



FIOCRUZ

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa**

TESE DE DOUTORADO

**ALTERAÇÕES MORFOFUNCIONAIS CARDÍACAS
INDUZIDAS PELO VENENO DA *CROTALUS DURISSUS*
CASCAVELLA – SERPENTE DE ALTA PREVALÊNCIA NO
ESTADO DA BAHIA**

LETÍCIA OLIVEIRA SIMÕES

**Salvador - Bahia
2019**

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa**

**ALTERAÇÕES MORFOFUNCIONAIS CARDÍACAS
INDUZIDAS PELO VENENO DA *CROTALUS DURISSUS*
CASCAVELLA – SERPENTE DE ALTA PREVALÊNCIA NO
ESTADO DA BAHIA**

LETÍCIA OLIVEIRA SIMÕES

Orientadora: Profa. Dra. Darízy Flávia Silva Amorim de Vasconcelos

Tese apresentada à Pós Graduação
em Biotecnologia em Saúde e
Medicina Investigativa para a
obtenção do grau de Doutor.

**Salvador - Bahia
2019**

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Instituto Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

S149a Simões, Letícia Oliveira.
Alterações morfofuncionais cardíacas induzidas pelo veneno da *Crotalus durissus cascavella* – serpente de alta prevalência no Estado da Bahia. / Letícia Oliveira Simões. - 2019.
117 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Darízy Flávia Silva Amorim de Vasconcelos,
Laboratório de Fisiologia e Farmacologia Endócrina e Cardiovascular-LAFFEC
Tese (Doutorado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) –
Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, 2019.

1. *Crotalus cascavella*. 2. Cardiotoxicidade. 3. Coração. 4. Inotropismo.
I. Título.

CDU 568.12:616.127

" ALTERAÇÕES MORFOFUNCIONAIS CARDÍACAS INDUZIDAS PELO VENENO DA *CROTALUS*
DURISSUS CASCAVELLA – SERPENTE DE ALTA PREVALÊNCIA NO ESTADO DA BAHIA "

LETÍCIA OLIVEIRA SIMÕES

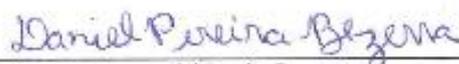
FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 25 de fevereiro de 2019.

COMISSÃO EXAMINADORA



Dr. Isaac Almeida de Medeiros
Professor Titular
UFPB



Dr. Daniel Pereira Bezerra
Pesquisador
IGM/FIOCRUZ



Dr. Denis de Melo Soares
Professor Adjunto
UFBA

FONTES DE FINANCIAMENTO

"O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001”

FAPESB

*Dedico esse trabalho ao meu grande amor Alanjone Azevêdo...
Você me impulsiona!*

AGRADECIMENTOS

Aos meus queridos e amados pais, **Maria das Graças** e **José Simões**, pelo carinho, compreensão e dedicação em todos os momentos. Vocês me mostraram que devemos fazer tudo na vida com amor e dedicação. Fizeram e fazem tudo por mim e por nossa família. Amo vocês!

Às minhas irmãs, **Gísea Simões** e **Mayana Simões**, que sempre acreditaram na minha capacidade de conquistar meus ideais e tiraram de mim as risadas mais gostosas.

À minha orientadora, **Prof.^a Dra. Darizy Flávia Silva Amorim de Vasconcelos**, por acreditar em mim e pelos ensinamentos que vão muito além da ciência! Sou muito grata pela amizade, incentivos e oportunidade de poder realizar e conquistar esse sonho. Você é um exemplo pra mim!

À **Quiara Lovatti Alves**, **Samuel Camargo** e **Keina Marciele**, que estiveram ao meu lado durante e me apoiaram a todo o momento. Sem vocês tudo seria mais difícil! Obrigada pelos conselhos, pelas conversas, pelos choros mútuos e por simplesmente existirem em minha vida.

Aos **alunos do LAFPEC** de iniciação científica e mestrado. Juntos fizemos uma grande equipe! Obrigada por fazer meus dias no laboratório mais gostosos!

A **todos os professores e coordenação do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Medicina Investigativa**, por terem me proporcionado um ensino de excelência e pelo empenho com que conduzem este programa.

Ao **IGM** pelas estruturas que proporcionaram a minha participação em diversos projetos de pesquisa.

A **todos os membros da biblioteca do IGM** pelo apoio e suporte na revisão da presente tese.

À **FAPESB** pela concessão da bolsa, imprescindível para a realização deste trabalho.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

SIMÕES, Letícia Oliveira. Alterações morfofuncionais cardíacas induzidas pelo veneno da *Crotalus durissus cascavella* – serpente de alta prevalência no estado da Bahia. 2019. 117 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2019.

RESUMO

INTRODUÇÃO: O veneno de *Crotalus durissus cascavella* (CDC) pode ser uma fonte de bioprospecção para novos agentes terapêuticos com ação cardiovascular, porém, não são inteiramente compreendidos os efeitos biológicos induzidos em tecido cardíaco. **OBJETIVOS:** Investigar as influências do veneno CDC sobre a atividade cardíaca de ratos e seus possíveis mecanismos de ação envolvidos. **MÉTODOS:** Átrio isolado de ratos machos wistar e espontaneamente hipertensos (SHR) (12-16 semanas) foram mantidos num banho para órgãos com solução de Krebs-bicarbonato, e após um período de estabilização, CDC (0,1-30 µg/mL) foi adicionado cumulativamente ao banho de órgãos. Alterações na contratilidade dos cardiomiócitos foram avaliadas por meio da técnica de alteração de comprimento do cardiomiócito, usando-se um sistema de detecção de bordas. Cardiomiócitos de rato da linhagem H9c2 foram utilizados para avaliar a citotoxicidade do composto em células de mamífero em diferentes concentrações (0,37-30 µg/ml). Para a quantificação da atividade enzimática da cinase de creatina total (CK), amostras de krebs foram recolhidas antes e depois da adição do veneno no banho de órgãos e quantificado usando um kit de ensaio disponível comercialmente. Análises morfológicas e na ultraestrutura do cardiomiócito foram realizadas para investigar algum tipo de lesão cardíaca. As influências de CDC sobre a atividade elétrica cardíaca foram investigadas através sistema de Langendorff. O mecanismo de ação do efeito cardíaco de CDC foi investigado em tecido atrial na presença de Epinefrina (10 µM), Propranolol (10 µM), L-NAME (100 µM); PTIO (100 µM); ODQ (10µM) e KT5823 (1µM). Avaliação dos efeitos de CDC sobre a hemodinâmica de ratos não-anestesiados e sobre o ECG foram realizados no set de experimentos in vivo. Os ensaios realizados foram aprovados pela CEUA (CEUA-ICS/UFBA nº072/2014). As análises estatísticas foram feitas utilizando teste t de Student ou análise de variância “one-way” (ANOVA) seguido de teste de Bonferroni, quando apropriado utilizando o GraphPadPrism 6.0® (EUA). **RESULTADOS:** O CDC induziu um efeito inotrópico negativo em átrio isolado de rato, assim como reduziu a contratilidade em cardiomiócito isolado. CDC nas concentrações de 7,5, 15 e 30 µg/ml não induziu alteração significativa da proliferação celular de cardiomiócitos. O tratamento dos átrios de ratos com CDC (30 µg/ml), não alteraram de maneira significativa os níveis de CK-Total e de CK-MB em solução fisiológica contendo tecido atrial. Adicionalmente, o veneno CDC não induziu alterações morfológicas nem ultraestruturais importantes assim como a eletrogênese cardíaca avaliado através do sistema de Langendorff. CDC não foi capaz de induzir efeito inotrópico negativo em átrio isolado na presença de L-NAME, PTIO, ODQ e KT5823. Em ratos não anestesiados CDC induziram uma hipotensão seguida de bradicardia, essa última sendo também observado em ECG em animais anestesiados. CDC não induziu nenhum efeito em átrio isolado de ratos hipertensos. **CONCLUSÃO:** Esses dados em conjunto demonstram que o efeito cardíaco de CDC possa ser devido a um mecanismo não tóxico, e depender da via NO/GMPc/PKG para induzir seu efeito inotrópico negativo.

Palavras-chave: *Crotalus durissus cascavella*; Cardiotoxicidade; Coração; Inotropismo negativo.

SIMÕES, Letícia Oliveira. Morphofunctional cardiac changes induced by *Crotalus durissus cascavella* venom - a high prevalence snake in the state of Bahia. 2019. 117 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2019.

ABSTRACT

INTRODUCTION: The venom of *Crotalus durissus cascavella* (CDC) may be a source of bioprospecting for new therapeutic agents with cardiovascular action, however, the biological effects induced in cardiac tissue are not fully understood. **AIM:** To investigate the influence of CDC venom on the cardiac activity of rats and their possible mechanisms of action involved. **METHODS:** Atrium isolated from wistar male and spontaneously hypertensive rats (SHR) (12-16 weeks) were maintained in organ bath with Krebs-bicarbonate solution, and after a stabilization period, CDC (0.1-30 µg/mL) was added cumulatively to the organ bath. Changes on the contractility of cardiomyocytes were evaluated by means of the cardiomyocyte length alteration technique, using a border detection system. Rat cardiomyocytes of the H9c2 strain were used to evaluate the cytotoxicity of the compound on mammalian cells at different concentrations (0.37-30 µg/mL). For quantification of the total creatine kinase (CK) enzyme activity, krebs samples were collected before and after the addition of the venom in the organ bath and quantitated using a commercially available assay kit. Morphological and ultrasound analyzes of the cardiomyocyte were performed to investigate some type of cardiac lesion. The influences of CDC on cardiac electrical activity were investigated through Langendorff's system. The mechanism of action of cardiac effect of CDC was investigated on atrial tissue in the presence of Epinephrine (10 µM), Propranolol (10 µM), L-NAME (100 µM); PTIO (100 µM); ODQ (10 µM) and KT5823 (1µM). Evaluation of the effects of CDC on the hemodynamics of non-anesthetized rats and ECG were performed in the set of in vivo experiments. The tests carried out were approved by CEUA (CEUA-ICS / UFBA n ° 072/2014). Statistical analyzes were performed using Student's t-test or one-way ANOVA followed by Bonferroni test, when appropriate using GraphPadPrism 6.0® (USA). **RESULTS:** CDC induced a negative inotropic effect on isolated rat atrium, as well as reduced contractility on isolated cardiomyocytes. CDC at concentrations of 7.5, 15 and 30 µg/mL did not induce a significant change in cardiomyocyte cell proliferation. Treatment of the atria of rats with CDC (30 µg/mL) did not significantly alter the levels of CK-Total and CK-MB in physiological solution containing atrial tissue. In addition, the CDC venom did not induce important morphological or ultrastructural changes as well as cardiac electrogenesis evaluated through the Langendorff system. CDC was not able to induce negative inotropic effect in isolated atrium in the presence of L-NAME, PTIO, ODQ and KT5823. In non-anesthetized CDC rats induced hypotension followed by bradycardia, the latter being also observed on ECG in anesthetized animals. CDC did not induce any atrial effect isolated from hypertensive rats. **CONCLUSION:** These data together demonstrate that the cardiac effect of CDC may be due to a non-toxic mechanism and depend on the NO/cGMP/PKG pathway to induce its negative inotropic effect.

Palavras-chave: *Crotalus durissus cascavella*; Cardiotoxicity; Heart; Negative inotropismo.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Distribuição geográfica das subespécies de <i>Crotalus durissus</i> no Brasil.	20
Figura 2	Imagem ilustrativa da serpente <i>Crotalus durissus cascavella</i>	23
Figura 3	Papel da enzima conversora de angiotensina (ECA) no sistema renina-angiotensina e caliceína-cinina.	27
Figura 4	Proposta de ligação ao sítio ativo local da enzima conversora de angiotensina (ECA), por um análogo de peptídeo de veneno com a sequência C-terminal Phe-Ala-Pro, pela succinil-Pro, e, finalmente, pelo captopril.	29
Figura 5	Proposta de ligação ao sítio ativo local da enzima conversora de angiotensina (ECA), por um análogo de peptídeo de veneno com a sequência C-terminal Phe-Ala-Pro, pela succinil-Pro, e, finalmente, pelo captopril.	31
Figura 6	Representação da reação de síntese de NO à partir da L-arginina.	32
Figura 7	Representação esquemática do mecanismo de ação do Óxido Nítrico na célula muscular cardíaca.	34
Figura 8	Representação esquemática do protocolo de isolamento de átrios dos ratos.	42
Figura 9	Representação esquemática do protocolo para avaliação dos efeitos cronotrópicos e inotrópicos induzidos pelo veneno CDC.	43
Figura 10	Representação esquemática do protocolo de isolamento de cardiomiócitos dos ratos.	44
Figura 11	A) aparato utilizado para experimentos de contratilidade em cardiomiócitos. B) imagem do cardiomiócito isolado e a representação da contração das suas bordas direita e esquerda e a contração referente à célula inteira.	45
Figura 12	Representação esquemática da incubação de CDC para avaliação do seu efeito sobre a contratilidade de cardiomiócitos ventriculares isolados de ratos.	46
Figura 13	Microscópio Eletrônico de Transmissão Zeiss, EM 109 utilizado nas avaliações do efeito de CDC na ultraestrutura de tecido atrial de ratos.	50
Figura 14	Aparato utilizado para os experimentos com coração isolado em Langendorff. ..	51
Figura 15	Representação esquemática do protocolo para avaliação dos efeitos CDC na presença do agonista adrenérgico epinefrina.	53
Figura 16	Representação esquemática do protocolo para avaliação da participação dos receptores adrenérgicos no efeito inotrópico negativo de CDC.	53
Figura 17	Representação esquemática do protocolo para avaliação da participação da via do Óxido Nítrico (NO)/ GMPc/PKG no efeito inotrópico negativo induzido por CDC.	55
Figura 18	Sistema de obtenção do registro eletrocardiográfico.	56
Figura 19	Desenho esquemático da implantação de cateteres de polietileno para a investigação do efeito de CDC na hemodinâmica de animais.	57
Figura 20	feito do CDC sobre o cronotropismo cardíaco em átrios direitos isolados de ratos normotensos.	61
Figura 21	Efeito do CDC sobre o inotropismo cardíaco em átrios esquerdos isolados de ratos normotensos.	62

Figura 22	Influência do CDC (0,1 µg/ml, 1 µg/ml e 10 µg/ml) na contratilidade de cardiomiócitos do ventrículo esquerdo de ratos.....	63
Figura 23	Ausência de efeito citotóxico de CDC, em células H9c2.	65
Figura 24	Tratamento com veneno de CDC (30 µg/mL) não altera os níveis de CK-Total e CK-MB em solução contendo átrios de ratos.	67
Figura 25	Ausência de alterações morfológicas em átrios isolados de ratos tratados com CDC (30 µg/mL).	69
Figura 26	Ausência de alterações ultraestruturais induzidas por CDC (30 µg/ml) em átrios isolados de ratos.....	71
Figura 27	Representação eletrocardiográfica após tratamento com veneno CDC.	72
Figura 28	CDC reverte inotropismo positivo induzido por ativação adrenérgica.....	74
Figura 29	CDC induz efeito inotrópico negativo em átrio isolado de rato na presença de um bloqueador adrenérgico.....	75
Figura 30	A presença de L-NAME reduz efeito inotrópico negativo induzido por CDC.....	76
Figura 31	PTIO reduz efeito inotrópico negativo induzido por CDC em átrios isolados de ratos.....	77
Figura 32	ODQ reduz efeito inotrópico negativo induzido por CDC em átrios isolados de ratos.....	78
Figura 33	KT5823 inibe efeito inotrópico negativo induzido por CDC em átrios isolados de ratos.....	79
Figura 34	Efeito hipotensor e bradicárdico de CDC em ratos normotensos não anestesiados. Efeitos da administração intravenosa de CDC (0,1, 0,3, 1 e 3 µg/kg, iv) sobre a Pressão Arterial Média (%PAM) e Frequência Cardíaca (%FC) em ratos, não anestesiados.....	81
Figura 35	Efeito bradicárdico do CDC em ratos anestesiados submetidos ao ECG. Gráficos em barra demonstrando as alterações da atividade elétrica cardíaca em ratos vivos anestesiados submetidos ao ECG.....	83
Figura 36	Efeito do CDC sobre o cronotropismo cardíaco em átrios direitos isolados de ratos hipertensos..	84
Figura 37	Efeito do CDC sobre o inotropismo cardíaco em átrios esquerdos isolados de ratos hipertensos..	85
Figura 38	Perfil eletroforético do veneno de CDC em gel de poliacrilamida 15% sob condições desnaturantes e reduzidas. (MM) Marcador Molecular, 15 e 30 µg de proteínas aplicadas.	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Número estimado de picadas de cobra na América do Sul.	18
Tabela 2	Incidência e letalidade dos acidentes ofídicos por gênero de serpente.	21
Tabela 3	Composição da solução de Krebs-bicarbonato (pH=7,4).	40

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS	Síndrome de Imunodeficiência Adquirida
Ang I	Angiotensina I
Ang II	Angiotensina II
ATP	Trifosfato de adenosina
BPP	Peptídeo Potencializador de Bradicininina
CDC	<i>Crotalus durissus cascavella</i>
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CK	Creatina cinase
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
DCV	Doença Cardiovascular
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DTN	Doenças negligenciadas Tropicais
ECA	Enzima Conversora de Angiotensina
ECG	Eletrocardiograma
eNOS	Óxido nítrico sintetase endotelial
FAD	Flavina-adenina dinucleotídeo
FC	Frequência cardíaca
FMN	Flavina mononucleotídeo
G-6-P	Glicose-6-fosfato
GMPC	Guanilato ciclase
H4B	Tetraidrobiopterina
HE	Hematoxilina-eosina
HEME	Ferroprotoporfirina IV
HPLC	High performance liquid chromatography
IECAs	Inibidores da Enzima Conversora de Angiotensina
iNOS	Óxido nítrico sintetase induzível
LD	Lactato Desidrogenase
L-NAME	N ^ω -Nitro-L-arginine methyl ester
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
mtNOS	Isoforma mitocondrial da óxido nítrico sintetase
NADPH	Fosfato de nicotinamida-adeninad nucleotídeo
nNOS	Óxido nítrico sintetase neural
NO	Óxido nítrico
NOAP	Núcleo de Ofiologia e Animais peçonhentos da Bahia
NOS	Nitric oxide synthases
NP	Peptídeos natriuréticos
ODQ	1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one
OMS	Organização Mundial da Saúde
PA	Pressão arterial
PAM	Pressão arterial média

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVOS	37
2.1	OBJETIVO GERAL.....	37
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
3	MATERIAL E MÉTODOS	39
3.1	OBTENÇÃO E PREPARAÇÃO DO VENENO BRUTO DA SERPENTE <i>CROTALUS DURISSUS CASCAVELLA</i>	39
3.2	ANIMAIS.....	39
3.3	SOLUÇÕES FISIOLÓGICAS	39
3.4	ISOLAMENTO DE ÁTRIOS DE RATOS.....	41
3.5	PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS UTILIZANDO ÁTRIOS ISOLADOS DE RATOS	42
3.5.1	<i>AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CRONOTRÓPICOS E INOTRÓPICOS INDUZIDOS PELO VENENO CDC</i>	42
3.6	ISOLAMENTO DOS CARDIOMIÓCITOS DE RATOS.	43
3.7	MEDIDA DE CONTRATILIDADE EM CARDIOMIÓCITOS	44
3.8	PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS UTILIZANDO CARDIOMIÓCITOS VENTRICULARES ISOLADOS DE RATOS.....	46
3.8.1	<i>AVALIAÇÃO DO EFEITO DE CDC SOBRE A CONTRATILIDADE DE CARDIOMIÓCITOS VENTRICULARES ISOLADOS DE RATOS</i>	46
3.9	AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE CDC EM CÉLULAS DE MAMÍFEROS.	47
3.10	DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE CREATINA CINASE TOTAL E ISOFORMA MB (CK-TOTAL E CK-MB) EM SOLUÇÃO DE KREBS.....	47
3.11	AVALIAÇÃO DAS INFLUÊNCIAS DE CDC NA MORFOLOGIA CARDÍACA	48
3.11.2	<i>OBTENÇÃO DE IMAGENS</i>	48
3.12	AVALIAÇÃO DA ULTRAESTRUTURA DE TECIDO CARDÍACO TRATADOS COM CDC USANDO MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET).	49
3.13	AVALIAÇÃO DO EFEITO DE CDC SOBRE A ATIVIDADE ELÉTRICA DE CORAÇÕES ISOLADOS DE RATOS.	51
3.13.1	<i>PROTOCOLO EXPERIMENTAL PARA AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE CARDÍACA EM TECIDO ISOLADO</i>	52
3.14	INVESTIGAÇÃO DOS MECANISMOS DE AÇÃO SUBJACENTES AO EFEITO DE CDC EM ÁTRIO ISOLADO DE RATO.....	52
3.14.1	<i>AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CDC NA PRESENÇA DE UM AGONISTA ADRENÉRGICO</i>	52
3.14.2	<i>AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES ADRENÉRGICOS NO EFEITO INOTRÓPICO NEGATIVO DE CDC</i>	53

3.14.3	<i>AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DA VIA DO ÓXIDO NÍTRICO (NO)/ GMPC/PKG NO EFEITO INOTRÓPICO NEGATIVO INDUZIDO POR CDC.</i>	54
3.15	EFEITO DO VENENO CDC SOBRE A ATIVIDADE ELÉTRICA CARDÍACA <i>IN VIVO</i> .	55
3.16	MEDIDA DIRETA DA PRESSÃO ARTERIAL (PA) E FREQUÊNCIA CARDÍACA (FC) EM RATOS NÃO ANESTESIADOS.	56
3.16.1	<i>AVALIAÇÃO DO EFEITO DE CDC SOBRE A PAM E FC DE RATOS NÃO ANESTESIADOS.</i>	57
3.17	CARACTERIZAÇÃO GERAL DOS COMPONENTES PRESENTES NO VENENO CDC	58
3.17.1	<i>ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE).</i>	58
3.17.2	<i>CROMATOGRAFIA DE FASE REVERSA EM HPLC.</i>	59
3.18	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.	59
4	RESULTADOS	61
4.1	EFEITO DO VENENO DE CDC SOBRE O CRONOTROPISMO CARDÍACO DE ANIMAIS NORMOTENSOS.	61
4.2	EFEITO DO VENENO DE CDC SOBRE O INOTROPISMO CARDÍACO DE ANIMAIS NORMOTENSOS E HIPERTENSOS.	61
4.3	CDC REDUZ A CONTRATILIDADE DE CARDIOMIÓCITOS VENTRICULARES ISOLADOS DE RATOS.	63
4.4	EFEITO CITOTÓXICO DE CDC EM CÉLULAS DE MAMÍFEROS.	65
4.5	EFEITO DO VENENO DE CDC SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA CK-TOTAL E CK-MB EM ÁTRIO ISOLADO DE RATOS.	66
4.6	EFEITOS DO VENENO CDC SOBRE A MORFOLOGIA DO TECIDO ATRIAL.	67
4.6.1	<i>ANÁLISE MORFOLÓGICA DESCRITIVA.</i>	68
4.7	EFEITO DE CDC SOBRE A ULTRAESTRUTURA DE CÉLULAS CARDÍACAS.	70
4.8	AUSÊNCIA DE INDÍCIOS CARDIOTÓXICOS DE CDC EM CORAÇÃO ISOLADO.	72
4.9	EFEITO DE CDC EM ÁTRIO ESTIMULADOS COM EPINEFRINA.	74
4.10	PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES ADRENÉRGICOS NO EFEITO INDUZIDO POR CDC.	75
4.11	PARTICIPAÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO SINTASE (NOS) NO EFEITO INDUZIDO POR CDC.	76
4.12	PARTICIPAÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO (NO) NO EFEITO INDUZIDO POR CDC.	77
4.13	PARTICIPAÇÃO DA GUANILIL CICLASE NO EFEITO INDUZIDO POR CDC.	78
4.13	PARTICIPAÇÃO DA PROTEÍNA CINASE DEPENDENTE DE GMPC (PKG) NO EFEITO INDUZIDO POR CDC.	79
4.14	EFEITOS DE CDC NA PRESSÃO ARTERIAL (PA) E FREQUÊNCIA CARDÍACA (FC) DE RATOS.	80
4.15	EFEITO BRADICÁRDICO DE CDC EM ANIMAIS ANESTESIADOS.	82
4.16	EFEITO DO VENENO DE CDC SOBRE O CRONOTROPISMO CARDÍACO DE ANIMAIS HIPERTENSOS.	84

4.17	EFEITO DO VENENO DE CDC SOBRE O INOTROPISMO CARDÍACO DE ANIMAIS HIPERTENSOS.	85
4.18	CARACTERIZAÇÃO DO VENENO CDC.....	86
5	DISCUSSÃO	88
6	CONCLUSÃO	103
	REFERÊNCIAS	104

Introdução

1 INTRODUÇÃO

Os venenos são substâncias produzidas pelo animal com função de defesa contra o predador e no auxílio da digestão. São constituídos por componentes de diferente natureza, incluindo proteínas citotóxicas e polipeptídios biologicamente ativos, compreendendo cerca de 90 a 95% do peso seco do veneno (LEWIS e GARCIA, 2003). São produzidos por plantas ou animais em um órgão secretor bem desenvolvido, ou mesmo num grupo de células (CUNHA e MARTINS, 2012). Entre os seres produtores de veneno, destacam-se as serpentes, uma vez que produzem uma mistura contendo uma variedade de toxinas peptídicas, para imobilizar e capturar suas presas e para se defender contra predadores (KOH e KINI, 2012).

O Brasil possui uma vasta fauna ofídica totalizando 371 espécies, distribuídas em 10 famílias e 75 gêneros. Apenas 2 famílias (*Elapidae* e *Viperidae*) reúnem as espécies que chamamos de peçonhentas, ou seja, aquelas que produzem toxinas em suas glândulas especializadas e possuem aparelhos apropriados para inoculá-las, ocasionando acidentes em seres humanos e animais domésticos (CARDOSO, 2003; BÉRNILS, 2010). A família *Viperidae*, tem especial importância no Brasil, uma vez que é composta pelos gêneros *Bothrops*, *Bothropoides*, *Bothriopsis*, *Bothrocophias*, *Rhinocerophis*, *Crotalus* e *Lachesis*, importante grupo, pois são responsáveis pela maioria e pelos mais graves casos de acidentes ofídicos registrados no Brasil, e também em outros países das Américas (AZEVEDO-MARQUES; CUPO; HERING, 2003).

Os envenenamentos por serpentes são um importante problema de saúde pública em grande parte da África, Ásia e América Latina (WHO, 2007a; KASTURIRATNE et al., 2008; GUTIERREZ et al, 2010) e afeta principalmente as pessoas mais pobres que vivem em áreas rurais (GUTIÉRREZ et al., 2006; WHO, 2007a; HARRISON et al., 2009). Há evidências de que cerca de 4,5 a 5,4 milhões de pessoas sofrem anualmente acidentes ofídicos com um número de mortes que pode variar de 81.000 a 138.000 globalmente (WHO, 2018). Devido à importância destes acidentes, pelo número de pessoas afetadas e o risco de morbimortalidade dos envenenados, a Organização Mundial de Saúde (OMS) incluiu em 2009 os acidentes por animais peçonhentos na lista de Doenças Tropicais Negligenciadas (DTN) que já ocupam o terceiro lugar no quadro epidemiológico do Brasil, ultrapassando a malária e a AIDS (ficando atrás apenas da dengue e tuberculose) demonstrando a necessidade de estudos nesta área (BRASIL, 2016).

Os dados de incidência e mortalidade de envenenamentos ofídicos na América Latina são, em muitos casos, incompletos, por várias razões. Geralmente estes dados vêm de estatísticas hospitalares, porém um número indeterminado de pacientes não são tratados em centros de saúde por diversas razões. Nos países da África e Ásia, algumas estimativas de incidência com base em censos e entrevistas populacionais domiciliares têm mostrado a ocorrência de uma grande subnotificação desses casos, e que essas práticas (entrevistas em domicílio) produzem números mais realistas de incidência e mortalidade (ver, por exemplo, o estudo de RAHMAN et al., (2010) para Bangladesh) (GUTIÉRREZ, 2011). A notificação de envenenamento ofídico como um agravo de notificação obrigatória em alguns países tem sido um passo importante que deve ser generalizada na região (GUTIERREZ et al., 2007).

No Brasil, profissionais de saúde notificam os acidentes por animais peçonhentos às autoridades desde 1986. A importância dos acidentes ofídicos e envenenamentos são revelados pelo alto número de casos notificados no Sistema Nacional de Agravos de Notificação (SINAN). O sub registro desses incidentes é um sério problema, uma vez que tenha sido anteriormente relatados apenas envenenamento em centros de controle. No Brasil, o SINAN relatou um aumento considerável no número de picadas de cobra notificado desde 2001. Em 2008, 26.156 incidentes foram registrados no país, o que corresponde a uma incidência de 13,8 casos por 100.000 habitantes. Em 2015, 105.862 incidentes com cobras peçonhentas. No entanto, há uma variação significativa entre as regiões, com maior incidência ocorre na Região Norte (BRASIL, 2016).

A região Nordeste do Brasil apresenta distribuição desigual dos acidentes ofídicos, possivelmente relacionada à subnotificação. No período de 1999 a 2003, foram notificados 15.345 acidentes ofídicos, o que corresponde a uma média de 3.069 casos por ano. A incidência média para a região foi de 4,57/100.000. A Bahia foi o estado que apresentou maior número de casos (8.599, média de 1.719,8 casos por ano) e maior incidência média (13,16 casos/100.000 hab.), seguida do Maranhão (2.871 casos, média de 574,2 casos/ano e 10,16 casos/100.000 hab.) (LIRA-DA-SILVA et al., 2009).

O trabalho de Gutierrez (2011) resume o número de casos de diferentes países, para um total de cerca de 70.000 casos por ano na América Latina. Isto corresponde aproximadamente ao limite inferior de uma estimativa feita com base em várias fontes e que afirma que o número de casos anuais no continente está entre 80.329 e 129.084 (KASTURIRATNE et al., 2008). A tabela 1 mostra o número estimado por país de picadas de cobra e as espécies de grande relevância médica na América do Sul.

Tabela 1: Número estimado de picadas de cobra na América do Sul.

País	Número de picadas de cobra por ano	Espécies mais importantes
Argentina	270 (Gutiérrez <i>et al.</i> , 2009b)	<i>Bothrops alternatus</i> <i>Bothrops diporus</i> <i>Crotalus durissus</i>
Bolívia	1.000 (Gutiérrez <i>et al.</i> , 2009b)	<i>Bothrops atrox</i> <i>Bothrops mattogrossensis</i> <i>Crotalus durissus</i>
Brasil	26.000-29.000 (de Oliveira <i>et al.</i> , 2009)	<i>Bothrops atrox</i> <i>Bothrops jararaca</i> <i>Bothrops jararacussu</i> <i>Bothrops leucurus</i> <i>Bothrops moojeni</i> <i>Crotalus durissus</i>
Colômbia	3.000 (Otero <i>et al.</i> , 2006)	<i>Bothrops asper</i> <i>Bothrops atrox</i> <i>Bothrops bilineatus</i> <i>Crotalus durissus</i>
Equador	1.400-1.600 (González Andrade & Chippaux, 2010)	<i>Bothrops asper</i> <i>Bothrops atrox</i> <i>Bothrops bilineatus</i> <i>Lachesis muta</i>
Paraguai	400-500 (Gutiérrez <i>et al.</i> , 2009)	<i>Bothrops alternatus</i> <i>Crotalus durissus</i>
Peru	1.400-1.500 (Gutiérrez <i>et al.</i> , 2007)	<i>Bothrops atrox</i> <i>Bothrops bilineatus</i> <i>Bothrops pictus</i> <i>Crotalus durissus</i> <i>Lachesis muta</i>
Uruguai	50-60 (Gutiérrez <i>et al.</i> , 2007)	<i>Bothrops alternatus</i> <i>Crotalus durissus</i>
Venezuela	7.000 (Alexis Rodríguez-Acosta, comunicação pessoal)	<i>Bothrops atrox</i> <i>Bothrops colombiensis</i> <i>Bothrops venezuelensis</i> <i>Crotalus durissus</i>

ADAPTADO: GUTIERREZ, JM., 2011.

Os casos de acidentes ofídicos ocorrem predominantemente durante o período quente e chuvosa, e tipicamente afeta trabalhadores rurais com idade variando entre 15-49 anos, do sexo masculino, e com mordidas, principalmente, no pé ou a mão (BRASIL, 2001; PINHO, 2001; WHO, 2018). Os meses com maior ocorrência de acidentes são geralmente os mesmos em

vários estudos, ocorrendo com maior frequência nos meses com tempo chuvoso e quente, mas com algumas variações de acordo com a região. Tem sido sustentada a hipótese da influência da precipitação pluviométrica, a qual elevaria os níveis das águas dos rios, fazendo com que as serpentes que habitam as regiões próximas dessas margens se desloquem a procura de terra firme, e com a diminuição do espaço territorial, aumente o contato com o homem, facilitando a ocorrência dos acidentes (OLIVEIRA et al., 2010).

Os desfechos de acidentes ofídicos dependem de vários fatores, incluindo a espécie, a área do corpo afetado, a quantidade de veneno injetado, e as condições de saúde da pessoa mordida. A maioria dos acidentes, seja por uma cobra venenosa ou não, pode ter algum tipo de efeito local, com lesões extremamente dolorosas, tornando-se severamente inchada dentro de cinco minutos. Esta área também pode sangrar e eventualmente experimentar necrose tecidual. Dependendo do gênero da cobra, os sintomas podem tornar-se mais graves, levando ao risco de vida ao longo do tempo (GOLD, 2002; BRASIL, 2016).

No Brasil, as serpentes de interesse médico são representadas pelos gêneros *Bothrops*, *Crotalus*, *Lachesis* e *Micrurus* (BRASIL, 1999). Este perfil tem sido relatado em muitas regiões do Brasil, embora a epidemiologia dos casos ofídicos no nordeste do Brasil continua mal compreendida, devido à subnotificação de casos e falhas na coleta de dados epidemiológicos (BRASIL; PINHO, 2001). Além disso, várias mudanças sociais e ambientais que ocorreram na região durante as últimas décadas indicam que a nova pesquisa é necessária sobre este tópico (OLIVEIRA, 2015).

