



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO PROCESSOS
INTERATIVOS DOS ÓRGÃOS E SISTEMAS

SUELEN SILVA SANTOS

EFEITO VASCULAR E CARDÍACO DO VENENO DA *Crotalus*
***durissus cascavella* EM RATOS NORMOTENSOS**

SALVADOR

2014

SUELEN SILVA SANTOS

EFEITO VASCULAR E CARDÍACO DO VENENO DA *Crotalus durissus cascavella* EM RATOS NORMOTENSOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas da Universidade Federal da Bahia, como requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Darízy Flávia S. Amorim de Vasconcelos

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Luciana Lyra Casais e Silva.

SALVADOR

2014

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Universitária de Saúde, SIBI - UFBA.

S237 Santos, Suelen Silva

Efeito vascular e cardíaco do veneno da *Crotalus durissus cascavella* em ratos normotensos/ Suelen Silva Santos. – Salvador, 2014.

105 f.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Darízy Flávia Silva Amorim de Vasconcelos.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciências da Saúde, 2014.

1. *Crotalus cascavella*. 2. Sistema cardiovascular. 3. Ratos . 4. Cardiologia. I. Vasconcelos, Darízy Flávia Silva Amorim. II. Universidade Federal da Bahia. III. Título.

CDU 616.12

SUELEN SILVA SANTOS

EFEITO VASCULAR E CARDÍACO DO VENENO DA *Crotalus durissus cascavella* EM RATOS NORMOTENSOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas da Universidade Federal da Bahia como requisito para obtenção do título de mestre.

Banca examinadora:

Prof^ª. Dr^ª. Darizy Flávia Silva Amorim de Vasconcelos
(Orientadora)

Prof^º. Dr^º. Eudes da Silva Velozo
(Examinador interno - UFBA)

Prof^º. Dr^º. Robson Cavalcante Veras
(Examinador externo - UFPB)

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE



ATA DA SESSÃO PÚBLICA DO COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROCESSOS INTERATIVOS DOS ÓRGÃOS E SISTEMAS

Aos quinze dias do mês de dezembro de dois mil e catorze, reuniu-se em sessão pública o Colegiado do Programa de Pós-Graduação Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas com a finalidade de apreciar a **Defesa Pública da Dissertação** da Mestranda **Suelen Silva Santos**, através da Comissão Julgadora composta pelos **Professores Darizy Flavia Silva Amorim de Vasconcelos, Eudes da Silva Veloso e Robson Cavalcante Veras**. O título da Dissertação apresentada foi **Investigação do potencial biotecnológico do veneno da *Crotalus durissus cascavella* sobre o sistema cardiovascular**. Ao final dos trabalhos, os membros da mencionada Comissão Examinadora emitiram os seguintes pareceres:


Profa. Dra. Darizy Flavia Silva Amorim Vasconcelos APROVADO

Prof. Dr. Eudes da Silva Veloso APROVADO

Prof. Dr. Robson Cavalcante Veras APROVADO

Franqueada a palavra, como não houve quem desejasse fazer uso da mesma lavrou-se a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada por todos.

Salvador, 15 de dezembro de 2014

Profa. Dra. Darizy Flavia Silva Amorim Vasconcelos 

Prof. Dr. Eudes da Silva Veloso 

Prof. Dr. Robson Cavalcante Veras 

*Se não puder voar, corra,
Se não puder correr, ande,
Se não puder andar, rasteje,
mas continue em frente de qualquer jeito..."*

Martin Luther King Jr.

Dedicatória

Aos meus familiares e amigos, pelo carinho e apoio,
por compreender minha ausência e pelos incansáveis incentivos.

Agradecimientos

A Deus, pelo dom da vida, por todas as graças alcançadas e por me dar força e serenidade para vencer todos os desafios.

A **Prof. Dr^a Darizy Flávia Silva Amorim de Vasconcelos**, pela oportunidade e confiança, por todos os ensinamentos e pela compreensão ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

A querida **Letícia Simões**, pelo carinho, pelos ensinamentos e pelo apoio nos momentos mais difíceis.

A **Quiara Lovatti**, pela amizade, por todo aprendizado e pela importante participação no desenvolvimento desse trabalho.

A **Rafael Leonne**, por todo apoio técnico, pelas constantes trocas de informações e ideias.

Aos colegas do **LAFPEC**, pela calorosa receptividade e por toda alegria ao longo desses dois anos.

Aos **colegas** de Mestrado que compartilharam comigo esses momentos de aprendizado, especialmente à Juliana Costa.

A **Prof. Dr^a Luciana Lyra Casais e Silva**, por todo apoio e por ter tornado possível a realização desse trabalho.

Ao **Prof. Dr. Robson Cavalcante Veras** e sua aluna **Walma Pereira de Vasconcelos** por participarem da execução do trabalho, fornecendo-me valiosos resultados.

Aos **Professores membros da banca examinadora** deste trabalho, pela disponibilidade e pelas colaborações enriquecedoras.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Imagem ilustrativa da serpente <i>Crotalus durissus cascavella</i> | 39 |
| Figura 2 - Aparato utilizado para os experimentos com anéis de artéria mesentérica superior isolada de Wistar PA | 48 |
| Figura 3 - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de concentrações crescentes do veneno da CDC (0,001-30µg/mL) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato Wistar, pré-contraídos com Phe (10µM). (A) Anéis com endotélio intacto; (B) Anéis com endotélio ausente..... | 49 |
| Figura 4 - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de concentrações crescentes do veneno da CDC (0,001 – 30 µg/mL) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato Wistar com e sem endotélio funcional, no estado basal do tecido vascular. | 50 |
| Figura 5 - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de concentrações crescentes do veneno da CDC aquecido (0,001-30µg/mL) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato Wistar, pré-contraídos com Phe (10µM)..... | 51 |
| Figura 6 - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de concentrações crescentes do veneno da CDC (0,001 – 30 µg/mL) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato Wistar com endotélio funcional, pré-contraídos com solução despolarizante (KCl 80 mM). | 52 |
| Figura 7 - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de concentrações crescentes do veneno da CDC (0,001 – 30 µg/mL) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato Wistar com endotélio funcional, pré-contraídos com PGF _{2α} | 53 |
| Figura 8 - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação da participação de fatores de Relaxamento endotelial na resposta vasorrelaxante induzida por veneno da CDC em anéis da artéria mesentérica superior isolada de rato Wistar, com endotélio funcional..... | 54 |
| Figura 9 - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação da participação de canais para K ⁺ na resposta vasorrelaxante induzida por veneno da CDC em anéis da artéria mesentérica superior isolada de rato Wistar, com endotélio funcional..... | 55 |
| Figura 10. Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação da participação de diferentes canais para K ⁺ na resposta vasorrelaxante induzida por veneno da CDC em anéis da artéria mesentérica superior isolada de rato Wistar, com endotélio funcional. | 56 |
| Figura 11. Representação esquemática do protocolo de isolamento de átrios dos ratos Wistar. | 57 |
| Figura 12 - Representação esquemática do protocolo para avaliação dos efeitos cronotrópicos e inotrópicos induzidos pelo veneno da CDC (0,1 – 100 µg/mL) | 58 |
| Figura 13. Efeito do veneno da CDC em anéis de artéria mesentérica superior de ratos Wistar. Curvas concentração-resposta mostrando o efeito relaxante do veneno da CDC a (0,001- 30 µg/mL, cumulativamente) em anéis mesentéricos de animais Wistar pré-contraídos com fenilefrina (Phe 10uM), na presença ou ausência de endotélio funcional..... | 62 |
| Figura 14. Efeito do veneno da CDC em anéis de artéria mesentérica superior de ratos Wistar submetidos a tônus basal. Curvas concentração-resposta mostrando o efeito do | |

| | |
|---|----|
| veneno da CDC (0,001- 30 µg/mL, cumulativamente) em anéis mesentéricos de animais Wistar em tônus | |
| Efeito do veneno da CDC em anéis de artéria mesentérica superior de ratos Wistar em tônus basal. | 63 |
| Figura 15. Contração induzida por Phe (10µM) em anéis de artéria mesentérica superior de ratos Wistar, com endotélio vascular intacto, antes e após adição do veneno da CDC. | 64 |
| Figura 16. Contração induzida por Phe (10µM) em anéis de artéria mesentérica superior de ratos Wistar, sem endotélio vascular, antes e após adição do veneno da CDC. | 64 |
| Figura 17. Efeito do veneno da CDC em anéis de artéria mesentérica superior de ratos Wistar após aquecimento. Curvas concentração-resposta mostrando o efeito do aquecimento do veneno da CDC (0,001- 30 µg/mL, cumulativamente) sobre anéis mesentéricos de animais Wistar pré-contraídos com fenilefrina (Phe 10µM), na presença do endotélio funcional | 65 |
| Figura 18. Efeito vasodilatador do veneno da CDC em anéis contraídos com solução despolarizante de KCl 80mM. Curvas concentração-resposta do efeito vasorrelaxante do veneno da CDC (0,001- 30 µg/mL, cumulativamente) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de animais Wistar com endotélio vascular, pré-contraídos com fenilefrina (Phe 10µM) ou com KCl 80 mM..... | 66 |
| Figura 19. Efeito vasodilatador do veneno da CDC é reduzido em anéis contraídos com agonista do receptor PF - PGF _{2α} . Curvas concentração-resposta do efeito vasorrelaxante do veneno da CDC (0,001- 30 µg/mL, cumulativamente) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de animais Wistar com endotélio vascular, pré-contraídos com Phe 10µM ou com PGF _{2α} 10µM.. | 67 |
| Figura 20. Participação de prostanóides derivados da ciclooxigenase no relaxamento induzido pelo veneno da CDC. Curvas concentração-resposta do efeito vasorrelaxante do veneno da CDC (0,001- 30 µg/mL, cumulativamente) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de animais Wistar com endotélio vascular, pré-contraídos com fenilefrina (Phe 10µM), na ausência e na presença de Indometacina, 10µM. | 68 |
| Figura 21. Participação da óxido nítrico-sintase no efeito vasodilatador do veneno da CDC. Curvas concentração-resposta do efeito vasorrelaxante do veneno da CDC (0,001- 30 µg/mL, cumulativamente) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de animais Wistar com endotélio vascular, pré-contraídos com fenilefrina (Phe 10µM), na ausência e na presença de L-NAME, 100µM..... | 69 |
| Figura 22. A via CGs/GMPc participa do efeito vasodilatador do veneno da CDC. Curvas concentração-resposta do efeito vasorrelaxante do veneno da CDC (0,001- 30 µg/mL, cumulativamente) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de animais Wistar com endotélio vascular, pré-contraídos com fenilefrina (Phe 10µM), na ausência e na presença de ODQ, 10µM. | 70 |
| Figura 23. Efeito do veneno da CDC na liberação de NO por células endoteliais isoladas. Gráficos A, B e C demonstram que as células testadas apresentavam viabilidade e tratando-se de células endoteliais. Gráfico D representativo da detecção por amperimetria de NO liberado após adições do veneno da CDC (1-90 µg/mL, cumulativamente) em células aórticas isoladas | 72 |
| Figura 24. Efeito vasodilatador do veneno da CDC envolve canais para K ⁺ . Curva concentração-resposta para veneno da CDC (0,001 – 30 µg/mL) em anéis da artéria mesentérica superior isolada de animais Wistar, com endotélio funcional na presença de [K ⁺] _e = 4 mM ou [K ⁺] _e = 20 mM. | 73 |

| | |
|--|----|
| Figura 25. Canais BKca parecem não participar do efeito vasodilatador do veneno da CDC. Curva concentração-resposta para veneno da CDC (0,001 – 30 µg/mL) em anéis da artéria mesentérica superior isolada de animais Wistar, com endotélio funcional na presença de TEA = 1 mM e na ausência. | 74 |
| Figura 26. Efeito vasodilatador do veneno da CDC parece envolver Kir. Curva concentração-resposta para veneno da CDC (0,001 – 30 µg/mL) em anéis da artéria mesentérica superior isolada de animais Wistar, com endotélio funcional na presença de BaCl ₂ (30µM) e na ausência | 75 |
| Figura 27. Participação de canais Kv no relaxamento induzido pelo veneno da CDC. Curva concentração-resposta para veneno da CDC (0,001 – 30 µg/mL) em anéis da artéria mesentérica superior isolada de animais Wistar, com endotélio funcional na presença de 4-aminopiridina (1mM) e na ausência.. | 76 |
| Figura 28. O cronotropismo cardíaco não é alterado pelo veneno da CDC. Gráfico de barras, em porcentagem de resposta, para influência do veneno de <i>Crotalus durissus</i> cascavella (0,1 - 100µM) no efeito cronotrópico em átrios direitos isolados de ratos Wistar (n=5)..... | 77 |
| Figura 29. Representação do registro original dos efeitos cronotrópicos de concentrações cumulativas do veneno da CDC (0,1 - 100µM) sobre átrio direito de animal Wistar. | 77 |
| Figura 30. O inotropismo é alterado pelo veneno da CDC. Gráfico de barras, em porcentagem de resposta, para efeito inotrópico negativo do veneno da CDC (0,1 - 100µM) em átrios esquerdos isolados de ratos Wistar (n=5)..... | 78 |
| Figura 31. Representação do registro original dos efeitos inotrópicos de concentrações cumulativas do veneno da CDC (0,1 - 100µM) sobre átrio esquerdo de animal Wistar. | 79 |

Lista de Tabelas

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Classificação da pressão arterial de acordo com a medida casual realizada em consultório..... | 34 |
| Tabela 2. Classes de Anti-Hipertensivos disponível para uso clínico..... | 35 |
| Tabela 3. Composição da solução de Tyrode (pH= 7,4)..... | 45 |
| Tabela 4. Composição da solução de Tyrode despolarizante com KCl à 20mM (pH=7,4) | 46 |
| Tabela 5. Composição da solução de Tyrode despolarizante com KCl à 80mM (pH=7,4) | 46 |
| Tabela 6. Composição da solução de Krebs-bicarbonato (pH=7,4) | 46 |

Resumo e Abstract

RESUMO

As toxinas de animais são fontes de recursos naturais para estudos farmacológicos. O veneno da *Crotalus durissus cascavella* (CDC), pode ser uma fonte na bioprospecção de novos agentes anti-hipertensivos. O objetivo deste estudo foi investigar o efeito vascular e cardíaco do veneno da CDC em ratos normotensos (Wistar). Foram realizados estudos *in vitro* com artéria mesentérica isolada de ratos, células endoteliais aórticas isoladas e átrio isolado. A administração cumulativa do veneno da CDC (0,001 – 30 µg/mL) em anéis pré-contraídos com Phe (10 µM), induziu um vasorrelaxamento dependente de concentração com $E_{max} = 47,9 \pm 5,0$ % n=8 na presença do endotélio vascular, sendo seu efeito praticamente abolido na ausência do endotélio $E_{max} = 5,8 \pm 2,4$ % n=5 ($^{***}p < 0,001$). Em tônus basal, os anéis vasculares apresentaram contração significativa ($*p < 0,05$) após adição do veneno; a viabilidade tecidual foi mantida, pois não houve diferença na capacidade contrátil dos anéis após administração do veneno. O efeito vasorrelaxante do veneno sobre contrações induzidas por KCl 80 mM, foi abolido ($E_{max} = 6,4 \pm 0,9$ % n= 5) ($^{***}p < 0,001$). No entanto, em contrações induzidas por $PGF_{2\alpha}$, o efeito do veneno foi atenuado de forma significativa ($^{***}p < 0,001$) ($PGF_{2\alpha}$ $E_{max} = 18,7 \pm 1,3$ % e $CE_{50} = 15,22$ (8,3 - 27,7)). Avaliando a participação dos fatores de relaxamento derivados do endotélio, foi observado que a inibição não seletiva da COX com indometacina (10 µM) apresentou uma atenuação significativa ($*p < 0,05$) sobre efeito vasorrelaxante, a partir das duas últimas concentrações testadas. Investigando a participação do NO liberado pelo endotélio, foi demonstrada uma redução significativa do efeito vasorrelaxante do veneno em anéis tratados com L-NAME (100 µM) (E_{max} para $17,5 \pm 2,2$ % n= 6 ($^{**}p < 0,01$)). Resultados semelhantes foram observados na presença de ODQ (10 µM), um inibidor da guanilil ciclase solúvel ($E_{max} = 11,2 \pm 3,5$ %, n= 6). Adicionalmente, o veneno induziu liberação de NO por células endoteliais aórticas isoladas através de estudos de amperimetria. Avaliando a participação dos canais de K^+ na resposta vasodilatadora do veneno foi demonstrado uma redução significativa ($^{***}p < 0,001$) deste efeito na presença de solução de tyrode com 20 mM de KCl ($E_{max} = 21,3 \pm 8$, %, n=7). O bloqueio dos BK_{Ca} com TEA (1mM) não apresentou alteração significativa sobre o efeito vasorrelaxante ($E_{max} = 40,0 \pm 6$, %, n=5). A presença do bloqueador dos canais para K^+ retificadores de entrada ($BaCl_2$ 30 µM), ou do bloqueador dos canais para K^+ retificador retardado (4-aminopiridina 1 mM), induziu uma diminuição significativa do efeito vasorrelaxante do veneno da CDC ($E_{max} = 21,7 \pm 8$, %, n= 5., $*p < 0,05$ e $E_{max} = 9,5 \pm 1,3$, %, n=5, $^{***}p < 0,001$; respectivamente). Por fim, o veneno promoveu efeito inotrópico negativo em átrio isolado de rato demonstrando uma importante ação cardíaca direta. Portanto, esses resultados sugerem que o veneno da CDC induz vasorrelaxamento em anéis da artéria mesentérica superior de ratos normotensos de maneira dependente do endotélio, possivelmente através de fatores de relaxamento derivados do endotélio, principalmente o NO, além da participação de canais para K^+ . Além disso, apresenta atividade cardíaca direta, tornando-se uma importante fonte de moléculas com atividade cardiovascular.

Palavras-Chave: *Crotalus cascavella*. Sistema cardiovascular. Ratos wistar

ABSTRACT

Animal toxins are sources of natural resources for pharmacological studies. The poison of *Crotalus durissus cascavella* (CDC) may be a source in the bio-prospecting of new anti-hypertensive agents. The aim of this study was to investigate vascular and cardiac effects of the poison of CDC in normotensive rats (Wistar). *In vitro* studies were performed using isolated mesenteric artery of rats, besides aortic endothelial cells and isolated atrium. The cumulative administration of the poison of CDC (0,001 – 30 µg/mL) in Phe (10 µM) precontracted rings induced a concentration-dependent vasorelaxation with $E_{max} = 47,9 \pm 5,0\%$ $n=8$ in the presence of vascular endothelium, and its effect was nearly abolished in the absence of endothelium ($E_{max} = 5,8 \pm 2,4\%$ $n=5$ ($^{***}p < 0,001$)). In basal tonus, the vascular rings showed significant contraction ($^{*}p < 0,05$) after addition of poison; the tissue feasibility was kept because there was no difference in the contractile capacity of rings after administration of poison. The vasorelaxant effect of poison over contractions induced by KCl 80 mM was abolished ($E_{max} = 6,4 \pm 0,9\%$ $n=5$) ($^{***}p < 0,001$). However, in contractions induced by $PGF_{2\alpha}$, the effect of poison was mitigated in a significant way ($^{***}p < 0,001$) ($PGF_{2\alpha}$ $E_{max} = 18,7 \pm 1,3\%$ and $CE_{50} = 15,22$ (8,3 - 27,7)). When assessing the participation of endothelium-derived relaxing factors, it was noted that the COX non-selective inhibition with indomethacin (10 µM) showed a significant mitigation ($^{*}p < 0,05$) over the vasorelaxant effect, from the last two tested concentrations. When investigating the participation of NO released by endothelium, there was a significant reduction of the vasorelaxant effect of poison in rings treated with L-NAME (100 µM) (E_{max} for $17,5 \pm 2,2\%$ $n=6$) ($^{**}p < 0,01$). Similar results were noted in the presence of ODQ (10 µM), which is an inhibitor of soluble guanylyl cyclase ($E_{max} = 11,2 \pm 3,5\%$, $n=6$). Moreover, the poison induced the release of NO by isolated aortic endothelial cells through amperometric studies. When assessing the participation of K^{+} channels in the vasodilatory response of poison, it was shown a significant reduction ($^{***}p < 0,001$) of this effect in the presence of tyrode solution with 20 mM of KCl ($E_{max} = 21,3 \pm 8, \%$, $n=7$). The blocking of BK_{Ca} block with TEA (1mM) did not show significant alteration in the vasorelaxant effect ($E_{max} = 40,0 \pm 6, \%$, $n=5$). The presence of the blocker of inward rectifier K^{+} channels ($BaCl_2$ 30 µM), or of the blocker of delayed rectifier K^{+} channels (4-aminopyridine 1 mM), induced a significant reduction of the vasorelaxant effect of the poison of CDC ($E_{max} = 21,7 \pm 8, \%$, $n=5$, $^{*}p < 0,05$ and $E_{max} = 9,5 \pm 1,3, \%$, $n=5$, $^{***}p < 0,001$; respectively). Lastly, the poison promoted a negative inotropic effect in isolated atrium of rat, thereby showing an important direct cardiac action. Therefore, these results suggest that the poison of CDC induces vasorelaxation in superior mesenteric artery rings of normotensive rats in an endothelium-dependent way, which possibly occurs through endothelium-derived relaxing factors, especially the NO, besides the participation of K^{+} channels. Furthermore, it shows direct cardiac activity, thereby becoming an important source of molecules with cardiovascular activity.

Keywords: *Crotalus cascavella*. Cardiovascular system. Rats, wistar.

Lista de abreviaturas

| | |
|----------------------------------|---|
| AC | adenilil-ciclase |
| ANOVA | análise de variância |
| ACC | American College of Cardiology |
| ACh | Acetilcolina |
| AHA | American Heart Association |
| AMPc | adenosina monofosfato cíclico |
| Ang I | angiotensina I |
| Ang II | angiotensina II |
| ATP | trifosfato de adenosina |
| ADP | difosfato de adenosina |
| BK | Bradicinina |
| BKca | canais para K ⁺ sensíveis ao Ca ²⁺ de grande condutância |
| BPP | peptídeos potenciadores de bradicinina |
| Ca _v | canais para cálcio sensíveis a voltagem |
| [Ca ²⁺] _c | concentração de cálcio citosólica |
| CDC | <i>Crotalus durissus cascavella</i> |
| CE ₅₀ | concentração efetiva 50% |
| DAC | doença arterial coronariana |
| DC | débito cardíaco |
| DCV | doenças cardiovasculares |
| DMSO | dimetil sulfóxido |
| E _{máx} | efeito máximo |
| e.p.m | erro padrão da média |
| IECA | inibidor da enzima conversora de angiotensina |
| IP ₃ | trifosfato de inositol [1,4,5] |
| IKca | canais para K ⁺ sensíveis ao Ca ²⁺ de intermediária condutância |
| K _{Ca} | canais para K ⁺ sensíveis ao Ca ²⁺ |
| K _{ir} | canais para K ⁺ retificadores de entrada |
| K _v | canais para K ⁺ sensíveis a voltagem |
| K _{ATP} | canais para K ⁺ sensíveis a ATP |
| PA | pressão arterial |
| Phe | Fenilefrina |
| SKca | canais para K ⁺ sensíveis ao Ca ²⁺ de pequena condutância |

Observação: As abreviaturas e símbolos utilizados neste trabalho e que não constam nesta relação, encontram-se descritas no texto ou são convenções adotadas internacionalmente.

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 22 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA..... | 26 |
| 2.1 EPIDEMIOLOGIA DA HIPERTENSÃO ARTERIAL SISTÊMICA..... | 26 |
| 2.2 FISIOLOGIA VASCULAR E FISIOPATOLOGIA DA HIPERTENSÃO ARTERIAL SISTÊMICA | 27 |
| 2.3 TRATAMENTO DA HIPERTENSÃO..... | 34 |
| 2.3.1 INIBIDORES DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA..... | 35 |
| 2.4 VENENO DE SERPENTES - ASPECTOS GERAIS | 36 |
| 2.4.1 <i>Crotalus durissus</i> | 37 |
| 3. OBJETIVO..... | 42 |
| 3.1 Geral..... | 42 |
| 3.2 Específicos | 42 |
| 4. MATERIAIS | 44 |
| 4.1 OBTENÇÃO E PREPARAÇÃO DO VENENO BRUTO DA SERPENTE | 44 |
| 4.2 ANIMAIS..... | 44 |
| 4.3 DROGAS..... | 45 |
| 4.4 SOLUÇÕES FISIOLÓGICAS..... | 45 |
| 5. MÉTODOS | 46 |
| 5.1 Preparações com artéria mesentérica superior isolada de rato com ou sem endotélio funcional. | 47 |
| 5.1.1 Protocolos experimentais utilizando artéria mesentérica superior isolado de Wistar. | 48 |
| 5.1.1.1 Avaliação do efeito do veneno da CDC em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos Wistar, pré-contraídos com Phe (10µM)... | 48 |
| 5.1.1.2 Avaliação do efeito do veneno da CDC em anéis vasculares sob tônus basal..... | 49 |
| 5.1.1.3 Avaliação do efeito do veneno da CDC submetido ao aquecimento sobre anéis vasculares pré-contraídos com Phe (10µM) | 50 |
| 5.1.1.4 Avaliação do efeito do veneno da CDC sobre as contrações vasculares induzidas por agente despolarizante KCl 80mM. | 51 |
| 5.1.1.5 Avaliação do efeito do veneno da CDC sobre as contrações vasculares induzidas por PGF _{2α} | 52 |
| 5.1.1.6 Avaliação da participação de fatores relaxantes derivados do endotélio na resposta vascular induzida pelo veneno da CDC..... | 53 |
| 5.1.1.7 Avaliação da participação de canais para K ⁺ na resposta vasorrelaxante induzida por veneno da CDC..... | 54 |

| | | |
|---------|---|----|
| 5.1.1.8 | Influência de bloqueadores para diferentes canais para K ⁺ na resposta vasorrelaxante induzida por veneno da CDC..... | 55 |
| 5.1.2 | Isolamento dos átrios de animais Wistar..... | 56 |
| 5.1.3 | Protocolos Experimentais utilizando átrios isolados de ratos..... | 57 |
| 5.1.3.1 | Avaliação dos efeitos cronotrópicos e inotrópicos induzidos pelo veneno da CDC..... | 57 |
| 5.1.4 | Avaliação da Produção de NO em Células Endoteliais por Amperometria..... | 58 |
| 5.2 | ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 59 |
| 6. | RESULTADOS..... | 62 |
| 6.1 | Efeito relaxante do veneno da CDC em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos Wistar..... | 62 |
| 6.2 | Efeito do veneno da CDC sobre o tônus intrínseco vascular de anéis mesentéricos..... | 63 |
| 6.3 | Efeito do veneno da CDC submetido ao aquecimento sobre anéis vasculares pré-contraídos com Phe (10µM)..... | 64 |
| 6.4 | Efeito Vascular da CDC em tecidos vasculares contraídos por agente despolarizante KCl 80 mM..... | 65 |
| 6.5 | Efeito Vascular da CDC em tecidos vasculares contraídos pelo agonista de receptores prostanóide PGF _{2α} | 66 |
| 6.6 | Efeito do inibidor não seletivo da COX (Indometacina) sobre o relaxamento induzido pelo veneno da CDC em anéis vasculares..... | 68 |
| 6.7 | Participação da NO-sintase no relaxamento induzido pelo veneno da CDC em anéis vasculares..... | 69 |
| 6.8 | Participação da guanilil ciclase na resposta vasorrelaxante do veneno da CDC em anéis vasculares..... | 69 |
| 6.9 | Produção de NO em células endoteliais induzida pelo veneno da CDC..... | 70 |
| 6.10 | Influência dos canais para K ⁺ sobre o relaxamento induzido pelo veneno da CDC em anéis vasculares..... | 72 |
| 6.11 | Participação dos canais BK _{Ca} na resposta vasorrelaxante induzida por veneno da CDC em anéis vasculares..... | 73 |
| 6.12 | Influência dos canais K _r na resposta vasorrelaxante induzida por veneno da CDC em anéis mesentéricos de ratos Wistar..... | 74 |
| 6.13 | Influência dos canais para K ⁺ retificadores retardados na resposta vasorrelaxante induzida por veneno da CDC em anéis mesentéricos de ratos Wistar..... | 75 |
| 6.14 | Efeito do veneno da CDC sobre o cronotropismo cardíaco..... | 76 |
| 6.15 | Efeito do veneno da CDC sobre o inotropismo cardíaco..... | 78 |
| 7. | DISCUSSÃO..... | 81 |
| 8. | CONCLUSÃO..... | 90 |

| | |
|---------------------|----|
| 9. PERSPECTIVA..... | 92 |
| REFERÊNCIAS | 93 |

Introdução

1 INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares (DCV) estão entre os mais significativos problemas de saúde pública do mundo. Entre as DCVs, a hipertensão arterial sistêmica (HAS) ganha papel de destaque, por se tratar de uma doença de alta prevalência e com baixas taxas de controle (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2010). A HAS é uma doença crônica não transmissível, multifatorial, em que os níveis pressóricos apresentam-se elevados (>140/90 mmHg) e sustentados, sendo considerada o principal fator de risco para as DCVs e insuficiência renal (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2010; MANCIA et al., 2013; ACHELROD; WENZEL; FREY, 2014).

