6 ±2.4
90	334.8 ±10.5	345.0 ±19.3	94.6 ±6.4	87.8 ±5.1	107.5 ±4.0	91.7 ±3.7
120	322.9 ±8.0	340.9 ±17.3	93.3 ±4.1	93.2 ±5.3	102.8 ±3.0	92.5 ±3.2
150	326.4 ±12.3	344.2 ±19.2	100.2 ±4.3	100.4 ±6.1	100.6 ±4.0	93.3 ±2.4
180	332.4 ±10.5	349.9 ±12.5	109.6 ±3.9	96.8 ±5.2	102.7 ±4.9	95.1 ±3.6
210	341.4 ±8.0	354.9 ±18.6	115.9 ±4.6	94.4 ±3.0	105.4 ±4.6	98.4 ±2.1
240	358.0 ±8.6	355.6 ±18.9	123.1 ±5.0	99.2 ±4.3	107.3 ±3.7	97.3 ±1.4
270	363.0 ±8.4	348.2 ±20.6	122.2 ±4.1	100.6 ±2.5	107.5 ±5.5	99.0 ±1.9
300	371.5 ±6.5	359.7 ±18.5	124.0 ±4.5	97.9 ±2.8	109.7 ±4.0	95.1 ±2.1
330	368.8 ±6.5	369.8 ±16.8	116.3 ±7.7	98.4 ±3.6	109.8 ±5.3	94.9 ±1.6
360	367.9 ±6.8	358.8 ±21.7	117.4 ±6.7	97.9 ±3.3	107.3 ±4.9	95.1 ±1.4

± EPM

Tabela 18: Média padrão das variáveis cardiovasculares CVR e CVA utilizando SF (0,9%) e PepTry (3,3 mg/Kg) em escala temporal de 360 minutos, via gavagem, em ratos WR (n=6) - ANOVA (two way).

PTRY (3.3 mg/Kg); SF (0,9%)				
TEMPO (minutos)	CVR (%)		CVA (%)	
	PTRY	SF	PTRY	SF
Basal 1 = -10	100.0 ±0.0	100.0 ±0.0	100.0 ±0.0	100.0 ±0.0
Basal 2 = 0	99.7 ±0.1	99.7 ±0.5	99.7 ±0.1	100.4 ±0.4
30	110.7 ±4.2	89.5 ±3.4	112.4 ±3.3	101.7 ±2.5
60	126.4 ±6.5	84.8 ±4.9	119.2 ±2.6	93.9 ±3.6
90	132.6 ±5.3	88.3 ±6.3	134.2 ±8.4	92.3 ±5.6
120	147.2 ±7.7	97.5 ±5.7	149.5 ±7.2	96.8 ±4.2
150	152.9 ±10.1	105.5 ±8.5	153.0 ±4.6	97.4 ±3.5
180	147.5 ±10.0	100.3 ±7.5	155.7 ±6.9	98.3 ±5.3
210	151.5 ±9.8	97.6 ±2.8	158.7 ±6.6	102.0 ±3.2
240	148.7 ±13.4	101.9 ±3.8	155.5 ±7.1	100.0 ±1.3
270	143.9 ±13.8	104.1 ±1.1	148.5 ±7.6	102.7 ±2.5
300	133.7 ±14.8	100.2 ±1.7	137.8 ±8.8	97.5 ±2.7
330	136.1 ±14.1	103.1 ±2.2	141.8 ±10.7	99.7 ±3.0
360	132.2 ±12.4	100.7 ±2.1	141.5 ±11.5	98.2 ±2.8

±EPM

Tabela 19: Média padrão das variáveis cardiovasculares CVR e CVA utilizando SF (0,9%) e PepTry (3,3 mg/Kg) em escala temporal de 360 minutos, via gavagem, via gavagem, em ratos SHR (n=6) - ANOVA (two way)

PTRY (3.3 mg/Kg); SF (0.9%)				
TEMPO (minutos)	CVR (%)		CVA (%)	
	PTRY	SF	PTRY	SF
Basal 1=-10	100.0 ±0.0	100.0 ±0.0	100.0 ±0.0	100.0 ±0.0
Basal 2=0	100.2 ±0.2	99.8 ±0.6	100.3 ±0.3	99.9 ±0.2
30	123.1 ±7.9	87.4 ±6.3	135.9 ±7.3	93.1 ±2.4
60	131.1 ±8.9	91.9 ±7.1	152.3 ±8.5	97.8 ±4.6
90	135.9 ±8.1	96.5 ±5.8	155.3 ±8.2	103.6 ±5.8
120	149.2 ±8.3	97.8 ±6.9	159.1 ±6.4	102.4 ±6.4
150	161.8 ±7.2	103.2 ±8.8	157.1 ±6.7	108.5 ±7.6
180	178.2 ±8.1	108.6 ±8.8	161.4 ±8.7	112.1 ±6.1
210	192.2 ±3.7	112.3 ±10.6	169.9 ±8.5	115.5 ±6.9
240	198.7 ±9.5	116.7 ±12.5	167.8 ±8.9	114.6 ±6.3
270	198.8 ±7.9	115.9 ±12.1	169.6 ±10.9	116.8 ±6.1
300	194.4 ±9.6	116.5 ±11.7	167.9 ±13.3	115.8 ±5.7
330	183.6 ±13.5	116.1 ±11.5	168.1 ±11.7	117.6 ±5.6
360	182.7 ±11.8	119.2 ±12.1	169.1 ±11.8	117.4 ±6.4

±EPM

Tabela 20: Média padrão da variável hemodinâmica PAS utilizando SF (0,9%), BTCl (30,0 mg), PepChy e PepTry (3,3 mg/Kg) em escala temporal de 360 minutos, via gavagem, em ratos WR (n=6). ANOVA (two way).

SF (0,9%), BTCl (30,0 mg/Kg), PepChy e PepTry (3,3 mg/Kg)				
Δ PAS (mmHg)				
TEMPO (minutos)	SF	BTCl	PepChy	PepTry
Basal2=0	-0,3	0,1	0,6	0,2
30	-1,4	-10,8	-15,9	-9,6
60	3,7	-13,5	-29,0	-18,2
90	2,7	-33,1	-38,9	-28,4
120	-1,4	-38,0	-37,9	-36,5
150	-0,8	-37,0	-41,8	-38,8
180	0,5	-40,3	-44,6	-36,9
210	0,1	-34,4	-41,8	-37,5
240	-0,9	-36,4	-41,0	-32,3
270	-0,3	-34,2	-46,2	-29,4
300	2,9	-34,8	-41,2	-26,7
330	-0,3	-29,6	-33,1	-27,5
360	0,6	-30,6	-33,2	-25,7
+EPM				

Tabela 21: Média padrão da variável hemodinâmica PAD utilizando SF (0,9%), BTCl (30,0 mg/Kg), PepChy e PepTry (3,3 mg/Kg) em escala temporal de 360 minutos, via gavagem, em ratos WR (n=6). ANOVA (two way).

SF (0,9%), BTCl (30,0 mg/Kg), PepChy e PepTry (3,3 mg/Kg)				
Δ PAD (mmHg)				
TEMPO (minutos)	SF	BTCl	PepChy	PepTry
Basal2=0	0,1	0,3	0,1	0,4
30	-4,6	-12,9	-14,9	-6,4
60	-0,1	-14,0	-24,2	-15,8
90	-0,6	-33,0	-31,0	-24,0
120	-6,1	-35,8	-30,9	-30,4
150	-5,9	-36,9	-31,3	-30,9
180	-4,6	-39,5	-35,3	-28,5
210	-5,4	-36,5	-32,3	-28,4
240	-3,9	-35,4	-31,9	-24,0
270	-5,4	-38,5	-34,5	-22,2
300	-5,0	-39,1	-30,7	-20,1
330	-7,1	-37,0	-28,8	-22,4
360	-4,7	-36,6	-27,7	-19,8
+EPM				

Tabela 22: Média padrão da variável hemodinâmica PAM utilizando SF (0,9%), BTCl (30,0 mg/Kg), PepChy e PepTry (3,3 mg/Kg) em escala temporal de 360 minutos, via gavagem, em ratos WR (n=6). ANOVA (two way).

SF (0,9%), BTCl (30,0 mg/Kg), PepChy e PepTry (3,3 mg/Kg)				
Δ PAM (mmHg)				
TEMPO (minutos)	SF	BTCl	PepChy	PepTry
Basal2=0	-0,1	0,2	0,1	0,3
30	-4,2	-12,1	-16,1	-7,4
60	1,2	-14,0	-28,1	-16,5
90	0,4	-32,8	-36,2	-25,5
120	-4,6	-36,5	-36,3	-32,3
150	-4,2	-36,9	-34,7	-33,5
180	-3,0	-39,8	-35,8	-31,3
210	-3,6	-35,7	-35,4	-31,3
240	-2,9	-35,8	-32,6	-26,6
270	-3,9	-37,1	-38,1	-25,0
300	-2,4	-37,6	-36,6	-22,0
330	-4,9	-34,5	-33,7	-24,3
360	-3,0	-34,5	-28,0	-21,7
+EPM				

Tabela 23: Média padrão das variáveis cardiovasculares CVR e CVA utilizando SF (0,9%), BTCl (30,0 mg/Kg), PepChy e PepTry (3,3 mg/Kg) em escala temporal de 360 minutos, via gavagem, em ratos WR (n=6). ANOVA (two way).

SF (0,9%), BTCl (30,0 mg/Kg), PepChy e PepTry (3,3 mg/Kg)								
TEMPO (minutos)	Δ CVR (%)				Δ CVA (%)			
	SF	BTCl	PepChy	PepTry	SF	BTCl	PepChy	PepTry
Basal2=0	99,8	100,8	99,4	100,2	99,9	100,5	100,2	100,3
30	87,4	128,2	151,8	123,1	93,1	133,8	164,4	135,9
60	91,9	139,0	188,9	131,0	97,8	146,4	197,1	152,3
90	96,5	154,4	200,1	135,9	103,6	157,8	204,3	155,3
120	97,8	165,5	205,0	149,2	102,4	164,7	198,7	159,0
150	103,2	170,1	195,8	161,8	108,5	159,9	197,8	157,1
180	108,6	172,7	201,8	178,2	112,1	172,5	205,8	161,4
210	112,3	178,0	204,9	192,2	115,5	180,3	202,2	169,9
240	116,7	171,4	203,1	198,7	114,6	167,6	200,7	167,8
270	115,9	171,2	195,0	198,8	116,8	159,7	189,6	169,6
300	116,5	165,5	192,5	194,4	115,8	159,6	190,2	167,9
330	116,1	157,8	176,8	183,6	117,6	150,0	183,1	168,0
360	119,2	156,0	170,9	182,7	117,4	149,0	171,7	162,0
+EPM								

Tabela 24: Média padrão da variável hemodinâmica PAS utilizando SF (0,9%), BTCl (30,0 mg/Kg), PepChy e PepTry (3,3 mg/Kg) em escala temporal de 360 minutos, via gavagem, em ratos SHR(n=6). ANOVA (two way).

SF (0,9%), BTCl (30,0 mg/Kg), PepChy e PepTry (3,3 mg/Kg)				
Δ PAS (mmHg)				
TEMPO (minutos)	SF	BTCl	PepChy	PepTry
Basal2=0	0,0	0,0	-0,4	0,3
30	2,8	-30,2	-48,4	-36,7
60	-0,2	-41,2	-59,9	-40,2
90	0,6	-45,4	-59,8	-40,9
120	-2,8	-46,9	-58,4	-48,6
150	-2,5	-45,9	-55,8	-54,6
180	-3,3	-53,8	-56,7	-53,7
210	-6,0	-62,1	-55,8	-54,9
240	-5,2	-53,3	-54,7	-49,3
270	-4,4	-47,6	-47,3	-49,0
300	-4,2	-44,8	-51,3	-44,2
330	-5,5	-42,2	-44,8	-46,7
360	-4,4	-45,3	-39,0	-41,3
+EPM				

Tabela 25: Média padrão da variável hemodinâmica PAD utilizando SF (0,9%), BTCl (30,0 mg/Kg), PepChy e PepTry (3,3 mg/Kg) em escala temporal de 360 minutos, via gavagem, em ratos SHR(n=6). ANOVA (two way).

SF (0,9%), BTCl (30,0 mg/Kg), PepChy e PepTry (3,3 mg/Kg)				
Δ PAD (mmHg)				
TEMPO (minutos)	SF	BTCl	PepChy	PepTry
Basal2=0	-0,2	-0,1	-0,8	-0,4
30	-3,6	-34,8	-46,0	-42,3
60	-8,3	-47,5	-59,2	-41,6
90	-7,4	-50,7	-59,0	-42,4
120	-7,0	-54,0	-57,9	-47,4
150	-8,8	-54,3	-58,9	-45,7
180	-10,0	-59,5	-59,9	-47,4
210	-12,5	-62,9	-56,2	-49,8
240	-10,9	-58,6	-56,5	-48,5
270	-15,0	-58,1	-52,8	-49,3
300	-17,2	-57,6	-54,9	-46,7
330	-18,3	-51,9	-28,8	-47,9
360	-19,4	-59,4	-47,6	-47,6
+EPM				

Tabela 26: Média padrão da variável hemodinâmica PAM utilizando SF (0,9%), BTCl (30,0 mg/Kg), PepChy e PepTry (3,3 mg/Kg) em escala temporal de 360 minutos, via gavagem, em ratos SHR(n=6). ANOVA (two way).

SF (0,9%), BTCl (30,0 mg/Kg), PepChy e PepTry (3,3 mg/Kg)				
ΔPAM (mmHg)				
TEMPO (minutos)	SF	BTCl	PepChy	PepTry
Basal2=0	-0,1	0,1	-0,3	-0,3
30	-1,6	-33,3	-46,6	-39,0
60	-4,4	-45,4	-59,3	-40,5
90	-4,8	-48,9	-58,8	-41,4
120	-5,6	-51,8	-58,0	-47,4
150	-6,6	-51,6	-57,7	-48,8
180	-7,8	-57,6	-58,3	-49,3
210	-10,3	-62,6	-55,3	-51,1
240	-9,3	-56,8	-55,4	-48,5
270	-11,5	-54,5	-50,5	-49,3
300	-12,9	-53,9	-53,0	-45,7
330	-14,1	-51,7	-48,8	-46,4
360	-14,6	-54,0	-44,5	-45,2
+EPM				

Tabela 27: Média padrão das variáveis cardiovasculares CVR e CVA utilizando SF (0,9%), BTCl (30,0 mg/Kg), PepChy e PepTry (3,3 mg/Kg) em escala temporal de 360 minutos, via gavagem, em ratos SHR(n=6). ANOVA (two way).

