

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE PEPTÍDEOS ISOLADOS DE VENENOS DE SERPENTES NO SISTEMA CARDIOVASCULAR DE RATOS

PEDRO HENRIQUE ALVES

GOIÂNIA 2016





TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS (TEDE) NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

L	1. Identificação do material bibli	iográfico:	[X] Dis	sertação	_ [] T	ese
2	2. Identificação da Tese ou Disse	ertação				
Γ	Autor (a): Pedro Henrique Alves	3				
	E-mail: Alvespedrohenrique8	6@amail.com				
	Seu e-mail pode ser disponibilizad	do na página?	[X]Sim	[] N	ão	
		ie ne paginai	[,,],,	1 1 1		
	Vinculo empregaticio do autor	~ .				
	Agência de fomento:	omissão de	Aperfeiço	amento de	Sigla:	CAPES
	Pe	essoal do Níve	Superior			
	País: Brasil U	JF:GO	CNPJ:	08.156.102	/0001-02	
	Título: Avaliação Dos Efeitos De I	Peptídeos Isola	dos De Ve	nenos De Se	rpentes N	o Sistem
	Cardiovascular De Ratos					
	Palavras-chave: Sistema cardio	ovascular, Pept	tídeos isol	ados do vene	<u>eno de se</u>	rpentes
	Título em outra língua: Evaluation	on Of The Effec	ts Of Pepti	des Isolated F	rom Snak	es Venom
	In Cardi	ovascular Syste	m Of Rats			
	Palavras-chave em outra língua:	Palavras-chave em outra língua: Cardiovascular system, PEPTIDES ISOLATED FRO				
		SNAKES VEN	IOMS			
	Area de concentração: Fisiolog	jia				
	Data defesa: (dd/mm/aaaa) 2	2/03/2016				
Programa de Pós-Graduação:		rograma Multi	cêntrico d	le Pós-gradu	ação em	Ciência
	Fi	isiológicas				
	Orientador (a): Carlos Henrique	de Castro				
	E-mail: <u>castroufg@gmail.</u>	com				
Γ	Co-orientador (a):* Danielle Alv	ves Ianzer				
Γ	E-mail: daianzer@gmail.c	com				
۴Ì	*Necessita do CPF quando não constar no Sis	sPG				

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento [X] SIM [] NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

no Homeique Auer Assinatura do (a) autor (a)

Data: 17 / 08 / 2016

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

PEDRO HENRIQUE ALVES

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE PEPTÍDEOS ISOLADOS DE VENENOS DE SERPENTES NO SISTEMA CARDIOVASCULAR DE RATOS

1

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Goiás para obtenção do título de Mestre em Fisiologia.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Henrique de Castro Co-orientadora: Dr^a. Danielle Alves Ianzer

GOIÂNIA 2016 Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

> Alves, Pedro Henrique AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE PEPTÍDEOS ISOLADOS DE VENENOS DE SERPENTES NO SISTEMA CARDIOVASCULAR DE RATOS [manuscrito] / Pedro Henrique Alves. - 2016. XVII, 55 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Henrique Castro; co-orientador Dr. Danielle Alves Ianzer.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Programa de Pós-Graduação em Biologia, Goiânia, 2016.

Bibliografia.

Inclui siglas, símbolos, gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Sistema cardiovascular. 2. Peptídeos isolados de serpentes. I. Castro, Carlos Henrique, orient. II. Título.



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE Nº 3

1

2 Aos vinte e dois dias do mês de março do ano de dois mil e dezesseis, às catorze horas, no Anfiteatro do ICB2 da Universidade Federal de Goiás, 3 reuniram-se os componentes da banca examinadora: Prof. Dr. Carlos Henrique 4 5 de Castro, Dra. Danielle Alves Ianzer, Prof. Dr. Carlos Henrique Xavier Custódio e Prof. Dr. Paulo César Ghedini para, em sessão pública presidida 6 pelo primeiro examinador citado, procederem à avaliação da defesa de 7 dissertação intitulada "AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE PEPTÍDEOS ISOLADOS 8 9 DO VENENO DE SERPENTES NO SISTEMA CARDIOVASCULAR DE RATOS", em nível de mestrado, área de concentração em Fisiologia e Órgãos de Sistemas, 10 de autoria de Pedro Henrique Alves, discente do Programa Multicêntrico de 11 12 Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pelo presidente, que fez a apresentação formal dos membros 13 14 da banca. A palavra, a seguir, foi concedida ao autor da dissertação que, em cerca de $\frac{30}{20}$ minutos, procedeu à apresentação de seu trabalho. 15 Terminada a apresentação, cada membro da banca arguiu o examinado, 16 tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Terminada a fase de 17 arguição, procedeu-se à avaliação da dissertação. Tendo-se em: vista o que 18 consta na Resolução nº1129 de maio de 2012 do Conselho de Ensino, 19 Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa 20 Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, a dissertação foi 21 apronada, considerando-se integralmente cumprido este 22 requisito para fins de obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas 23 pela Universidade Federal de Goiás. A conclusão do curso dar-se-á quando da 24 entrega da versão definitiva da dissertação na secretaria do programa, com as 25 devidas correções sugeridas pela banca examinadora, no prazo de trinta dias a 26 contar da data da defesa. Cumpridas as formalidades de pauta, 27 às<u>///</u>horas e <u>00</u>minutos, encerrou-se a sessão de defesa e, para 28

2 Pro Jay



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

	INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLOGICAS PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS
29	constar, eu, Renato César Rodrigues, Assistente em Administração da
30	Secretaria de Pós-graduação do Instituto de Ciências Biológicas da
31	Universidade Federal de Goiás, lavrei a presente ata que após lida e aprovada,
32	será assinada pelos membros da banca examinadora em três vias de igual
33	teor.
34	\sim
35	$\left(\right)$
36	Ver
37	Prot. Dr. Carlos Henrique de Castro
38	Presidente da Banca
39	Universidade Federal de Goiás
40	
41	
42	allubur
43	Dra-Danielle Alves Janzer
44	Universidade Federal de Goiás
45	
46	Ω M $(1, 0)$
47	CayAM Reel.
48	Prof. Dr. Carlos Henrique Xavier Custódio
49	Universidade Federal de Goiás
50	\sim
51	
52	Jose feel
53	Prof. Dr. Paulo Çésar Ghedini
54	Universidade Federal de Goiás





TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: [x] Dissertação [] Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Nome completo do autor: Pedro Henrique Alves

Título do trabalho: Avaliação dos efeitos de peptídeos isolados de venenos de serpentes no sistema cardiovascular de ratos.

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento [x] SIM [] NÃO1

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.

Nomeious AWES

Assinatura do (a) autor (a)

Data: 17 / 08 / 2016

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Aqueles que esperam no Senhor renovam as suas forças, voam alto como águias, correm e não ficam exaustos, andam e não se cansam (Isaías 40:31).

Dedicatória

A Deus,

Pela graça da vida e por ser meu refugio, fortaleza e fonte de inspiração.

Aos meus pais Marilda Auxiliadora da Silva e Arnaldo Soares Pereira,

Por estarem sempre ao meu lado, pelo amor, dedicação e por sonharem comigo os meus sonhos. Amo vocês.

Aos meus avos Antônio Alves da Silva e Lenir Nunes da Silva,

Por serem à base da minha vida, por todo o amor a mim dedicado e por sempre terem me aproximado dos ensinamentos de Cristo.

Aos meus irmãos André Luiz Alves eThiago Alves da Silva,

Pelo sincero amor à minha vida e por perceber que mesmo "distantes" estamos sempre unidos. Vocês são tudo para mim.

A minha madrinha Maria Helena da Silva,

Por todo amor a mim dedicado, pelo incentivo, dedicação, motivação e conselhos. Eu não teria conseguido chegar até onde cheguei se não fosse por você.

Ao meu primo Luiz Gustavo Nunes de Lima

Pela confiança, amor, por compartilharmos os mesmos sonhos e pelo companheirismo de sempre.

À minha namorada Juliana Pires Ribeiro,

Por estar sempre ao meu lado. Seu amor, sua compreensão foram e são de grande importância em minha vida.

Ao Xisto Sena Passos,

Mais que um amigo, um pai. Seus conselhos sempre me levam adiante, me motivando e elogiando sempre. Obrigado pelo amor e por fazer parte da minha vida.

Agradecimentos

Ao Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas, pela oportunidade de realizar este estudo.

As instituições de fomento CAPS, CNPq e FAPEG, por proporcionar todo o suporte necessário para a realização deste estudo.

A meu orientador, Prof. Dr. Carlos Henrique de Castro, por ter me dado a oportunidade de trilhar esse "caminho" e acima de tudo, pela confiança a mim depositada. Obrigado por toda a dedicação, paciência e ensinamentos ao longo desses dois anos de pesquisa.

A minha co-orientadora, Dr^a. Danielle Alves lanzer, pela brilhante orientação e por toda atenção a mim dedicado.

A Prof^a. Dr^a. Elizabeth Pereira Mendes, por todo suporte, conselhos e contribuição a pesquisa. Aprendi muito com você nesses dois anos.

Ao Mestre, Allancer Divino de Carvalho Nunes, pela brilhante parceria e dedicação a esta pesquisa.

Ao Mestre, Álvaro Paulo Silva Souza, por ter me passado o conhecimento técnico da parte experimental e pela parceria dentro e fora do ambiente de trabalho.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	34
1.1 Sistema Cardiovascular	35
1.2 Endotélio vascular e síntese de óxido nítrico	35
1.3 Oligopeptídeos Ricos em Prolina (PROs)	
1.3.1 Contexto histórico e desenvolvimento do captopril	40
1.3.2 Efeitos cardiovasculares promovidos pelos PROs	41
1.3.3 Bj-PRO-5a	41
1.3.4 Bj-PRO-7a	42
1.3.5 Bj-PRO-10c	42
1.3.6 Novos PROs	42
2 OBJETIVOS	45
2.1 Objetivo Geral	45
2.2 Objetivos Específicos	45
3 MATERIAIS E MÉTODOS	46
3.1 Animais	46
3.2 Peptídeos	46
3.3 Reatividade Vascular	48
3.3.1 Preparo dos anéis de aorta isolados	48
3.3.2 Protocolo experimental	49
3.4 Preparações dos corações isolados	50
3.4.2 Protocolo experimental	51
3.5 Análise Estatística	51
4 Resultados	52
4.1 Efeitos cardiovasculares induzidos pelo <i>Bj</i> -PRO-5a	52
4.2 Efeitos cardiovasculares induzidos pelo <i>Bj</i> -PRO-7a	53
4.3 Efeitos cardiovasculares induzidos pelo <i>Bj</i> -PRO-10c	55
4.4 Efeitos cardiovasculares induzidos pelo <i>Bc</i> -PRO-10e	57
4.5 Efeitos cardiovasculares induzidos pelo Bf-PRO-10d	59
4.6 Efeitos cardiovasculares induzidos pelo <i>Bf</i> -PRO-10f	61
4.7 Seleção dos PROs para investigação dos mecanismos de ação	63
4.8 Avaliação dos Mecanismos de ação do <i>Bj</i> -PRO-7a	64

4.9 Mecanismo de ação do <i>Bj</i> -PRO-10c	68
5 DISCUSSÃO	55
5.1 Avaliação dos PROs sobre o leito aórtico	55
5.2 Avaliação dos PROs sobre o leito coronariano	57
5.3 Avaliação dos PROs sobre os parâmetros de contratilidade cardíaca	58
6 CONCLUSÃO	61
REFERÊNCIAS	62
APÊNDICE	

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- mM- Milimolar
- µM- Micromolar
- nM- Nanomolar
- pM- Picomolar
- AC- Adenilato Ciclase
- Ach- Acetilcolina
- Ang II- Angiotensina II
- AMPc- Adenosina 3'5'- Monofosfato Cíclica
- AsL- Argininosuccinato Liase
- AsS- Argininosuccinato Sintetase
- BH4- Tetrahidrobiopterina
- Bc- Bothrops cotiara
- Bf- Bothrops Fonsecai
- Bj- Bothrops Jararaca
- **Bk- Bradicinina**
- BPFs- Fatores de Potencialização da Bradicinina
- BPPs- Peptídeos potencializadores da bradicinina
- Ca²⁺- Íon Cálcio
- CaCl₂2H₂O- Cloreto de Cálcio Dihidratado
- cDNA- Ácido Desoxirribonucléico Complementar
- CHO- Células Ovarianas de Hamster Chinês
- C-terminal- Carboxi-terminal
- Da- Dalton
- DC- Débito Cardíaco
- DCV- Doenças Cardiovasculares
- dP/dt Máxima- Velocidade de Contração Intraventricular
- dP/dt Mínima- Velocidade de Relaxamento Intraventricular
- (E+)- Anel de Aorta com Endotélio
- (E-)- Anel de Aorta sem Endotélio

ECA- Enzima Conversora de Angiotensina

EDHF- Fator Hiperpolarizante Derivado do Endotélio

EMP- Erro Padrão da Média

eNOS- Óxido Nítrico Síntase Endotelial

FAD- Dinucleotídeo de Flavina e Adenina

FC- Frequência Cardíaca

FMN- Mononucleotídeo de Flavina

GCs- Guanilato Ciclase solúvel

GMPc- Guanosina 3'5'- monofosfato Cíclico

GTP- Guanosina 5'-trifosfato

HA- Hipertensão Arterial

iECA- Inibidor da Enzima Conversora de Angiotensina

iNOS- Óxido Nítrico Síntase Induzida

K⁺- Íon Potássio

KCI- Cloreto de Potássio

KH₂PO₄- Fosfato de Potássio

L-NAME- NG -nitro-Larginina-metil-éster

MgSO₄H₂O- Sulfato de Magnésio Monohidratado

NaCI- Cloreto de Sódio

NADPH Dinucleotídeo Nicotinamida Adenina Fosfato

NaHCO₃- Bicarbonato de Sódio

NO- Óxido Nítrico

NOS- Óxido Nítrico Síntase

nNOS- Óxido Nítrico Síntase Neural

N-terminal- Amino-terminal

PA- Pressão Arterial

PDVE- Pressão Desenvolvida no Ventrículo Esquerdo

PGL₂- Prostaciclina 2

Phe- Fenilefrina

PIS- Pressão Intraventricular Sistólica

PKA- Proteína Quinase A

PKG- Proteína Quinase G

PP- Pressão de Perfusão

PROs- Oligopeptídeos Ricos em Prolina

RS- Retículo Sarcoplasmático

RVP- Resistência Vascular Periférica

SBH- Sociedade Brasileira de Hipertensão

SERCA- Ca2+ ATPase do Retículo Endo-sarcoplasmático

SHR- Rato Espontaneamente Hipertenso

UI- Unidades

VS- Volume Sistólico

VS-Versus

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ilustração da estrutura da parede arterial de aorta torácica
Figura 2. Ilustração representando a via de formação do NO através da eNOS
Figura 3. Ilustração esquemática de uma preparação de anel de aorta de ratos em banho de órgãos isolados
Figura 4. ilustração do sistema de Langendorff a fluxo constante
Figura 5 . Efeito do <i>Bj</i> -PRO-5a em anéis de aorta isolados com (E+) e sem endotélio (E) de ratos Wistar e SHR
Figura 6. Efeito do <i>Bj</i> -PRO-5a sob o leito coronariano de ratosWistar e SHR52
Figura 7. Efeitos do peptídeo <i>Bj</i> -PRO-5a na (A) Pressão Intraventricular Sistólica, (B) Pressão Desenvolvida no Ventrículo Esquerdo, (C) dP/dt máxima, (D) dP/dt mínima53
Figura 8 . Efeito do peptídeo <i>Bj</i> -PRO-7a em anéis de aorta isolados com (E+) e sem endotélio (E-) de ratos Wistar e SHR
Figura 9. Efeito do peptídeo Bj-PRO-7a no leito coronariano de ratos Wistar e SHR54
Figura 10. Efeitos do peptídeo <i>Bj</i> -PRO-7a na (A) Pressão Intraventricular Sistólica, (B) Pressão Desenvolvida no Ventrículo Esquerdo, (C) dP/dt máxima, (D) dP/dt mínima55
Figura 11. Efeito do peptídeo <i>Bj</i> -PRO-10c em anéis de aorta isolados com (E+) e sem endotélio (E-) de ratos Wistar e SHR
Figura 12. Efeito do peptídeo Bj-PRO-10c em coronárias de ratos Wistar e SHR. I
Figura 13. Efeitos do peptídeo <i>Bj</i> -PRO-10c na (A) Pressão Intraventricular Sistólica, (B) Pressão Desenvolvida no Ventrículo Esquerdo, (C) dP/dt máxima, (D) dP/dt mínima57
Figura 14 . Efeito do peptídeo Bc-PRO-10e em anéis de aorta isolados com (E+) e sem endotélio (E-) de ratos Wistar e SHR
Figura 15. Efeito do peptídeo Bc-PRO-10e em coronárias de ratos Wistar e SHR58
Figura 16. Efeitos do peptídeo Bc-PRO-10e na (A) Pressão Intraventricular Sistólica, (B) Pressão Desenvolvida no Ventrículo Esquerdo, (C) dP/dt máxima, (D) dP/dt mínima59
Figura 17. Efeito do peptídeo Bf-PRO-10d em anéis de aorta isolados com (E+) e sem endotélio (E-) de ratos Wistar e SHR
Figura 18. Efeito do peptídeo Bf-PRO-10d em coronárias de ratos Wistar e SHR60