Dados estimados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) apontam que mais de 30% dos adultos com idade maior ou igual a 25 anos, em todo o mundo, são acometidos por essa enfermidade (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2013). Na virada do milênio, 1 bilhão de pessoas foram contabilizadas como portadoras de HAS. Em 2025, prevê-se que mais de 1,5 bilhão de pessoas serão afetadas (KEARNEY et al., 2005; IVY; BAILEY, 2014). No Brasil, a prevalência, nos últimos 20 anos, foi acima de 30%, com baixas taxas de adesão às terapias para controle dos níveis pressóricos (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2010; GREZZANA et al., 2013). As terapias medicamentosas para controle da HAS se expandiram ao longo dos anos (SANTOS; VASCONCELOS, 2014). As classes atuais de medicamentos anti-hipertensivos de uso corrente podem ser divididas em: inibidores adrenérgicos, vasodilatadores diretos, diuréticos, antagonistas dos canais de cálcio, bloqueadores dos receptores da angiotensina, inibidores diretos da renina e inibidores da enzima conversora da angiotensina (IECA) (DUSING, 2010; SOOD et al., 2010; MANCIA et al., 2013).

A criação dos IECAs representou um importante avanço no tratamento das DCVs. Sua eficácia para reduzir o risco de DCV tem sido frequentemente estabelecida por vários ensaios clínicos, com uma diversidade de pacientes hipertensos, portadores de insuficiência cardíaca, doença arterial coronariana estável e função ventricular preservada, com níveis de risco cardiovascular diferentes (BRUGTS et al., 2014). Os IECAs estão associados à redução do

tônus vascular, com conseqüente diminuição da resistência periférica e melhor distribuição do fluxo sanguíneo (APONTE; FRANCIS, 2012).

Atualmente, o uso dos IECAs está bem estabelecido nas diretrizes brasileiras de hipertensão, bem como nas diretrizes internacionais da Sociedade Europeia de Cardiologia (ESC), da American Heart Association (AHA) e American College of Cardiology (ACC) para o tratamento de doenças cardiovasculares, como a hipertensão, doença arterial coronariana (DAC) estável, infarto do miocárdio e insuficiência cardíaca (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2010; BRUGTS et al., 2014).

Essa possibilidade de terapia para HAS originou-se de estudos iniciados por brasileiros, que levaram ao descobrimento e validação de um fármaco de ação cardiovascular, o captopril, obtido a partir de estudos com o veneno da serpente *Bothrops jararaca* (CAMARGO, 2012). O captopril, primeiro inibidor específico da enzima conversora de angiotensina (ECA), foi desenvolvido por Ondetti, em 1977, no Squibb Institute for Medical Research, e sua aprovação para uso ocorreu em 1981 (CUSHMAN et al., 1982; ERDOS, 2006; PROBSTFIELD; O'BRIEN, 2010).

O captopril age inibindo a conversão da angiotensina I em angiotensina II, além de gerar um aumento de bradicinina. Possui uma meia vida curta e apresenta efeitos adversos importantes tais como neutropenia, erupção cutânea, tosse seca, angioedema, hipercalemia, cefaleia, tonturas e outros, sendo esses especialmente associados à presença do seu grupo sulfidrilo. Essa porção sulfidrilo foi substituída nos IECAs que surgiram posteriormente, como no caso do enalapril, além do aumento da biodisponibilidade e ação mais prolongada, possibilitando uma única administração ao dia (MANCIA et al., 2013; FELDMAN et al., 2014).

Com base nos agravos à saúde ocasionados pela hipertensão, bem como os inúmeros problemas relacionados às classes de anti-hipertensivos atuais e o aumento da prevalência de indivíduos com hipertensão resistente na população, se fazem necessários novos estudos investigando possíveis novos candidatos a fármacos para tratamento da hipertensão. Associado a isso, o fato de os produtos naturais se apresentarem como promissoras fontes de novos fármacos, a fauna brasileira ser pouco explorada para esse fim e o potencial

farmacológico presente em venenos de serpentes no sistema cardiovascular serviram de motivação para buscar nos venenos possíveis fármacos para tratamento da hipertensão.

É bem descrito que os produtos naturais derivados de plantas e animais constituem excelente fonte para o surgimento de novos agentes terapêuticos. Os pró-fármacos de origem natural têm desempenhado importante papel ao longo dos anos no surgimento de drogas sintéticas, além de representarem fontes de baixo custo e fácil acessibilidade (KUMAR et al., 2014).

Diversos fármacos derivados de produtos naturais têm sido aprovados para utilização em seres humanos. Dentre os produtos naturais, os venenos são misturas complexas, formadas por diferentes compostos que podem fornecer moléculas terapêuticamente úteis, a exemplo do captopril (anti-hipertensivo), o tirofiban e o eptifibatide (agentes antiagregantes), além de alguns estudos demonstrarem efeitos antivirais (ONDETTI; RUBIN; CUSHMAN, 1977; SCARBOROUGH et al., 1991; EGBERTSON et al., 1994; MULLER et al., 2014).

Pelas considerações apresentadas sobre a hipertensão arterial e suas complicações, bem como os danos causados ao indivíduo e à sociedade, e sendo os venenos de serpentes uma promissora fonte natural, justifica-se a permanente preocupação mundial em aprimorar e descobrir novos métodos para o tratamento dessa enfermidade, com estudos direcionados para intervenções na saúde pública, medidas preventivas com abordagem global, bem como o surgimento de novas terapias medicamentosas.

Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Epidemiologia da hipertensão arterial sistêmica

Hipertensão é o termo utilizado para designar a elevação da pressão arterial com caráter patológico. É uma condição clínica multifatorial com consequentes alterações dos órgãos-alvo (coração, encéfalo, rins e vasos sanguíneos) e também alterações metabólicas, com aumento do risco para o surgimento de DCV (WILLIAMS, 2009; SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2010; STERN, 2013; WESTERDAHL et al., 2013). É a doença crônica mais prevalente, afetando mais de 30% dos adultos com idade ≥ 25 anos, em todo o mundo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2013). Estima-se que as complicações da HAS alcancem 9,4 milhões de mortes a cada ano (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2013).

No Brasil, inquéritos populacionais realizados nos últimos 20 anos apontaram uma prevalência acima de 30%. Estima-se que 50% das pessoas com idade entre 60 e 69 anos são acometidas com HAS, e 75% das pessoas com idade acima de 70 anos. Entre os gêneros, a prevalência foi de 35,8% entre homens e de 30% em mulheres, semelhante à de outros países. A prevalência global da HAS encontra-se em torno de 37,8% entre homens e 32,1% em mulheres, segundo estudos realizados em 35 países (PEREIRA et al., 2009; SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2010; NOBRE et al., 2013).

As altas e crescentes taxas de HAS são atribuídas ao crescimento populacional, ao envelhecimento e a fatores de risco comportamentais, como dieta pouco saudável, consumo nocivo de álcool, falta de atividade física, excesso de peso e exposição persistente ao estresse (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2013). Essa patologia representa um grande problema social para o mundo e, apesar da vasta possibilidade de medidas preventivas e de controle disponíveis, sejam ou não farmacológicas, a HAS figura como um grande desafio para a saúde pública e um significativo ônus para a sociedade (ANDRADE et al., 2002; DE SOUSA, 2011).

Uma das principais dificuldades encontradas no controle dos níveis pressóricos de pacientes hipertensos é a falta de adesão ao tratamento. Essa, por sua vez, decorre de vários fatores, incluindo os efeitos adversos apresentados pelos medicamentos. Estudos apontam que 50% dos pacientes hipertensos conhecidos não fazem uso de medicamentos anti-hipertensivos e, aproximadamente, 16 a 50% dos que iniciam o tratamento descontinuam ainda no primeiro ano ou o fazem de maneira incorreta (ANDRADE et al., 2002; LESSA, 2006; NADERI; BESTWICK; WALD, 2012; MOISE et al., 2014).

De maneira generalizada, as consequências dessa falta de controle dos níveis pressóricos refletem na qualidade de vida dos indivíduos e nos gastos em saúde, principalmente nos custos com doenças cardiovasculares que têm a hipertensão arterial como seu principal fator de risco (DESHMUKH et al., 2011; SANTOS; VASCONCELOS, 2014). Em 2009, a AHA estimou um gasto de \$73 bilhões com HAS nos EUA (DESHMUKH et al., 2011). No Brasil, segundo a Sociedade Brasileira de Cardiologia, 75% dos custos financeiros com a saúde são gastos no tratamento de DCV, sendo que 31% são com a hipertensão (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2010).

Assim, o estabelecimento de uma adequada gestão e de estratégias governamentais deve ser continuamente elaborado, na perspectiva de conscientizar a população, promover uma cobertura de saúde universal e de incentivar a redução dos fatores de riscos para HAS (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2013).

2.2 Fisiologia vascular e fisiopatologia da hipertensão arterial sistêmica

A função do sistema cardiovascular pode ser caracterizada por meio de parâmetros mecânicos e físicos. Um destes é a pressão que o sangue exerce sobre a parede das artérias, denominada pressão arterial (JONES et al., 2014). A Pressão (ΔP) no sistema cardiovascular resulta na lei hidrodinâmica de Ohm como $\Delta P = Q \times R$, onde Q é o fluxo sanguíneo e R, a resistência (SALAZAR et al., 2012). Assim, a pressão arterial pode ser elevada, se houver aumento do fluxo sanguíneo, da resistência vascular ou de ambos. Dessa forma, as propriedades mecânicas dos vasos sanguíneos periféricos desempenham

papel importante no controle circulatório, tanto em condições fisiológicas quanto em patológicas (EIKEN et al., 2014; JOYNER; LIMBERG, 2014).

A regulação do tônus vascular e, conseqüentemente, da atividade contrátil das células do músculo liso vascular na circulação sistêmica, é mediada pela interação de substâncias vasodilatadoras e vasoconstrictoras, tais como estímulos hormonais, neurotransmissores e fatores derivados do endotélio (JACKSON, 2000).

O endotélio vascular é considerado um órgão dinâmico que reveste o sistema vascular, composto por células endoteliais que respondem a hormônios, neurotransmissores e fatores que afetam a vasomotricidade, agregação plaquetária, inflamação e outros (GALLEY; WEBSTER 2004; SANDOO et al., 2010). O endotélio libera diversos compostos vasoativos que podem ser vasodilatadores, tais como o óxido nítrico (NO), prostaciclina (PGI₂) e fator de hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) ou fatores vasoconstritores, tais como o tromboxano e endotelina (LÜSCHER; BARTON 1997; KANG, 2014).

O óxido nítrico (NO), um mediador vasodilatador liberado pelo endotélio, foi inicialmente investigado com tal função biológica a partir dos estudos de Furchgott e Zawadzki (1980), que descreveram o fenômeno pelo qual a acetilcolina relaxava preparações dos vasos sanguíneos isolados somente se o endotélio vascular que reveste os vasos estivesse presente e intacto (ZAWADSKI et al., 1980 apud BAUER e SOTNÍKOVÁ, 2010; MONCADA e HIGGS, 2006). O NO desempenha um papel fundamental na manutenção do tônus vascular. É formado sob a influência da enzima óxido nítrico sintase (NOS), que converte o aminoácido L-arginina em NO. São descritas três isoformas de NOS: a neuronal (nNOS), que regula a liberação de neurotransmissor, atuando como um mensageiro neuronal; a isoforma induzível (iNOS), expressa em uma variedade de tecidos de forma induzida por diferentes agentes biológicos; e NOS endotelial (eNOS), que é uma das principais fontes de NO encontradas no sistema cardiovascular (DUDZINSKI et al., 2006).

A eNOS, quando inativa, está vinculada à proteína caveolina, localizada em pequenas invaginações, chamadas cavéolas, presentes na membrana

celular. O aumento dos níveis intracelulares de Ca^{2+} promove a separação da eNOS da caveolina, promovendo sua ativação (MARLETTA, 1994; DESSY; FERON; BALLIGAND, 2010). O NOS pode sofrer influência de agonistas, tais como a bradicinina (BK), a acetilcolina (ACh), trifosfato de adenosina (ATP), adenosina-di fosfato (ADP), a substância P e a trombina (MONCADA; HIGGS 2006; SANDOO et al., 2010).

Uma vez produzido pela eNOS, o NO se difunde a partir das células endoteliais para o músculo liso vascular adjacente. O mecanismo melhor reconhecido para o relaxamento vascular induzido pelo NO é a ativação de guanilil-ciclase solúvel (GCs) em células do músculo liso. Após ativada a GCs, ela catalisa a conversão de trifosfato de guanosina (GTP) para o monofosfato de guanosina cíclico (GMPc), que modula numerosos alvos, incluindo cinases de proteínas, tais como a proteína cinase G (PKG), fosfolipase C (PLC), fosfodiesterases, tirosina-cinases, fosfatases de tirosina e canais iônicos. Em células musculares lisas, ativa a fosfatase da cadeia leve de miosina, que desfosforila a miosina do músculo liso, promovendo a interrupção da contração tônica do sistema contrátil, resultando em relaxamento do vaso. Além disso, o GMPc reduz a liberação de Ca^{2+} pelo retículo sarcoplasmático e também ajuda a restaurar as reservas de Ca^{2+} para dentro desse retículo, ações que reduzem a contração de células musculares lisas vasculares (DUDZINSKI et al., 2006; KANG, 2014).

É fundamental salientar que tal mecanismo de produção de NO depende, em parte, dos níveis intracelulares de Ca^{2+} do retículo endoplasmático, bem como do Ca^{2+} que se difunde para dentro da célula do meio extracelular. A redução nos níveis de Ca^{2+} dissocia o complexo de cálcio-calmodulina da eNOS, que, por sua vez, liga-se com caveolina e fica inativada (FLEMING; BUSSE, 1999; SANDOO et al., 2010).

A tensão de cisalhamento também inicia fosforilação da eNOS pelas ações de proteína cinase B ou Akt. Os resultados desse cisalhamento, com maior fluxo de sangue no vaso, podem aumentar a produção de NO pela eNOS, mas também através da estimulação de receptores de células endoteliais, em que a ativação por agonistas pode desencadear aumento intracelular de Ca^{2+} , resultando em toda a via de sinalização supracitada. Outro

componente de grande importância para o controle do tônus vascular são as prostaglandinas (TRAN; OHASHI; WATANABE, 2000; SANDOO et al., 2010).

As prostaglandinas (PG) foram as primeiras substâncias vasoativas derivadas do endotélio identificadas (MONCADA et al., 1976 apud FÉLÉTOU; HUANG; VANHOUTTE, 2011). Além da liberação de NO, as células endoteliais produzem e liberam PGI₂ em decorrência de múltiplos estímulos fisiológicos e patológicos, e a ação desses prostanoides também regula a função vascular (FÉLÉTOU; HUANG; VANHOUTTE, 2011; KANG, 2014). PGI₂ é solúvel em lipídios e, assim, pode atravessar as membranas das células endoteliais como um fator de vasorrelaxamento local. PGI₂ liga-se ao receptor de IP na membrana plasmática das células musculares lisas vasculares, induzindo à ativação da via adenilil-ciclase (AC)/ AMPc/PKA. Quando ativada, a PKA fosforila proteínas-alvo, resultando no relaxamento vascular (VANE; CORIN, 2003; FETALVERO; MARTIN; HWA, 2007).

A PGI₂ tem sua produção derivada da catálise gerada pela enzima ciclo-oxigenase (COX), da qual existem duas isoformas: a COX-1 e COX-2. A COX-1 é expressa continuamente em células endoteliais, enquanto a COX-2 é expressa quando o endotélio está danificado e exposto a citocinas inflamatórias. A COX-2 converte o ácido araquidônico em prostaglandina H₂ (PGH₂), que é então convertida em PGI₂ pela prostaciclina sintase (DAVIDGE, 2001; KAWKA et al., 2007; FÉLÉTOU; HUANG; VANHOUTTE, 2011).

O fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) foi descrito inicialmente a partir da hiperpolarização de células do músculo liso vascular, com consequente relaxamento independente da eNOS e COX, sugerindo que alguma substância liberada a partir do endotélio estaria induzindo tal efeito (CHEN; SUZUKI; WESTON, 1988; KANG, 2014). O EDHF é ativado por agonista, tais como acetilcolina e bradicinina. Esses receptores, quando ativados, parecem abrir canais para K⁺ nas células do músculo liso, permitindo que o efluxo de K⁺, ao longo do seu gradiente eletroquímico, resulte em hiperpolarização da membrana muscular seguida de relaxamento. Assim, a atividade EDHF não é bloqueada por inibidores de NO-sintase ou da ciclo-oxigenase, mas pode ser inibida, pelo menos em parte, por bloqueadores de canais para K⁺, como os inibidores Kir e Na⁺/K⁺ATPase, ou por bloqueadores

dos canais SKca e IKca, (CHEN; SUZUKI; WESTON, 1988; FÉLÉTOU; VANHOUTTE, 2006; SANDOO et al., 2010; GARLAND; HILEY; DORA, 2011; KANG, 2014).

A resposta vascular mediada pelo EDHF é bloqueada por uma combinação de caribdotoxina, que bloqueia tanto canais para K^+ ativados por Ca^{2+} de grande e intermediária condutância, e apamina, que bloqueia os de pequena condutância, o que não exclui a participação de outros canais para K^+ . Estudos em humanos têm demonstrado a contribuição do EDHF para mediar relaxamento dependente do endotélio, de forma mais significativa em microvasos do que em artérias de grande calibre (FÉLÉTOU; VANHOUTTE, 2006; OZKOR; QUYYUMI, 2011).

O diâmetro das pequenas artérias e arteríolas é mantido, principalmente, pela interação dinâmica de canais para Ca^{2+} e K^+ expressos na membrana plasmática de células vasculares do músculo liso (NELSON; QUAYLE, 1995; JOSEPH et al., 2013).

O Ca^{2+} é um íon importante para a fisiologia cardiovascular. Os níveis de Ca^{2+} intracelular, mais especificamente o aumento do Ca^{2+} nas células musculares, ocorrem, principalmente, pelos canais para cálcio sensíveis à voltagem (Ca_v) e canais catiônicos não seletivos, localizados na membrana plasmática, além de canais que levam à liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares, tais como os receptores de trifosfato de inositol (IP3) e/ou receptores de rianodina presentes na membrana do retículo sarcoplasmático (LEDOUX et al., 2006; ABOU-SALEH et al., 2013).

Os canais para Ca^{2+} sensíveis à voltagem são denominados canais para Ca^{2+} tipo-L e Ca^{2+} tipo-T. Os chamados tipo-L são canais abertos por despolarização, ativados por altos valores de voltagens, o que permite o influxo Ca^{2+} para o meio intracelular e início da contração celular e outros processos dependentes do íon Ca^{2+} . Esses canais apresentam condutância unitária e têm sua inativação lenta. Já os canais para Ca^{2+} tipo-T têm ativação rápida, em baixos valores de voltagem, são relativamente insensíveis a agentes que bloqueiam os canais para Ca^{2+} tipo-L e possuem pouca predominância no leito vascular (GRAY et al., 1998; CATTERALL, 2000; JACKSON, 2000).

O aumento nos níveis intracelulares de cálcio leva ao processo de acoplamento excitação-contração, que resulta de mecanismos eletromecânicos ou fármacomecânicos. O mecanismo eletromecânico depende do potencial de membrana e do influxo de cálcio pelos canais de cálcio de voltagem dependente do tipo-L, levando ao seu aumento no meio intracelular e posterior ativação da maquinaria contrátil. No acoplamento fármacomecânico, a ativação da PKC e outros componentes intracelulares desempenham papel importante na produção de força por vasoconstritores (SOMLYO, 1994; GRAY et al., 1998).

A abertura de canais para K^+ decorrente de estímulos endógenos ou agentes farmacológicos propicia o efluxo de K^+ e conseqüente hiperpolarização da membrana plasmática, levando ao fechamento de canais para Ca^{2+} , reduzindo seus níveis no meio intracelular e proporcionando a vasodilatação. Por outro lado, o fechamento dos canais para K^+ despolariza a membrana plasmática, que resulta na abertura de canais para Ca^{2+} , aumentando seus níveis no meio intracelular, o que leva à vasoconstrição (COX; RUSCH, 2002; JOSEPH et al., 2013).

As células musculares lisas expressam diferentes tipos de canais iônicos, seja no retículo sarcoplasmático ou na membrana plasmática, objetivando controlar o potencial de membrana, os níveis de Ca^{2+} intracelular e, conseqüentemente, a contratilidade celular (JACKSON, 2005).

O potencial de membrana celular é determinado, principalmente, pelo efluxo de K^+ através da membrana plasmática por canais aí presentes, incluindo os dependentes da voltagem (K_V) e os ativados por Ca^{2+} (K_{Ca}), embora haja também os retificadores de entrada (K_{ir}), os sensíveis ao ATP (K_{ATP}) e os canais de dois poros (K_{2P}) (NELSON; QUAYLE, 1995; CHRISOBOLIS; SOBEY, 2003; GUÉGUINOU et al., 2014).

Os K_{Ca} são canais ativados por Ca^{2+} intracelular (GHATTA et al., 2006). São divididos em canais para K^+ de grande (BK_{Ca}), intermediária (IK_{Ca}) e pequena condutância (SK_{Ca}). Os canais BK_{Ca} são expressos de forma abundante no tecido vascular (GHATTA et al., 2006; TIAN et al., 2014). São ativados por despolarização do potencial de membrana e por Ca^{2+} intracelular, proporcionando um mecanismo de *feedback* para limitar a contração do

músculo. Isso causa hiperpolarização do músculo liso e encurtamento da duração do potencial de ação, diminuindo, assim, a entrada de cálcio através de canais de cálcio voltagem-dependentes. Apresenta, desta forma, significativa importância para induzir interrupção de mecanismos de contração e despolarização muscular (LEDOUX et al., 2006; PONTE, et al., 2012). IK_{Ca} e SK_{Ca} são canais de condutância unitária menor, sendo sensíveis ao complexo Ca^{2+} - calmodulina e insensíveis ao potencial de membrana (LEDOUX et al., 2006).

Os canais K_V , dos quais alguns membros são chamados de canais para K^+ retificadores de saída, são ativados por despolarização de membrana plasmática e são encontrados em todas as células musculares lisas. Fisiologicamente, em artéria mesentérica de rato, os canais K_V contribuem para restaurar o potencial de membrana e o tônus dos vasos. Além disso, os canais K_V também são alvo de fosforilação pela proteína cinase A (PKA) (COLE; CLEMENT-CHOMIENNE; AIELLO, 1996; JOSEPH et al., 2013). A via de sinalização da proteína cinase C (PKC) leva ao fechamento dos canais K_V e constrição do músculo liso, enquanto que a sinalização dependente de PKA pode ser decorrente do aumento de cAMP, gerando abertura dos canais K_V , hiperpolarizando a membrana e facilitando o relaxamento das células do músculo liso (JACKSON, 2005; JOSEPH et al., 2013).

Os canais K_{ir} conduzem corrente de K^+ especialmente para o meio intracelular. São canais ativados por potenciais de membrana e por concentrações de K^+ extracelular, contudo, também conduzem pequenas correntes de K^+ para o meio extracelular (JACKSON, 2005; GUÉGUINOU et al., 2014). Toda essa abordagem possibilita o entendimento dos diversos fatores que podem estar relacionados com a hipertensão arterial. A PA é classificada conforme os níveis da pressão arterial sistólica e diastólica. Essa classificação apresenta pequenas variações, de acordo com as Sociedades mundiais. No Brasil, a Sociedade Brasileira de Cardiologia, juntamente com a Sociedade Brasileira de Hipertensão e Nefrologia, classifica os níveis de PA, conforme Tabela 1.

Tabela 1 - Classificação da pressão arterial de acordo com a medida casual realizada em consultório

| Classificação | Pressão sistólica | Pressão diastólica |
|--------------------------------------|--------------------------|---------------------------|
| Ótima | <120 | <80 |
| Normal | <130 | <85 |
| Limítrofe | 130-139 | 85-89 |
| Hipertensão estágio 1 | 140-159 | 90-99 |
| Hipertensão estágio 2 | 160-179 | 100-109 |
| Hipertensão estágio 3 | ≥180 | ≥110 |
| Hipertensão sistólica isolada | ≥140 | <90 |

Fonte: Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2010.