O gênero *Crotalus*, popularmente conhecido como cascavel, é representado no Brasil por uma única espécie, *Crotalus durissus*, e por cinco subespécies, entre elas, a *Crotalus durissus cascavella* (CDC), encontrada nas áreas da caatinga do Nordeste, e registro de sua presença também em regiões litorâneas (BOLDRINI-FRANCA et al., 2010) (figura 1). Em todos os estados do nordeste existem registros de *Crotalus durissus cascavella*. Embora tipicamente esteja descrita como habitando apenas áreas abertas e secas, estudos realizados em colaboração com o Núcleo de Ofiologia e Animais Peçonhentos da Bahia (NOAP) demonstraram que em pelo menos sete dos 10 municípios da Região Metropolitana de Salvador e em sete, dos 20 municípios do Litoral Norte da Bahia, onde o clima não é árido e o ambiente é de dunas e restingas dentro do bioma de Mata Atlântica, existe a ocorrência desta subespécie. Nesse aspecto, chamam a atenção os registros recentes de quatro exemplares dentro da cidade de Salvador, nos bairros da Paralela, Cabula e Stella Maris (LIRA-DA-SILVA et al., 2009).

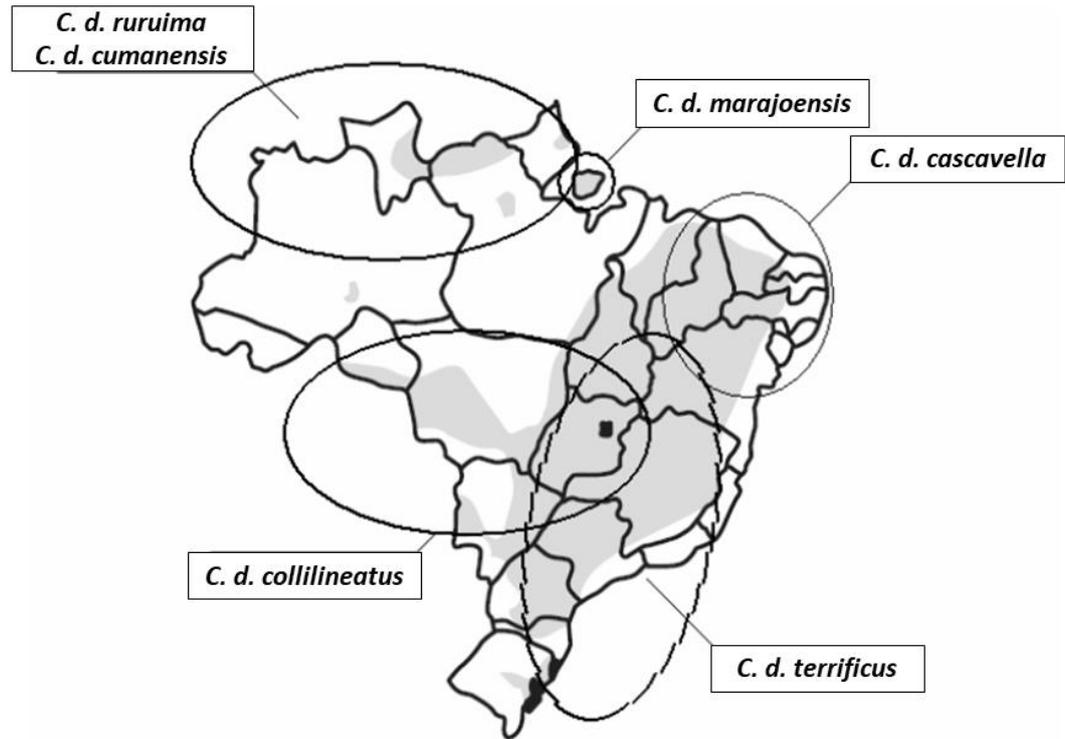


Figura 1. Distribuição geográfica das subespécies de *Crotalus durissus* no Brasil. Fonte: DIZ FILHO, 2007.

O veneno de *Crotalus* é responsável por quase 10% dos acidentes ofídicos registrados no Brasil e apresentam o maior coeficiente de letalidade (1,5%) devido à frequência com que o acidente evolui para insuficiência renal aguda. As reações sistêmicas podem ser de caráter geral, devido a estímulos de diversas origens: mal-estar, prostração, sudorese, náuseas, sonolência ou inquietação e secura da boca (BRASIL, 1999). As ações neurológicas (efeitos no sistema nervoso central) podem aparecer nas primeiras horas após a picada. A idade do paciente e o tempo decorrente entre o acidente e o atendimento, são variáveis que podem interferir nas complicações decorrentes ao envenenamento (FERNANDES et al., 2008). Esses sintomas podem apresentar diferentes manifestações dependendo de fatores de toxicidade intrínseca e quantidade de veneno inoculada, velocidade de absorção e penetração na presa, afetando vários sistemas e ocasionando ações distintas, tais como:

- (a) Ação neurotóxica: Ocasiona bloqueio neuromuscular e consequentemente paralisia motora e respiratória e até convulsões.

Normalmente está relacionada com a fração crotóxina que age nas terminações nervosas;

(b) Ação miotóxica: Causa lesões nas fibras musculares esqueléticas (rabdomiólise) ocasionando liberação de mioglobina na urina;

(c) Ação coagulante: Altera a coagulação sanguínea convertendo o fibrinogênio em fibrina através da atividade enzimática similar a trombina (trombina-like) (BRASIL, 2001).

Alguns estudos avaliando a atividade miotóxica do veneno do gênero *Crotalus* já foram publicados. No trabalho de PAOLA e ROSSI (1993) o aspecto microscópico do miocárdio de ratos em vários intervalos de tempo após a administração do veneno de *Crotalus durissus terrificus* (80 µg/0,2 ml) pela via intraperitoneal foi avaliado. Foi observado que o envenenamento crotálico nessa dose produziu pequenos focos de necrose miocárdica espalhadas ao longo da base dos ventrículos. Estas lesões eram predominantemente perivascular e foram associados com ligeiro a moderado edema intersticial, bem como infiltração de células mononucleares e de um grande número de mastócitos. As primeiras mudanças apareceram 24 horas após o envenenamento e chegou a severidade máxima após 4 dias.

No estudo de CUPO et al. (2003) foi demonstrada a atividade miotóxica cardíaca veneno de *Crotalus durissus terrificus* através do aumento dos níveis séricos das enzimas creatina cinase (CK), lactato desidrogenase (LD) e aspartato aminotransferase. Medidas seriadas da CK, LD e suas isoenzimas em vítimas de picadas de serpentes mostraram um padrão semelhante ao observado em infarto do miocárdio agudo, apesar do curso clínico e os dados de eletro e ecocardiograma não sugerirem um envolvimento cardíaco. Estes dados levantaram a hipótese de que o veneno crotálico preferencialmente causa danos às fibras musculares do tipo I e/ou fibras do tipo IIa, que contêm quantidades de CK-MB e LD1 semelhantes a aqueles encontrados em fibras cardíacas.

Tabela 2. Incidência e letalidade dos acidentes ofídicos por gênero de serpente.

Gênero	Número de casos	Número de óbitos	Letalidade (%)
<i>Bothrops</i>	32.777	138	0.42
<i>Crotalus</i>	3.333	33	0.99
Total	36.110	171	0,47

FONTE: BRASIL, 2016

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 e MARTINS, 2012). Estudos têm demonstrado uma vasta rede de funções biológicas com fins terapêuticos atribuídos aos venenos das subespécies *Crotalus durissus*.

A crotoxina, principal toxina do veneno crotálico, é responsável por cerca de 65% da composição total da peçonha e considerado o principal componente tóxico do veneno. Essa toxina 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; CLISSA, 1997; LOMEIO et al., 2014), sendo essa toxina responsável pelo efeito neurotóxico e miotóxico, com ação pré-sináptica inibindo a liberação de acetilcolina nos nervos terminais produzindo bloqueio neuromuscular (SOARES et al, 2001; PONCE-SOTO et al., 2002).

Ensaio clínico de fase I realizados com a crotoxina isolada da *Crotalus durissus terrificus* mostraram seu potencial antitumoral em pacientes portadores de tumores sólidos refratários à terapia convencional, após administração dessa toxina por via intramuscular durante 30 dias (CURA et al., 2002). Estudos demonstrando seu potencial analgésico (NOGUEIRA-NETO et al., 2008) e atividade antiplasmódica também já foram descritos (QUINTANA et al., 2012). Adicionalmente foram descritos seu potencial para o tratamento de doenças como dengue e febre amarela, demonstrando a inibição da atividade viral envolvendo uma possível ação da fosfolipase A₂ (MULLER, et al., 2014).

O componente crotamina constitui aproximadamente 17% (p/p) do peso total do veneno seco. É considerado um polipeptídeo de baixo peso molecular, básico, mionecrótico, ausente de atividade enzimática e pertencente à família das miotoxinas (OLIVEIRA e SILVA, 2005). Sua ação tóxica é caracterizada por agir nas células musculares esqueléticas ocasionando paralisia muscular, devido à despolarização da membrana, afetando o influxo de cálcio e interagindo com os canais de sódio (PONCE-SOTO et al., 2007).

A convulxina assim como a giroxina são capazes de interferirem no sistema hematológico e cardiovascular. O primeiro é considerado uma glicoproteína pertencente à família das Lectina tipo C, o qual se liga aos receptores de glicoproteínas tipo VI provocando indução da agregação plaquetária (BARRAVIEIRA, 1994; POLGAR, 1997; JANDROT-PERRUS, et al., 1998). De modo semelhante age a fração giroxina presente na *Crotalus durissus terrificus* (MAGRO et al., 2001; SANTORO, 1999).

De modo geral, estudos com o veneno da *Crotalus durissus cascavella* (CDC) têm demonstrado uma gama de possibilidades terapêuticas, como por exemplo, efeito bactericida para bactérias Gram negativas e positivas, além de um poder antiparasitário, especificamente anti-leishmania, dependente da produção de peróxido de hidrogênio induzido pelo veneno (DE OLIVEIRA et al., 2003; TOYAMA et al., 2006; RÁDIS-BAPTISTA et al., 2006). Ensaio *in vivo* comparando três subespécies da *crotalus durrisus*, identificaram que os componentes com atividade anti-leishmaniose se apresentavam em maior concentração na subespécie CDC em relação às outras espécies, e que estes poderiam servir como possíveis agentes contra a leishmaniose cutânea (PASSERO et al., 2007).

Além das atividades antiparasitárias e antimicrobianas já descritas, ensaios vasculares realizados com anéis de aorta torácica de ratos evidenciaram uma atividade relaxante induzida por um peptídeo natriurético isolado do veneno da CDC. Estudos *in vivo* demonstraram um efeito hipotensor, com redução da pressão arterial média, frequência cardíaca e aumento na produção de nitrito. Adicionalmente 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).

Em um estudo prévio do nosso grupo de pesquisa foi demonstrado o veneno de CDC induz vasorelaxamento em anéis de artéria mesentérica superior de ratos normotensos de uma maneira dependente de endotélio vascular. Especificamente, o veneno estimula a produção de NO levando à hiperpolarização do músculo liso vascular através da ativação de canais para K^+ (SANTOS et al., 2017).



Figura 2: Imagem ilustrativa da serpente *Crotalus durissus cascavella*. Fonte: <http://www.vitalbrazil.rj.gov.br/imagens/cascavel2.jpg> (2016).

Apesar do grande interesse médico sobre os venenos do gênero *Crotalus*, e a alta ocorrência desses gêneros no estado da Bahia, poucos estudos caracterizam os efeitos biológicos apresentados durante o envenenamento por picadas com essas espécies de serpentes. Alguns trabalhos com toxinas de venenos de serpentes têm evidenciado promissores efeitos biológicos, dos quais podemos destacar aqueles relacionados ao sistema cardiovascular, com propriedades hipotensoras, vasodilatadoras e anticoagulantes.

Diversos venenos contêm toxinas que produzem hipotensão e choque devido à liberação de substâncias vasoativas que atuam principalmente sobre o tecido vascular ou, em alguns casos, uma ação direta sobre a função cardíaca (ROTHSCHILD e ROTHSCCHILD, 1979; AIRD, 2002). As alterações hemodinâmicas que contribuem para esta hipotensão variam entre os venenos, podendo envolver a diminuição na resistência vascular periférica ou pulmonar, alterações no débito cardíaco e no volume sistólico, mesmo sem alteração na frequência cardíaca e eletrocardiograma (TIBBALLS et al., 1989; CEVESE et al., 1983).

Dentre os mediadores envolvidos nas respostas de hipotensão imediata (segundos a minutos) identificados de venenos animais, podemos destacar as substâncias de baixo peso molecular como as aminas biogênicas, aminoácidos, purinas e pirimidinas e seus derivados nucleosídicos e nucleotídicos (AIRD, 2002). Embora alguns destes componentes estejam

presentes em pequena concentração na composição do veneno (alguns estão em quantidades reduzidas com menos de 1%) outros como nucleosídeos pirimidínicos (adenosina, guanosina e inosina), podem corresponder até a 10% do peso total do veneno. Em 2002, Aird sugeriu que no envenenamento por serpentes, que as purinas e seus derivados exercem um papel importante na resposta hipotensora, paralisia e digestão das presas.

Ainda, muitas substâncias de baixo peso molecular são liberadas endogenamente após o envenenamento (ROTHSCHILD e ROTHSCCHILD, 1979; HAWGOOD, 1982), pela ação de enzimas como as fosfolipases (LLORET e MORENO, 1993; LANDUCCI et al., 1998; AIRD, 2002). Outro grupo de substâncias são os peptídeos natriuréticos (NP), com homologia funcional e estrutural com os NPs de mamíferos, isolados de muitos venenos das famílias *Elapidae* e *Viperidae*, com atividade hipotensora. No animal envenenado, estes componentes podem desencadear diminuição de pressão arterial e do volume sistólico (VINK et al., 2012), através da ligação direta com receptores e ativação da guanilato ciclase e formação de GMPc, pela indução de substâncias hipotensoras como o NO ou mesmo através da liberação de histamina de mastócitos (DE PLATER et al., 1998; CHAI et al., 2001). Foi sugerida, inclusive, a possibilidade de utilização terapêutica do peptídeo natriurético isolado de *Dendroaspis angusticeps* (mamba verde, um elapídeo da África) em pacientes com insuficiência cardíaca (LISY et al., 2001). Já foram isolados NP dos venenos de *Crotalus durissus cascavella* (EVANGELISTA et al., 2008) e *Micrurus corallinus* (HO et al., 1997).

Enquanto o interesse inicial nos venenos de serpentes foi compreender como combater os efeitos de acidentes ofídicos em seres humanos e, para determinar o mecanismo de ação das toxinas presentes nos venenos brutos, o estudo dos venenos atualmente tem despertado interesse para sua utilização com objetivo terapêutico, uma vez que os venenos de serpentes são coleções de moléculas biológicas que são capazes de alterar fisiologicamente os sistemas vitais (KOH e KINI, 2012).

É bem descrito que os produtos naturais derivados de plantas e animais constituem excelente fonte para o surgimento de novos agentes terapêuticos, e 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). Adicionalmente, pode-se ressaltar que poucos estudos foram desenvolvidos com produtos de origem animal quando comparados aos outros produtos de origem natural, especialmente abordando toxinas de serpentes com importante prevalência no Brasil.

O interesse no efeito de algumas toxinas no sistema cardiovascular surgiu principalmente após a década de 50, onde os pesquisadores Maurício Rocha e Silva et al.,

descobriram a bradicinina enquanto estudavam a fisiopatologia do envenenamento da *B. jararaca*, colaborando para avanços e caracterização de uma nova classe de medicamentos conhecidos hoje como Inibidores da Enzima Conversora de Angiotensina (IECAs) (CAMARGO, 2012).

Entre as principais ações fisiológicas da bradicinina está sua participação nos mecanismos de controle do tônus vascular. A ação vasodilatadora arterial da bradicinina deve-se principalmente à ativação de receptores B₂ na superfície de células endoteliais, seguida pela liberação de óxido nítrico (NO) e prostaciclina. Bradicinina promove mudança bifásica do pH intracelular, que pode também modular a liberação de NO pela célula. Esse composto faz parte de uma reação complexa do sistema calicreína-cinina (HECKER et al., 1994; MORAIS et al., 1999). Esse sistema pode ser ativado por proteases presentes em venenos de serpentes, como o *B. jararaca*, que é capaz de ativar a calicreína plasmática e produzir cininas, como a bradicinina, a partir do cininogênio. A bradicinina exerce seu papel farmacológico antes de ser metabolizado pela Enzima Conversora de Angiotensina (ECA). Desta forma, o bloqueio farmacológico do sistema renina-angiotensina 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 (figura 3) (MURPHEY, VAUGHAN e BROWN, 2003; PROBSTFIELD e O'BRIEN, 2010). Então, nesse contexto, uma importante conclusão é que a ativação do sistema calicreína-cinina pelo veneno de serpente pode levar a um choque hipotensivo se não for contrabalanceado por sistemas antagônicos, incluindo o sistema renina-angiotensina, identificados algumas décadas antes (CAMARGO, 2012).

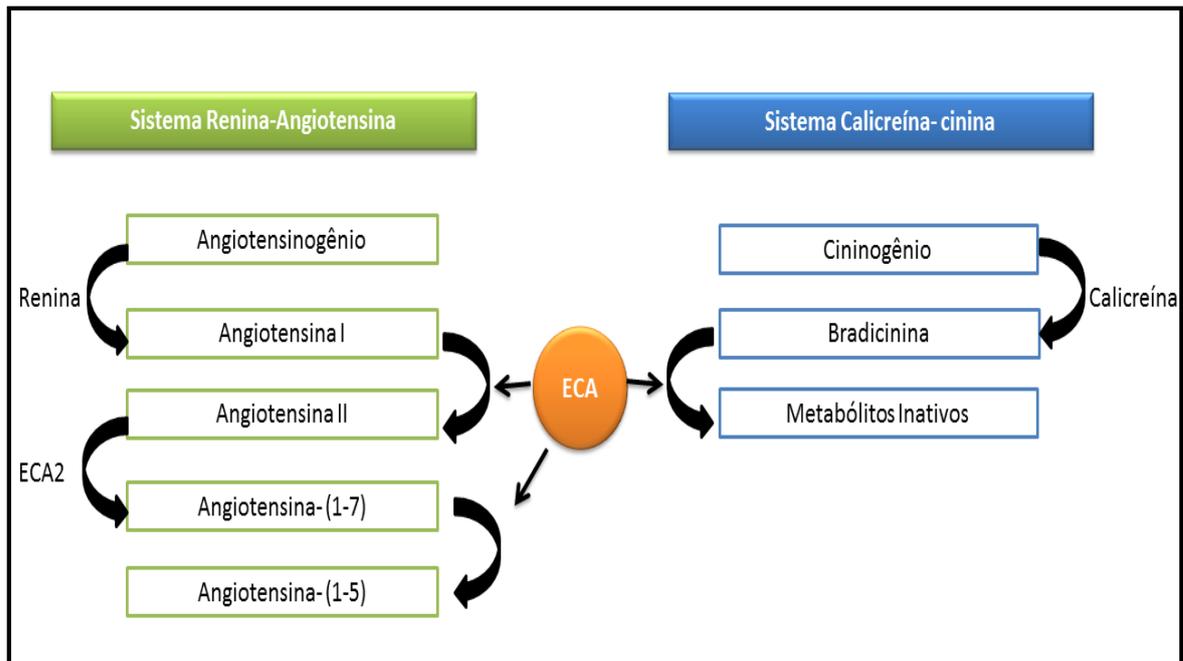


Figura 3: Papel da enzima conversora de angiotensina (ECA) no sistema renina-angiotensina e caliceína-cinina. Adaptado: CAMARGO, 2012.

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 (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 convertem a angiotensina I (Ang I), em angiotensina II (Ang II), um potente vasoconstritor (CAMARGO et al., 2012; BERNSTEIN et al., 2013).

A importância da ECA na regulação da pressão arterial foi reconhecida a partir da década de 60, quando o grupo de Ferreira isolou peptídeos de *B. jararaca*, o que efetivamente melhorou a atividade sobre o músculo liso, em parte através da inibição da degradação da bradicinina (FERREIRA e ROCHA e SILVA, 1965; FERREIRA et al, 1970) Independentemente, David Cushman e Miguel Ondetti se interessaram na pesquisa dos peptídeos inibidores da ECA a partir do veneno da *B. jararaca* (CUSHMAN et al., 1982; CAMARGO, 2012). Esses pesquisadores isolaram alguns peptídeos que inibiram ECA, uma dipeptidil- carboxipeptidase dependente de zinco, que era então conhecido como uma relevante enzima inibidora da bradicinina (CUSHMAN e ONDETTI, 1999). Entre os peptídeos isolados de *B. jararaca*, a mais eficaz para ações de inibição da ECA e, conseqüentemente, anti-hipertensiva foi a Teprotida (Bj-PRO-9a) (FERREIRA et al, 1970). O único inconveniente foi

que ela era inativada após a administração oral. Assim, um modelo de sítio ativo foi desenvolvido para sintetizar análogos desses peptídeos.

Estudos de estrutura-atividade dos inibidores da ECA mostraram que a sequência de aminoácido C-terminal mais favorável era Phe-Ala-Pro. Estes aminoácidos, possivelmente interagem com bolsas no sítio ativo da enzima (figura 6). O inibidor primeiramente desenhado, com base na forma de carboxipeptidase A, foi o ácido benzilsuccínico. Curiosamente, substituição do grupo carboxila por um sulfidrila resultou num aumento de 1.000 vezes na atividade inibitória de ECA. Finalmente, a molécula resultante de todas estas estratégias foi captopril (figura 4), uma droga anti-hipertensiva que é um dos inibidores de ECA mais potentes (CUSHMAN; ONDETTI, 1999). Atualmente, existem no mercado diversos fármacos inibidores da enzima conversora de angiotensina (IECAs), sendo utilizado em vários países, todos com mesmo mecanismo de ação (RIBEIRO e MUSCARÁ, 2001). Desde a descoberta do captopril, a primeira droga com base em proteína do veneno de cobra, as toxinas do veneno de serpentes se tornaram uma fonte natural valiosa de moléculas bioativas.

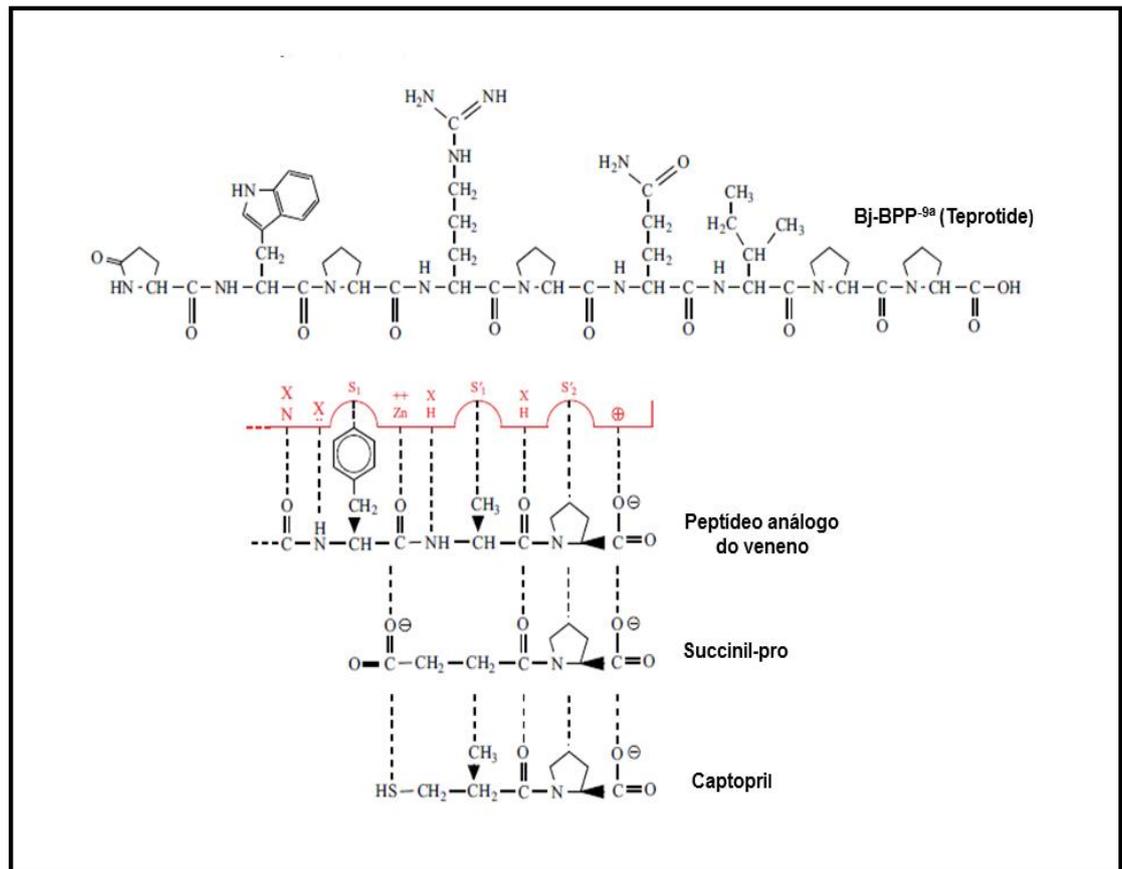


Figura 4 Proposta de ligação ao sítio ativa local da enzima conversora de angiotensina (ECA), por um análogo de peptídeo de veneno com a sequência C-terminal Phe-Ala-Pro, pela succinil-Pro, e, finalmente, pelo captopril. Adaptado: CAMPOLINA REBELLO HORTA, Carolina et al., 2016.

Recentemente, pesquisadores isolaram do veneno de CDC um novo peptídeo potencializador de bradicinina (BPP), 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 cobra. Os dados sugerem uma diminuição de produção da angiotensina II com resultados muito semelhantes ao apresentado pelo captopril (LOPES et al., 2014).

Além da importância dos sistemas renina-angiotensina e caliceína-cinina nos efeitos cardiovasculares de toxinas e/ou venenos de serpentes, dados prévios do nosso grupo de pesquisa, demonstraram a participação do NO/GMPc/PKC no efeito vasodilatador induzido por CDC em artéria mesentérica isolado de rato (SANTOS, 2017), sendo dessa forma, uma interessante via de investigação do mecanismo de ação dos efeitos subjacentes de CDC no tecido cardíaco.

O NO é um radical difusível e lipofílico que medeia diversas funções de sinalização intra e extracelular (DUDZINSKI, 2006). As enzimas sintetizadoras de óxido nítrico (nitric oxide synthases – NOS) convertem o aminoácido L-arginina em L-citrulina com consequente produção de óxido nítrico (TATCHUM-TALOM et al., 2000; GREEN et al., 2004).

Existem três isoformas da NOS: a neuronal (nNOS ou NOS1), a endotelial (eNOS ou NOS3) e a induzível (iNOS ou NOS2). As isoformas endotelial e neuronal são consideradas constitutivas, por serem expressas em condições basais nos tecidos. A atividade enzimática destas duas isoformas é dependente de cálcio/calmodulina ($\text{Ca}^{+2}/\text{CaM}$) e, portanto, controlada pelas variações da concentração de cálcio intracelular. A isoforma induzível de NOS é assim chamada por ser expressa quando as células são estimuladas por fatores específicos, como certas citocinas. Diferente de eNOS e nNOS, a iNOS é independente, ou ao menos, pouco dependente das concentrações de cálcio intracelular, sendo a sua atividade enzimática controlada principalmente pela expressão da enzima (TATCHUM-TALOM et al., 2000). Alguns autores sugerem a existência de uma quarta isoforma de NOS, exclusivamente presente nas mitocôndrias, denominada de isoforma mitocondrial (mtNOS) (GHAFOURIFAR e RICHTER, 1997; LACZA et al., 2003).

Em sua estrutura, as enzimas NOS apresentam um domínio C-terminal transportador de elétrons denominado domínio redutor, um domínio ligante da calmodulina e um domínio oxidante que forma o sítio catalítico da molécula (FÖRSTERMANN, 2000). No domínio redutor, encontram-se os sítios de ligação para o co-substrato fosfato de nicotinamida-adeninadínucleotídeo (NADPH) e para os cofatores flavina-adenina dinucleotídeo (FAD) e flavina mononucleotídeo (FMN). No domínio oxidante, encontram-se os sítios de ligação para os cofatores ferroprotoporfirina IV (Heme), tetraidrobiopterina (H4B), para o co-substrato O_2 e para o substrato L-arginina (STUEHR e GHOSH, 2000) (Figura 5).

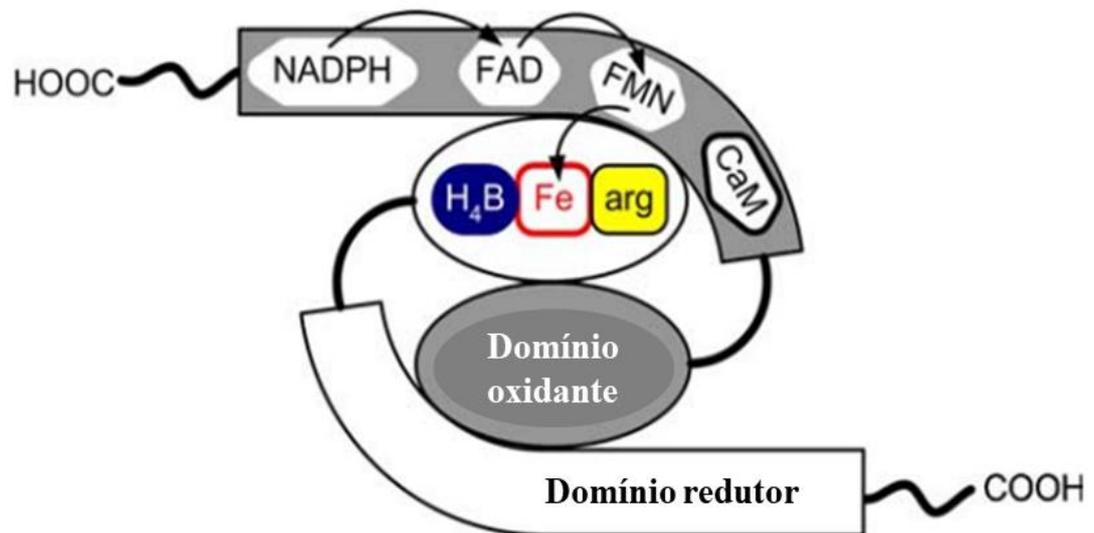


Figura 5: Proposta de ligação ao sítio ativa local da enzima conversora de angiotensina (ECA), por um análogo de peptídeo de veneno com a sequência C-terminal Phe-Ala-Pro, pela succinil-Pro, e, finalmente, pelo captopril.

Entre os domínios redutor e oxidante, encontra-se o domínio de ligação da calmodulina. Próximo à porção de ligação da FMN, existe uma sequência (alça) de auto inibição que controla a ligação da calmodulina. Durante a síntese de NO as flavinas adquirem elétrons do NADPH e transferem estes para o ferro do grupamento heme, permitindo a ligação do oxigênio e catalisando a produção do NO a partir da L-arginina (STUEHR, 1997).

Em suma, a síntese de NO pela família da NOS pode ser descrita da seguinte forma: A L-arginina é inicialmente hidroxilada ao intermediário L-N-hidroxiarginina, em seguida ocorre a oxidação da L-N-hidroxi-arginina formando L-citrulina com geração concomitante de óxido nítrico, como ilustrado na figura 6.

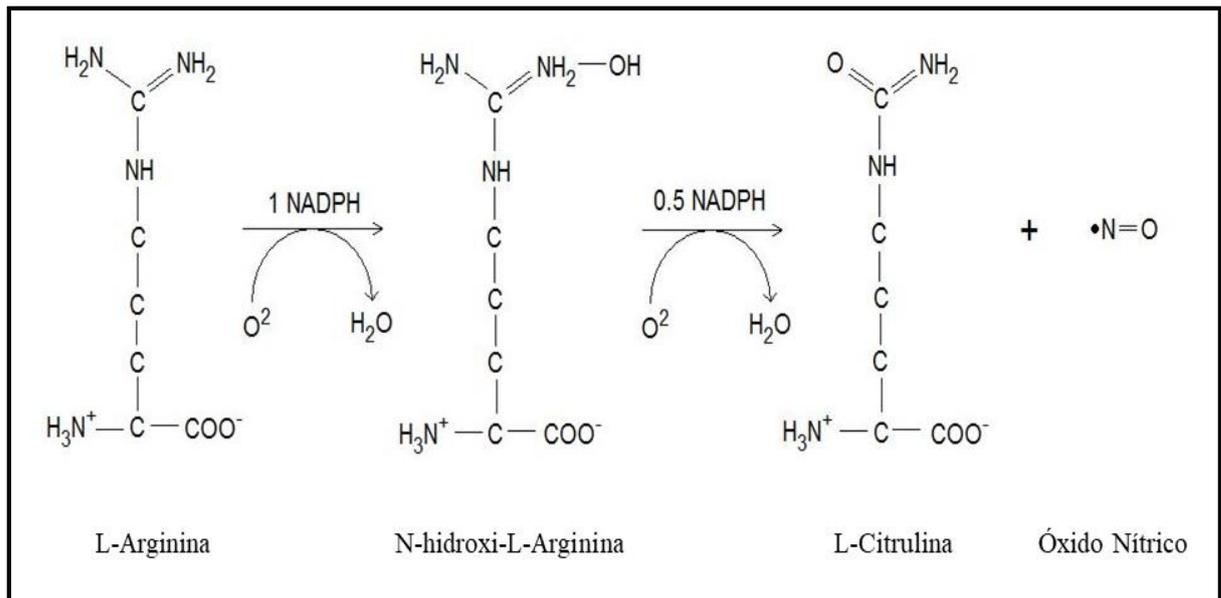


Figura 6: Representação da reação de síntese de NO à partir da L-arginina. Inicialmente, ocorre a hidroxilação da L-arginina a N-hidroxi-L-arginina, seguida de oxidação da N-hidroxi-L-arginina formando L-citrulina e NO. Os co-substratos NADPH e O₂ também estão representados na figura. ADAPATADO de STUEHR, 2004.

Assim como ocorre na célula muscular lisa, o NO tem papel importante no tecido cardíaco. O NO tem como alvo no cardiomiócito a enzima guanilato ciclase solúvel (GCs) que, uma vez ativada, catalisa a conversão de GTP em GMPc, e consequentemente ativa a PKG. A PKG pode inibir o influxo de cálcio, que ocorre através dos canais de cálcio voltagem-dependentes presentes na membrana celular (HARTZELL e FISCHMEISTER, 1986; MERY et al., 1991) e pode diminuir a sensibilidade dos miofilamentos ao cálcio (SHAH et al., 1994; YASUDA e LEW, 1997), provavelmente através da fosforilação da troponina I (TnI) (LAYLAND et al., 2005).