SF (0,9%), BTCl (30,0 mg/Kg), PepChy e PepTry (3,3 mg/Kg)								
TEMPO (minutos)	ΔCVR (%)				ΔCVA (%)			
	SF	BTCl	PepChy	PepTry	SF	BTCl	PepChy	PepTry
Basal2=0	99,7	100,2	101,4	99,7	100,4	99,7	100,5	99,7
30	89,5	122,7	140,3	110,7	101,7	117,8	124,9	112,4
60	84,8	133,3	156,5	126,4	93,9	122,7	143,6	119,2
90	88,3	166,8	172,3	132,6	92,3	135,7	153,9	134,2
120	97,5	169,5	188,5	147,2	96,8	144,0	157,1	149,5
150	105,5	173,9	192,3	152,9	97,4	145,6	158,2	153,0
180	100,3	175,0	189,5	147,5	98,3	150,1	156,7	157,5
210	97,6	169,9	189,8	151,5	102,0	140,7	156,8	158,7
240	101,9	153,0	186,4	148,7	100,0	132,0	152,3	155,5
270	104,1	153,5	186,9	143,9	102,7	126,8	158,5	148,5
300	100,2	141,8	182,6	133,7	97,5	120,0	149,4	137,8
330	103,1	130,9	168,0	136,1	99,7	109,1	140,6	141,8
360	100,7	132,4	159,9	132,2	98,2	106,3	133,7	141,5
+EPM								

ANEXO 2



Certificamos que o trabalho **“Hypotensor and cardiovascular effects of a Bowman-Birk protease inhibitor from *Vigna unguiculata* seeds”**, de autoria de **Maria Alzira Garcia de Freitas**, sob orientação da **Profa. Dra. Sonia Maria de Freitas**, apresentado no **III Simpósio do Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular**, realizado nos dias 22 e 23 de março de 2018, na Universidade de Brasília, Brasília – DF, foi premiado com a **SEGUNDA COLOCAÇÃO** na categoria Pôster.

José Raimundo Corrêa
Coordenador do Programa de Pós-Graduação
em Patologia Molecular

Sébastien Olivier Charneau
Presidente da Comissão Organizadora do
III Simpósio do PPG em Patologia Molecular



4º Simpósio do Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular da UnB: De Portas Abertas

CERTIFICADO

Certificamos que **Maria Alzira Garcia de Freitas** participou do **IV Simpósio do Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular**, realizado entre os dias 23 a 25 de outubro de 2019, na Universidade de Brasília, Brasília – DF.

Sébastien Olivier Charneau
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Patologia Molecular
Universidade de Brasília

ANEXO 3

Blood pressure-lowering effects of a Bowman-Birk inhibitor and its derived peptides in normotensive and hypertensive rats

Maria Alzira Garcia de Freitas¹, Nathalia Oda Amaral², Alice da Cunha Morales Álvares¹, Sandrielle Aires de Oliveira^{1,5}, Azadeh Mehdad^{1,5}, Diego Elias Honda¹, Amanda Sá Martins Bessa³, Marcelo Henrique Soller Ramada⁴, Lara Marques Naves², Carolina Nobre Ribeiro Pontes³, Carlos Henrique Castro³, Gustavo Rodrigues Pedrino^{2*} and Sonia Maria de Freitas^{1*}

¹Biology Institute, Department of Cell Biology, Laboratory of Biophysics, University of Brasília (UnB), Quadra 604, Asa Norte, Bloco J 1º andar, Brasília, DF 70910-900, Brazil.

²Center of Neuroscience and Cardiovascular Physiology; Department of Physiological Sciences, Biological Sciences Institute, Federal University of Goiás, Goiania, GO 74690-900, Brazil.

³Integrative Laboratory of Cardiovascular and Neurological Pathophysiology; Department of Physiological Sciences, Biological Sciences Institute, Federal University of Goiás, Goiania, GO 74690-900, Brazil.

⁴Graduate Program in Genomics Science and Biotechnology, and Graduate Program in Gerontology; Catholic University of Brasília, Brasília, DF 70790-160, Brazil.

⁵Deceased

*Authors to whom correspondence should be addressed; E-Mail: nina@unb.br; pedrino@ufg.br; Tel.: +55-61-3107-3101.

Abstract

Bioactive plant peptides have received considerable interest due to their potential as antihypertensive agents with lower side effects than antihypertensive drugs. Here, the blood pressure-lowering effects of the Bowman-Birk protease inhibitor, BTCl, and its derived peptides, PepChy and PepTry, were investigated using normotensive (Wistar-WR) and

spontaneously hypertensive rats (SHR). BTCI at about 6 μM and 40 μM inhibits the proteases trypsin and chymotrypsin, respectively, 10-fold more than PepTry (60 μM) and PepChy (400 μM). These molecules also inhibited angiotensin converting enzyme (ACE) with IC_{50} values of 54.6 ± 2.9 ; 24.7 ± 1.1 ; and 24.4 ± 1.1 μM , respectively, occluding its catalytic site, as indicated by molecular docking simulation, mainly for PepChy and PepTry. Gavage administration of BTCI and the peptides promoted a decrease of systolic and diastolic blood pressure and an increase of renal and aortic vascular conductance. These effects were more expressive in SHR than in WR. Additionally, BTCI, PepChy and PepTry promoted an important coronary vasodilation and negative inotropic effects in the isolated perfused hearts. The nitric oxide synthase inhibitor blunted the BTCI and PepChy, but not PepTry cardiac effects. Altogether, these results indicate a possible therapeutic potential of BTCI and its related peptides in the treatment of hypertension.

Key words: hypertension, angiotensin converting enzyme, spontaneously hypertensive rats, bioactive peptide, Bowman-Birk, protease inhibitor, *Vigna unguiculata*.

Introduction

Cardiovascular diseases (CDVs) are one of the main causes responsible for the highest mortality rate in the world¹. Most deaths have been attributed mainly to stroke and heart attacks such as myocardial infarction, coronary artery diseases and atrial fibrillation², in which hypertension and obesity are considered as a major risk factors. Although hypertension was identified in the late fifties as primary risk factor, in the early 21st century, it still represents a global public health challenge and it is estimated to be responsible for at least 45% of deaths worldwide¹. Thus, it is important to identify novel molecules with therapeutic potential for the treatment of hypertension and

others CDVs. Pathophysiological characteristics of hypertension are increased total peripheral resistance³, endothelium dysfunction and decreased blood flow⁴. However, despite of clinical studies and experimental reports about the stiffness of large artery involved in increase of blood pressure, the cause of hypertension remains unknown.

Plant protease inhibitors are of biotechnological importance due their pharmaceutical potential for several diseases, such as cardiovascular and autoimmune diseases, cancer, and inflammatory processes⁵⁻⁹. Protease inhibitors, especially from Kunitz and Bowman-Birk family (BBI), are commonly found in high amount in leguminous seeds, such as soybean, pea and bean. The black-eyed pea trypsin/chymotrypsin inhibitor (BTCI) - the object of the present study - is a member of BBI family isolated from *Vigna unguiculata* (Cowpea) seeds¹⁰. BTCI is a small protein with low-molecular mass (9071 Da) and seven disulfide bonds that are responsible for its remarkable stability and, particularly, for the appropriately conformation of two opposite β -hairpins containing the reactive sites (K26 and F53) against trypsin and chymotrypsin, respectively^{11,12}. This conformation enables the simultaneous and independent inhibition of trypsin and chymotrypsin, driven by an entropic and endothermic process¹³⁻¹⁷. BTCI have been characterized as an enhancer of guanylin-induced natriuresis in isolated rat kidney assay protecting its degradation by chymotrypsin-like proteases. Besides that, BTCI increased urine flow, Na^+ excretion and glomerular filtration rate¹⁸. In addition, intravenous administration of BTCI on Wistar rats showed a similar effect on bradykinin cleavage inhibiting plasma serine proteases as well as enhanced renal aortic vasodilation induced by bradykinin; besides, BTCI-Bradykinin complex induced smooth muscle contraction in dose-dependent manner¹⁹.

Nowadays, blood pressure drugs such as thiazides, β blockers, angiotensin converting enzyme inhibitors, angiotensin receptor antagonists and calcium channel blockers have been currently used for blood pressure control in order to prevent heart attacks and stroke²⁰. However, these antihypertensive drugs can

cause adverse side effects, decreasing the effectiveness of drug treatment²¹. Therefore, interest in developing natural and food products with lower side effects than antihypertensive drugs has been increased²²⁻²⁴. Nevertheless, bioactive plant peptides or synthetic peptides of biotechnological potential in nutraceutical and pharmacological point of view, especially those used for hypertension treatment, have been extensively explored^{23,25,26}.

In the present study, the synthetic cyclic peptides named PepChy and PepTry were designed to contain the same amino acid sequence of the two reactive loops present in BTC1 tridimensional structure¹⁶, each one connected by a disulfide bond. Cyclic peptides contain the same reactive sites of the BTC1 (K26 and F53) responsible for inhibiting trypsin and chymotrypsin, respectively, and also trypsin-*like* and chymotrypsin-*like* proteases. Recently, a tridimensional structure of PepTry in complex with trypsin was solved at 1.15 Å resolution (PDB code 6EAT)²⁷. Similar to BTC1 (PDB code 2G81)¹⁶, this complex is mainly formed by electrostatic interactions involving the lysine reactive site of the PepTry. It is noteworthy that the cyclic peptides were also chosen based on our previous studies from which BTC1 were characterized as: *i*) enhancer of the guanylin-induced natriuresis by inhibiting its degradation through chymotrypsin-*like* proteases in isolated rat kidney¹⁸; *ii*) anticarcinogenic agent in breast cancer cells by inhibiting trypsin-*like*, chymotrypsin-*like* and caspase-*like* proteases of the proteasome 20S, on invasive MDA-MB-231 breast cancer cells and noninvasive MCF-7 breast cancer cells, as well as presenting no effect on mammary epithelial MCF-10A cells^{8,28}; *iii*) potential antihypertensive agent by hemodynamic and cardiovascular effects and its protective action on proteolytic degradation of bradykinin and derived peptides in Wistar rats, via intravenous administration, which were attributed to its ability to inhibit trypsin-*like* and chymotrypsin-*like* proteases¹⁹. Additionally, there are wide benefits and advantages in the use

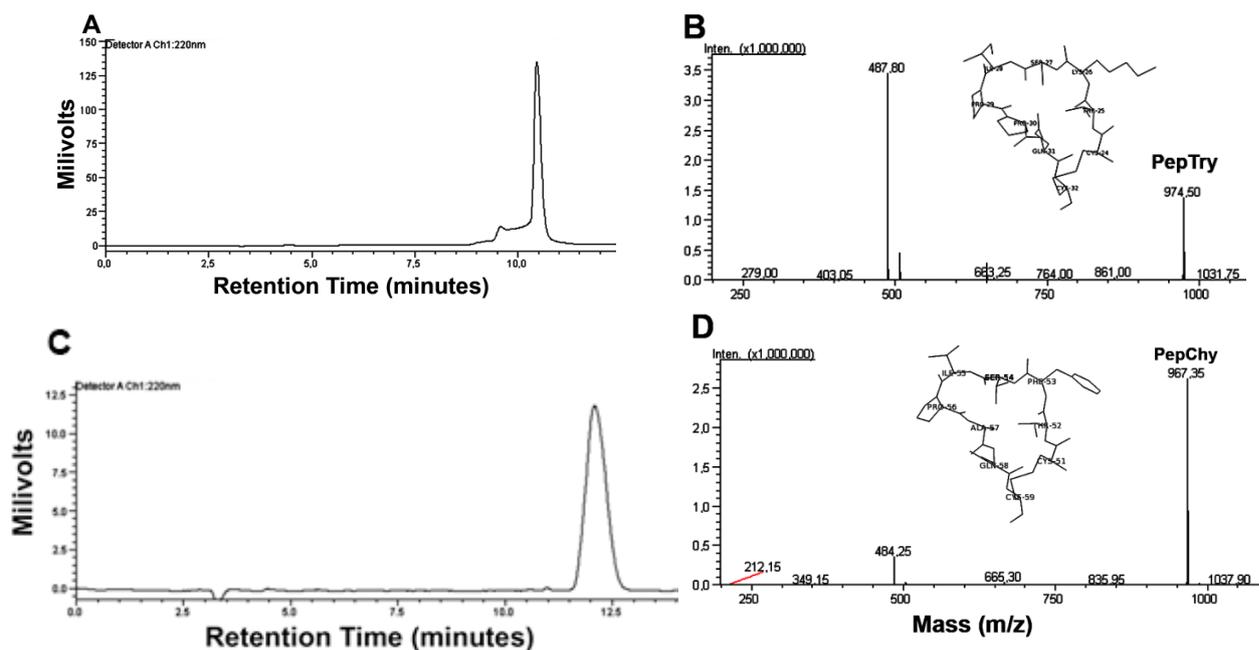
of bioactive peptides from plants and synthetic peptides, such as bio distribution, drug delivery, low side effects, and generally present high specificity and broad spectrum activity. Considering the wide health benefits of Bowman-Birk inhibitors^{6-9,18,19,28-32} and advantages of bioactive peptides from plants in biodistribution and drug delivery of synthetic peptides, the effects of the Bowman-Birk inhibitor BTCI and its derived peptides on blood pressure were investigated in the present study by using normotensive and spontaneously hypertensive rats.