Embora a definição clínica da hipertensão seja uma pressão arterial acima de 140/90 mmHg, as novas diretrizes sugerem que as intervenções para baixar a pressão arterial devem ser instituídas com pressões sistólicas de 130 a 139 mmHg e pressões diastólicas de 85 a 89 mmHg (MANCIA et al., 2013).

2.3 Tratamento da hipertensão

A terapia anti-hipertensiva engloba o tratamento não medicamentoso, com mudança nos hábitos de vida, alimentação saudável, dentre outros, e o tratamento medicamentoso, ambos com o objetivo de reduzir a morbidade e mortalidade cardiovascular, possibilitando melhor qualidade de vida (GIROTTI et al., 2013).

Ao longo dos anos, vários fármacos surgiram para tratamento da HAS com o objetivo de reduzir o débito cardíaco (DC) e/ou a resistência periférica total (ROWAN et al., 2014). Atualmente, a terapia medicamentosa é dividida em diferentes classes, conforme a Tabela 2. Para o presente estudo, os inibidores da enzima conversora de angiotensina apresentam uma característica especial, devido ao fato de o primeiro fármaco pertencente a essa classe ter sido originado de uma fonte natural, mais especificamente do veneno de uma serpente (ONDETTI; RUBIN; CUSHMAN, 1977).

Tabela 2 - Classes de Anti-Hipertensivos disponíveis para uso clínico

| |
|--|
| Diuréticos |
| Diuréticos de Alça |
| Diuréticos tiazídicos |
| Diuréticos poupadores de potássio |
| Diuréticos inibidores da anidrase carbônica |
| Inibidores adrenérgicos |
| Ação central – agonistas alfa-2 centrais |
| Betabloqueadores – bloqueadores beta-adrenérgicos |
| Alfabloqueadores – bloqueadores alfa-1 adrenérgicos |
| Vasodilatadores diretos |
| Bloqueadores dos canais de cálcio |
| Inibidores diretos da renina |
| Bloqueadores do receptor AT1 da angiotensina II |
| Inibidores da enzima conversora da angiotensina |

Fonte: Adaptada da Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2010.

2.3.1 Inibidores da enzima conversora de angiotensina

A enzima conversora de angiotensina (ECA) é uma proteína formada por uma única cadeia polipeptídica, organizada em dois domínios catalíticos independentes e está localizada sobre a superfície do endotélio vascular (ERDÖS; SKIDGEL, 1987 apud GONZALEZ-VILLALOBOS, 2013). É um componente essencial na ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) e tem sua liberação no plasma mediada após ação de uma carboxipeptidase. A ECA tecidual ou a plasmática converte a angiotensina I (Ang I) em angiotensina II (Ang II), um potente vasoconstrictor (CAMARGO et al., 2012; BERNSTEIN et al., 2013).

A ECA cliva muitos substratos, incluindo a angiotensina I e a bradicinina (BK), com consequente degradação desta. A BK é um peptídeo vasodilatador atuante em receptores específicos presentes no endotélio vascular,

desencadeando diferentes vias de sinalização, induzindo a liberação de substâncias vasodilatadoras, como óxido nítrico e as prostaciclina (BERNIER; HALDAR; MICHEL, 2000; BAE et al., 2003). Desta forma, o bloqueio farmacológico do SRAA, através da inibição da ECA, diminui a conversão da angiotensina II, inibe a degradação de bradicinina, estimulando assim a liberação de fatores de relaxamento do endotélio (MURPHEY; VAUGHAN; BROWN, 2003; PROBSTFIELD; O'BRIEN, 2010). Por isso, a ECA é um alvo para o tratamento da hipertensão arterial humana. Durante muitos anos, os IECAs têm sido usados para o tratamento de doenças cardíacas e a hipertensão (BRUGTS et al., 2014).

O surgimento dos IECAS originou-se de estudos iniciados por brasileiros, que resultaram no isolamento e identificação do nonapeptídeo inibidor competitivo da ECA, levando ao descobrimento e validação de um fármaco de ação cardiovascular, o captopril, derivado a partir do veneno da serpente *Bothrops jararaca* (CUSHMAN et al., 1977; CAMARGO, 2012; DA SILVA, 2013). No primeiro momento, os pesquisadores descobriram um novo fator hipotensor da musculatura lisa, presente no veneno da *Bothrops jararaca*, denominado bradicinina. Posteriormente, observou-se que o veneno não somente gerava bradicinina, mas também reforçava o seu efeito hipotensor através da formação de peptídeos potenciadores de bradicinina (BPP) (FERREIRA, 1965; CUSHMAN et al., 1982; FERREIRA; SILVA, 1965 apud CAMARGO, 2012).

O captopril foi o primeiro IECA administrado por via oral. Atualmente, existem no mercado diversos fármacos inibidores da enzima conversora de angiotensina, sendo utilizados em vários países, todos com o mesmo mecanismo de ação (RIBEIRO; MUSCARÁ, 2001; FELDMAN et al., 2014). Contudo, muitos estudos são realizados e publicados em diferentes partes do mundo, buscando moléculas terapeuticamente úteis, derivadas de veneno de serpentes ou de outras fontes naturais, que apresentem potencial anti-hipertensivo ou para outros fins terapêuticos.

2.4 Veneno de serpentes - Aspectos gerais

A literatura aponta a existência de 2.900 espécies de serpentes catalogadas no mundo, distribuídas em 465 gêneros e 20 famílias, das quais 410 espécies são venenosas (TOKARNIA; PEIXOTO, 2006; CUNHA; MARTINS, 2012). No Brasil, existem exemplares de 10 famílias, 65 gêneros e 365 espécies, sendo 59 delas venenosas (LIRA-DA-SILVA et al., 2009). Das espécies venenosas, 32 pertencem ao gênero *Bothrops* e 6 ao gênero *Crotalus* (TOKARNIA; PEIXOTO, 2006).

Os venenos são substâncias tóxicas produzidas por plantas ou animais em um órgão secretor bem desenvolvido, ou mesmo num grupo de células (RUSSEL, 1980 apud CUNHA; MARTINS, 2012). Sabe-se que os venenos de serpentes são os mais complexos de todos os venenos naturais. São compostos bioativos, formados por componentes orgânicos e inorgânicos, naturalmente adaptados pela seleção natural, e constituem-se ferramentas farmacológicas e biotecnológicas com variadas atividades biológicas (CALVETE, 2009, 2013; WARRELL, 2010). Esse complexo de substâncias pode conter mais de 100 diferentes proteínas e peptídeos tóxicos e não tóxicos, mas também pode ser composto por aminoácidos, nucleotídeos, lipídios e carboidratos. Entretanto, a maior parte das substâncias presentes nos venenos de serpente é formada por proteínas (JIANG et al., 2008; BARLOW et al., 2009; WARRELL, 2010).

O valor medicinal dos venenos é conhecido desde os tempos antigos. Contudo, investigações intensivas sobre compostos naturais derivados do veneno de serpentes, para a geração de produtos farmacêuticos, têm sido realizadas apenas nas últimas décadas, em especial, após a identificação e isolamento do peptídeo potencializador de bradicinina, a partir do veneno *Bothrops jararaca*, que culminou no surgimento do primeiro IECA (FERNANDEZ; NESHICH; CAMARGO, 2004; CALVETE, 2009). Desde então, diversos estudos com venenos de serpentes vêm sendo desenvolvidos, a fim de identificar mecanismos moleculares envolvidos nos processos fisiológicos induzidos por esses compostos, bem como o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos para o tratamento de múltiplas patologias (CALVETE, 2009; WARRELL, 2010; GOMES et al., 2014).

2.4.1 *Crotalus durissus*

O gênero *Crotalus* é representado no Brasil por uma única espécie, *Crotalus durissus*, e por cinco subespécies: *Crotalus durissus terrificus*, encontrada nas zonas altas e secas da Região Sul oriental e meridional; *Crotalus durissus collilineatus*, distribuídas nas regiões secas da Região Centro-Oeste, Minas Gerais e norte de São Paulo; *Crotalus durissus cascavella* (CDC), encontrada nas áreas da caatinga do Nordeste, e registro de sua presença também em regiões litorâneas; *Crotalus durissus ruruima*, observada na Região Norte do País; *Crotalus durissus marajoensis*, observada na Ilha de Marajó. Esse gênero é popularmente conhecido como cascavel (BOLDRINI-FRANCA et al., 2010).

O veneno crotálico apresenta-se como um complexo enzimático com múltiplas ações biológicas. É composto pelas enzimas fosfodiesterase, L-amino oxidase, 5-nucleotidase e as seguintes toxinas: crotoxina, crotamina, giroxina, convulxina e proteinases séricas, como crotalocitina, trombocitina e enzimas (KERKIS et al., 2004; CUNHA; MARTINS, 2012; GUIDOLIN et al., 2013).

Estudos têm demonstrado uma vasta rede de funções biológicas com fins terapêuticos atribuídos aos venenos das subespécies *Crotalus durissus*. Existem publicações com a crotoxina isolada da *Crotalus durissus terrificus* como agente antitumoral, além de um ensaio clínico em estágio I com pacientes portadores de tumores sólidos refratários à terapia convencional, demonstrando uma atividade antitumoral promissora após administração intramuscular de crotoxina durante 30 dias (CURA et al., 2002). Relatos de potencial analgésico com indução de efeito antinociceptivo de longa duração da dor neuropática também com a crotoxina da *Crotalus durissus terrificus* foram apresentados (NOGUEIRA-NETO et al., 2008).

Outros estudos *in vitro* demonstraram atividade antiplasmódica induzida pela crotoxina isolada da *Crotalus durissus cumanensis* (QUINTANA et al., 2012). A crotoxina, principal toxina do veneno crotálico, é constituída por duas subunidades, sendo uma de caráter ácido, a crotapotina, e a outra de caráter básico, a fosfolipase A₂ (BON et al., 1979; LOMEIO et al., 2014). Foram apresentadas também publicações inovadoras que podem servir de base para o tratamento da Dengue e Febre Amarela, a partir de ensaios com veneno da

Crotalus durissus terrificus, demonstrando inibição da atividade viral induzida pelo veneno dessa serpente, envolvendo uma possível ação da fosfolipase A₂ (MULLER et al. 2014).

A subespécie de interesse deste estudo, *Crotalus durissus cascavella* (Figura 1), é encontrada, principalmente, em regiões da caatinga do Nordeste (BOLDRINI-FRANCA et al., 2010). Estudos com o veneno dessa subespécie têm demonstrado uma gama de possibilidades terapêuticas secundárias à complexa formação química desse composto. A crotapotina isolada da CDC mostrou efeito bactericida para bactérias gram-negativas (DE OLIVEIRA et al., 2003). Estudos posteriores reafirmaram esse poder antimicrobiano, agregando ainda ação sobre bactérias gram-positivas, além de um poder antiparasitário, especificamente antileishmaniose, dependente da produção de peróxido de hidrogênio, induzido pelo veneno (TOYAMA et al., 2006; RÁDIS-BAPTISTA et al., 2006). Ensaios *in vivo* realizados com ratos, comparando 3 subespécies da *Crotalus durissus*, identificaram que os componentes antileishmaniose se apresentavam em maior quantidade na subespécie CDC, e que esses poderiam servir como possíveis agentes contra a leishmaniose cutânea (PASSERO et al., 2007).

Figura 1 - Imagem ilustrativa da serpente *Crotalus durissus cascavella*



Fonte: Daniela Pinto Coelho

Para além das atividades antiparasitária e antimicrobiana, ensaios vasculares realizados com anéis de artéria aorta torácica de ratos evidenciaram uma atividade relaxante induzida por um peptídeo natriurético isolado do veneno da CDC. Além de estudos *in vivo* demonstrarem um efeito hipotensor,

com redução da pressão arterial média, frequência cardíaca e aumento na produção de nitrito, foram apresentados também efeitos renais com aumento na pressão de perfusão, no fluxo urinário e na taxa de filtração glomerular (EVANGELISTA et al., 2008, 2011).

Recentemente, pesquisadores isolaram desse veneno um novo peptídeo potencializador de bradicinina, dito como único isolado de tal veneno. A partir desse BPP, foi observada a inibição do efeito vasopressor da angiotensina I em ratos hipertensos e redução da contração induzida pela angiotensina I em íleo de cobaia. Os dados sugerem uma diminuição de produção da angiotensina II com resultados muito semelhantes ao apresentado pelo captopril (LOPES et al., 2014).

Portanto, todos esses estudos realizados com venenos de serpentes demonstram o potencial dos compostos presentes para tratamento de diferentes enfermidades, incluindo aquelas do sistema cardiovascular. Dentre esses, o veneno da serpente CDC é passível de ser uma fonte natural importante na bioprospecção de novos agentes anti-hipertensivos, podendo representar uma nova possibilidade terapêutica para o tratamento das DCVs. Entretanto, investigações mais detalhadas sobre o mecanismo de ação desse veneno em vasos sanguíneos, bem como em tecido cardíaco isolado, não foram ainda evidenciadas, tornando este estudo de grande importância para o potencial cardiovascular de princípios ativos da citada serpente, assim como no desenvolvimento de novos fármacos anti-hipertensivos.

Objetivo

3 OBJETIVO

3.1 Geral:

O presente estudo objetivou investigar o efeito vascular e cardíaco do veneno bruto da serpente *Crotalus durissus cascavella* em ratos normotensos (Wistar).

3.2 Específicos:

- ✓ Avaliar o efeito agudo do veneno da serpente *Crotalus durissus cascavella* sobre vasos sanguíneos, utilizando preparações de anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato;
- ✓ Verificar o mecanismo de ação envolvido no relaxamento vascular induzido pelo veneno da *Crotalus durissus cascavella*;
- ✓ Investigar os efeitos induzidos pelo veneno da *Crotalus durissus cascavella* sobre o cronotropismo e inotropismo cardíacos em ensaios com átrio isolado de rato;
- ✓ Verificar a produção de NO por células endoteliais aórticas isoladas de ratos induzida pelo veneno da *Crotalus durissus cascavella*.

Materiais e Métodos

4 MATERIAIS

4.1 Obtenção e preparação do veneno bruto da serpente

Crotalus durissus cascavella.

O veneno bruto da CDC foi extraído e cedido pela Professora Doutora Luciana Lyra Casais para a realização dos estudos da atividade farmacológica.

As amostras do veneno foram extraídas por pressão manual das glândulas de espécimes da CDC provenientes de Ibiquera (BA), município localizado a Latitude 12° 39' 04" S Longitude 40° 56' 01" W. Os animais foram mantidos no serpentário do Núcleo Regional de Ofiologia e Animais Peçonhentos da Bahia (NOAP-UFBA). Após a extração, as amostras foram secas a vácuo e imediatamente armazenadas a uma temperatura de -20°C até o uso; toda a extração do veneno já foi realizada. O NOAP é um criadouro científico com autorização para manutenção e extração de animais peçonhentos (licença do IBAMA nº 016/2002).

No momento da realização dos experimentos, as amostras foram solubilizadas em água destilada e conservadas em gelo durante todo o experimento.

4.2 Animais

Foram utilizados para todos os experimentos ratos normotensos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*), pesando entre 250-300 gramas. Os animais foram provenientes do Biotério do Laboratório de Neurociências do Instituto de Ciências da Saúde da UFBA. Estes animais foram mantidos sob condições controladas de temperatura ($21 \pm 1^\circ \text{C}$) e submetidos a um ciclo claro-escuro de 12 horas (6 – 18 horas), tendo livre acesso à alimentação e água. Os ensaios foram realizados de acordo com o guia de cuidados e uso de animais de laboratório adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências da Saúde – ICS da Universidade Federal da Bahia (CEUA-ICS/ UFBA nº 072/2014).

4.3 Drogas

Durante a realização dos experimentos, foram utilizadas as seguintes drogas: cloridrato de L (-) fenilefrina (Sigma), cloridrato de acetilcolina (Sigma), 4-aminopiridina (Sigma), prostaglandina F2 α (Sigma), tetraetilamônio (TEA) (Sigma), ODQ (1H-[1,2,4] Oxadiazolo-[4,3-a] Quinoxalin -1 – One) (Sigma), Indometacina (sigma), cloreto de bário (BaCl₂) (sigma) e L-NAME (N^G-nitro-L-arginina-metil éster) (sigma). Para a preparação das soluções estoques o ODQ foi dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO) e diluído em Água Milli Q, a indometacina foi dissolvida em solução de bicarbonato de sódio (NaHCO₃) a 5%. As demais drogas foram dissolvidas em água destilada. Todas as soluções foram mantidas em temperatura de 0°C.

4.4 Soluções fisiológicas

Para a preparação das soluções fisiológicas foram utilizados os seguintes sais: cloreto de sódio (NaCl) (Merck), cloreto de potássio (KCl) (Merck), cloreto de cálcio di-hidratado (CaCl₂.2H₂O) (Merck), sulfato de magnésio heptahidratado (MgSO₄.7H₂O) (Merck), cloreto de magnésio hexa-hidratado (MgCl₂.6H₂O) (Merck), glicose (C₆H₁₂O₆) (Merck), bicarbonato de sódio (NaHCO₃) (VETEC), fosfato de sódio mono-hidratado (NaH₂PO₄.H₂O) (VETEC) e fosfato de potássio (KH₂PO₄) (VETEC).

As tabelas a seguir mostram as composições das soluções utilizadas:

Tabela 3. Composição da solução de Tyrode (pH= 7,4)

| Substância | Concentração (mM) |
|----------------------------------|-------------------|
| NaCl | 158,3 |
| KCl | 4,0 |
| CaCl ₂ | 2,0 |
| MgCl ₂ | 1,05 |
| NaHCO ₃ | 10,0 |
| NaH ₂ PO ₄ | 0,42 |
| Glicose | 5,6 |

Fonte: Adaptado de TANAKA et al., 1999

Tabela 4. Composição da solução de Tyrode despolarizante com KCl à 20mM (pH=7,4)

| Substância | Concentração (mM) |
|----------------------------------|--------------------------|
| NaCl | 142,3 |
| KCl | 20,0 |
| CaCl ₂ | 2,0 |
| MgCl ₂ | 1,05 |
| NaHCO ₃ | 10,0 |
| NaH ₂ PO ₄ | 0,42 |
| Glicose | 5,6 |

Fonte: Adaptado de TANAKA et al., 1999.

Tabela 5. Composição da solução de Tyrode despolarizante com KCl à 80mM (pH=7,4)

| Substância | Concentração (mM) |
|----------------------------------|--------------------------|
| NaCl | 82,3 |
| KCl | 80,0 |
| CaCl ₂ | 2,0 |
| MgCl ₂ | 1,05 |
| NaHCO ₃ | 10,0 |
| NaH ₂ PO ₄ | 0,42 |
| Glicose | 5,6 |

Fonte: Adaptado de TANAKA et al., 1999.

Tabela 6. Composição da solução de Krebs bicarbonato (pH=7,4)

| Substância | Concentração (mM) |
|---|--------------------------|
| Cloreto de Sódio (NaCl) | 117,0 |
| Cloreto de Potássio (KCl) | 5,36 |
| Cloreto de Cálcio (CaCl ₂ .H ₂ O) | 2,5 |
| Fosfato de Potássio (KH ₂ PO ₄) | 1,03 |
| Bicarbonato de sódio (NaHCO ₃) | 25,0 |
| Sulfato de Magnésio (MgSO ₄ .H ₂ O) | 0,57 |
| Glicose (C ₆ H ₁₂ O ₆) | 11,1 |

Fonte: BAILEY e ONG, 1978

5 MÉTODOS

Ensaio farmacológicos

Foi utilizada abordagem farmacológica *in vitro* com animais normotensos (Wistar). Para os ensaios vasculares, foram utilizadas artérias mesentéricas superiores de ratos Wistar. Para avaliação da influência do veneno da CDC no inotropismo e cronotropismo cardíacos, foram realizados ensaios com átrios isolados de ratos também normotensos. Para avaliação da produção de NO, foram utilizadas células endoteliais aórticas.

Estudos *In vitro*

5.1 Preparações com artéria mesentérica superior isolada de rato com ou sem endotélio funcional.

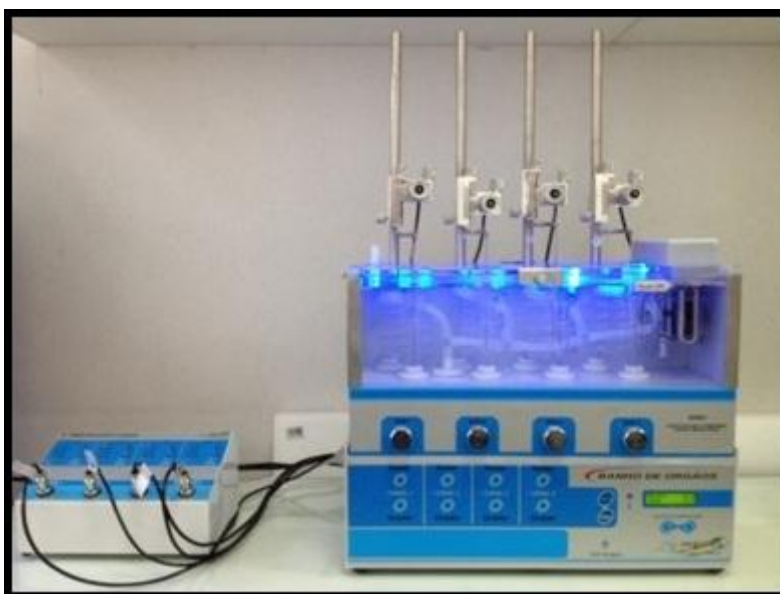
Os ratos foram eutanasiados em câmara de CO₂. Através de uma incisão no abdome do animal, a artéria mesentérica superior foi retirada, isolada de tecido conectivo e adiposo e anéis do primeiro segmento da artéria (1 - 2 mm) foram obtidos. Os anéis foram mantidos em cubas contendo 10 mL de solução de Tyrode a 37 °C e gaseificada com uma mistura de 95% de O₂ e 5% de CO₂ (carbogênio). Os anéis foram suspensos por linhas de algodão fixadas a um transdutor de força, o qual estava acoplado a um sistema de aquisição (Miobath-4, WPI, Sarasota, EUA) para o registro das contrações isométricas. Cada anel foi submetido a uma tensão constante de 0,75 g por um período de 60 min. Durante esse tempo, o meio nutritivo foi trocado a cada 15 minutos para prevenir a interferência de metabólitos.

Posteriormente uma contração tônica submáxima à fenilefrina (Phe) 10µM, a qual se estabiliza em torno de 25 minutos, foi registrada. Uma segunda resposta à Phe foi obtida e concentrações diferentes do veneno foram adicionadas cumulativamente à cuba. Os resultados foram expressos levando em consideração que a contração induzida por Phe corresponde a 100% e que, a tensão de repouso é igual a 0%.

Para a realização dos experimentos na ausência do endotélio funcional, os anéis foram submetidos a um leve atrito mecânico entre as paredes internas do vaso com uma haste de metal.

A presença de endotélio funcional foi verificada pelo relaxamento dos anéis após adição de 10 μ M de acetilcolina (ACh). Foram considerados com endotélio, os anéis com relaxamento superior a 90% sobre a pré-contracção com Phe. Já os anéis com relaxamentos inferiores a 10%, foram considerados sem endotélio. Anéis com relaxamentos entre 10 e 90% foram desprezados dos protocolos experimentais.

Figura 2 - Aparato utilizado para os experimentos com anéis de artéria mesentérica superior isolada de Wistar PA



Fonte: Autora

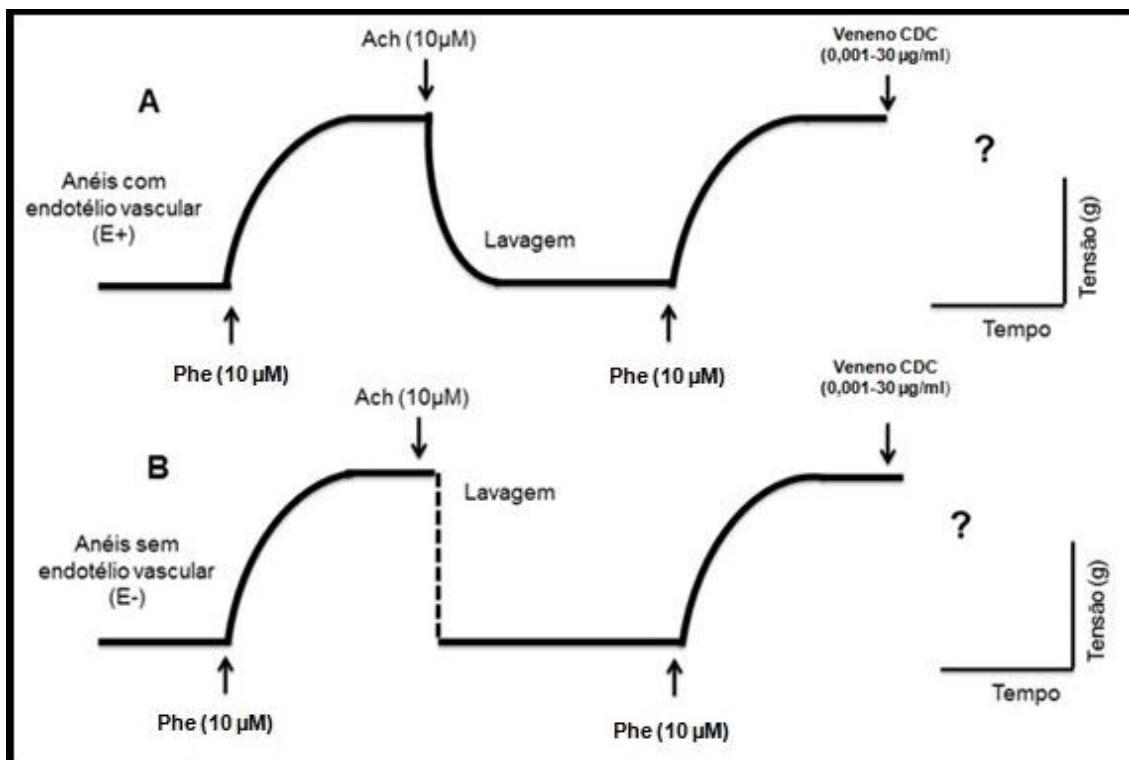
5.1.1 Protocolos experimentais utilizando artéria mesentérica superior isolada de Wistar.

5.1.1.1 Avaliação do efeito do veneno da CDC em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos Wistar, pré-contráidos com Phe (10 μ M).