É sugerido também uma possível interação da via NO/GMPc e das vias de ativação do AMPc, durante a estimulação β-adrenérgica, com o GMPc atuando sobre as fosfodiesterases presentes no coração (BALLIGAND et al., 2007). Balligand e colaboradores, sugerem que baixas doses de NO poderiam ativar a GMPc, que por sua vez inibe a fosfodiesterase III e, dessa forma, poderia potencializar a ação do AMPc, especialmente sobre o transporte de cálcio através dos canais de cálcio voltagem dependentes. No entanto, altas concentrações de NO estimulariam a fosfodiesterase II, reconhecida como a fosfodiesterase dependente de GMPc, reduzindo dessa forma, a quantidade de AMPc e determinando a atenuação dos efeitos da estimulação β-adrenérgica.

Adicionalmente, Hu e colaboradores (1997) demonstraram que o NO pode atuar de forma direta diminuindo a corrente de cálcio através dos canais de cálcio voltagem-dependente da membrana. Outro efeito mediado pelo NO, independentes de GMPc, ocorre sobre a respiração celular. Como demonstrado por Kelm e colaboradores (1997), a depressão na geração de energia pelas mitocôndrias estava associada à inibição da contratilidade cardíaca induzida pelo NO.

O peroxinitrito, derivado da reação entre o NO e o superóxido, pode causar danos celulares por induzir: lesão direta sobre o DNA (BURNEY et al., 1999), peroxidação de lipídeos (RUBBO et al., 1994), disfunção mitocondrial (CASSINA e RADI, 1996; CASSINA et al., 2000), além de promover estresse oxidativo, tendo como alvo diversas proteínas dentro da célula cardíaca (FUKUTO et al., 2000; WINK et al., 2000), e induzindo uma redução da contração cardíaca.

Os efeitos diretos e indiretos do NO no cardiomiócito estão sumarizados na figura 7. A figura é uma representação esquemática dos efeitos do NO sobre seus principais alvos dentro da célula muscular cardíaca.

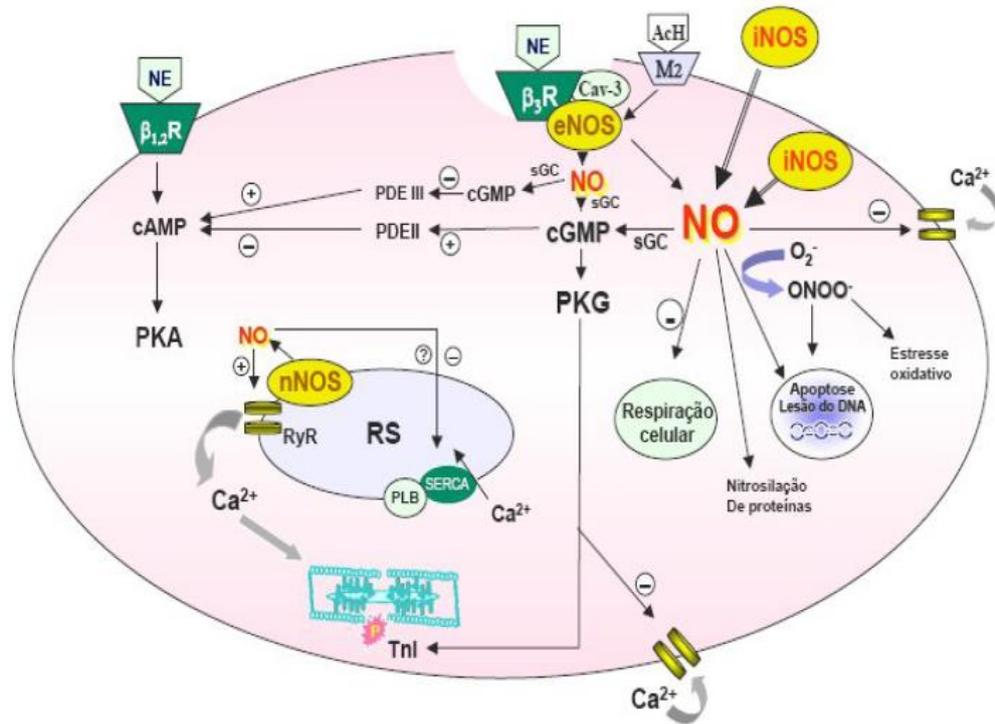


Figura 7: Representação esquemática do mecanismo de ação do Óxido Nítrico na célula muscular cardíaca. As abreviações usadas foram : NE, norepinefrina; $\beta_{1,2}R$, receptores β -adrenérgicos do subtipos 1 e 2; AcH, acetilcolina; M2, receptor muscarínico do tipo 2; Cav-3 caveolina-3; eNOS, óxido nítrico sintase endotelial; iNOS, óxido nítrico sintase induzível; nNOS, óxido nítrico sintase neuronal; NO, óxido nítrico; sGC, guanilato ciclase solúvel; PDE, fosfodiesterases; cAMP, monofosfato cíclico de adenosina; cGMP monofosfato cíclico de guanosina; PKA, proteína quinase A; PKG, proteína quinase dependente de cGMP; RS, retículo sarcoplasmático; PLB, fosfolambano; SERCA, bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático; TnI, troponina I; RyR, canais rionidínicos; O_2^- , superóxido; ONOO⁻, peroxinitrito. Os canais de cálcio de membrana do tipo L estão representados em amarelo. Os símbolos + e - indicam estímulo e inibição de função, respectivamente. Reproduzido de DIAS FA., 2007.

As investigações dos efeitos cardiovasculares de toxinas e/ou venenos e suas possíveis vias se tornam mais relevantes quando associadas aos altos índices de doenças cardiovasculares na população mundial e nacional.

As doenças cardiovasculares constituem-se em um dos mais importantes problemas de saúde da atualidade, tanto em países desenvolvidos quanto em países emergentes. A mortalidade por doença cardiovascular (DCV) aumenta progressivamente com a elevação da pressão arterial (PA) a partir de 115/75 mmHg de forma linear, contínua e independente (SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO, 2016).

Anualmente mais pessoas morrem de DCV do que de qualquer outra causa de morte. Estima-se que 17,3 milhões de pessoas morreram de doenças cardiovasculares em 2008, representando 30% de todas as mortes globais (WHO, 2011). Estima-se, para o ano de 2020,

que 24.800.000 pessoas morrerão por estas causas, das quais 45% por doenças isquêmicas do coração e 31% por doenças cerebrovasculares (DE OLIVEIRA et al., 2003).

No Brasil as DCVs também têm sido a principal causa de morte no Brasil. Entre os anos de 1996 e 2007, a mortalidade por doença cardíaca isquêmica e cerebrovascular diminuiu 26% e 32%, respectivamente. No entanto, a mortalidade por doença cardíaca hipertensiva cresceu 11%, fazendo aumentar para 13% o total de mortes atribuíveis a doenças cardiovasculares em 2007 (SCHMIDT et al., 2011).

Vista a alta incidência de doenças cardiovasculares em todo mundo e suas dificuldades no controle, faz-se necessária a busca de novas alternativas medicamentosas para o tratamento destas enfermidades. Aliado a este fato, substâncias originadas de produtos naturais têm sido uma importante fonte para a obtenção de novos fármacos.

O estudo dos venenos de serpentes apresenta, portanto, uma importância quanto à investigação dos mecanismos fisiopatológicos que desencadeiam os sinais e sintomas observados na clínica, mas também existe um claro potencial biotecnológico na bioprospecção de novas moléculas a partir de venenos de serpentes (CALVETE, 2013).

Dados prévios em nosso laboratório demonstraram ação vascular do veneno CDC e efeito inotrópico negativo, sem alteração significativa no cronotropismo cardíaco de ratos normotensos. Adicionalmente, pode-se ressaltar que poucos estudos foram desenvolvidos com produtos de origem animal quando comparados aos outros produtos de origem natural. Logo, o desenvolvimento deste estudo poderá subsidiar um grande avanço na descoberta de novos fármacos de origem animal para o tratamento de enfermidades do afetam o sistema cardiovascular, bem como poderá auxiliar na caracterização dos mecanismos celulares cardíacos envolvidos nos acidentes ofídicos ocasionados por estas espécies de serpentes.

Dessa forma, o objetivo desse estudo é investigar as influências do veneno CDC sobre a atividade cardíaca de ratos e seus possíveis mecanismos de ação envolvidos.

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Investigar as influências do veneno CDC sobre a atividade cardíaca de ratos e seus possíveis mecanismos de ação envolvidos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito de CDC sobre o cronotropismo e inotropismo cardíaco utilizando átrio isolado de ratos saudáveis;
- Avaliar as influências de CDC sobre a contratilidade de cardiomiócitos isolados;
- Avaliar citotoxicidade de CDC em células cardíacas;
- Avaliar a cardiotoxicidade do veneno CDC através da determinação da atividade de CK e CK-MB;
- Avaliar os efeitos morfológicos do veneno CDC sobre tecido atrial de rato;
- Avaliar os efeitos de CDC sobre a ultraestrutura celular cardíaca;
- Investigar o mecanismo de ação do veneno CDC em átrios isolados de rato;
- Avaliar o efeito de CDC sobre a atividade elétrica cardíaca em estudos com coração isolado de ratos;
- Investigar as influências hemodinâmicas dos venenos de CDC utilizando técnica para medida direta da pressão arterial (PA) e frequência Cardíaca (FC) em ratos;
- Investigar as influências de CDC sobre a atividade elétrica cardíaca de ratos anestesiados;
- Avaliar o efeito de CDC sobre o cronotropismo e inotropismo cardíaco utilizando átrio isolado de ratos não saudáveis;
- Avaliar o perfil do veneno CDC.

Material e Métodos

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO E PREPARAÇÃO DO VENENO BRUTO DA SERPENTE

CROTALUS DURISSUS CASCAVELLA

As amostras do veneno foram extraídas por pressão manual das glândulas de espécimes da CDC provenientes de Ibiquera (BA), mantidos no serpentário do Núcleo Regional de Ofiologia e Animais Peçonhentos da Bahia (NOAP-UFBA). O NOAP é um criadouro científico com autorização para manutenção e extração de animais peçonhentos (licença do IBAMA n° 016/2002). Após a extração, as amostras foram secas à vácuo e imediatamente armazenadas a uma temperatura de -20°C até o uso; toda extração do veneno já foi realizada. O veneno bruto da CDC foi extraído e cedido pela professora Doutora Luciana Lyra Casais para realização dos estudos da atividade farmacológica.

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

3.2 ANIMAIS

Foram utilizados para todos os experimentos, até então realizados, ratos normotensos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*) e ratos espontaneamente hipertensos (SHR), pesando entre 250-300 gramas, com idade entre 12-16 semanas. Os animais foram provenientes do Biotério do Laboratório de Neurociências do Instituto de Ciências da Saúde da UFBA. Estes animais foram mantidos em condições controladas de temperatura ($24 \pm 1^\circ \text{C}$) 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 n° 072/2014).

3.3 SOLUÇÕES FISIOLÓGICAS

Para a preparação das soluções fisiológicas foram utilizados os seguintes sais: cloreto de sódio (NaCl) (VETEC), cloreto de potássio (KCl) (VETEC), cloreto de cálcio di-hidratado

(CaCl₂.2H₂O) (VETEC), sulfato de magnésio heptahidratado (MgSO₄.7H₂O) (VETEC), cloreto de magnésio hexa-hidratado (MgCl₂.6H₂O) (VETEC), glicose (C₆H₁₂O₆) (VETEC), bicarbonato de sódio (NaHCO₃) (VETEC), fosfato de sódio mono-hidratado (NaH₂PO₄.H₂O) (VETEC) e fosfato de potássio (KH₂PO₄) (VETEC), HEPES (USB corporation), EGTA (Sigma).

A) Solução fisiológica para átrios isolados e Langendorff

Tabela 3: 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

B) Solução fisiológica para células isoladas- Tyrode.

Tabela 4: Composição da solução de Tyrode (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

3.4 ISOLAMENTO DE ÁTRIOS DE RATOS

Após eutanásia dos animais em câmara de CO₂, o coração foi imediatamente removido, e os átrios foram isolados, de acordo com a técnica descrita por NASA et al., 1992, para ensaios em banho de órgãos em átrios isolados. Os átrios esquerdos e direitos 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 °C e aerado com uma mistura carbogênica (95% O₂ e 5% CO₂). 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 o estimulador AVS (AVS, Brasil), com pulsos quadrados de 3 Hz, duração de 3ms 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 pelas drogas. A força de contração atrial foi avaliada no átrio esquerdo e determinada o efeito inotrópico induzido pelas mesmas drogas.

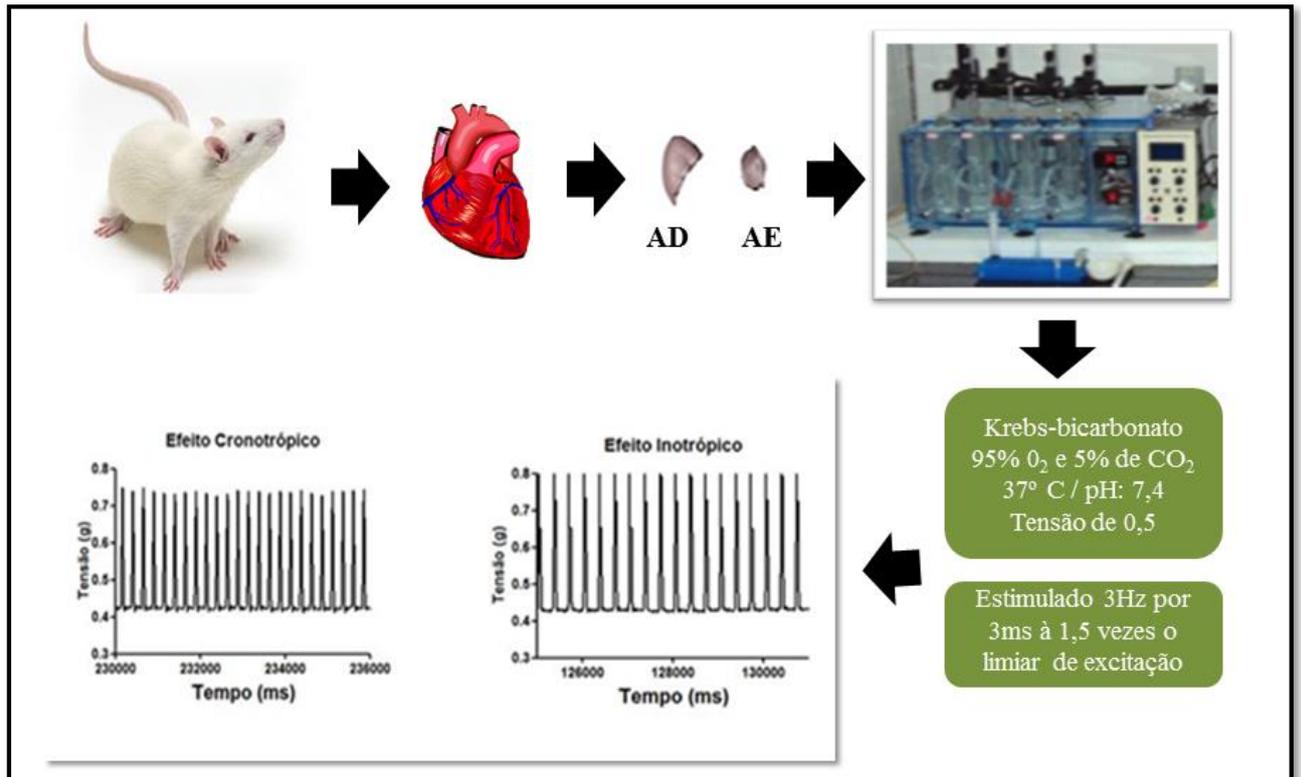


Figura 8: Representação esquemática do protocolo de isolamento de átrios dos ratos.

3.5 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS UTILIZANDO ÁTRIOS ISOLADOS DE RATOS

3.5.1 Avaliação dos efeitos cronotrópicos e inotrópicos induzidos pelo veneno CDC

Após um período de 45 minutos de estabilização das preparações, 6 concentrações crescentes dos venenos CDC (0,1 $\mu\text{g/ml}$, 0,3 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$, 3 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$ e 30 $\mu\text{g/ml}$), foram adicionadas cumulativamente nos átrios direito e esquerdo de ratos. Os efeitos inotrópicos e cronotrópicos dos venenos foram avaliados na ausência de qualquer outro tipo de substância. Após a obtenção das representações gráficas do cronotropismo e inotropismo cardíaco na presença dos venenos, foram analisados 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.

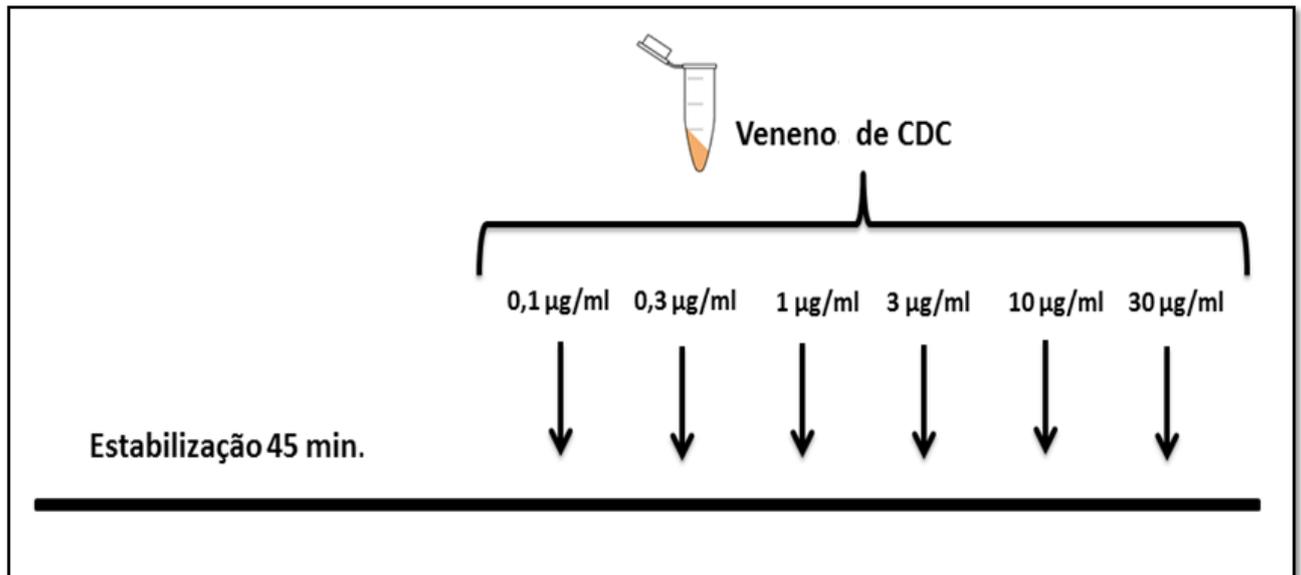


Figura 9: Representação esquemática do protocolo para avaliação dos efeitos cronotrópicos e inotrópicos induzidos pelo veneno CDC.

3.6 ISOLAMENTO DOS CARDIOMIÓCITOS DE RATOS

Após eutanásia, o coração foi imediatamente removido e colocado em solução de C.I.B. (livre de cálcio) contendo EGTA 0,4 mM para a canulação da artéria aorta, de acordo com a técnica descrita por Shioya (2007). Após a canulação o coração foi perfundido na mesma solução para retirar excesso de sangue. Em seguida, o coração foi perfundido com uma solução contendo 1mg/mL de colagenase tipo II, tripsina 0,07 mg/mL e protease 0,07 mg/mL e 0,3 mM de cálcio durante 5 minutos para dissociação enzimática das células do coração.

Após a perfusão, o ventrículo esquerdo foi separado, fragmentado e colocado em uma solução contendo 1mg/mL de colagenase tipo II, tripsina 0,07 mg/mL e protease 0,07 mg/mL e 0,7 mM de cálcio durante 5 minutos banho-maria. Após esse procedimento, com uma seringa de plástico foi realizada a dissociação mecânica no intuito de dissolver o tecido ventricular na solução de modo que não houvesse tecido existente. Essa preparação foi centrifugada a 1000 rpm durante 18-20 segundos, o sobrenadante desprezado e adicionado uma solução contendo 2 mg/mL de albumina e 1,2 mM de cálcio durante 5 minutos em banho-maria. Após esse período, a preparação foi novamente centrifugada a 1000 rpm durante 18-20 segundos, o sobrenadante foi desprezado e foi adicionado 8 mL de solução de Tyrode.

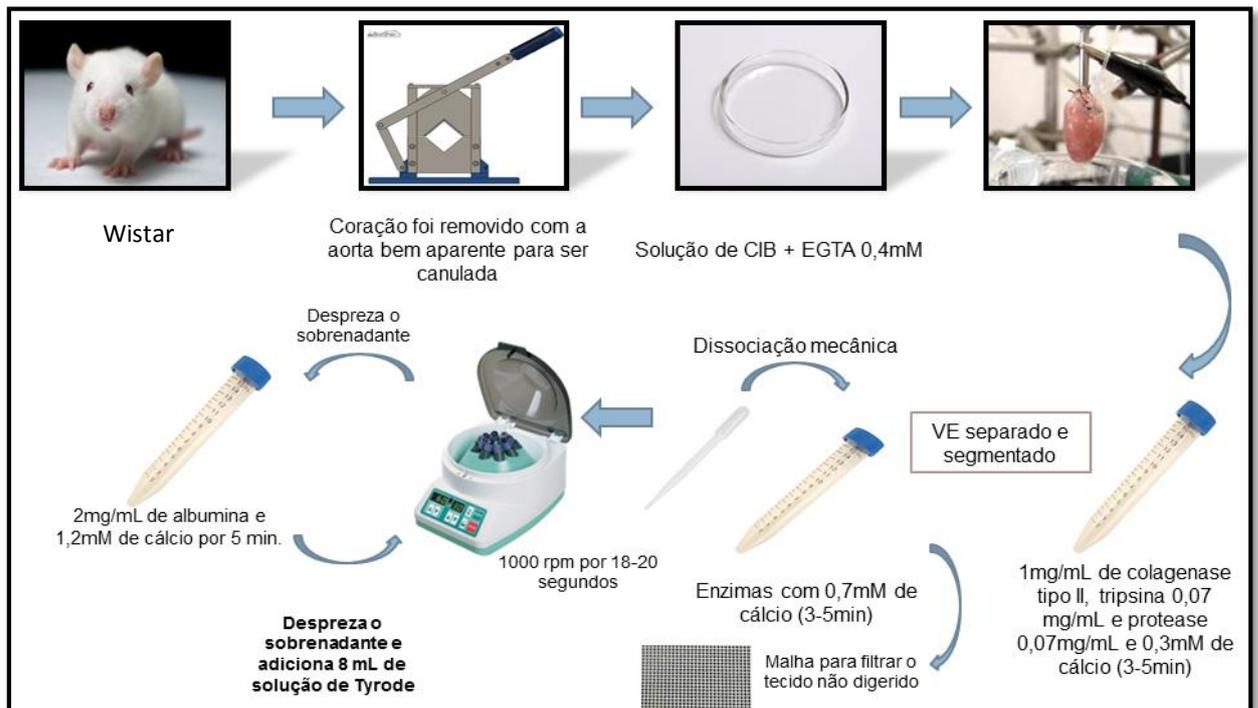


Figura 10: Representação esquemática do protocolo de isolamento de cardiomiócitos dos ratos.

3.7 MEDIDA DE CONTRATILIDADE EM CARDIOMIÓCITOS

A contração celular foi medida por meio da técnica de alteração de comprimento do cardiomiócito, usando-se um sistema de detecção de bordas, montado em um microscópio invertido (Ionoptix, EUA). Os cardiomiócitos foram acomodados em uma câmara experimental com a base de vidro e banhados por solução de Tyrode. Os cardiomiócitos foram visualizados em um monitor por meio de uma câmera (Myocam, Ionoptix, 240hz) acoplada a um microscópio utilizando um programa de detecção de imagens (Ionwizard, Ionoptix). Os cardiomiócitos foram estimulados na frequência de 1hz (10V de 5 Min) utilizando-se um par de eletrodos de aço e um estimulador elétrico de campo (Myopacer, Ionoptir). Os movimentos longitudinais dos cardiomiócitos foram capturados pelo sistema de detecção de bordas e armazenados para análise posterior. Foram utilizados para as medidas de contração somente os cardiomiócitos que estavam em boas condições, com as bordas e as estriações sarcoméricas bem definidas, relaxados em repouso e sem apresentar contrações voluntárias.

A)



B)

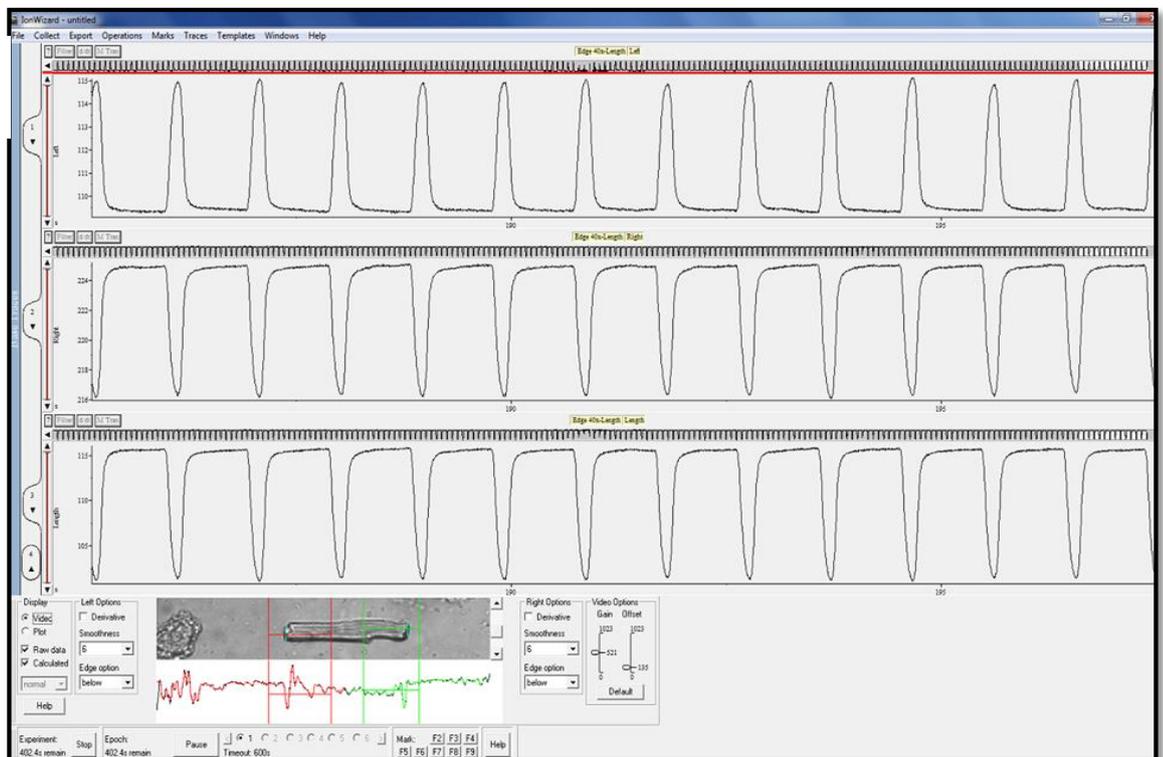


Figura 11: A) aparato utilizado para experimentos de contratilidade em cardiomiócitos. B) imagem do cardiomiócito isolado e a representação da contração das suas bordas direita e esquerda e a contração referente à célula inteira.

3.8 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS UTILIZANDO CARDIOMIÓCITOS VENTRICULARES ISOLADOS DE RATOS

3.8.1 Avaliação do efeito de CDC sobre a contratilidade de cardiomiócitos ventriculares isolados de ratos

Após o isolamento das células provenientes de ventrículos esquerdos dos animais em estudo, estas foram incubadas com CDC em três diferentes concentrações (0,1 µg/ml, 1 µg/ml e 10 µg/ml) e foram observados os efeitos do veneno na contração celular.

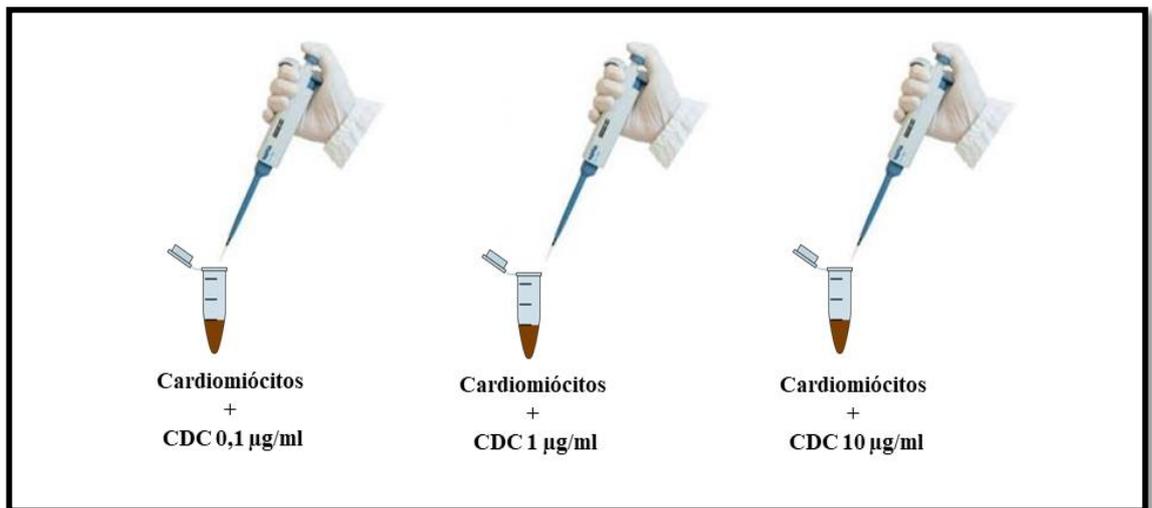


Figura 12: Representação esquemática da incubação de CDC para avaliação do seu efeito sobre a contratilidade de cardiomiócitos ventriculares isolados de ratos.

3.9 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE CDC EM CÉLULAS DE MAMÍFEROS

Cardiomiócitos de rato da linhagem H9c2 foram utilizados para avaliar a citotoxicidade do composto em células de mamífero. As células foram incubadas em placa de 96 poços (5×10^3) em meio Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Life Technologies, GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD), suplementado com 10% de soro bovino fetal (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) e 50 $\mu\text{g/mL}$ de gentamicina (Novafarma, Anápolis, GO, Brasil) e mantidos por 24 h na estufa a 37°C e 5% de CO_2 . Os extratos foram testados em diferentes concentrações (0,37-30 $\mu\text{g/ml}$), em triplicatas, incubados por 72 horas. Em seguida, a citotoxicidade em cardiomiócitos foi avaliada pelo método do AlamarBlue (MEIRa et al., 2015). Como controle positivo foi utilizado a violeta de genciana (Synth, São Paulo, SP, Brasil) nas mesmas concentrações.

3.10 DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE CREATINA CINASE TOTAL E ISOFORMA MB (CK-TOTAL E CK-MB) EM SOLUÇÃO DE KREBS

Nos experimentos atriais de investigação de efeito inotrópico e cronotrópico, uma alíquota de 1 ml de Krebs foi obtida no momento zero (basal, antes da adição do veneno no banho) e no final do experimento (após adição cumulativa dos venenos) para a quantificação da atividade de creatina cinase total (CK-Total) e a isoforma MB (CK-MB) em átrio tratado com CDC 30 $\mu\text{g/ml}$, Isoproterenol (1 μM) e veículo. O método utilizado para dosagem da CK foi o cinético ultravioleta (UV) feita pelo autoanalisador. O ensaio de CK é utilizado para a quantificação de CK em soro de humanos *in vitro*, utilizando kits VIDA Biotecnologia ®. O método baseia-se no princípio de que a CK, presente na amostra, catalisa a transferência de um grupo fosfato de alta energia a partir da creatina fosfato para o ADP. O ATP é produzido nesta reação é subsequentemente, utilizado para fosforilar a glicose produzindo glicose-6-fosfato (G-6-P) na presença da hexoquinase. A G-6-P é, então, oxidada pela glicose-6-fosfato desidrogenase (G-6-PDH) com redução concomitante de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) para nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida (NADH), que é proporcional a atividade de CK na amostra.

3.11 AVALIAÇÃO DAS INFLUÊNCIAS DE CDC NA MORFOLOGIA CARDÍACA

Após os átrios direito e esquerdo dos corações serem isolados e testados para diferentes protocolos, tais amostras foram fixadas em solução de 4% de formaldeído tamponada em fosfato de sódio 0,1M, pH 7,4 por 48 horas. Em seguida as amostras foram lavadas em água corrente por uma hora e submetidas à desidratação em um gradiente crescente de concentrações de etanol diluído em água destilada até chegar-se ao etanol absoluto. A seguir, os espécimes foram diafanizados em xilol, infiltrados e incluídos em parafina. Os espécimes incluídos em parafina foram trimados e cortados de forma a obter secções seriadas de 5 µm por um micrótomo (RM2125RT, Leica®, Alemanha), montados em lâminas de vidro e corados pelo método da hematoxilina-eosina (HE).

O estudo morfológico descritivo das secções coradas por HE compreendeu a avaliação das regiões contendo o miocárdio atrial direito ou esquerdo. Os resultados foram descritos e comparados entre os grupos estudados, em função de alterações celulares (hipereosinofilia, diminuição do volume celular, presença de fibras musculares onduladas, ausência de estriações transversais, granulação sarcoplasmática, faixas de contração, alterações nucleares e perda de continuidades entre fibras musculares) sugestivas de injúria nos miócitos.

3.11.2 *Obtenção de Imagens*

As imagens das secções histológicas foram capturadas através de um sistema formado por uma câmera digital (DP71, Olympus, Japão), acoplada a um microscópio de luz (BX-51, Olympus, Japão), processado por um *notebook* (Dell, Intel core™ i5) com auxílio do *software Analysis Get It*.

3.12 AVALIAÇÃO DA ULTRAESTRUTURA DE TECIDO CARDÍACO TRATADOS COM CDC USANDO MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

Os ensaios utilizando a Microscopia Eletrônica de Transmissão tiveram objetivo de observar alterações nas estruturas internas dos cardiomiócitos isolados de átrio esquerdo de ratos tratados com CDC.