Figura 19. Efeitos do peptídeo Bf-PRO-10d na (A) Pressão Intraventricular Sistólica, (B) Pressão Desenvolvida no Ventrículo Esquerdo, (C) dP/dt máxima, (D) dP/dt mínima.......61

Figura 21. Efeitos do peptídeo Bf-PRO-10f em coronárias de ratos Wistar e SHR......62

Figura 22. Efeitos do peptídeo Bf-PRO-10f na (A) Pressão Intraventricular Sistólica, (B) Pressão Desenvolvida no Ventrículo Esquerdo, (C) dP/dt máxima, (D) dP/dt mínima.63

Figura 27. Efeito do peptídeo *Bj*-PRO-10c na presença de L-NAME, ODQ, MDL 12,330a ou MDLA em anéis de aorta de ratos (A) Wistar e (B) SHR......68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Peptídeos isolados do veneno da serpente Bothrop jararaca (Bj),	
Bhothrops cotiara (Bc) e Bothrops fonsecai (Bf)4	13
Tabela 2. Peptídeos potencializadores da Bk e/ou inibidores da atividade da ECA. 4	14
Tabela 3. Grupos experimentais4	17
Tabela 4. Solução de Krebs-Henseleit4	19
Tabela 5. Solução de Krebs-Ringer. 5	50
Tabela 6. Efeito vasorelaxante em aorta isolada promovido pelos PROs.	5 4
Tabela 7. Efeito em corações isolados promovido pelos PROs6	3 4
Tabela 8. Mecanismo de ação dos peptídeos Bj-PRO-7a e Bj-PRO-10c em aortasisoladas de ratos Wistar e SHR5	54
Tabela 9. Mecanismo de ação dos peptídeos <i>Bj</i> -PRO-7a e <i>Bj</i> -PRO-10c em	
corações isolados de ratos Wistar e SHR5	54

RESUMO

Os oligopeptídeos ricos em prolina (PROs) foram identificados no veneno bruto das serpentes Bothrops jararaca (Bj), Bothrops cotiara (Bc) e Bothrops fonsecai (Bf). Estudos anteriores demonstram que os PROs promoveram efeitos hipotensor/antihipertensivo em ratos normotensos e espontaneamente hipertensos (SHR). No entanto, os efeitos diretos dos PROs em aorta e coração isolado, bem como, os mecanismos de ação envolvidos nestes efeitos são desconhecidos. No presente estudo, foram avaliados os efeitos cardiovasculares de seis PROs, Bi-PRO-5a, Bi-PRO-7a, Bj-PRO-10c, Bc-PRO-10e, Bf-PRO-10d e Bf-PRO-10f. Os anéis de aorta com (E+) e sem endotélio (E-) foram pré-constritos com fenilefrina (Phe, 0,1 µmol/L), seguido de concentrações cumulativas dos PROs (0,1 nmol/L – 1 µmol/L) na presença ou ausência de um antagonista não seletivo dos receptores muscarínicos (atropina, 3 µmol/L), antagonista do receptor muscarínico M1 (pirezenpina, 1 µmol/L), inibidor da óxido nítrico sintase (L-NAME, 3 µmol/L), inibidor da adenilato ciclase (MDL12,330a, 3 µmol/L), inibidor da guanilato ciclase (ODQ, 3 µmol/L) ou inibidor da argininosuccinato sintetase (MDLA, 1 µmol/L). Para avaliar os efeitos dos PROs na coronária e contratilidade cardíaca, os corações foram perfundidos de acordo com a técnica de Langendorff. Os corações foram perfundidos por um período basal com solução Krebs Ringer contendo os PROs (0,05 ou 5 nmol/L) na presença ou ausência de L-NAME (10 nmol/L, ODQ (200 nmol/L) ou MDL (1µmol/L). Todos os PROs utilizados neste estudo induziram vasorelaxamento dependente do endotélio em anéis de aorta de ratos Wistar e SHR. Atropina e pirenzepina bloquearam os efeito vasorelaxante do Bj-PRO-7a em aorta isolada de ratos Wistar e SHR. L-NAME, ODQ e MDL inibiram o vasorelaxamento induzido pelo Bj-PRO-7a e Bj-PRO-10c em ambas as linhagens. O MDLA inibiu o vasorelaxamento induzido pelo Bj-PRO-10c somente em anéis de aorta de SHRs. Somente os peptídeos Bj-PRO-7a e Bj-PRO-10c promoveram uma vasodilatação coronariana em corações isolados de ratos Wistar e SHR. A vasodilatação coronariana induzida pelo Bj-PRO-7a foi inibida na presença de L-NAME em corações de ratos Wistar. Já em corações isolados de SHRs este efeito

abolido por com L-NAME, ODQ ou MDL. O *Bc*-PRO-10e e *Bf*-PRO-10f não induziram efeitos significantes na contratilidade cardíaca. No entanto, o *Bj*-PRO-5a, *Bj*-PRO-7a, *Bj*-PRO-10c e *Bf*-PRO-10f promoveram efeito inotrópico negativo em corações isolados de ratos Wistar e/ou SHRs. Este efeito desencadeado pelo *Bj*-PRO-7a foi inibido na presença de L-NAME em corações isolados de Wistar. Diferentemente, o efeito do *Bj*-PRO-10c foi bloqueado pelo L-NAME, ODQ ou MDL em ambas as linhagens. Sumarizando, os PROs utilizados neste estudo induziram vasorelaxamento dependente do endotélio. Os dados demonstram a participação das vias NO/GC/GMPc e AC/AMPc nos efeitos vasorelaxantes promovidos pelos peptídeos *Bj*-PRO-7a e *Bj*-PRO-10c. Além disso, os receptores muscarínicos estão envolvidos nos efeitos vasorelaxantes do peptídeo *Bj*-PRO-7a e *Bj*-PRO-10c negativo induzidos pelo *Bj*-PRO-7a e *Bj*-PRO-10c. Além disso, os receptores muscarínicos estão envolvidos nos efeitos vasorelaxantes do peptídeo *Bj*-PRO-7a e *Bj*-PRO-10c. Além disso, os receptores muscarínicos estão envolvidos nos efeitos vasorelaxantes do peptídeo *Bj*-PRO-7a e *Bj*-PRO-10c negativo induzidos pelo *Bj*-PRO-7a e *Bj*-PRO-10c está relacionado com a ativação do NO em cardiomiócitos de ratos normotensos e hipertensos.

ABSTRACT

The proline-riche-oligopeptides (PROs) were identified in the crude venom of snakes Bothrops jararaca (Bj), Bothrops cotiara (Bc) and Bothrops fonsecai (Bf). Previous studies have shown hypotensive/antihypertensive effects of the PROs in normotensive and hypertensive (SHR) rats. However, the direct effect of PROs in the aorta and heart isolated, as well as, the action mechanisms involved in these effects is unknown. In the presenty study, were evaluated the cardiovascular effect of six PROs, Bi-PRO-5a,-7a,-10c, Bc-PRO-10e, Bf-PRO-10d,-10f. The aortic rings, with (E+) or without (E-) endothelium, were preconstricted with phenylephine (Phe, 0.1 μ mol/L), following increasing concentrations of PROs (0.1 nmol/L – 1 μ mol/L) in presence or absence of a nonselective antagonist muscarinic receptors (Atropine, 3µmol/L), M1 muscarinic receptor antagonist (Pirenzepine, 1 µmol/L), synthase nitric oxide inhibitor (L-NAME, 1 µmol/L), adenylyl cyclase inhibitor (MDL 12.330A, 3 µmol/L), guanylyl cyclase inhibitor (ODQ, 3µmol/L) or argininosuccinate synthetase inhibitor (MDLA, 1 µmol/L). To evaluated the coronary and cardiac contractility effects of PROs, the hearts were perfused according Langendorff technique. The hearts were perfused for a basal period with Krebs Ringer solution containing the PROs (0.05 or 5 nmol/L) in presence or absence of L-NAME (10 nmol/L), ODQ (200 nmol/L) or MDL (1 µmol/L). The PROs utilized in this study induced endotheliumdependend vasorelaxation in aortic rings of Wistars and SHRs. Atropine and pirezenpine blocked the vasorelaxant effect of Bi-PRO-7a in isolated aorta from Wistar and SHR. L-NAME, ODQ or MDL inhibited the aortic vasorelaxation induced by Bj-PRO-7a and Bj-PRO-10c in both strains. MDLA inhibited the Bj-PRO-10cinduced vasorelaxation in aortic rings of SHR, but not in Wistar. Just the peptides Bj-PRO-7a and Bj-PRO-10c promoted a significant coronary vasodilatation in isolated heart from Wistar and SHR rats. The coronary vasodilatation induced by Bj-PRO-7a was inhibited in the presence of L-NAME in isolated heart from Wistar. Already in isolated heart from SHR this effect was abolished by L-NAME, ODQ or MDL. The *Bc*-PRO-10e and *Bf*-PRO-10f did not induce significant effects on cardiac contractility. However, the Bj-PRO-5a, -7a, -10c and Bf-PRO-10f promoted negative

inotropic effect in the isolated hearts from Wistar and/or SHR. This effect in isolated hearts perfused by *Bj*-PRO-7a was inhibited in the presence of L-NAME in Wistars. Differently, the effect of *Bj*-PRO-10c was blocked by L-NAME, ODQ or MDL in both strains. Sumarizing, the PROs utilized in this study induced endothelium-dependend vasorelaxation. The data demonstrated participation of pathways NO/GCs/GMPc and AC/AMPc in the vasorelaxant effect of peptides *Bj*-PRO-7a and *Bj*-PRO-10c. In addition, the muscarinic receptors are involved in the vasorelaxant effects induced by peptide *Bj*-PRO-7a in aortic rings from Wistar and SHR rats. Moreover, the negative inotropic effect induced by *Bj*-PRO-7a and *Bj*-PRO-10c is linked with activation of NO in cardiomyocyte of normotensive and hypertensive rats.

1 INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares (DCV), como, Hipertensão arterial (HA), doenças coronarianas, insuficiência cardíaca, angina e infarto do miocárdio são um grupo de doenças que atingem o coração e os vasos sanguíneos (WESTER MEIER et al., 2015). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), as DCV são responsáveis por 17 milhões ou 30% das mortes no mundo (WHO, 2013). No Brasil, o último censo realizado pelo Ministério da Saúde no ano de 2011, apontou as DCV como principal causa de morte entre homens e mulheres em todas as regiões do país¹. Estima-se que no Brasil existam cerca de 17 milhões de portadores de Hipertensão Arterial (HA), sendo a HA um dos principais fatores de risco para as DCV.

De acordo com a Sociedade Brasileira de Hipertensão (SBH), a HA é caracterizada pela presença constante de níveis elevados de pressão arterial (PA), sendo uma condição clínica associada frequentemente a alterações funcionais e estruturais de órgãos alvo, como, vasos sanguíneos, coração, encéfalo e rins.

O tratamento da HA deve conter estratégias terapêuticas que previnam complicações, como, infarto agudo do miocárdio e acidente vascular cerebral (HEYDE, 2004; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2013). Nos últimos anos tem-se observado grandes avanços na ciência, com o desenvolvimento e aperfeiçoamento de intervenções cirúrgicas e farmacológicas. Os resultados desses avanços são refletidos na redução das taxas de mortalidade por DCV, contudo a HA ainda é considerada um importante problema de saúde pública de âmbito global (ABRAMOV; CARSON, 2012).

A PA é controlada principalmente pelo sistema nervoso autônomo (SNA) simpático e parassimpático e sistemas humorais (GUYTON, 1991). Por participarem da regulação da contratilidade e frequência cardíaca e do controle do tônus vascular, esses dois sistemas são os principais alvos de fármacos antihipertensivos.

Atualmente, existem várias classes de medicamentos para o tratamento da HA, tais como, inibidores da enzima conversora de angiotensina (iECA), diuréticos, antagonistas adrenérgicos e bloqueadores de canais de cálcio, alguns fármacos

¹ www.datasus.gov.br

pertencentes a estes grupos de drogas, tem apresentado significativos efeitos colaterais como, hiperpotassemia, taquicardia reflexa, bradicardia excessiva e retenção hídrica (ANDRADE; VILAS-BOAS; ANDRADE, 2002; KOSTIS et al., 2005).

1.1 Sistema Cardiovascular

É sabido que a magnitude da pressão arterial (PA) depende do débito cardíaco (DC) e da resistência vascular periférica (RVP) (OIGMAN, 1987). O DC consiste no volume de sangue bombeado pelo coração por minuto, ou seja, depende da frequência cardíaca (FC) e do volume sistólico (VS). Já a RVP, é a resistência dos vasos à circulação do sangue, sendo determinada principalmente pelo diâmetro das arteríolas e, portanto, depende da espessura da parede arteriolar e dos efeitos causados por estímulos neuronais e humorais que podem causar vasoconstrição e/ou vasodilatação (BAKER et al., 1990; LORELL; CARABELLO, 2000).

A parede arterial é composta por três camadas distintas: íntima, média e adventícia. A camada íntima é constituída principalmente por células endoteliais que cobrem a superfície interna da parede, formando um leito contínuo em contato com o sangue (STEVENS; LOWE, 1998). A camada média é formada predominantemente por células musculares lisas e constituintes extracelulares (proteoglicanos, colágeno, fibrilas, fibrilas de elastina e fibras elásticas). E a camada adventícia, é composta por tecido conjuntivo e fibras colágenas do tipo I (Figura 1).

Dentre as camadas da parede arterial, destaca-se a íntima, pois as células que a constitui (células endoteliais) exercem papel fundamental no controle de fluidez do sangue, agregação plaquetária e regulação do tônus vascular em resposta a hormônios vasoativos ou metabólitos, assegurando assim não só a manutenção adequada da PA, mas também a provisão adequada de nutrientes ao organismo (FÉLÉTOU; KÖHLER; VANHOUTTE, 2010).

1.2 Endotélio vascular e síntese de óxido nítrico

As células endoteliais são capazes de sintetizar substâncias vasoconstritoras e vasodilatadoras. As principais substâncias que induzem a vasoconstrição são: endotelina (MASASHI et al., 1988), tromboxano A₂ (ELLIS et

al., 1976) e angiotensina II (Ang II) (VELTMAR; GOHLKE; UNGER, 1991). Como substâncias vasodilatadoras se destacam o óxido nítrico (NO) (FURCHGOTT, 1983; IGNARRO et al., 1987; PALMER; FERRIGE; MONCADA, 1987; VANHOUTTE, 1990), e a prostaciclina (PGI₂) (MONCADA et al., 1976). Dentre as substâncias vasodilatadoras o NO é o mais relevânte por desempenhar um papel de grande importância no controle cardiovascular (MAXWELL, 2002).