Results

Purification of BTCI and derived peptides PepTry and PepChy

Purification of BTCI from *V. unguiculata* seeds, and synthetic peptides derived from BTCI structure, PepTry (CTKSIPPQC-OH; S-S on Cys 1-9) and PepChy (CTFSIPAQC-OH; S-S on Cys 1-9), and their purity analyses were performed before *in vivo* and *ex vivo* assays. As previously reported, BTCI was purified and presented high purity degree and molecular mass of 9071.6 Da^{10-12,17}. Peptides were chemically synthesized and purified by semi-preparative high performance liquid chromatography (HPLC), as shown in Fig. 1A and 1C. RP-HPLC profile of peptides collected at 10.5 minutes (PepTry) and 12.0 minutes (PepChy) are shown in Fig. 1A and 1C, respectively. The molecular mass of PepTry of 974.5Da and PepChy of 967.35Da and their purity were confirmed by ESI-MS spectrometry, respectively, as indicated by a single spectrum obtained for each peptide (Fig. 1B and 1D).

Figure 1



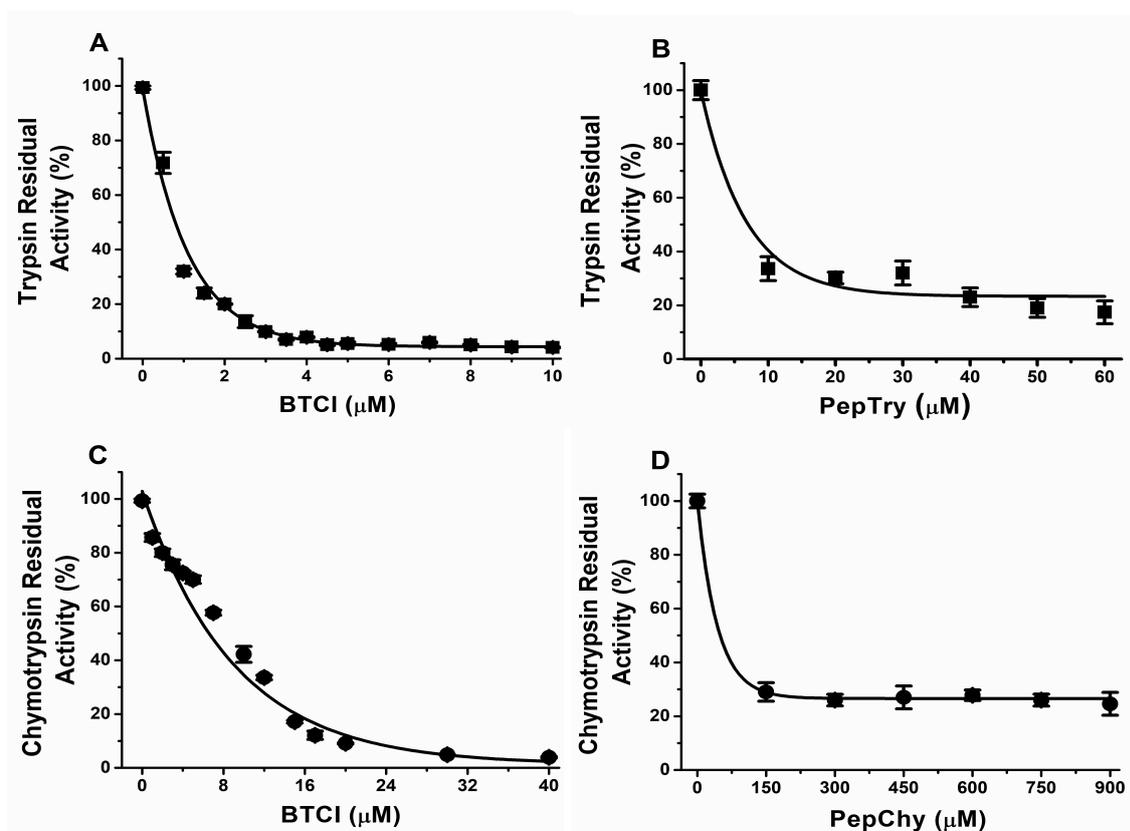
Purification and purity of synthetic peptides PepTry and PepChy. **(A)** and **(C)** Reverse-phase chromatography of PepTry and PepChy, respectively, on C18 Shim-pak VP-ODS column using a linear gradient (5%–95%) of acetonitrile. PepTry and PepChy were eluted at 10.5 minutes and 12.0 minutes and 50% and 55% ACN, respectively. **(B)** and **(D)** EIS-MS spectrometry analysis of PepTry (molecular mass of 974.5 Da) and PepChy (molecular mass of 967.35 Da), respectively. *In sets*: structures of PepTry and PepChy from crystal structure of BTCl¹⁶ (PDB code 2G81).

Inhibition assay of BTCl, PepTry and PepChy against trypsin and chymotrypsin

The inhibitory activity of BTCl and its derived peptides, PepTry and PepChy, was evaluated through the residual enzymatic activity of serine proteases trypsin and chymotrypsin in the presence of increasing concentrations of BTCl and its derived peptides (Fig. 2A-D). In the absence of BTCl and peptides, the proteases cleave BAPNA/GPNA substrates releasing the yellow-colored p-nitroanilide product corresponding to enzymatic activity of 100%³⁴. In the presence of BTCl and peptides, a gradual decay of the proteases activities is observed. BTCl at about 6 μM and 40 μM inhibits trypsin and chymotrypsin, respectively, 10-fold more than PepTry (60 μM) and PepChy (400 μM). The inhibition constants, K_i , of BTCl and PepTry

against trypsin were $0.59 \pm 0.03 \times 10^{-8} \text{ M}^{13}$ and $1.19 \pm 0.04 \times 10^{-7} \text{ M}$, respectively; K_i values against chymotrypsin for BTCI and PepChy were $1.15 \pm 0.04 \times 10^{-7} \text{ M}^{14}$, and $1.21 \pm 0.26 \times 10^{-4} \text{ M}$, respectively. These values indicate that BTCI is a more potent inhibitor against trypsin than chymotrypsin and also that PepTry is more potent than PepChy.

Figure 2



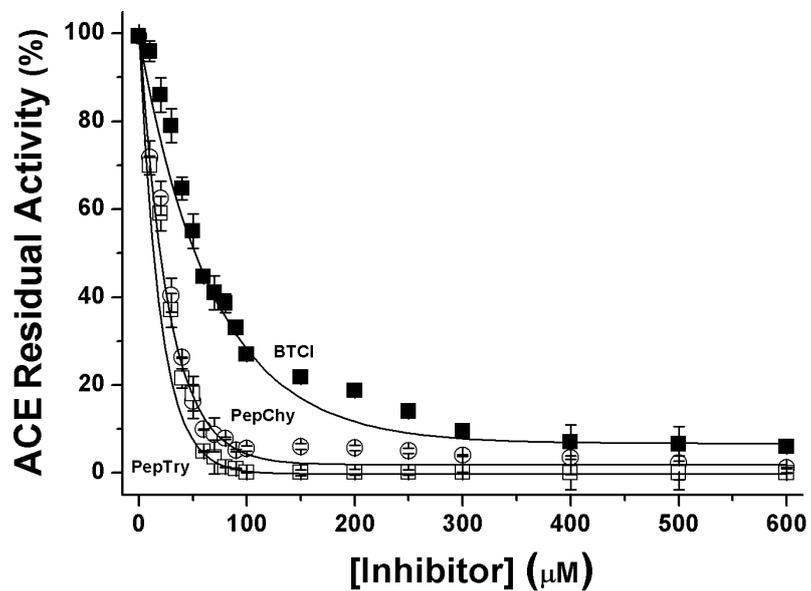
Inhibitory activities of BTCI and its derived peptides. (A) Residual activity of trypsin in the presence of increasing concentrations of BTCI and (B) PepTry. (C) Residual activity of chymotrypsin in the presence of increasing concentrations of BTCI and PepChy (D). The inhibitory assay showed that PepTry and PepChy required a concentration of about 6 and 8-fold higher than BTCI to give a total inhibition of trypsin and chymotrypsin, respectively.

In the present study, the ACE-inhibitory activity of BTCI and its derived peptides, PepChy and PepTry was evaluated at different concentrations (0–600 μM) as shown in Fig. 3. The

ACE-inhibitory activity increased in a dose-dependent pattern. The highest inhibitory value of about 98% was recorded for PepTry and PepChy at 100 μM , whereas about 300 μM of BTCI was required to reach 94% of ACE-inhibition. The ACE-inhibition curves were fitting by a non-linear method from which the IC_{50} values for BTCI, PepChy and PepTry were estimated as $54.6 \pm 2.9 \mu\text{M}$, $24.7 \pm 1.1 \mu\text{M}$, and $24.4 \pm 1.1 \mu\text{M}$, respectively.

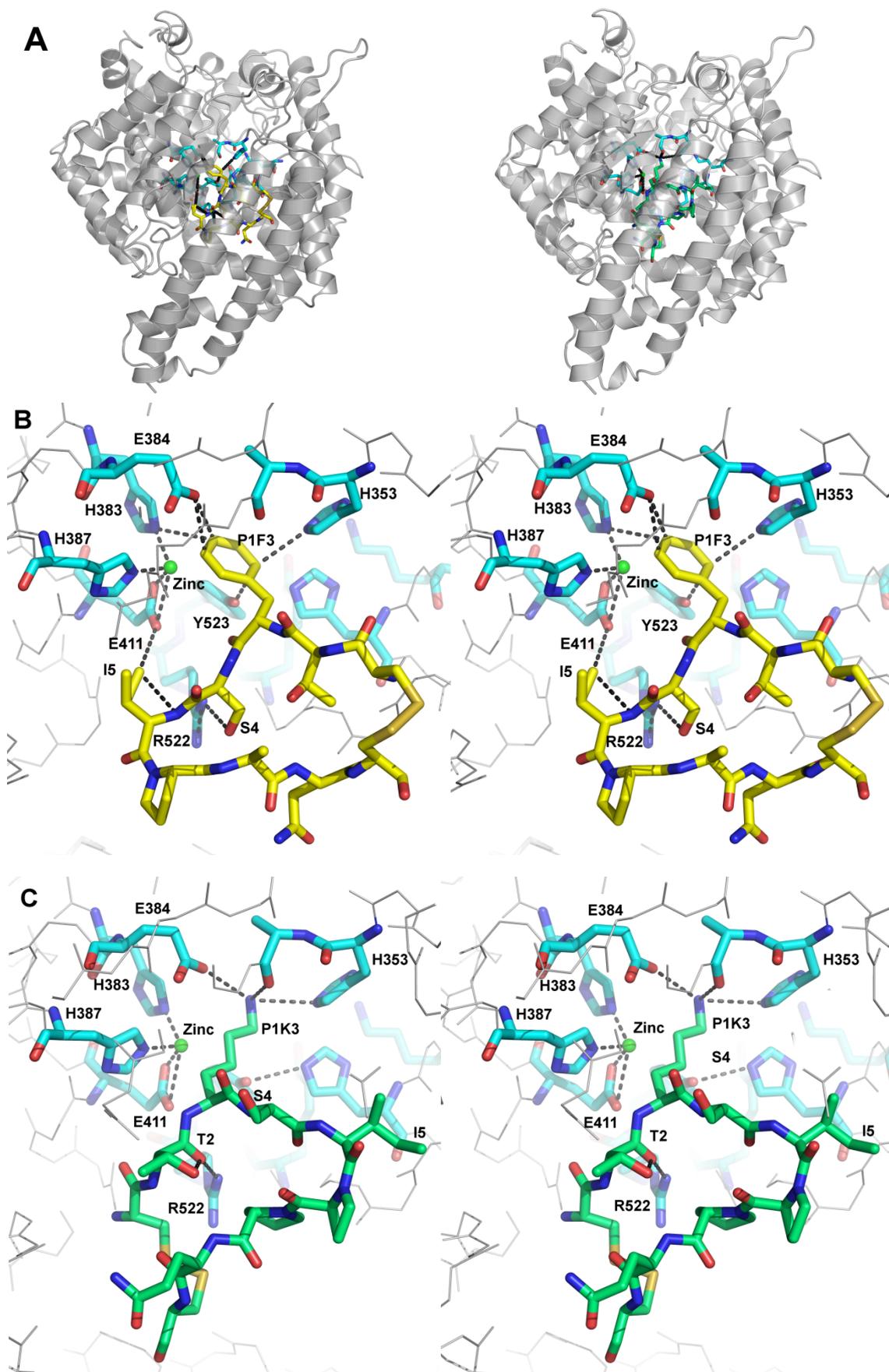
The ACE-inhibitory effects of PepChy and PepTry are consistent with molecular docking simulation. This methodology was used to predict the interactions of the inhibitors (PepChy and PepTry) with ACE by calculating the interaction energies for the best pose of inhibitors closest to catalytic site of the enzyme. The best poses were achieved for both peptides, which occlude the enzyme catalytic pocket (Fig. 4A-C) interacting with ΔG binding energies of about -11.0 kcal/mol. The majority of hydrogen bonds were observed between PepChy and ACE (Fig. 4B) involving three amino acid residues in PepChy (F3, S4 and I5) and six amino acid residues in ACE (R522, E411, Y523, H383, E384 and H353). For PepTry, the majority of hydrogen bonds were observed between two amino acid residues in PepTry (T2 and K3) and three amino acid residues in ACE (R522, E384 and A354). Moreover, electrostatic interaction between PepTry (K3) and ACE (E384) and the T-shaped π - π -interaction between phenyl rings of Y523 in ACE and F3 in PepChy were observed. It is noteworthy that H387, H383, E384 and E411 amino acid residues involved in coordination of Zinc in the native ACE active site also interact with PepChy and PepTry (Fig. 4B-C). Therefore, all results showed that interaction between ACE and peptides occur within the catalytic site leading the complete inhibition of the enzyme, corroborating with the estimated IC_{50} , as described above (Fig. 3).

Figure 3



Inhibitory activities of BTCl (■-■), PepChy (○-○) and PepTry (□-□) against angiotensin converting enzyme (ACE). All molecules present the inhibition closest to 95% and the values of IC_{50} were estimated for BTCl, PepChy and PepTry as $54.6 \pm 2.9 \mu\text{M}$, $24.7 \pm 1.1 \mu\text{M}$, and $24.4 \pm 1.1 \mu\text{M}$, respectively.