Para isso, os átrios foram colocados em banho de órgãos contendo 10 ml de solução Krebs, e então foram adicionados CDC (30 µg/ml), Isoproterenol (10 µM), como controle positivo, ou não receberam tratamento (controle negativo). Após 10 minutos de incubação com a droga, os átrios foram fixados em glutaraldeído 2% diluído em tampão cacodilato de sódio 0,1 M por 12 h a 4°. Em seguida, os fragmentos foram lavados por três vezes em cacodilato de sódio 0,1 M e pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% por 1 h em temperatura ambiente. Logo depois, os fragmentos foram lavados por três vezes com cacodilato de sódio 0,1 M e iniciada a desidratação com banhos sucessivos, com duração de 10 min, em acetona com concentrações crescentes, 30, 50, 70, 90 até 100%. A substituição foi realizada com um banho de 12 h com a mistura de acetona e resina Polybed 812 (1:2) e em seguida um banho com resina pura por mais 12 h. Por fim, os fragmentos foram incluídos em resina Polybed em moldes de silicone, devidamente identificados, e levados para a polimerização em estufa a 60° por 72 h.

Foi realizado corte com espessura de 1 µm, em ultramicrótomo reichert Jung dos blocos obtidos e observado em microscópio de campo claro a fim de selecionar os blocos com área de interesse para observação no microscópio eletrônico.

Foram realizados cortes ultrafinos, com espessura de 60 a 70 nm, dos blocos selecionados, utilizando navalha de diamante Diatome com ângulo de 45°. Os cortes obtidos foram colocados em grades de cobre de 200 MESH e contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo. O material foi observado em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM109 e as fotos foram obtidas por meio de imagens digitais com resolução de 4,1 Mpixels acoplada a um microscópio óptico binocular convencional.



Figura 13: Microscópio Eletrônico de Transmissão Zeiss, EM 109 utilizado nas avaliações do efeito de CDC na ultraestrutura de tecido atrial de ratos. Fonte: Núcleo de Microscopia e microanálise, Universidade de Viçosa. (http://www.nmm.ufv.br/?page_id=334)

3.13 AVALIAÇÃO DO EFEITO DE CDC SOBRE A ATIVIDADE ELÉTRICA DE CORAÇÕES ISOLADOS DE RATOS.

Para avaliar se os efeitos cardíacos induzidos pelos venenos foram devido a uma possível cardiotoxicidade, foram realizados estudos para avaliar a atividade elétrica cardíaca utilizando o sistema de Langendorff, que permitiu a realização de experimentos com o coração isolado de rato perfundindo-o retrogradamente pela artéria aorta à pressão ou fluxo constante.

O equipamento de Langendorff (figura 14) inclui um sistema de registro e aquisição de sinais com um amplificador munido de um módulo de análise (ML870 PowerLab 8/35).

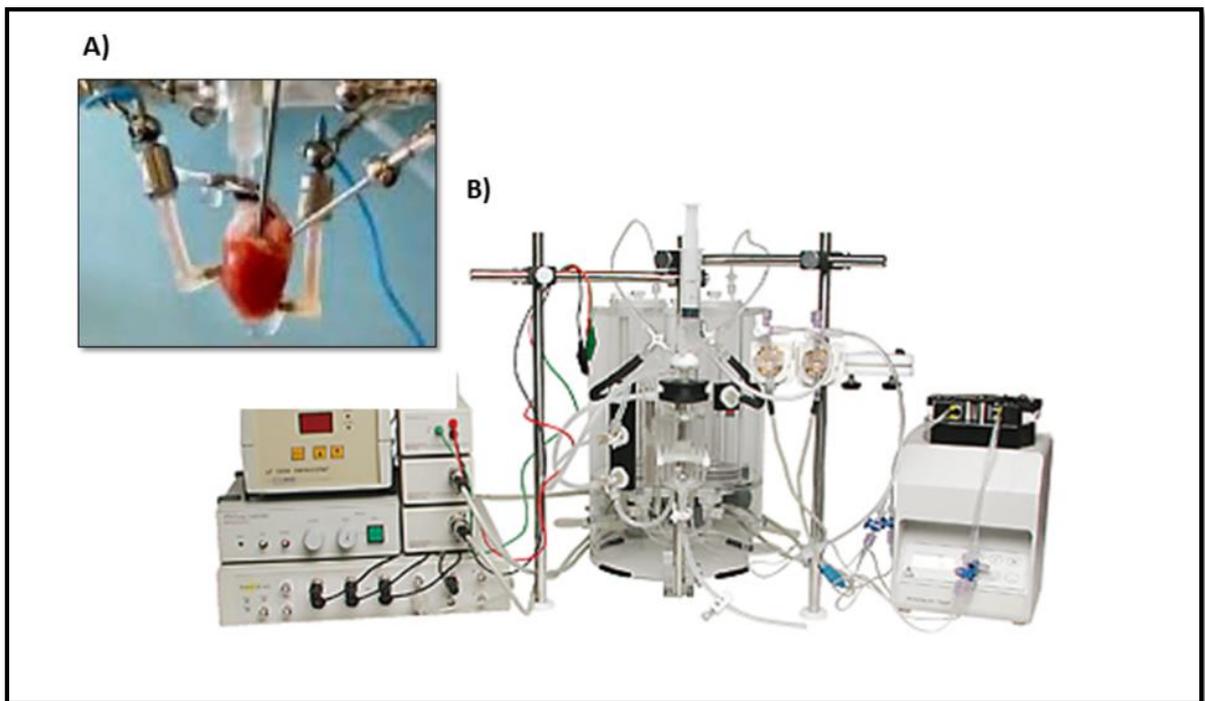


Figura 14: Aparato utilizado para os experimentos com coração isolado em Langendorff. Em A) Imagem ilustrativa do coração isolado de rato com os eletrodos para captação dos sinais elétricos fixados em seu tecido; Em B) Equipamento completo de Langendorff (Fonte: <http://www.sastra.edu/vbl/resources.html>).

Esse aparelho é constituído por um controlador de termostato (ML176), bomba peristáltica Minipuls 3 (ML172), controlador de bomba (ML175 STH), transdutor de pressão fisiológica (MLT844), eletrodos para captação dos sinais elétricos (MLA1210). O software LabChart Pro inclui os módulos de Pressão Arterial (Win), Análise de ECG e Dose Resposta para uma análise dos registros.

3.13.1 *Protocolo experimental para avaliação de atividade cardíaca em tecido isolado*

Os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂ e os corações removidos após a toracotomia. Após a remoção do coração, este foi rapidamente canulado e perfundido com solução de Krebs-Henseleit pré-aquecido à 37°C. Os eletrodos para o registro dos sinais eletrocardiográficos foram posicionados ao redor do coração na altura do átrio direito e do ventrículo esquerdo. O protocolo experimental consistiu em: período controle por 20 minutos de perfusão com solução de Krebs, 10 minutos de perfusão com solução de Krebs contendo a solução a ser avaliada e um período de retorno à perfusão com solução de Krebs por 10 minutos. Os registros eletrocardiográficos armazenados no computador foram avaliados quanto à presença de arritmias, frequência cardíaca, intervalo PR, deflexão intrínscóide, amplitude das ondas e duração do intervalo QT.

3.14 INVESTIGAÇÃO DOS MECANISMOS DE AÇÃO SUBJACENTES AO EFEITO DE CDC EM ÁTRIO ISOLADO DE RATO

3.14.1 *Avaliação dos efeitos CDC na presença de um agonista adrenérgico*

Com o objetivo de investigar se o veneno de CDC seria capaz de induzir uma reversão do aumento da força contrátil induzido por um agonista adrenérgico, o átrio isolado de rato foi tratado previamente com epinefrina (10 µM). Dessa forma, após o período de estabilização, foi adicionado o agonista adrenérgico de forma isolada às cubas experimentais, e em seguida foram adicionadas duas concentrações de CDC de forma cumulativa (10 e 30 µg/ml) e então avaliado seu efeito.

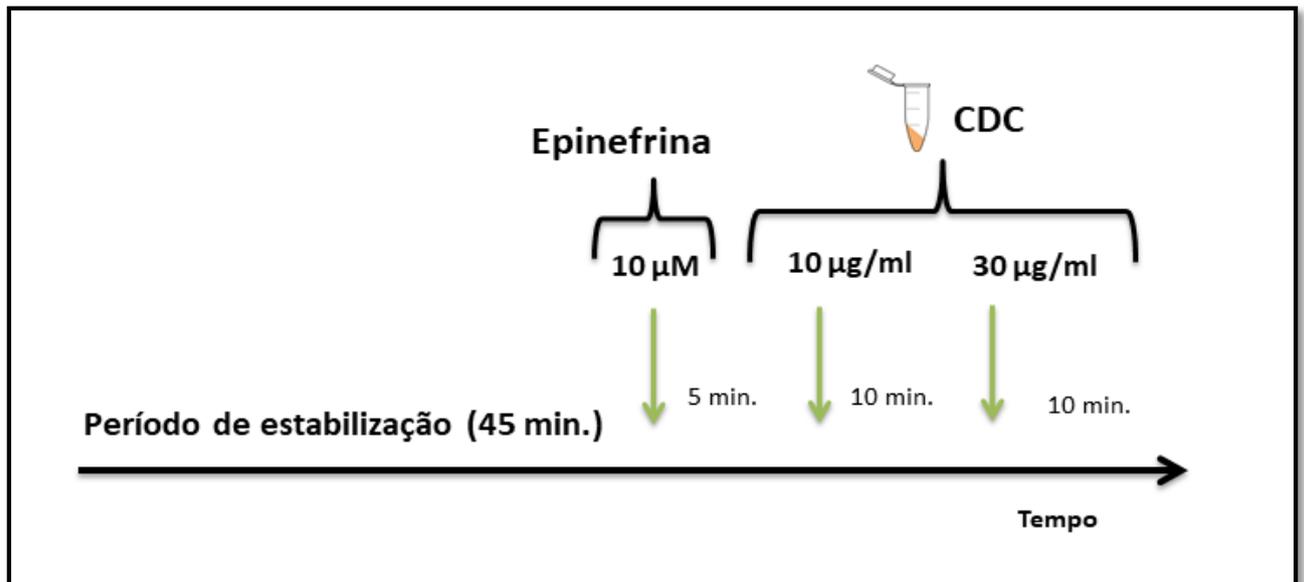


Figura 15: Representação esquemática do protocolo para avaliação dos efeitos CDC na presença do agonista adrenérgico epinefrina.

3.14.2 Avaliação da participação dos receptores adrenérgicos no efeito inotrópico negativo de CDC

Com o objetivo de investigar a participação dos receptores adrenérgicos no efeito inotrópico negativo de CDC, foram realizados experimentos em átrio isolado de ratos, na presença do antagonista não seletivo de receptores adrenérgicos, propranolol. Para isso, após o período de estabilização, o átrio esquerdo isolado de rato foi incubado com o propranolol 10 µM durante 5 minutos, seguido da adição cumulativa de CDC nas concentrações 10 e 30 µg/ml.

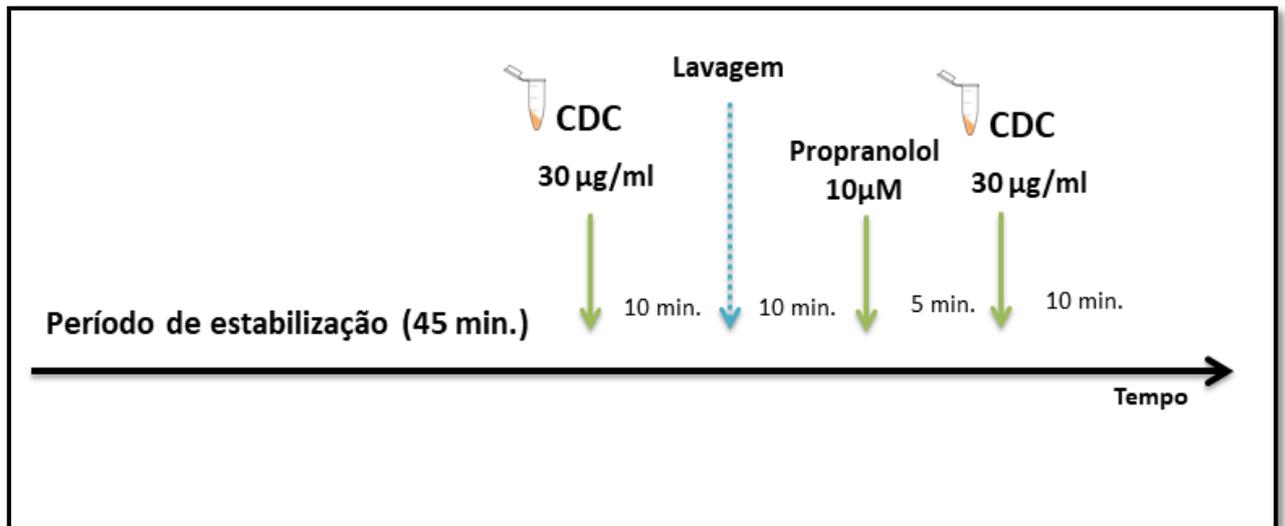


Figura 16: Representação esquemática do protocolo para avaliação da participação dos receptores adrenérgicos no efeito inotrópico negativo de CDC.

3.14.3 Avaliação da participação da via do Óxido Nítrico (NO)/ GMPc/PKG no efeito inotrópico negativo induzido por CDC

Neste protocolo buscou-se avaliar a participação da via NO/GMPc/PKG no efeito inotrópico negativo induzido pelo CDC. Para isso, utilizou-se em diferentes experimentos o L-NAME (N ω -Nitro-L-arginine methyl ester) (100 μ M) inibidor não seletivo da NOS (IIDA et al., 2001); PTIO (2-Phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl 3-oxide) (100 μ M) sequestrador de NO; ODQ (1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one) (10 μ M) inibidor específico da ciclase de guanilil solúvel (PLANE et al., 2001); KT5823 (1 μ M) inibidor seletivo de PKG. Todos os inibidores foram adicionados 5 minutos antes da adição de CDC nas cubas contendo os átrios isolados. Posteriormente, foi adicionado a uma concentração de CDC (30 μ g/ml) e as respostas obtidas na presença de cada bloqueador foram comparadas com aquela observada na ausência dos mesmos, avaliando-se dessa forma as possíveis vias de ação envolvidos na resposta induzida por CDC.

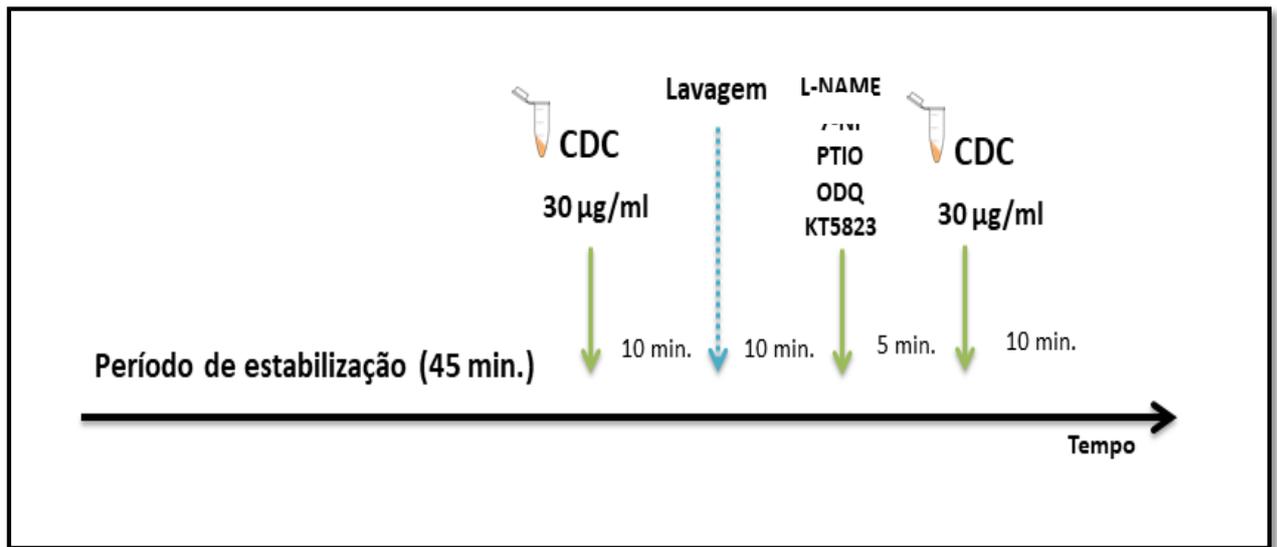


Figura 17: Representação esquemática do protocolo para avaliação da participação da via do Óxido Nítrico (NO)/GMPc/PKG no efeito inotrópico negativo induzido por CDC.

3.15 EFEITO DO VENENO CDC SOBRE A ATIVIDADE ELÉTRICA CARDÍACA *IN VIVO*

Os ratos foram anestesiados por administração intraperitoneal de 80 mg/kg de cetamina e 10 mg/kg de xilazina e foram então heparinizados (200 U). A administração de CDC (0,1, 1 e 10 µg/kg) foi realizado através de um cateter de polietileno inserido na veia femoral direita através de um pequeno procedimento cirúrgico e, após 30 minutos de estabilização, foi administrado o veículo (solução salina). Posteriormente, foram administradas três doses de CDC num intervalo de 5 minutos entre elas.

Para gravar o eletrocardiograma, os animais foram mantidos em posição supina e três eletrodos de aço inoxidável foram implantados subcutaneamente. Em seguida, os sinais ECG foram amplificados e digitalizados (Dataq DI400, DI 205, Windaq PRO Acquisition). Para cada dose de CDC, a frequência cardíaca média (FC), intervalo PR (PRi), intervalo QT (QTi), intervalo RR e duração do complexo QRS foi medido.

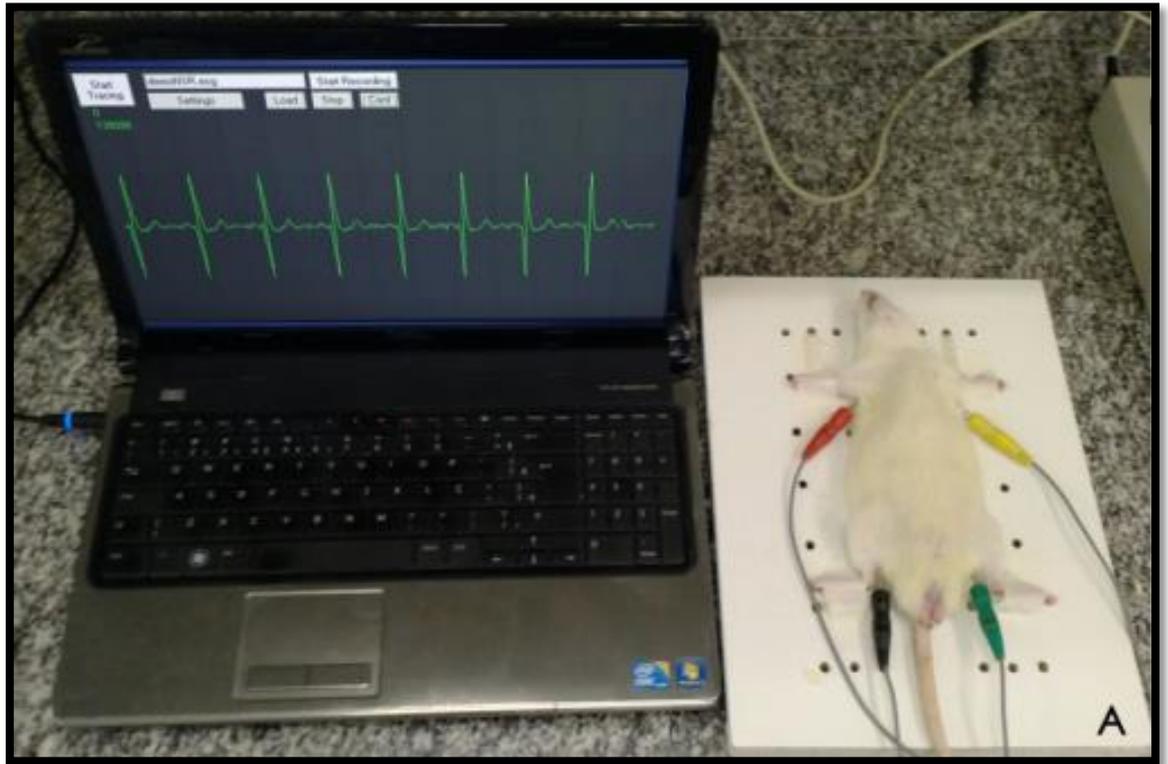


Figura 18: Sistema de obtenção do registro eletrocardiográfico. A) aparelhagem utilizada para a realização do registro (Heart Ware System); B) eletrodo com agulha devidamente acoplada; C) posicionamento adequado dos eletrodos no corpo do animal. Adaptado de Pezolato, 2014.

3.16 MEDIDA DIRETA DA PRESSÃO ARTERIAL (PA) E FREQUÊNCIA CARDÍACA (FC) EM RATOS NÃO ANESTESIADOS

Inicialmente, os animais foram anestesiados com cetamina/xilazina e cateteres de polietileno (PE), segmentos de PE-10 (diâmetro interno e externo de 0,28 e 0,61 mm, respectivamente) soldado a um segmento de PE-50 (diâmetro interno e externo de 0,58 e 0,96 mm, respectivamente) foram implantados na aorta abdominal e na veia cava inferior, via artéria e veia femoral esquerda, respectivamente (Figura 19). Após a inserção e fixação, os cateteres foram tunelizados subcutaneamente e exteriorizados através de uma incisão na região cervical posterior do animal.

Após 24 horas da cirurgia, a pressão arterial foi monitorada continuamente através do cateter arterial conectado a um transdutor de pressão arterial (World Precision Instruments), cujo sinal foi amplificado e gravado digitalmente por uma interface analógica para digital (AqDados, requerimento de aquisição de dados, Lynx Tecnologia Eletrônica Ltda, versão 7.0,

São Paulo, Brasil) e gravou (1 kHz) em um microcomputador para posterior análise. A pressão arterial média (PAM) foi calculada a partir de dados de pressão arterial sistólica e diastólica, enquanto a frequência cardíaca (FC) foi determinada pela pulsação da pressão arterial utilizando o programa AcqKnowledge, versão 3.5.7, desenvolvido por Biopac Systems, Inc., Califórnia, EUA.

Após os parâmetros cardiovasculares terem se estabilizado, a PAM e FC foram registradas antes (valores iniciais) e depois da administração intravenosa da droga teste (0,1, 0,3, 1 e 3 mg/Kg, aleatoriamente). Injeções sucessivas foram separadas por um intervalo de tempo suficiente para permitir a recuperação completa da pressão arterial, normalmente 20 min.

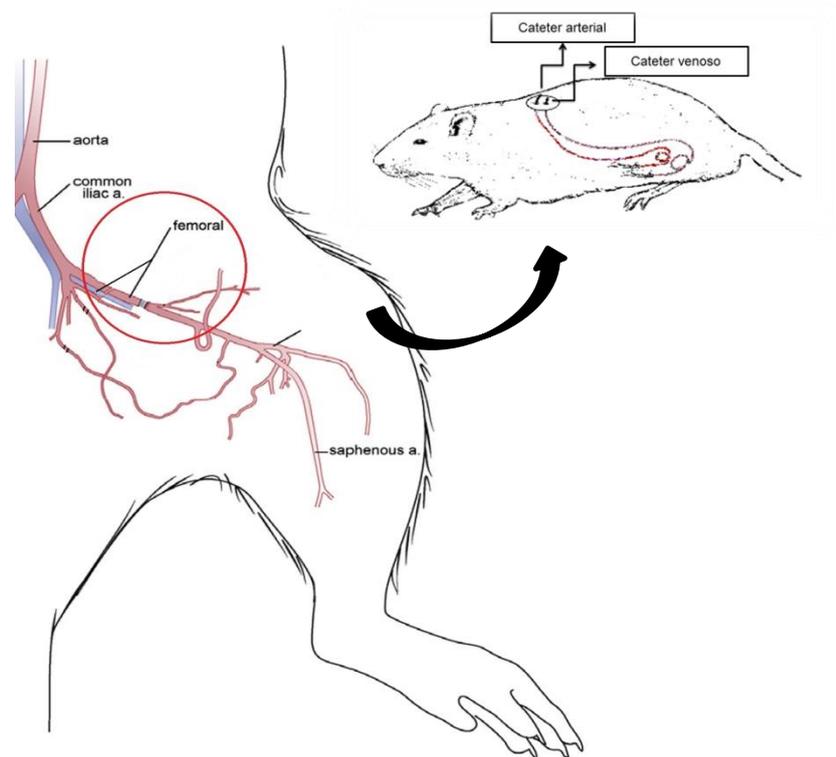


Figura 19: Desenho esquemático da implantação de cateteres de polietileno para a investigação do efeito de CDC na hemodinâmica de animais.

3.16.1 Avaliação do efeito de CDC sobre a PAM e FC de ratos não anestesiados

Para obtenção de uma curva dose-resposta, os animais foram mantidos em aclimação por um período de no mínimo 30 minutos, para estabilização dos parâmetros cardiovasculares. Em seguida, administrou-se nitroprussiato de sódio (NPS) (10 µg/kg, i.v.), um clássico doador

de óxido nítrico, para verificar a eficácia da implantação do cateter venoso. Após 15 min., doses diferentes de CDC (0,1; 0,3; 1 e 3 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, i.v.) foram administradas randomicamente com intervalos de tempo suficiente para que os parâmetros cardiovasculares retornassem aos seus valores da linha de base. Os valores de PAM e FC foram obtidos antes (valores da linha de base) e após a administração de CDC e suas variações foram expressas em porcentagem (%) dos valores em delta (Δ).

3.17 CARACTERIZAÇÃO GERAL DOS COMPONENTES PRESENTES NO VENENO CDC

3.17.1 *Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)*

As eletroforeses em gel de poliacrilamida a 15% na presença de SDS (SDS-PAGE) em um sistema desnaturante e reduzido, foram realizadas conforme a técnica descrita por Laemmli (1999).

Para o gel de separação foram utilizadas as seguintes soluções:

- Tampão de separação Tris-HCl pH 8,8;
- SDS (Dodecil sulfato de sódio) (Sigma Chem. Co) a 10%;
- Água destilada;
- Acrilamida:Bis 30,0:0,8 (Sigma Chem. Co);
- Persulfato de amônio (Sigma Chem. Co) a 10%;
- Temed (N',N',N',N'- tetrametilenodiamino) (Sigma Chem. Co).

Para o gel de empilhamento (4%) foram utilizados:

- Tampão de empilhamento Tris-HCl pH 6,8;
- SDS (Dodecil sulfato de sódio) (Sigma Chem. Co) a 10%;
- Água destilada;
- Acrilamida:Bis 30,0:0,8 (Sigma Chem. Co);
- Persulfato de amônio (Sigma Chem. Co) a 10%;
- Temed (N',N',N',N'- tetrametilenodiamino) (Sigma Chem. Co).

A amostra de veneno CDC foi diluída a uma concentração de 0,5 mg/ml e dissolvidos em tampão de amostras (β -mercaptoetanol (Sigma Chem. Co); SDS (Dodecil sulfato de sódio) (Sigma Chem. Co) 10%; Tampão de empilhamento Tris-HCl pH 6,8; Glicerol; Azul de bromofenol (Sigma Chem. Co)). A corrida eletroforética foi realizada a 40 mA.

Terminada a migração das proteínas, o sistema foi desligado e o gel foi transferido para um recipiente contendo a solução corante composta por Coomassie Brilliant Blue 0,05% (Sigma Chem. Co). Este gel foi corado por 40 minutos e então descorado, também por 40 minutos, com uma solução contendo ácido acético, etanol comercial e água destilada. Esta solução foi trocada periodicamente até que as bandas fossem visualizadas.

3.17.2 *Cromatografia de fase reversa em HPLC*

Com o objetivo de identificar os constituintes do veneno CDC, foram realizado experimentos para obtenção do perfil cromatográfico por meio HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) em coluna de fase reversa C18 (4,6 x 250 mm), partícula de 5 μ m de diâmetro, em um sistema Agilent 1220.

A coluna foi condicionada com os solventes de corrida (solvente A: água e 0,1% TFA (Ac. Trifluoroacético); solvente B: acetonitrila com 0,1% de TFA), e a eluição foi feita com gradiente de concentração de 0% do solvente B por 5 minutos e em seguida de 0-15% de B por 10 minutos, 15-45% por 60 min, 45-70% por 10 minutos e 70% por 9 minutos com um fluxo de 1 mL/min.

Os picos foram monitorados através da determinação da absorbância a 215 nm.

3.18 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m) ou média (intervalo de confiança).

As análises estatísticas foram feitas utilizando teste t de Student ou análise de variância “one-way” (ANOVA) seguido de teste de Bonferroni, quando apropriado. Foram considerados significantes os valores de $p < 0,05$. O programas utilizado para análise dos dados foi Graph PadPrism 5.0® (EUA).

Resultados

4 RESULTADOS

4.1 EFEITO DO VENENO DE CDC SOBRE O CRONOTROPISMO CARDÍACO DE ANIMAIS NORMOTENSOS

Para avaliar o efeito cronotrópico induzido pelo veneno de CDC em átrios direitos isolados de animais normotensos, foram administradas seis diferentes concentrações do veneno (0,1, 0,3, 1, 3, 10 e 30 $\mu\text{g/mL}$). A administração cumulativa em átrios de animais normotensos não induziu alteração da ritmicidade cardíaca quando comparado ao controle ($99,9\% \pm 1,0$; $101,9\% \pm 1,6$; $102,5\% \pm 2,8$; $105,2\% \pm 2,1$; $103,9\% \pm 1,8$; $105,9\% \pm 2,1$; $108,7\% \pm 2,6$, $n=5$). (Figura 20). O tempo esperado para a observação das respostas máximas de cada concentração do veneno foi de 10 minutos.

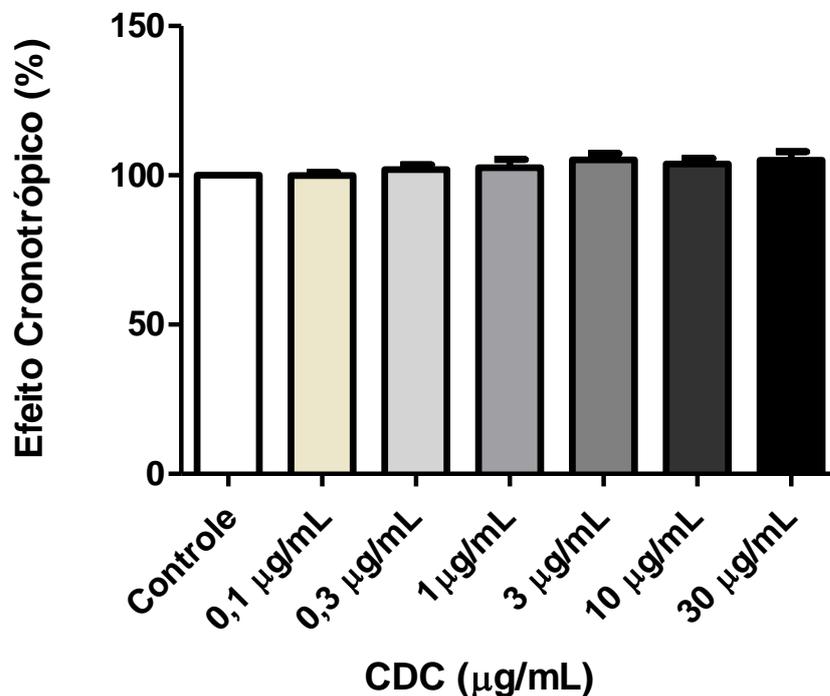


Figura 20: efeito do CDC sobre o cronotropismo cardíaco em átrios direitos isolados de ratos normotensos. Gráficos em barras demonstrando a porcentagem de variação de resposta cronotrópica cardíaca induzida por CDC (0,1 $\mu\text{g/mL}$ - 30 $\mu\text{g/mL}$) em ensaios com átrios direitos isolados de ratos normotensos (wistar). Os valores estão expressos como média \pm e.p.m. ($n=5$).

4.2 EFEITO DO VENENO DE CDC SOBRE O INOTROPISMO CARDÍACO DE ANIMAIS NORMOTENSOS E HIPERTENSOS

Diferente do que foi observada em átrios direitos isolados de animais normotensos, a administração cumulativa de CDC em átrios esquerdos desses animais, induziu inotropismo negativo estatisticamente significativa a partir da concentração de 3 $\mu\text{g/mL}$ ($94,7 \pm 7,4\%$; $80,8 \pm 4,2\%$; $72,0 \pm 5,3\%$; $65,8 \pm 8,9\%$; $58,3 \pm 5,5\%$; $54,4 \pm 7,7\%$; $5,6 \pm 1,8\%$, *versus* $100\% \pm 0,0$, $n= 5$ CDC e controle, respectivamente) (figura 25). Já em animais hipertensos, não houve alteração significativa sobre o inotropismo cardíaco após a administração do veneno ($98,3 \pm 9,7\%$; $92,1 \pm 19,4\%$; $91 \pm 21,3\%$; $87,2 \pm 15,5\%$; $84,4 \pm 20,19\%$; $85,7 \pm 23\%$, $n=8$) quando comparado ao controle ($100\% \pm 0,0$).

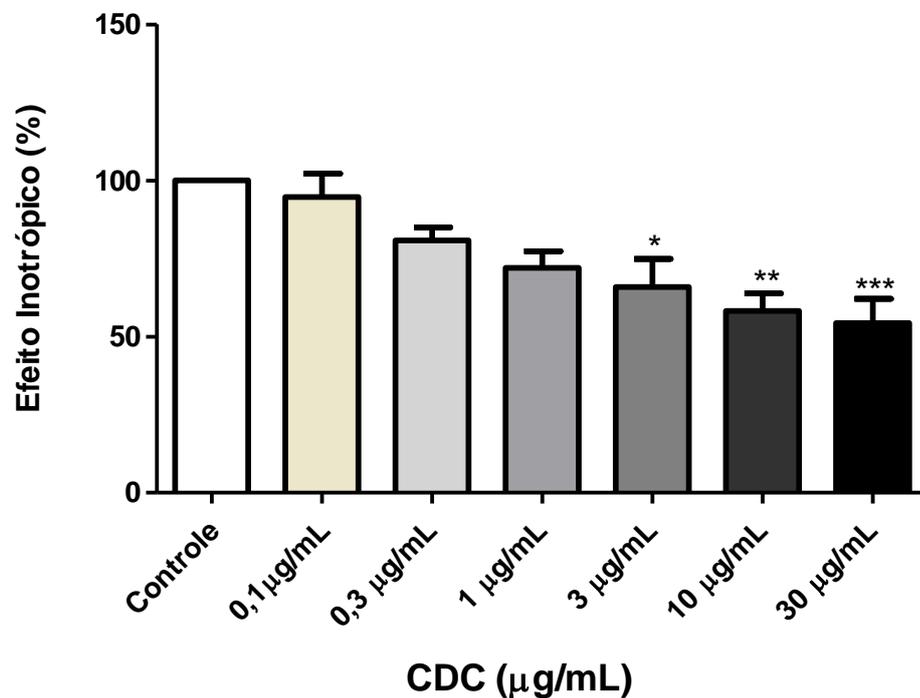


Figura 21. Efeito do CDC sobre o inotropismo cardíaco em átrios esquerdos isolados de ratos normotensos. Gráficos em barras demonstrando a porcentagem de variação de resposta inotrópica cardíaca induzida por CDC (0,1- 30 $\mu\text{g/mL}$) em ensaios com átrios esquerdos isolados de ratos normotensos (Wistar). Os valores estão expressos como média \pm e.p.m. ($n=8$). * $p<0,05$; ** $p<0,01$ *** $p<0,001$ vs controle.