Após um período de 60 minutos de estabilização, uma contração tônica submáxima a Phe (agonista α 1-adrenérgico) 10 μ M, a qual se estabilizou em torno de 25 minutos, foi registrada em anéis mesentéricos de animais Wistar.

Uma segunda resposta à Phe foi obtida e concentrações crescentes do veneno e/ou frações foram adicionadas, cumulativamente, à cuba, contendo os anéis mesentéricos com o endotélio intacto e anéis com o endotélio funcionalmente removido. Durante a fase de contração tônica, diferentes concentrações do veneno (0,001; 0,01; 0,1; 0,3; 1; 3; 10; 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foram adicionadas, cumulativamente, ao banho de órgãos. Os resultados foram expressos levando em consideração que a contração induzida por Phe corresponde a 100 % e que a tensão de repouso é igual a 0 %. Após a obtenção das curvas concentração-resposta, foi analisado o E_{max} (efeito máximo) das curvas individuais na presença e na ausência de endotélio funcional (Figura 3).

Figura 3 - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de concentrações crescentes do veneno da CDC (0,001-30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato Wistar, pré-contraídos com Phe (10 μM). (A) Anéis com endotélio intacto; (B) Anéis com endotélio ausente.

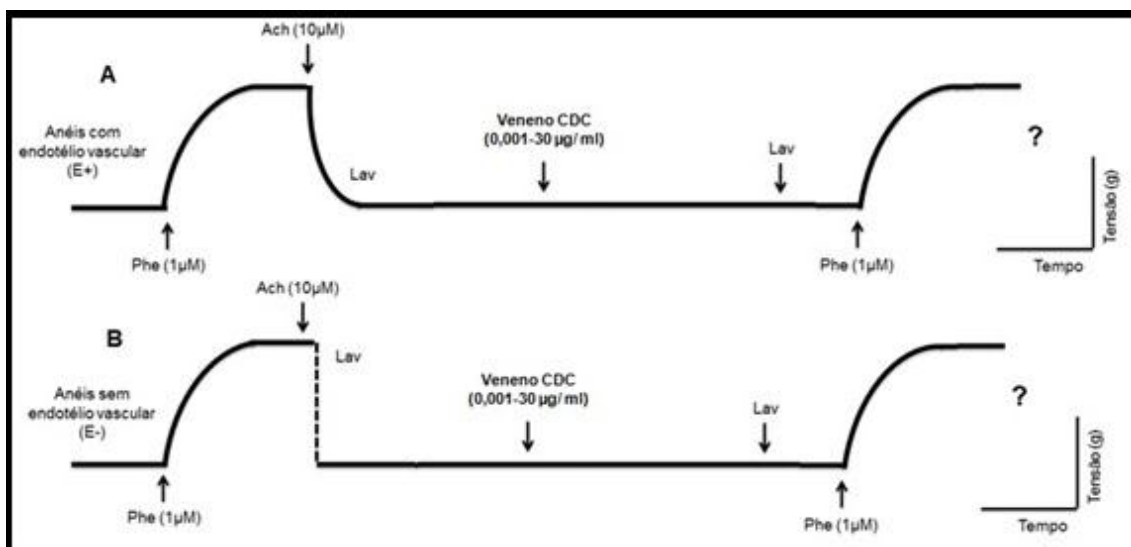


Fonte: Autora

5.1.1.2 Avaliação do efeito do veneno da CDC em anéis vasculares sob o tônus basal.

Para avaliar o efeito do veneno da CDC no estado de contratilidade basal do tecido vascular, esse foi testado em anéis mesentéricos de animais Wistar, com e sem endotélio funcional, sob o tônus basal. Após a verificação da presença e/ou ausência de endotélio funcional, o anel de artéria mesentérica foi estabilizado durante 30 minutos e, posteriormente, o veneno da CDC (0,001- 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foi adicionado cumulativamente, seguido de lavagem e uma nova contração com Phe (10 μM). A reversibilidade do efeito foi analisada, comparando as contrações induzidas por Phe antes e após adição do veneno (Figura 4).

Figura 4 - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de concentrações crescentes do veneno da CDC (0,001 – 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato Wistar com e sem endotélio funcional, no estado basal do tecido vascular.



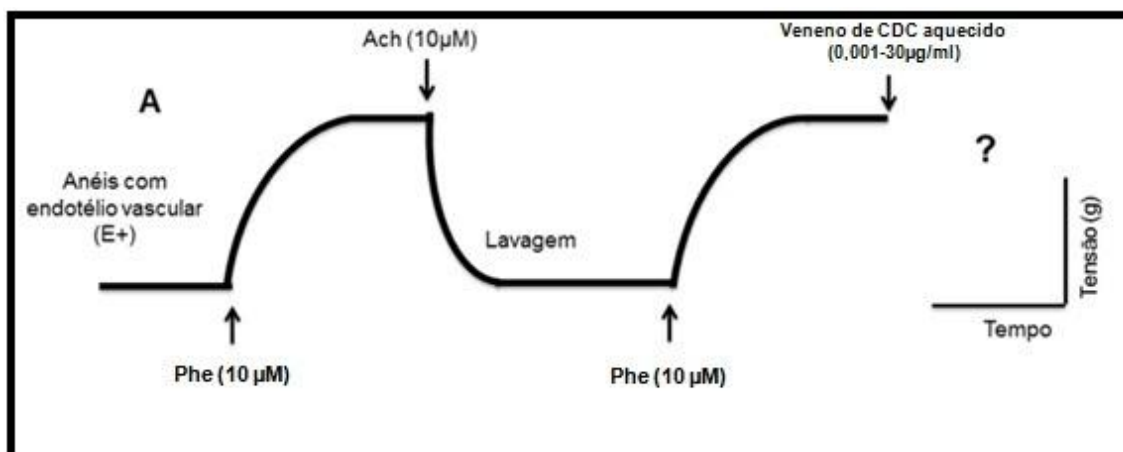
Fonte: Autora

5.1.1.3 Avaliação do efeito do veneno da CDC submetido ao aquecimento sobre anéis vasculares pré-contraídos com Phe (10 μM)

Para obter indicações de uma possível termolabilidade do constituinte vasorrelaxante do veneno, o mesmo foi testado após aquecimento em anéis mesentéricos de animais Wistar, com endotélio funcional intacto. Após a verificação da presença do endotélio funcional, o anel de artéria mesentérica foi lavado, seguido de uma nova contração com Phe (10 μM). Posteriormente, o veneno da CDC, aquecido durante 20 minutos a uma temperatura de 100°C,

foi adicionado cumulativamente (0,001- 30 $\mu\text{g/mL}$). A eficácia vasorrelaxante do veneno foi avaliada através do E_{max} obtido como descrito anteriormente (Figura 5).

Figura 5 - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de concentrações crescentes do veneno da CDC aquecido (0,001-30 $\mu\text{g/mL}$) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato Wistar, pré-contraídos com Phe (10 μM).

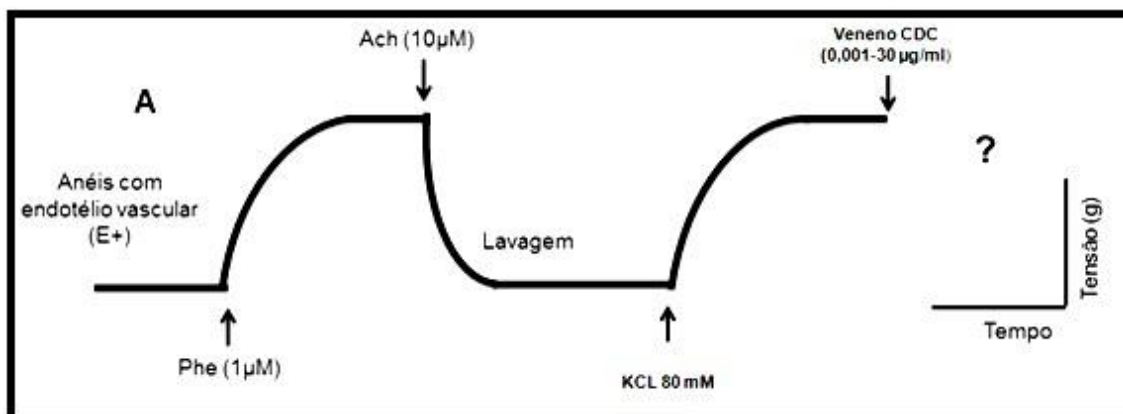


Fonte: Autora

5.1.1.4 Avaliação do efeito do veneno da CDC sobre as contrações vasculares induzidas por agente despolarizante KCl 80mM.

Esse experimento foi desenvolvido para avaliar o efeito do veneno da CDC em anéis mesentéricos pré-contraídos com outro agente contracturante, cujo mecanismo de ação difere do induzido por Phe para gerar aumento de tensão. Após a verificação da presença do endotélio funcional como descrito anteriormente, o meio nutritivo de cada preparação foi trocado por uma solução com elevada concentração de K^+ (KCl 80 mM - Tabela 5), que promove uma despolarização da membrana plasmática, gerando, principalmente, a ativação dos canais de Ca^{2+} sensíveis à voltagem (Ca_v) (VERGARA et al., 1998; GUÉGUINOU et al. 2014). No componente tônico e sustentado da segunda contração, com o tempo médio de 30 minutos para estabilização, foram adicionadas concentrações crescentes do veneno da CDC (0,001- 30 $\mu\text{g/mL}$), de maneira cumulativa no banho. A eficácia vasorrelaxante do veneno foi avaliada através do E_{max} obtido como descrito anteriormente (Figura 6).

Figura 6 - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de concentrações crescentes do veneno da CDC (0,001 – 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato Wistar com endotélio funcional, pré-contraídos com solução despolarizante (KCl 80 mM).

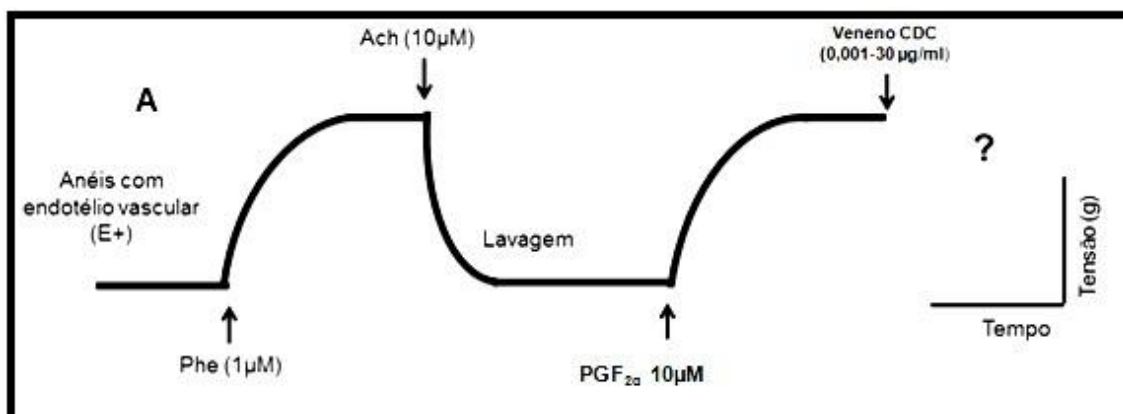


Fonte: Autora

5.1.1.5 Avaliação do efeito do veneno da CDC sobre as contrações vasculares induzidas por $\text{PGF}_{2\alpha}$.

Este experimento foi desenvolvido para avaliar o efeito do veneno da CDC em anéis mesentéricos pré-contraídos com outro agente contracturante, cujo mecanismo de ação difere do induzido por Phe ou KCl 80 mM para gerar aumento de tensão. Após a verificação da presença do endotélio funcional como descrito anteriormente, foi obtida uma contração de $\text{PGF}_{2\alpha}$ 10 μM , um prostanóide vasoconstrictor, agonista dos receptores prostanóide F (PF) (TAKAYAMA; OZAKI; KARAKI, 1996; LA FUENTE, 2003). No componente tônico dessa contração, foi adicionado, cumulativamente, o veneno da CDC (0,001- 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$). A percentagem de relaxamento induzida pelo veneno foi calculada pela comparação da resposta antes e após a adição do veneno. Os valores de CE_{50} e E_{max} também foram obtidos como descrito anteriormente (Figura 7).

Figura 7 - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de concentrações crescentes do veneno da CDC (0,001 – 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato Wistar com endotélio funcional, pré-contraídos com $\text{PGF}_{2\alpha}$.

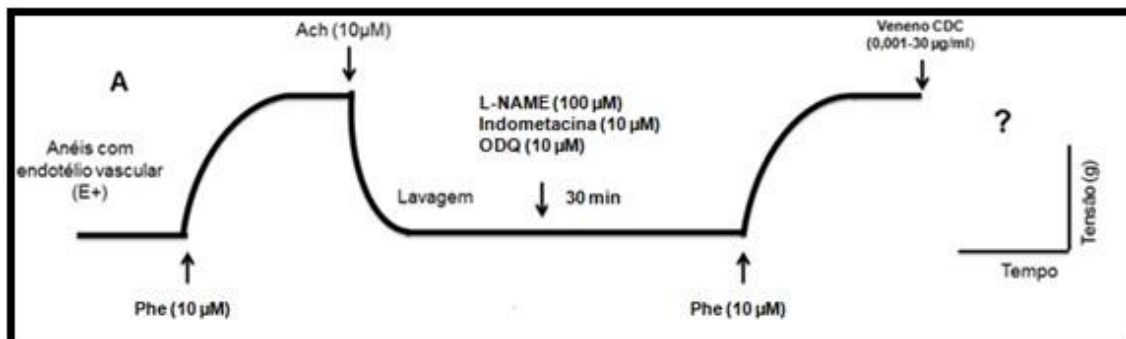


Fonte: Autora

5.1.1.6 Avaliação da participação de fatores relaxantes derivados do endotélio na resposta vascular induzida pelo veneno da CDC

Neste protocolo, buscou-se avaliar a participação de diferentes fatores relaxantes derivados do endotélio na resposta vascular induzida pelo veneno da CDC. Neste intuito, após a verificação da presença do endotélio funcional como descrito anteriormente, foram administradas, em preparações diferentes, L-NAME (100 μM), inibidor não seletivo de óxido nítrico sintase NOS (IIDA et al., 2001), ODQ (10 μM), inibidor específico da ciclase de guanilil solúvel (PLANE et al., 2001) e indometacina (10 μM), inibidor não seletivo da enzima ciclooxigenase (COX) (PEREDO, 2003), permanecendo na presença desses até o final do experimento. Decorridos 30 minutos da incubação com os inibidores, foi induzida uma nova contração tônica com Phe (10 μM) e, em seguida, uma curva concentração-resposta para o veneno da CDC foi construída. Os valores de E_{max} foram obtidos, bem como o efeito a cada concentração e comparados na situação-controle e na presença de cada substância (Figura 8).

Figura 8 - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação da participação de fatores de Relaxamento endotelial na resposta vasorrelaxante induzida por veneno da CDC em anéis da artéria mesentérica superior isolada de rato Wistar, com endotélio funcional.

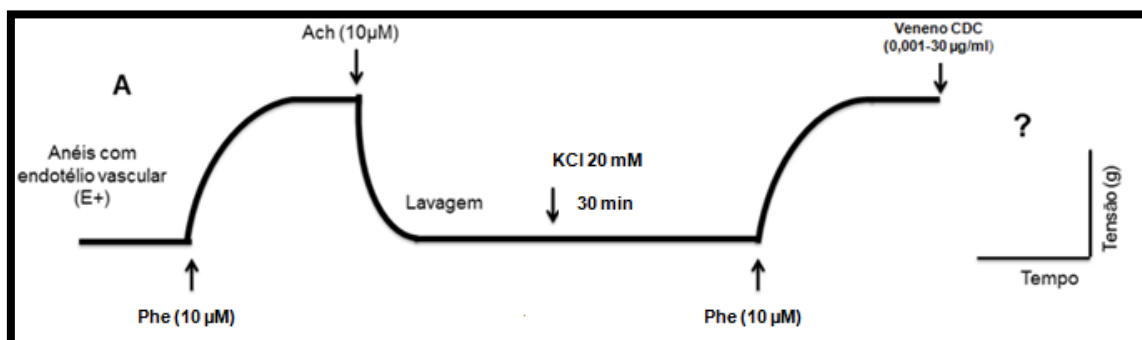


Fonte: Autora

5.1.1.7 Avaliação da participação de canais para K^+ na resposta vasorrelaxante induzida por veneno da CDC

Após a verificação da presença do endotélio funcional como descrito anteriormente, a solução de Tyrode (Tabela 3) das cubas foi trocada pela solução despolarizante de Tyrode com KCl 20 mM (KCl 20) (Tabela 4) e as preparações permaneceram nesta solução até o final do experimento. Esse procedimento impede parcialmente o efluxo de K^+ e atenua relaxamentos mediados por abertura de canais para K^+ (CLARK; FUCHS, 1997; CAMPBELL; HARDER, 1999; SILVA, 2011). Decorridos 30 minutos da incubação da solução de KCl 20 mM, foi induzida uma nova contração tônica com Phe (10 μ M) e, em seguida, uma curva concentração-resposta para o veneno da CDC foi obtida. Os valores de E_{max} foram obtidos, bem como o efeito a cada concentração, e comparados na situação-controle e na presença do KCl 20 mM (Figura 9).

Figura 9 - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação da participação de canais para K^+ na resposta vasorrelaxante induzida por veneno da CDC em anéis da artéria mesentérica superior isolada de rato Wistar, com endotélio funcional.

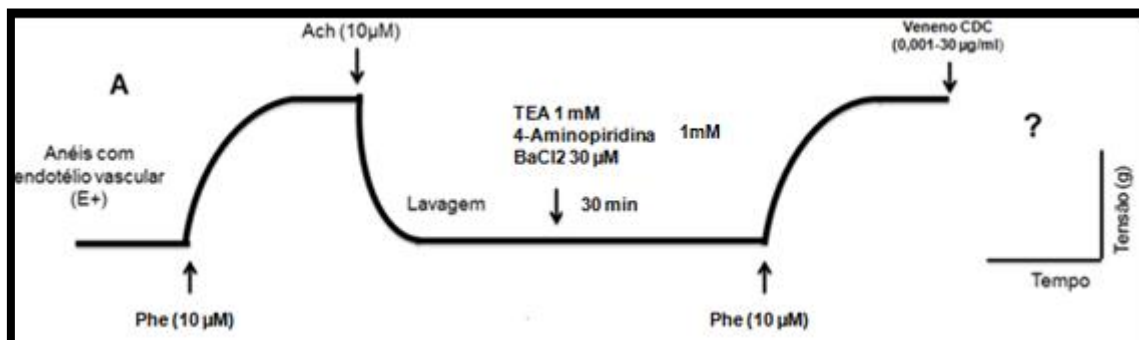


Fonte: Autora

5.1.1.8 Influência de bloqueadores para diferentes canais para K^+ na resposta vasorrelaxante induzida por veneno da CDC.

Nesse protocolo, desejou-se avaliar a real participação de diferentes tipos de canais para K^+ na resposta vasodilatadora induzida pelo veneno da CDC. Neste intuito, após a verificação da presença do endotélio funcional como descrito anteriormente, foram administradas, em preparações diferentes, TEA (1 mM), nessa concentração, um bloqueador dos canais para K^+ sensíveis ao Ca^{2+} de larga condutância - BK_{Ca} (REIS et al., 2013), 4-aminopiridina (1mM), bloqueador dos canais para K^+ retificador retardado (GHISDAL; MOREL, 2001) e $BaCl_2$ (30 μ M), bloqueador dos canais para K^+ retificadores de entrada (KAWABATA et al., 2004), permanecendo com os mesmos até o final do experimento. Decorridos 30 minutos da incubação com os bloqueadores, foi induzida uma nova contração tônica com Phe (10 μ M) e, em seguida, uma curva concentração-resposta para o veneno da CDC foi obtida. Os valores de E_{max} e de cada concentração foram obtidos e comparados na situação-controle e na presença de cada bloqueador dos canais para K^+ (Figura 10).

Figura 10. Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação da participação de diferentes canais para K^+ na resposta vasorrelaxante induzida por veneno da CDC em anéis da artéria mesentérica superior isolada de rato Wistar, com endotélio funcional.



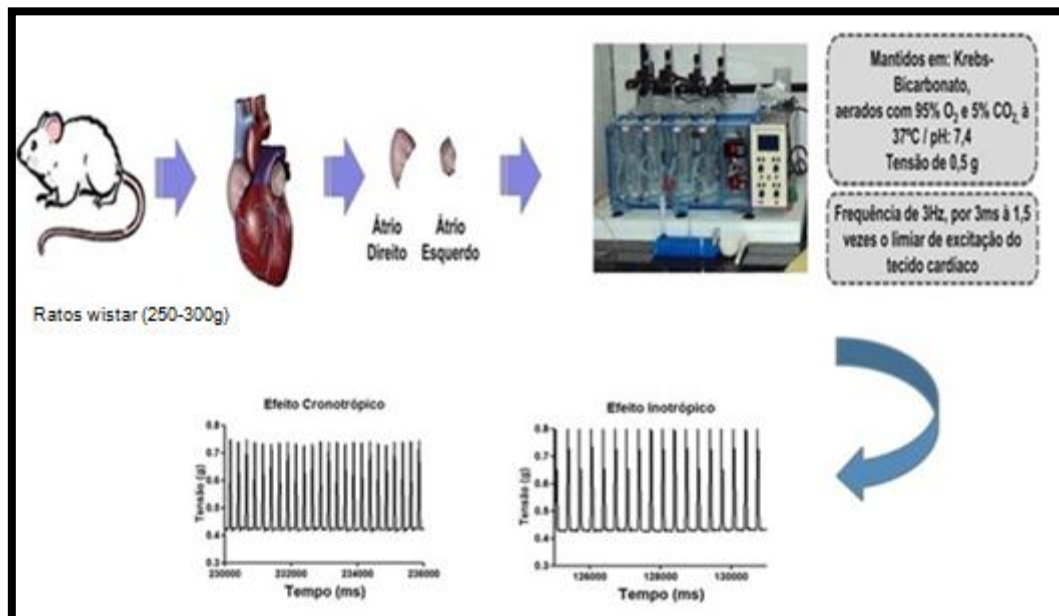
Fonte: Autora

5.1.2 Isolamento dos átrios de animais Wistar

Após eutanásia dos animais em câmara de CO_2 , o coração foi imediatamente removido, e os átrios foram isolados para ensaios em banho de órgãos em átrios isolados (NASA et al., 1992). Os átrios esquerdo e direito foram cortados perpendicularmente ao eixo do coração e, em seguida, cada um foi suspenso por um fio de algodão e colocado em cuba de 10 mL, contendo solução de Krebs Bicarbonato. O banho foi mantido a uma temperatura de $37\text{ }^\circ\text{C}$ e aerado com uma mistura carbogênica (95% O_2 e 5% CO_2). A tensão inicial de cada átrio foi ajustada em 500 mg e os tecidos foram mantidos em equilíbrio durante um período de 0,75 hora antes do início dos experimentos. As preparações de átrio esquerdo foram estimuladas eletricamente, de forma contínua (estimulação de campo), usando-se o estimulador AVS (AVS, Brasil), com pulsos quadrados de 3 Hz, duração de 3 ms e voltagem de 1,5 vezes o limiar de excitação do tecido cardíaco. As preparações de átrio direito foram montadas no mesmo banho para órgão, mas não foram estimuladas, devido à presença do nodo sinoatrial, permitindo a medidas de ritmicidade e das contrações espontâneas. Os parâmetros cardíacos foram registrados pelo sistema de aquisição de dados AVS. A frequência de batimentos espontâneos do átrio direito foi quantificada e definida como frequência atrial para a avaliação dos efeitos cronotrópicos

induzidos pelo veneno. A força de contração atrial foi avaliada no átrio esquerdo e determinado o efeito inotrópico induzido pelo veneno.

Figura 11. Representação esquemática do protocolo de isolamento de átrios dos ratos Wistar.



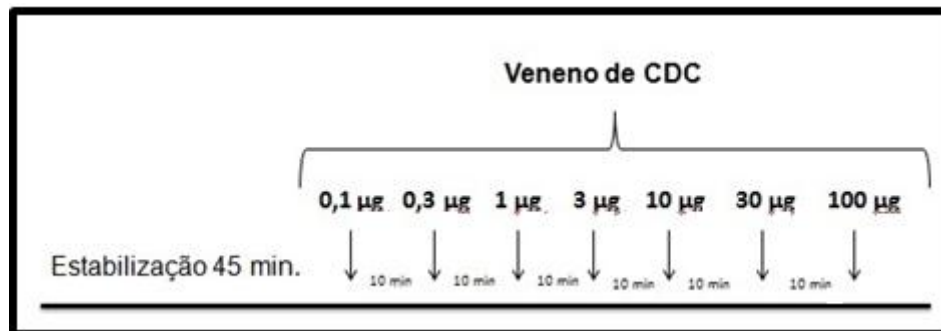
Fonte: Autora

5.1.3 Protocolos experimentais utilizando átrios isolados de ratos

5.1.3.1 Avaliação dos efeitos cronotrópicos e inotrópicos induzidos pelo veneno da CDC

Após um período de 45 minutos de estabilização das preparações, 7 concentrações crescentes do veneno da CDC (0,1; 0,3; 1; 3; 10; 30; 100 µg/mL) foram adicionadas, cumulativamente, às cubas contendo os átrios direito e esquerdo. Os efeitos inotrópicos e cronotrópicos do veneno foram avaliados na ausência de qualquer outro tipo de substância. Nesse ensaio, foram determinados os efeitos do veneno da CDC sobre a frequência cardíaca através dos batimentos por minuto, e a força de contração, através da tensão medida em grama, obtida para átrios direito e esquerdo, respectivamente.

Figura 12 - Representação esquemática do protocolo para avaliação dos efeitos cronotrópicos e inotrópicos induzidos pelo veneno da CDC (0,1 – 100 µg/mL)



Fonte: Autora

5.1.4 Avaliação da produção de NO em células endoteliais por amperometria.

A aorta torácica foi removida e logo imersa em solução de Tyrode, onde foi liberta do tecido conjuntivo e adiposo adjacente. Em seguida, foi aberta longitudinalmente, e as células endoteliais foram coletadas através de raspagem mecânica. O sedimento foi lavado duas vezes e ressuspensão (10^6 células/mL) em meio HEPES enriquecido com 0,5 % de soro fetal bovino (SFB) (BAUDIN et al., 2007; ROCHA et al., 2007; VAN et al., 2008).