Figure 4



Tridimensional structures of the ACE-PepChy and ACE-PepTry complexes obtained by docking. **(A)** ACE (gray cartoon) in complex with PepChy (yellow sticks) and PepTry (green sticks). **(B)** Stereo view (cross-eyed) of ACE active site (blue) with bound PepChy (yellow). Interacting residues of the ACE active site and reactive site of PepChy (PIF3) are labelled. Atoms are coloured as red for oxygen, blue for nitrogen and green sphere for zinc ion. Hydrogen bonds at the complex interface are shown as dotted lines. **(C)** Stereo view (cross-eyed) of ACE active site (blue) with bound PepTry (green). Interacting residues of the ACE active site and reactive site of PepTry (PIK3) are labelled. Atoms are coloured as red for oxygen, blue for nitrogen and green sphere for zinc ion. Hydrogen bonds at the complex interface are shown as dotted lines. The crystallographic structures used by docking procedure were: ACE PDB code 1O8A³⁵, PepTry and PepChy from BTCl¹⁶ (PDB code 2G81).

***In vivo* assays**

Cardiovascular and hemodynamic effects of equimolar concentration (3.31 mM) for all molecules, doses were BTCl (30.0 mg/kg), PepTry (3.3 mg/kg), and PepChy (3.3 mg/kg), or NaCl 0.9% (Vehicle) were evaluated by *in vivo* experiments in normotensive (Wistar, WR) and spontaneously hypertensive rats (SHR) (Fig. 5A-D, 6A-D and 7A-D). As expected, vehicle did not promote significant changes in all of hemodynamic parameters. In contrast, all cardiovascular parameters were modified after the treatment with BTCl and its derived peptides (Fig. 5A-D, 6A-D). The comparison of the maximum response to BTCl, PepChy and PepTry between normotensive and SHR is presented in the Fig. 7A-D.

Cardiovascular effects of BTCl, PepTry and PepChy administrated via gavage on SBP, DBP, RVC and AVC hemodynamic parameters in WR and SHR rats

BTCl in WR(n=6) decreased SBP (140.1 ± 1.3 to 102.0 ± 6.3 mmHg; $\Delta -38.1$ mmHg, from the baseline, Fig. 5A) and DBP (91.5 ± 3.0 to 51.7 ± 3.5 mmHg; $\Delta -39.8$ mmHg, from the baseline, Fig. 5C). Additionally, the drug increased RVC ($72\% \pm 15.3\%$, Fig. 6A) and AVC

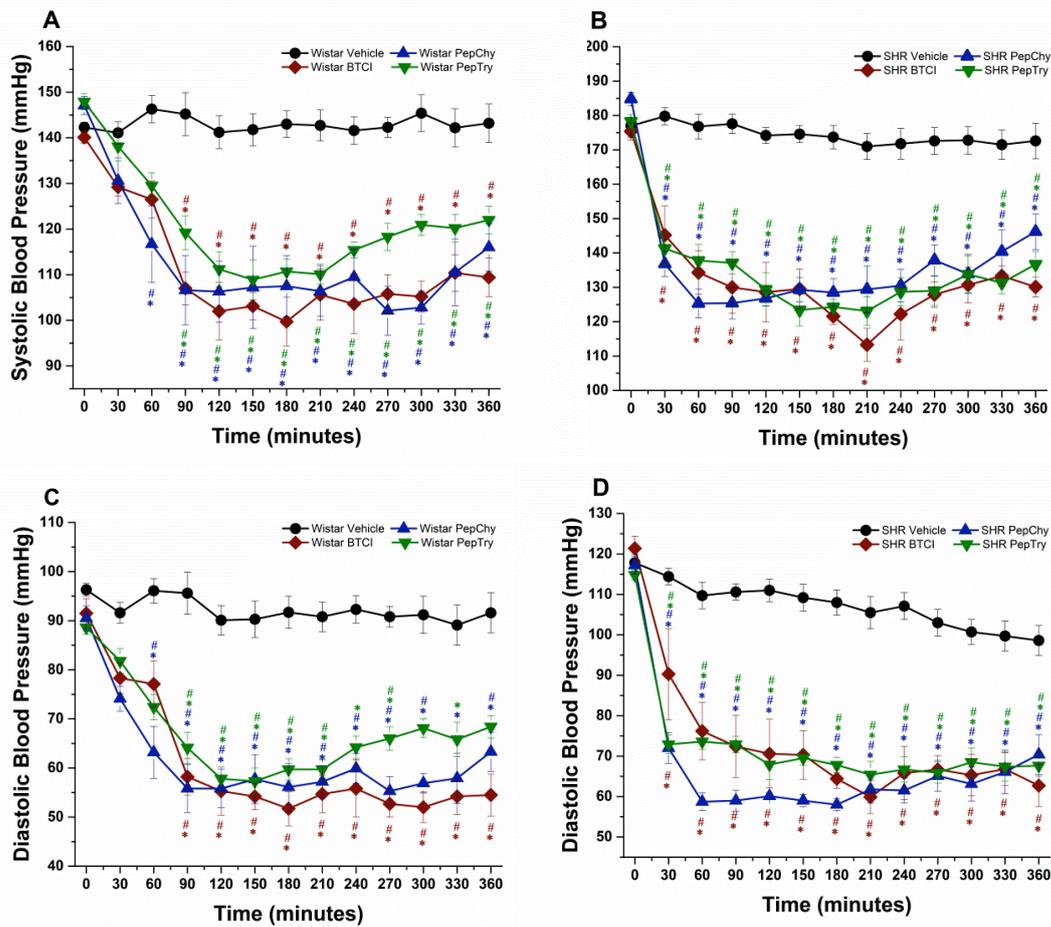
($50.1 \pm 6.5\%$, Fig. 6C). In SHR ($n=6$), a marked decrease of SBP (175.4 ± 2.5 to 113.3 ± 4.8 mmHg; $\Delta -62.3$ mmHg, from de baseline, Fig. 5B) and DBP (121.3 ± 2.7 to 59.9 ± 4.1 mmHg; $\Delta -61.4$ mmHg, from de baseline, Fig. 5D) were noticeable. In addition, an increase of RVC ($78 \pm 10.1\%$, Fig. 6B) and AVC ($80.3 \pm 11.5\%$, Fig. 6D) were achieved. Additionally, Fig. 7 shows the comparison of maximum cardiovascular responses induced by BTCl, PepChy and PepTry between SHR and WR. It is noteworthy that SBP, DBP and AVC variations promoted by BTCl were more expressive in SHR than in WR (Fig. 7A, B and D).

PepTry gavage at dose of $3.3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ in WR rats ($n=6$) resulted in a decrease of SBP (147.9 ± 1.8 to 108.9 ± 4.4 mmHg; $\Delta -39.0$ mmHg, from the baseline, Fig. 5A) and DBP (88.6 ± 1.4 to 57.3 ± 2.7 mmHg; $\Delta -31.3$ mmHg, from the baseline, Fig. 5C). It was observed an increase of RVC ($52.9 \pm 10.1\%$, Fig. 6A) and AVC ($58.7\% \pm 6.6\%$, Fig. 6C). In SHR ($n=6$) were observed a decrease in SBP (178.3 ± 2.0 to 123.4 ± 4.6 mmHg; $\Delta -54.9$ mmHg, from the baseline, Fig. 5B) and DBP (114.8 ± 1.2 mmHg to 65.4 ± 3.3 mmHg; $\Delta -49.4$ mmHg, from the baseline, Fig. 5D). And an increase of RVC was observed ($98.8 \pm 7.9\%$, Fig. 6B) and AVC ($69.9 \pm 8.5\%$, Fig. 6D). Indeed, the variations of SBP, DBP and RVC promoted by PepTry were more expressive in SHR than in WR (Fig. 7A-D).

PepChy oral gavage at dose of $3.3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ in WR rats ($n=6$) decreased SBP (147.1 ± 2.0 to 106.3 ± 6.7 mmHg; $\Delta -40.8$ mmHg, from the baseline, Fig. 5A) and DBP in (90.5 ± 2.5 to 55.8 ± 3.9 mmHg; $\Delta -34.7$ mmHg, from the baseline, Fig. 5C). In addition, RVC ($92.30 \pm 19.9\%$, Fig. 6A) and AVC ($58.2\% \pm 16.8\%$ Fig. 6C) increased. In SHR ($n=6$), the PepChy oral gavage results in decreased SBP (184.8 ± 2.0 to 126.8 ± 2.3 mmHg; $\Delta -58.0$ mmHg, from the baseline, Fig. 5B) and DBP in (117.2 ± 2.2 to 59.0 ± 2.6 ; $\Delta -58.2$ mmHg, from the baseline, Fig. 5D). It was observed an increase of RVC ($105.0 \pm 12.5\%$, Fig. 6B) and AVC

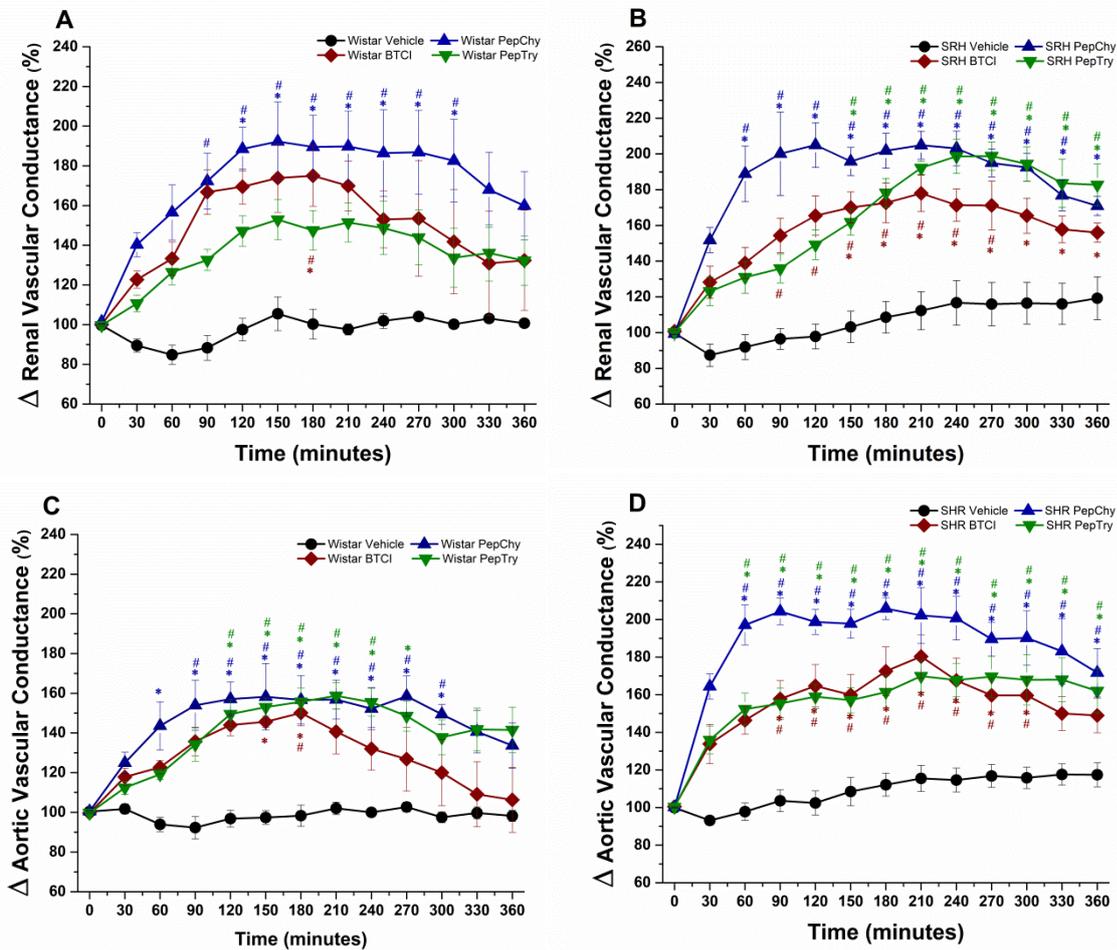
($105.8 \pm 5.8\%$, Fig. 6D). As noticed for BTCI and PepTry, all hemodynamics responses and cardiovascular parameters in both WR and SHR were significantly altered. In addition, the changes in SBP, DBP and AVC promoted by PepChy were more expressive in SHR than in WR (Fig. 7A-D).

Figure 5



Hemodynamic effects in WR and SHR induced by gavage administration of BTCI ($30.0 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), PepTry ($3.3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) and PepChy ($3.3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) or Vehicle ($\text{NaCl } 0.9\%$), in anesthetized rats. **(A)** Systolic blood pressure (SBP) in Wistar; **(B)** Systolic blood pressure (SBP) in SHR; **(C)** Diastolic blood pressure (DBP) in Wistar; **(D)** Diastolic blood pressure (DBP) in SHR. The results are expressed as the mean \pm SEM. * compared to vehicle; # compared to basal time. $p < 0.05$.