4.3 CDC REDUZ A CONTRATILIDADE DE CARDIOMIÓCITOS VENTRICULARES ISOLADOS DE RATOS

Com o objetivo de eliminar o controle eletrofisiológico da resposta induzida por CDC no tecido cardíaco, foram realizados ensaios em células ventriculares frescas isoladas de ratos. Para isso, diferentes concentrações do veneno foram incubadas aos cardiomiócitos onde foi observado que, as concentrações de 1 µg/mL e 10 µg/ml causaram uma redução significativa da contratilidade celular ($76,2\% \pm 5,9$ e $68,9\% \pm 7,2$, respectivamente, $*p < 0,05$ e $**p < 0,01$, $n=50$) quando comparado às células que não receberam tratamento (controle- $100\% \pm 0,0$, $n=50$). Entretanto a concentração de 0,1 µg/ml ($89,1\% \pm 8,5$, $n=50$) não promoveu uma redução significativa (figura 22 A).

O segundo parâmetro avaliado foi a velocidade de partida (%) o qual é um valor que caracteriza a velocidade com a qual a célula contrai ou $[Ca^{2+}]_i$ aumenta. Como observado na figura 22 B, apenas a concentração de 10 µg/ml de CDC foi capaz de diminuir a velocidade de contração de maneira significativa ($67,7\% \pm 12,6$, $*p < 0,05$, $n=50$ *versus* $100\% \pm 0,0$).

O tempo para 10% do pico de contração não apresentou alteração significativa para nenhuma das concentrações utilizadas de CDC ($104,5\% \pm 7,1$; $124,0\% \pm 6,6$; $110,6\% \pm 17,0$, para as concentrações de 0,1, 1 e 10 µg/mL, respectivamente, $n=50$).

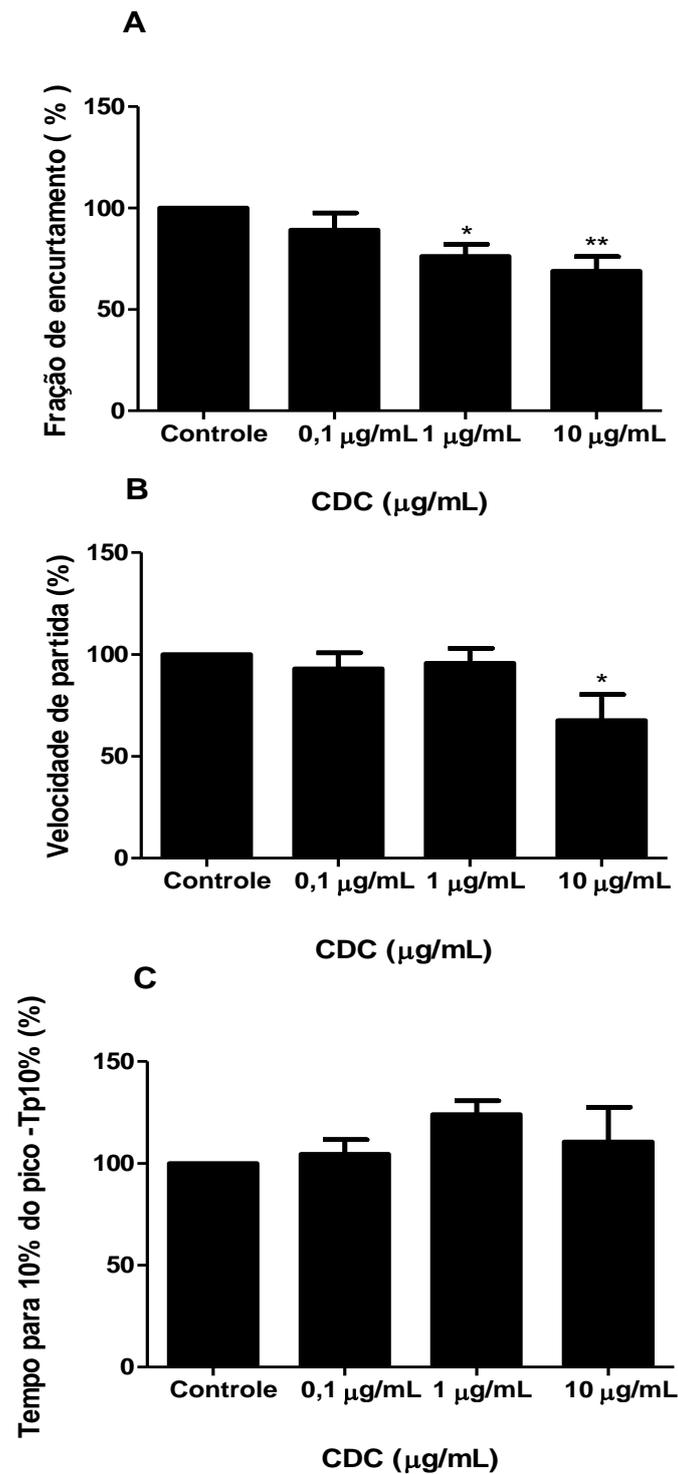


Figura 22: Influência do CDC (0,1 µg/mL, 1 µg/mL e 10 µg/mL) na contratilidade de cardiomiócitos do ventrículo esquerdo de ratos. A) Gráfico de barras, demonstrando a fração de encurtamento (%) de cardiomiócitos na ausência (controle) e na presença de CDC nas diferentes concentrações; B) Gráfico de barras, a velocidade de partida (%) de cardiomiócitos na ausência (controle) e na presença de CDC nas diferentes concentrações; C) Gráfico de barras, demonstrando o tempo de 10% de pico (%) de cardiomiócitos na ausência (controle) e na presença de CDC nas diferentes concentrações. Os valores estão expressos como média ± e.p.m. (n=50 células). *p<0,05, **p<0,01.

4.4 EFEITO CITOTÓXICO DE CDC EM CÉLULAS DE MAMÍFEROS

Cardiomiócitos de rato da linhagem H9c2 foram utilizados para avaliar a citotoxicidade dos compostos em células de mamíferos. A adição de CDC nas concentrações de 7,5, 15 e 30 $\mu\text{g/mL}$ não induziu alteração significativa da proliferação celular (Figura 23).

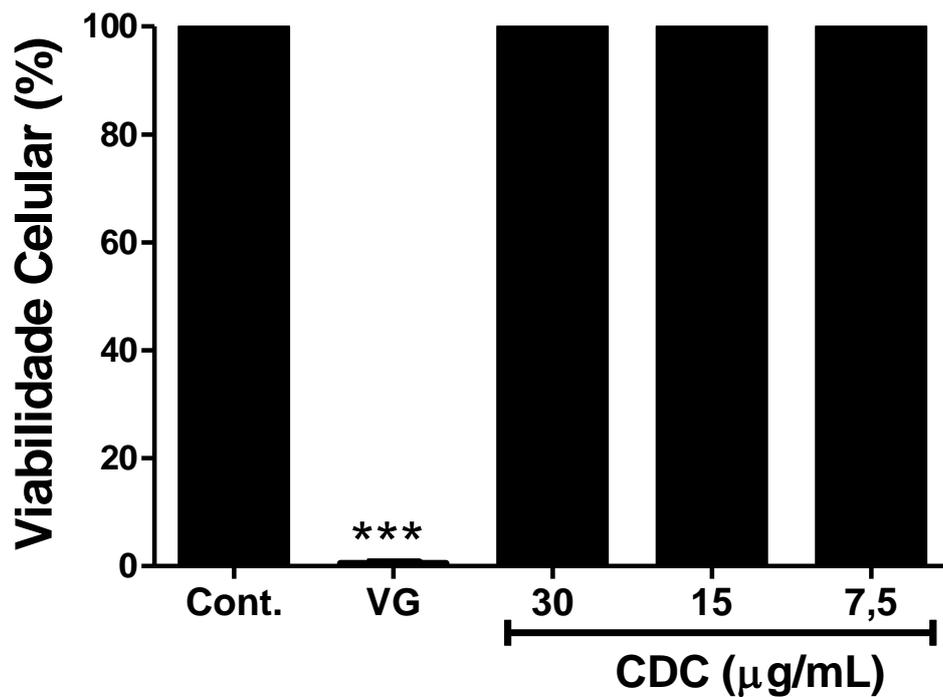


Figura 23: Ausência de efeito citotóxico de CDC, em células H9c2. Gráfico em barras de células H9c2 tratadas com diferentes concentrações de CDC (7,5, 15 e 30 $\mu\text{g/mL}$) por 72 horas. A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio Alamar Blue. Violeta genciana (VG) foi utilizada como controle positivo. Os dados são expressos como média \pm SEM; n = 9 determinações por grupo.

4.5 EFEITO DO VENENO DE CDC SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA CK-TOTAL E CK-MB EM ÁTRIO ISOLADO DE RATOS

A figura 24 (A e B) demonstra que o tratamento dos átrios de ratos com CDC (30 $\mu\text{g/mL}$), não alteraram de maneira significativa os níveis de CK-Total e de CK-MB em solução fisiológica contendo tecido atrial (CK-Total- $7,0 \pm 1,2 \text{ U/mL}$ e $9,3 \pm 1,3 \text{ U/ml}$, controle e CDC, respectivamente; CK-MB- $3,0 \pm 1,5 \text{ U/mL}$ e $3,2 \pm 0,6 \text{ U/mL}$ controle e CDC, respectivamente).

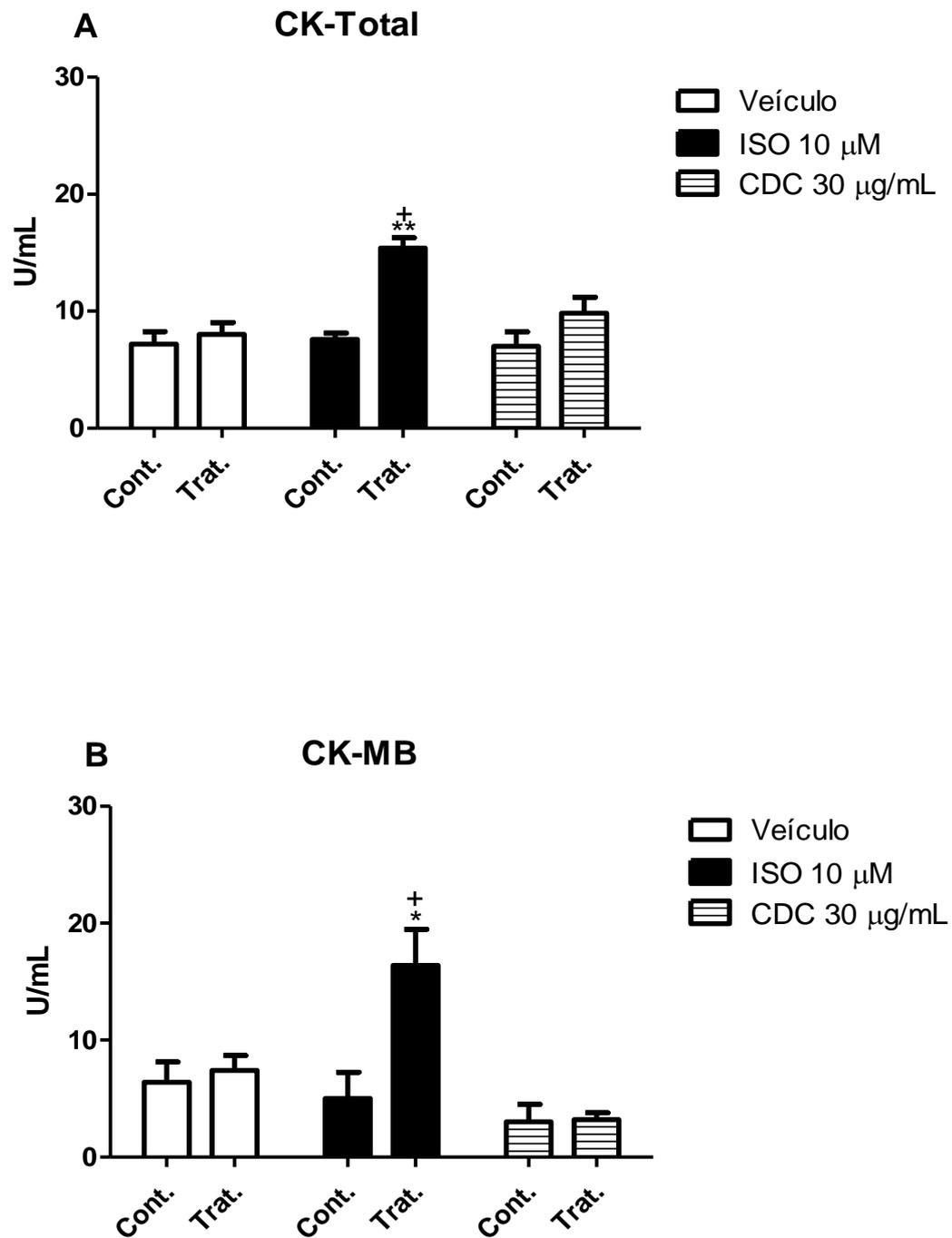


Figura 24: Tratamento com veneno de CDC (30 µg/mL) não altera os níveis de CK-Total e CK-MB em solução contendo átrios de ratos. Gráfico em barras demonstrando a ausência de alteração da atividade de CK-Total (A) e CK-MB (B) induzida por CDC (30 µg/ml) em átrios isolados de ratos normotensos (Wistar). Os valores estão expressos como média ± e.p.m. (n=5).**p<0,01 versus controle; †p< 0,05 versus veículo tratado.

4.6 EFEITOS DO VENENO CDC SOBRE A MORFOLOGIA DO TECIDO ATRIAL

A análise histológica dos corações em microscopia de luz mostrou discretas alterações nos espécimes pertencentes a todos os grupos.

4.6.1 *Análise morfológica descritiva*

Os espécimes provenientes do grupo controle mostraram um miocárdio com aspecto histológico normal, ainda que alguns cardiomiócitos estivessem lesados ou que uma leve desorganização das fibras musculares fosse observada. Em sua maioria, os miocárdios eram constituídos por cardiomiócitos alongados e ramificados, exibindo estriações transversais, eosinofilia típica e núcleos localizados no centro da fibra muscular.

Nos corações tratados com o veneno de CDC, o miocárdio mostrava cardiomiócitos com eosinofilia típica, estriações transversais e núcleos localizados centralmente. Cardiomiócitos rompidos ou discreta desorganização das fibras musculares foram achados incomuns.

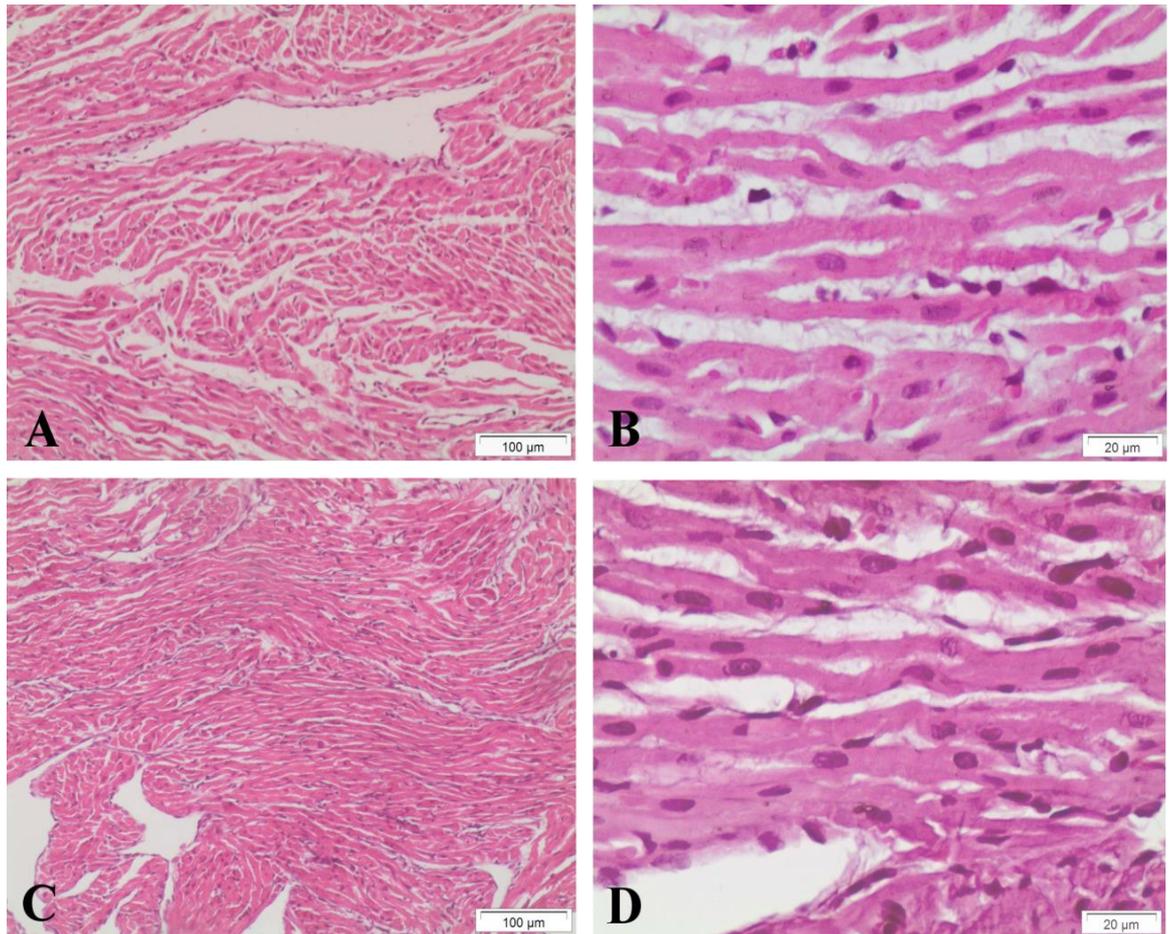


Figura 25: Ausência de alterações morfológicas em átrios isolados de ratos tratados com CDC (30 µg/mL). Fotomicrografias mostrando seções longitudinais do miocárdio atrial de amostras tratadas com veículo (salina, A e B) e CDC 30 µg/mL (C e D). Músculo cardíaco normal com fibras bem organizadas é observado em espécimes do grupo controle, assim como uma preservação da estrutura muscular atrial pode ser observada em espécimes tratados com CDC. Coloração com hematoxilina e eosina.

4.7 EFEITO DE CDC SOBRE A ULTRAESTRUTURA DE CÉLULAS CARDÍACAS

Com o objetivo de avaliar o efeito de CDC sobre a ultraestrutura de células cardíacas isoladas de ratos, foram realizados ensaios utilizando Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) onde, previamente, o tecido atrial foi colocado no banho de órgãos sob condições controladas e, então tratado com CDC (30 µg/mL), água destilada (30 µl) ou Isoproterenol (ISO 10 µM) por 10 minutos para posterior processamento e avaliação em MET.

Em todos os grupos experimentais foram observadas miofibrilas cardíacas degeneradas, porém lesões mitocondriais eletrolucentes focais foram mais comuns no grupo tratado com ISO, acompanhado pela presença de edema. Além disso, a avaliação ultraestrutural demonstrou desorganização da fibra em animais tratados com CDC. Células cardíacas de todos os grupos revelaram mitocôndrias intermiofibrilares inchadas e deslocadas com desorganização de cristas e danos estruturais, porém este efeito foi observado principalmente no grupo CDC (Figura 26).

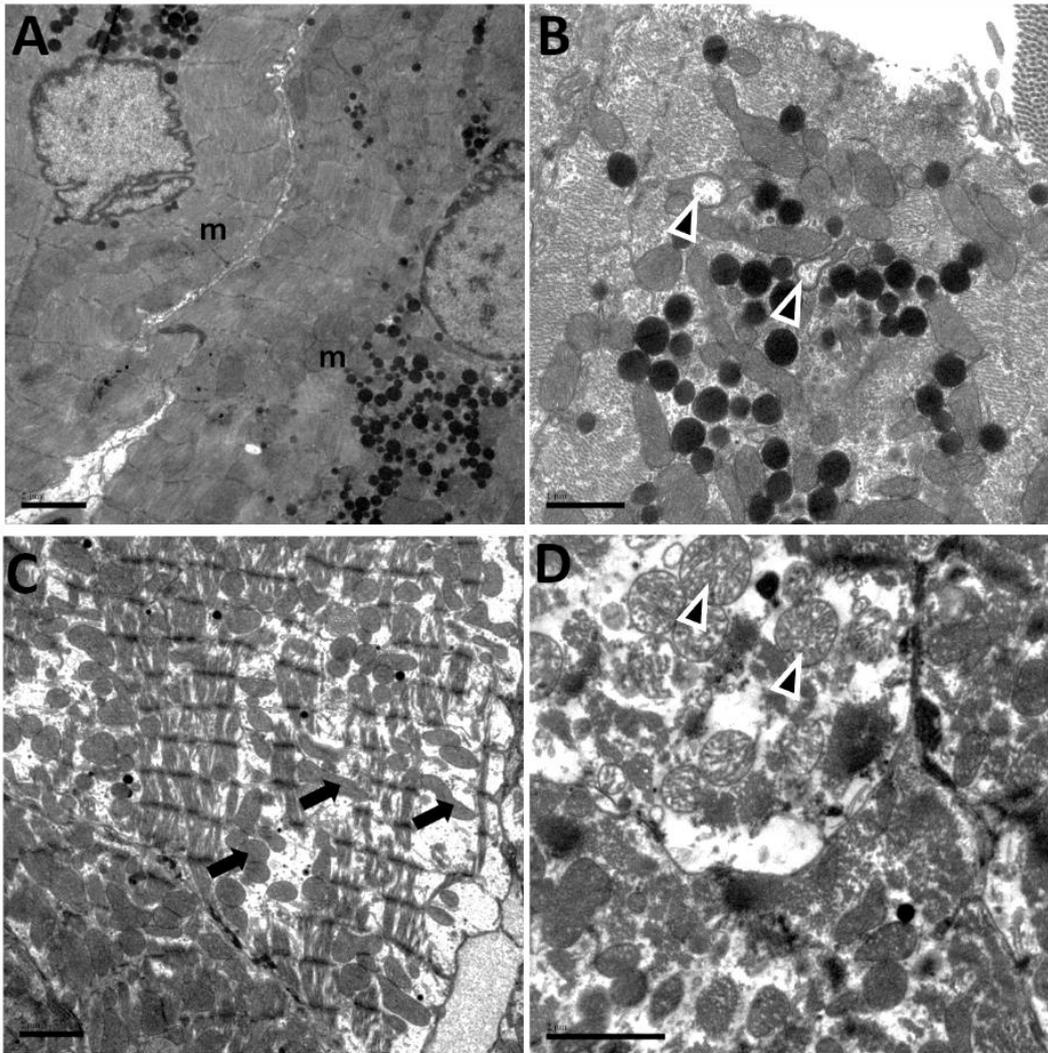


Figura 26: Microscopia eletrônica de transmissão do tecido cardíaco. Miocárdio tratado com solução salina (A) exibindo miofibrilas bem organizadas com mitocôndrias interpostas (m). Miocárdio tratado com 10 μ M Isoproterenol mostrando principalmente fibras preservadas, com eventuais lesões mitocondriais (B, cabeças de setas). Miocardias (C e D) tratadas com CDC (30 μ g / mL) freqüentemente apresentavam fibras desorganizadas na vizinhança de mitocôndrias distribuídas aleatoriamente (C, setas), bem como mitocôndrias amplamente desbotadas (D, cabeças de setas).

4.8 AUSÊNCIA DE INDÍCIOS CARDIOTÓXICOS DE CDC EM CORAÇÃO ISOLADO

Adicionalmente, para continuar avaliando uma possível ação cardiotoxica do veneno CDC em coração isolado de animais wistar, foram realizados ensaios utilizando o sistema de Langendorff, investigando quanto à presença de arritmias e alterações na frequência cardíaca, intervalo PR, deflexão intrínscóide, amplitude das ondas e duração do intervalo QT.

O veneno CDC nas concentrações testadas de 0,1 $\mu\text{g/mL}$; 1 $\mu\text{g/mL}$ e 10 $\mu\text{g/mL}$ não induziu alteração significantes sobre a eletrogênese cardíaca em coração isolado e perfundido de rato, usando a técnica de Langendorff, como ilustrado nos registros abaixo (figura 27) que apontam ausência de cardiotoxicidade nas doses testadas. A tabela 3 mostra os parâmetros cardíacos obtidos.

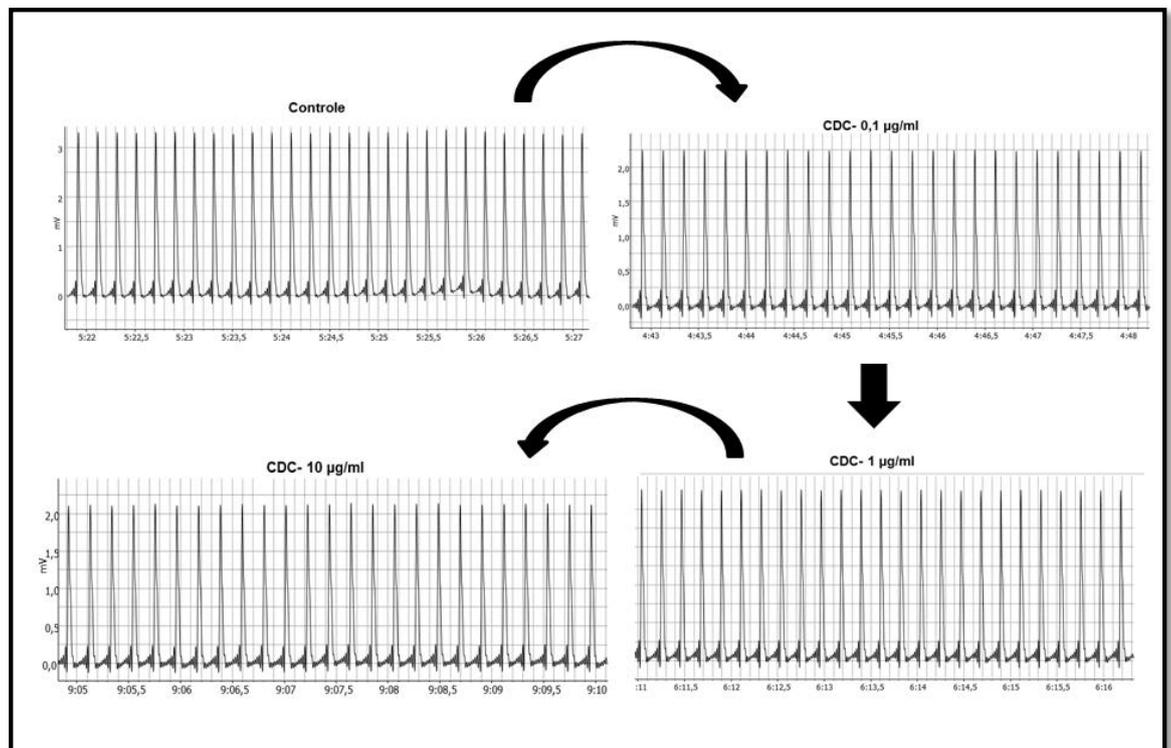


Figura 27: Representação eletrocardiográfica após tratamento com veneno CDC.

CDC						
	IRR	IQT	TAV	Amp QRS	FC	IPR
Controle	219±38.8	71 ±0.4	17 ±0.4	1.3±0.5	261±34.7	29±2.1
0.1 µg/mL	224 ± 33.3	71 ±0.0	18±0.8	1.1±0.3	266±34.1	29±2.1
Lavagem 1	212±33.8	71 ±0.8	17±1.25	0.9±0.2	269±29.3	29±2.5
1 µg/mL	210±31.6	72 ±0.8	18±1.70	0.9±0.2	270±26.2	30±2.6
Lavagem 2	207 ±25.6	72 ±0.8	18±1.41	1.1±0.7	279±22.0	29±2.5
10 µg/mL	211±20.3	72 ±0.4	18±1.41	0.8±0.2	279±19.1	30±2.6
Lavagem 3	209±17	71±0.8	18±1.25	0.8± 0.2	266±31.0	29±2.8

Tabela 3: Parâmetros cardíacos obtido em coração de rato perfundido pela técnica de Langendorff para avaliação da cardiotoxicidade. Frequência cardíaca (FC), IRR (Intervalo RR), IPR(Intervalo PR), Tempo de ativação ventricular (TAV), Intervalo QT (IQT), Amplitude do QRS (Amp QRS). Os valores estão expressos como média ± DP.

4.9 EFEITO DE CDC EM ÁTRIO ESTIMULADOS COM EPINEFRINA

Com o objetivo de avaliar se o veneno CDC é capaz de reverter o inotropismo cardíaco positivo induzido por um agonista adrenérgico, foram realizados experimentos utilizando átrio isolado de rato, os quais foram incubados com epinefrina (10 μ M) e posteriormente foram adicionados de maneira cumulativa, duas concentrações de CDC (10 e 30 μ g/mL). Como observado na figura 28, a adição da epinefrina induziu um efeito inotrópico positivo de maneira significativa (** $p < 0,01$) nos átrios isolados quando comparado ao controle ($184,5 \pm 4,8\%$ versus $100 \pm 0\%$, $n=5$, epinefrina e controle, respectivamente). A adição de 30 μ g/ml de CDC induziu uma reversão do efeito inotrópico positivo de maneira significativa (** $p < 0,01$) ($107,8 \pm 13,0$, $n=5$) quando comparado à epinefrina.

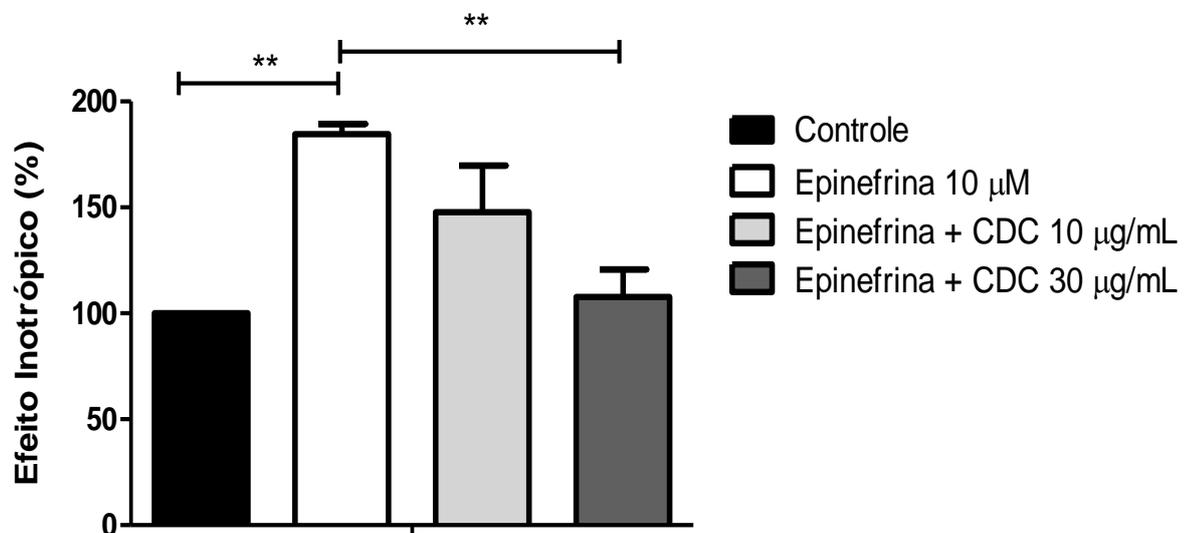


Figura 28: CDC reverte inotropismo positivo induzido por ativação adrenérgica. Gráfico em barras demonstrando a porcentagem de variação de resposta inotrópica cardíaca induzida por epinefrina 10 μ M na ausência ou na presença de CDC (10 e 30 μ g/mL) em ensaios com átrios esquerdos isolados de ratos normotensos (Wistar). Os valores estão expressos como média \pm e.p.m. ($n=5$). ** $p < 0,01$ vs controle.

4.10 PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES ADRENÉRGICOS NO EFEITO INDUZIDO POR CDC

Com objetivo de avaliar a participação de receptores adrenérgicos no efeito inotrópico negativo induzido pelo CDC, os átrios esquerdos isolados de ratos foram incubados por 5 minutos com propranolol (10 μM), um conhecido antagonista não seletivo de receptores adrenérgicos e, posteriormente, foram adicionados cumulativamente às concentrações de 10 e 30 $\mu\text{g/mL}$ de CDC.

Como observado na figura 29, o propranolol, como esperado, induziu um efeito inotrópico negativo de maneira significativa ($*p<0,05$) quando comparado ao controle ($100,0 \pm 0\%$ versus $59,9 \pm 5,1\%$, $n=5$, controle e propranolol respectivamente). A adição de CDC nas concentrações 10 e 30 $\mu\text{g/mL}$ continuou reduzindo a contratilidade atrial de maneira significativa quando comparado ao controle e ao propranolol ($**p<0,05$ e $***p<0,001$) induzindo a paralisação da atividade contrátil.