Uma alíquota foi encaminhada para identificação e viabilidade celular através de citometria de fluxo. Inicialmente, uma alíquota de células foi incubada com 1 µg/mL de anticorpo “anti-CD 31-rat *endothelium*” – PE (OX43, sc53109 da Santa Cruz, EUA) (HEWETT; MURRAY, 1993) durante 45 minutos a 4° C na ausência de luz. Após lavagem (duas vezes com meio HEPES enriquecido com 0,5 % SFB e centrifugação 400 g por 5 minutos) e fixação das amostras, um citômetro FACS Canto II (Becton; Dickson, CA, USA), equipado com laser de argônio (λ : 488 nm), foi utilizado para quantificar a fluorescência celular. Em cada amostra, foram analisadas 10000 células, possíveis partículas não celulares foram removidas da análise pela realização de *gates*. Células com positividade de fluorescência no canal PE (com Lowpass de 556nm, λ em: 485/42nm) foram consideradas CD-31 positivas, o que confirmou a origem endotelial (VAN et al., 2008). A viabilidade celular foi determinada com o uso da 7-amino Actinomicina D (7-AAD), uma sonda

impermeável à membrana usada para marcar células inviáveis. Células lavadas e aliqüotadas em 10^6 células/100 μ L foram tratadas com 5 μ L de 7-AAD e incubadas por 30 minutos a 4^o C no escuro. Células viáveis foram obtidas em gráfico *dot-plot side-scatter* versus 7-AAD (fluorescência no canal PerCP) (OZDOGU et al., 2007). Células não marcadas foram utilizadas como controle negativo.

Após a confirmação da população e viabilidade celular acima de 75% para ambas as medidas, obteve-se a medida de NO, na qual foram usados microssensores para medida da liberação de óxido nítrico por amperometria (FUJITA et al., 1998; ZHANG et al., 2000). Inicialmente, os microssensores (ISSO-NOP3005, WPI, EUA) foram conectados a um amplificador (TBR 4100 – Free Radical Analyser, WPI, FL, EUA) e este a um Bridge (LAB-TRAX com 4 canais, WPI, FL, EUA) o qual realiza a interface com um computador contendo o *software* DataTrax-2 (WPI, FL, EUA). Os microssensores foram mantidos imersos por duas horas na solução de CuCl_2 (0,1M) para polarização e manutenção de uma amperagem estável, com faixa de aceitabilidade entre 150-3500pA. Os microssensores foram calibrados por decomposição do SNAP (S-nitroso-N-acetil-D,L-penicilinamina), usando como catalisador solução de CuCl_2 (0,1M) (SCHMIDT; MAYER 1998; MICHAEL et al., 2007). A curva-padrão foi construída pela plotagem da amperagem *versus* concentração de NO liberado pelo SNAP. Em seguida, a suspensão de células previamente obtida foi depositada na câmara de medida de NO (NOCHM-4, WPI, FL, EUA), acoplada ao microssensor utilizado na calibração, e a concentração de NO captada antes e após a adição de concentrações crescentes do veneno da CDC (1; 3; 10; 30; 90 μ g/mL).

5.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores foram expressos como média \pm erro-padrão da média (e.p.m.). As curvas concentração-resposta foram realizadas segundo equação logística de quatro parâmetros ou equação de Hill abaixo descrita, onde: Y é a variável dependente, correspondente a percentagem (%) de relaxamento, $Y_{\text{mínimo}}$ é o valor de % de relaxamento mínimo, $Y_{\text{máximo}}$ é o valor de % de relaxamento

máximo, $\log CE_{50}$ é o logaritmo da concentração de uma substância que induz 50% do efeito máximo, X é a variável independente, que corresponde à concentração do veneno da CDC e s corresponde à inclinação de Hill:

$$Y = Y_{\text{mínimo}} + \frac{Y_{\text{máximo}} - Y_{\text{mínimo}}}{1 + (10^{\log CE_{50}} / 10^X)^s}$$

Para estudar o efeito vasorrelaxante induzido por veneno da CDC, o parâmetro farmacológico analisado foi a eficácia farmacológica (E_{max} , resposta máxima induzida pela substância). As análises estatísticas foram feitas utilizando teste t de Student ou análise de variância *one-way* (ANOVA), seguidas de teste de Bonferroni, quando apropriado. Foram considerados significantes os valores de $p < 0,05$. O programa utilizado para a análise dos dados foi o GraphPad Prism 5.0® (EUA).

Resultados

6 RESULTADOS

6.1 Efeito relaxante do veneno da CDC em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos Wistar.

A administração cumulativa do veneno da CDC (0,001 – 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) em anéis da artéria mesentérica superior isolada de ratos Wistar, com endotélio funcional íntegro e pré-contraído com Phe (10 μM), induziu a um vasorrelaxamento dependente de concentração com $E_{\text{max}} = 47,9 \pm 5,0\%$ $n=8$ (Figura 13). Entretanto, na ausência do endotélio vascular, houve atenuação de maneira significativa ($^{***} p < 0,001$) da resposta vasorrelaxante do veneno, sendo esta praticamente abolida, apresentando uma magnitude de $E_{\text{max}} = 5,8 \pm 2,4\%$ $n=5$.

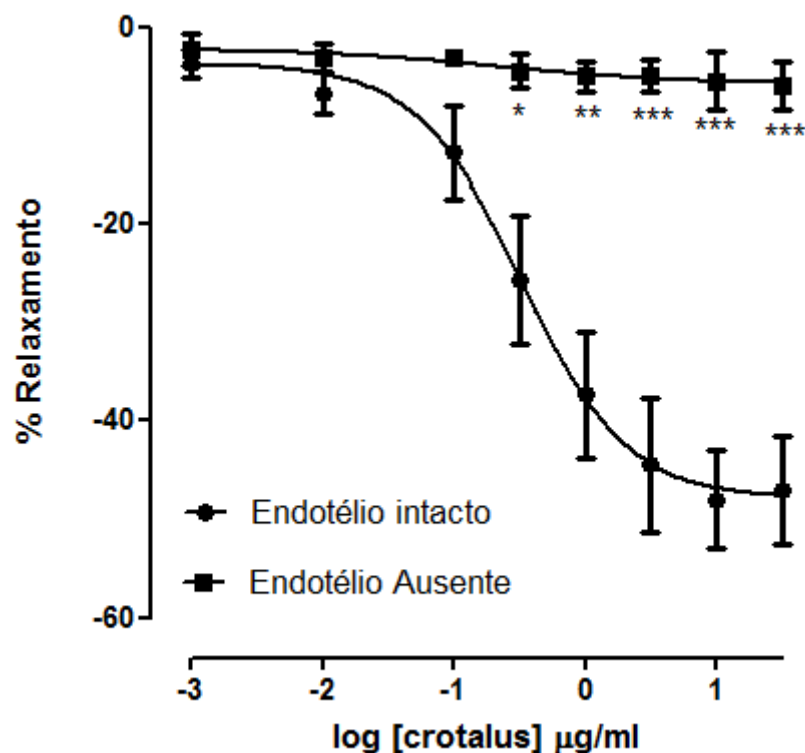


Figura 13. Efeito do veneno da CDC em anéis de artéria mesentérica superior de ratos Wistar. Curvas concentração-resposta mostrando o efeito relaxante do veneno da CDC a (0,001- 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$, cumulativamente) em anéis mesentéricos de animais Wistar pré-contraídos com fenilefrina (Phe 10 μM), na presença ou ausência de endotélio funcional. Os valores estão expressos como média \pm e.p.m. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Fonte: Autora

6.2 Efeito do veneno da CDC sobre o tônus intrínseco vascular de anéis mesentéricos.

Em anéis de artéria mesentérica superior isolada de animal Wistar, na presença do endotélio vascular, a adição cumulativa do veneno (0,001 – 30 µg/mL) resultou em uma contração significativa (* $p < 0,05$) em relação ao estado de repouso. Nos resultados apresentados não houve diferença significativa entre as contrações induzidas pelas concentrações testadas do veneno da CDC na presença ou ausência do endotélio vascular (Figura 14).

Para avaliar a reversibilidade da contratilidade tecidual induzida pelo agonista α -adrenérgico Phe após adição cumulativa do veneno da CDC (0,001 – 30 µg/mL), novas contrações induzidas por Phe (10 µM) foram realizadas. Não houve diferença significativa na capacidade contrátil dos anéis vasculares após administração de concentrações cumulativas do veneno (Figuras 15 e 16).

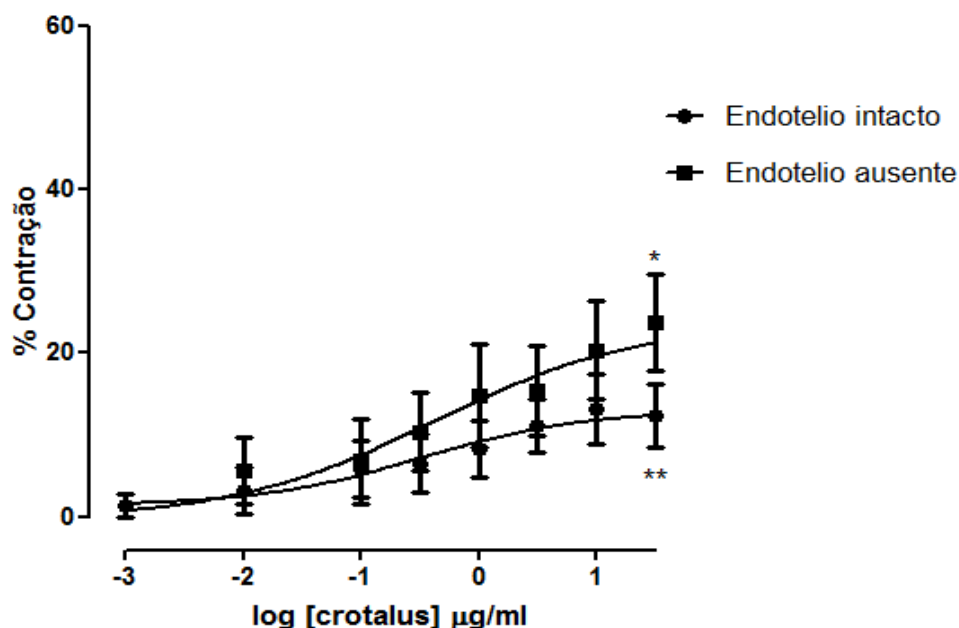


Figura 14. Efeito do veneno da CDC em anéis de artéria mesentérica superior de ratos Wistar submetidos a tônus basal. Curvas concentração-resposta mostrando o efeito do veneno da CDC (0,001- 30 µg/mL, cumulativamente) em anéis mesentéricos de animais Wistar em tônus. Efeito do veneno da CDC em anéis de artéria mesentérica superior de ratos Wistar em tônus basal. Os valores estão expressos como média \pm e.p.m. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Fonte: Autora

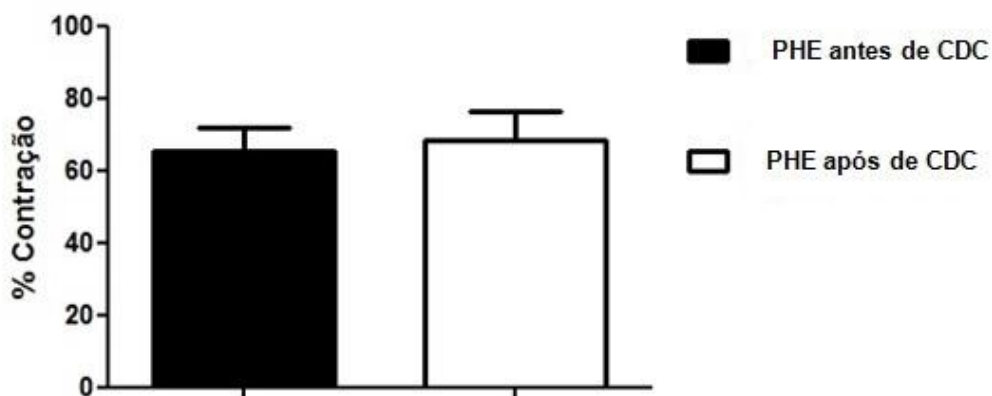


Figura 15. Contração induzida por Phe (10uM) em anéis de artéria mesentérica superior de ratos Wistar, com endotélio vascular intacto, antes e após adição do veneno da CDC.

Fonte: Autora

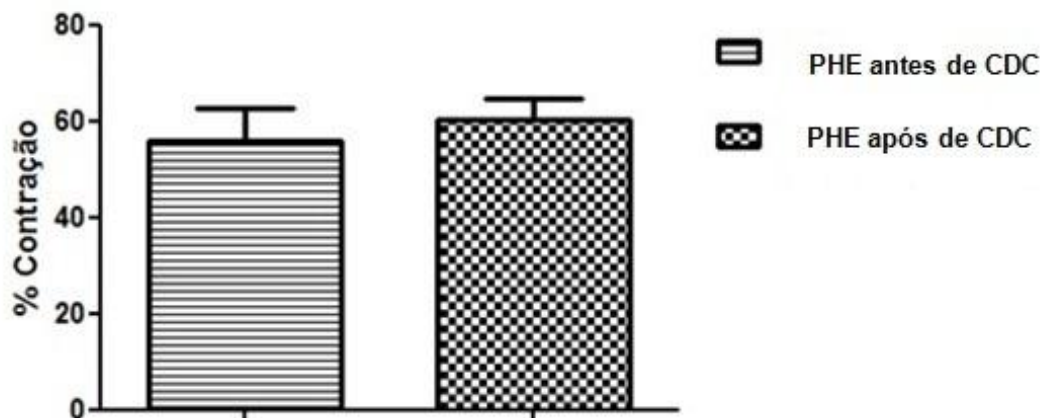


Figura 16. Contração induzida por Phe (10uM) em anéis de artéria mesentérica superior de ratos Wistar, sem endotélio vascular, antes e após adição do veneno da CDC.

Fonte: Autora

6.3 Efeito do veneno da CDC submetido ao aquecimento sobre anéis vasculares pré-contraídos com Phe (10 μ M)

Para obter indicações da natureza química do constituinte vasorrelaxante do veneno, sua atividade relaxante foi avaliada após um protocolo de aquecimento. O veneno aquecido apresentou um efeito relaxante significativamente menor (** $p < 0,01$) quando comparado ao seu controle em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, com endotélio vascular, pré-contraídos com Phe ($E_{\max} = 20,5 \pm 4,0\%$, $n=5$) (Figura 17).

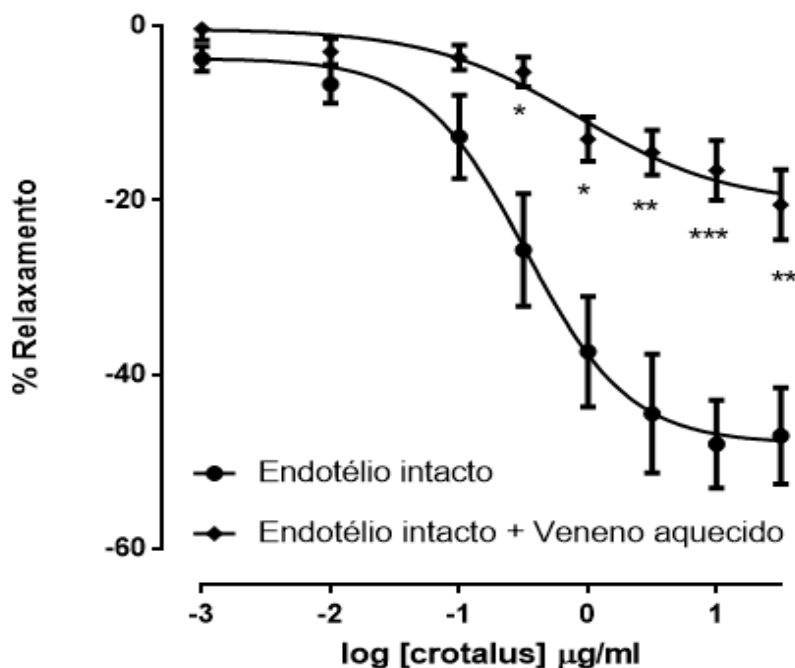


Figura 17. Efeito do veneno da CDC em anéis de artéria mesentérica superior de ratos Wistar após aquecimento. Curvas concentração-resposta mostrando o efeito do aquecimento do veneno da CDC (0,001- 30 µg/mL, cumulativamente) sobre anéis mesentéricos de animais Wistar pré-contraídos com fenilefrina (Phe 10µM), na presença do endotélio funcional. Os valores estão expressos como média \pm e.p.m. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Fonte: Autora

6.4 Efeito vascular da CDC em tecidos vasculares contraídos por agente despolarizante KCl 80 mM

Em anéis de artéria mesentérica superior isolada de animal Wistar, com endotélio vascular, pré-contraídos com um agente despolarizante KCl 80 mM, a resposta relaxante induzida pela adição cumulativa do veneno da CDC (0,001 – 30 µg/mL) foi praticamente abolida ($E_{\max} = 6,4 \pm 0,9\%$ $n= 5$), quando comparado aos resultados obtidos por contrações induzidas por Phe, na presença do endotélio vascular Phe ($E_{\max} = 47,9 \pm 5,0\%$ $n= 8$) (Figura 18).

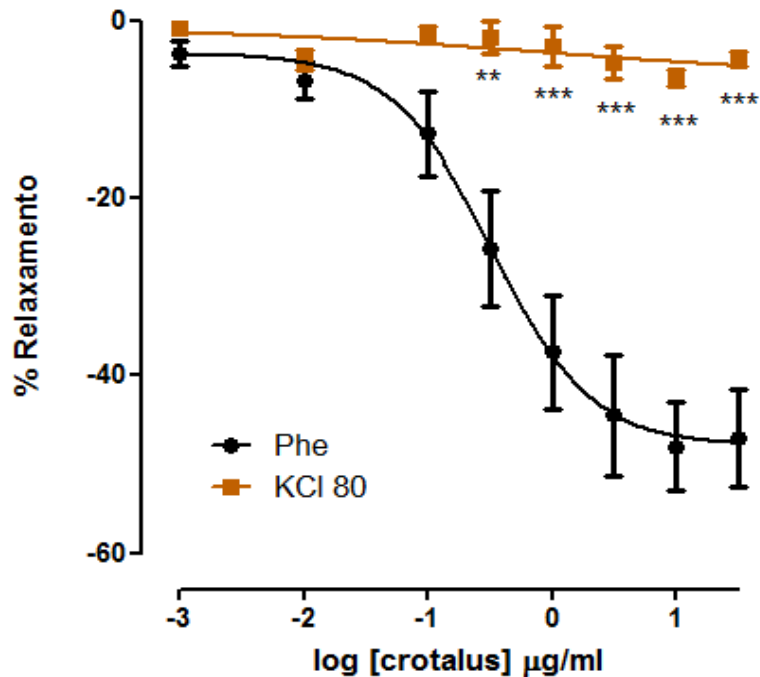


Figura 18. Efeito vasodilatador do veneno da CDC em anéis contraídos com solução despolarizante de KCl 80mM. Curvas concentração-resposta do efeito vasorrelaxante do veneno da CDC (0,001- 30 µg/mL, cumulativamente) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de animais Wistar com endotélio vascular, pré-contraídos com fenilefrina (Phe 10µM) ou com KCl 80 mM. Os valores estão expressos como média ± e.p.m. **p<0,01, ***p<0,001.

Fonte: Autora

6.5 Efeito vascular da CDC em tecidos vasculares contraídos pelo agonista de receptores prostanóide $PGF_{2\alpha}$.

Em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, com endotélio vascular, pré-contraídos com $PGF_{2\alpha}$, a resposta relaxante induzida pela adição cumulativa do veneno da CDC (0,001 – 30 µg/mL) foi diminuída de forma significativa ($E_{max} = 18,7 \pm 1,3\%$, $n=6$; ***p< 0,001), quando comparado com os resultados obtidos com contrações induzidas por Phe, na presença do endotélio vascular. ($E_{max} = 47,9 \pm 5,0\%$, $n=8$) (Figura 19).

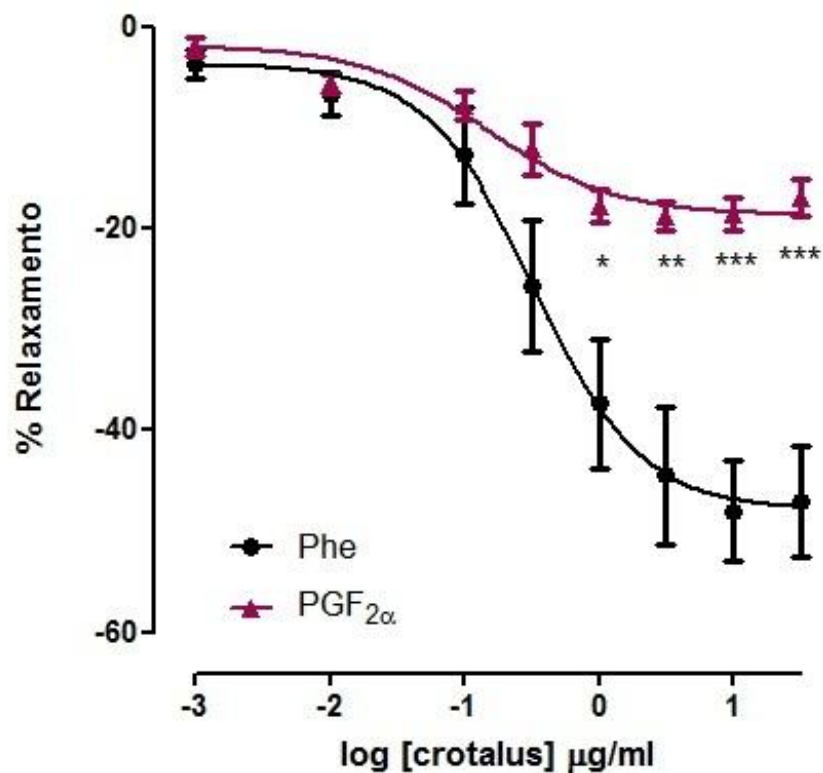


Figura 19. Efeito vasodilatador do veneno da CDC é reduzido em anéis contraídos com agonista do receptor PF - PGF_{2α}. Curvas concentração-resposta do efeito vasorrelaxante do veneno da CDC (0,001- 30 µg/mL, cumulativamente) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de animais Wistar com endotélio vascular, pré-contraídos com Phe 10µM ou com PGF_{2α} 10µM. Os valores estão expressos como média ± e.p.m. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

Fonte: Autora

6.6 Efeito do inibidor não seletivo da COX (Indometacina) sobre o relaxamento induzido pelo veneno da CDC em anéis vasculares.

Em anéis de artéria mesentérica superior isolada de animais Wistar com endotélio intacto pré-contraídos com Phe (10 μ M), o pré-tratamento com indometacina (10 μ M), por 30 minutos, promoveu uma atenuação significativa (* $p < 0,05$), a partir da concentração de 10 μ g/mL do efeito vasorrelaxante induzido pela administração cumulativa do veneno (0,001 – 30 μ g/mL), com alteração significativa no valor de E_{max} (Phe, $E_{max} = 47,9 \pm 5,0\%$, $n = 8$); Phe + indometacina, $E_{max} = 29,1 \pm 7,1\%$, $n = 6$) (Figura 20).

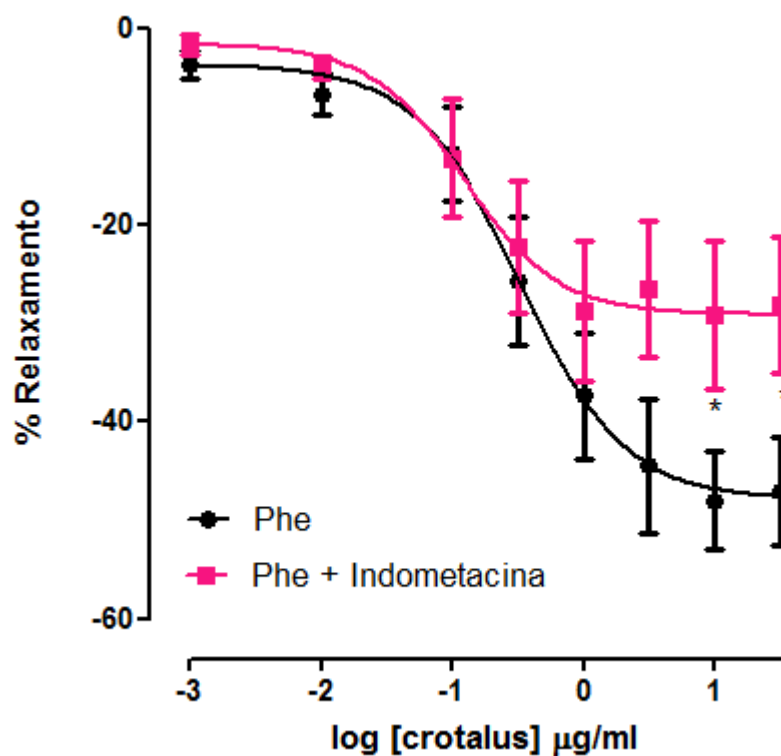


Figura 20. Participação de prostanóides derivados da ciclooxigenase no relaxamento induzido pelo veneno da CDC. Curvas concentração-resposta do efeito vasorrelaxante do veneno da CDC (0,001- 30 μ g/mL, cumulativamente) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de animais Wistar com endotélio vascular, pré-contraídos com fenilefrina (Phe 10 μ M), na ausência e na presença de Indometacina, 10 μ M. Os valores estão expressos como média \pm e.p.m. * $p < 0,05$.

Fonte: Autora

6.7 Participação da NO-sintase no relaxamento induzido pelo veneno da CDC em anéis vasculares

Após o tratamento dos anéis com L-NAME (100 μ M), um inibidor da NOS, a curva do vasorrelaxante induzida pelo veneno da CDC foi deslocada para a direita, com modificações significantes nos efeitos vasculares do veneno, a partir da concentração 1 μ g/mL, reduzindo significativamente o E_{max} ($17,5 \pm 2,2\%$ n= 6; **p<0,01), conforme demonstrado na Figura 21.