Figure 6

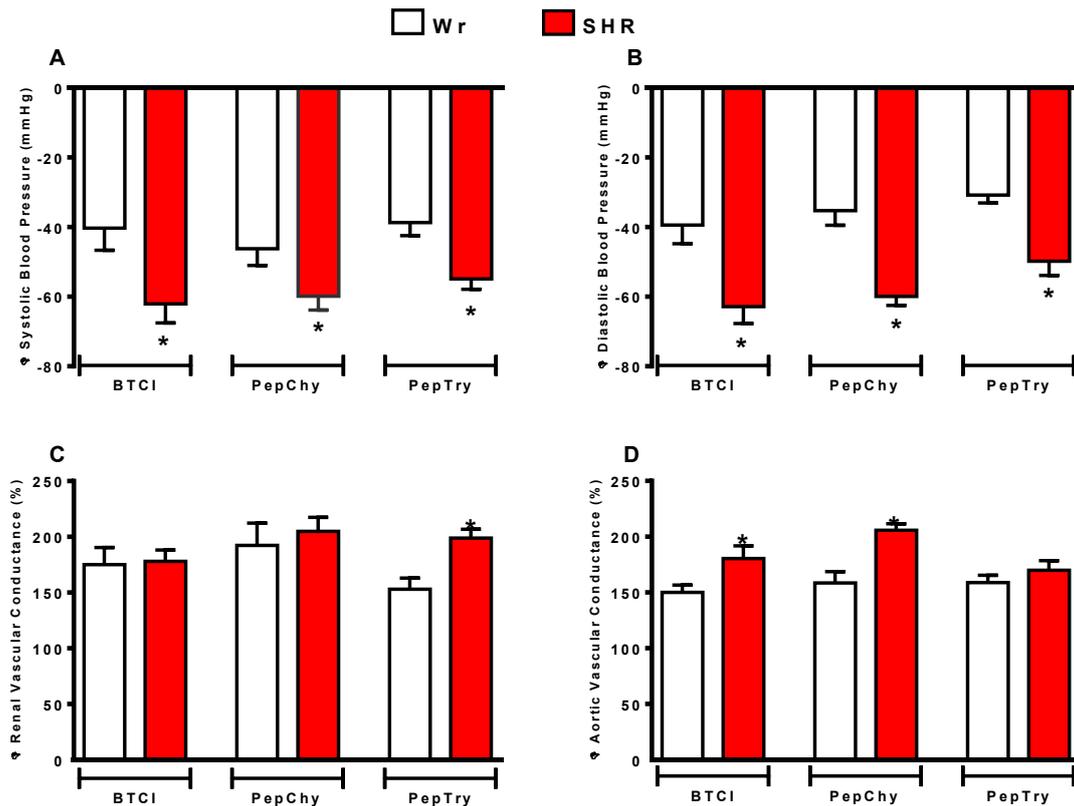


Cardiovascular responses induced by gavage administration of BTCl ($30.0 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), PepTry ($3.3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) and PepChy ($3.3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) or Vehicle (NaCl 0.9%), in anesthetized rats. **(A)** Renal vascular conductance (RVC) in Wistar; **(B)** Renal vascular conductance (RVC) in SHR; **(C)** Aortic vascular conductance (AVC) in Wistar **(D)** Aortic vascular conductance (AVC) in SHR. The results are expressed as the mean \pm SEM. * compared to vehicle; # compared to basal time. $p < 0.05$.

As shown in the Fig. 5, 6 and 7, the values of hemodynamic parameters evaluated in WR rats in the presence of BTCl and derived peptides presented reduction of SBP and DBP. On the other hand, the values of RAC and AVC increased after administration of BTCl and peptides with the highest response for BTCl and PepChy at 180 minutes and PepTry at 270 minutes. In the SHR rats, the values of SBP and DBP were similar with faster reduction for BTCl and

PepChy, when compared to the PepTry. In contrast, it was observed an increase of the RAC and AVC hemodynamic parameters after 30 minute administration of BTCl and peptides with greater expressiveness for PepChy.

Figure 7



The maximum response induced by gavage administration of BTCl ($30.0 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), PepTry ($3.3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) and PepChy ($3.3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) in anesthetized WR rats ($n=6$) and SHR ($n=6$). **(A)** Systolic blood pressure (SBP); **(B)** Diastolic blood pressure (DBP); **(C)** Renal vascular conductance (RVC); **(D)** Aortic vascular conductance (AVC). The results are expressed as the mean \pm SEM. * compared to WR. $p < 0.05$.

The results presented in Fig. 6A-D, show that up to 180 minutes significant increase of the renal and aortic conductance for all molecules was achieved, compatible with vasodilation effect on the respective arteries. Indeed, comparing the WR and SHR models studied for BTCl, it can be observed that up to 180 minutes the measured values were similar, and

differed from 180 to 360 minutes. At 360 minutes, the values for the WR rats drastically decreased near to the basal level. These data indicate that vasodilation of the renal artery was greater than the aortic artery (Fig. 6A and 6C). It is noteworthy the expressive increase of CVR and AVC for PepChy in both WR and SHR models (Fig. 6A-D). Altogether the *in vivo* assays suggest that BTCl and related peptides had a greater hypotensive effect in SHR than in WR rats (Fig. 7A-D).

Effects of BTCl, PepChy and PepTry on left ventricular contractility and coronary vasodilation

The effects of BTCl, PepChy and PepTry on left ventricular contractility and coronary vasomotricity in the isolated hearts are presented in Fig. 8A-L. All the molecules have shown expressive changes on left ventricular contractility and coronary vasodilation.

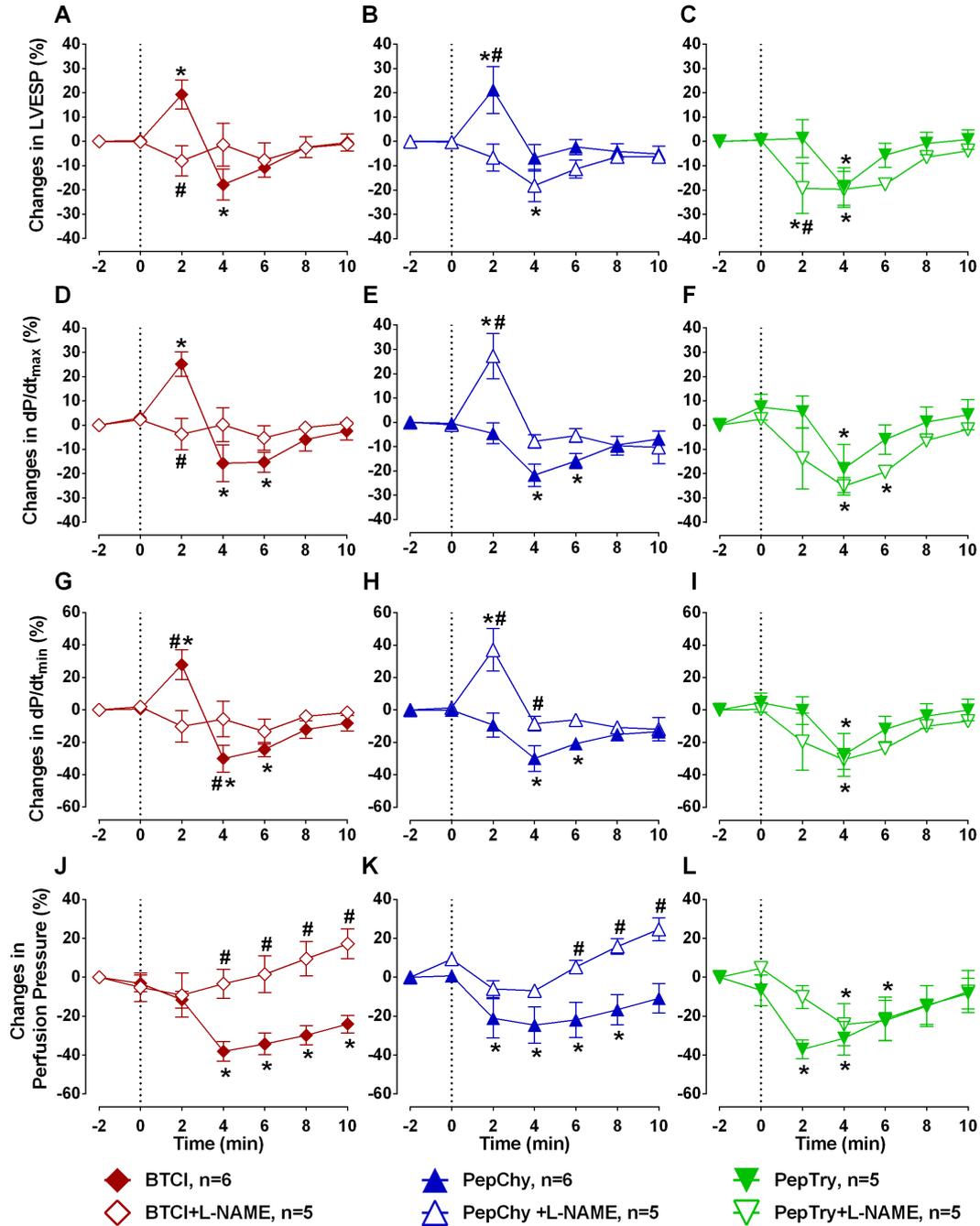
The BTCl infusion promoted a transitory increase followed by a significative reduction in the left ventricular end-systolic pressure (LVESP, E_{\max} : $-17.83 \pm 4.34\%$, $p < 0.05$), maximal rate of left ventricular pressure rise (dP/dt_{\max} , E_{\max} : $-15.73 \pm 5.22\%$, $p < 0.05$) and maximal rate of left ventricular pressure decline (dP/dt_{\min} , E_{\max} : $-30.15 \pm 7.21\%$, $p < 0.05$) (Fig. 8A, D and G). BTCl also promoted a coronary vasodilation observed by the reduction of the perfusion pressure (E_{\max} : $-38.08 \pm 5.77\%$, $p < 0.05$) (Fig. 8J) without changing the heart rate (data not shown). The pre-treatment with L-NAME blunted the cardiac effects of the BTCl.

Similarly to BTCl, PepChy induced a significative reduction in the LVESP (E_{\max} : $-18.13 \pm 2.38\%$, $p < 0.05$), dP/dt_{\max} (E_{\max} : $-21.73 \pm 3.03\%$, $p < 0.05$) and dP/dt_{\min} (E_{\max} : $-29.95 \pm 4.08\%$, $p < 0.05$) (Fig. 8B, E and H). This peptide also promoted a reduction of the perfusion pressure (E_{\max} : $-24.59 \pm 3.94\%$, $p < 0.05$) (Fig. 8K). The pre-treatment with L-NAME abolished these

effects. Unexpectedly, PepChy promoted a transitory increase in the LVESP, dP/dt_{max} and dP/dt_{min} and dt/dt_{max} and dP/dt_{min} in the presence of L-NAME (Fig. 8B, E and H). The heart rate was not changed by PepChy (data not shown).

The perfusion with PepTry in the isolated hearts also evoked a significant reduction in the LVESP (E_{max} : $-18.55 \pm 2.70\%$, $p < 0.05$), dP/dt_{max} (E_{max} : $-17.89 \pm 3.29\%$, $p < 0.05$) and dP/dt_{min} (E_{max} : $-27.78 \pm 4.15\%$, $p < 0.05$) (Fig. 8C, F and I). This peptide also induced a significant decrease in the perfusion pressure (E_{max} : $-37.09 \pm 5.12\%$, $p < 0.05$) (Fig. 8L). No changes were observed in the heart (data not shown). The treatment with L-NAME only attenuated the reduction of the LVESP promoted by PepTry (Fig. 8C), but did not inhibit the effects on dP/dt_{max} , dP/dt_{min} , or perfusion pressure (Fig. 8F, I and L).

Figure 8



Effects of the BTCl, PepChy and PepTry in the isolated rat hearts. Effects of the PepChy, BTCl and PepTry in the (A-C) Left ventricular end-systolic pressure (LVESP), (D-F) Maximal Rate of Left Ventricular Pressure Rise (dP/dt_{max}), (G-I) Maximal Rate of Left Ventricular Pressure Decline (dP/dt_{min}), and (J-L) Perfusion Pressure. The dotted line represents the beginning of infusion of the peptides. Data are reported as mean \pm SE. * p <0.05 vs. baseline, # p <0.05 vs. between time points. Two-way ANOVA followed by Sidak's multiple comparison post-test.

Discussion

Hypertension is a worldwide health tricky problem considered a major risk factor for stroke and heart attacks and cardiovascular morbidity and mortality as well as renal diseases. Most of the drug classes in combination and in low doses provide several medical benefits in antihypertensive therapies and preventing renal, cardiovascular and non-vascular diseases, such as glaucoma and diabetic²⁰. Nevertheless, the adverse side effects in some patients have been responsible for limitations and reduced compliance of current treatments^{20,21,36}. Thus, it is important to identify novel molecules, as natural and synthetic or modified compounds, for drug development with therapeutic potential for treatment of hypertension and others cardiovascular diseases^{22,37}. The present study the hypotensive and vasodilator property of BTCI and two newly synthesized peptides derived from BTCI, namely PepChy and PepTry were investigated. Additionally, the possible mechanism of action underlying its hypotensive effects was evaluated.

BTCI is well- characterized as “double-headed” protease inhibitor capable to inhibit trypsin and chymotrypsin independently and simultaneously irreversibly blocking the enzyme active site through its two specific reactive sites (P1), K26 and F53, respectively^{11,13-16,38,39}. Here, bioactive peptides derived from BTCI were designed to contain these reactive sites for trypsin (PepTry) and chymotrypsin (PepChy), which were able to inhibit the proteases with less affinity than BTCI, as indicated by inhibition constants. Comparatively, the lower affinity of peptides can be due to lacking of structural regions such as those stabilizing the whole interface of the BTCI-protease complex. This is in agreement with previous reported data in which cyclic peptides from BBI family with additional amino acid residues after the disulfide bond presented a highest inhibitory activity against proteases^{40,41}.

Bioactive peptides have been described as a blood-pressure lowering agents by decreasing renin or angiotensin-converting enzyme (ACE) activities, and by regulating the NO synthesis pathway^{24,25}. Among them, the peptides with high antihypertensive potency have been designed based on the side chain amino acid cleavage position. Some of them containing charged (arginine and/or lysine), hydrophobic (valine, isoleucine, proline) and mainly aromatic amino acids (phenylalanine, tyrosine) residues were identified as ACE inhibitors and characterized as potent antihypertensive agents⁴²⁻⁴⁴. A BIOPEP database of biologically active peptides, including the ACE-inhibitors, and amino acid sequence is available at <http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/pl/biopep>⁴³. Nevertheless, to date, no cyclic peptides derived from BBIs, as BTCI, containing reactive sites formed by aromatic and positive charged amino acid residues, were investigated as antihypertensive agents.