Figura 1. Ilustração da estrutura da parede arterial de aorta torácica Fonte: Adaptado de <u>http://www.ice.uthscsa.eduHistology/20TubTubular</u>)

O NO é considerado uma das menores e mais simples moléculas biossintetizadas (MORRIS; BILLIAR; SIDNEY, 1994). Sua síntese ocorre através da ação catalítica de três isoformas da óxido nítrico sintase (NOS), a óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), a óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) e a óxido nítrico sintase induzida (iNOS) (DUDZINSKI et al., 2006; FULTON; GRATTON; SESSA, 2001; PAPAPETROPOULOS; RUDIC; SESSA, 1999). A eNOS é considerada uma isoforma essencial na manutenção do tono vascular basal, podendo ser encontrada principalmente nas células endoteliais, em compartimentos denominados cavéolas

(SHAUL; ANDERSON, 1998). A manutenção desse tono é essencial para a regulação do fluxo sanguíneo em diversos leitos vasculares (WANG et al., 2000). A nNOS pode ser encontrada em áreas cerebrais como tálamo, hipotálamo, córtex cerebral, núcleo do trato solitário, bulbo olfatório e cerebelo (RODRIGO et al., 1994; VINCENT; KIMURA, 1992). Além disso, a nNOS é a isoforma predominante envolvida na regulação da função cardíaca (JIN et al., 2012; SEARS et al., 2003; ZHANG et al., 2008). A iNOS encontra-se mais expressa em processos celulares anormais como na insuficiência cardíaca (FERREIRO et al., 2004), induzidas por citocinas pró-inflamatórias (ALDERTON et al., 2001; ANDREW; MAYER, 1999; BALLIGAND; CANNON, 1997).

Nas células endoteliais, a eNOS pode ser ativada através do estresse de cisalhamento (shear stress) ou pela interação de agonistas como, acetilcolina (Ach) e bradicinina (Bk) a seus respectivos receptores muscarínicos (M_1 , M_3 e M_5) e B2, acoplados a proteina G (MARÍN; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, 1997; MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991). A ativação destes receptores promove o influxo de Ca²⁺ para o interior das células endoteliais, favorecendo a interação do Ca²⁺ com a proteína calmodulina (DA LUZ; LAURINDO; CHAGAS, 2005) formando o complexo cálcio-calmodulina que é responsável pela ativação da eNOS e/ou nNOS. Depois de ativada, a eNOS utiliza como substrato a L-arginina, através de uma reação que ocorre em duas etapas, envolvendo heme oxidações, e catalisando a oxidação do nitrogênio guanidino terminal da L-arginina, formando como produtos finais Lcitrulina e NO (MARLETTA, 1993). A L-citrulina circulante é novamente convertida em L-arginina pela ação das enzimas argininosuccinato sintetase (AsS) e argininosuccinato liase (FLAM; EICHLER; SOLOMONSON, 2007). Essa reciclagem é responsável pela manutenção da produção de NO (HAINES; PENDLETON; EICHLER, 2011) (Figura 2). As duas etapas da ação da eNOS requerem o dinucleotídeo nicotinamida adenina fosfato (NADPH), oxigênio molecular e cofatores como tetrahidrobiopterina (BH4), mononucleotídeo de flavina (FMN), dinucleotídeo de flavina e adenina (FAD) (MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991).

Após sintetizado, o NO se difunde para células do músculo liso vascular, onde sua principal função é ativar a Guanilato Ciclase solúvel (GCs), um heterodímero que contém o grupo heme responsável pela conversão da guanosina 5'-trifosfato (GTP) em Guanosina 3'5'- monofosfato cíclico (GMPc), um segundo mensageiro das ações do NO na musculatura lisa vascular (MCGUIRE; DING; TRIGGLE, 2001). O aumento da concentração intracelular de GMPc ativa a proteína quinase G (PKG) que por sua vez fosforila os canais de cálcio dependentes de voltagem presente na membrana celular, reduzindo assim os níveis intracelulares de Ca²⁺(HERRMANN; LERMAN; LERMAN, 2010), fosforila a fosfolambam, uma proteína responsável pelo controle da atividade da bomba de cálcio conhecida como Ca²⁺ATPase do retículo endo-sarcoplasmático (SERCA), essa bomba é responsável por transportar Ca²⁺ do citoplasma para o interior do retículo sarcoplasmático (COHEN et al., 1999). Além disso, a PKG promove a ativação dos canais de K⁺, induzindo um efluxo de K⁺ para o meio extracelular das células do músculo liso vascular, desencadeando assim uma hiperpolarização dessas células (ARCHER et al., 1994) O balanço entre a redução dos níveis intracelulares de Ca²⁺ e efluxo de K⁺, promovem vasorelaxamento do músculo liso vascular (Figura 2).

Outra enzima de grande importância no vasorelaxamento do músculo liso vascular é a adenilato ciclase (AC). A AC é uma enzima que cataliza a formação de adenosina 3´-5´ monofosfato cíclica (AMPc) por meio da clivagem do nucleotídeo adenosina trifosfato (ATP). O aumento dos níveis de AMPc ativa a proteína quinase A (PKA), a qual induz uma diminuição na concentração intracelular de Ca²⁺ no músculo liso vascular, culminando em um vasorelaxamento através de vias semelhantes às descritas para PKG (BERNE; LEVY, 1998).

Os vários tipos de células que compõem o coração expressam uma ou mais de uma das três isoformas da NOS, revelando assim a importância dessas isoformas na contratilidade cardíaca (PRABHU, 2004). A expressão de nNOS nos terminais do nervo ortossimpático, por exemplo, regula a liberação de catecolaminas no coração, melhorando as respostas desencadeadas pelo receptor β-adrenérgico, como inotropismo e cronotropismo (PRABHU, 2004). A eNOS expressa nas células do músculo cardíaco, inibe o tônus contrátil, o crescimento celular e agregação plaquetária, diminui o consumo de oxigênio e se opõe as ações inotrópicas de catecolaminas após a estimulação dos receptores muscarínicos e β-adrenérgicos (BALLIGAND; CANNON, 1997). Tanto a eNOS quanto a nNOS contribuem para uma normal sustentação do acoplamento excitação-contração, inicio e fim das fases do mecanismo de Frank-Starling do coração (PELAT; MASSION; BALLIGAND, 1988).



Figura 2. Ilustração representando a via de formação do NO através da eNOS. A ativação do receptor muscarínico no endotélio vascular promove abertura dos canais de cálcio. O Ca²⁺ livre se liga a proteína calmodulina dando origem ao complexo Ca²⁺-calmodulina responsável pela ativação da eNOS, que por sua vez cliva L-arginina em L-citrulina + NO. O NO se difunde das células endoteliais para as células do músculo liso ativando a GCs, uma enzima responsável pela formação de GMPc através da GTP. A GMPc ativa a PKA, uma proteína responsável pela diminuição da concentração intracelular de Ca²⁺ e K⁺.

Diferentemente do observado no músculo liso vascular, a AC influencia a contratilidade cardíaca aumentando a concentração intracelular de cálcio nos cardiomiócitos. Nessas células, a atividade da AC (ADT→AMPc) para ativação da PKA é semelhante à observada no músculo liso vascular. No entanto, nos cardiomiócitos, a PKA promove a fosforilação da fosfolambam e dos canais de cálcio dependentes de voltagem, levando ao aumento da concentração intracelular de cálcio, e da ativação da SERCA, intensificando a recaptação de Ca²⁺ do meio intracelular para dentro do retículo sarcoplasmático. Dessa forma, as fosforilações promovidas pela PKA atuam tanto para aumentar a velocidade de contração quanto a do relaxamento do músculo cardíaco (BERNE; LEVY, 1998).

1.3 Oligopeptídeos Ricos em Prolina (PROs)

Os oligopeptídeos ricos em prolina PROs, também conhecidos como peptídeos potencializadores de bradicinina (BPPs), constituem o veneno de diferentes peçonhas, tais como, serpentes e escorpiões (HAYASHI et al., 2003; IANZER et al., 2004; MURAYAMA et al., 1997; TASHIMA et al., 2012; VERANO- BRAGA et al., 2008). Os PROs, descritos até então, são constituídos de 5-17 resíduos de aminoácidos, (IANZER et al., 2004; ZELANIS et al., 2010). como características estruturais, a maioria dos PROs apresentam alto teor de prolina, resíduo de ácido piroglutâmico na extremidade N-terminal e resíduo de prolina na extremidade C-terminal (IANZER et al., 2004) e geralmente possuem o tripeptídeo (isoleucina-prolina-prolina) na porção C-terminal (IANZER et al., 2010).

1.3.1 Contexto histórico e desenvolvimento do captopril

Na década de 60, em experimentos realizados com BAL (2,3 dimercaptopropanol) associados ao veneno bruto da serpente *Bothrops Jararaca* (*Bj*), foi observado que o veneno dessa serpente potencializou o efeito da Bk em íleo isolado de cobaia (FERREIRA; ROCHA E SILVA, 1963). Os BPPs, como foram chamados, também foram capazes de inibir a atividade catalítica da enzima conversora de angiotensina (ECA) *in vitro* (STEWART; FERREIRA; GREENE, 1971). Baseados na estrutura primária dos peptídeos *Bj*-PRO-9a e *Bj*-PRO-5a, o captopril foi o primeiro anti-hipertensivo da classe dos inibidores da enzima conversora de angiotensina (iECA), desenvolvido e largamente utilizado para o tratamento da HA (ONDETTI; CUSHMAN, 1981).

Na década de 90, WEI e colaboradores identificaram que a ECA possui dois sítios ativos denominados de domínio N- e C-terminal, com ações catalíticas distintas. O domínio C-terminal converte o peptídeo inativo, angiotensina I em ang II e também é responsável pela degradação da Bk. Enquanto o domínio N-terminal é responsável pela hidrólise do substrato Hip-His-Leu, envolvido na atividade hematopoiética e na degradação de peptídeos, como a angiotensina-(1-7) e também a Bk (ACHARYA et al., 2003; COATES, 2003; DEDDISH et al., 1998; WEI et al., 1991).

Embora na década de 80, o Captopril tenha sido caracterizado como um agente eficiente na inibição da formação de ang II e potencialização da Bk (FERREIRA; BARTELT; GREENE, 1970; MURAYAMA et al., 1997; ONDETTI et al., 1971), hoje sabe-se que este fármaco causa efeitos colaterais indesejáveis, como a anemia e tosse, provavelmente devido a sua maior afinidade ao sítio catalítico da porção N-terminal da ECA (COATES, 2003; WEI et al., 1991). O acumulo de Bk nos pulmões promovido pela inibição da ECA, estimula as fibras

aferentes vagais e a produção de metabolitos de NO e do ácido araquidônico, que participam de mecanismos pró-inflamatórios, desencadeando assim o reflexo da tosse (MORICE; BROWN; HIGENBOTTAM, 1989).

O interesse por estes peptídeos foi resgatado, a partir da identificação de novas sequências de PROs no veneno bruto da serpente *Bothrops jararaca* (IANZER et al., 2004) e nos cDNAs que codificam a proteína precursora do peptídeo natriurético tipo C na glândula de veneno e no cérebro dessa serpente (HAYASHI et al., 2003; MURAYAMA et al., 1997).

Desde então, através de técnicas modernas de biologia molecular, cromatografia líquida e espectrometria de massa, diversos peptídeos foram isolados e identificados no veneno bruto de diferentes espécies de serpentes (HAYASHI et al., 2003; IANZER et al., 2004; MURAYAMA et al., 1997; TASHIMA et al., 2012) (Tabela 1).

1.3.2 Efeitos cardiovasculares promovidos pelos PROs

Nos últimos anos, estudos *in vivo* têm demonstrado que alguns PROs possuem ação cardiovascular semelhante. O *Bj*-PRO-5a, *Bj*-PRO-7a e *Bj*-PRO-10c desencadearam efeito hipotensor/anti-hipertensivo duradouro, em ratos normotensos e espontaneamente hipertensos . No entanto, o efeito desencadeado por estes peptídeos não está diretamente relacionado com a inibição da ECA (IANZER et al., 2007, 2011). Além disso, somente o peptídeo *Bj*-PRO10c na dose de 71nmol/Kg foi capaz de potencializar os efeitos da Bk (IANZER et al., 2007).

1.3.3 Bj-PRO-5a

O primeiro PRO isolado, sequenciado e quimicamente sintetizado foi o pentapeptídeo *Bj*-PRO-5a, inicialmente caracterizado como um potente inibidor da ECA e potencializador da Bk *in vitro* e *in vivo* (STEWART; FERREIRA; GREENE, 1971). Hoje sabe-se que este peptídeo tem maior afinidade pelo sítio N-Terminal do que para o sítio C-terminal da ECA I, revelando assim, reduzida capacidade em inibir a formação de AngII e de degradar Bk (COATES, 2003; WEI et al., 1991). Recentemente, foi sugerido que os efeitos cardiovasculares desencadeados pelo peptídeo *Bj*-PRO-5a podem estar relacionados com o aumento da liberação de NO (IANZER et al., 2011; MORAIS et al., 2011).

1.3.4 Bj-PRO-7a

Identificado no veneno da *Bothrops jararaca* (IANZER et al., 2004), o *Bj*-PRO-7a, não é capaz de potencializar a Bk e também não inibe a atividade da ECA *in vitro* e *in vivo* (IANZER et al., 2007). Estudo preliminar demonstrou que o *Bj*-PRO-7a é capaz de induzir um aumento da concentração intracelular de cálcio [Ca²⁺]_I em células ovarianas de hamster chinês (CHO). Esse efeito foi abolido pelo antagonista de receptor muscarínico M₁ (NEGRAES et al., 2011). Diante disso o autor sugere que ações anti-hipertensivas evocada pelo receptor muscarínico M₁ (LAZARTIGUES et al., 1999) podem estar relacionadas com a atividade agonista do *Bj*-PRO-7a sobre este receptor (NEGRAES et al., 2011).

1.3.5 Bj-PRO-10c

Também identificado no veneno da serpente *Bothrops jararaca*, o *Bj*-PRO-10c promove efeitos anti-hipertensivo e bradicárdico através da ativação da argininosuccinato sintetase (AsS), culminando no aumento da síntese e liberação de NO (CAMARGO et al., 2012; FAKLER; KAFTAN; NELIN, 1995; GUERREIRO et al., 2009). Além disso, estudos de biodistribuição demonstraram que o *Bj*-PRO-10c é capaz de atravessar a barreira hemotoencefálica sugerindo uma possível ação central deste peptídeo (PASCHOAL et al., 2014; SILVA et al., 2008).

1.3.6 Novos PROs

Recentemente, vários peptídeos foram sequenciados e identificados no veneno das serpentes *Bothrops cotiara* e *Bothrops fonsecai*. Alguns deles, tais como, o *Bc*-PRO-10e e *Bf*-PRO-10f, apresentam alta similaridade com a estrutura primária do *Bj*-PRO-10c. Apesar disso, estudo preliminar mostrou diferenças significativas para potencializar os efeitos da Bk quando comparados ao *Bj*-PRO-10c (TASHIMA et al., 2012) (Tabela 1).