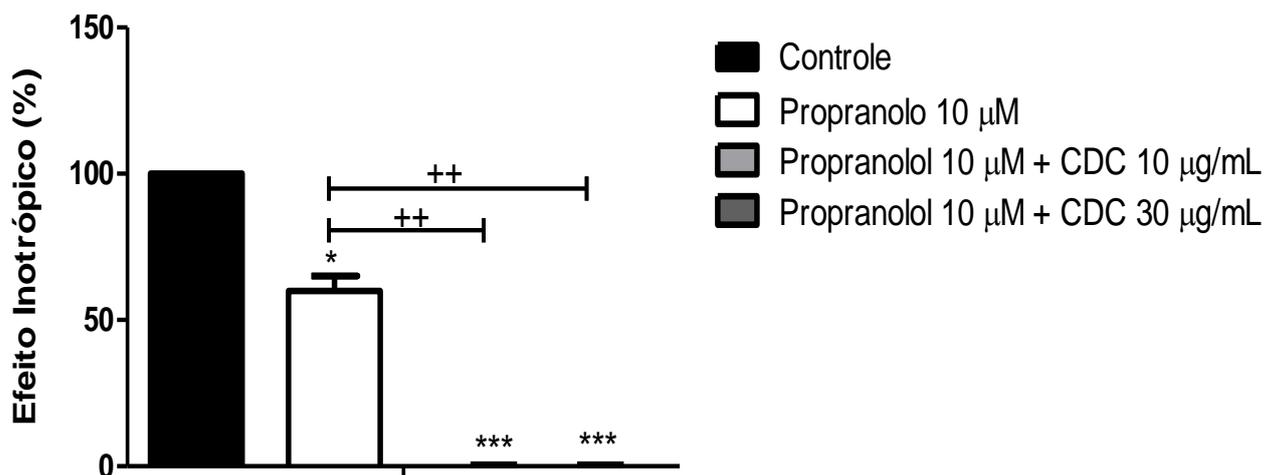


Figura 29: CDC induz efeito inotrópico negativo em átrio isolado de rato na presença de um bloqueador adrenérgico. Gráficos em barras demonstrando a porcentagem de variação de resposta inotrópica cardíaca induzida por CDC (10 e 30 $\mu\text{g/mL}$) na presença de propranolol 10 μM em ensaios com átrios esquerdos isolados de ratos normotensos (wistar). Os valores estão expressos como média \pm e.p.m. ($n=5$). $*p<0,05$; $**p<0,01$ e $***p<0,001$ vs controle; $++p<0,01$ vs propranolol.

4.11 PARTICIPAÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO SINTASE (NOS) NO EFEITO INDUZIDO POR CDC

Com objetivo de avaliar a participação do óxido nítrico sintase no efeito inotrópico negativo induzido por CDC, foram realizados experimentos de átrio isolado de ratos na presença de L-NAME (100 μ M), um conhecido inibidor não seletivo de NOS e, posteriormente, foram adicionados cumulativamente às concentrações de 10 e 30 μ g/mL de CDC.

Como observado na figura abaixo, o L-NAME sozinho não induziu alteração significativa do efeito contrátil nos átrios esquerdos isolados. Já na presença de CDC, foi observado um efeito inotrópico negativo significativo (** $p < 0,001$) como esperado ($100,0 \pm 0,0$ % *versus* $48,3 \pm 7,7$ %, $n=5$, controle e CDC, respectivamente). O pré-tratamento do átrio com L-NAME seguida da adição de CDC 30 μ g/mL não capaz de induzir o efeito inotrópico negativo ($83,6 \pm 4,9$, $n=5$, ** $p < 0,01$).

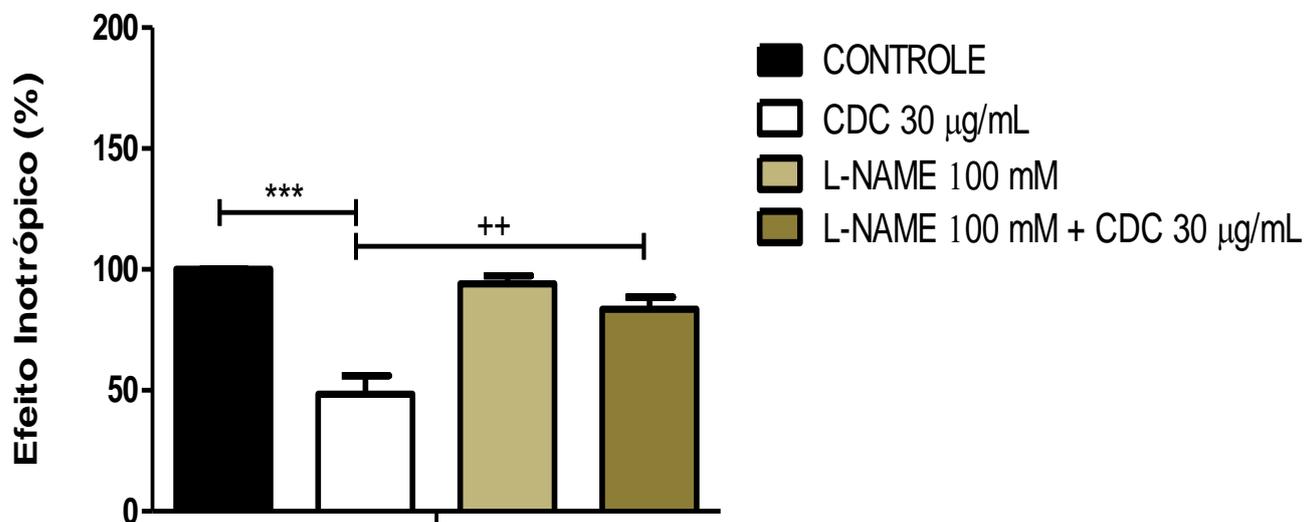


Figura 30: A presença de L-NAME reduz efeito inotrópico negativo induzido por CDC. Gráfico em barras demonstrando a porcentagem de variação de resposta inotrópica cardíaca induzida por L-NAME 100 μ M e CDC 30 μ g/mL em ensaios com átrios esquerdos isolados de ratos normotensos (Wistar). Os valores estão expressos como média \pm e.p.m. ($n=5$). ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ vs controle; ++ $p < 0,01$ vs L-NAME+ CDC.

4.12 PARTICIPAÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO (NO) NO EFEITO INDUZIDO POR CDC

Com o objetivo de avaliar a participação do óxido nítrico no efeito inotrópico negativo induzido por CDC, os átrios isolados de ratos foram incubados por 5 minutos com PTIO (2-Phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl 3-oxide) (100 μ M), um sequestrador de NO.

Como se pode observar na figura 31, a presença PTIO 100 μ M não alterou de maneira significativa a contratilidade atrial ($100,0 \pm 0,0$ % *versus* $115,7 \pm 2,7$ %, $n=5$), enquanto a adição de CDC, como esperado, induziu um efeito inotrópico negativo significativo ($59,5 \pm 7,0$ %, $n=5$, $***p<0,001$). Já na presença do PTIO, foi observada uma redução desse efeito inotrópico induzido por CDC ($109,2 \pm 3,4$ %, $n=5$, $+++p<0,001$ vs CDC).

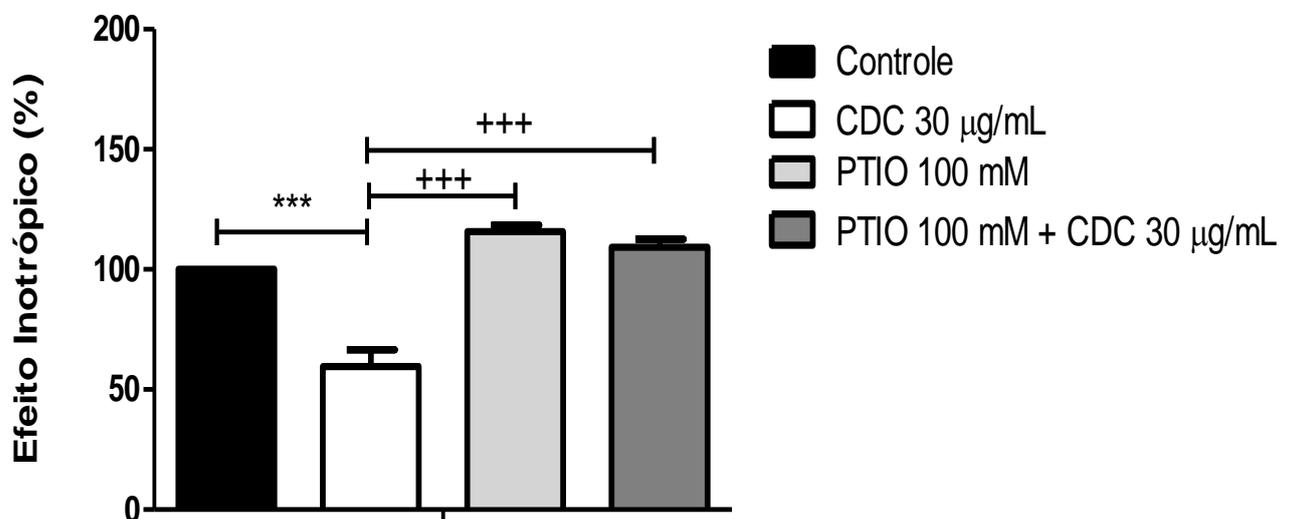


Figura 31: PTIO reduz efeito inotrópico negativo induzido por CDC em átrios isolados de ratos. Gráfico em barras demonstrando a porcentagem de variação de resposta inotrópica cardíaca induzida por PTIO 100 μ M e CDC 30 μ g/mL em ensaios com átrios esquerdos isolados de ratos normotensos (Wistar). Os valores estão expressos como média \pm e.p.m. ($n=5$). $**p<0,01$ $***p<0,001$ vs controle; $++p<0,01$ vs PTIO+ CDC.

4.13 PARTICIPAÇÃO DA GUANILIL CICLASE NO EFEITO INDUZIDO POR CDC

Com objetivo de avaliar a participação da Guanilil ciclase no efeito inotrópico negativo induzido por CDC, os átrios isolados foram incubados com ODQ (1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one) (10 μ M), um inibidor específico da ciclase de guanilil solúvel (PLANE et al., 2001) e posteriormente foi adicionado CDC 30 μ g/ml.

Como resultado pode-se observar que a adição de ODQ 10 μ M não induziu alteração da contratilidade atrial de maneira significativa quando comparado ao controle, enquanto a adição de CDC 30 μ g/mL induziu a um efeito inotrópico negativo importante quando comparado ao controle (100,0 \pm 0,0 % *versus* 54,3 \pm 9,2 %, n=5, controle e CDC, respectivamente, **p<0,01). Já na presença de ODQ, o CDC não foi capaz de induzir um efeito inotrópico negativo, aumentando de maneira significativa a atividade contrátil atrial quando comparado ao CDC 30 μ g/ml (135,4 \pm 10,0 %, n=5).

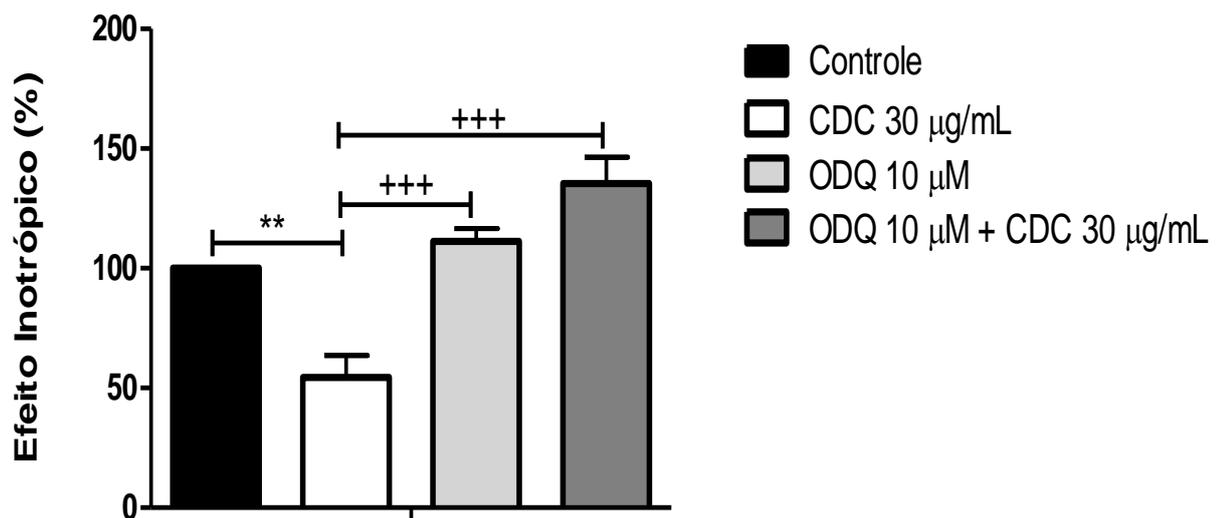


Figura 32: ODQ reduz efeito inotrópico negativo induzido por CDC em átrios isolados de ratos. Gráfico em barras demonstrando a porcentagem de variação de resposta inotrópica cardíaca induzida por ODQ 10 μ M e CDC 30 μ g/mL em ensaios com átrios esquerdos isolados de ratos normotensos (Wistar). Os valores estão expressos como média \pm e.p.m. (n=5). **p<0,01 vs controle; +++p<0,001 versus ODQ+ CDC.

4.14 PARTICIPAÇÃO DA PROTEÍNA CINASE DEPENDENTE DE GMPC (PKG) NO EFEITO INDUZIDO POR CDC

Com objetivo de avaliar a participação da PKG no efeito inotrópico negativo induzido por CDC, os átrios isolados foram incubados com KT5823 (1 μ M) inibidor seletivo de PKG durante 5 minutos e posteriormente foi adicionado CDC 30 μ g/mL.

Como resultado pode-se observar que a adição de KT5823 1 μ M não induziu alteração da contratilidade atrial de maneira significativa quando comparado ao controle, enquanto a adição de CDC 30 μ g/mL induziu a um efeito inotrópico negativo importante quando comparado ao controle (100,0 \pm 0,0 % *versus* 65,3 \pm 5,0 %, n=5, controle e CDC, respectivamente, ***p<0,001). Já na presença de KT5823, o CDC não foi capaz de induzir um efeito inotrópico negativo, aumentando de maneira significativa a atividade contrátil atrial quando comparado ao CDC 30 μ g/ml (101,8 \pm 3,2 %, n=5).

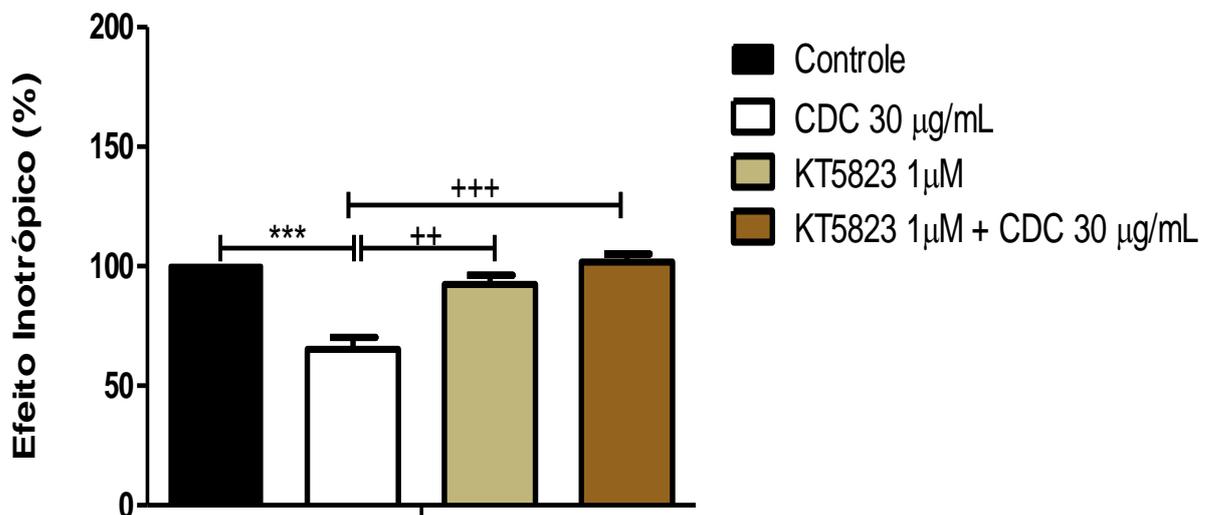


Figura 33: KT5823 inibe efeito inotrópico negativo induzido por CDC em átrios isolados de ratos. Gráfico de barras demonstrando a porcentagem de variação de resposta inotrópica cardíaca induzida por KT5823 1 μ M e CDC 30 μ g/mL em ensaios com átrios esquerdos isolados de ratos normotensos (Wistar). Os valores estão expressos como média \pm e.p.m. (n=5). ***p<0,001 vs controle; ++p<0,01 e +++p<0,001 vs KT5823+ CDC.

4.15 EFEITOS DE CDC NA PRESSÃO ARTERIAL (PA) E FREQUÊNCIA CARDÍACA (FC) DE RATOS

Com objetivo de avaliar o efeito de CDC sobre a hemodinâmica de ratos, cateteres de polietileno foram inseridas na veia e artéria femoral através de um procedimento cirúrgico e injeções intravenosas em bolus de CDC (0,1, 0,3, 1 e 3 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, i.v.), em ratos não anestesiados foram administradas.

As injeções intravenosas induziram uma redução da pressão arterial de maneira significativa (PAM = $-6,5 \pm 1,3$; $-18,2 \pm 2,9$; $-22,9 \pm 1,2$; $-36,0 \pm 2,3$ % de forma dose- dependente (n=5). Este efeito hipotensor foi associado a uma bradicardia (FC= $-1,5 \pm 1,6$; $-18,8 \pm 2,6$; $-13,0 \pm 4,0$; $-19,2 \pm 3,7$; $-5,0 \pm 2,5$ %) quando comparado ao veículo (Figura 34).

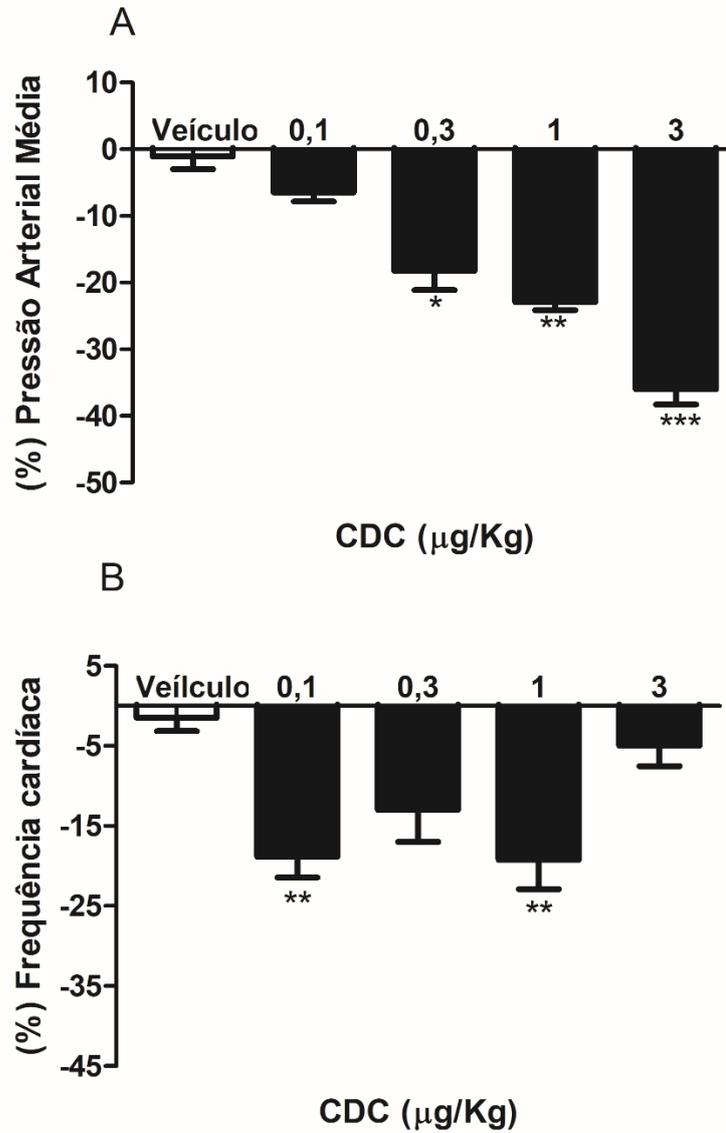


Figura 34: Efeito hipotensor e bradicárdico de CDC em ratos normotensos não anestesiados. Efeitos da administração intravenosa de CDC (0,1, 0,3, 1 e 3 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, iv) sobre a Pressão Arterial Média (%PAM) e Frequência Cardíaca (%FC) em ratos, não anestesiados. (A) Gráficos em barras mostrando os efeitos de CDC sobre a % Pressão Arterial Média (PAM) de ratos. (B) Efeitos de CDC sobre a % Frequência Cardíaca (FC) de ratos. Os valores estão expressos como médio \pm SEM (n = 5). (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

4.16 EFEITO BRADICÁRDICO DE CDC EM ANIMAIS ANESTESIADOS

Com o objetivo de avaliar as influências de CDC na atividade elétrica cardíaca, foram realizados experimentos para medidas eletrocardiográficas *in vivo* após administração de diferentes doses de CDC (0,1; 0,3; 1 e 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$) por via endovenosa em ratos anestesiados e, posteriormente, foram avaliados parâmetros como FC, duração do segmento PR, do complexo QRS e do segmento QTc. Como observado nas figuras abaixo (figura 35, A, B, C e D), o veneno CDC só foi capaz de reduzir significativamente a frequência cardíaca nas doses 0,1, 0,3 e 1 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ comparadas ao controle ($210,5 \pm 3,6$; $173,5 \pm 5,5$; $184,6 \pm 4,8$ bpm, controle e doses de 0,1, 0,3 e 1 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ respectivamente).

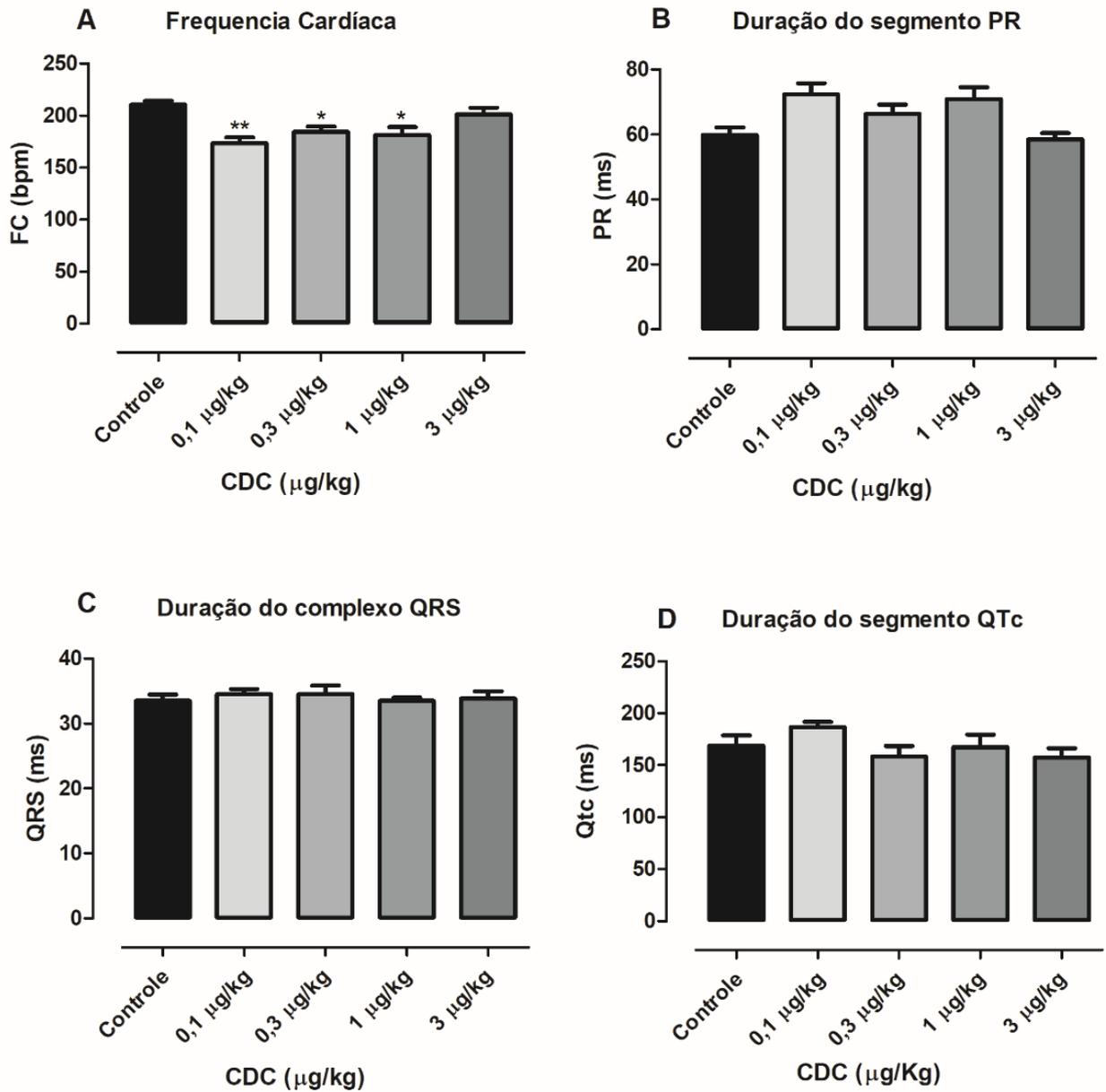


Figura 35: Efeito bradicárdico do CDC em ratos anestesiados submetidos ao ECG. Gráficos em barra demonstrando as alterações da atividade elétrica cardíaca em ratos vivos anestesiados submetidos ao ECG. A) CDC induziu uma redução da frequência cardíaca nas doses de 0,1, 0,3 e 1 $\mu\text{g/Kg}$. B) ausência de efeitos de CDC na duração do segmento PR. C) ausência de efeitos de CDC sobre o intervalo QRS. D) ausência de efeitos de CDC na duração do segmento QTc. Análises realizadas com ANOVA one-way, com pós-teste de Bonferroni (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ versus controle).

4.17 EFEITO DO VENENO DE CDC SOBRE O CRONOTROPISMO CARDÍACO DE ANIMAIS HIPERTENSOS

Para avaliar o efeito cronotrópico induzido pelo veneno de CDC em átrios direitos isolados de animais hipertensos, foram administradas seis diferentes concentrações do veneno (0,1, 0,3, 1, 3, 10 e 30 $\mu\text{g/mL}$). A administração cumulativa em átrios de animais hipertensos induziu a um discreto aumento da ritmicidade cardíaca ($p < 0,05$) na concentração mais alta estudada, a de 30 $\mu\text{g/mL}$ ($106,7\% \pm 1,6$; $108,4\% \pm 2,6$; $110\% \pm 2,1$; $108,4\% \pm 3$; $109,1\% \pm 3,1$; $112,5\% \pm 3,6$, $n=5$) quando comparado ao controle ($100\% \pm 0$) (Figura 36).

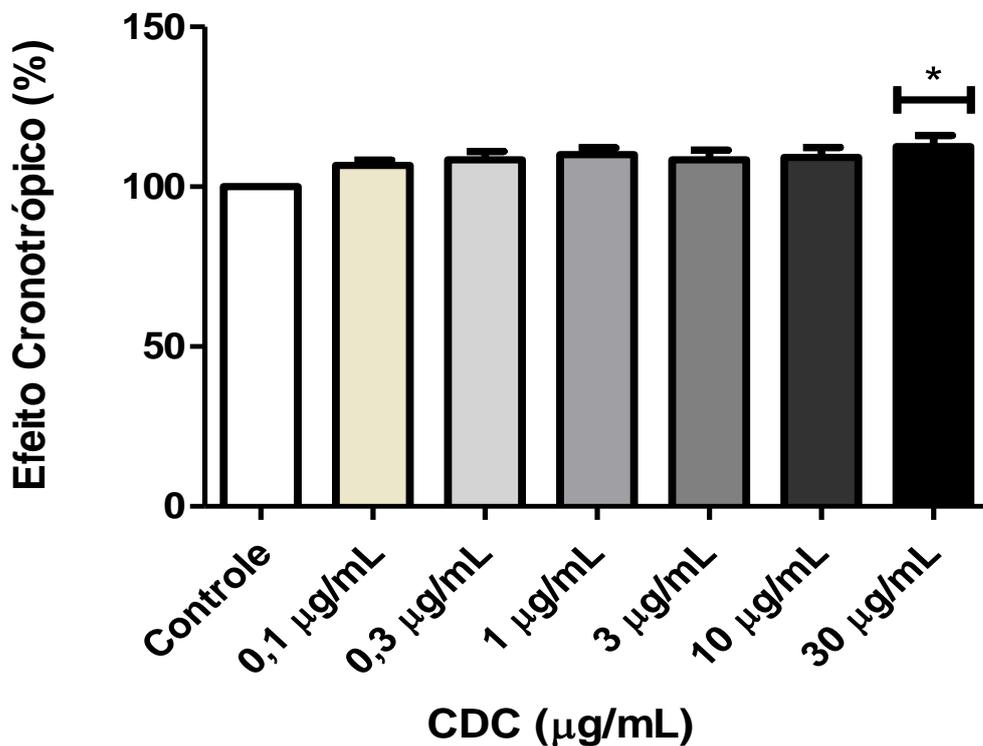


Figura 36: Efeito do CDC sobre o cronotropismo cardíaco em átrios direitos isolados de ratos hipertensos. Gráficos em barras demonstrando a porcentagem de variação de resposta cronotrópica cardíaca induzida por CDC (0,1 $\mu\text{g/mL}$ - 30 $\mu\text{g/mL}$) em ensaios com átrios direitos isolados de ratos hipertensos (SHR). Os valores estão expressos como média \pm e.p.m. ($n=5$).

4.18 EFEITO DO VENENO DE CDC SOBRE O INOTROPISMO CARDÍACO DE ANIMAIS HIPERTENSOS

A administração cumulativa de CDC em átrios esquerdos de animais hipertensos, não induziu uma alteração significativa sobre o inotropismo cardíaco após a administração da droga teste ($98,3 \pm 9,7\%$; $92,1 \pm 19,4\%$; $91 \pm 21,3\%$; $87,2 \pm 15,5\%$; $84,4 \pm 20,19\%$; $85,7 \pm 23\%$, $n=8$) quando comparado ao controle ($100\% \pm 0,0$).

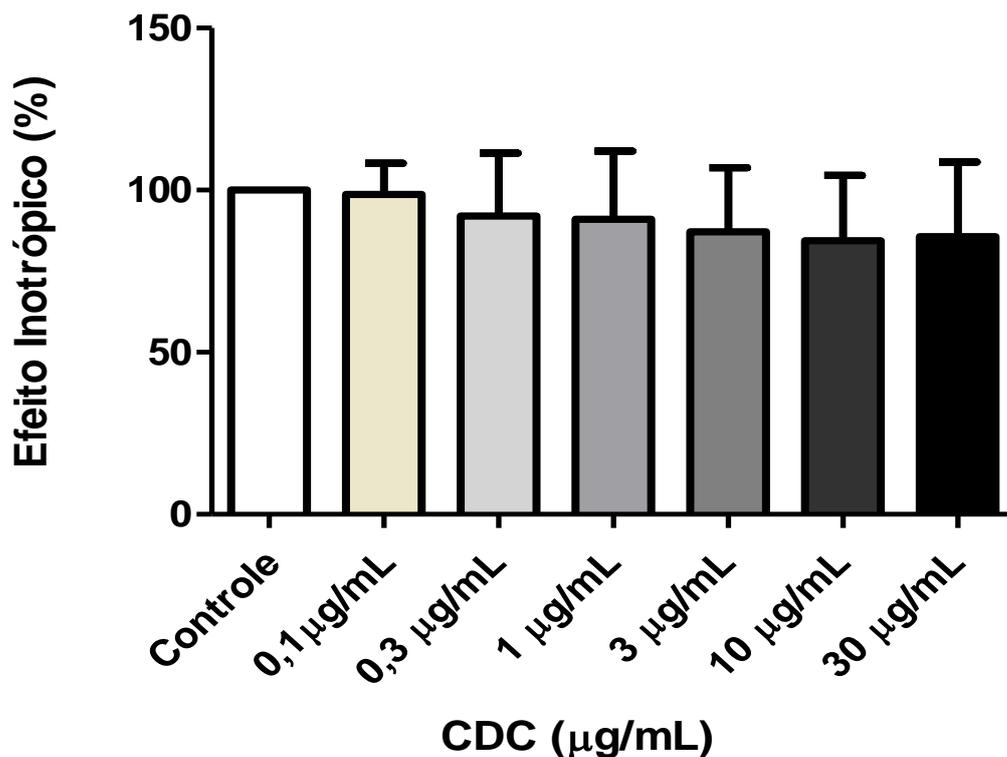


Figura 37: Efeito do CDC sobre o inotropismo cardíaco em átrios esquerdos isolados de ratos hipertensos. Gráficos em barras demonstrando a porcentagem de variação de resposta inotrópica cardíaca induzida por CDC (0,1- 30 µg/mL) em ensaios com átrios esquerdos isolados de ratos hipertensos (SHR). Os valores estão expressos como média \pm e.p.m. ($n=8$). * $p<0,05$; ** $p<0,01$ *** $p<0,001$ vs controle.

4.19 CARACTERIZAÇÃO DO VENENO CDC

Na análise do perfil de migração eletroforética da amostra de CDC, foi observado a formação de três principais bandas com peso molecular próximo a 40, 17 e 14,4 KDa. Na separação por HPLC de fase reversa das proteínas dos venenos, também foi possível observar três principais picos (1, 2 e 3). O pico 1 parece estar relacionado à fração ácida da crotoxina (CA); pico 2 à fração básica da crotoxina (CB) e o pico 3 parece estar relacionado a uma concentração de D49-PLA2 ácida.