Similarly to BTCI, the two cyclic peptides contain the same reactive sites K26 and F53 responsible for inhibiting trypsin and chymotrypsin, respectively and also trypsin- and chymotrypsin-*like* proteases. These peptides were chosen based on our previous studies where, the natriuretic, hemodynamic and cardiovascular and anticarcinogenic effects of BTCI were attributed to its ability to inhibit trypsin and chymotrypsin-*like* proteases^{8,18,19,28}. Therefore, as expected, all results showed that blood pressure-lowering on WR and SHR is associated with the capability of BTCI and both peptides to inhibit proteases, such as ACE, and other trypsin/chymotrypsin-*like* proteases. Therefore, here, the ACE-inhibitory activity of the BTCI, PepChy and PepTry increased in a dose-dependent manner presenting the IC₅₀ value estimated as $54.6 \pm 2.9 \mu\text{M}$, $24.7 \pm 1.1 \mu\text{M}$, and $24.4 \pm 1.1 \mu\text{M}$, respectively.

The inhibition activities of BTCI and peptides against ACE was performed in order to investigate the possible mechanism involved in blood pressure-lowering on WR and SHR, as

ACE is a protease involved in blood pressure control and BTCI and tested peptides are proteases inhibitors. As observed, ACE maximum concentration of BTCI inhibition were greater (300 μM) compared with trypsin and chymotrypsin inhibition (6 μM and 40 μM , respectively) indicating that BTCI is more potent inhibitor against trypsin and chymotrypsin than ACE. Therefore, the maximum concentration differences to inhibit ACE by BTCI compared to those proteases can be attributed to conformational differences of the active site of ACE leading to steric impediments that avoid or hinder optimal interaction between BTCI and ACE molecules.

Based on these results, the inhibitory activities of BTCI and peptides against ACE may be mainly due the presence of the basic (lysine) and the hydrophobic (phenylalanine) amino acids in the reactive loops that also determine the potency of protein and peptides inhibition of trypsin and chymotrypsin proteases. In all three molecules, BTCI and peptides, the positively charged ϵ -amine group derived from lysine and the active site occlusion by phenylalanine interactions might have closed to the ACE active site. It is noteworthy that the peptides containing aromatic, positively charged and some hydrophobic residues (proline, isoleucine, valine and leucine), like BTCI, have been reported as strong ACE-inhibitors and antihypertensive agents⁴⁴. Additionally, the IC_{50} values of BTCI, PepChy and PepTry are in agreement with those ACE-inhibitory peptides from several proteins deposited in the BIOPEP database (<http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/en/biopep>)⁴³.

The ACE-inhibitory effects of PepChy and PepTry were consistent with molecular docking simulation. As seen in Fig. 4, the hydrophobic phenylalanine and the charged lysine amino acids in all the inhibitors make the most important hydrophobic and electrostatic interactions in the ACE active site and are responsible for inhibiting ACE activity.

The docking simulation showed that the interaction between two peptides and ACE occurs with the key residues within the catalytic site. It consists of E411, Y523, V518, H353, H513, E384, A354, Y520, E384 and Zn²⁺. The stability of ACE peptides interaction is represented by the binding energy values, which is dependent of the number of hydrogen bonds, hydrophobic and electrostatic interactions, as well as interaction with Zn²⁺ cofactor. Typically, high stability is related with a better inhibition showing lower IC₅₀ value. The best results were obtained for PepChy and PepTry at the ACE active site near to the Zn²⁺ ion. The lowest values of binding energies and IC₅₀ of about -11.0 kcal/mol and 24.0 μM, respectively, were obtained, which were compatible with the high stability of ACE-peptides complex. The peptides bind to the active site pocket of ACE through hydrogen bonds, hydrophobic and electrostatic forces. In addition, PepChy and PepTry are also linked through F3 and K3, respectively, with specific amino acid side chains responsible for zinc coordination, such as E411, H383, E384, by induced ion-dipole and electrostatic interactions. It has been reported that the same interactions play an important role in stabilizing the interface of the ACE-lisinopril and selenium analogues of captopril complexes^{33,35}. Therefore, these results suggested that these interactions contribute to the stabilization of the ACE-peptide complex, which lead to strong ACE-inhibitory activity. Finally, altogether, these results points out the important *in vitro* and *in vivo* antihypertensive properties and a potential role of these molecules in the reduction of blood pressure, discussed below.

The present study was firstly motivated by inhibitory effects of BTCI related to its natriuretic effects on renal system model of Wistar rats. As reported, BTCI enhanced guanylin-induced natriuresis¹⁸ and showed a protective effect on bradykinin towards plasma serine proteases cleavage as well as enhanced renal aortic vasodilation induced by bradykinin¹⁹. Furthermore,

it is also known that the cyclic peptides with nine amino acid residues stabilised by one disulfide bond present, besides their inhibitory activity against trypsin and chymotrypsin through lysine and phenylalanine reactive sites, respectively, structural rigidity and stability and can be tested and used as a natural protease inhibitor^{40,41}. Based on structural and inhibitory property of BTCI and peptides, as well as the natriuretic and hemodynamic effects of BTCI, the hypotensive effects through the peripheral vascular resistance and endothelial nitric oxide synthase (*eNOS*)/nitric oxide (NO) (*eNOS/NO*) pathway *in vivo* and *ex vivo*, respectively, were investigated in the present study.

The results of *in vivo* assays showed: I. BTCI and related peptides promoted a decrease of SBP and DBP and renal and aortic vasodilation in WR and SHR; II. The decrease in SBP, DBP and aortic vasodilation promoted by BTCI and PepChy is more expressive in SHR than WR; III. The reduction in SBP, DBP and renal vasodilation caused by PepTry administration is more expressive in SHR than WR. Taken together, the results demonstrate that BTCI and related peptides have antihypertensive and vasodilator effects. Also, the present findings highlight the possible therapeutic potential in the treatment of hypertension of those compounds.

In general, blood pressure-lowering effects of drugs or chemical compounds and bioactive peptides are related with the ability to modulate the renin-angiotensin system by the inhibition of renin or angiotensin-converting enzyme (ACE) and also by increase enzymatic activity of the endothelial nitric oxide synthase (*eNOS*) leading to increase nitric oxide (NO)^{24,25}. Additionally, as known, the effects of antihypertensive drugs by reducing systolic or diastolic blood pressure daily are important factor to prevent the risk of cardiovascular diseases and stroke. Our data demonstrate that BTCI and the peptides administration promoted a decrease of SBP and DBP and an increase in RVC and AVC in WR and SHR. These increases indicate

vasodilation in the renal and aortic territories, which possibly leads to the hypotension observed after oral administration of BTCI and the peptides. All results are consistent with our previous data, which were showed that BTCI has a protective effect on bradykinin cleavage through inhibition of plasma serine proteases and presented the vasodilation and hypotensive responses by intravenous administration¹⁹. It has also been demonstrated that BTCI enhanced the effect of guanylin on natriuresis increasing urine flow, Na⁺ excretion and glomerular filtration rate¹⁸. In addition, the greatest effects of guanylin on osmolar clearance were achieved in the presence of BTCI. It is noteworthy that the results obtained here are consistent with those reported for bioactive peptides, hydrolysed proteins and commercial compounds that reduce SBP and DBP and increase renal and aortic vasodilation^{25,44-46}. Altogether, these effects and the sodium and water/urine excretion (pressure-natriuresis) promoted by BTCI can provide a compensatory effect on blood pressure lowering by decreasing the peripheral vascular resistance⁴⁷⁻⁴⁹.

PepTry and PepChy also showed vascular relaxation and consequent hypotensive effects *in vivo*. We highlight the PepChy effects, since this peptide promoted expressive aortic vasodilation in SHR. Additionally, we also demonstrated that hypotensive responses observed by peptides administration were more expressive in SHR than in WR. Therefore, these results indicate a possible therapeutic potential of BTCI and its related peptides in the treatment of hypertension.

The renin-angiotensin system (RAS) plays a crucial role to regulate blood pressure and electrolyte homeostasis. ACE catalyzes the degradation of the blood pressure lowering bradykinin that is responsible for the release of prostacyclin and nitric oxide (NO) on blood vessels^{35,50-53}. These systems were tested in *ex vivo assays* only for BTCI and PepChy,

considering their higher expressive hypotensive effects *in vivo* compared to PepTry. Interestingly, no inhibitory effects of BTCI and its derived peptide, PepChy, were detected in the specific systems.

Nevertheless, these peptides were able to promote an important coronary vasodilation observed by the reduction in the perfusion pressure of the isolated hearts. These findings are in agreement with the increase of the vascular conductance observed in *in vivo* assays. The coronary vasodilation induced by BTCI or PepChy was completely blunted by the nitric oxide synthase inhibition. The involvement of the eNOS/NO pathway in the vascular tonus of the coronary arteries has been reported by previous studies⁵⁴⁻⁵⁶. However, the pre-treatment with L-NAME did not change the reduction on the perfusion pressure induced by PepTry. Thus, the coronary vasodilation induced by PepTry seems to be mediated by a nitric oxide-independent manner. Further investigation is needed to better understand this effect. Additionally, we observed that BTCI and PepChy promoted negative inotropic effect in isolated hearts that was inhibited by the non-selective NOS inhibitor, L-NAME. Previous studies have shown the involvement of the NO on myocardial contractility⁵⁷⁻⁵⁹. High concentration of the NO can increase the production of the cGMP by activating the guanylyl cyclase resulting in the activation of a PKG. The activation of PKG can block the L-type Ca²⁺ channels in the plasma membrane of the cardiomyocytes and reduce the ventricular contractility⁵⁷. The pre-treatment with L-NAME was not able to blunt the effects of the PepTry on cardiac contractility, suggesting again, that the nitric oxide is not involved in the effects evoked by this peptide.

In conclusion, the presented results showed that BTCI, PepChy and PepTry promoted reduction in the blood pressure and coronary vasodilation. Thus, these data suggest these peptides have

great therapeutic potential that can form the basis for further studies involving the development of new drugs for treatment of cardiovascular diseases.

Material and Methods

Purification of BTCI and its derived peptides, PepTry and PepChy

BTCI was purified from *Vigna unguiculata* seeds as previously described by Ventura et al.^{10,60}. In brief, crude extract (CE) from *Vigna unguiculata* seeds were obtained after incubation of homogenized seeds in distilled water in the presence of 10.0 μ M of phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF), a synthetic protease inhibitor, at 4 °C for 12 hours, followed by precipitation of 2.5% (v/v) TCA (trichloroacetic acid PA-C₂HCl₃O₂) (Sigma Aldrich, USA) and 50% ammonium sulfate ((NH₄)₂ SO₄) (m/v). The suspension was centrifuged at 8.000g for 40 minutes at 4 °C and the precipitate (CE) was collected, dialyzed and stored at 4 °C. The purification of BTCI was achieved with one step of ion exchange chromatography using previously activated DEAE-cellulose resin (Sigma Aldrich). The proteins were eluted using 10 mM phosphate buffer, pH 7.3 and a linear gradient of 0-800 mM NaCl. The fractions corresponding to BTCI were dialyzed and lyophilized.

PepTry (CTKSIPPQC-OH; S-S on Cys 1-9) and PepChy (CTFSIPAQC-OH; S-S on Cys 1-9) were purchased from AminoTech Research and Development (São Paulo, SP, Brazil), which were synthesized by standard solid-phase method using the Fmoc strategy^{61,62}. Fmoc-amino acids and reagents were purchased from NovaSyn TGA (Novabiochem, San Diego, CA, USA). Peptides were synthesized through steps of deprotection of the Fmoc group using 20% (v/v) 4-methylpiperidine in dimethylformamide (DMF). The complete peptide linked to the resin was obtained after successive cycles of peptide bond formation using 2-

(1H-Benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylammonium tetrafluoroborate (TBTU) in DMF at room temperature and followed by removal of Fmoc groups and coupling with the subsequent amino acids⁶³. The peptide was cleaved from the resin by 92.5% (v/v) trifluoroacetic acid (TFA), 2.5% (v/v) thioanisole, 2.5% (v/v) 1,2-ethanedithiol, 2.5% (v/v) and precipitated using diisopropyl ether (−20 °C). The precipitate was solubilized using 50% (v/v) acetonitrile (ACN) and then lyophilized. The formation of disulfide bonds was achieved in diluted solution buffered adjusted with NH₄OH at pH 8.

Peptides were purified by reverse-phase high performance liquid chromatography, RP-HPLC (Class LC-20A from Shimadzu Corp., Kyoto, Japan), using a semi-preparative C18 Shim-pak VP-ODS column (5µm, 4.6 × 250 mm) (Shimadzu Corp., Kyoto, Japan) with a linear gradient (5%–45%) of ACN. The column was washed with 95% ACN and 0.1% TFA and equilibrated with 5% ACN and 0.1% TFA. Crude peptide extract was applied to the column subjected to a linear gradient (5 to 95%) of ACN for 90 minutes at a flow rate of 1.0 mL/min. The chromatographic profile was followed by reading the absorbance at 220 nm.

The purity and molecular mass of BTCI and peptides were estimated by electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) on a LCMS-2020 system (Shimadzu Corp., Kyoto, Japan). The positive reflector with external calibration, as well as molecular mass ranges of calibrants comprise the molecular masses of BTCI 9100 Da and peptides of about 950 Da. were considered. Concentration of the peptides was estimated using absorbance at 215, 225 and 205 nm, as follows⁶⁴:

$$C (\mu\text{g}/\text{mL}) = \frac{[(A^{215} - A^{225}) \times 144] + (A^{205} \times 31)}{2} \times \text{dilution factor} \quad (1)$$

Inhibition assay of BTCI, PepTry and PepChy against trypsin and chymotrypsin

The inhibitory activities of BTCI, PepTry and PepChy against trypsin and chymotrypsin activities were assayed using the substrates Na-benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide (BAPNA) and n-glutaryl-L-phenylalanine-p-nitroanilide (GPNA), respectively (Sigma)^{16,34}. The enzymatic assays were performed in 50 mM Tris-HCl, CaCl₂ 20 mM pH 7.6 for chymotrypsin or pH 8.2 for trypsin. Forty μ L of BTCI and PepTry (0 to 20 μ M) and BTCI and PepChy (0 to 50 μ M) were incubated with 40 μ L of trypsin (2.57 μ M) or chymotrypsin (28.60 μ M), respectively, in a 96-well plate at room temperature for 15 minutes. Then, 200 μ L BAPNA (0.064 mg/mL) or GPNA (0.8 mg/mL) were added. The reaction was stopped by addition of 30 μ L 30% acetic acid (v/v). The enzymatic hydrolysis of the substrate was evaluated by recording the absorbance at 410 nm. The residual activities of the enzymes, in the presence of inhibitors, were estimated considering the free enzyme activity to be 100%. Inhibition constants of the enzyme-inhibitor complexes, K_i , were calculated from fitted inhibition curves⁶⁵ using the GRAFIT program version 3 (Erithacus Software, Horley, Surrey, United Kingdom).