Nome	Sequência de aminoácidos	MM (Da)
<i>Bj</i> -PRO-5a ^{a,c,d,e}	<ekwap< td=""><td>611,7</td></ekwap<>	611,7
<i>Bj</i> -PRO-5b ^e	<ewprp< td=""><td>665,8</td></ewprp<>	665,8
<i>Bj</i> -PRO-6a ^{a,e}	<eswpgp< td=""><td>653,7</td></eswpgp<>	653,7
<i>Bj</i> -PRO-7a °	<edgpipp< td=""><td>705,8</td></edgpipp<>	705,8
Bc-PRO-7bf	<enwpsp[q k]<="" td=""><td>838,4</td></enwpsp[q>	838,4
<i>Bf</i> -PRO-7c ^f	<erwpsp[q k]<="" td=""><td>880,5</td></erwpsp[q>	880,5
Bc-PRO-8a ^f	<enahpsp[q k]<="" td=""><td>860,4</td></enahpsp[q>	860,4
<i>Bj</i> -PRO-9a ^{a,b,e}	<ewprpqipp< td=""><td>1101,3</td></ewprpqipp<>	1101,3
<i>Bj</i> -PRO-10a ^{a,b,c,e}	<eswpgpnipp< td=""><td>1075,2</td></eswpgpnipp<>	1075,2
<i>Bj</i> -PRO-10b ^{b,e}	<enwprpqipp< td=""><td>1215,4</td></enwprpqipp<>	1215,4
<i>Bj</i> -PRO-10c ^{a,b,c,d,e}	<enwphpqipp< td=""><td>1196,3</td></enwphpqipp<>	1196,3
Bc-PRO-10d ^f	<enwphppmpp< td=""><td>1183,7</td></enwphppmpp<>	1183,7
Bc-PRO-10e ^f	<enwpsp[q k]vpp<="" td=""><td>1131,5</td></enwpsp[q>	1131,5
Bf-PRO-10d ^f	<enwphppmpp< td=""><td>1182,7</td></enwphppmpp<>	1182,7
Bf-PRO-10f ^f	<erwpsp[q k]vpp<="" td=""><td>1173,6</td></erwpsp[q>	1173,6
<i>Bj</i> -PRO-11a ^{b,e}	<ewprptpqipp< td=""><td>1299,5</td></ewprptpqipp<>	1299,5
<i>Bj</i> -PRO-11b ^{c,e}	<egrapgppipp< td=""><td>1069,2</td></egrapgppipp<>	1069,2
<i>Bj</i> -PRO-11c ^d	<egraphppipp< td=""><td>1149,3</td></egraphppipp<>	1149,3
<i>Bj</i> -PRO-11d ^{a,e}	<egrppgppipp< td=""><td>1095,3</td></egrppgppipp<>	1095,3
<i>Bj</i> -PRO-11e ^d	<earpphppipp< td=""><td>1189,4</td></earpphppipp<>	1189,4
Bc-PRO-11ff	<enahpsp[q k]vpp<="" td=""><td>1153,6</td></enahpsp[q>	1153,6
<i>Bj</i> -PRO-11g ^f	<earprhp[q k][i="" l]pp<="" td=""><td>1278,7</td></earprhp[q>	1278,7
<i>Bj</i> -PRO-11h ^f	<egrhpp[i l]ppap<="" td=""><td>1148,7</td></egrhpp[i>	1148,7
<i>Bj</i> -PRO-11i ^f	<engprp[i l]g[i="" l]pp<="" td=""><td>1127,7</td></engprp[i>	1127,7
<i>Bj</i> -PRO-11j ^f	<enrhpp[i l]ppap<="" td=""><td>1205,6</td></enrhpp[i>	1205,6
<i>Bj</i> -PRO-12a ^{a,e}	<egwawprpqipp< td=""><td>1415,6</td></egwawprpqipp<>	1415,6
<i>Bj</i> -PRO-12b ^d	<ewgrppgppipp< td=""><td>1281,5</td></ewgrppgppipp<>	1281,5
<i>Bj</i> -PRO-12c ^e	<ewaqwprpqipp< td=""><td>1485,8</td></ewaqwprpqipp<>	1485,8
<i>Bf</i> -PRO-12d ^f	<enwphppmppap< td=""><td>1350,7</td></enwphppmppap<>	1350,7
Bc-PRO-12e ^f	<earprpgp[q k][i="" l]pp<="" td=""><td>1295,5</td></earprpgp[q>	1295,5
<i>Bj</i> -PRO-12e ^f	<earprpgp[q k][i="" l]pp<="" td=""><td>1295,6</td></earprpgp[q>	1295,6
<i>Bj</i> -PRO-13a ^{d,e}	<eggwprpgpeipp< td=""><td>1370,5</td></eggwprpgpeipp<>	1370,5
<i>Bj</i> -PRO-13b ^{a,b,c,d,e}	<egglprpgpeipp< td=""><td>1297,5</td></egglprpgpeipp<>	1297,5
<i>Bj</i> -PRO-13d ^f	<egraphpp[i l]ppap<="" td=""><td>1316,7</td></egraphpp[i>	1316,7
Bj-PRO-13cf	<egrpphpp[i l]ppap<="" td=""><td>1342,6</td></egrpphpp[i>	1342,6
<i>Bj</i> -PRO-14a ^e	<ewaqwprpptpqipp< td=""><td>1683,5</td></ewaqwprpptpqipp<>	1683,5

Tabela 1. Peptídeos isolados do veneno da serpente Bothrops jararaca (*Bj*), Bothrops cotiara (Bc) e Bothrops fonsecai (Bf).

Referências: (a)Ferreira et al. (1970),(b) Ondetti et al. (1971), (c) Murayama et al. (1977), (d) Hayashi et al. (2003), (e) lanzer et al. (2004), (f) Tashima et al. (2012), (g) Zelanis et al. (2010).

Durante várias décadas, acreditou-se na clássica hipótese de que os possíveis efeitos na PA induzidos pelos PROs estavam diretamente relacionados com a inibição da ECA e com a potencialização da Bk (CUSHMAN et al., 1973), no entanto, estudos recentes demonstram que os efeitos sobre os parâmetros cardiovasculares induzidos por alguns PROs não estão diretamente relacionados

com inibição da ECA e com a potencialização da Bk (GUERREIRO et al., 2009; MORAIS et al., 2013). Os peptídeos utilizados neste estudo capazes de potencializar a BK e/ou inibir a atividade da ECA *in vitro* e/ou *in vivo*, estão apresentados na tabela 2. Além disso, outros estudos sugerem que os PROs possam atuar por diferentes vias de sinalização (GUERREIRO et al., 2009; IANZER et al., 2007, 2011; MORAIS et al., 2011; NEGRAES et al., 2011), contudo, ainda não foi demonstrado os possíveis efeitos diretos destes peptídeos em aorta e coração isolados de ratos e o possível envolvimento das vias GCs/GMPc/PKG e AC/AMPc/PKA.

Nome	Sequência de aminoácidos	Inibição da ECA		Potencialização da bradicinina	
		In vitro	In vivo	In vitro	In vivo
<i>Bj</i> -PRO-5a ^{a,c,d,e}	<ekwap< td=""><td>х</td><td>-</td><td>1</td><td>-</td></ekwap<>	х	-	1	-
<i>Bj</i> -PRO-7a ^e	<edgpipp< td=""><td>-</td><td>-</td><td>ND</td><td>-</td></edgpipp<>	-	-	ND	-
<i>Bj</i> -PRO-10c ^{a,b,c,d,e}	<enwphpqipp< td=""><td>x</td><td>-</td><td>1</td><td>1</td></enwphpqipp<>	x	-	1	1
Bc-PRO-10e ^f	<enwpspkvpp< td=""><td>x</td><td>ND</td><td>1</td><td>1</td></enwpspkvpp<>	x	ND	1	1
<i>Bf</i> -PRO-10d ^f	<enwphppmpp< td=""><td>x</td><td>ND</td><td>-</td><td>-</td></enwphppmpp<>	x	ND	-	-
Bf-PRO-10ff	<erwpspkvpp< td=""><td>x</td><td>ND</td><td>1</td><td>1</td></erwpspkvpp<>	x	ND	1	1

Tabela 2. Peptídeos potencializadores o	da Bk e/ou inibidores da atividade da ECA
---	---

Referências: (a) Ferreira et al. (1970),(b) Ondetti et al. (1971), (c) Murayama et al. (1977), (d) Hayashi et al. (2003), (e) lanzer et al. (2004), (f) Tashima et al. (2012), (g) Zelanis et al. (2010). (x) inibe a atividade da ECA, (-) Não inibe a ECA e/ou potencializa a Bk, (↑) potencializa a Bk (ND) não determinado.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos de peptídeos isolados de venenos de diferentes serpentes em corações e vasos isolados de ratos hipertensos e normotensos.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar os efeitos dos peptídeos isolados dos venenos das serpentes Bothrops jararaca (Bj-PRO-5a, Bj-PRO-7a e Bj-PRO-10c), Bothrops cotiara (Bc-PRO-10e) e Bothrops fonsecai (Bf-PRO-10d e Bf-PRO-10f) na reatividade vascular em anéis de aorta isolados de aorta torácica de ratos normotensos e hipertensos.
- Avaliar os efeitos dos peptídeos isolados dos venenos das serpentes Bothrops jararaca (Bj-PRO-5a, Bj-PRO-7a e Bj-PRO-10c), Bothrops cotiara (Bc-PRO-10e) e Bothrops fonsecai (Bf-PRO-10d e Bf-PRO-10f) na vasomotricidade coronariana em corações isolados de ratos normotensos e hipertensos.
- Avaliar os efeitos dos peptídeos isolados dos venenos das serpentes Bothrops jararaca (Bj-PRO-5a, Bj-PRO-7a e Bj-PRO-10c), Bothrops cotiara (Bc-PRO-10e) e Bothrops fonsecai (Bf-PRO-10d e Bf-PRO-10f) na contratilidade cardíaca em corações isolados de ratos normotensos e hipertensos.
- Avaliar os possíveis mecanismos de ação dos peptídeos *Bj*-PRO-7a e *Bj*-PRO-10c na reatividade aórtica e coronariana e na contratilidade cardíaca de ratos normotensos e hipertensos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos adultos normotensos (Wistar) e hipertensos (SHR), pesando entre 280-300 gramas, provenientes do Biotério Central do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás. Os animais foram divididos em grupos conforme descrito na tabela 3.

Os animais foram alocados no biotério central de animais para ensino e pesquisa do Instituto de Ciências Biológicas (ICB2), em temperatura e intensidade de luz controladas (12 horas claro / escuro), com livre acesso à água e a comida. Todos os protocolos utilizados foram submetidos à aprovação na Comissão de Ética no Uso de Animais da Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade Federal de Goiás (CEUA/UFG), sob n⁰040/14.

3.2 Peptídeos

Para o desenvolvimento deste estudo foram utilizados os seguintes peptídeos, *Bj*-PRO-5a, *Bj*-PRO-7a, *Bj*-PRO-10c, *Bf*-PRO-10d, *Bf*-PRO-10f e *Bc*-PRO-10e. Estes peptídeos foram cedidos pela Dra. Danielle Alves lanzer, sintetizados no laboratório de síntese de peptídeos do LETA-Instituto Butantan.

Grupo	Protocolo	Peptídeo	Concentração (mol/L)	Linhagem	Inibidor / antagonista	Concentração Inibidor/antag (mol/L)	n
G1	Reatividade vascular	<i>Bj</i> -PRO-5a	10 ⁻⁹ – 10 ⁻⁵	Wistar e SHR	-	-	10
G2	Reatividade vascular	<i>Bj</i> -PRO-7a	10 ⁻⁹ – 10 ⁻⁵	Wistar e SHR	-	-	11
G3	Reatividade vascular	<i>Bj</i> -PRO-7a	10 ⁻⁹ – 10 ⁻⁵	Wistar e SHR	Pirenzepina	3µmol/L	10
G4	Reatividade vascular	<i>Bj</i> -PRO-7a	10 ⁻⁹ - 10 ⁻⁵	Wistar e SHR	Atropina	3µmol/L	10
G5	Reatividade vascular	<i>Bj</i> -PRO-7a	10 ⁻⁹ – 10 ⁻⁵	Wistar e SHR	L-NAME	1µmol/L	12
G6	Reatividade vascular	<i>Bj</i> -PRO-7a	10 ⁻⁹ - 10 ⁻⁵	Wistar e SHR	ODQ	3µmol/L	12
G7	Reatividade vascular	<i>Bj</i> -PRO-7a	10 ⁻⁹ – 10 ⁻⁵	Wistar e SHR	MDL	3µmol/L	11
G8	Reatividade vascular	<i>Bj</i> -PRO-10c	10 ⁻⁹ – 10 ⁻⁵	Wistar e SHR	-	-	10
G9	Reatividade vascular	<i>Bj</i> -PRO-10c	10 ⁻⁹ – 10 ⁻⁵	Wistar e SHR	L-NAME	1µmol/L	11
G10	Reatividade vascular	<i>Bj</i> -PRO-10c	10 ⁻⁹ - 10 ⁻⁵	Wistar e SHR	ODQ	3µmol/L	10
G11	Reatividade vascular	<i>Bj</i> -PRO-10c	10 ⁻⁹ - 10 ⁻⁵	Wistar e SHR	MDL	3µmol/L	10
G12	Reatividade vascular	<i>Bj</i> -PRO-10c	10 ⁻⁹ – 10 ⁻⁵	Wistar e SHR	MDLA	1µmol/L	10
G13	Reatividade	Bc-PRO-10e	10 ⁻⁹ – 10 ⁻⁵	Wistar e SHR	-		10
G14	Reatividade vascular	Bf-PRO-10d	10 ⁻⁹ – 10 ⁻⁵	Wistar e SHR	-	-	10
G15	Reatividade vascular	<i>Bf</i> -PRO-10f	10 ⁻⁹ – 10 ⁻⁵	Wistar e SHR	-	-	10
G16	Coração isolado	<i>Bj</i> -PRO-5a	5nmol/L 50pmol/L	Wistar e SHR	-	-	20
G17	Coração isolado	<i>Bj</i> -PRO-7a	5nmol/L 50pmol/L	Wistar e SHR	-	-	24
G18	Coração isolado	<i>Bj</i> -PRO-7a	5nmol/L	Wistar e SHR	L-NAME	10nmol/L	10
G19	Coração isolado	<i>Bj</i> -PRO-7a	5nmol/L	Wistar e SHR	ODQ	200nmol/L	10
G20	Coração isolado	<i>Bj</i> -PRO-7a	5nmol/L	Wistar e SHR	MDL	1µmol/L	11
G21	Coração isolado	<i>Bj</i> -PRO-10c	5nmol/L 50pmol/L	Wistar e SHR	-	-	25
G22	Coração isolado	<i>Bj</i> -PRO-10c	50pmol/L	Wistar e SHR	L-NAME	10nmol/L	10
G23	Coração isolado	<i>Bj</i> -PRO-10c	50pmol/L	Wistar e SHR	ODQ	200nmol/L	10
G24	Coração isolado	<i>Bj</i> -PRO-10c	50pmol/L	Wistar e SHR	MDL	1µmol/L	10
G25	Coração isolado	Bc-PRO-10e	5nmol/L 50pmol/L	Wistar e SHR	-	-	20
G26	Coração isolado	Bf-PRO-10d	5nmol/L 50pmol/L	Wistar e SHR	-	-	19
G27	Coração isolado	Bf-PRO-10f	5nmol/L 50pmol/L	Wistar e SHR	-	-	21

Tabela 3. Grupos experimentais.
3.3 Reatividade Vascular

3.3.1 Preparo dos anéis de aorta isolados

A avaliação da reatividade vascular foi realizada utilizando-se a técnica de Banho de órgãos isolados (Figura 3).



Figura 3. Ilustração esquemática de uma preparação de anel de aorta de ratos em banho de órgãos isolados. Os anéis são mantidos em solução de Krebs-Henseleit carbogenada (95% O_2 ,5% CO_2) e aquecida a ± 37 $^{\circ}$ C, com uma tensão de 1,5g (Adaptado de OGUZHAN YILDIZ, 2013).

Para a obtenção dos vasos, os animais foram eutanasiados por decapitação 10 minutos após serem heparinizados (400 UI de heparina). Uma vez exposta a cavidade torácica a aorta torácica foi retirada e dividida em anéis de 4 mm. Os anéis de aorta torácica descendente, livre de tecido adiposo e conectivo, foram montados em hastes metálicas e submersas em solução Krebs-Henseleit oxigenada (95% O_2 + 5% CO_2) e mantida a uma temperatura de 37 ^oC.

Os anéis de aorta foram mantidos sob uma tensão de 1,5 g por um período de 1 hora para a estabilização da preparação. A atividade mecânica foi registrada isometricamente utilizando um sistema de aquisição de dados (Dataq Instruments,

EUA). A composição da solução nutridora utilizada para o banho do anel de aorta isolada (Solução Krebs-Henseleit) está detalhada na Tabela 4.

Composto	Concentração em mM
NaCl	118,06
KCI	4,6
MgSO ₄ .7H ₂ O	2,4
CaCl ₂ .2H ₂ O	3,3
C ₆ H ₁₂ O ₆	11,1
NaHCO ₃	24,9
KH ₂ PO ₄	0,9

Tabela 4. Solução de Krebs-Henseleit.