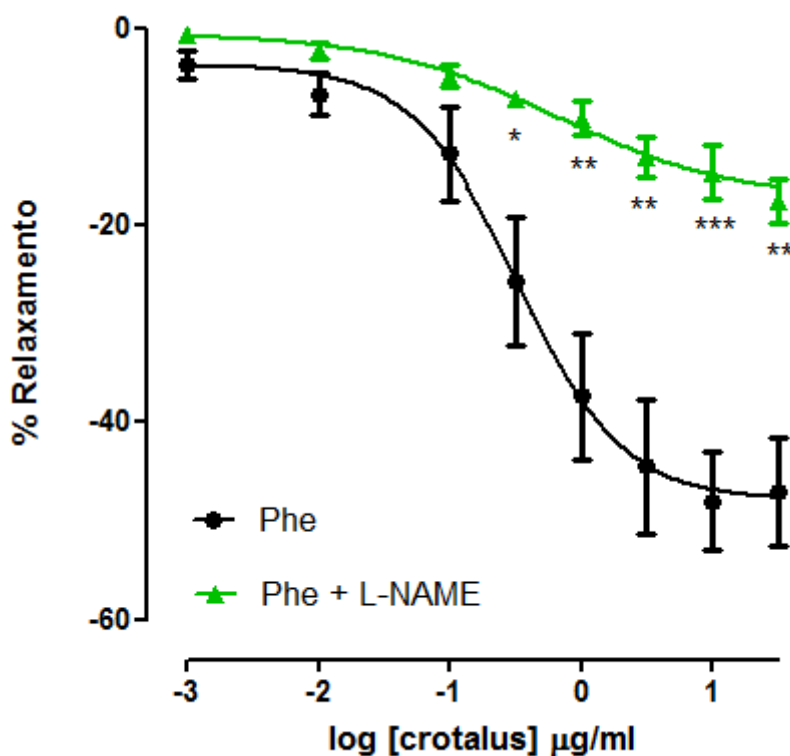


Figura 21. Participação da óxido nítrico-sintase no efeito vasodilatador do veneno da CDC. Curvas concentração-resposta do efeito vasorrelaxante do veneno da CDC (0,001- 30 μ g/mL, cumulativamente) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de animais Wistar com endotélio vascular, pré-contraídos com fenilefrina (Phe 10 μ M), na ausência e na presença de L-NAME, 100 μ M. Os valores estão expressos como média \pm e.p.m. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

Fonte: Autora

6.8 Participação da guanilil ciclase na resposta vasorrelaxante do veneno da CDC em anéis vasculares

O inibidor seletivo da CGs (PLANE et al., 2001), ODQ, foi utilizado no intuito de investigar a participação da via CGs/GMPc. A presença de ODQ na concentração de 10 μ M inibiu o efeito vasorrelaxante induzido pelo veneno de forma significativa ($***p<0,001$), com conseqüente diminuição do E_{max} ($11,2 \pm 3,5\%$, $n= 6$) quando comparado com os resultados obtidos na ausência do inibidor ($E_{max} = 47,9 \pm 5,0\%$, $n= 8$) (Figura 22).

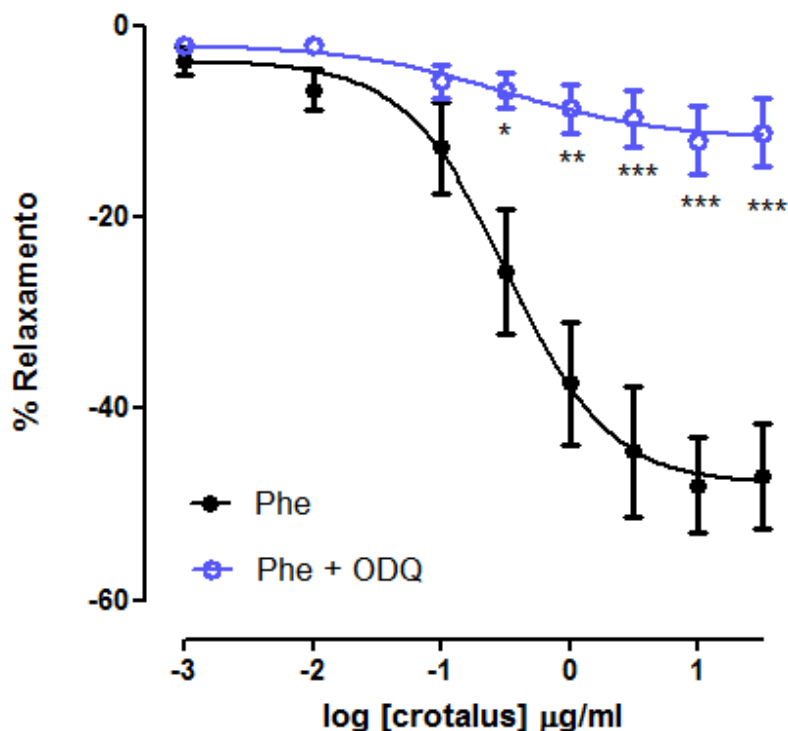


Figura 22. A via CGs/GMPc participa do efeito vasodilatador do veneno da CDC. Curvas concentração-resposta do efeito vasorrelaxante do veneno da CDC (0,001- 30 μ g/mL, cumulativamente) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de animais Wistar com endotélio vascular, pré-contraídos com fenilefrina (Phe 10 μ M), na ausência e na presença de ODQ, 10 μ M. Os valores estão expressos como média \pm e.p.m. * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$.

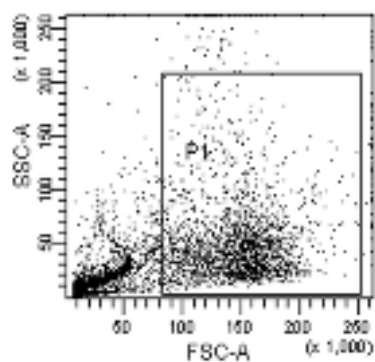
Fonte: Autora

6.9 Produção de NO em células endoteliais induzida pelo veneno da CDC.

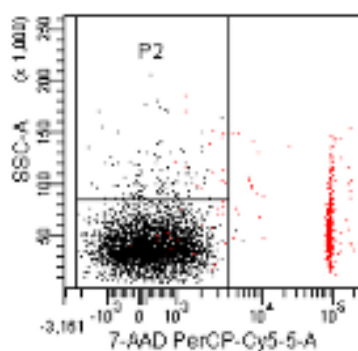
Para avaliar se o veneno da CDC induz liberação de NO a partir de células endoteliais, foi utilizada a técnica de amperimetria com células endoteliais aórticas isoladas. Brevemente, foi confirmado que as células apresentavam constituição acima de 75% de células endoteliais e que estas estavam viáveis para experimentação como demonstrado pela Figura 23 (A, B

e C). Os resultados mostram que o veneno da CDC induz liberação de NO, após adição cumulativa do veneno, de forma significativa ($*p < 0,05$) e concentração dependente. Essa liberação só foi perceptível a partir das duas maiores concentrações testadas (Figura 23).

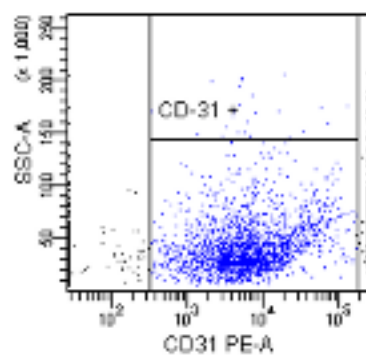
A



B



C



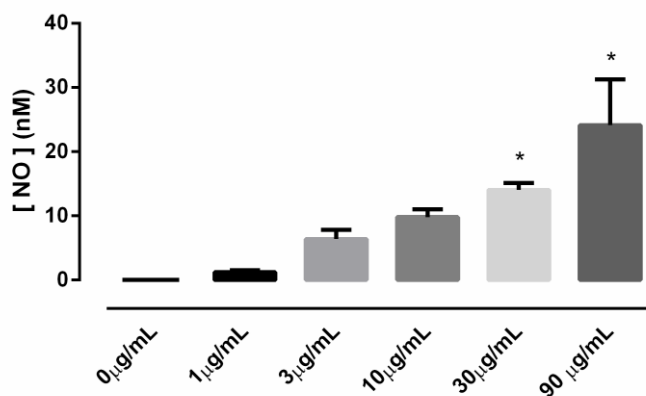


Figura 23. Efeito do veneno da CDC na liberação de NO por células endoteliais isoladas. Gráficos A, B e C demonstram que as células testadas apresentavam viabilidade e tratando-se de células endoteliais. Gráfico D representativo da detecção por amperimetria de NO liberado após adições do veneno da CDC (1-90 µg/mL, cumulativamente) em células aórticas isoladas. * $p < 0,05$

Fonte: Autora

6.10 Influência dos canais para K^+ sobre o relaxamento induzido pelo veneno da CDC em anéis vasculares

Para avaliação da participação de canais para K^+ na resposta vasorrelaxante induzida por veneno da CDC, foram realizados experimentos com anéis da artéria mesentérica superior isolada de animais Wistar, com endotélio funcional e pré-contraídos com Phe (10 µM), na presença de uma solução de Tyrode com 20 mM de KCl. O bloqueio parcial do efluxo de K^+ com o aumento da concentração K^+ extracelular ($[K^+]_e$) para 20 mM induziu uma diminuição significativa (** $p < 0,001$) do efeito vasorrelaxante após administração cumulativa do veneno (0,001 – 30 µg/mL), com alterações significantes nos valores de efeito máximo ($E_{máx} = 21,3 \pm 8, \%$, $n=7$) (Figura 24).

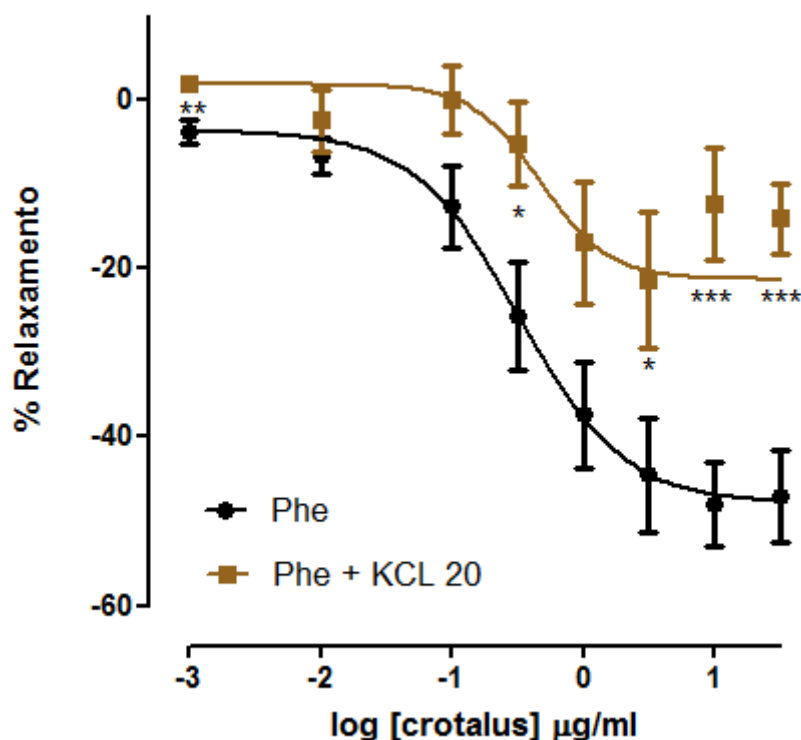


Figura 24. Efeito vasodilatador do veneno da CDC envolve canais para K^+ . Curva concentração-resposta para veneno da CDC (0,001 – 30 $\mu\text{g/mL}$) em anéis da artéria mesentérica superior isolada de animais Wistar, com endotélio funcional na presença de $[K^+]_e = 4 \text{ mM}$ ou $[K^+]_e = 20 \text{ mM}$. Os valores estão expressos como média \pm e.p.m. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Fonte: Autora

6.11 Participação dos canais BK_{Ca} na resposta vasorrelaxante induzida por veneno da CDC em anéis vasculares.

Para investigar a participação dos BK_{Ca} nos efeitos vasculares induzidos por veneno da CDC, foram realizados experimentos na presença de TEA 1mM, que, nessa concentração, é considerado um bloqueador seletivo dos BK_{Ca}^{2+} (REIS et al., 2013).

O bloqueio dos BK_{Ca} com TEA (1mM) não apresentou nenhuma alteração significativa sobre o efeito vasorrelaxante induzido pela adição cumulativa do veneno (0,001 – 30 $\mu\text{g/mL}$), sem alterações nos valores de efeito máximo ($E_{\text{máx}} = 40,0 \pm 6, \%$, $n=5$) (Figura 25)

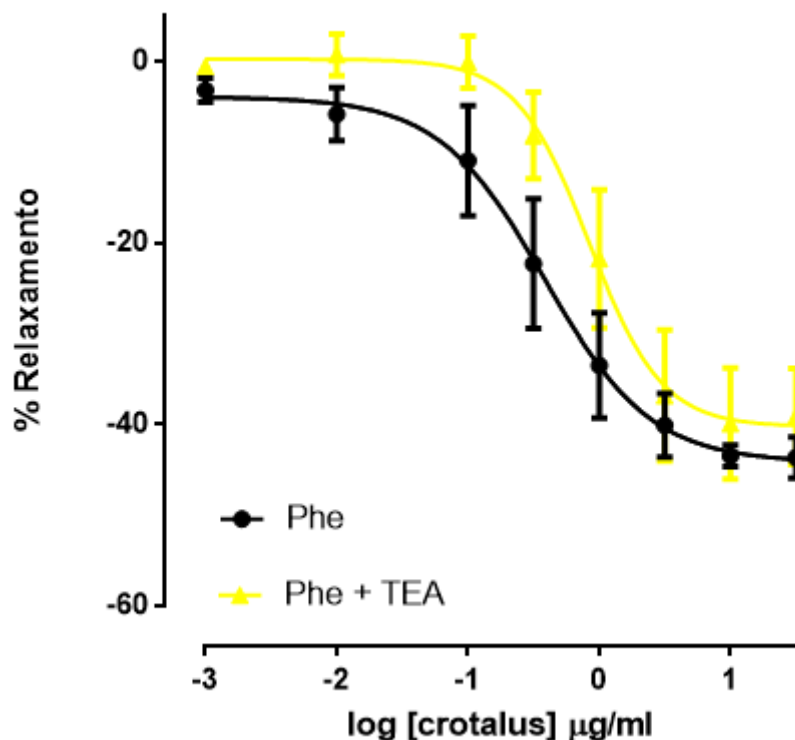


Figura 25. Canais BKca parecem não participar do efeito vasodilatador do veneno da CDC. Curva concentração-resposta para veneno da CDC (0,001 – 30 µg/mL) em anéis da artéria mesentérica superior isolada de animais Wistar, com endotélio funcional na presença de TEA = 1 mM e na ausência. Os valores estão expressos como média ± e.p.m.

Fonte: Autora

6.12 Influência dos canais K_{ir} na resposta vasorrelaxante induzida por veneno da CDC em anéis mesentéricos de ratos Wistar.

Para avaliar a participação dos canais para K^+ retificador de entrada nos efeitos vasculares induzidos por veneno da CDC, foram realizados experimentos na presença de $BaCl_2$ 30µM, bloqueador destes canais (KAWABATA et al., 2004). A presença do bloqueador induziu uma diminuição significativa (* $p < 0,05$) do efeito vasorrelaxante após administração cumulativa do veneno (0,001 – 30 µg/mL), com alterações nos valores do efeito máximo ($E_{máx} = 21,7 \pm 8, \%$, $n = 5$), quando comparados aos anéis-controle ($E_{máx} = 47,9 \pm 5,0\%$, $n = 8$) (Figura 26).

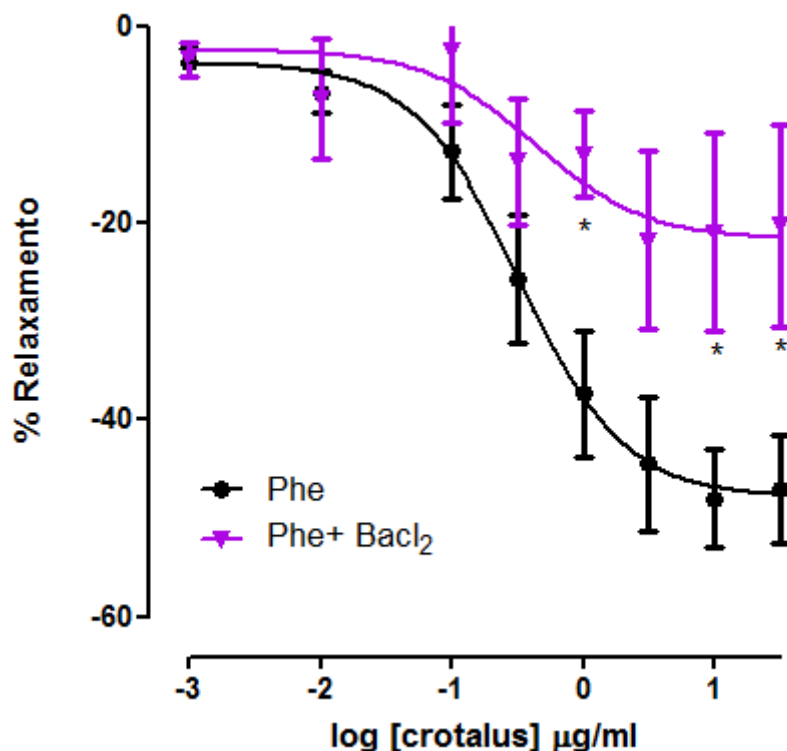


Figura 26. Efeito vasodilatador do veneno da CDC parece envolver Kir. Curva concentração-resposta para veneno da CDC (0,001 – 30 µg/mL) em anéis da artéria mesentérica superior isolada de animais Wistar, com endotélio funcional na presença de BaCl₂ (30µM) e na ausência. Os valores estão expressos como média ± e.p.m. *p<0,05.

Fonte: Autora

6.13 Influência dos canais para K⁺ retificadores retardados na resposta vasorrelaxante induzida por veneno da CDC em anéis mesentéricos de ratos Wistar.

Para investigar a participação dos canais para K⁺ retificador retardado nos efeitos vasculares induzidos por veneno da CDC, foram realizados experimentos na presença de 4-aminopiridina (1 mM), bloqueador destes canais (GHISDAL; MOREL, 2001). A presença do bloqueador 4-aminopiridina na concentração de 1 mM aboliu o efeito vasorrelaxante induzido pelo veneno de forma significativa (**p<0,001), em artéria mesentérica de ratos, na presença do endotélio intacto, pré-contraído com Phe, com expressiva diminuição do Emáx = 9,5 ± 1,3, %, n=5), quando comparados aos anéis-controle (Emax = 47,9 ± 5,0%, n= 8).(Figura 27)

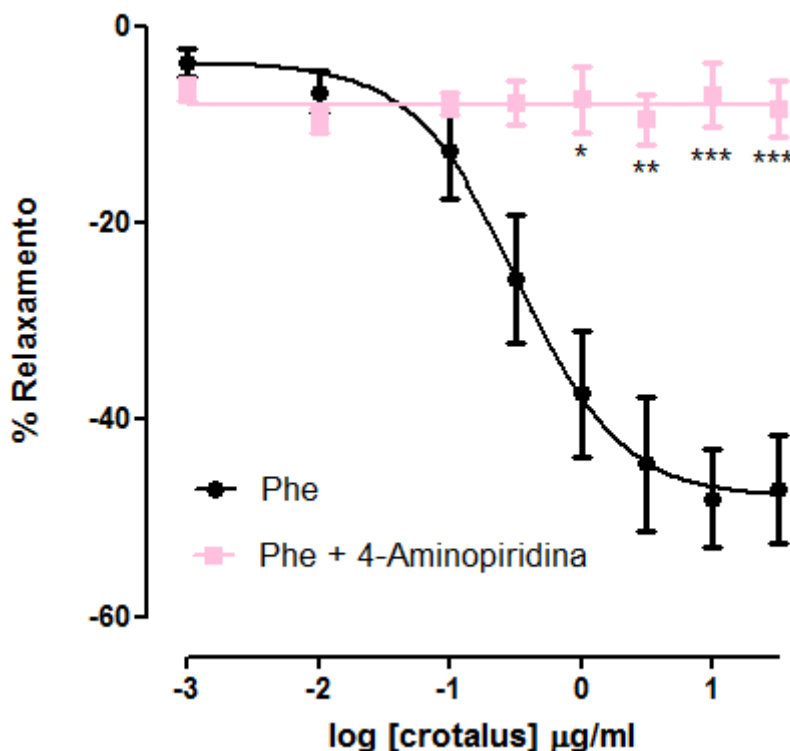


Figura 27. Participação de canais Kv no relaxamento induzido pelo veneno da CDC. Curva concentração-resposta para veneno da CDC (0,001 – 30 µg/mL) em anéis da artéria mesentérica superior isolada de animais Wistar, com endotélio funcional na presença de 4-aminopiridina (1mM) e na ausência. Os valores estão expressos como média ± e.p.m. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Fonte: Autora

6.14 Efeito do veneno da CDC sobre o cronotropismo cardíaco.

Para avaliar os efeitos cronotrópicos do veneno da CDC em átrios direitos isolados de rato Wistar, foram administradas 7 diferentes concentrações do veneno: 0,1µg, 0,3µg, 1µg, 3µg, 10µg, 30µg e 100µg/ mL. A administração cumulativa levou a um discreto aumento da ritmicidade cardíaca (99,9% ± 1,0; 101,9% ± 1,6; 102,5% ± 2,8; 105,2% ± 2,1; 103,9% ± 1,8; 105,9% ± 2,1; 108,7% ± 2,6, respectivamente), entretanto, não foi estatisticamente significante em nenhuma concentração de veneno testada, quando comparadas ao controle (100% ± 0,0), n=5. (Figura 28). A Figura 29 representa um registro original do efeito do veneno no cronotropismo cardíaco. O tempo esperado para a observação das respostas máximas de cada concentração do veneno foi de 10 minutos.

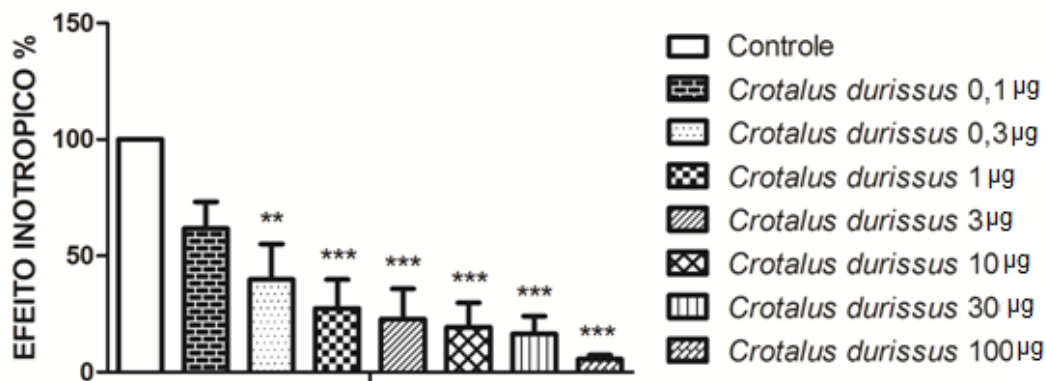


Figura 28. O cronotropismo cardíaco não é alterado pelo veneno da CDC. Gráfico de barras, em porcentagem de resposta, para influência do veneno de *Crotalus durissus cascavella* (0,1 - 100 µg/mL) no efeito cronotrópico em átrios direitos isolados de ratos Wistar (n=5).

Fonte: Autora

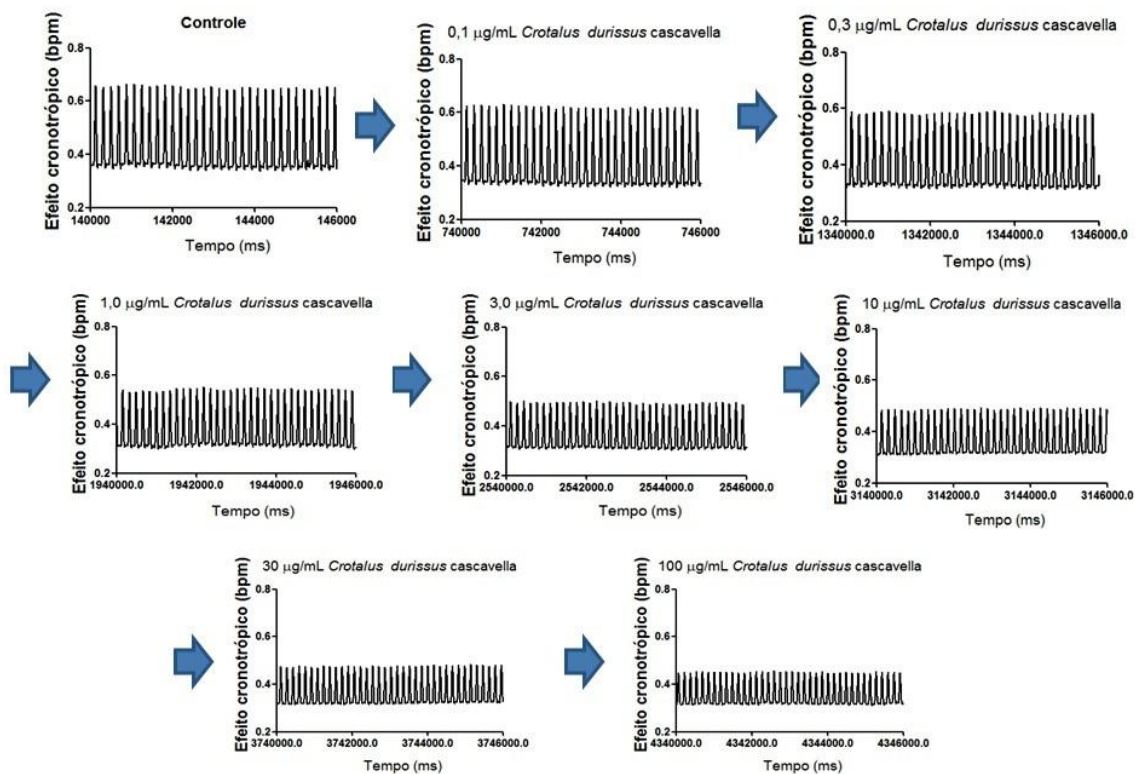


Figura 29. Representação do registro original dos efeitos cronotrópicos de concentrações cumulativas do veneno da CDC (0,1 - 100 µg/ mL) sobre átrio direito de animal Wistar.

Fonte: Autora

6.15 Efeito do veneno da CDC sobre o inotropismo cardíaco.

Para avaliar os efeitos inotrópicos do veneno da CDC em átrios direitos isolados de rato Wistar, foram administradas 7 diferentes concentrações do veneno: 0,1µg, 0,3µg, 1µg, 3µg, 10µg, 30µg e 100µg/ mL. A administração cumulativa levou a um inotropismo negativo (61,7% ± 11,4; 39,8% ± 1,6; 27,5% ± 12,3; 22,8% ± 13; 19,3% ± 1,5; 16,4% ± 7,7; 5,6% ± 1,8, respectivamente), com uma redução estatisticamente significativa da força de contração cardíaca, quando comparadas ao controle (100% ± 0,0) a partir da segunda concentração (Figura 30). A Figura 31 representa o registro original do efeito inotrópico negativo do veneno da CDC em átrio esquerdo isolado. O tempo esperado para a observação das respostas máximas de cada concentração do veneno foi de 10 minutos.