ACE inhibition assay

Inhibitory activities of peptides PepTry and PepChy and BTCI against ACE were performed according to Hayakari, et al. (1978) using the synthetic substrate hippuryl-L-histidyl-L-leucine (HHL)⁶⁶. Briefly, ACE stock solution was obtained from rabbit lung in 10 mM sodium phosphate buffer, pH 8.3 and BTCI and peptides stock solutions were prepared in MilliQ water (m/v). Concentration of BTCI was estimated from spectrophotometric absorbance at 280 nm based $A_{280}^{1\%} = 8.23$. Concentration of PepTry and PepChy were estimated according to equation 1. BTCI and peptides were diluted in 10 mM sodium phosphate buffer pH 8.3 to obtain the concentration ranging from 0 to 600 μ M. Ten μ L

peptide solutions were pre-incubated with 10 μ L of ACE containing 0.5 M NaCl at 37 $^{\circ}$ C for 10 min. The mixture was then incubated with 10 μ L substrate containing 12.5 mM HHL in 10 mM sodium phosphate buffer, pH 8.3 and 300 mM NaCl at 37 $^{\circ}$ C for 45 min. The enzymatic reaction was terminated by adding a mixture containing 550 μ L of 100 mM sodium phosphate pH 8.3 and 332.5 μ L of 3% (m/v) 2,4,6-trichloro-s-triazine (TT) (in dioxane). Mixture was incubated for 5 min. at room temperature and then centrifuged at 1000g for 10 min at 4 $^{\circ}$ C. The absorbance values of supernatants containing hippuric acid liberated from HHL were recorded at 382 nm using the Jasco Spectrophotometer V-530 (Jasco Analytical Instruments, Tokyo, Japan). IC₅₀ values for peptides and BTCI were calculated from nonlinear regression curve of ACE residual activity (%) *versus* inhibitors (BTCI, PepTry and PepChy) concentration (μ M) using Origin software (OriginLab Corporation, USA). The control was prepared containing only the substrate without enzyme solution. The assay was performed in triplicate.

Interaction of Peptides with Angiotensin converting enzyme (ACE) by docking procedure

The binding of peptides into ACE active site was performed using the Evolutionary Algorithm for Docking (EADock)⁶⁷, available at <http://www.swissdock.ch/docking#>. This algorithm is based on two adjust functions of molecular docking, interfaced with the CHARMM package for binding energy calculations and output the atomic coordinates of the protein-ligand complex. The tridimensional coordinates of target protein (ACE, PDB code 1O8A) and ligands, PepTry and PepChy, derived from BTCI structure (PDB code 3RU4), were considered for docking procedure. The tridimensional coordinates of ligands were prepared using Pymol program (DeLano Scientific LLC) and converted into a MOL2 file

format with all hydrogen using the Open Babel GUI programa⁶⁸ version 2.4.1. The best model was ranked according to position of ligands closest to ACE active site, as well as the docking scores (Full Fitness) and the most favorable estimated Gibbs free energy values for the ACE-peptide binding process.

***In vivo* assays: hemodynamic and cardiovascular effects of BTCl, PepTry and PepChy**

Animals

Adult male Wistar (WR) and spontaneously hypertensive (SHR) rats weighing 250 to 300 g from the Department of Physiological Sciences of the Federal University of Goiás, Brazil, were used in all *in vivo* assays. The animals were housed in special room under controlled conditions of 12-h light–dark cycle and $23 \pm 1^\circ\text{C}$ temperature with free access to water and food. The use of animals and the protocols for *in vivo* and *ex vivo* assays were approved by the Ethics Committee of Animal Use and Care at the Federal University of Goiás, Brazil (protocol numbers 13/2016 and 039/2017).

Surgical Procedures

Surgical procedures were performed as previous described.¹⁹ Rats were anesthetized with isoflurane (2% in O₂) and arterial blood flow (ABF) measurement was carried out from the right femoral or brachial artery via catheters. Administration of drugs was made through a catheter inserted into femoral veins. Anesthesia was maintained with urethane (1.2 mg.kg⁻¹, iv.). Tracheotomy was performed in order to reduce respiratory effort and airway resistance. The electrocardiogram (ECG) was monitored from needle electrodes on the forelimbs. For

recording hemodynamic parameters rats were placed in a stereotaxic apparatus (Insight Ltda., Ribeirão Preto, SP, Brazil) in the ventral decubitus position. Body temperature was maintained at $37 \pm 1.0^{\circ}\text{C}$ with a heated water-circulating pad.

Hemodynamic and cardiovascular parameters recording

After stabilization of the cardiovascular parameters, 0.9% NaCl (vehicle - V) or BTCI (30.0 mg/kg) and its derived peptides, PepTry and PepChy (3.3 mg/kg) were administered via gavage. The hemodynamic and cardiovascular parameters, systolic blood pressure (SBP), diastolic blood pressure (DBP), renal vascular conductance (RVC) and aortic vascular conductance (AVC) were recorded immediately after gavage and were monitored during 6 hours.

Pulsatile arterial pressure (PAP) measurements were performed through an arterial cannula connected to a pressure transducer linked to a specific amplifier (MLT0380 and Bridge Amp, ML221, AD Instruments, Bella Vista, Australia). Hemodynamic parameters were recorded (1000 samples/s), using a digital analog converter and LabChart 7 software (PowerLab 4/25, ML845, AD Instruments, Bella Vista, Australia). ECG signals were recorded (2.000 samples/s) using a digital analog converter, and were considered to calculate HR. The RBF and ABF were recorded in absolute values (mL/min) through miniature probe on the left renal artery and abdominal aorta connected to a T206 flowmeter (Transonic Systems, Inc., Ithaca, NY, USA). The recorded signals (1000 samples/s) were analyzed using the PowerLab 4/25, ML845, AD Instruments, Bella Vista, Australia). The RVC and AVC were estimated by the ratio of RBF/mean arterial pressure (MAP) and ABF/MAP, respectively. The ΔRVC and ΔAVC were expressed as percentage change.

***Ex vivo* assays: Effects of BTCl, PepChy and PepTry on left ventricular contractility and coronary vasodilation**

Male WR and SHR weighing 250 to 300 g were used, as described above. To evaluate the cardiac effect of BTCl, PepChy and PepTry, isolated hearts were perfused according to Langendorff technique⁶⁹. Heparin (200 I.U) was injected intra-peritoneally and after 10-15 min animals were decapitated. The heart was carefully dissected and connected in the Langendorff system through the aortic stump and perfused with Krebs-Ringer solution containing 118.4 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM KH₂PO₄, 1.2 mM MgSO₄·7H₂O, 1.25 mM CaCl₂·2H₂O, 11.7 mM glucose, and 26.5 mM NaHCO₃. In addition, albumin (0.2 mg/mL) was added to Krebs Ringer's solution to prevent aggregation of BTCl and peptides in the glassware of the system. The system was maintained with constant perfusion flow of 10.0±2 mL/min, at 37°C and constant oxygenation (5% CO₂ and 95% O₂). Isovolumetric left ventricular systolic and diastolic pressures were measured after insertion of a balloon into the cavity of the left ventricle through a left atrium incision. Diastolic intraventricular pressure was measured during coronary perfusion via a pressure transducer connected to the aortic cannula and was adjusted to 10 ± 2 mmHg. After 30 to 40 min, the hearts were perfused for 10 minutes with KRS containing (1) BTCl (1.0 nM), (2) PepChy (1.0 nM), or (3) PepTry (1.0 nM). To evaluate the possible effects of these peptides on eNOS/NO pathway, hearts were perfused with KRS containing nitric oxide synthase inhibitor NG-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME; 1 µM) for 15 min before the perfusion of BTCl, PepChy or PepTry⁵⁶. The coronary vasodilatations induced by peptides were recorded and analyzed using a data acquisition system (DATAQ Instruments, Akron, OH, USA).

Statistical analysis

The GraphPad Prism software (v 6.03) was used to calculate cardiovascular parameters as mean \pm E.P.M (Mean Standard Error). Variance (ANOVA two ways) and a subsequent Tukey's post-test were used to analyze the SBP, DBP, RVC and AVC variations. The maximum response after administration of BTCl, PepChy and PepTry were analyzed by Student's t-Test. The results obtained for left ventricular pressure from isolated hearts were compared using two-way analysis of variance and Sidak's post-test. Value of $p < 0.05$ was considered to denote a significant difference.

References

- 1 WHO. World Health Organization. World Health Day. A global briefing on hypertension. (2013).
- 2 Bromfield, S. & Muntner, P. High blood pressure: the leading global burden of disease risk factor and the need for worldwide prevention programs. *Current hypertension reports* **15**, 134-136, doi:10.1007/s11906-013-0340-9 (2013).
- 3 Bernatova. Endothelial dysfunction in experimental models of arterial hypertension: cause or consequence? . *Biomed Res. Int* **598271** (2014).
- 4 Torok, J. Participation of nitric oxide in different models of experimental hypertension. *Physiological research* **57**, 813-825 (2008).
- 5 Sharony R, Y. P., Park J, Galloway AC, Mignatti P, Pintucci G.. . Protein targets of inflammatory serine proteases and cardiovascular disease. *J Inflamm (Lond)* **7**, 45 (2010).
- 6 Safavi F., R. A. Role of serine proteases in inflammation: Bowman-Birk protease inhibitor (BBI) as a potential therapy for autoimmune diseases. *Exp. Mol. Pat.* **93** 428-433 (2012).
- 7 Armstrong, W. B. *et al.* Clinical modulation of oral leukoplakia and protease activity by Bowman-Birk inhibitor concentrate in a phase IIa chemoprevention trial. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **6**, 4684-4691 (2000).
- 8 Mehdad, A. *et al.* A Bowman-Birk inhibitor induces apoptosis in human breast adenocarcinoma through mitochondrial impairment and oxidative damage following proteasome 20S inhibition. *Cell death discovery* **2**, 15067, doi:10.1038/cddiscovery.2015.67 (2016).
- 9 Clemente, A. & Arques Mdel, C. Bowman-Birk inhibitors from legumes as colorectal chemopreventive agents. *World journal of gastroenterology* **20**, 10305-10315, doi:10.3748/wjg.v20.i30.10305 (2014).
- 10 X-FJ., V. M. Trypsin and chymotrypsin inhibitor from black-eyed pea (*V. Sinensis* L.) I. Purification and partial characterization. *An Acad Bras Cienc.* **38**, 553-566 (1966).
- 11 Ventura, M. M. M., C.O.; Morhy, L. A trypsin and chymotrypsin inhibitor form black-eyed pea (*Vigna sinensis* L.). VI. Isolation and properties of complexes with trypsin and chymotrypsin. *An. Acad. Bras. Cienc* **47**, 335-346 (1975).

- 12 Morhy, L. & Ventura, M. M. The complete amino acid sequence of the *Vigna unguiculata* (L.) Walp. seed trypsin and chymotrypsin inhibitor. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias* **59**, 71-81 (1987).
- 13 Fachetti, H. C. S. M., K.; Ventura, M.M. Thermodynamics of the black-eyed pea trypsin and chymotrypsin inhibitor. *An. Acad. Bras. Cienc* **56**, 311–317 (1984).
- 14 de Freitas, S. M., Ikemoto, H. & Ventura, M. M. Thermodynamics of the binding of chymotrypsin with the black-eyed pea trypsin and chymotrypsin inhibitor (BTCI). *Journal of protein chemistry* **18**, 307-313 (1999).
- 15 de Freitas, S. M. *et al.* Analysis of the black-eyed pea trypsin and chymotrypsin inhibitor-alpha-chymotrypsin complex. *FEBS letters* **409**, 121-127 (1997).
- 16 Barbosa, J. A. *et al.* Crystal structure of the Bowman-Birk Inhibitor from *Vigna unguiculata* seeds in complex with beta-trypsin at 1.55 Å resolution and its structural properties in association with proteinases. *Biophysical journal* **92**, 1638-1650, doi:10.1529/biophysj.106.090555 (2007).
- 17 Silva LP, L. J. S., Bloch C Jr, Freitas SM. Thermal stability of a black eyed pea trypsin/chymotrypsin inhibitor (BTCI). *Protein Pept Lett* **7**, 397–401 (2001).
- 18 Carvalho, A. F. *et al.* BTCI enhances guanylin-induced natriuresis and promotes renal glomerular and tubular effects. *Brazilian journal of biology = Revista brasleira de biologia* **68**, 149-154 (2008).
- 19 da Cunha Morales Alvares, A. *et al.* Bowman-Birk protease inhibitor from *Vigna unguiculata* seeds enhances the action of bradykinin-related peptides. *Molecules (Basel, Switzerland)* **19**, 17536-17558, doi:10.3390/molecules191117536 (2014).
- 20 Law, M. R., Morris, J. K. & Wald, N. J. Use of blood pressure lowering drugs in the prevention of cardiovascular disease: meta-analysis of 147 randomised trials in the context of expectations from prospective epidemiological studies. *BMJ (Clinical research ed.)* **338**, b1665, doi:10.1136/bmj.b1665 (2009).
- 21 Bremner, A. D. Antihypertensive medication and quality of life--silent treatment of a silent killer? *Cardiovascular drugs and therapy* **16**, 353-364 (2002).
- 22 Manso, M. E. G., Biffi, E. C. A., and Gerardi, T. J. Prescrição inadequada de medicamentos a idosos portadores de doenças crônicas em um plano de saúde no município de São Paulo, Brasil. *Rev. Bras. Geriatr. Gerontol* **18**, 151–164, doi:doi: 10.1590/1809-9823.2015.14056 (2015).
- 23 Chen, Z. Y. *et al.* Anti-hypertensive nutraceuticals and functional foods. *Journal of agricultural and food chemistry* **57**, 4485-4499, doi:10.1021/jf900803r (2009).
- 24 Aluko, R. E. Antihypertensive peptides from food proteins. *Annual review of food science and technology* **6**, 235-262, doi:10.1146/annurev-food-022814-015520 (2015).
- 25 Yang, H.-Y., Yang, S.-C., Chen, J.-R., Tzeng, Y.-H. & Han, B.-C. *Soybean protein hydrolysate prevents the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats*. Vol. 92 (2004).
- 26 Aluko, R. *Determination of Nutritional and Bioactive Properties of Peptides. In Enzymatic Pea, Chickpea, and Mung Bean Protein Hydrolysates*. Vol. 91 (2008).
- 27 Fernandes, J. P. C. *et al.* Crystallographic structure of a complex between trypsin and a nonapeptide derived from a Bowman-Birk inhibitor found in *Vigna unguiculata* seeds. *Archives of biochemistry and biophysics* **665**, 79-86, doi:10.1016/j.abb.2019.02.013 (2019).
- 28 Joanitti, G. A., Azevedo, R. B. & Freitas, S. M. Apoptosis and lysosome membrane permeabilization induction on breast cancer cells by an anticarcinogenic Bowman-Birk protease inhibitor from *Vigna unguiculata* seeds. *Cancer letters* **293**, 73-81, doi:10.1016/j.canlet.2009.12.017 (2010).