A integridade do endotélio foi avaliada através do efeito vasorelaxamente da Ach (10 μ M) em anéis de aorta pré-contraídos com Fenilefrina (Phe 0,1 μ M). Os anéis foram considerados viáveis para realização dos experimentos quando alcançado no mínimo 40% de contração e acima de 80% de relaxamento.

Para avaliar os efeitos dos PROs na musculatura lisa vascular dos anéis de aorta, o endotélio foi removido através do atrito mecânico da superfície interna do vaso com uma haste metálica.

3.3.2 Protocolo experimental

Para avaliar o possível efeito vasorelaxante dos PROs, após o período de estabilização, os anéis de aorta com (E+) e sem endotélio (E-), foram précontraídos com Phe (0,1 µM), seguido de concentrações cumulativas dos PROs (0,1 nM - 1 µM).

Para avaliar o envolvimento do NO nos efeitos dos PROs, os anéis de aorta foram incubados por um período de 10 ou 30 minutos com um antagonista do receptor muscarínico M₁ (Pirenzepina, 3 μ mol/L), antagonista não específico dos receptores muscarínicos (Atropina 1 μ mol/L), inibidor da óxido nítrico sintase (L-NAME 1 μ mol/L), inibidor da guanilato ciclase (ODQ, 3 μ mol/L), inibidor da adenilato ciclase (MDL 12,330A, 3 μ mol/L) ou inibidor da argininosuccinato sinthetase (MDLA, 1 μ mol/L). Após o período de incubação, foi adicionado concentrações cumulativas dos PROs (0,1 nM - 1 μ M).

3.4 Preparações dos corações isolados

Para avaliação dos efeitos dos peptídeos na função ventricular e coronariana *ex vivo*, foi utilizada a técnica de Langendorff com fluxo constante. O fluxo estabelecido foi de 10 ± 2 ml/min, mantidos a uma temperatura de 37 ± 1 ^oC.

Os animais foram eutanasiados por decaptação 10 minutos após serem heparinizados (400 UI). A cavidade torácica foi aberta e o coração retirado e colocado em um béquer, contendo solução nutridora em temperatura aproximada de 4 °C. Esse resfriamento foi necessário para diminuir o metabolismo do miocárdio, antes destes serem conectados ao sistema de perfusão.

Após os corações terem sido colocados sobre uma placa de Petri, foram removidos os tecidos pulmonar e vascular, esôfago e traquéia que acompanhavam o coração, a artéria aorta ascendente foi seccionada na altura de sua primeira ramificação e fixada a uma agulha de aço inoxidável conectada ao sistema de perfusão contendo a solução nutridora de Krebs Ringer (mmol/L) (Tabela 5).

Composto	Concentração em mM
NaCl	118,4
KCI	4,7
MgSO _{4.} 7H ₂ O	1,2
CaCl ₂ .2H ₂ O	1,25
C ₆ H ₁₂ O ₆	11,7
NaHCO ₃	26,5
KH ₂ PO ₄	1,2

Tabela 5. Solução de Krebs-Ringer.

Foram utilizados dois transdutores de registro, o primeiro conectado a um pequeno balão que foi inserido na câmara ventricular esquerda e o segundo transdutor foi acoplado ao sistema por uma abertura acima do coração. Os dados foram analisados utilizando um sistema de aquisição de dados DATAQ Instruments (Figura 4).



Figura 4. ilustração do sistema de Langendorff a fluxo constante. Os corações são perfundidos por solução Krebs-Ringer (95% O_2 ,5% CO_2) e aquecida a ± 37 $^{\circ}C$.

3.4.2 Protocolo experimental

Para verificar os efeitos do PROs sobre a vasomotricidade coronariana e contratilidade cardíaca, foram avaliados os parâmetros de Pressão de Perfusão (PP), Pressão Intraventricular Sistólica (PIS), Pressão Desenvolvida no Ventrículo Esquerdo (PDVE), dP/dt máxima e mínima. Os corações isolados de ratos foram perfundidos com solução nutridora contendo os PROs (5 nmol/L ou 50 pmol/L) durante 15 minutos, após um período de estabilização (30-40 minutos).

Para avaliar os possíveis mecanismos de ação, alguns corações foram perfundidos com solução nutridora contendo os seguintes inibidores, L-NAME (10 nmol/L), ODQ (200 nmol/L) ou MDL 12,330a (1 µmol/L) durante o período de estabilização. Posteriormente, foram adicionados os peptídeos *Bj*-PRO-7a (5 nmol/L) ou *Bj*-PRO-10c (50 pmol/L).

3.5 Análise Estatística

Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média (EPM). Para análise dos resultados, foi utilizado o teste Two-Way ANOVA, seguido do pósteste Sidak. Todas as análises estatísticas foram consideradas significantes quando p<0,05.

4 Resultados

4.1 Efeitos cardiovasculares induzidos pelo Bj-PRO-5a

O *Bj*-PRO-5a promoveu vasorelaxamento dependente do endotélio em anéis de aorta isolados de ratos normotensos e hipertensos. A amplitude do efeito vasorelaxante induzido pelo *Bj*-PRO-5a, não diferiu significativamente entre os anéis de aorta isolados de ratos Wistar (17,2 \pm 1,1 %) comparados aos anéis de aorta de SHR (18,2 \pm 0,4%) (Figura 5).



Figura 5. Efeito do *Bj*-PRO-5a em anéis de aorta isolados com (E+) e sem endotélio (E) de ratos Wistar e SHR. . Os valores estão expressos como média \pm EPM. Two-Way ANOVA seguido pelo pós teste Sidak foi utilizado.*p<0,05 *vs* Wistar (E+), # p<0,05 vs SHR (E+).

No leito coronariano, o *Bj*-PRO-5a não promoveu nenhuma alteração significativa nas concentrações utilizadas (Figura6).



Figura 6. Efeito do *Bj*-PRO-5a sob o leito coronariano de ratos Wistar e SHR. Os valores estão expressos como média ± EPM. Two-Way ANOVA seguido pelo pós teste Sidak foi utilizado.

Nos parâmetros de contratilidade cardíaca, o *Bj*-PRO-5a na concentração de 50 pmol/L, promoveu uma redução significativa da Pressão Intraventricular Sistólica (PIS), Pressão Desenvolvida no Ventrículo Esquerdo (PDVE), dP/dt máxima e mínima em corações isolados de ratos Wistar. Além disso, esse efeito foi significativamente diferente dos observados em corações isolados de SHR (Figura 7 A-D).



Figura 7. Efeitos do *Bj*-PRO-5a na (A) Pressão Intraventricular Sistólica, (B) Pressão Desenvolvida no Ventrículo Esquerdo, (C) dP/dt máxima, (D) dP/dt mínima. Os valores estão expressos como média \pm EPM. Two-Way ANOVA seguido pelo pós teste Sidak foi utilizado. +p<0,05 vs basal, * p<0,05 vs SHR mesma concentração.

4.2 Efeitos cardiovasculares induzidos pelo Bj-PRO-7a

Em anéis de aorta isolados de ratos normotensos e hipertensos, o *Bj*-PRO-7a promoveu vasorelaxamento dependente do endotélio. Foi possível observar também, um vasorelaxamento mais significativo em anéis de aorta isolados de ratos Wistar (22,2 \pm 1,3%) quando comparados aos SHRs (15,6 \pm 1,4%) (Figura 8).



Figura 8. Efeito do *Bj*-PRO-7a em anéis de aorta isolados com (E+) e sem endotélio (E-) de ratos Wistar e SHR. Os valores estão expressos como média \pm EPM. Two-Way ANOVA seguido pelo pós teste Sidak foi utilizado. +p<0,05 Wistar (E+) *vs* SHR (E+), * p<0,05 *vs* Wistar (E+), #p<0,05 *vs* SHR (E+).

Além disso, somente na concentração de 5nmol/L, o *Bj*-PRO-7a induziu uma significativa vasodilatação coronariana em corações isolados de ratos Wistar e SHR (figura 9).



Figura 9. Efeito do *Bj*-PRO-7a no leito coronariano de ratos Wistar e SHR. Os valores estão expressos como média ± EPM. Two-Way ANOVA seguido pelo pós teste Sidak foi utilizado. + p<0,05 *vs* Basal do SHR nos tempos 4,6,8,10 e Wistar nos tempos 4 e 6.

Nos parâmetros de contratilidade cardíaca, o *Bj*-PRO-7a tanto na concentração de 5 nmol/L quanto na de 50 pmol/L promoveu uma redução significativa na PIS e PDVE em corações isolados de ratos Wistar. Além disso, na concentração de 50 pmol/L, foi observado uma redução significativa na dP/dt

máxima e mínima em corações isolados de ratos Wistar. Os resultados observados na PIS, PDVE e dP/dt mínima em corações isolados de Wistar foram significativamente diferentes quando comparados aos de SHR na concentração de 50 pmol/L (Figura10 A-D).



Figura 10. Efeitos do *Bj*-PRO-7a na (A) Fressao muavemmoural Sistema, (B) Pressão Desenvolvida no Ventrículo Esquerdo, (C) dP/dt máxima, (D) dP/dt mínima.Os valores estão expressos como média ± EPM. Two-Way ANOVA seguido pelo pós teste Sidak foi utilizado. +p<0,05 *vs* basal, * p<0,05 *vs* SHR na mesma concentração.

4.3 Efeitos cardiovasculares induzidos pelo Bj-PRO-10c

O efeito vasorelaxante promovido pelo *Bj*-PRO-10c foi observado somente em anéis de aorta isolados com endotélio de ratos normotensos e hipertensos. Observou-se também, uma diferença mais significativa no vasorelaxamento induzido por este peptídeo em anéis de aorta isolados de ratos Wistar (26,5 ± 2,8 %) comparados aos de SHRs (14,4 ± 2,0 %) (Figura 11).



Figura 11. Efeito do *Bj*-PRO-10c em anéis de aorta isolados com (E+) e sem endotélio (E-) de ratos Wistar e SHRs. Os valores estão expressos como média \pm EPM. Two-Way ANOVA seguido pelo pós teste Sidak foi utilizado.⁺p<0,05 Wistar (E+) *vs* SHR (E+), *p<0,05 *vs* Wistar (E+), #p<0,05 vs SHR (E+).

Na concentração de 50 pmol/L, o *Bj*-PRO-10c promoveu uma significante vasodilatação coronariana em corações isolados de ratos Wistar e SHRs, no entanto não foi observado alterações significativas na concentração 5 nmol/L (Figura 12).



Figura 12. Efeito do *Bj*-PRO-10c em coronárias de ratos Wistar e SHR. Os valores estão expressos como média ± EPM. Two-Way ANOVA seguido pelo pós teste Sidak foi utilizado. ⁺p<0,05 *vs* basal.

Nos parâmetros de contratilidade cardíaca, este peptídeo promoveu uma significativa redução na PIS, PDVE, dPdt máxima e mínima em corações isolados de ratos Wistar e SHR, em todas as concentrações utilizadas (5 nmol/L e 50 pmol/L) (Figura 13 A-D).



Figura 13. Efeitos do *Bj*-PRO-10c na (A) Pressão Intraventricular Sistólica, (B) Pressão Desenvolvida no Ventrículo Esquerdo, (C) dP/dt máxima, (D) dP/dt mínima. Os valores estão expressos como média ± EPM. Two-Way ANOVA seguido pelo pós teste Sidak foi utilizado.+p<0,05 *vs* basal.

4.4 Efeitos cardiovasculares induzidos pelo Bc-PRO-10e

O peptídeo *Bc*-PRO-10e promoveu vasorelaxamento dependente do endotélio em anéis de aorta isolados de ratos normotensos e hipertensos. Esse efeito foi mais evidente em anéis de aorta isolados de ratos Wistar (8,1 \pm 0,5%) do que em anéis de SHRs (4,5 \pm 0,6%) (Figura 14).



Figura 14. Efeito do *Bc*-PRO-10e em anéis de aorta isolados com (E+) e sem endotélio (E-) de ratos Wistar e SHRs. Os valores estão expressos como média \pm EPM. Two-Way ANOVA seguido pelo pós teste Sidak foi utilizado.⁺ p< 0,05 Wistar (E+) *vs* SHR (E+), *p<0,05 *vs* Wistar (E+), #p<0,05 *vs* SHR (E+).

No entanto, o *Bc*-PRO-10e não induziu nenhuma alteração significativa no leito coronariano de ratos Wistar e SHRs em nenhuma das concentrações utilizadas (Figura 15).



Figura 15. Efeito do *Bc*-PRO-10e em coronárias de ratos Wistar e SHR. Os valores estão expressos como média ± EPM. Two-Way ANOVA seguido pelo pós teste Sidak foi utilizado.

Semelhante ao resultado observado no leito coronariano, este peptídeo não promoveu nenhuma alteração significativa nos parâmetros de contratilidade cardíaca em nenhuma das concentrações utilizadas (Figura 16 A-D).



Figura 16. Efeitos do *Bc*-PRO-10e na (A) Pressão Intraventricular Sistólica, (B) Pressão Desenvolvida no Ventrículo Esquerdo, (C) dP/dt máxima, (D) dP/dt mínima. Os valores estão expressos como média ± EPM. Two-Way ANOVA seguido pelo pós teste Sidak foi utilizado.

4.5 Efeitos cardiovasculares induzidos pelo Bf-PRO-10d

O efeito vasorelaxante promovido *Bf*-PRO-10d, foi evidenciado somente em anéis de aorta isolados com endotélio de ratos normotensos e hipertensos. Não houve diferença significativa no efeito vasorelaxante induzido por este peptídeo em anéis de aorta isolados de ratos Wistar (11,8 \pm 2,5 %) comparados aos de SHRs (13,9 \pm 1,5 %) (Figura 17).



Figura 17. Efeito do *Bf*-PRO-10d em anéis de aorta isolados com (E+) e sem endotélio (E-) de ratos Wistar e SHR. Os valores estão expressos como média \pm EPM. Two-Way ANOVA seguido pelo pós teste Sidak foi utilizado. *p<0,05 *vs* Wistar (E+), #p<0,05 *vs* SHR (E+).

Este peptídeo, não promoveu nenhuma alteração significativa, no parâmetro pressão de perfusão coronariana em corações isolados de ratos Wistar e SHR (Figura 18).



Figura 18. Efeito do *Bf*-PRO-10d em coronárias de ratos Wistar e SHR. Os valores estão expressos como média ± EPM. Two-Way ANOVA seguido pelo pós teste Sidak foi utilizado.

Nos parâmetros de contratilidade cardíaca, o *Bf*-PRO-10d não promoveu nenhuma alteração significativa (Figura 19 A-D).



Figura 19. Efeitos do *Bf*-PRO-10d na (A) Pressão Intraventricular Sistólica, (B) Pressão Desenvolvida no Ventrículo Esquerdo, (C) dP/dt máxima, (D) dP/dt mínima. Os valores estão expressos como média ± EPM. Two-Way ANOVA seguido pelo pós teste Sidak foi utilizado.

4.6 Efeitos cardiovasculares induzidos pelo Bf-PRO-10f

O *Bf*-PRO-10f promoveu vasorelaxamento dependente do endotélio, em anéis de aorta isolados de ratos normotensos e hipertensos. Não houve diferença significativa no efeito vasorelaxante induzido pelo *Bf*-PRO-10f em anéis de aorta isolados de ratos Wistar (15,6 \pm 1,4%) comparados aos de SHRs (15,0 \pm 1,5%) (Figura 20).



Figura 20. Efeitos do *Bf*-PRO-10f em anéis de aorta isolados com (E+) e sem endotélio (E-) de ratos Wistar e SHR. Os valores estão expressos como média \pm EPM. Two-Way ANOVA seguido pelo pós teste Sidak foi utilizado. *p<0,05 *vs* Wistar (E+), #p<0,05 *vs* SHR (E+).

Não foi observada nenhuma alteração significativa no parâmetro pressão de perfusão coronariana, em nenhuma das concentrações utilizadas em corações isolados de ratos Wistar e SHRs (Figura 21).



Figura 21. Efeitos do *Bf*-PRO-10f em coronárias de ratos Wistar e SHRs. Os valores estão expressos como média ± EPM. Two-Way ANOVA seguido pelo pós teste Sidak foi utilizado.