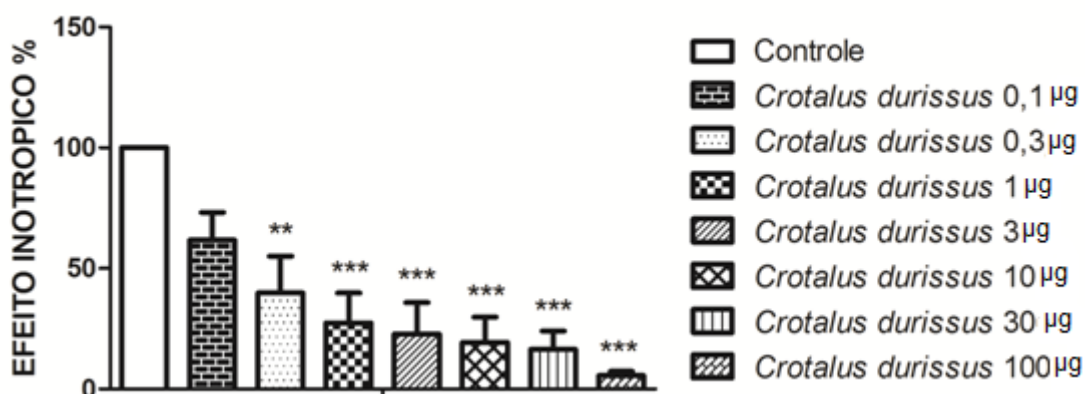


Figura 30. O inotropismo é alterado pelo veneno da CDC. Gráfico de barras, em porcentagem de resposta, para efeito inotrópico negativo do veneno da CDC (0,1 - 100µg/mL) em átrios esquerdos isolados de ratos Wistar (n=5).

Fonte: Autora

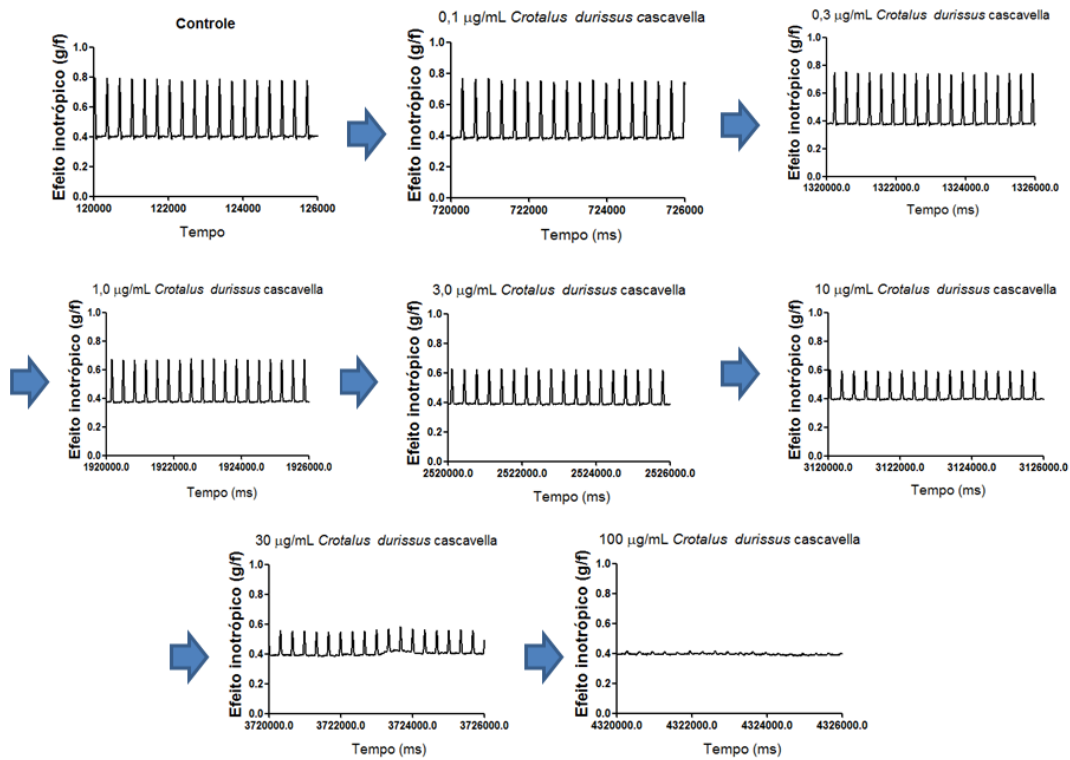


Figura 31. Representação do registro original dos efeitos inotrópicos de concentrações cumulativas do veneno da CDC (0,1 - 100 µg/mL) sobre átrio esquerdo de animal Wistar.

Fonte: Autora

Discussão

7 DISCUSSÃO

Os venenos de serpente são compostos bioativos, constituídos por uma mistura bioquímica complexa, formados, em grande parte, por proteínas, cuja definição dos mecanismos de ação e de seus alvos pode constituir ferramentas farmacológicas e biotecnológicas com variadas atividades biológicas (CALVETE, 2009, 2013; WARRELL, 2010; DE SOUSA, 2011).

Esse complexo de substâncias é composto por toxinas, enzimas, fatores de crescimento, ativadores e inibidores com ampla atividade biológica. Estudos diversos vêm sendo desenvolvidos e, à medida que revelam detalhes funcionais, contribuem para o esclarecimento dos mecanismos envolvidos na fisiopatologia das respostas ao envenenamento, predispondo à descoberta de ferramentas farmacológicas ou substâncias farmacologicamente ativas (BON, 2000).

O efeito do veneno da CDC em anéis de artéria mesentérica isolada de ratos Wistar não possui relatos na literatura, embora diversos ensaios *in vivo* e *in vitro* venham sendo desenvolvidos com abordagem no sistema cardiovascular, mas os mecanismos envolvidos não foram completamente elucidados.

O presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de investigar o potencial biotecnológico do veneno da CDC sobre o sistema cardiovascular. As principais constatações foram a atividade vasorrelaxante em artéria mesentérica superior isolada de rato Wistar, envolvendo, provavelmente, os fatores de relaxamento derivado do endotélio, em especial, o NO, com fortes evidências da participação da via CGs/GMPc, além da participação de alguns canais para K⁺, principalmente, os canais para K⁺ retificador retardado. Este trabalho também evidenciou um efeito inotrópico negativo cardíaco induzido pelo veneno.

O veneno crotálico pode desencadear ações neurotóxicas, miotóxicas e coagulantes. No sistema cardiovascular, podem ser observados quadros de hipotensão, alterações na permeabilidade vascular, alterações no traçado eletrocardiográfico sugestivo de hipóxia do miocárdio com alterações

enzimáticas ou ainda arritmia sinusal (SANTOS et al., 1990; ZHANG et al., 2010). Diante desse conhecimento, investigou-se se o veneno bruto da CDC poderia apresentar atividade em tecido vascular.

Para tanto, foram realizados ensaios em artéria mesentérica de ratos normotensos Wistar, os quais demonstraram que o veneno da CDC possui efeito vasorrelaxante, de maneira dependente da concentração, sobre o tônus induzido por Phe 10 μ M.

O endotélio vascular ocupa um local de controle estratégico na hemodinâmica vascular, sendo formado por uma monocamada de células endoteliais que recobrem a luz do vaso e possui grande relevância na modulação do tônus vascular. A modulação do estado contrátil dos vasos pelas células endoteliais é feita pela liberação de fatores de contração e relaxamento. Os fatores de relaxamento são coletivamente chamados de EDRFs (do inglês *Endothelium derived relaxing factors*), representados, principalmente, pelo óxido nítrico, prostanoide vasodilatador, como a prostaciclina (PGI₂), e pelo fator hiperpolarizante derivado do endotélio (LÜSCHER; BARTON 1997; GALLEY; WEBSTER 2004; KANG, 2014).

A fim de investigar a participação do endotélio no efeito vasorrelaxante induzido pelo veneno, foram realizados ensaios na presença e ausência do endotélio funcional. Os resultados demonstraram que a resposta vasorrelaxante induzida pelo veneno foi significativamente reduzida pela ausência do endotélio, evidenciando que fatores relaxantes derivados do endotélio parecem ser essenciais para o efeito vasodilatador do veneno. Estudos anteriores realizados em aorta torácica de ratos Wistar, com peptídeo natriurético isolado a partir do veneno da mesma serpente, também apontaram um efeito vasorrelaxante dependente da presença do endotélio vascular (EVANGELISTA et al., 2008). Além dessa espécie, resultados com veneno da *Bothrops atrox* em artéria coronária isolada de porco também apresentaram um relaxamento dependente do endotélio vascular (GLUSA; BRAUNS; STOCKER, 1991).

É importante destacar que as respostas farmacológicas obtidas após a administração de determinadas substâncias podem variar em função de vários fatores, inclusive quanto aos diferentes tecidos. Os leitos vasculares são

distintos no que diz respeito à fisiologia, à densidade e ao tipo de receptores que expressam, como também à maneira que respondem a determinada substância (SILVA, 2011). Em se tratando de veneno de serpente, cuja composição pode ser alterada naturalmente ao longo da evolução por múltiplos fatores, como habitat, alimentação e até a idade da serpente, diferentes respostas podem ser encontradas (CALVETE; 2009, 2013; WARRELL, 2010).

Exemplos dessas diferenças foram demonstrados em ensaios realizados com aorta torácica de rato Wistar, na presença do veneno da subespécie *Crotalus durissus cumanensis*, nos quais se observou aumento da contração em anéis pré-contraídos com Phe, na presença do endotélio intacto, e efeito vasorrelaxante na ausência do endotélio (PEREIRA et al., 2011).

Para avaliar o efeito do veneno da CDC em anéis de artéria mesentérica pré-contraídos com agentes contracturantes, cujo mecanismo de ação difere do induzido por fenilefrina para gerar aumento de tensão, foi avaliado o efeito do veneno em preparações pré-contraídas com solução despolarizante de KCl 80 (mM). A solução despolarizante de potássio nessa concentração promove bloqueio de, pelos menos, parte do efluxo de K^+ , atenuando, desta forma, relaxamentos mediados por abertura de canais para K^+ . O KCl 80 mM promove uma despolarização da membrana plasmática, com consequente ativação dos canais de cálcio sensíveis à voltagem (Cav). Dessa forma, ocorre o influxo de íons cálcio e contração muscular (VERGARA et al., 1998; GUÉGUINOU et al., 2014).

O veneno não foi capaz de relaxar as contrações induzidas por altas concentrações de K^+ , tendo seu efeito praticamente abolido. Resultados semelhantes foram observados em aorta torácica, com peptídeo natriurético da mesma subespécie em solução de K^+ 80mM, bem como de outra espécie, a *Crotalus oreganus abyssus*; ou mesmo em soluções com concentrações menores (K^+ 40mM), como a subespécie *Crotalus durissus cumanensis* (EVANGELISTA et al., 2008; PEREIRA et al., 2011; SILVA et al., 2012).

Em virtude da ausência de relaxamento em altas concentrações de K^+ , e a fim de identificar se o efeito vasorrelaxante do veneno resultaria de uma possível inibição de receptores alfa-adrenérgicos, utilizou-se outro agente contracturante, o agonista de receptor de $PGF_{2\alpha}$, para avaliar se a resposta do

veneno seria modificada. Os resultados demonstraram uma atenuação do efeito vasorrelaxante do veneno nas contrações induzidas por $\text{PGF}_{2\alpha}$ de forma significativa, quando comparados às contrações com Phe. Esses resultados sugerem uma provável predileção do veneno em promover relaxamento sobre contrações induzidas por acoplamento fármaco-mecânico, além de uma possível participação de canais para K^+ , já que o efeito relaxante do veneno foi abolido em situação de altas concentrações de K^+ e apenas atenuado em contrações induzidas por $\text{PGF}_{2\alpha}$. Tal predileção por anéis contraídos por Phe pode ser devido ao fato de que receptores α_1 -adrenérgicos, possivelmente, sejam capazes de promover fosforilação do resíduo estimulatório da NOS3, resultando em um possível aumento da atividade dessa enzima e, por conseguinte, um maior efeito vasorrelaxante do veneno na presença da Phe em comparação ao $\text{PGF}_{2\alpha}$ (LOOFT-WILSON et al., 2013). Contudo, estudos adicionais deverão ser realizados para avaliar tal hipótese.

Ao se analisarem os possíveis mecanismos responsáveis pelo relaxamento induzido pelo veneno da CDC, os resultados sugerem o envolvimento do NO nessa resposta, uma vez que o vasorrelaxamento foi atenuado após inibição não seletiva da enzima NOS, com a utilização do L-NAME. A GCs presente nas células do músculo liso vascular é o principal alvo celular do NO para indução do relaxamento vascular. O NO se liga ao sítio heme da GCs e modula positivamente sua atividade. A ativação da GCs promove aumento na produção de GMPc. Por diversas vias de sinalização celular, o GMPc leva à redução da concentração citosólica de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) nas células do músculo liso vascular e consequente relaxamento vascular (SANDOO et al., 2010; KANG, 2014).

Neste trabalho, foi demonstrado que a via CG/GMPc é fundamental para o relaxamento induzido pelo veneno, desde que tal relaxamento fosse expressamente reduzido pelo inibidor seletivo da GCs, ODQ. Esses resultados sugerem que o relaxamento estimulado pelo veneno da CDC deve ser devido à liberação de NO e consequente ativação da enzima guanilil-ciclase solúvel. Ensaios *in vivo* descritos na literatura têm sugerido a participação do NO no efeito hipotensor induzido pelo veneno da CDC. Essa possível participação do NO foi descrita em algumas espécies do gênero *Crotalus*, assim como no

gênero *Bothrops*, que serviu como precursora para o captopril (EVANGELISTA et al., 2008; IANZER et al., 2011; SILVA et al., 2012).

Para avaliar a ação direta do veneno sobre células endoteliais isoladas, testes com amperimetria foram realizados. O resultado da liberação de NO a partir de células aórticas isoladas corroboram o provável mecanismo de ação do veneno em tecido vascular, liberação de NO endotelial e relaxamento.

Outro fator de relaxamento derivado do endotélio que pode estar envolvido no efeito vasorrelaxante induzido pelo veneno é a prostaciclina. A síntese da PGI₂ é iniciada pela ação da enzima fosfolipase A₂ sobre os fosfolípidios de membrana, promovendo a liberação do ácido araquidônico que os compõe. Uma vez produzida e liberada, a PGI₂ liga-se ao receptor de IP na membrana plasmática das células musculares lisas, que induz a ativação da adenilil-ciclase (AC) / AMPc / PKA, resultando no relaxamento vascular (VANE; CORIN, 2003; FETALVERO; MARTIN; HWA, 2007).

Nos ensaios realizados com indometacina, um inibidor não seletivo da COX, a resposta vascular do veneno da CDC foi reduzida significativamente, pelo menos, nas maiores concentrações testadas, sugerindo que prostanoídes vasorrelaxantes derivados da ciclooxigenase participam do efeito vascular induzido pelo veneno da CDC.

Além do efeito vasodilatador descrito neste trabalho, também foi evidenciada atividade vasoconstritora do veneno quando adicionado sob o tônus basal, tanto em anéis com endotélio funcional como em vasos desnudos de endotélio, sugerindo que algum composto presente no veneno age diretamente sobre a musculatura lisa para induzir contração. São dados que diferem de estudos realizados com a aorta torácica sobre o efeito do veneno de *Crotalus durissus cumanensis*, em que a contratilidade não foi alterada (PEREIRA et al., 2011). Uma hipótese para essa contração independente da presença do endotélio seria a indução, pela crotoxina, de alteração nos canais de sódio da membrana plasmática das células musculares, com consequente elevação dos níveis de sódio intracelular, podendo levar à ativação de canais para Ca²⁺ e consequente contração (HENDON; FRAENKEL-CONRAT, 1971; CASTRO, 2006; FLORES-SOTO et al., 2013). Porém, estudos deverão ser realizados para avaliar essa hipótese.

É importante ressaltar que a viabilidade tecidual foi mantida, uma vez que as contrações induzidas por Phe, após uso cumulativo do veneno, não se alteraram, quando comparadas às contrações antes da incubação com o mesmo, demonstrando que, provavelmente, o veneno não apresenta atividade tóxica tecidual ou ligação irreversível com seus alvos biológicos no tecido vascular.

Os venenos são compostos bioativos, com uma variedade de atividades biológicas, formados, principalmente, por proteínas. No presente estudo, foi demonstrado que componentes do veneno da CDC, que participam do efeito vasorrelaxante, são sensíveis a altas temperaturas, uma vez que o efeito foi significativamente atenuado após o aquecimento. Esse resultado indica que os constituintes relaxantes do veneno da CDC, provavelmente, têm natureza peptídica. Essa hipótese está de acordo com os dados encontrados na literatura sobre a composição peptídica dos venenos (JIANG et al., 2008; RODRIGUES et al., 2014).

Os canais para K^+ desempenham importante papel na regulação de funções vasculares. Além disso, são alvos diretos e indiretos das ações do NO em tecidos vasculares. O NO pode induzir a ativação de canais para K^+ sensíveis ao ATP (K_{ATP}) e canais para K^+ ativados por cálcio ($K_{Ca^{2+}}$) (COSTA; ASSREUY, 2005; ZHANG et al., 2014).

Para avaliar a participação desses canais na resposta vasorrelaxante induzida por veneno bruto da CDC, foram realizados ensaios utilizando preparações incubadas com KCl 20 mM, condição em que promove bloqueio parcial do efluxo de K^+ por deslocar o potencial de equilíbrio do K^+ para valores mais próximos do potencial de membrana, minimizando, desta forma, relaxamentos mediados por abertura de canais para K^+ (REIS et al., 2013). A elevação do K^+ extracelular (de 4 para 20 mM) alterou significativamente o vasorrelaxamento dependente de concentração induzido pelo veneno com atenuação da magnitude do efeito, sugerindo que a resposta relaxante induzida por veneno da CDC parece envolver canais para K^+ . Contudo, esse protocolo não forneceu informações sobre o tipo de canal para potássio que poderia ser ativado pelo veneno, e dados na literatura descrevem a existência de vários tipos de canais para K^+ no músculo liso vascular.

Em virtude da existência de vários canais para K^+ nas células musculares lisas e da necessidade de identificar quais subtipos de canais para potássio poderiam participar da resposta vasorrelaxante, induzida pelo veneno da CDC, realizaram-se experimentos para obtenção de curvas concentração-resposta para veneno da CDC na presença de alguns bloqueadores de canais para K^+ . No ensaio realizado na presença do TEA 1mM que, nesta concentração, é um bloqueador não seletivo dos BK_{Ca} (REIS et al. 2013), a curva concentração-resposta do veneno não apresentou diferença significativa na presença de TEA 1 mM. No entanto, o efeito vasorrelaxante induzido pelo veneno da CDC foi atenuado nas preparações pré-incubadas separadamente com $BaCl_2$ (30 μ M), um bloqueador dos canais retificadores de entrada (KAWABATA et al., 2004), como pode ser observado pelos valores do E_{max} . Contudo, as reduções mais expressivas da magnitude do efeito foram observadas nas curvas concentração-resposta obtidas na presença de 4-AP, um bloqueador seletivo dos canais K_v (GHISDAL; MOREL, 2001), sugerindo fortemente a participação desses canais.

É importante destacar que o NO também tem papel de destaque entre os fatores vasoativos que influenciam o potencial de membrana e alteram a atividade do canal de K^+ , exercendo suas ações através da proteína quinase dependente de GMPc. Os canais K_{Ca} podem ser ativados por proteínas quinases dependentes de AMPc ou GMPc e/ou diretamente pela proteína G (COSTA; ASSREUY, 2005). Alguns estudos sugerem que o NO também modula a ativação dos canais K_{ATP} , via GCs-GMPc-PKG. Esses mecanismos, entretanto, não estão claramente elucidados (ZHANG et al., 2014).

Tão importante quanto avaliar o efeito do veneno sobre os vasos sanguíneos e seus mecanismos de funcionamento é identificar as possíveis ações desse veneno sobre o coração.

Os resultados com átrio isolado apontam que o veneno da CDC apresenta efeito inotrópico negativo, uma vez que reduziu a força de contração, provavelmente atuando sobre a maquinaria contrátil, já que a automicidade cardíaca não foi alterada, sugerindo uma ausência de ação sobre o nó sinoatrial. Os achados assemelham-se a ensaios realizados com coração isolado de porco na presença do veneno da *Crotalus durissus terrificus*, onde

também foi observado efeito inotrópico negativo, sem alteração significativa na frequência cardíaca, e diverge parcialmente de ensaios com átrio de ratos também normotensos sobre a ação do veneno da espécie *Bothrops marajoensis*, onde o veneno induziu efeito inotrópico negativo e cronotrópico positivo (SANTOS et al., 1990; EVANGELISTA et al., 2011). Contudo, ensaios específicos devem ser realizados para definir o mecanismo de ação envolvido na atividade cardíaca do veneno, bem como a dosagem de enzimas cardíacas para descartar a possibilidade de lesão celular, já que a literatura descreve ação miotóxica do veneno de serpentes e, especificamente, na espécie *crotalus durissus* (LOMONTE; ANGULO; CALDERÓN, 2003).

Por fim, esses resultados em conjunto sugerem que o veneno da CDC induz efeito vasorrelaxante em anéis da artéria mesentérica superior de rato normotenso de maneira dependente do endotélio, possivelmente, através de fatores de relaxamento derivados do endotélio, em especial o NO, além da participação de canais para K^+ , com destaque para os K_v . O veneno também induziu efeito inotrópico negativo sem induzir alterações sinificantes no cronotropismo. Os resultados são promissores e serão agregados a novos ensaios, a fim de delinear, de maneira mais clara, o mecanismo de ação envolvido no relaxamento induzido pelo veneno da CDC.

Conclusão

8 CONCLUSÃO

Em conclusão, o presente estudo demonstrou que:

- ✓ O veneno da CDC, promove vasorrelaxamento em anéis de artéria mesentérica isolada de ratos Wistar, dependente da presença do endotélio vascular;
- ✓ O veneno da CDC altera a contratilidade de anéis de artéria mesentérica em tônus basal, promovendo contração independente da presença do endotélio vascular;
- ✓ Os fatores de relaxamento endotelial, em especial o NO, parecem participar do vasorrelaxamento induzido pelo veneno da CDC;
- ✓ O veneno da CDC induz liberação de NO em células endoteliais aórticas.
- ✓ Canais K_{ir} e K_v parecem participar da resposta vasorrelaxante do veneno da CDC em anéis de artéria mesentérica isolada de ratos Wistar;
- ✓ O veneno da CDC induz efeito inotrópico negativo, sem alteração no cronotropismo cardíaco.

Perspectiva

9 PERSPECTIVA

Participação dos canais K^+ sensíveis a ATP e demais BKca na resposta vasorrelaxante induzida por veneno da CDC em anéis vasculares.

Participação do Fator Hiperpolarizante derivado do endotélio na resposta vasorrelaxante induzida por veneno da CDC em anéis vasculares.

Mecanismo de ação envolvido no efeito inotrópico negativo e dosagem de enzimas cardíacas.

|

Referências

REFERÊNCIAS

- ABOU-SALEH, Haissam et al. Inositol 1, 4, 5-Trisphosphate (IP3) Receptor Up-regulation in Hypertension Is Associated with Sensitization of Ca²⁺ Release and Vascular Smooth Muscle Contractility. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 46, p. 32941-32951, 2013.
- ACHELROD, Dmitrij; WENZEL, Ulrich; FREY, Simon. Systematic Review and Meta-Analysis of the Prevalence of Resistant Hypertension in Treated Hypertensive Populations. **American journal of hypertension**, p. hpu151, 2014.
- ANDRADE, Jadelson P. et al. Epidemiological aspects of adherence to the treatment of hypertension. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v. 79, n. 4, p. 380-384, 2002.
- APONTE, Maria M. Patarroyo; FRANCIS, Gary S. Effect of Angiotensin-converting enzyme inhibitors and Angiotensin receptor antagonists in atherosclerosis prevention. **Current cardiology reports**, v. 14, n. 4, p. 433-442, 2012.
- BAE, Sung Won et al. Rapid increase in endothelial nitric oxide production by bradykinin is mediated by protein kinase A signaling pathway. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 306, n. 4, p. 981-987, 2003.
- BAILEY, Leslie E.; ONG, Seok D. Krebs-Henseleit solution as a physiological buffer in perfused and superfused preparations. **Journal of Pharmacological Methods**, v. 1, n. 2, p. 171-175, 1978.
- BARLOW, Axel et al. Coevolution of diet and prey-specific venom activity supports the role of selection in snake venom evolution. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, p. rspb. 2009.0048, 2009.
- BAUDIN, Bruno et al. A protocol for isolation and culture of human umbilical vein endothelial cells. **Nature protocols**, v. 2, n. 3, p. 481-485, 2007.
- BAUER, Viktor; SOTNÍKOVÁ, Ružena. Nitric oxide--the endothelium-derived relaxing factor and its role in endothelial functions. **General physiology and biophysics**, v. 29, n. 4, p. 319-340, 2010.
- BERNIER, Sylvie G.; HALDAR, Saptarsi; MICHEL, Thomas. Bradykinin-regulated interactions of the mitogen-activated protein kinase pathway with the endothelial nitric-oxide synthase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 39, p. 30707-30715, 2000.
- BERNSTEIN, Kenneth E. et al. A modern understanding of the traditional and nontraditional biological functions of angiotensin-converting enzyme. **Pharmacological reviews**, v. 65, n. 1, p. 1-46, 2013.

BOLDRINI-FRANCA, Johara et al. Snake venomomics and antivenomics of *Crotalus durissus* subspecies from Brazil: Assessment of geographic variation and its implication on snakebite management. **Journal of proteomics**, v. 73, n. 9, p. 1758-1776, 2010.

BON, Cassian et al. Postsynaptic effects of crotoxin and of its isolated subunits. **European Journal of Biochemistry**, v. 99, n. 3, p. 471-482, 1979.

BON, Cassian et al. The natural toxins. **Biochimie**, v. 82, n. 9/10, p. 791-766, 2000.

BRUGTS, J. J. et al. The incidence and clinical predictors of ACE-inhibitor induced dry cough by perindopril in 27,492 patients with vascular disease. **International journal of cardiology**, v. 176, n. 3, p. 718-723, 2014.

CALVETE, Juan J. Snake venomomics: from the inventory of toxins to biology. **Toxicon**, v. 75, p. 44-62, 2013.