- 29 Clemente, A., Carmen Marin-Manzano, M., Jimenez, E., Carmen Arques, M. & Domoney, C. The anti-proliferative effect of TI1B, a major Bowman-Birk isoinhibitor from pea (*Pisum sativum* L.), on HT29 colon cancer cells is mediated through protease inhibition. *The British journal of nutrition* **108 Suppl 1**, S135-144, doi:10.1017/s000711451200075x (2012).
- 30 Clemente, A., Sonnante, G. & Domoney, C. Bowman-Birk inhibitors from legumes and human gastrointestinal health: current status and perspectives. *Current protein & peptide science* **12**, 358-373 (2011).
- 31 Marin-Manzano, M. C., Ruiz, R., Jimenez, E., Rubio, L. A. & Clemente, A. Anti-carcinogenic soyabean Bowman-Birk inhibitors survive faecal fermentation in their active form and do not affect the microbiota composition in vitro. *The British journal of nutrition* **101**, 967-971 (2009).
- 32 Souza Lda, C. *et al.* Effects of an anticarcinogenic Bowman-Birk protease inhibitor on purified 20S proteasome and MCF-7 breast cancer cells. *PloS one* **9**, e86600, doi:10.1371/journal.pone.0086600 (2014).
- 33 Akif M, M. G., Schwager SL, Bhuyan BJ, Muges G, Isaac RE, Sturrock ED, Acharya KR. Structural characterization of angiotensin I-converting enzyme in complex with a selenium analogue of captopril. *Febs J.* **278**, 3644-3650 (2011).
- 34 Erlanger, B. F., Kokowsky, N. & Cohen, W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Archives of biochemistry and biophysics* **95**, 271-278 (1961).
- 35 Natesh, R., Schwager, S. L., Sturrock, E. D. & Acharya, K. R. Crystal structure of the human angiotensin-converting enzyme-lisinopril complex. *Nature* **421**, 551-554, doi:10.1038/nature01370 (2003).
- 36 Tamargo, J., Duarte, J. & Ruilope, L. M. New antihypertensive drugs under development. *Current medicinal chemistry* **22**, 305-342 (2015).
- 37 Wroblewska, M. *et al.* Marsanidine and 7-Me-marsanidine, the new hypotensive imidazolines augment sodium and urine excretion in rats. *Pharmacological reports : PR* **65**, 1025-1032 (2013).
- 38 Esteves, G. F. *et al.* Crystallization, data collection and processing of the chymotrypsin-BTCI-trypsin ternary complex. *Acta crystallographica. Section F, Structural biology and crystallization communications* **63**, 1087-1090, doi:10.1107/s1744309107056424 (2007).
- 39 Diego Elias Honda, J. B. L. M., Manuel Mateus Ventura, Saltuk Mustafa Eyrilmez, Martin Lepšík, Pavel Hobza, Adam Pecina, Sonia Maria de Freitas. Interface Interactions of the Bowman–Birk Inhibitor BTCI in a Ternary Complex with Trypsin and Chymotrypsin Evaluated by Semiempirical Quantum Mechanical Calculations. *European Journal of Organic Chemistry*, 5203–5211 doi:https://doi.org/10.1002/ejoc.201800754 (2018).
- 40 Gariani, T. & Leatherbarrow, R. J. Stability of protease inhibitors based on the Bowman-Birk reactive site loop to hydrolysis by proteases. *The journal of peptide research : official journal of the American Peptide Society* **49**, 467-475 (1997).
- 41 Nishino, N., Aoyagi, H., Kato, T. & Izumiya, N. Synthesis and activity of nonapeptide fragments of soybean Bowman-Birk inhibitor. *Experientia* **31**, 410-412 (1975).
- 42 Nakamura, Y., Yamamoto, N., Sakai, K. & Takano, T. Antihypertensive effect of sour milk and peptides isolated from it that are inhibitors to angiotensin I-converting enzyme. *Journal of dairy science* **78**, 1253-1257, doi:10.3168/jds.S0022-0302(95)76745-5 (1995).

- 43 Iwaniak, A., Minkiewicz, P., Darewicz, M., Sieniawski, K. & Starowicz, P. BIOPEP database of sensory peptides and amino acids. *Food research international (Ottawa, Ont.)* **85**, 155-161, doi:10.1016/j.foodres.2016.04.031 (2016).
- 44 Anna Iwaniak, P. M., and Małgorzata Darewicz. Food-Originating ACE Inhibitors, Including Antihypertensive Peptides, as Preventive Food Components in Blood Pressure Reduction. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **13** 114-134, doi:doi: 10.1111/1541-4337.12051 (2014).
- 45 Koyama, M. *et al.* Purification and identification of antihypertensive peptides from fermented buckwheat sprouts. *Journal of agricultural and food chemistry* **61**, 3013-3021, doi:10.1021/jf305157y (2013).
- 46 Daniel Martínez-Maqueda, B. M., Isidra Recio and Blanca Hernández-Ledesma. Antihypertensive peptides from food proteins: a review. *Food & Function* **3**, 350-361, doi: 10.1039/c2fo10192k (2012).
- 47 Guyton, A. C. Blood pressure control--special role of the kidneys and body fluids. *Science (New York, N.Y.)* **252**, 1813-1816 (1991).
- 48 Aperia, A. C., Broberger, C. G. & Soderlund, S. Relationship between renal artery perfusion pressure and tubular sodium reabsorption. *The American journal of physiology* **220**, 1205-1212, doi:10.1152/ajplegacy.1971.220.5.1205 (1971).
- 49 Guyton, A. C. *et al.* Arterial pressure regulation. Overriding dominance of the kidneys in long-term regulation and in hypertension. *The American journal of medicine* **52**, 584-594 (1972).
- 50 Peach, M. J. Renin-angiotensin system: biochemistry and mechanisms of action. *Physiological reviews* **57**, 313-370, doi:10.1152/physrev.1977.57.2.313 (1977).
- 51 Reudelhuber, T. L. The renin-angiotensin system: peptides and enzymes beyond angiotensin II. *Current opinion in nephrology and hypertension* **14**, 155-159 (2005).
- 52 Yang, H. Y., Erdos, E. G. & Levin, Y. A dipeptidyl carboxypeptidase that converts angiotensin I and inactivates bradykinin. *Biochimica et biophysica acta* **214**, 374-376 (1970).
- 53 Beuschlein, F. Regulation of aldosterone secretion: from physiology to disease. *European journal of endocrinology* **168**, R85-93, doi:10.1530/eje-13-0263 (2013).
- 54 Godecke, A. *et al.* Coronary hemodynamics in endothelial NO synthase knockout mice. *Circulation research* **82**, 186-194 (1998).
- 55 Nunes, A. D. *et al.* Influence of antihypertensive drugs on aortic and coronary effects of Ang-(1-7) in pressure-overloaded rats. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas* **50**, e5520, doi:10.1590/1414-431x20165520 (2017).
- 56 Souza, A. P. *et al.* Angiotensin II type 1 receptor blockade restores angiotensin-(1-7)-induced coronary vasodilation in hypertrophic rat hearts. *Clinical science (London, England : 1979)* **125**, 449-459, doi:10.1042/cs20120519 (2013).
- 57 Massion, P. B. & Balligand, J. L. Modulation of cardiac contraction, relaxation and rate by the endothelial nitric oxide synthase (eNOS): lessons from genetically modified mice. *The Journal of physiology* **546**, 63-75 (2003).
- 58 Rastaldo, R. *et al.* Nitric oxide and cardiac function. *Life sciences* **81**, 779-793, doi:10.1016/j.lfs.2007.07.019 (2007).
- 59 Zhang, Y. H., Jin, C. Z., Jang, J. H. & Wang, Y. Molecular mechanisms of neuronal nitric oxide synthase in cardiac function and pathophysiology. *The Journal of physiology* **592**, 3189-3200, doi:10.1113/jphysiol.2013.270306 (2014).
- 60 Ventura, M. M., Xavier Filho, J., Moreira, R. A., Aquino Ade, M. & Pinheiro, P. A. A trypsin and chymotrypsin inhibitor from black-eyed pea (*Vigna sinensis* L.). II.

- Further studies on its characterization and a reevaluation of earlier results. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias* **43**, 233-242 (1971).
- 61 B, M. Solid-Phase Peptide Synthesis. *Peptides: Synthesis, Structures, and Applications*, 93-169 (1995).
- 62 Fields, G. B. & Noble, R. L. Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids. *International journal of peptide and protein research* **35**, 161-214 (1990).
- 63 Kaiser, E., Colescott, R. L., Bossinger, C. D. & Cook, P. I. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. *Analytical biochemistry* **34**, 595-598 (1970).
- 64 Murphy, J. B. K., M.W. A note on spectrophotometric determination of proteins in dilute solution. *Biochim. Biophys. Acta* **45**, 382-384 (1960).
- 65 Morrison, J. F. The slow-binding and slow, tight-binding inhibition of enzyme catalyzed reactions. *Trends Biochem. Sci.* **7**, 102-105 (1982).
- 66 Hayakari, M., Kondo, Y. & Izumi, H. A rapid and simple spectrophotometric assay of angiotensin-converting enzyme. *Analytical biochemistry* **84**, 361-369 (1978).
- 67 Grosdidier, A., Zoete, V. & Michielin, O. EADock: docking of small molecules into protein active sites with a multiobjective evolutionary optimization. *Proteins* **67**, 1010-1025, doi:10.1002/prot.21367 (2007).
- 68 O'Boyle, N. M. *et al.* Open Babel: An open chemical toolbox. *Journal of cheminformatics* **3**, 33, doi:10.1186/1758-2946-3-33 (2011).
- 69 Bell, R. M., Mocanu, M. M. & Yellon, D. M. Retrograde heart perfusion: the Langendorff technique of isolated heart perfusion. *Journal of molecular and cellular cardiology* **50**, 940-950, doi:10.1016/j.yjmcc.2011.02.018 (2011).

Acknowledgements

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) grants 423875/2016-7, 306132/2016-8, 477832/2010-5, 483411/2012-4, 447496/2014-0 and 406789/2016-9; Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG) grant 2012/0055431086; Fundação de Desenvolvimento de Tecnópolis (Funtec) grant 001/2016 and Fundação de Empreendimentos Científicos e Tecnológicos (FINATEC).

Author information

Affiliations

Department of Cell Biology, Laboratory of Biophysics, Biology Institute, University of Brasília-UnB, Quadra 604, Asa Norte, Bloco J 1º andar, Brasília, DF 70910-900, Brazil;

Maria Alzira Garcia de Freitas, Alice da Cunha Morales Álvares, Sandrielle Aires de Oliveira (*in memoriam*), Azadeh Mehdad (*in memoriam*), Diego Elias Honda and Sonia Maria de Freitas.

Center of Neuroscience and Cardiovascular Physiology, Department of Physiological Sciences, Biological Sciences Institute, Federal University of Goiás, Goiania, GO 74690-900, Brazil, Tel.: +55-61-3107-3101

Nathalia Oda Amaral, Lara Marques Naves, Amanda de Sá Martins Bessa, and Gustavo Rodrigues Pedrino.

Integrative Laboratory of Cardiovascular and Neurological Pathophysiology; Department of Physiological Sciences, Biological Sciences Institute, Federal University of Goiás, Goiania, GO 74690-900, Brazil.

Carolina Nobre Ribeiro Pontes, Carlos Henrique de Castro.

Graduate Program in Genomics Science and Biotechnology and Graduate Program in Gerontology; Catholic University of Brasilia, Brasilia, DF 70790-160, Brazil.

Marcelo Henrique Soller Ramada.

Contributions

S.M. de F., G.R.P. and C.H.C. planned the study; M.A.G. de F., N.O.A., A. da C.M.A., S.A. de O., D.E.H., L.M.N, A.S.M.B., C.N.R.P., M.H.S.R., and S.M. de F. performed the experiments; M.A.G. de F., N.O.A., A. da C.M.A., S.A. de O., A.M., M.H.S.R., L.M.N, A.S.M.B., C.N.R.P., C.H.C., G.R.P. and S.M. de F. analyzed data; S.M. de F., G.R.P. and C.H.C. supervised the study; S.M. de F., A.M., G.R.P. and C.H.C. wrote the manuscript.

Competing Interests Statement

The authors declare no competing interests.

Corresponding authors

Correspondence to Sonia Maria de Freitas (nina@unb.br) or Gustavo Pedrino (pedrino@ufg.br).

Data Availability

All data produced during this work are available from corresponding authors on reasonable request.

Ethical approval and informed consent

All procedures were performed in accordance with institutional guidelines for the use of laboratory animals of the institution and the protocols were approved by the Ethics Committee of Animal Use of the Federal University of Goiás (protocol numbers 13/2016 and 039/2017).