No entanto, o *Bf*-PRO-10f induziu uma redução significativa em todos os parâmetros de contratilidade em corações isolados de ratos Wistar e SHRs na concentração de 50 pmol/L (Figura 22 A-D).



Figura 22. Efeitos do *Bf*-PRO-10f na (A) Pressão Intraventricular Sistólica, (B) Pressão Desenvolvida no Ventrículo Esquerdo, (C) dP/dt máxima, (D) dP/dt mínima. Os valores estão expressos como média ± EPM. Two-Way ANOVA seguido pelo pós teste Sidak foi utilizado. +p<0,05 *vs* basal.

4.7 Seleção dos PROs para investigação dos mecanismos de ação

Após análise dos efeitos induzidos por cada peptídeo sobre os anéis de aorta e corações isolados de ratos Wistar e SHRs, pôde-se constatar que os peptídeos que promoveram melhores efeitos vasculares foram o *Bj*-PRO-7a e *Bj*-PRO-10c Tabela 6. O mesmo foi observado quando foi analisada a pressão de perfusão e a função contrátil dos corações isolados, na qual o *Bj*-PRO-7a induziu maior efeito na concentração (5 nmol/L) e *Bj*-PRO-10c (50 pmol/L) Tabela 7. A partir desta análise, foi utilizada a concentração que induziu maior efeito para investigar os possíveis mecanismos de ação em anéis de aorta e corações isolados.

Vasorelaxamento													
Peptídeos	Wistar (E+)	Wistar (E-)	SHR (E+)	SHR (E-)									
<i>Bj</i> -PRO-5a	\downarrow	-	\downarrow	-									
<i>Bj</i> -PRO-7a	$\downarrow\downarrow$	-	\downarrow	-									
<i>Bj</i> -PRO-10c	$\downarrow\downarrow$	-	\downarrow	-									
Bc-PRO-10e	$\downarrow\downarrow$	-	\downarrow	-									
<i>Bf</i> -PRO-10d	\downarrow	-	\downarrow	-									
Bf-PRO-10f	\downarrow	-	\downarrow	-									

 Tabela 6. Efeito vasorelaxante em aorta isolada promovido pelos PROs.

(\downarrow) Vasorelaxamento, ($\downarrow\downarrow$) Vasorelaxamento mais significativo em relação aos SHRs, (-) ausência de vasorelaxamento.

Tabela 7. Efeito en	n corações isolados	promovido pelos PROs.	
---------------------	---------------------	-----------------------	--

Parâmetros Cardiovasculares

Peptídeo	PP		PIS		PD\	/E	dP/dt	Máx	dP/dt Mín		
	Wistar	SHR	Wistar	SHR	Wistar	SHR	Wistar	SHR	Wistar	SHR	
<i>Bj</i> -PRO-5a	-	-	$\downarrow\downarrow$	-	$\downarrow\downarrow$	-	$\downarrow\downarrow$	-	$\downarrow\downarrow$	-	
<i>Bj</i> -PRO-7a	\downarrow	↓	$\downarrow\downarrow$	-	\downarrow	-	\downarrow	-	$\downarrow\downarrow$	-	
<i>Bj</i> -PRO-10c	\downarrow	\downarrow	\downarrow	\downarrow	\downarrow	\downarrow	\downarrow	\downarrow	\downarrow	\downarrow	
Bc-PRO-10e	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Bf</i> -PRO-10d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Bf-PRO-10f	-	-	\downarrow	\downarrow	↓	\downarrow	\downarrow	\downarrow	\downarrow	\downarrow	

(↓) Redução do parâmetro cardíaco, (↓↓) redução mais significativa do parâmetro cardíaco em relação aos SHRs,(-) ausência de efeito no parâmetro cardíaco

4.8 Avaliação dos Mecanismos de ação do Bj-PRO-7a

O efeito vasorelaxante em anéis de aorta isolado de ratos Wistar e SHRs induzido pelo peptídeo *Bj*-PRO-7a foi bloqueado pela atropina (3 µmol/L), um antagonista não específico de receptores muscarínicos, e significativamente reduzido por um antagonista específico do receptor muscarínico M₁, pirenzepina (3 µmol/L) (Figura 23 A-B).



Figura 23. Efeito do *Bj*-PRO-7a na presença de pirenzepina ou atropina em anéis de aorta isolados de ratos (A) Wistar e (B) SHR. Os valores estão expressos como média ± EPM. Two-Way ANOVA seguido pelo pós teste Sidak foi utilizado. *p<0,05 *vs* controle

Além disso, na presença do inibidor da óxido nítrico sintase (L-NAME), inibidor da guanilato ciclase (ODQ) ou inibidor da adenilato ciclase (MDL 12,330a), o efeito vasorelaxante do *Bj*-PRO-7a em anéis de aorta isolados de ratos Wistar e SHRs foi completamente inibido (Figura 24 A-B).



Figura 24. Efeito do *Bj*-PRO-7a na presença de L-NAME, ODQ ou MDL 12,330a em anéis de aorta de ratos (A) Wistar e (B) SHR. Os valores estão expressos como média ± EPM. Two-Way ANOVA seguido pelo pós teste Sidak foi utilizado.*p<0,05 *vs* controle

No leito coronariano, o efeito vasodilatador induzido pelo *Bj*-PRO-7a em corações isolados de ratos Wistar foi inibido na presença de L-NAME e atenuado pelo MDL 12,330a. Interessantemente em corações de ratos SHR, este efeito foi bloqueado pelo L-NAME, ODQ ou MDL 12,330a (Figura 25 A-B).



Figura 25. Efeito do *Bj*-PRO-7a na presença de L-NAME, ODQ ou MDL 12,330a em coronárias de ratos (A) Wistar e (B) SHR. Os valores estão expressos como média ± EPM. Two-Way ANOVA seguido pelo pós teste Sidak foi utilizado.*p<0,05 *vs* controle; +p<0,05 *vs* basal

Ao investigar os mecanismos de ação envolvidos no inotropismo negativo desencadeado pelo *Bj*-PRO-7a, apenas o L-NAME foi capaz de inibir este efeito em corações isolado de ratos Wistar. No entanto o inibidor da guanilato ciclase e adenilato ciclase potencializou o efeito do *Bj*-PRO-7a nos corações destes ratos (Figura 26 A, C, E e G). Nenhum dos inibidores utilizados foi capaz de inibir o efeito deste peptídeo em corações isolados de SHRs, todavia, o inibidor da adenilato ciclase potencializou o efeito do *Bj*-PRO-7a em corações isolados de SHRs (Figura 26 B, D, F e H).





Figura 26. Efeito do *Bj*-PRO-7a na presença de L-NAME, ODQ ou MDL 12,330a na Pressão Intraventricular Sistólica em corações isolados de ratos (A) Wistar e (B) SHRs, Pressão Desenvolvida no Ventrículo Esquerdo em corações isolados de ratos (C) Wistar (D) SHRs, dP/dt Máxima em corações isolados de ratos (E) Wistar (F) SHRs, dP/dt mínima em corações isolados de ratos (G) Wistar e (H) SHRs. Os valores estão expressos como média ± EPM. Two-Way ANOVA seguido pelo pós teste Sidak foi utilizado.*p<0,05 *vs* controle, + p<0,05 *vs* basal.

4.9 Mecanismo de ação do Bj-PRO-10c

Em anéis de aorta isolados de ratos Wistar e SHR, o efeito vasorelaxante do *Bj*-PRO-10c foi inibido na presença de L-NAME, ODQ ou MDL 12,330a. Já na presença do MDLA o efeito vasorelaxante deste peptídeo foi inibido somente em anéis de aorta de ratos SHRs (Figura 27).



Figura 27. Efeito do *Bj*-PRO-10c na presença de L-NAME, ODQ, MDL 12,330a ou MDLA em anéis de aorta de ratos (A) Wistar e (B) SHRs. Os valores estão expressos como média ± EPM. Two-Way ANOVA seguido pelo pós teste Sidak foi utilizado.*p<0,05 vs controle

A vasodilatação coronariana induzida pelo *Bj*-PRO-10c foi inibida na presença de L-NAME, ODQ ou MDL 12,330a em corações de ratos Wistar e SHR (Figura 28 A-B).



Figura 28. Efeito do *Bj*-PRO-10c em coronárias de ratos (A) Wistar e (B) SHRs na presença de L-NAME, ODQ ou MDL 12,330a. Os valores estão expressos como média \pm EPM. Two-Way ANOVA seguido pelo pós teste Sidak foi utilizado. *p<0,05 *vs* controle, + p<0,05 *vs* basal.

Efeito semelhante foi observado ao se investigar o mecanismo de ação responsável pelo efeito inotrópico negativo induzido por este peptídeo (Figura 29 A-H).



Figura 29. Efeito do *Bj*-PRO-10c na presença de L-NAME, ODQ ou MDL 12,330a na Pressão Intraventricular Sistólica em corações isolados de ratos (A) Wistar e (B) SHRs, Pressão Desenvolvida no Ventrículo Esquerdo em corações isolados de ratos (C) Wistar (D) SHRs, dP/dt Máxima em corações isolados de ratos (E) Wistar (F) SHRs, dP/dt mínima em corações isolados de ratos (G) Wistar e (H) SHRs. Os valores estão expressos como média ± EPM. Two-Way ANOVA seguido pelo pós teste Sidak foi utilizado.*p<0,05 vs controle, + p<0,05 vs basal.

A representação simplificada dos resultados de investigação dos mecanismos de ação em artéria isolada e coração isolado estão descritos na tabela 8 e 9 respectivamente.

Tabela 8. Mecanismo de ação dos peptídeos Bj-PRO-7a e Bj-PRO-10c em aortas isoladas de ratos Wistar e SHR.

	Vasorelaxamento aórtico													
	Wistar								SHR					
Peptídeos	Cont	Atrop	Pirenz	L-NAME	ODQ	MDL	MDLA	Cont	Atrop	Pirenz	L-NAME	ODQ	MDL	MDLA
<i>Bj-</i> PRO-7a	$\downarrow\downarrow$	х	-↓	х	х	х	NA	↓	х	-↓	х	х	Х	NA
<i>Bj-</i> PRO-10c	$\downarrow\downarrow$	NA	NA	х	х	х	\downarrow	↓ ↓	NA	NA	х	х	х	х

(4) Vasorelaxamento, (44) maior vasorelaxamento em relação aos SHRs, (x) bloqueio do vasorelaxamento, (-4) bloqueio parcial do vasorelaxamento, (NA) não aplicado

Tabela 9. Mecanismo de ação dos peptídeos Bj-PRO-7a e Bj-PRO-10c em corações isolados de ratos Wistar e SHR.

Parâmetros Cardíacos

Peptídeos		Pı	de Perfu	isão Co	ronariana	Contratilidade										
		Wista	ar		SHR			Wistar				SHR				
	Cont	L-NAME	ODQ	MDL	Cont	L-NAME	ODQ	MDL	Cont	L-NAME	ODQ	MDL	Cont	L-NAME	ODQ	MDL
<i>Bj</i> -PRO-7a	\downarrow	х	\downarrow	х	↓	х	Х	х	↓	х	\downarrow	↓	-	-	-	\downarrow
<i>Bj</i> -PRO-10c	\downarrow	Х	Х	Х	↓	х	Х	х	↓	х	Х	Х	↓	Х	Х	х

(↓) Redução dos parâmetros cardíacos, (-) ausência de efeito nos parâmetros cardíacos, (x) bloqueio dos parâmetros cardíacos

5 DISCUSSÃO

Os principais achados deste estudo são; (a) todos os PROs promoveram vasorelaxamento dependente do endotélio em anéis de aorta isolados de ratos Wistar e SHR; (b) Somente os PROs *Bj*-PRO-7a (5nmol/L) e *Bj*-PRO-10c (50pmol/L) promoveram significativa vasodilatação coronariana em corações isolados de ratos Wistar e SHR; (c) Os peptídeos *Bj*-PRO-5a e *Bj*-PRO-7a promoveram significativa redução da PIS, PDVE, dP/dt máxima e mínima somente em corações isolados de ratos Wistar, ao passo que os peptídeos *Bj*-PRO-10c e *Bf*-PRO-10f induziram significante redução destes parâmetros tanto em corações isolados de ratos Wistar quanto em SHR.

5.1 Avaliação dos PROs sobre o leito aórtico

Em nosso estudo, foi observado que os peptídeos *Bj*-PRO-5a, *Bf*-PRO-10d e *Bf*-PRO-10f promoveram vasorelaxamento dependente do endotélio em anéis de aorta isolados de ratos Wistar e SHR. No entanto, não houve diferença significativa no efeito vasorelaxante entre as linhagens. Por outro lado, os peptídeos *Bj*-PRO-7a, *Bj*-PRO-10c e *Bc*-PRO-10e promoveram um vasorelaxamento mais proeminente em anéis de aorta isolados de ratos Wistar quando comparados aos de SHRs. O único PRO descrito na literatura por seus efeitos diretos em anéis de aorta isolados de ratos, foi o pentapeptídeo *Bj*-PRO-5a (IANZER et al., 2011). Semelhante aos nossos resultados, lanzer et al., 2011 demonstraram que o efeito vasorelaxante desencadeado pelo *Bj*-PRO-5a é dependente de endotélio. Tais achados sugerem que os PROs desencadeiam seus efeitos por vias presentes no endotélio.

Já foi demonstrado, que o NO é a principal substância responsável pelo vasorelaxamento de artérias e arteríolas (MAXWELL, 2002). Em animais SHR a redução da biodisponibilidade de NO e a consequente disfunção endotelial, determinam, no ambiente vascular, alterações do tono, ou seja, a capacidade de relaxamento adequado (CARVALHO, 1987). Tal fato, explicaria um menor efeito vasorelaxante em anéis de aorta de SHRs induzido pelos peptídeos *Bj*-PRO-7a, *Bj*-PRO-10c e *Bc*-PRO-10e.

Trabalhos anteriores sugeriram que o peptídeo *Bj*-PRO-7a possui atividade agonista sobre o receptor muscarínico M₁ (NEGRAES et al., 2011) e que o *Bj*-PRO-10c aumenta a atividade da enzima argininosuccinato sintetase (AsS) (Guerreiro et

al.,2009). Baseado nestes estudos, nos avaliamos os mecanismos de ação envolvidos no vasorelaxamento desencadeado pelo *Bj*-PRO-7a sobre os receptores muscarínicos e do *Bj*-PRO-10c sobre a AsS em anéis de aorta isolados de ratos Wistar e SHR.

De acordo com nossos resultados, o efeito vasorelaxante desencadeado pelo *Bj*-PRO-7a foi bloqueado por atropina e significantemente reduzido pela pirezenpina em anéis de aorta isolados de ratos Wistar e SHRs. O vasorelaxamento induzido pelo *Bj*-PRO-10c foi bloqueado por um inibidor da enzima AsS (MDLA) em anéis de aorta isolados de SHR, mas não alterou o efeito nos anéis de aorta isolados de ratos Wistar.