CALVETE, Juan J. Venomomics: digging into the evolution of venomous systems and learning to twist nature to fight pathology. **Journal of proteomics**, v. 72, n. 2, p. 121-126, 2009.

CAMARGO, Antonio et al. Bradykinin-potentiating peptides: beyond captopril. **Toxicon**, v. 59, n. 4, p. 516-523, 2012.

CAMPBELL, William B.; HARDER, David R. Endothelium-derived hyperpolarizing factors and vascular cytochrome P450 metabolites of arachidonic acid in the regulation of tone. **Circulation Research**, v. 84, n. 4, p. 484-488, 1999.

CASTRO, Isac de. Estudo da toxicidade das peçonhas crotálicas e botrópicas, no acidente ofídico, com ênfase a toxicidade renal. **O Mundo da Saúde**, v. 30, p. 644-653, 2006.

CATTERALL, William A. Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. **Annual review of cell and developmental biology**, v. 16, n. 1, p. 521-555, 2000.

CHEN, Guifa; SUZUKI, Hikaru; WESTON, Arthur H. Acetylcholine releases endothelium-derived hyperpolarizing factor and EDRF from rat blood vessels. **British journal of pharmacology**, v. 95, n. 4, p. 1165-1174, 1988.

CHRISOBOLIS, Sophocles; SOBEY, Christopher G. Inwardly rectifying potassium channels in the regulation of vascular tone. **Current drug targets**, v. 4, n. 4, p. 281-289, 2003.

CLARK, Shawn G.; FUCHS, Leslie C. Role of nitric oxide and Ca⁺⁺-dependent K⁺ channels in mediating heterogeneous microvascular responses to acetylcholine in different vascular beds. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 282, n. 3, p. 1473-1479, 1997.

COLE, W. C.; CLEMENT-CHOMIENNE, O.; AIELLO, E. A. Regulation of 4-aminopyridine-sensitive, delayed rectifier K⁺ channels in vascular smooth muscle by phosphorylation. **Biochemistry and cell biology**, v. 74, n. 4, p. 439-447, 1996.

COSTA, Renata SA; ASSREUY, Jamil. Multiple potassium channels mediate nitric oxide-induced inhibition of rat vascular smooth muscle cell proliferation. **Nitric Oxide**, v. 13, n. 2, p. 145-151, 2005.

COX, Robert H.; RUSCH, Nancy J. New Expression Profiles of Voltage-gated Ion Channels in Arteries Exposed to High Blood Pressure. **Microcirculation**, v. 9, n. 4, p. 243-257, 2002.

CUNHA, Elaine Moio; MARTINS, Otávio Augusto. Principais compostos químicos presentes nos venenos de cobras dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus* – uma revisão. **Revista Eletrônica de Educação e Ciência**, v. 2, n. 2, p. 21-26, 2012.

CURA, Jorge E. et al. Phase I and pharmacokinetics study of crotoxin (cytotoxic PLA₂, NSC-624244) in patients with advanced cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 8, n. 4, p. 1033-1041, 2002.

CUSHMAN, David W. et al. Design of potent competitive inhibitors of angiotensin-converting enzyme. Carboxyalkanoyl and mercaptoalkanoyl amino acids. **Biochemistry**, v. 16, n. 25, p. 5484-5491, 1977.

CUSHMAN, David W. et al. Development and design of specific inhibitors of angiotensin-converting enzyme. **The American journal of cardiology**, v. 49, n. 6, p. 1390-1394, 1982.

DA SILVA, Tiago F. Abordagens da Química Medicinal para o Planejamento de Protótipos de Fármacos. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 5, p. 921-933, 2013.

DAVIDGE, Sandra T. Prostaglandin H synthase and vascular function. **Circulation research**, v. 89, n. 8, p. 650-660, 2001.

DE OLIVEIRA, Daniela G. et al. Structural and biological characterization of a crotapotin isoform isolated from *Crotalus durissus cascavella* venom. **Toxicon**, v. 42, n. 1, p. 53-62, 2003.

DE SOUSA ARAÚJO, Zélia Maria. Hipertensão arterial - um problema de saúde pública. **Revista Brasileira em Promoção da Saúde**, v. 24, n. 4, p. 285-286, 2011.

DESHMUKH, Abhishek et al. Effect of Joint National Committee VII report on hospitalizations for hypertensive emergencies in the United States. **The American journal of cardiology**, v. 108, n. 9, p. 1277-1282, 2011.

DESSY, Chantal; FERON, Olivier; BALLIGAND, Jean-Luc. The regulation of endothelial nitric oxide synthase by caveolin: a paradigm validated in vivo and

shared by the 'endothelium-derived hyperpolarizing factor'. **Pflügers Archiv-European Journal of Physiology**, v. 459, n. 6, p. 817-827, 2010.

DUDZINSKI, David M. et al. The regulation and pharmacology of endothelial nitric oxide synthase. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 46, p. 235-276, 2006.

DÜSING, Rainer. Optimizing blood pressure control through the use of fixed combinations. **Vascular health and risk management**, v. 6, p. 321, 2010.

EGBERTSON, Melissa S. et al. Non-peptide fibrinogen receptor antagonists. 2. Optimization of a tyrosine template as a mimic for Arg-Gly-Asp. **Journal of medicinal chemistry**, v. 37, n. 16, p. 2537-2551, 1994.

EIKEN, Ola; MEKJAVIC, Igor B.; KÖLEGÅRD, Roger. Blood pressure regulation V: in vivo mechanical properties of precapillary vessels as affected by long-term pressure loading and unloading. **European journal of applied physiology**, v. 114, n. 3, p. 499-509, 2014.

ERDÖS, Ervin G. The ACE and I: how ACE inhibitors came to be. **The FASEB Journal**, v. 20, n. 8, p. 1034-1038, 2006.

EVANGELISTA, Inez Liberato et al. Renal and cardiovascular effects of *Bothrops marajoensis* venom and phospholipase A₂. **Toxicon**, v. 55, n. 6, p. 1061-1070, 2010.

EVANGELISTA, J. S. et al. Hypotensive effects of the *Crotalus durissus cascavella* venom: involvement of NO. **Natural product communications**, v. 6, n. 6, p. 871-874, 2011.

EVANGELISTA, Janaina SAM et al. Renal and vascular effects of the natriuretic peptide isolated from *Crotalus durissus cascavella* venom. **Toxicon**, v. 52, n. 7, p. 737-744, 2008.

FELDMAN, Ross D. et al. Intraclass Differences Among Antihypertensive Drugs. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 55, September 2014.

FÉLÉTOU, Michel; HUANG, Yu; VANHOUTTE, Paul M. Endothelium-mediated control of vascular tone: COX-1 and COX-2 products. **British journal of pharmacology**, v. 164, n. 3, p. 894-912, 2011.

FÉLÉTOU, Michel; VANHOUTTE, Paul M. Endothelium-derived hyperpolarizing factor where are we now?. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 26, n. 6, p. 1215-1225, 2006.

FERNANDEZ, Jorge Hernandez et al. Using bradykinin-potentiating peptide structures to develop new antihypertensive drugs. **Genet. Mol. Res**, v. 3, n. 4, p. 554-563, 2004.

FERREIRA, S. H. A bradykinin-potentiating factor (BPF) present in the venom of bothrops jararaca. **Brit. J. Pharmacol**, v. 24, p. 163-169, 1965.

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

FETALVERO, Kristina M.; MARTIN, Kathleen A.; HWA, John. Cardioprotective prostacyclin signaling in vascular smooth muscle. **Prostaglandins & other lipid mediators**, v. 82, n. 1, p. 109-118, 2007.

FLEMING, Ingrid; BUSSE, Rudi. Signal transduction of eNOS activation. **Cardiovascular research**, v. 43, n. 3, p. 532-541, 1999.

FLORES-SOTO, Edgar et al. Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ refilling is determined by L-type Ca²⁺ and store operated Ca²⁺ channels in guinea pig airway smooth muscle. **European journal of pharmacology**, v. 721, n. 1, p. 21-28, 2013.

FUJITA, Satoshi et al. Effects of vasodilators and perfusion pressure on coronary flow and simultaneous release of nitric oxide from guinea pig isolated hearts. **Cardiovascular research**, v. 38, n. 3, p. 655-667, 1998.

GALLEY, H. F.; WEBSTER, N. R. Physiology of the endothelium. **British journal of anaesthesia**, v. 93, n. 1, p. 105-113, 2004.

GARLAND, Christopher J.; HILEY, C. Robin; DORA, Kim A. EDHF: spreading the influence of the endothelium. **British journal of pharmacology**, v. 164, n. 3, p. 839-852, 2011.

GHATTA, Srinivas et al. Large-conductance, calcium-activated potassium channels: structural and functional implications. **Pharmacology & therapeutics**, v. 110, n. 1, p. 103-116, 2006.

GHISDAL, Philippe; MOREL, Nicole. Cellular target of voltage and calcium-dependent K⁺ channel blockers involved in EDHF-mediated responses in rat superior mesenteric artery. **British journal of pharmacology**, v. 134, n. 5, p. 1021-1028, 2001.

GIROTTI, Edmarlon et al. Adesão ao tratamento farmacológico e não farmacológico e fatores associados na atenção primária da hipertensão arterial. **Ciênc Saúde Coletiva**, v. 18, n. 6, p. 1763-72, 2013.

GLUSA, E.; BRAUNS, H.; STOCKER, K. Endothelium-dependent relaxant effect of thrombocytin, a serine proteinase from *Bothrops atrox* snake venom, on isolated pig coronary arteries. **Toxicon**, v. 29, n. 6, p. 725-732, 1991.

GOMES, Antony et al. Anti-arthritic and anti-inflammatory activity of a cytotoxic protein NN-32 from Indian spectacle cobra (*Naja naja*) venom in male albino rats. **Toxicon**, v. 90, p. 106-110, 2014.

GONZALEZ-VILLALOBOS, Romer A. et al. Rediscovering ACE: novel insights into the many roles of the angiotensin-converting enzyme. **Journal of molecular medicine**, v. 91, n. 10, p. 1143-1154, 2013.

GRAY, Peter C. et al. Primary structure and function of an A kinase anchoring protein associated with calcium channels. **Neuron**, v. 20, n. 5, p. 1017-1026, 1998.

GREZZANA, Guilherme Brasil; STEIN, Airtón Tetelbon; PELLANDA, Lúcia Campos. Adesão ao tratamento e controle da pressão arterial por meio da monitoração ambulatorial de 24 horas. **Arq Bras Cardiol**, v. 100, n. 4, p. 355-361, 2013.

GUÉGUINOU, Maxime et al. KCa and Ca²⁺ channels: The complex thought. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1843, n. 10, p. 2322–2333, 2014.

HA, Sung Kyu. Dietary salt intake and hypertension. **Electrolytes & Blood Pressure**, v. 12, n. 1, p. 7-18, 2014.

HENDON, R. A.; FRAENKEL-CONRAT, H. Biological roles of the two components of crotoxin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 68, n. 7, p. 1560-1563, 1971.

HEWETT, P. W.; MURRAY, J. C. Immunomagnetic purification of human microvessel endothelial cells using Dynabeads coated with monoclonal antibodies to PECAM-1. **European journal of cell biology**, v. 62, n. 2, p. 451-454, 1993.

IANZER, Danielle et al. BPP-5a produces a potent and long-lasting NO-dependent antihypertensive effect. **Therapeutic advances in cardiovascular disease**, v. 5, n. 6, p. 281-295, 2011.

IIDA, Shinichiro et al. Insulin-induced relaxation of rat mesenteric artery is mediated by Ca²⁺-activated K⁺ channels. **European journal of pharmacology**, v. 411, n. 1, p. 155-160, 2001.

IVY, Jessica R.; BAILEY, Matthew A. Pressure natriuresis and the renal control of arterial blood pressure. **The Journal of physiology**, v. 592, n. 18, p. 3955-3967, 2014.

JACKSON, William F. Ion channels and vascular tone. **Hypertension**, v. 35, n. 1, p. 173-178, 2000.

JACKSON, William F. Potassium channels in the peripheral microcirculation. **Microcirculation**, v. 12, n. 1, p. 113-127, 2005.

JIANG, Wei-jian et al. Purification and characterization of a novel antinociceptive toxin from Cobra venom (*Naja naja atra*). **Toxicon**, v. 52, n. 5, p. 638-646, 2008.

- JONES, Casey M. et al. Measurement Science in the Circulatory System. **Cellular and molecular bioengineering**, v. 7, n. 1, p. 1-14, 2014.
- JOSEPH, Biny K. et al. Ion channel remodeling in vascular smooth muscle during hypertension: Implications for novel therapeutic approaches. **Pharmacological Research**, v. 70, n. 1, p. 126-138, 2013.
- JOYNER, Michael J.; LIMBERG, Jacqueline K. Blood pressure regulation: every adaptation is an integration?. **European journal of applied physiology**, v. 114, n. 3, p. 445-450, 2014.
- KANG, Kyu-Tae. Endothelium-derived Relaxing Factors of Small Resistance Arteries in Hypertension. **Toxicological research**, v. 30, n. 3, p. 141, 2014.
- KAWABATA, A.; KUBOA, S.; NAKAYAA, Y. et. al. Distinct roles for protease-activated receptors 1 and 2 in vasomotor modulation in rat superior mesenteric artery. **Cardiovasc Res**, v.61, 683 - 692, 2004.
- KAWKA, Douglas W. et al. Double-label expression studies of prostacyclin synthase, thromboxane synthase and COX isoforms in normal aortic endothelium. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1771, n. 1, p. 45-54, 2007.
- KEARNEY, Patricia M. et al. Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. **The Lancet**, v. 365, n. 9455, p. 217-223, 2005.
- KERKIS, Alexandre et al. Crotonamine is a novel cell-penetrating protein from the venom of rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. **The FASEB journal**, v. 18, n. 12, p. 1407-1409, 2004.
- KUMAR, S.V., et al. An update on prodrugs from natural products. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v.7, n. 1, p. 54-59, Set. 2014.
- LA FUENTE, José Maria. Caracterização dos receptores prostanoídes reguladores do tónus do músculo liso trabecular humano-valor da combinação farmacológica da PGE1 na terapêutica intracavernosa. Cidade: Editora, 2003.
- LEDOUX, Jonathan et al. Calcium-activated potassium channels and the regulation of vascular tone. **Physiology**, v. 21, n. 1, p. 69-78, 2006.
- LESSA, Ínes. Impacto social da não-adesão ao tratamento da hipertensão arterial. **Rev Bras Hipertens**, v. 13, n. 1, p. 39-46, 2006.
- LIRA-DA-SILVA, Rêjane M. et al. Serpentes de importância médica do nordeste do Brasil. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 79, n. 1, 2009.
- LOMEO, Rosângela da Silva et al. Crotoxin from *Crotalus durissus terrificus* snake venom induces the release of glutamate from cerebrocortical synaptosomes via N and P/Q calcium channels. **Toxicon**, v. 85, p. 5-16, 2014.

LOMONTE, Bruno; ANGULO, Yamileth; CALDERÓN, Leonel. An overview of lysine-49 phospholipase A₂ myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. **Toxicon**, v. 42, n. 8, p. 885-901, 2003.

LOOFT-WILSON, Robin C. et al. Alpha₁-adrenergic-mediated eNOS phosphorylation in intact arteries. **Vascular pharmacology**, v. 58, n. 1, p. 112-117, 2013.

LOPES, Denise M. et al. A new structurally atypical bradykinin-potentiating peptide isolated from *Crotalus durissus cascavella* venom (South American rattlesnake). **Toxicon**, v. 90, p. 36-44, 2014.

LÜESCHER, THOMAS F.; BARTON, MATTHIAS. Biology of the endothelium. **Clinical Cardiology-Supplement**, p. 3-10, 1997.

MANCIA, Giuseppe et al. 2013 ESH/ESC Guidelines for the management of arterial hypertension The Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). **European Heart Journal**, v. 34, n. 28, p. 2159-2219, 2013.

MARLETTA, Michael A. Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. **Cell**, v. 78, n. 6, p. 927-930, 1994.

MICHAEL, Adrian C. et al. The principles, development and application of microelectrodes for the in vivo determination of nitric oxide. 2007.

MOISE, Nathalie et al. Antihypertensive Drug Class and Adherence: An Electronic Monitoring Study. **American journal of hypertension**, p. hpu199, 2014.

MONCADA, S.; HIGGS, E. A. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. **British journal of pharmacology**, v. 147, n. S1, p. S193-S201, 2006.

MULLER, Vanessa Danielle et al. Phospholipase A2 Isolated from the Venom of *Crotalus durissus terrificus* Inactivates Dengue virus and Other Enveloped Viruses by Disrupting the Viral Envelope. **PloS one**, v. 9, n. 11, p. e112351, 2014.

MURPHEY, L.; VAUGHAN, D.; BROWN, N. Contribution of bradykinin to the cardioprotective effects of ACE inhibitors. **European heart journal supplements**, v. 5, n. A, 2003.

NADERI, Sayed H.; BESTWICK, Jonathan P.; WALD, David S. Adherence to drugs that prevent cardiovascular disease: meta-analysis on 376,162 patients. **The American journal of medicine**, v. 125, n. 9, p. 882-887. e1, 2012.

NASA, Yoshihisa et al. Positive inotropic and negative chronotropic effects of (-)-cis-diltiazem in rat isolated atria. **British journal of pharmacology**, v. 105, n. 3, p. 696-702, 1992.

NELSON, Mark T.; QUAYLE, John M. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 37, n. 4, p. C799, 1995.

NOBRE, Fernando et al. Hipertensão arterial sistêmica primária. **Medicina (Ribeirão Preto. Online)**, v. 46, n. 3, p. 256-272, 2013.

NOGUEIRA-NETO, Francisco de Sousa et al. The analgesic effect of crotoxin on neuropathic pain is mediated by central muscarinic receptors and 5-lipoxygenase-derived mediators. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 91, n. 2, p. 252-260, 2008.

ONDETTI, M. A., RUBIN, B., AND CUSHMAN, D. W. Design of specific inhibitors of angiotensin-converting enzyme: new class of orally active antihypertensive agents. **Science** (Wash. DC), 196: 441–444, 1977.

OZKOR, Muhiddin A.; QUYYUMI, Arshed A. Endothelium-derived hyperpolarizing factor and vascular function. **Cardiology research and practice**, v. 2011, 2011.

PASSERO, L. F. D. et al. Comparative studies of the anti-leishmanial activity of three *Crotalus durissus* ssp. venoms. **Parasitology research**, v. 101, n. 5, p. 1365-1371, 2007.

PEREDO, H. A. Opposite effects of endogenous nitric oxide and prostaglandin F₂ α in the rat mesenteric bed. **Autonomic and Autacoid Pharmacology**, v. 23, n. 3, p. 167-172, 2003.

PEREIRA, Marta et al. Differences in prevalence, awareness, treatment and control of hypertension between developing and developed countries. **Journal of hypertension**, v. 27, n. 5, p. 963-975, 2009.

PEREIRA, T. P. et al. Renal and vascular effects of *Crotalus durissus* cumananensis venom and its crotoxin fraction. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 17, n. 3, p. 333-347, 2011.

PLANE, Frances et al. Relaxation to authentic nitric oxide and SIN-1 in rat isolated mesenteric arteries: variable role for smooth muscle hyperpolarization. **British journal of pharmacology**, v. 133, n. 5, p. 665-672, 2001.

PONTE, Cristiano G. et al. Selective, direct activation of high-conductance, calcium-activated potassium channels causes smooth muscle relaxation. **Molecular pharmacology**, v. 81, n. 4, p. 567-577, 2012.

PROBSTFIELD, Jeffrey L.; O'BRIEN, Kevin D. Progression of cardiovascular damage: the role of renin–angiotensin system blockade. **The American journal of cardiology**, v. 105, n. 1, p. 10A-20A, 2010.

QUINTANA, J. C. et al. Antiplasmodial effect of the venom of *Crotalus durissus cumanensis*, crotoxin complex and Crotoxin B. **Acta tropica**, v. 124, n. 2, p. 126-132, 2012.

RÁDIS-BAPTISTA, Gandhi et al. Crotacetin, a novel snake venom C-type lectin homolog of convulxin, exhibits an unpredictable antimicrobial activity. **Cell biochemistry and biophysics**, v. 44, n. 3, p. 412-423, 2006.

REIS, Milena Ramos et al. Involvement of Potassium Channels in Vasorelaxant Effect Induced by Valeriana prionophylla Standl. in Rat Mesenteric Artery. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, 2013.

RIBEIRO, Wellington; MUSCARÁ, Marcelo Nicolás. Características farmacocinéticas de antagonistas de cálcio, inibidores da ECA e antagonistas de angiotensina II em humanos. **Revista Brasileira de Hipertensão**, p. 114-124, 2001.

ROCHA, Juliana T. et al. Ethanol induces vascular relaxation via redox-sensitive and nitric oxide-dependent pathways. **Vascular pharmacology**, v. 56, n. 1, p. 74-83, 2012.

RODRIGUES, Mariana AP et al. Rat atrial responses to *Bothrops jararacussu* (jararacuçu) snake venom. **Toxicology**, v. 323, p. 109-124, 2014.

ROWAN, Christopher G. et al. Antihypertensive treatment and blood pressure control relative to hypertension treatment guidelines. **Pharmacoepidemiology and drug safety**, 2014.

SALAZAR, Sérgio A.; BORRERO, Jose L.; HARRIS, David M. On systolic murmurs and cardiovascular physiological maneuvers. **Advances in physiology education**, v. 36, n. 4, p. 251-256, 2012.

SANDOO, Amer et al. The endothelium and its role in regulating vascular tone. **The open cardiovascular medicine journal**, v. 4, p. 302, 2010.

SANTOS, P. E. B. et al. Effects of crotoxin on the isolated guinea pig heart. **Toxicon**, v. 28, n. 2, p. 215-224, 1990.

SANTOS, Suelen Silva; VASCONCELOS, Darizy Flavia Amorim. Hospitalizações por hipertensão arterial essencial em caráter de urgência no Brasil, 2008-2012. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 12, n. 4, p. 465-471, 2014.

SCARBOROUGH, Robert M. et al. Barbourin. A GPIIb-IIIa-specific integrin antagonist from the venom of *Sistrurus m. barbouri*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 15, p. 9359-9362, 1991.

- SCHMIDT, Kurt; MAYER, Bernd. Determination of NO with a Clark-type electrode. In: **Nitric Oxide Protocols**. Humana Press, 1998. p. 101-109.
- SILVA, Darízy F. et al. Rotundifolone-Induced Relaxation is Mediated by BKCa Channel Activation and Cav Channel Inactivation. **Basic & clinical pharmacology & toxicology**, v. 109, n. 6, p. 465-475, 2011.
- SILVA, S. L. et al. Vascular effects and electrolyte homeostasis of the natriuretic peptide isolated from *Crotalus oreganus abyssus* (North American Grand Canyon rattlesnake) venom. **Peptides**, v. 36, n. 2, p. 206-212, 2012.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA / Sociedade Brasileira de Hipertensão / Sociedade Brasileira de Nefrologia. VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. In: Rev. Arq. Bras. Cardiol., São Paulo, v. 95, n. 1, supl. 1, jan/mar 2010.
- SOMLYO, Andrew P.; SOMLYO, Avril V. Signal transduction and regulation in smooth muscle. 1994.
- SOOD, Nitesh; REINHART, Kurt M.; BAKER, William L. Combination therapy for the management of hypertension: A review of the evidence. **American Journal of Health-System Pharmacy**, v. 67, n. 11, p. 885-894, 2010.
- STERN, Ralph H. The New Hypertension Guidelines. **The Journal of Clinical Hypertension**, v. 15, n. 10, p.748-51, oct. 2013.
- TAKAYAMA, Makoto; OZAKI, Hiroshi; KARAKI, Hideaki. Effects of a myosin light chain kinase inhibitor, wortmannin, on cytoplasmic Ca²⁺ levels, myosin light chain phosphorylation and force in vascular smooth muscle. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 354, n. 2, p. 120-127, 1996.
- TANAKA, Yoshio et al. Significant role of neuronal non-N-type calcium channels in the sympathetic neurogenic contraction of rat mesenteric artery. **British journal of pharmacology**, v. 128, n. 7, p. 1602-1608, 1999.
- TIAN, Chuan et al. Potassium Channels: Structures, Diseases, and Modulators. **Chemical biology & drug design**, v. 83, n. 1, p. 1-26, 2014.
- TOKARNIA, Carlos Hubinger; PEIXOTO, Paulo Vargas. A importância dos acidentes ofídicos como causa de mortes em bovinos no Brasil. **Pesq. Vet. Bras**, v. 26, n. 2, p. 55-68, 2006.
- TOYAMA, Marcos H. et al. Isolation of a new l-amino acid oxidase from *Crotalus durissus cascavella* venom. **Toxicon**, v. 47, n. 1, p. 47-57, 2006.
- TRAN, Quang-Kim; OHASHI, Kyoichi; WATANABE, Hiroshi. Calcium signalling in endothelial cells. **Cardiovascular research**, v. 48, n. 1, p. 13-22, 2000.
- VAN BEIJNUM, Judy R. et al. Isolation of endothelial cells from fresh tissues. **Nature protocols**, v. 3, n. 6, p. 1085-1091, 2008.

- VANE, J.; CORIN, R. E. Prostacyclin: a vascular mediator. **European journal of vascular and endovascular surgery**, v. 26, n. 6, p. 571-578, 2003.
- VERGARA, Cecilia et al. Calcium-activated potassium channels. **Current opinion in neurobiology**, v. 8, n. 3, p. 321-329, 1998.
- WARRELL, David A. Snake bite. **The Lancet**, v. 375, n. 9708, p. 77-88, 2010.
- WESTERDAHL, Christina et al. Family history as a predictor of hospitalization for hypertension in Sweden. **Journal of hypertension**, v. 31, n. 10, p. 1952-1958, 2013.
- WILLIAMS, Bryan. The year in hypertension. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 55, n. 1, p. 65-73, 2009.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. A global brief on hypertension: silent killer, global public health crisis: World Health Day 2013. 2013.
- ZHANG, Dai-Min et al. Intracellular signalling mechanism responsible for modulation of sarcolemmal ATP-sensitive potassium channels by nitric oxide in ventricular cardiomyocytes. **The Journal of physiology**, v. 592, n. 5, p. 971-990, 2014.
- ZHANG, Peng et al. Crotoxin potentiates L-type calcium currents and modulates the action potential of neonatal rat cardiomyocytes. **Toxicon**, v. 55, n. 7, p. 1236-1243, 2010.
- ZHANG, Xueji et al. Novel calibration method for nitric oxide microsensors by stoichiometrical generation of nitric oxide from SNAP. **Electroanalysis**, v. 12, n. 6, p. 425-428, 2000.