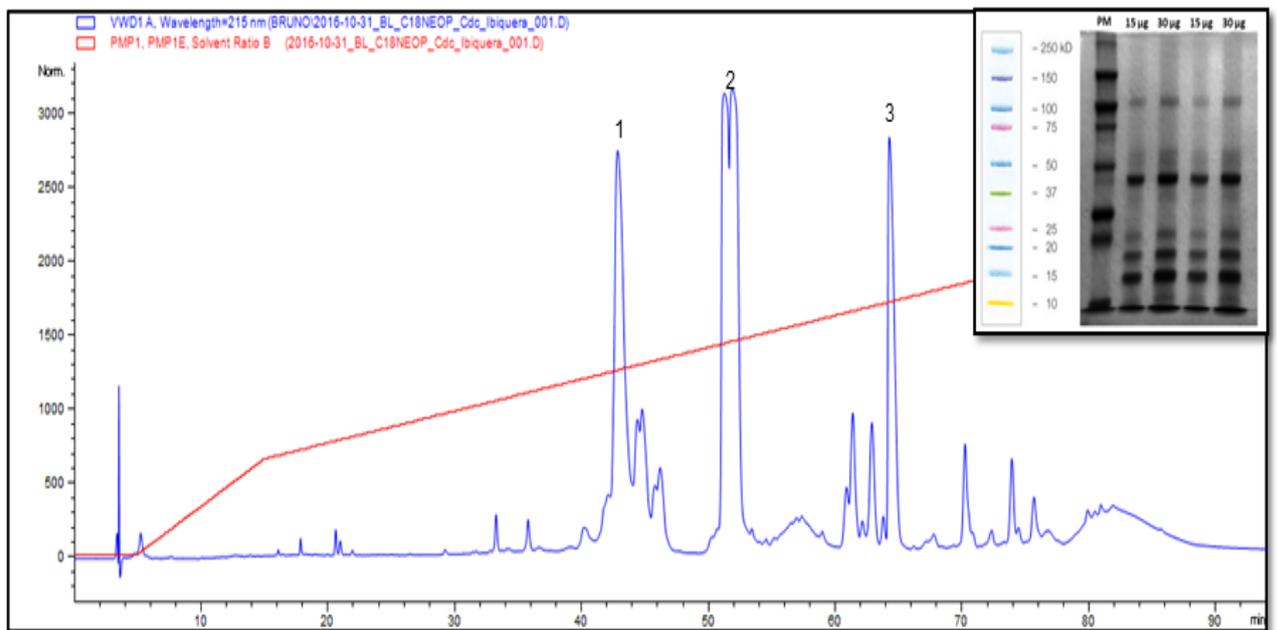


Figura 38: Perfil eletroforético do veneno de CDC em gel de poliacrilamida 15% sob condições desnaturantes e reduzidas. (MM) Marcador Molecular, 15 e 30 µg de proteínas aplicadas.

Discussão

5 DISCUSSÃO

Os venenos de serpentes são compostos bioativos, constituídos por uma mistura bioquímica complexa, formada em grande parte por proteínas, cuja definição dos mecanismos de ação e de seus alvos, pode constituir importantes ferramentas farmacológicas e biotecnológicas (CALVETE, 2009, 2013; WARRELL, 2010).

Este 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 esclarecimento dos mecanismos envolvidos na fisiopatologia das respostas ao envenenamento, predispondo a descoberta de ferramentas farmacológicas ou substâncias farmacologicamente ativas (BON, 2000).

Dados prévios em nosso laboratório demonstraram ação vascular do veneno CDC com a participação do óxido nítrico de origem endotelial para a produção do efeito vasodilatador. Porém, tão importante quanto avaliar o efeito do veneno sobre os vasos sanguíneos e seus mecanismos de funcionamento, é identificar as possíveis ações deste veneno sobre a atividade cardíaca, tendo em vista que os venenos são conhecidos por apresentar influências sobre o sistema cardiovascular.

O presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de investigar as influências diretas dos venenos CDC sobre a atividade cardíaca de ratos e seus possíveis mecanismos de ação envolvidos. Uma das principais constatações foi a ação inotrópica negativa de CDC em átrio isolado de animais normotensos, sem alteração na ritmicidade cardíaca. Estes efeitos parecem envolver a produção de NO, ativação de CGs, PKG. Em adição, o efeito inotrópico negativo observado parece não ser decorrente de uma morte celular ou atividade tóxica do veneno, uma vez que não foi constatado alterações significativamente na atividade da enzima creatina cinase, a atividade eletrogênica de característica cardiotóxica e viabilidade celular de cardiomiócitos. Adicionalmente, através da realização de análises morfológicas e na ultraestrutura de células cardíacas, alterações importantes em relação ao controle não foram observadas em átrios tratados com CDC.

O veneno crotálico de algumas espécies pode desencadear ações neurotóxicas, miotóxicas do musculo esquelético além de coagulantes. No sistema cardiovascular podem ser observados quadros de hipotensão, alterações na permeabilidade vascular, alterações enzimáticas ou ainda arritmia sinusal (SANTOS et al., 1990; ZHANG et al., 2010). Porém,

ensaios com veneno da *Crotalus durissus cascavela* (CDC) em tecido cardíaco ainda não foram descritos na literatura. Diante dessa falta de conhecimento científico, foi investigado se o veneno bruto de CDC poderia apresentar atividade direta em tecido cardíaco.

Para tanto, foram realizados ensaios com átrio isolado de ratos normotensos (Wistar). Os resultados com átrio isolado demonstram que o veneno da CDC induziu um efeito inotrópico negativo de maneira concentração dependente, uma vez que reduziu a força de contração, sem alteração da automaticidade cardíaca. Esses achados assemelham-se a ensaios realizados com coração isolado de porco na presença do veneno de outra espécie do mesmo gênero, a *Crotalus durissus terrificus*, onde também foi observado efeito inotrópico negativo, sem alterações significantes da frequência cardíaca (SANTOS et al., 1990). Apesar de existirem estudos demonstrando efeitos cardíacos de venenos desse gênero, ainda não foram desvendados os mecanismos de ação por trás desse efeito inotrópico negativo observado.

O veneno CDC possivelmente pode está atuando sobre a maquinaria contrátil cardíaca, já que a automaticidade não foi alterada, o que pode ser indicativo de uma provável ausência de ação sobre o nó sinoatrial. O nó sinoatrial, que tem função de marcapasso, é uma estrutura importante para o funcionamento do músculo cardíaco, pois ele comanda o ritmo cardíaco e é a partir dele que é gerado o sinal elétrico para as outras partes do coração. Ele controla o ciclo cardíaco que é dividido em duas fases: diástole e sístole (KATZ, 1992).

Já maquinaria contrátil cardíaca é composta pelos filamentos finos que apresentam em sua composição a actina, nebulina (que age como um citoesqueleto do filamento), tropomiosina e a troponina, formada por suas três subunidades (troponina T, troponina I e troponina C) com a função de regular a interação entre os filamentos finos e grossos. Os filamentos grossos, por sua vez, são formados principalmente pela proteína miosina, contando também com outras proteínas como a titina, que compõe o citoesqueleto do filamento (KOEPPEN; STANTON, 2008). A função contrátil cardíaca é mantida graças à geração e condução do estímulo elétrico sendo regulada pelo nível de cálcio citosólico e pela sensibilidade dos elementos contráteis ao cálcio (KARAKI et al., 1997), regulando a força e a frequência dos batimentos cardíacos (BERS, 2006).

Após a investigação do efeito atrial de CDC em animais normotensos, foram avaliadas as influências de CDC em cardiomiócitos isolados de ventrículo de ratos. A utilização do miócito cardíaco isolado permite estudar as bases microscópicas da contração cardíaca (KRUEGER; FORLETTI; WITTENBERG, 1980), possibilitando entender os mecanismos

envolvidos na contração da célula sem as influências elásticas da matriz extracelular, bem como das células adjacentes.

Ensaio para avaliação da contratilidade podem ser analisados a partir da dinâmica de encurtamento dos miócitos cardíacos. Nessa metodologia utiliza-se imagens das células obtidas por microscópio para quantificar a variação no comprimento da célula que ocorre durante a contração.

Os resultados obtidos com a medição da contratilidade pela variação do comprimento da célula mostram que o CDC foi capaz de induzir uma redução na fração de encurtamento assim como, reduzir a velocidade de partida na última concentração utilizada, sugerindo que a contratilidade cardíaca do miócito isolado foi modificada. A fração de encurtamento é um índice que calcula a porcentagem de alteração da altura do pico na contração celular e, velocidade de partida avalia a rapidez que a contração acontece possivelmente ou como a concentração de Ca^{2+} no citosol aumentou, como resultado de algum insulto mecânico ou farmacológico (IONOPTIX, 2018).

Por outro lado não foi observada nenhuma alteração no parâmetro Tempo para 10% de pico de contração (TP 10%). Assim como a velocidade de partida, o TP 10% caracteriza a velocidade de resposta da célula, porém a interpretação é um pouco diferente entre estes dois parâmetros: duas células podem ter a mesma velocidade de encurtamento, mas o intervalo de tempo para a célula iniciar a contração pode ser diferente (SMAIL, et al., 2016; IONOPTIX, 2018).

Poucos estudos demonstram o efeito de um veneno ou toxina sobre a contratilidade de células cardíacas, porém nosso trabalho é pioneiro em avaliar o efeito de veneno do gênero *Crotalus* sobre a contratilidade de cardiomiócitos. Os resultados obtidos nesse protocolo experimental estão consistentes com os ensaios de átrio isolado, onde o CDC apresentou efeito inotrópico negativo em átrio isolado.

É descrito na literatura que alguns venenos de serpentes são capazes de causar algum tipo de lesão, tanto em tecido muscular esquelético como em músculo cardíaco, em acidentes ofídicos (DIAS, et al., 2012; LOMONTE, ANGULO e CALDERÓN, 2003; DE PAOLA; ROSSI, 1993; MEBS; OWNBY, 1990; OWNBY, 1998; GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1995). Dessa forma, foi realizada uma série de ensaios com objetivo de investigar se o efeito

inotrópico negativo induzido por CDC, nos experimentos anteriores, estavam relacionados com algum dano cardíaco.

O primeiro ensaio realizado foi o teste de viabilidade celular, onde cardiomiócitos de rato da linhagem H9c2 foram utilizados para avaliar a citotoxicidade desses compostos utilizando Alamar Blue® (sal de resazurina) como indicador de crescimento celular. O Alamar Blue® é um indicador de viabilidade celular não tóxico, solúvel em água, estável no meio de cultura e que já foi utilizado em diversos tipos celulares. Resazurin é o componente oxidado do Alamar Blue que ao ser adicionado à cultura entra no citosol das células e é convertido à forma reduzida (resorufin) pela atividade de enzimas mitocondriais, através da captação de elétrons dos cofatores NADPH, FADH, FMNH e NADH, bem como de citocromos. Através desta reação de oxi-redução, o corante passa da cor azul (forma oxidada) para rosa (forma reduzida), mudança de cor esta que pode ser medida pela leitura colorimétrica. As cores intermediárias, entre a forma oxidada e completamente reduzida, indicam a porcentagem de células viáveis e, conseqüentemente, o nível de toxicidade da droga ou componente testado (FIELDS e LANCASTER, 1993; AHMED et al., 1994; O'BRIEN et al., 2000; BIOSOURCE ALAMAR BLUE® ASSAY, Technical Bulletin).

No nosso estudo foi observado que o veneno CDC não foi capaz de alterar a proliferação celular, sugerindo uma pequena ou ausente ação tóxica do veneno CDC nas concentrações testadas. Diferentemente do que foi encontrado nesse trabalho, alguns L-aminoácidos oxidases (LAAO) isolados de outras espécies do gênero *Crotalus* demonstraram efeito citotóxico sobre diferentes linhagens de células cancerígenas. Os estudos mais recentes, como no de Teixeira et al (2016) um LAAO isolado da *Crotalus durissus terrificus* exibiu citotoxicidade em células de câncer, onde Glioma e células de carcinoma pancreático foram as linhagens celulares mais sensíveis (TEIXEIRA, et al., 2016). Já o LAAO da *Crotalus mitchellii pyrrhus* (Cmp-LAAO) exibiu citotoxicidade contra células de adenocarcinoma de próstata LNCaP. A viabilidade de células LNCaP diminuiu de uma maneira dependente da concentração e do tempo com a administração de Cmp-LAAO. O efeito prejudicial da LAAO parece ser devido à sua atividade enzimática, que produz peróxido de hidrogênio que pode então induzir o estresse oxidativo dentro das células (TAN et al., 2017).

Estudos anteriores também demonstraram o efeito citotóxico da crotoxina isolada da *Crotalus durissus terrificus* sobre glioma e células cancerígenas de pâncreas e pulmonares, sendo essa última intermediada pela via de sinalização p38MAPK (HAN et al., 2014;

MULLER et al., 2018). Nenhum trabalho avaliando o potencial citotóxico de CDC ou de seus constituintes foi encontrado na literatura, demonstrando novamente a importância desse estudo para a ciência.

Com o objetivo de investigar se o efeito cardíaco induzido pelo CDC estaria relacionado com dano cardíaco, foi realizado também a quantificação da atividade da enzima creatina cinase (CK), que é uma importante enzima reguladora da produção e utilização de fosfatos de alta energia nos tecidos contráteis. Ela é encontrada na musculatura esquelética, no músculo cardíaco e no cérebro. A CK é um dímero composto de duas subunidades B (brain) e M (muscle) que formam as três frações principais. Estas duas cadeias podem combinar-se de três formas, formando as chamadas isoenzimas da CK: CK-MM, CK-MB e CK-BB. Estas enzimas não possuem ação fisiológica conhecida no plasma, tendo níveis de atividades mais elevados nos tecidos do que na circulação (ADAIR e HAVRANECK, 1996). A CK-MB está presente no miocárdio, onde representa cerca de 20% da CK total presente. No infarto agudo do miocárdio, a CK total começa a se elevar em até 6 horas após a ocorrência do infarto (SCIENTIFIC DIVISION, WORKING GROUP ON ENZYMES, 1999; YOUNG, D.S., 2000).

Nos ensaios realizados nesse estudo, foi possível observar que o veneno CDC não induziu aumento dos níveis de CK-Total e de CK-MB nas soluções que banhavam as amostras de átrio, sugerindo que esse veneno não é miotóxico para o tecido nas concentrações testadas.

No estudo de CUPO et al. (2003), foram realizadas medidas de CK plasmática e CK-MB em vítimas humanas que sofreram acidente ofídico com *Crotalus durissus terrificus*, onde foi observado um aumento da atividade dessas enzimas num padrão semelhante ao observado no infarto agudo do miocárdio, embora o curso clínico e dados eletrocardiográficos e eletrocardiográficos não sugeriram envolvimento cardíaco (CUPO et al., 2003).

A atividade mionecrótica do veneno de algumas serpentes está relacionado ao seu conteúdo de fosfolipase A2 (PLA₂), como a fosfolipase bothropstoxins para as espécies do gênero *Bothrops* (GUTIERREZ et al., 1991; MELO et al., 1993; OLIVEIRA et al., 2003), embora este veneno contenha outras PLA₂ (BONFIM et al 2001; ANDRIÃO-ESCARSO et al., 2002; KETELHUT et al., 2003; KASHIMA et al., 2004; PONCE-SOTO et al., 2006). Já a neuro e miotoxicidade crotálica está principalmente atribuída à alta concentração de crotoxina, uma PLA₂ heterodímera (SAMPAIO et al., 2010). A crotoxina tipicamente constitui 70-90% das toxinas presentes nessa espécie (BOLDRINI-FRANÇA et al., 2010;

CALVETE et al., 2010). O veneno de *Crotalus durissus ssp.* também contém quantidades variáveis de crotamina, uma outra toxina mionecrótica (OGUIURA. et al., 2005).

A ausência do aumento da atividade de CK por CDC observada nesse estudo pode ser devido possivelmente a uma diminuição na proporção desses agentes miotóxicos no veneno bruto utilizado, assim como, uma ação preferencial sobre tecidos musculares esqueléticos e não a tecido cardíaco, como demonstrado pelo estudo de CUPO et al. (2003).

Para descartar a possível presença de danos teciduais induzidos pelos venenos, foram realizados ensaios morfológicos de tecidos atriais tratados com CDC em banho de órgãos os quais não demonstraram alterações morfológicas importantes quando comparados ao controle, sugerindo dessa forma, uma provável ausência de efeito miotóxico do veneno nas concentrações utilizadas. Em ensaios com Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), a qual possibilita a aquisição de imagens com resolução muito superior às obtidas com microscópios ópticos comuns (CETENE, 2018), foram observadas alterações celulares pontuais quando comparado ao grupo que recebeu veículo, de maneira que parece não alterar a função cardíaca. Experimentos com MET são comuns para avaliar a toxicidade de produtos com potencial farmacológico. É observada a presença de edema, formação de vacúolos, tumefação e lise mitocondrial, organização das fibras contráteis dentre outros achados que podem indicar toxicidade em comparação aos grupos controles (WONG, et al., 2017; GE, et al., 2017; ALTINOZ, BILIR, ELMACI, 2018).

Nossos dados morfológicos vão de encontro com alguns dados da literatura que reportam que outras espécies do gênero *Crotalus* são capazes de alterar morfológicamente tecidos cardíacos, como a *Crotalus horridus horridus*, a qual foi capaz de induzir degenerações localizadas no músculo ventricular 5 minutos após o início da infusão de 33 µg/ml de veneno em corações isolados de ratos. Também foram mostradas fibras com perda de estrias transversais e alguns segmentos contendo coloração mais pálida; nas áreas mais afetadas, perda completa de coloração e ruptura celular foi evidente (KEMPSFORD, 1987; HAWGOOD, 1987). Já em tecido cardíaco de ratos que receberam alta dose de veneno de *Crotalus durissus terrificus* (80 µg de em 0,2 ml de solução salina i.p), apresentaram fibras musculares inchadas, bandas de contração e necrose miocitolítica – e que foram associados com edema leve a moderada do interstício, bem como infiltração de células mononucleares e de um grande número de mastócitos (DE PAOLA, 1993; ROSSI, 1993).

Estudos mostraram que os venenos da subespécie *C. d. terrificus*, *C. d. cascavella* e *C. d. collilineatus* possuíam atividades biológicas similares, exceto pequenas diferenças na atividade indutora de edema da pata, perfil eletroforético, atividade de fosfolipase A₂ e teores de elementos inorgânicos no veneno de CDC. Adicionalmente foi reportada a ausência de crotamina no veneno de CDC, o que pode estar associada a uma menor atividade miotóxica. Além disso, a presença tanto de crotamina como de uma alta atividade de PLA₂ fornece ao veneno de *C. durissus terrificus* uma maior atividade miotóxica quando comparada a outros venenos da mesma subespécie (SANTORO et al., 1999).

O veneno crotálico, no sistema cardiovascular, pode induzir 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; BRASIL, 2001; ZHANG et al., 2010). Então com o objetivo de investigar os efeitos dos venenos sobre a atividade elétrica cardíaca e avaliar indícios de cardiotoxicidade, foram realizados experimentos com coração isolado, utilizando a técnica de Langendorff.

O método de perfusão de Langendorff é uma técnica experimental de grande utilidade no entendimento da fisiologia e da farmacologia cardíaca. Seu princípio básico consiste em perfundir as artérias coronárias através de uma cânula de perfusão retrógrada inserida na aorta. Quando se alcança uma pressão adequada do líquido nutriente, a válvula aórtica se fecha permitindo o fluxo pelas coronárias, de modo que todo o tecido seja perfundido (BERNAL et al., 2004), possibilitando a difusão da substância teste em todo o órgão. Eletrodos para captação dos sinais elétricos também foram fixados em seu tecido para determinar os parâmetros eletrocardiográficos. A avaliação da resposta dos venenos sobre a pressão intraventricular esquerda não foi possível devido à ausência do balonete no equipamento.

Os resultados observados nesse estudo sugeriram que o veneno de CDC não exerce efeito sobre a eletrogênese cardíaca, evidenciado pela não alteração de alguns parâmetros elétricos como frequência cardíaca, intervalo QT e intervalo RR. Esses dados se assemelham aos ensaios realizados por Breithaupt, H (1976), que demonstrou ausência de efeitos cardiotoxícos na preparação de Langendorff de corações de ratos perfundidos apenas com fosfolipase A (6 × 10⁻⁶ M) ou em conjunto com o crotapotina (10⁻⁵ M) isolados da *Crotalus durissus terrificus*. Em contrapartida, o estudo de Kempsford; Hawgood. (1987) com coração isolado de rato, também perfundido através da utilização do sistema de langendorff, foi utilizado para examinar os efeitos de uma infusão por 4 minutos do veneno de *Crotalus*

horridus horridus (3,3 -33 µg/ml). Foi observada uma perda progressiva do componente RST do ECG, o que, em conjunto com a ausência de quaisquer efeitos sobre a frequência sinusal e as ondas P e Q, pôde sugerir uma ação ventricular específica desse veneno.

Esse método apresenta algumas limitações, dentre elas a impossibilidade de estudo da influência humoral e dos eventos pós e pré-carga não fisiológicos, além das consequências da oxigenação inadequada e não fisiológica do tecido durante a perfusão. Esta última requer um alto fluxo coronariano, muito acima do fluxo fisiológico (até 10 vezes maior) para oxigenar adequadamente o tecido cardíaco, evitando assim morte tecidual por isquemia (BERNAL et al., 2004). Dessa forma, seria necessários outros experimentos para uma melhor avaliação dos parâmetros de ECG em animais tratados com CDC.

A partir da observação da provável ausência de feitos tóxicos de CDC nas concentrações utilizadas, de seu efeito inotrópico negativo em átrio isolado e indutor de redução da fração de encurtamento de cardiomiócitos, se fez necessário avaliar os mecanismos de ação relacionados aos efeitos cardíacos de CDC. Para isso, inicialmente, foram realizados experimentos na presença de conhecidos agonista e antagonista adrenérgico (epinefrina e propranolol respectivamente). A epinefrina foi utilizada com o objetivo de avaliar se o CDC seria capaz de reverter o aumento da força de contração induzido por essa droga uma vez que o sistema nervoso simpático libera catecolaminas durante a resposta de luta ou fuga e, aumenta o influxo de cálcio através dos canais de cálcio do tipo L levando a um melhor desempenho cardíaco (BAKER, 2014, HULME et al., 2006). A Estimulação aguda de receptores β -adrenérgicos (β AR) regula o débito cardíaco na resposta de luta ou fuga, enquanto a estimulação crônica de β AR desempenha um papel importante na remodelação cardíaca fisiológica e patológica (WOO e XIAO, 2017).

A sinalização β -adrenérgica simpática é um modulador inotrópico e lusitrópico bem estabelecido do acoplamento excitação-contração (AEC) cardíaco. Quando as catecolaminas se ligam a β ARs, ocorrem mudanças conformacionais no receptor permitindo o seu acoplamento a proteínas G heterotriméricas. Isso resulta na substituição do GDP na subunidade $G\alpha$ das proteínas G pelo GTP e subsequente dissociação do heterotrímero em subunidades ativas $G\alpha$ -GTP e $G\beta\gamma$ para mediar a sinalização a jusante (WESS, 1997). $G\alpha$ -GTP depois estimula a adenilil ciclase (AC) que resulta na formação de AMP cíclico (AMPc). AMPc subsequentemente ativa proteínas cinases que fosforilam várias proteínas essenciais para eletrofisiologia, balanço de cálcio, e, portanto, AEC, incluindo o canal de cálcio do tipo

L, fosfolambam, receptor de rianodina, troponina I e proteína C de ligação a miosina (ZHAO, et al., 1994; KAUMANN et al., 1999; KUNST, 2000; MARX, et al., 2000; BERS, 2002; LOHSE, ENGELHARDT, ESCHENHAGEN, 2003).

Como observado em nosso estudo, a epinefrina (10 μM) foi capaz de induzir um aumento da força de contração em átrio isolado de maneira significativa, e a adição de CDC (10 e 30 $\mu\text{g/ml}$) foi capaz de reverter esse aumento de maneira significativa, sugerindo dessa forma, que o CDC pode ser capaz de induzir um efeito inotrópico negativo em átrio isolado em situações de elevação de atividade do sistema nervoso simpático.

Com a finalidade de avaliar se o veneno CDC estaria induzindo um efeito inotrópico negativo através de ação antagônica em receptores adrenérgicos no tecido cardíaco, foi utilizado o propranolol (10 μM), um antagonista de receptores adrenérgicos (JEONG et al., 2018). Como resultado foi observado a redução na contratilidade atrial na presença de propranolol e, o CDC ainda foi capaz de induzir efeito inotrópico negativo, mesmo na presença desse bloqueador, sugerindo dessa forma, que o veneno não necessita de uma ligação aos receptores adrenérgicos para induzir o efeito cardíaco observado.

Santos et al (2017) descreveu em seu trabalho o provável mecanismo de ação do efeito vasorelaxante de CDC em artéria mesentérica isolada de rato. Neste estudo foi demonstrado a participação da via do óxido nítrico/ guanilato ciclase/proteína cinase G (PKG) e hiperpolarização do músculo liso vascular via ativação dos canais de K^+ no efeito vasodilatador de CDC. Então, tendo em vista esse conhecimento, foi avaliada a participação do óxido nítrico (NO) e da via guanilato ciclase/ PKG no efeito inotrópico negativo induzido por CDC. Para isso, foram utilizados inicialmente L-NAME e PTIO, um inibidor não seletivo de NOS e um sequestrador de NO respectivamente. Como resultado obtido foi observado que a adição de L-NAME e PTIO induziu uma atenuação importante do efeito inotrópico negativo causado por CDC, sugerindo dessa forma, um possível envolvimento do NO na resposta cardíaca observada.

O óxido nítrico (NO) é um mediador endógeno com propriedades vasorelaxantes e, foi originalmente chamado de fator relaxante derivado do endotélio (EDRF) (FURCHGOTT e ZAWADZKI, 1980). Os estudos que se seguiram mostraram que o NO é um importante mediador fisiológico e modulador potente de muitas funções biológicas. Hoje é bem descrito que o NO é um dos principais moléculas sinalizadoras no sistema cardiovascular e nervoso. Os estudos mais recentes de cardiomiócitos identificaram a função do NO na regulação do

crescimento e remodelação cardíaca; desempenho contrátil, ritmicidade e taxas metabólicas (SMILJIĆ, 2014).

O NO pode ser sintetizado a partir de L-arginina usando três isoformas diferentes da óxido nítrico sintase (NOS), duas das quais são constitutivas, endoteliais (eNOS, NOSIII) e as isoformas neuronais (nNOS, NOSI), manifestada sob condições fisiológicas, enquanto a terceira isoforma, óxido nítrico sintase induzível (iNOS, NOSII), é biossintetizada somente após a estimulação por uma variedade de agentes estressores e citocinas (MASSION, et al., 2003). Enzimas constitutivas geram uma pequena quantidade de NO, enquanto a atividade da iNOS é de aproximadamente mil vezes maior (MASSION, et al., 2003).

O NO é relatado como tendo efeitos inotrópicos bifásicos na contratilidade. A resposta inotrópica positiva ao NO em isolados cardiomiócitos foi obtido em vários estudos (KOJDA, et al., 1997; VILA-PETROF, 1999); no entanto, também há dados sobre NO causando um efeito inotrópico negativo, porém em maiores concentrações (BRADY, et al., 1993). Valores baixos de NO, estão mais frequentemente associadas à geração desse produto endogenamente, causando uma resposta inotrópica positiva, enquanto concentrações mais altas causam uma resposta inotrópica negativa consistente.

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

Os mecanismos de ação do NO na célula cardíaca são mediados pelo aumento da concentração da GMPc, por efeitos direto do NO sobre proteínas alvo ou por efeitos indiretos mediados por derivados do NO. Assim como ocorre na célula muscular lisa, o NO tem como alvo na célula cardíaca a enzima guanilato ciclase solúvel (GCs). Uma vez ativada, a GCs catalisa a conversão de GTP em GMPc, que conseqüentemente ativa a PKG (HARTZELL e FISCHMEISTER, 1986; MERY et al., 1991; MAYOURIAN, et al., 2018).

Então, com o objetivo de avaliar a participação da Guanilil ciclase (GC) no efeito cardíaco induzido por CDC foi utilizado ODQ, um inibidor seletivo de GC nos experimentos com átrio isolado. Neste experimento foi demonstrado que a via CG/GMPc é importante para o efeito inotrópico negativo induzido pelo veneno, desde que esse efeito foi expressamente

reduzido pelo ODQ. Estes resultados, em conjunto, sugerem que o efeito cardíaco induzido pelo veneno da CDC pode ser devido a liberação de NO e consequente ativação da enzima guanilil-ciclase solúvel.

A PKG, proteína ativada pelo GMPc, pode inibir o influxo de cálcio para a célula, que ocorre através dos canais de cálcio voltagem-dependentes presentes na membrana celular (HARTZELL e FISCHMEISTER, 1986; MERY et al., 1991) e pode diminuir a sensibilidade dos miofilamentos ao cálcio (SHAH et al., 1994; YASUDA e LEW, 1997), provavelmente através da fosforilação da troponina I (TnI) (LAYLAND et al., 2005) para produzir um efeito inotrópico negativo em tecido cardíaco. Tendo em vista esse conhecimento, foi avaliado no presente estudo, a participação da PKG no efeito cardíaco induzido por CDC através da utilização de um inibidor seletivo da PKG, o KT5823.

Resultados demonstraram que na presença de KT5823 o CDC não foi capaz de induzir inotropismo negativo em átrio isolado, sugerindo dessa forma, uma possível participação, pelo menos em parte, da via NO/GMPc/PKC no efeito cardíaco do veneno avaliado.

Após a realização de experimentos celulares e teciduais, é de extrema importância a avaliação do efeito de CDC em sistemas vivos, permitindo a observação das influências de diversos sistemas, como o sistema nervoso e endócrino, sobre o efeito cardiovascular de CDC. Dessa forma, foram realizados inicialmente experimentos para avaliar os efeitos hemodinâmicos do veneno em ratos não anestesiados.

Nestes animais, CDC induziu uma resposta hipotensora dose-dependente seguida por um efeito bradicárdico que não dependeu da dose. O efeito hipotensor causado por CDC pode estar relacionado à diminuição da resistência vascular periférica, como demonstrado no trabalho de Santos et al. (2017) com experimentos *in vitro* com artéria mesentérica isolada de ratos, onde CDC mostrou um efeito vasodilatador dependente da presença do endotélio vascular. Já o efeito bradicárdico, pode estar relacionado ao efeito direto do veneno sobre o tecido cardíaco, como demonstrado no presente estudo, com importante papel do NO para exercer essa ação. Importante ressaltar que a avaliação do efeito da administração aguda de CDC sobre a PA e FC de ratos foi realizada em animais não anestesiados, pois a anestesia pode modificar os níveis de PA e FC e do funcionamento do sistema nervoso simpático e o barorreflexo, tornando sua medida em estado conciso importante (FLUCKIGER et al., 1985; SUN et al., 1995).

Uma redução significativa na pressão arterial também foi observada no trabalho de Evangelista et al. (2011), com a administração intravenosa de CDC em ratos normotensos. O veneno evocou uma diminuição dependente da dose da pressão arterial média, frequência cardíaca e respiratória com aumento dos níveis plasmáticos de nitrito. Adicionalmente L-NAME (10 mg/kg) bloqueou tanto a hipotensão e aumento da produção de nitrito após a administração do veneno, sugerindo a participação do NO no efeito hipotensor de CDC. Outras toxinas presentes em venenos de serpentes também já foram descritas possuírem efeitos hipotensores, como descrito por Joseph et al. (2004).

Parâmetros eletrogênicos também foram avaliados em animais vivos que receberam CDC por via endovenosa, através de ensaios de eletrocardiograma (ECG). Com o uso do ECG, é possível detectar alterações tanto no tempo quanto na intensidade das ondas elétricas cardíacas, bem como identificar lesões no próprio músculo cardíaco (NOLTE e MCKEE, 2004). Sua eficiência se mostra fidedigna no diagnóstico, uma vez que, alterações funcionais refletem mudanças na propagação do potencial de ação no músculo cardíaco, ocasionando consequentemente mudanças nas ondas do próprio ECG (ARNOLD et al., 2011; SCHWARZ, 2009).

Como resultado, foi obtida apenas alteração significativa na FC nas doses 0,1, 0,3 e 1 µg/kg, semelhante com o observado nos experimentos *in vivo* anteriores, sem qualquer modificação na duração do intervalo PR, QRS e QTc. Esse dado sugere uma possível ausência de cardiotoxicidade uma vez que, experimentos com toxinas cardiotoxícas demonstraram alterações proeminentes no ECG de ratos como taquicardia ventricular monomórfica, períodos de assistolia alternando com complexos QRS largos até total ausência de atividade elétrica (HUANG et al., 1993; GOMES et al., 2001). O efeito bradicárdico de CDC observado no ECG corrobora também com os experimentos de Evangelista et al. (2011), que demonstraram efeito bradicárdico de CDC.

Estudos pré-clínicos com modelos animais *in vivo* desempenham papel significativo na avaliação cardiológica e podem ajudar a elucidar fenômenos gerados pela ação de fármacos, lesões que acompanham a associação com outras substâncias, entre outras (LAMFERS et al., 2001; SUZUKI et al., 2008).

Com objetivo de avaliar o efeito do veneno de CDC sobre o tecido atrial de ratos não-sadios, foram realizados experimentos com átrio isolado de ratos espontaneamente hipertensos (SHR).

O endotélio é um importante regulador do tônus vascular, liberando substâncias como óxido nítrico derivados do endotélio (EDRF), fatores hiperpolarizantes derivado do endotélio, metabólitos da ciclooxigenase, endotelina e outros fatores de contração derivados do endotélio (EDCF). Em um grande número de patologias cardiovasculares, como hipertensão ou insuficiência cardíaca, o equilíbrio na produção endotelial de mediadores vasodilatadores e vasoconstritores são alterados. A aparente diminuição no relaxamento dependente do endotélio é denominada "disfunção endotelial". A disfunção endotelial observada em SHRs é provavelmente consequência da hipertensão arterial (BOULANGER, 1999). Em grandes artérias de SHR, os relaxamentos dependentes do endotélio são prejudicados, principalmente devido ao concomitante liberação aumentada de endoperóxidos e ânions superóxido.

Como observado nesse trabalho, o CDC não foi capaz de induzir um efeito inotrópico e/ou cronotrópico importante em átrio isolado de animais SHRs, sugerindo que o endotélio das coronárias são importantes para o efeito cardíaco de CDC.

Sabendo-se que o veneno é constituído por uma mistura de diversas substâncias e que o CDC possui atividade biológica sobre o sistema cardiovascular, pode-se relacionar esse efeito cardíaco a um ou mais componentes do veneno. A neuro e a miotoxicidade sistêmica das mordidas de *C. durissus* ssp. são principalmente atribuíveis à alta concentração de crotoxina, uma molécula heterodimérica de PLA₂ (WARRELL, 2004; BOLDRINI-FRANCA et al., 2010). Diferenças na composição do veneno entre as subespécies de serpentes já são relatadas na literatura, assim como dentro da mesma subespécie de acordo com a variação geográfica (BOLDRINI-FRANCA et al., 2010). Variabilidade na composição do veneno tem sido associada com fatores, como a idade (JIMENEZ-PORRAS, 1964), localização geográfica (CHIPPAUX e GOYFFON, 1998; RODRIGUES et al., 1998; FRANCISCHETTI et al., 2000), sexo (MARSH e GLATSTON, 1974) e hábitos alimentares (DALTRY et al., 1996).