Já foi demonstrado que o peptídeo Bj-PRO-7a tem capacidade de induzir um aumento no transiente intracelular de Ca²⁺ em células ovarianas de hamster chineses (CHO), e na presença de um antagonista específico do receptor muscarínico M1 este efeito foi abolido (NEGRAES et al., 2011). Os receptores muscarínicos M₁, M₃ e M₅ são os subtipos mais expressos no endotélio vascular (ADRIAN et al., 2011). Embora o subtipo M₃ seja o mais expresso no endotélio dos vasos de condutância (aorta e femoral) (BÉNY et al., 2008; BOULANGER; MORRISON; VANHOUTTE, 1994; FERNANDES et al., 1991; GERICKE et al., 2009; LAMPING et al., 2004), os subtipos M1 e M5 também são expressos e podem influenciar no vasorelaxamento do músculo liso vascular através da síntese de NO (CHIBA; TSUKADA, 1996; ELHUSSEINY; HAMEL, 1993; NOREL et al., 1996; PESIC; JOVANOVIC; GRBOVIC, 2001; RYBERG et al., 2008; YAMADA et al., 2001). Embora nossos resultados corroborem com os achados de Negraes et al 2011, é necessário avaliar ainda a influência direta dos receptores M₃ e M₅ no efeito vasorelaxante desencadeado por este peptídeo em aorta isolada. Por outro lado, já foi demonstrado que o peptídeo Bi-PRO-10c tem a capacidade de induzir um aumento dos níveis de L-Arginina no plasma de ratos Wistar e SHR, no entanto, a redução na PA induzida por este peptídeo foi observada somente em SHR (Guerreiro et al., 2009). Ademais, foi observado que a administração de MDLA promoveu um aumento da PA somente em SHRs (Guerreiro et al.,2009), indicando a participação da AsS no controle da PA nesses animais. De acordo Guerreiro et al. (2009), a atividade aumentada da AsS em SHRs surge como um possível mecanismo compensatório para a síntese de NO (Guerreiro et al.,2009). Diante disso, pode ser possível que a atividade da AsS em anéis de aorta de SHRs esteja aumentada devido a uma menor síntese de NO, o que justificaria nossos resultados, uma vez que o efeito vasorelaxante promovido pelo *Bj*-PRO-10c em anéis de aorta de SHR foi abolido na presença do MDLA.

Tendo em vista que a ativação de receptores muscarínicos e que o aumento da atividade da AsS culminam na síntese de NO, nos avaliamos os mecanismos de ação do Bi-PRO-7a e Bi-PRO-10c sobre as vias NO/GCs/PKG e AC/PKA em anéis de aorta isolados de ratos Wistar e SHRs. O efeito vasorelaxante promovido por ambos os peptídeos foi abolido pelos inibidores das enzimas, óxido nítrico sintase, quanilato ciclase e adenilato ciclase, tanto em anéis de aorta isolados de ratos Wistar quanto em SHRs. O relaxamento do músculo liso vascular está relacionado principalmente com a síntese de NO e com o aumento das concentrações intracelulares de dois nucleotídeos ciclicos, GMPc e AMPc (LINCOLN, 1990). Esses dois nucleotídeos podem atuar em diferentes alvos intracelulares, modulando a concentração de Ca²⁺ e induzindo um vasorelaxamento muscular liso (LINCOLN, 1990). Essa diminuição do Ca²⁺ no músculo liso vascular ocorre devido ao aumento da recaptação de Ca²⁺ através da bomba de Ca²⁺-ATPase (serca), (CORNWELL et al., 1991), inibição da atividade dos canais de Ca2+ e ativação dos canais de K+ induzindo uma hiperpolarização. Todos esses eventos contribuem para um vasorelaxamento do músculo liso vascular (MINAMI et al., 1993; QUIGNARD et al., 1997). Diante disso, pode-se sugerir que os peptídeos Bj-PRO-7a e Bj-PRO-10c promovem vasorelaxamento em anéis de aorta isolados de ratos Wistar e SHRs através das vias NO/GCs/PKG e AC/PKA.

5.2 Avaliação dos PROs sobre o leito coronariano

No leito coronariano, somente os peptídeos *Bj*-PRO-7a e *Bj*-PRO-10c promoveram efeito vasodilatador em corações isolados de ratos Wistar e SHRs. O efeito vasodilatador induzido pelo *Bj*-PRO-7a foi inibido pelo L-NAME e atenuado pelo MDL 12,330a em corações isolados de ratos Wistar. Em corações de SHRs, o efeito vasodilatador coronariano também foi inibido pelo L-NAME, MDL 12,330a e pelo ODQ. Já o efeito vasodilatador coronariano induzido pelo *Bj*-PRO-10c foi inibido na presença de L-NAME, ODQ e MDL 12,330a em corações isolados de ratos Wistar e SHRs. Estes dados sugerem que o *Bj*-PRO-7a pode estar agindo de forma diferente no leito coronariano destes animais. Apenas o inibidor da guanilato ciclase bloqueou os efeitos deste peptídeo em coronárias de ratos wistar, mostrando a

importante participação do GMPc na vasodilatação coronariana do Bj-PRO-7a nestes animais. Por outro lado, em SHRs tanto a formação de AMPc quanto de GMPc podem ser os principais mecanismo vasodilatadores em coronárias de SHRs. No entanto, a enzima óxido nítrico sintase parace ter um papel importante em ambos animas, uma vez que a inibição desta bloqueou o efeito vasodilatador tanto em wistar quanto em SHRs. Já o mecanismo mediado pelo Bj-PRO-10c no leito coronariano de ratos Wistar e SHRs estão relacionados tanto com a ativação da enzima óxido nítrico sintase quanto com o ativação das enzimas guanilato ciclase ou adenilato ciclase. Sabe-se que a vasodilatação coronariana é mediada predominantemente pela ativação do receptor muscarínico M₃ (LAMPING et al., 2004). Assim, não pode ser descartada a participação outros receptores muscarínicos, além da ativação de receptor M₁ (Negraes et al.; 2011), para o efeito vasodilatador coronariano promovido pelo Bj-PRO-7a. Considerando os resultados em que o bloqueador do receptor M1 inibiu o efeito de vasorelaxamento aórtico do *Bj*-PRO-7a, tentamos avaliar a participação destes receptores no leito coronariano. No entanto, a atropina, bem como a pirezenpina promoveram efeitos deletérios na função cardíaca (dados não mostrados), inviabilizando a continuidade dos experimentos. De maneira similar, a participação de receptor B2 e da AsS para redução da pressão de perfusão coronariana induzido pelo Bj-PRO-10c também não podem ser descartadas.

5.3 Avaliação dos PROs sobre os parâmetros de contratilidade cardíaca

Nos parâmetros de contratilidade cardíaca, os peptídeos *Bj*-PRO-5a e *Bj*-PRO-7a promoveram uma redução significativa da PIS, PDVE, dP/dt máxima e mínima somente em corações isolados de ratos Wistar. Por outro lado, o *Bj*-PRO-10c e *Bf*-PRO-10f induziram uma redução destes parâmetros tanto em corações isolados de ratos Wistar quanto em SHRs. Já os PROs *Bc*-PRO-10e e *Bf*-PRO-10d não promoveram nenhuma alteração significativa nos parâmetros de contratilidade cardíaca. Ao se avaliar os mecanismos de ação do *Bj*-PRO-7a e *Bj*-PRO-10c, pôde-se observar que o efeito inotrópico negativo desencadeado pelo *Bj*-PRO-7a foi abolido somente na presença de L-NAME em corações isolados de ratos Wistar. Já

De acordo com estudos anteriores, os peptídeos *Bj*-PRO-5a e *Bj*-PRO-7a podem atuar via receptor muscarínico M₁ (MORAIS et al., 2011; NEGRAES et al., 2011). Além disso, a atuação sobre receptores muscarínicos também foi constatada em nosso estudo, uma vez que o efeito vasorelaxante em anéis de aorta isolados de ratos Wistar e SHR, induzido pelo *Bj*-PRO-7a foi bloqueado na por um antagonista não específico de receptores muscarínicos (atropina) e pelo inibidor específico para receptor muscarínico M₁ (pirezenpina). Sendo assim, é possível que o efeito inotrópico negativo desencadeado por ambos os peptídeos, estejam relacionados com os receptores muscarínicos, uma vez que, a ativação colinérgica em cardiomiócitos, diminui a contratilidade cardíaca através da diminuição da atividade da via AC/AMPc/PKA e consequentemente redução da concentração intracelular de Ca²⁺(WARRIER et al., 2005). O efeito inotrópico negativo não observado em corações isolados de SHRs pode estar relacionado com a diminuição da expressão de receptores muscarínicos nestes animais (GRAMMAS et al., 1989).

Pelegrino et al. (2009), demonstraram que o NO promove efeito inotrópico negativo e que este efeito é mediado pela ativação da via NO/GCs/PKG (PELLEGRINO et al., 2009). Já é bem descrito, que em miócitos ventriculares de ratos, a PKG reduz as correntes de Ca²⁺ do tipo L (ABI-GERGES; FISCHMEISTER; MÉRY, 2001; MÉRY et al., 1991) e fosforila a troponina I, consequentemente reduzindo a afinidade da troponina C ao Ca²⁺ e diminuindo a contratilidade cardíaca (HOVE-MADSEN et al., 1996). Estes estudos estão de acordo com os nossos resultados, pois ao inibirmos enzimas da via de produção do NO, o efeito inotrópico negativo promovido pelos peptídeos *Bj*-PRO-7a e *Bj*-PRO-10c foi abolido. Diante disso, pode-se afirmar que os efeitos observados na contratilidade cardíaca desencadeados pelo *Bj*-PRO-7a e *Bj*-PRO-10c são mediados pelo NO.

O efeito inotrópico negativo desencadeado pelos peptídeos *Bj*-PRO-10c e *Bf*-PRO-10f também pode estar relacionado com os mecanismos semelhantes aos mediados pela Bk, uma vez que estudos prévios demonstraram que estes peptídeos são capazes de potencializar a bk (IANZER et al., 2007; TASHIMA et al., 2012). Além disso, é possível que a diminuição nos parâmetros de contratilidade cardíaca induzida pelo *Bf*-PRO-10f esteja relacionado com a similaridade que este peptídeo possui com o *Bj*-PRO-10c (TASHIMA et al., 2012). Já foi descrito que existe apenas uma diferença de 4 aminoácidos na estrutura molecular entre estes peptídeos e que todas as posições ocupadas pelo resíduo de Pro no *Bj*-PRO-10c estão preservadas

no *Bf*-PRO-10f (TASHIMA et al., 2012). Diante disso, é possível que a potencialização da Bk evocada pelo *Bf*-PRO-10f esteja envolvida no efeito intrópico negativo deste peptídeo, visto que a sinalização do NO pode ser mediada por vias dependentes de Bk (KRIEG et al., 2004).

Os peptídeos *Bc*-PRO-10e e *Bf*-PRO-10d são capazes de inibir a atividade da ECA *in vitro*, contudo, somente o *Bc*-PRO-10e é capaz de potencializar os efeitos da Bk *in vivo* (TASHIMA et al., 2012) Embora o vasorelaxamento em anéis de aorta isolados tenha sido promovido por ambos os peptídeos, as duas diferentes concentrações utilizadas (5nmol/L ou 50pmol/L) nos experimentos de coração isolados não promoveram nenhuma alteração significativa nos parâmetros da contratilidade cardíaca.

6 CONCLUSÃO

•Todos os peptídeos utilizados neste estudo promoveram vasorelaxamento dependente do endotélio em aorta isolada.

• Somente o Bj-PRO-7a e Bj-PRO-10c promoveram vasodilatação coronariana.

•Os PROs *Bj*-PRO-5a, *Bj*-PRO-7a, *Bj*-PRO-10c e *Bf*-PRO-10f promoveram efeito inotrópico negativo.

•Todos os efeitos desencadeados pelos PROs estão relacionados com a via do NO.

Baseado nos efeitos diretos dos PROs em anéis de aorta e corações isolados, bem como, na importância das vias NO/GCs/PKG e AC/PKA no sistema cardiovascular, é possível que estes peptídeos possam ser utilizados no tratamento da hipertensão arterial, como também servir de protótipo para o desenvolvimento de novos fármacos.

REFERÊNCIAS

ABI-GERGES, N.; FISCHMEISTER, R.; MÉRY, P. F. G protein-mediated inhibitory effect of a nitric oxide donor on the L-type Ca2+ current in rat ventricular myocytes. **The Journal of physiology**, v. 531, n. Pt 1, p. 117–130, 2001.

ABRAMOV, D.; CARSON, P. E. The role of angiotensin receptor blockers in reducing the risk of cardiovascular disease. **Journal of the renin-angiotensin-aldosterone system : JRAAS**, v. 13, n. 3, p. 317–27, set. 2012.

ACHARYA, K. R. et al. Ace revisited: a new target for structure-based drug design. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 2, n. 11, p. 891–902, nov. 2003.

ADRIAN, G. et al. Role of M1, M3, and M5 muscarinic acetylcholine receptors in cholinergic dilation of small arteries studied with gene-targeted mice. **American J. Physiology Heart Circ. Physiol.**, v. 5, n. 300, p. 1602–1608, 2011.

ALDERTON, W. K. et al. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. **The Biochemical journal**, v. 357, n. Pt 3, p. 593–615, 2001.

ANDRADE, J. P.; VILAS-BOAS, F.; ANDRADE, M. Aspectos epidemiológicos da aderência ao tratamento da hipertensão arterial sistêmica. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v. 79, n. 4, p. 375–379, 2002.

ANDREW, P. J.; MAYER, B. Enzymatic function of nitric oxide synthases. **Cardiovascular Research**, v. 43, n. 3, p. 521–531, 1999.

ARCHER, S. L. et al. Nitric oxide and cGMP cause vasorelaxation by activation of a charybdotoxin-sensitive K channel by cGMP-dependent protein kinase. **Proceedings** of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 91, n. 16, p. 7583–7587, 1994.

BAKER, K. et al. Renin-angiotensin system involvement in pressure-overload cardiac hypertrophy in rats. **Am J Physiol**, p. 324–32, 1990.

BALLIGAND, J.-L.; CANNON, P. J. Nitric Oxide Synthases and Cardiac Muscle Autocrine and Paracrine Influences. **Ateriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, n. 17, p. 1846–1858, 1997.

BÉNY, J. L. et al. Muscarinic receptor knockout mice confirm involvement of M3 receptor in endothelium-dependent vasodilatation in mouse arteries. **Jornal of Cardiovasc Pharmacoly**, v. 5, n. 51, p. 505–512, 2008.

BERNE, R. M.; LEVY, M. N. Fisiologia. 4. ed. [s.l: s.n.].

BOULANGER, C. M.; MORRISON, K. J.; VANHOUTTE, P. M. Mediation by M3muscarinic receptors of both endothelium-dependent contraction and relaxation to acetylcholine in the aorta of the spontaneously hypertensive rat. **British journal of pharmacology**, v. 112, n. 2, p. 519–24, 1994. CAMARGO, A. C. M. et al. Bradykinin-potentiating peptides: beyond captopril. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 59, n. 4, p. 516–23, 15 mar. 2012.

CARVALHO, M. H. C. Reactivity of aorta and mesenteric microvessels to drugs in spontaneously hypertensive rats: role of endothelium. **Journal of hypertension**, v. 5, p. 377–382, 1987.

CHIBA, S.; TSUKADA, M. Possible involvement of muscarinic M1 and M3 receptor subtypes mediating vasodilation in isolated, perfused canine lingual arteries. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 4, n. 23, p. 839–843, 1996.

COATES, D. The angiotensin converting enzyme (ACE). **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 35, n. 6, p. 769–73, jun. 2003.

COHEN, R. A. et al. Mechanism of nitric oxide induced vasodilatation: refilling of intracellular stores by sarcoplasmic reticulum Ca2+ ATPase and inhibition of store operated Ca2+ influx. **Circulation Research**, v. 84, p. 210–219, 1999.

CORNWELL, T. L. et al. Regulation of sarcoplasmic reticulum protein phosphorylation by localized cyclic GMP-dependent protein kinase in vascular smooth muscle cells. **Molecular Pharmacology**, n. 40, p. 923–931, 1991.

CUSHMAN, D. et al. Inhibition of angiotensin-coverting enzyme by analogs of peptides from Bothrops jararaca venom. **Experientia**, v. 8, p. 1032–5, 1973.

DA LUZ, P. L.; LAURINDO, F. R. M.; CHAGAS, A. C. P. Endotélio e doenças cardiovasculares. [s.l: s.n.].

DEDDISH, P. A. et al. N-Domain Specific Substrate and C-Domain Inhibitors of Angiotensin-Converting Enzyme : Angiotensin-(1 7) and Keto-ACE. **Hypertension**, v. 31, n. 4, p. 912–917, 1 abr. 1998.

DUDZINSKI, D. M. et al. The regulation and pharmacology of endothelial nitric oxide synthase. **Annual review of pharmacology and toxicology**, v. 46, p. 235–276, 2006.

ELHUSSEINY, A.; HAMEL, E. Muscarinic–but not nicotinic–acetylcholine receptors mediate a nitric oxide-dependent dilation in brain cortical arterioles. **J Cereb Blood Flow Metab**, n. 238, p. 343–355, 1993.