Portanto, a fim de caracterizar o veneno do CDC bruto, foi utilizada a eletroforese SDS-PAGE e RP-HPLC, onde foram observados perfis cromatográficos semelhantes à literatura (BOLDRINI-FRANCA et al., 2010), com a presença de crotoxina e um possivelmente concentração de D49-PLA₂ ácida (fração 3). Na eletroforese, o veneno apresentou uma banda com cor mais intensa perto de 14,4 KDa, que pode corresponder à dissociação das subunidades CA e CB, que tendem a ocorrer na presença de SDS e a aparecer em gel na forma de monômero e dímero (RANGEL-SANTOS et al., 2004).

Tipicamente a Crotoxina constitui 70-90% das toxinas presentes nesta espécie (BOLDRINI-FRANÇA et al., 2010; CALVETE et al., 2010). Essa toxina é composta de duas subunidades, a subunidade ácida não-tóxica (CA) denominada crotapotina, que não possui atividade de PLA₂, e a subunidade básica (CB) fracamente tóxica, que exibe atividade da PLA₂. Acredita-se que a crotapotina se comporta como um transportador para a subunidade B, reduzindo sua interação inespecífica e, portanto, aumentando a ligação com seu alvo (RANGEL-SANTOS et al., 2004; SAMPAIO et al., 2010). A crotoxina é a principal responsável pelos efeitos neurotóxicos e nefrotóxicos que caracterizam o envenenamento por essas serpentes (OLIVEIRA et al., 2015).

Salvini et al. (2001) demonstrou em ratos que a crotoxina, o principal componente do veneno de *C. durissus terrificus*, causa lesão muscular sistêmica e seletiva, com apenas músculos ou regiões musculares consistindo de fibras tipo I e do tipo IIa sendo danificadas.

Outro componente do veneno responsável pela atividade miotóxica é a crotamina, que causa paralisia associada a hiperextensão dos membros posteriores de camundongos (CHEYMOL et al., 1971; MEBS e OWNBY, 1990). O pico correspondente a essa toxina não foi detectada no nosso ensaio de cromatografia, o que está de acordo com o estudo de Santoro (1999) e Boldrini-Franca (2010), onde os venenos de CDC se mostraram ser crotamina negativa. A ocorrência de populações positivas para crotamina são descritas para *C. d. collilineatus* no meio-oeste do Brasil.

A crotamina é pertencente à família das miotoxinas polipeptídicas básicas, as quais possuem a capacidade de penetração intracelular, através de mecanismos independentes de gasto energético, por interação com proteoglicanos (MATSUBARA, 2009). O efeito miotóxico é causado pela atividade sinérgica à da crotoxina, causando principalmente contrações musculares, dependentes da despolarização da membrana das células musculares estriadas esqueléticas. Esta ação provavelmente é exercida sobre os canais de sódio, pela indução do influxo de cálcio (LOMONTE et al., 2003).

A partir desse conhecimento pôde-se sugerir que o efeito cardíaco induzido pelo veneno de CDC pode estar relacionado à presença de crotoxina e da PLA₂ D49, e à redução do efeito tóxico pode estar relacionada à ausência da crotamina.

A partir do que foi descrito nesse estudo, podemos evidenciar o potencial biotecnológico do veneno de CDC para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos para

doenças cardiovasculares, uma vez que foram observados efeitos cardíacos do veneno, acompanhado de ausência de evidências que demonstrem possíveis efeitos tóxicos, que podem estar relacionados à ausência da crotamina. Os dados do presente estudo também explicam, pelo menos em parte, a hipotensão observada em pacientes que sofreram acidentes ofídicos por CDC. No entanto, outros experimentos são necessários para melhor caracterizar a toxicidade do veneno de CDC, assim como melhor investigar as possíveis vias celulares envolvidas nas respostas cardíacas induzidas por venenos.

Conclusão

6 CONCLUSÃO

- Esses dados em conjunto demonstram que o veneno CDC possui efeito cardíaco direto, induzindo efeito inotrópico negativo em animais normotensos, possivelmente através de sua ação na maquinaria contrátil;
- Evidências mostraram uma ausência de cardiotoxicidade do veneno nas concentrações testadas;

- CDC foi capaz de reduzir a fração de encurtamento de células cardíacas frescas de ratos, sugerindo um efeito sob a maquinaria contrátil;
- O CDC parece induzir efeito inotrópico negativo em átrio isolado de ratos dependente da participação da via NO/ GMPc/ PKC;
- CDC foi capaz de induzir hipotensão e bradicardia em animais vivos não anestesiados, possivelmente devido ao seu efeito vascular e cardíaco direto;

REFERÊNCIAS

- AIRD, S.D. Ophidian envenomation strategies and the role of purines. **Toxicon**, v. 40, n. 4, p. 335-393, 2002.
- ALTINOZ, M. A.; BILIR, A.; ELMACI, İ. Erucic acid, a component of Lorenzo's oil and PPAR- δ ligand modifies C6 glioma growth and toxicity of doxorubicin. Experimental data and a comprehensive literature analysis. **Chemico-biological interactions**, v. 294, p. 107-117, 2018.
- ARNOLDS, D. E. *et al.* The emerging genetic landscape underlying cardiac conduction system function. **Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology**, v. 91, n. 6, p. 578-585, 2011.
- AZEVEDO-MARQUES, M. M.; CUPO, P.; HERING, S. E. Acidentes por animais peçonhentos: serpentes peçonhentas. **Medicina, Ribeirão Preto. Online**, v. 36, n. 2/4, p. 480-489, 2003.
- BAKER, A. J. Adrenergic signaling in heart failure: a balance of toxic and protective effects. **Pflügers Archiv-European Journal of Physiology**, v. 466, n. 6, p. 1139-1150, 2014.
- BALLIGAND, J. L., FERON, O., KELLER, R. A. Role of nitric oxide in myocardial function. In: IGNARRO, L. J. (Ed.). **Nitric Oxide: Biology and Pathobiology**. Academic Press, 2007. p. 585-608.
- BARRAVIEIRA, B. Acute-phase response in snakesbite. **Toxicon**, v. 32, n.2, p. 311-315, 1994.
- BERS, D. M. Cardiac excitation–contraction coupling. **Nature**, v. 415, n. 6868, p. 198, 2002.
- BERS, D. M. Altered cardiac myocyte Ca regulation in heart failure. **Physiology**, v. 21, n. 6, p. 380-387, 2006.
- BÉRNILS, R. S.; COSTA, H. C. **Brazilian reptiles–List of species**. **Sociedade Brasileira de Herpetologia**. Disponível em: <http://www.sbherpetologia.org.br/checklist/repteis.htm> (último acesso em 05/05/2010), 2010. Acesso em: 2 set. 2016.
- BERNAL, D. R.; BALTAJE, E.; PASCUAL, G. A. La preparación de Langendorff: corazón de mamífero aislado perfundido. **Universitas Médica**, v. 45, n. 3, 2004.
- BERNSTEIN, K. 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, J. *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, C. *et al.* Postsynaptic effects of crotoxin and of its isolated subunits. **European Journal of Biochemistry**, v. 99, n. 3, p. 471-482, 1979.

BOULANGER, C. M. Secondary endothelial dysfunction: hypertension and heart failure. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 31, n. 1, p. 39-49, 1999.

BRASIL. MINISTÉRIO NACIONAL DA SAÚDE. Fundação nacional de Saúde. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. Brasília, 2001.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, Coordenação de Controle de Zoonoses e Animais peçonhentos, 1999. 131 p.

BRASIL. **MINISTÉRIO DA SAÚDE**. Portal da Saúde. **Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN)** [Internet]. Brasília; 2016. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=21383

BRADY, A. J. *et al.* Nitric oxide attenuates cardiac myocyte contraction. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 265, n. 1, p. H176-H182, 1993.

BURNEY, S. *et al.* The chemistry of DNA damage from nitric oxide and peroxynitrite. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 424, n. 1-2, p. 37-49, 1999.

CALVETE, J. J. Venomics: 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.

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

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

REBELLO HORTA, CC. *et al.* Cardiovascular-Active Venom Toxins: An Overview. **Current Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 6, p. 603-622, 2016.

CARDOSO, J. L. C. **Animais Peçonhentos do Brasil: biologia, clinica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Sarvier, 2003.

CASSINA, A.; RADI, R. Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 328, n. 2, p. 309-316, 1996.

CASSINA, A. M. *et al.* Cytochrome c nitration by peroxynitrite. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 28, p. 21409-21415, 2000.

CENTRO DE TECNOLOGIAS ESTRATÉGICAS DO NORDESTE. CETENE. **Microscopia eletrônica de transmissão**. Disponível em: <http://www.cetene.gov.br/pdf/met.pdf>> Acesso em: 05 nov. 2018.

- CEVESE, A. *et al.* The effect of Bites gabonica (gaboon viper) snake venom on external iliac and mesenteric arterial circulation in the dog. **Toxicon**, v. 21, p. 67-74, 1983.
- CHAI, O. H. *et al.* Histamine release induced by dendroaspis natriuretic peptide from rat mast cells. **Peptides**, v.22, p.1421-1426, 2001.
- CHEYMOL, J. *et al.* Action neuromusculaire compare de la crotamine et du venin de *Crotalus durissus terrificus* var. *crotaminicus*—I. Sur preparations neuromusculaires in situ. **Toxicon**, v. 9, p. 279–286, 1971.
- CHIPPAUX, J.-P.; GOYFFON, M. Venoms, antivenoms and immunotherapy. **Toxicon**, v. 36, n. 6, p. 823-846, 1998.
- CLISSA, P. B. **Otimização da atenuação da toxicidade do veneno crotálico irradiado e estudo de suas propriedades imunológicas.** 1997. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, 1997.
- CUNHA, E. M.; MARTINS, O. A. Principais compostos químicos presente 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.
- CUPO, P. *et al.* Absence of myocardial involvement in children victims of *Crotalus durissus terrificus* envenoming. **Toxicon**, v. 42, n. 7, p. 741-745, 2003.
- CURA, J. 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, *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.
- CUSHMAN, D. W.; ONDETTI, M. A. Design of angiotensin converting enzyme inhibitors. **Nature Medicine**, v. 5, n. 10, p. 1110-1112, 1999.
- DALTRY, J. C.; WÜSTER, W.; THORPE, R. S. Diet and snake venom evolution. **Nature**, v. 379, n. 6565, p. 537, 1996.
- DE OLIVEIRA, D. 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 OLIVEIRA, R. C.; WEN, F. H.; SIFUENTES, D. N. Epidemiologia dos acidentes por animais peçonhentos. In: CARDOSO, J.L.C et al. (Ed.) **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes.** 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2009.p. 6-21.
- DE PAOLA, F.; ROSSI, M. A. Myocardial damage induced by tropical rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) venom in rats. **Cardiovascular Pathology**, v. 2, n. 1, p. 77-81, 1993.
- DE PLATER, G.M.; MARTIN, R.L.; MILBURN, P.J. The natriuretic peptide (ovCNP-39) from platypus (*Ornithorhynchus anatinus*) venom relaxes the isolated rat uterus and promotes oedema and mast cell histamine release. **Toxicon**, v. 36, p. 847-857, 1998.

DIAS, L. *et al.* Cardiovascular responses to *Bothrops alternatus* (Urutu) snake venom in anesthetized dogs. **Cardiovascular Toxicology**, v. 12, n. 3, p. 243-257, 2012.

DIZ FILHO, E. B. dos Ss. **Caracterização estrutural e farmacológica de novas isoformas de PLA₂ crotálicas, dos venenos de *Crotalus durissus cumanensis* e *Crotalus durissus ruruima***. Dissertação (Mestrado)-UNICAMP. Campinas, São Paulo, 2007.

DUDZINSKI, D. M.; MICHEL, T. Life history of eNOS: partners and pathways. **Cardiovascular Research**, v. 75, n. 2, p. 247-260, 2007.

EVANGELISTA, J. *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.

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.

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.

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

FERNANDES, T. A.; AGUIAR, C. N.; DAHER, E. F. Envenenamento Crotálico: epidemiologia, insuficiência renal aguda e outras manifestações clínicas. **Revista Eletrônica Pesquisa Médica**, v. 2, n. 2, p. 1-10, 2008.

FLUCKIGER, J.-P. *et al.* Attenuation of the baroreceptor reflex by general anesthetic agents in the normotensive rat. **European Journal of Pharmacology**, v. 109, n. 1, p. 105-109, 1985.

FORSTERMANN, U. Regulation of nitric oxide synthase expression and activity. In: MAYER, B., (Ed.). **Nitric Oxide**. Berlim, Germany: Springer-Verlag Berlim Heidelberg, 2000. p. 71-91.

FRANCISCHETTI, I. M. B *et al.* Intraspecific variation in the venoms of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology**, v. 127, n. 1, p. 23-36, 2000.

FUKUTO, J. M.; CHO, J. Y.; SWITZER, C. H. The chemical properties of nitric oxide and related nitrogen oxides. In: IGNARRO, L. J. (Ed.). **Nitric Oxide Biology and Pathobiology**. San Diego, CA: Academic Press, 2000. p. 23-40.

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v. 288, n. 5789, p. 373, 1980.

GE, J. *et al.* Assessment of aflatoxin B1 myocardial toxicity in rats: mitochondrial damage and cellular apoptosis in cardiomyocytes induced by aflatoxin B1. **Journal of International Medical Research**, v. 45, n. 3, p. 1015-1023, 2017.

GHAFOURIFAR, P.; RICHTER, C. Nitric oxide synthase activity in mitochondria. **FEBS letters**, v. 418, n. 3, p. 291-296, 1997.

GOLD, B. S.; DART, R. C.; BARISH, R. A. Bites of venomous snakes. **New England Journal of Medicine**, v. 347, n. 5, p. 347-356, 2002.

GOMES, A.; DE, Pallabi; DASGUPTA, S. C. Occurrence of a unique protein toxin from the Indian King Cobra (*Ophiophagus hannah*) venom. **Toxicon**, v. 39, n. 2-3, p. 363-370, 2001.

GONZÁLEZ-ANDRADE, F.; CHIPPAUX, J.-P. Snake bite envenomation in Ecuador. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 104, n. 9, p. 588-591, 2010.

GONZALEZ-VILLALOBOS, R. 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.

GREEN, D. J. *et al.* Effect of exercise training on endothelium derived nitric oxide function in humans. **The Journal of Physiology**, v. 561, n. 1, p. 1-25, nov. 2004.

GUTIÉRREZ, J. M.; THEAKSTON, R. D. G.; WARRELL, D. A. Confronting the neglected problem of snake bite envenoming: the need for a global partnership. **PLoS Medicine**, v. 3, n. 6, p. e150, 2006.

GUTIÉRREZ, J. M. *et al.* Strengthening antivenom production in Central and South American public laboratories: report of a workshop. **Toxicon**, v. 49, n. 1, p. 30-35, 2007.

GUTIÉRREZ, J. M. *et al.* Stability, distribution and use of antivenoms for snakebite envenomation in Latin America: report of a workshop. **Toxicon**, v. 53, n. 6, p. 625-630, 2009.

GUTIÉRREZ, J. M. *et al.* Snakebite envenoming from a global perspective: Towards an integrated approach. **Toxicon**, v. 56, n. 7, p. 1223-1235, 2010.

GUTIÉRREZ, J. M. Envenenamientos por mordeduras de serpientes en América Latina y el Caribe: Una visión integral de carácter regional. **Boletín de Malariología y Salud Ambiental**, v.51, p. 1-16, 2011.

HAN, R. *et al.* Crotoxin induces apoptosis and autophagy in human lung carcinoma cells in vitro via activation of the p38MAPK signaling pathway. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 35, n. 10, p. 1323, 2014.

HARRISON, R. A. *et al.* Snake envenoming: a disease of poverty. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, n. 12, p. e569, 2009.

HARTZELL, H. C.; FISCHMEISTER, R. Opposite effects of cyclic GMP and cyclic AMP on Ca²⁺ current in single heart cells. **Nature**, v. 323, n. 6085, p. 273-275, 1986.

HAWGOOD, B.J. Physiological and pharmacological effects of rattlesnake venoms. In: TU, A.T. (Ed.). **Rattlesnake Venoms: their actions and treatment**. Marcel Dekker: New York, 1982. p. 121-162.

HECKER, M.; PÖRSTI, I.; BUSSE, R. Mechanisms involved in the angiotensin II-independent hypotensive action of ACE inhibitors. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 27, n. 8, p. 1917-1921, 1994.

HO, P.L. *et al.* Cloning of an unusual natriuretic peptide from the South American coral snake *Micrurus corallinus*. **European Journal of Biochemistry**, v.250, n.1, p.144-149, 1997.

HU, H. *et al.* Direct inhibition of expressed cardiac L-type Ca²⁺ channels by S-nitrosothiol nitric oxide donors. **Circulation Research**, v. 81, n. 5, p. 742-752, 1997.

HUANG, M.-Z. *et al.* Effects of an acidic phospholipase A2 purified from *Ophiophagus hannah* (king cobra) venom on rat heart. **Toxicon**, v. 31, n. 5, p. 627-635, 1993.

HULME, J. T. *et al.* Phosphorylation of serine 1928 in the distal C-terminal domain of cardiac CaV1. 2 channels during β 1-adrenergic regulation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 44, p. 16574-16579, 2006.

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

IONOPTIX. Monotonic Transient Analysis Parameters –.Technical notes. Disponível em: <http://www.ionoptix.com/wp-content/uploads/2014/07/Monotonic-Transient-Analysis-Defined.pdf>. Acesso em: 05 nov. 2018.

JANDROT-PERRUS, M. *et al.* Convulxin-induced platelet adhesion and aggregation: involvement of glycoproteins VI and IaIIa. **Platelets**, v. 9, p. 207-211, 1998.

JEONG, T.-Y. *et al.* Effect of β -adrenergic receptor agents on cardiac structure and function and whole-body gene expression in *Daphnia magna*. **Environmental Pollution**, 2018.

JIMÉNEZ-PORRAS, J. M. Intraspecific variations in composition of venom of the jumping viper, *Bothrops nummifera*. **Toxicon**, v. 2, n. 3, p. 187-195, 1964.

JOSEPH, R. *et al.* Hypotensive agents from snake venoms. **Current Drug Targets-Cardiovascular & Hematological Disorders**, v. 4, n. 4, p. 437-459, 2004.

KARAKI, H. *et al.* Calcium movements, distribution, and functions in smooth muscle. **Pharmacological reviews**, v. 49, n. 2, p. 157-230, 1997.

KASTURIRATNE A. *et al.* The global burden of snakebite: a literature analysis and modeling based on regional estimates of envenoming and deaths. **PLoS Medicine**, v. 5, p. e218, 2008.

KATZ, A. M. Heart failure in 2001: a prophecy. **American Journal of Cardiology**, v. 70, n. 10, p. 126-131, 1992.

KAUMANN, A. *et al.* Activation of beta2-adrenergic receptors hastens relaxation and mediates phosphorylation of phospholamban, troponin I, and C-protein in ventricular myocardium from patients with terminal heart failure. **Circulation**, v. 99, p. 65–72. 1999.

KELM, M. *et al.* Nitric oxide induced contractile dysfunction is related to a reduction in myocardial energy generation. **Cardiovascular Research**, v. 36, n. 2, p. 184-194, 1997.

KEMPSFORD, R.; HAWGOOD, B. J. Characteristics of the action of *Crotalus horridus* horridus (timber rattlesnake) venom on the isolated, perfused rat heart. **Toxicon**, v. 25, n. 12, p. 1311-1319, 1987

KERKIS, A. *et al.* Crotamine 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.

KOEPPEN, B. M.; STANTON, B. A. (Ed.). **Berne & Levy Physiology**. 6. ed. Philadelphia, PA: Elsevier, 2008. 864 p.

KOH, C.Y.; KINI, R.M. From snake venom toxins to therapeutics - Cardiovascular examples. **Toxicon**, v. 59, p. 497596, 2012.

KOJDA G, *et al.* Inhibition of nitric oxide synthase and soluble guanylate cyclase induces cardiodepressive effects in normal rat hearts. **European Journal of Pharmacology**, v. 334, p. 181-190, 1997.

KRUEGER, J. W.; FORLETTI, D.; WITTENBERG, B. A. Uniform sarcomere shortening behavior in isolated cardiac muscle cells. **The Journal of General Physiology**, v. 76, n. 5, p. 587-607, 1980.

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.

KUNST, G. *et al.* Myosin binding protein C, a phosphorylation-dependent force regulator in muscle that controls the attachment of myosin heads by its interaction with myosin S2. **Circulation Research**, v. 86, n. 1, p. 51-58, 2000.

LACZA, Z. *et al.* Mitochondrial nitric oxide synthase is not eNOS, nNOS or iNOS. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 35, n. 10, p. 1217-1228, 2003.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680, 1970.

LANCASTER, M. V.; FIELDS, R. D. **Antibiotic and cytotoxic drug susceptibility assays using resazurin and poisoning agents**. U.S. Patent n. 5, 501,959, 26 mar, 1996.

LAMFERS, M. L. M. *et al.* In vivo suppression of restenosis in balloon-injured rat carotid artery by adenovirus-mediated gene transfer of the cell surface-directed plasmin inhibitor ATF. BPTI. **Gene Therapy**, v. 8, n. 7, p. 534, 2001.

LANDUCCI, E.C.T. V *et al.* Mast cell degranulation induced by two phospholipase A2 homologues: dissociation between enzymatic and biological activities. **European Journal of Pharmacology**, v.343, p.257-263, 1998.

LAYLAND, J.; SOLARO, R. J.; SHAH, A. M. Regulation of cardiac contractile function by troponin I phosphorylation. **Cardiovascular Research**, v. 66, n. 1, p. 12-21, 2005.

LEWIS, R. J.; GARCIA, M. L. Therapeutic potencial of venom peptides. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, p. 790-802, 2003.

LIRA-DA-SILVA, R.M. *et al.* Serpentes de Importância Médica do Nordeste do Brasil. **Gazeta Médica da Bahia**, v.79, supl. 1, p. 7- 20, 2009.

LISY, O. *et al.* Therapeutic actions of a new synthetic vasoactive and natriuretic peptide, dendroaspis natriuretic peptide, in experimental severe congestive heart failure. **Hypertension**, v. 37, n. 4, p. 1089-1094, 2001.

LLORET, S.; MORENO, J. J. Oedema formation and degranulation of mast cells by phospholipase A2 purified from porcine pancreas and snake venoms. **Toxicon**, v.31, p.949-956, 1993.

LOHSE, M. J.; ENGELHARDT, S.; ESCHENHAGEN, T. What is the role of β -adrenergic signaling in heart failure?. **Circulation Research**, v. 93, n. 10, p. 896-906, 2003.

LOMEO, R. da S. *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, B.; ANGULO, Y.; CALDERÓN, L. 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.

LOPES, D. *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.

MAGRO, A. J. *et al.* Intraspecific variation in the venom electrophoretic profile of recently captured *Crotalus durissus terrificus* (Laurenti, 1768) snakes. **Journal of Venomous animals and Toxins**, v. 7, n. 2, p. 276-301, 2001.

MARSH, N.; GLATSTON, A. Some observations on the venom of the rhinoceros horned viper, *Bitis nasicornis* Shaw. **Toxicon**, v. 12, n. 6, p. 621-628, 1974.

MARX, S. O. *et al.* PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. **Cell**, v. 101, n. 4, p. 365-376, 2000.

MATSUBARA, M. H. **Efeitos do veneno de *Crotalus durissus terrificus*, da crotoxina e de suas subunidades fosfolipase A2 e crotapotina em monocamadas de células endoteliais em cultura.** Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, 2009.

MEBS, D.; OWNBY, C. L. Myotoxic components of snake venoms: their biochemical and biological activities. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 48, n. 2, p. 223-236, 1990.

MEIRA, C. S. *et al.* In vitro and in vivo antiparasitic activity of *Physalis angulata* L. concentrated ethanolic extract against *Trypanosoma cruzi*. **Phytomedicine**, v. 22, n. 11, p. 969-974, 2015.

MERY, P. F. *et al.* Nitric oxide regulates cardiac Ca^{2+} current. Involvement of cGMP-inhibited and cGMP-stimulated phosphodiesterases through guanylyl cyclase activation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 35, p. 26286-26295, 1993.

MORAIS, F. V. *et al.* Enzima inativadora de bradicinina liberada de fígado preservado ex-vivo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, 1999.

MULLER, V. D. *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.

MULLER, S. P. *et al.* Crotoxin from *Crotalus durissus terrificus* venom: In vitro cytotoxic activity of a heterodimeric phospholipase A2 on human cancer-derived cell lines. **Toxicon**, v. 156, p. 13-22, 2018.

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.

NASA, Y. *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.

NOGUEIRA-NETO, F. de S. *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.

NOLTE, E.; MCKEE, M. **Does health care save lives? Avoidable mortality revisited.** The Nuffield Trust, 2004.

OLIVEIRA E SILVA, S. H. **Estudo comparativo bioquímico e imunofórmulas do veneno total, da crotoxina e sua isoforma de crotapotina e PLA2, de *Crotalus durissus terrificus*, *Crotalus durissus ruruima*, *Crotalus durissus casacavella* e *Crotalus durissus collilineatus*.** Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Médicas, Unicamp, 2005.

OLIVEIRA, F. N. *et al.* Accidents caused by Bothrops and Bothropoides in the State of Paraíba: epidemiological and clinical aspects. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 6, p. 662-667, 2010.

OLIVEIRA, N. da R. *et al.* The epidemiology of envenomation via snakebite in the State of Piauí, Northeastern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 1, p. 99-104, 2015.

OTERO, R. *et al.* Efficacy and safety of two whole IgG polyvalent antivenoms, refined by caprylic acid fractionation with or without β -propiolactone, in the treatment of Bothrops asper bites in Colombia. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100, n. 12, p. 1173-1182, 2006.

OWNBY, C. L. Structure, function and biophysical aspects of the myotoxins from snake venoms. **Journal of Toxicology: Toxin Reviews**, v. 17, n. 2, p. 213-238, 1998.

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.

DE PAOLA, F.; ROSSI, M. A. Myocardial damage induced by tropical rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) venom in rats. **Cardiovascular Pathology**, v. 2, n. 1, p. 77-81, 1993.

PEZOLATO, V. A. *et al.* Acompanhamento eletrocardiográfico no desenvolvimento de ratos Wistar. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 69, n. 1, p. 39-47, 2017.

PINHO, F. M. O.; PEREIRA, I. D. Ofidismo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 47, n. 1, p. 24-9, 2001.

POLGÁR, J. *et al.* Platelet activation and signal transduction by convulxin, a C-type lectin from *Crotalus durissus terrificus* (tropical rattlesnake) venom via the p62/GPVI collagen receptor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 21, p. 13576-13583, 1997.

PONCE-SOTO, L. A. *et al.* Isolation and preliminary enzymatic characterization of a novel PLA 2 from *Crotalus durissus collilineatus* venom. **Journal of Protein Chemistry**, v. 21, n. 3, p. 131-136, 2002.

PONCE-SOTO, L. A. *et al.* Structural and biological characterization of two crotoamine isoforms IV-2 and IV-3 isolated from the *Croatalus durissus cumanensis* venoms. **Protein Journal**, v. 26, p.533-540, 2007.

PROBSTFIELD, J. L.; O'BRIEN, K. 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, G. *et al.* Crotaacetin, 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.

RAHMAN, R. *et al.* Annual incidence of snake bite in rural Bangladesh. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 10, p. e860, 2010.

RANGEL-SANTOS, A. *et al.* A comparative study of biological activities of crotoxin and CB fraction of venoms from *Crotalus durissus terrificus*, *Crotalus durissus cascavella* and *Crotalus durissus collilineatus*. **Toxicon**, v. 43, n. 7, p. 801-810, 2004.

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

- RODRIGUES, V. M. *et al.* Geographic variations in the composition of myotoxins from *Bothrops neuwiedi* snake venoms: biochemical characterization and biological activity. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 121, n. 3, p. 215-222, 1998.
- ROTHSCHILD, A.M.; ROTHSCCHILD, Z. Liberation of pharmacologically active substances by snake venoms. In: LEE CY (ed) Snake Venoms. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v. 52, p. 591-628, 1979
- RUBBO, H. *et al.* Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 42, p. 26066-26075, 1994.
- SALVINI, T. F. *et al.* Systemic skeletal muscle necrosis induced by crotoxin. **Toxicon**, v. 39, n. 8, p. 1141-1149, 2001.
- SANTORO, Marcelo L. *et al.* Comparison of the biological activities in venoms from three subspecies of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*, *C. durissus cascavella* and *C. durissus collilineatus*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology**, v. 122, n. 1, p. 61-73, 1999.
- SAMPAIO, S. C. *et al.* Crotoxin: Novel activities for a classic β -neurotoxin. **Toxicon**, v. 55, n. 6, p. 1045-1060, 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, S. S. *et al.* NO production and potassium channels activation induced by *Crotalus durissus cascavella* underlie mesenteric artery relaxation. **Toxicon**, v. 133, p. 10-17, 2017.
- SCHMIDT, M. I. *et al.* Doenças crônicas não transmissíveis no Brasil: carga e desafios atuais. **The Lancet**, v. 377, n. 9781, p. 1949-1961, jun. 2011.
- SCHWARZ, L. Artigo de revisão: eletrocardiograma. **Revista Ilha Digital**, v. 1, p. 3-19, 2009.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. Sociedade Brasileira de Hipertensão. Sociedade Brasileira de Nefrologia. VII Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. **Revista Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, São Paulo, jan./mar. 2016.
- SHAH, A. M. *et al.* 8-bromo-cGMP reduces the myofilament response to Ca^{2+} in intact cardiac myocytes. **Circulation Research**, v. 74, n. 5, p. 970-978, 1994.
- SHIOYA, T. A Simple Technique for Isolating Healthy Heart Cells from Mouse Models. **The Journal of Physiological Sciences**, v.57, n.6, 327-335, 2007.
- 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.

SMAIL, M. M. A. *et al.* Regional effects of streptozotocin induced diabetes on shortening and calcium transport in epicardial and endocardial myocytes from rat left ventricle. **Physiological Reports**, v. 4, n. 22, p. 1–11, 2016.

SMILJIĆ, S.; NESTOROVIĆ, V.; SAVIĆ, S. Modulatory role of nitric oxide in cardiac performance. **Medicinski Pregled**, v. 67, n. 9-10, p. 345-352, 2014.

SOARES, A. M. *et al.* Effects of chemical modifications of crotoxin B, the phospholipase A 2 subunit of crotoxin from *Crotalus durissus terrificus* snake venom, on its enzymatic and pharmacological activities. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 33, n. 9, p. 877-888, 2001.

STUEHR, D. J. Structure-function aspects in the nitric oxide synthases. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 37, n. 1, p. 339-359, 1997.

STUEHR, D. J.; GHOSH, S. Enzymology of Nitric Oxide Synthases. In: MAYER, B. (Ed.). **Nitric Oxide**. Berlin, Germany: Springer, 2000. p. 33-70.

STUEHR, D. J. Enzymes of the L-arginine to nitric oxide pathway. **The Journal of Nutrition**, v. 134, n. 10, p. 2748S-2751S, 2004.

SUN, M.-K.; REIS, D. J. Urethane directly inhibits chemoreflex excitation of medullary vasomotor neurons in rats. **European Journal of Pharmacology: Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 293, n. 3, p. 237-243, 1995.

SUZUKI, Y. *et al.* In vivo comparison between optical coherence tomography and intravascular ultrasound for detecting small degrees of in-stent neointima after stent implantation. **JACC: Cardiovascular Interventions**, v. 1, n. 2, p. 168-173, 2008.

TAN, K. K. *et al.* In vitro cytotoxicity of L-amino acid oxidase from the venom of *Crotalus mitchellii* pyrrhus. **Toxicon**, v. 139, p. 20-30, 2017.

TATCHUM-TALOM, R. *et al.* Upregulation of neuronal nitric oxide synthase in skeletal muscle by swim training. **American Journal Physiology: Heart Circulation Physiology**, v. 279, n. 4, p. H1757-66. oct. 2000.

TEIXEIRA, T. L. *et al.* Isolation, characterization and screening of the in vitro cytotoxic activity of a novel L-amino acid oxidase (LAAOcdt) from *Crotalus durissus terrificus* venom on human cancer cell lines. **Toxicon**, v. 119, p. 203-217, 2016.

TIBBALLS, J.; SUTHERLAND, S.; KERR, S. Studies on Australian snake venoms. Part 1: The haemodynamic effects of brown snake (*Pseudonaja*) species in the dog. **Anaesthesia and Intensive Care**, v. 17, n. 4, p. 466-469, 1989.

TOYAMA, M. 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.

VINK, S. *et al.* Natriuretic peptide drug leads from snake venom. **Toxicon**, v. 59, p. 434-445, 2012.

WARRELL, D. A. Snake bite. **The Lancet**, v. 375, n. 9708, p. 77-88, 2010.

WINK, D. A. *et al.* The Chemical biology of nitric oxide. balancing nitric oxide with oxidative and nitrosative stress. In: MAYER, B. (Ed.). **Nitric Oxide**. Berlin: Springer, 2000. p. 7-32.

WONG, B. *et al.* The physiology and toxicology of acute inhalation phosphine poisoning in conscious male rats. **Inhalation Toxicology**, v. 29, n. 11, p. 494.

WOO, A. Y. H.; XIAO, R-P. β -Adrenergic receptor subtype signaling in heart: from bench to bedside. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 33, n. 3, p. 335, 2012.

WHO. **Rabies and envenomings. A neglected public health issue**. World Health Organization, Geneva. Documento en línea: Disponível em: www.who.int/bloodproducts/animal_sera/Rabies.pdf). Acesso em: 9 set. 2016. 2007a.

WHO. **Global status report on non-communicable diseases 2010**. Geneva, World Health Organization, 2011, 162 p.

WHO. **Prevalence of snakebite envenoming**. World Health Organization. Disponível em: <http://www.who.int/snakebites/epidemiology/en/>. Acesso em: 30 oct. 2018.

YASUDA, S.; LEW, W. Y.W. Lipopolysaccharide depresses cardiac contractility and β -adrenergic contractile response by decreasing myofilament response to Ca^{2+} in cardiac myocytes. **Circulation Research**, v. 81, n. 6, p. 1011-1020, 1997.

ZHANG, P. *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.

ZHAO, X. L. *et al.* The $\alpha 1$ -subunit of skeletal muscle L-type Ca channels is the key target for regulation by A-kinase and protein phosphatase-1C. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 198, n. 1, p. 166-173, 1994.