ELLIS, E. et al. Coronary arterial smooth muscle contraction by a substance released from platelets: evidence that it is thromboxane A2. **Science**, v. 193, p. 1135–1137, 1976.

FAKLER, C.; KAFTAN, H.; NELIN, L. Two cases suggesting a role for the L-arginine nitric oxide pathway in neonatal blood pressure regulation. **Acta Pediatrica**, v. 84, n. 4, p. 460–462, 1995.

FÉLÉTOU, M.; KÖHLER, R.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-derived vasoactive factors and hypertension: Possible roles in pathogenesis and as treatment targets. **Current Hypertension Reports**, v. 12, n. 4, p. 267–275, 2010.

FERNANDES, F. A. et al. M3-muscarinic receptor mediates prejunctional inhibition of noradrenaline release and the relaxation in cat femoral artery. **J Pharm Pharmacol**, v. 6, n. 43, p. 644–646, 1991.

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

FERREIRA, S. H.; ROCHA E SILVA, M. Potenciação de polipeptídeos (Bradicinina, Angiotensina, Ocitocina, etc.) por um fator presente no veneno da B. jararaca. **Ciências e cultura**, v. 15, n. 4, p. 276–7, 1963.

FERREIRO, C. R. et al. Expression of inducible nitric oxide synthase is increased in patients with heart failure due to ischemic disease. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas médicas e biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica ... [et al.]**, v. 37, n. 9, p. 1313–20, 2004.

FLAM, B. R.; EICHLER, D. C.; SOLOMONSON, L. P. Endothelial nitric oxide production is tightly coupled to the citrulline-NO cycle. **Nitric oxide**, v. 17, p. 115–121, 2007.

FULTON, D.; GRATTON, J. P.; SESSA, W. C. Post-translational control of endothelial nitric oxide synthase: why isn't calcium/calmodulin enough? **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 299, n. 3, p. 818–824, 2001.

FURCHGOTT, R. F. Role of endothelium in responses of vascular smooth muscle. **Circulation research**, v. 53, n. 5, p. 557–573, 1983.

GERICKE, A. et al. Cholinergic responses of ophthalmic arteries in M3 and M5 muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 3, n. 50, p. 4822–4827, 2009.

GRAMMAS, P. et al. Autonomic Receptor Myocytes Interactions in Isolated from Hypertensive Rats Cardiac. **J Mol Cell Cardiol**, v. 21, p. 807–815, 1989.

GUERREIRO, J. R. et al. Argininosuccinate synthetase is a functional target for a snake venom anti-hypertensive peptide: role in arginine and nitric oxide production. **The Journal of biological chemistry**, v. 284, n. 30, p. 20022–33, 24 jul. 2009.

GUYTON, A. C. Blood Pressure Control Special Role of the Kidneys and Body Fluids. **Science**, v. 252, n. June, p. 1813–1816, 1991.

HAINES, R. J.; PENDLETON, L. C.; EICHLER, D. C. Agininosuccinate synthase: at the center of arginine metabolism. **International journal biochemistry molecular biology**, v. 2, p. 8–23, 2011.

HAYASHI, M. A. F. et al. The C-type natriuretic peptide precursor of snake brain contains highly specific inhibitors of the angiotensin-converting enzyme. **Journal of Neurochemistry**, v. 85, n. 4, p. 969–977, 15 abr. 2003.

HERRMANN, J.; LERMAN, L.; LERMAN, A. Simply say yes to NO? Nitric oxide (NO) sensor-based assessment of coronary endothelial function. **European heart journal**, v. 31, n. 23, p. 2834–6, dez. 2010.

HEYDE, R. V. D.; HEYDE, M. V. . Implementando modificações no estilo de vida. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 11, n. 2, p. 102–104, 2004.

HOVE-MADSEN, L. et al. Regulation of myocardial calcium channels by cyclic AMP metabolism. **Basic Res Cardiol.**, v. 91, p. 1–8, 1996.

IANZER, D. et al. Identification of five new bradykinin potentiating peptides (BPPs) from Bothrops jararaca crude venom by using electrospray ionization tandem mass spectrometry after a two-step liquid chromatography. **Peptides**, v. 25, n. 7, p. 1085–92, jul. 2004.

IANZER, D. et al. Do the Cardiovascular Effects of Angiotensin-Converting Enzyme (ACE) I Involve ACE-Independent Mechanisms? New Insights from Proline-Rich Peptides of Bothrops jararaca. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 322, n. 2, p. 795–805, 2007.

IANZER, D. et al. BPP-5a produces a potent and long-lasting NO-dependent antihypertensive effect. **Therapeutic advances in cardiovascular disease**, v. 5, n. 6, p. 281–95, dez. 2011.

IGNARRO, L. J. et al. Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. **Circulation research**, v. 61, n. 6, p. 866–879, 1987.

JIN, C. Z. et al. Neuronal nitric oxide synthase is up-regulated by angiotensin II and attenuates NADPH oxidase activity and facilitates relaxation in murine left ventricular myocytes. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 52, n. 6, p. 1274–1281, 2012.

KOSTIS, J. B. et al. Incidence and characteristics of angiodema associated with enalapril. **Arch. Intern. Med**, v. 165, n. 14, p. 1637–1642, 2005.

KRIEG, T. et al. Acetylcholine and bradykinin trigger preconditioning in the heart through a pathway that includes Akt and NOS. **American journal of physiology**. **Heart and circulatory physiology**, v. 287, n. 6, p. H2606–11, 2004.

LAMPING, K. G. et al. Muscarinic (M) receptors in coronary circulation: genetargeted mice define the role of M2 and M3 receptors in response to acetylcholine. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 2, n. 24, p. 1253–1258, 2004. LAZARTIGUES, E. et al. Spontaneously hypertensive rats cholinergic hyperresponsiveness: central and peripheral pharmacological mechanisms. **Br J Pharmacol**, v. 127, n. 7, p. 1657–1665, 1999.

LINCOLN, T. M. Cyclic GMP-dependent protein kinase mediates the reduction of Ca2+ by cyclic AMP in vascular smooth muscle cells. **American Journal of Physiology**, n. 258, p. 399–407, 1990.

LORELL, B. H.; CARABELLO, B. A. Left Ventricular Hypertrophy: Pathogenesis, Detection, and Prognosis. **Circulation**, v. 102, n. 4, p. 470–479, 25 jul. 2000.

MARÍN, J.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, M. A. Role of vascular nitric oxide in physiological and pathological conditions. **Pharmacology & therapeutics**, v. 75, n. 2, p. 111–134, 1997.

MARLETTA, M. A. Nitric oxide synthase structure and mechanism. **The Journal of biological chemistry**, v. 268, n. 17, p. 12231–12234, 1993.

MASASHI, Y. et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endhotelial cells. **Nature**, v. 332, p. 411–415, 1988.

MAXWELL, A. J. Mechanisms of dysfunction of the nitric oxide pathway in vascular diseases. **Nitric oxide : biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society**, v. 6, n. 2, p. 101–24, mar. 2002.

MCGUIRE, J. J.; DING, H.; TRIGGLE, C. R. Endothelium-derived relaxing factors: a focus on endothelium-derived hyperpolarizing factor(s). **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 79, n. 6, p. 443–70, 2001.

MÉRY, P. F. et al. Ca2+ current is regulated by cyclic GMP-dependent protein kinase in mammalian cardiac myocytes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, n. 4, p. 1197–201, 1991.

MINAMI, K.; FUKUZAWA, K.; NAKAYA, Y. Mechanism of activation of the Ca2+activated Kb channel by cyclic AMP in cultured porcine coronary artery smooth muscle cells. **Life Sciences**, n. 53, p. 1129–1135, 1993.

MONCADA, S. et al. An anzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. **Nature**, v. 263, p. 663–665, 1976.

MONCADA, S.; PALMER, R. M.; HIGGS, E. . Nitric Oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacological Reviews**, v. 43, p. 109–142, 1991.

MORAIS, K. L. P. et al. Bj-PRO-5a, a natural angiotensin-converting enzyme inhibitor, promotes vasodilatation mediated by both bradykinin B₂and M1 muscarinic acetylcholine receptors. **Biochemical pharmacology**, v. 81, n. 6, p. 736–42, 15 mar. 2011.

MORAIS, K. L. P. et al. Proline rich-oligopeptides: Diverse mechanisms for antihypertensive action. **Peptides**, v. 48, p. 124–133, 2013.

MORICE, A. H.; BROWN, M. J.; HIGENBOTTAM, T. Cough associated with angiotensin converting enzyma inhibition. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 13, n. 3, p. S59–S62, 1989.

MORRIS, S. M.; BILLIAR, R.; SIDNEY, M. New insights into the regulation nitric oxide synthesis of inducible. 1994.

MURAYAMA, N. et al. Cloning and sequence analysis of a Bothrops jararaca cDNA encoding a precursor of seven bradykinin-potentiating peptides and a C-type natriuretic peptide. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 4, p. 1189–93, 18 mar. 1997.

NEGRAES, P. D. et al. The snake venom peptide Bj-PRO-7a is a M1 muscarinic acetylcholine receptor agonist. Cytometry. Part A: the journal of the International Society for Analytical Cytology, v. 79, n. 1, p. 77–83, jan. 2011.

NOREL, X. et al. M1 and M3 muscarinic receptors in human pulmonary arteries. **Br J Pharmacol**, n. 119, p. 149–157, 1996.

OIGMAN, W. Bases hemodinâmicas da hipertensão arterial. **Arquivo Brasileiro de** cardiologia, v. 49, p. 303–308, 1987.

ONDETT, M.; CUSHMAN, D. Inhibition of the renin-angiotensin system. A new approach to the therapy of hypertension. **Jornal of Medicinal Chemistry**, v. 24, n. 4, p. 355–361, 1981.

ONDETTI, M. et al. Angiotensin-converting enzyme inhibitors from the venom of Bothrops jararaca. Isolation, elucidation of structure, and synthesis. **Biochemistry**, v. 10, n. 22, p. 4033–9, 1971.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, O. A global brief on hypertension - Silent Killer, global public health crisis. **WHO**, 2013.

PALMER, R.; FERRIGE, A.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, v. 6122, p. 524–526, 1987.

PAPAPETROPOULOS, A; RUDIC, R. D.; SESSA, W. C. Molecular control of nitric oxide synthases in the cardiovascular system. **Cardiovascular research**, v. 43, n. 3, p. 509–520, 1999.

PASCHOAL, J. F. B. et al. Insights into cardiovascular effects of proline-rich oligopeptide (Bj-PRO-10c) revealed by structure-activity analyses: dissociation of antihypertensive and bradycardic effects. **Amino Acids**, v. 46, p. 401–413, 2014.

PELAT, M.; MASSION, P.; BALLIGAND, J. Nitric oxide "at heart": emerging paradigms after a decade. **Arch Mal Coeur Vaiss.**, v. 3, n. 98., p. 242–248., 1988.
PELLEGRINO, D. et al. Nitrite exerts potent negative inotropy in the isolated heart via eNOS-independent nitric oxide generation and cGMP-PKG pathway activation. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1787, n. 7, p. 818–27, 2009.

PESIC, S.; JOVANOVIC, A.; GRBOVIC, L. Muscarinic receptor subtypes mediating vasorelaxation of the perforating branch of the human internal mammary artery. **Pharmacology**, n. 63, p. 185–190, 2001.

PRABHU, S. D. Nitric oxide protects against pathological ventricular remodeling: reconsideration of the role of NO in the failing heart. **Circ Res**, v. 94, n. 9, p. 1155–1157, 2004.

QUIGNARD, J. F. et al. Voltage-gated calcium channel currents in human coronary myocytes. Regulation by cyclic GMP and nitric oxide. **Journal of Clinical Investigation**, n. 99, p. 185–193, 1997.

RODRIGO, J. et al. Localization of Nitric Oxide Synthase in the Adult Rat Brain. **Philosophical transactions B**, v. 345, n. 1312, p. 175–221, 1994.

RYBERG, A. T. et al. Cholinergic submandibular effects and muscarinic receptor expression in blood vessels of the rat. **Arch Oral Biol**, n. 53, p. 606–616, 2008.

SEARS, C. E. et al. Cardiac neuronal nitric oxide synthase isoform regulates myocardial contraction and calcium handling. **Circulation research**, v. 92, n. 5, p. e52–e59, 2003.

SHAUL, P. W.; ANDERSON, R. G. Role of plasmalemmal caveolae in signal transduction. **The American journal of physiology**, v. 275, n. 5 Pt 1, p. L843–L851, 1998.

SILVA, C. A et al. Tissue distribution in mice of BPP 10c, a potent proline-rich antihypertensive peptide of Bothrops jararaca. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 51, n. 4, p. 515–23, 2008.

STEVENS, A.; LOWE, J. S. **Stevens & Lowe`s Human Histology**. 1. ed. Philadelphia: Elsevier-Mosby, 1998.

STEWART, J. M.; FERREIRA, S. H.; GREENE, L. J. Bradykinin potentiating peptide PCA-Lys-Trp-Ala-Pro: an inhibitor of the pulmonary inactivation of bradykinin and conversion of angiotensin I to II. **Biochemical pharmacology**, v. 20, p. 1557–67, 1971.

TASHIMA, A. K. et al. Peptidomics of three Bothrops snake venoms: insights into the molecular diversification of proteomes and peptidomes. **Molecular & cellular proteomics : MCP**, v. 11, n. 11, p. 1245–62, nov. 2012.

VANHOUTTE, P. M. "Endothelium-derived relaxing and contracting factors". **European Journal of Pharmacology**, v. 183, n. 6, p. 2088–2089, 1990.

VELTMAR, A.; GOHLKE, P.; UNGER, T. From tissue angiotensin converting enzyme inhibition to antihypertensive effect. **American jornal of hypertension**, v. 4, p. 263–269, 1991.

VERANO-BRAGA, T. et al. Tityus serrulatus Hypotensins: a new family of peptides from scorpion venom. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 371, n. 3, p. 515–20, 4 jul. 2008.

VINCENT, S. R.; KIMURA, H. Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. **Neuroscience**, v. 46, n. 4, p. 755–784, 1992.

WANG, X. et al. Genotype dependent and cigarette specific effects on endothelial nitric oxide synthase gene expression and enzyme activity. **FEBS Letters**, v. 471, n. 1, p. 45–50, 2000.

WARRIER, S. et al. Beta-adrenergic and muscarinic receptor induced changes in cAMP activity in adult cardiac myocytes detected using a FRET based biosensor. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 289, p. C455–C461, 2005.

WEI, L. et al. The two homologous domains of human angiotensin I-converting enzyme are both catalytically active. **The Journal of biological chemistry**, v. 266, n. 14, p. 9002–8, 15 maio 1991.

WESTERMEIER, F. et al. Novel players in cardioprotection: Insulin like growth factor-1, angiotensin-(1–7) and angiotensin-(1–9). **Pharmacological Research**, v. 101, p. 41–55, 2015.

WHO. Organização Mundial de Sáude.

YAMADA, M. et al. Cholinergic dilation of cerebral blood vessels is abolished in M5 muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. **Proc Natl Acad Sci USA**, n. 98, p. 14096–14101, 2001.

ZELANIS, A. et al. Analysis of the Ontogenetic Variation in the Venom Proteome / Peptidome of Bothrops jararaca Reveals Different Strategies to Deal with Prey. **J Proteome Res**, p. 2278–2291, 2010.

ZHANG, Y. H. et al. Reduced phospholamban phosphorylation is associated with impaired relaxation in left ventricular myocytes from neuronal NO synthase-deficient mice. **Circulation Research**, v. 102, n. 2, p. 242–249, 2008.

APÊNDICE

Quadro de abreviaturas de aminoácidos

Sigla	Aminoácido
Arg	Arginina
Asn	Asparigina
Asp	Ácido aspártico
Cys	Cisteina
GIn	Glutamina
Glu	Ácido glutâmico
His	Histidina
Leu	Leucina
Lys	Lisina
Met	Metionina
Phe	Fenilalanina
Pro	Prolina
Ser	Serina
Thr	Treonina
Tyr	Tirosina
Val	Valina