

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

**EFEITOS CARDIOVASCULARES DO VENENO DA
ARANHA *Lasiadora* sp. EM RATOS**

Carolina Campolina Rebello Horta

Belo Horizonte

2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Carolina Campolina Rebello Horta

EFEITOS CARDIOVASCULARES DO VENENO DA ARANHA *Lasiadora* sp. EM RATOS

Dissertação de mestrado apresentada ao Curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof. Doutor Evanguedes Kalapothakis

Co-orientador: Prof. Doutor Alvair Pinto de Almeida

Colaboração: Profa. Doutora Virgínia Soares Lemos

Belo Horizonte

Instituto de Ciências Biológicas da UFMG

2008

Dedico este trabalho aos meus pais,
Martinho e Maria Carolina.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Evanguedes Kalapothakis, pela oportunidade de fazer parte de sua equipe e pelos valiosos ensinamentos durante seis anos de convivência que auxiliaram muito a minha formação.

Aos professores do Laboratório de Fisiologia Cardiovascular Alvair Pinto de Almeida e Virgínia Soares Lemos, pela importante colaboração no trabalho, pelos ensinamentos e pela agradável recepção no laboratório.

Ao Programa de Pós-graduação em Fisiologia e Farmacologia, aos coordenadores professores Maria José Campagnole-Santos, Frederic Jean Georges Frezard, Adelina Martha dos Reis e às secretárias Celinha e Creuza, pelo apoio.

Aos professores Christopher Kushmerick, Steyner França Côrtes, Anderson José Ferreira e Andréa Haibara, pela colaboração e auxílio nas discussões.

À equipe do Laboratório de Biotecnologia e Marcadores Moleculares (LBMM): Ana Carolina, Ana Paula, Anderson, André, Arthur, Bárbara, Brisa, Cleide, Denise, Flávia, Isabela, Isabella, Juvana, Kelly, Lílian, Marcos, Sara, Samyra, Tatiana e Valéria, pelo apoio e coleguismo.

Aos colegas que fizeram parte do LBMM, que já seguiram seus caminhos como mestres ou doutores e deixaram saudades: Ana Luiza, Andréa, Cibele, Fabíola, Flávia, Gabriel, Higgor, Maria, Simone. À Alessandra e à Thais, pelos ensinamentos.

À equipe dos Laboratórios de Fisiologia e Farmacologia Cardiovascular: Afonso, Alexandre, Alvarina, Amilton, Bruno, Camila, Carlos, Dênis, Diógenes, Fernando, Grazielle, José Felipe, Josiane, Júlia, Letícia, Lucas, Luciano, Lúdio, Mariana, Mirna, Pedro, Renata, Sílvia, Thiago e Virgínia Mendes, pela ajuda e coleguismo.

Aos profissionais dos Departamentos de Fisiologia e de Farmacologia, especialmente Adelaide, Betinha, Darcy, Jorge, Leidiane, Rosy e Zezé, pelo suporte técnico e agradável convivência.

À Capes, pelo recurso financeiro.

Aos membros da banca examinadora, pela atenção.

Aos meus pais Martinho e Maria Carolina (Naná), com quem divido minhas conquistas. Aos meus irmãos Martinho, Vanessa e Juliana, pelo carinho que nos une. Em especial ao meu irmão Martinho, professor e pesquisador que tanto admiro. À minha querida sobrinha Daniela, pela alegria. À minha cunhada Flávia, pela amizade.

Aos amigos e colegas do curso de Farmácia e da Pós-graduação. À Didi, amiga de sempre. Aos amigos Andréa, Bruno, Letícia, Luciana, Raquel e Thais, pela força.

Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro das seguintes instituições:

- ❖ Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes)
- ❖ Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
- ❖ Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG)

“De tudo, ficaram três coisas: a certeza de que ele estava sempre começando, a certeza de que era preciso continuar e a certeza de que seria interrompido antes de terminar. Fazer da interrupção um caminho novo. Fazer da queda um passo de dança, do medo uma escada, do sono uma ponte, da procura um encontro.”

Fernando Sabino

RESUMO

Os venenos de aranhas são misturas complexas de substâncias com grande potencial farmacológico. As aranhas do gênero *Lasiadora* (subordem Mygalomorphae, família Theraphosidae) são amplamente distribuídas no Brasil, onde são conhecidas vulgarmente como caranguejeiras. Mesmo venenos de baixa toxicidade, como o veneno de aranhas *Lasiadora*, podem ser fontes de ferramentas importantes para a descoberta de processos moleculares e fisiológicos nos vertebrados. Nosso grupo de pesquisa fracionou o veneno de *Lasiadora* sp. em HPLC, obtendo 12 frações (F1 a F12) e demonstrou que o veneno de *Lasiadora* sp. provoca bradicardia em coração isolado de rato. Muitos venenos de animais peçonhentos possuem ações diversas no sistema cardiovascular, com potencial terapêutico para algumas doenças desse sistema. Assim, os objetivos do presente trabalho foram avaliar o efeito do veneno bruto da aranha *Lasiadora* sp. sobre os parâmetros cardiovasculares em ratos anestesiados e avaliar os efeitos do veneno bruto e das frações F4, F5 e F10 sobre a função vascular em anéis de aorta de rato. Artéria e veia femoral de ratos foram canuladas para determinação dos parâmetros cardiovasculares e para administração de veneno e drogas. Nos ensaios de reatividade vascular, a aorta torácica de ratos foi retirada, cortada em anéis e montada em sistema apropriado. Nos animais normotensos anestesiados, o veneno bruto provocou hipotensão e bradicardia agudas ao ser aplicado por via endovenosa em diferentes doses (2, 5, 10, 15 e 20 µg). A atropina, antagonista de receptores muscarínicos, reduziu a hipotensão e a bradicardia promovidas pelo veneno (2 µg). Já o L-NAME, que inibe a produção de óxido nítrico (NO), reduziu apenas o efeito hipotensor. Em anéis de aorta de rato, o veneno bruto promoveu potente vasodilatação concentração-dependente. A retirada do endotélio vascular aboliu o efeito relaxante do veneno (8 µg/mL), bem como a pré-incubação dos vasos com L-NAME. Em anéis de aorta sem endotélio funcional, o veneno bruto (16 µg/mL) potencializou o efeito vasorelaxante de três drogas doadoras de NO, nitroprussiato de sódio, SIN-1 e SNAP, indicando que o veneno protege o NO de degradação, aumentando sua disponibilidade biológica. Foi investigada também a possibilidade de indução da produção de NO pelo veneno bruto via

ativação da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS). Para isso, a fosforilação da enzima em dois sítios regulatórios, Ser1177 (sítio de ativação) e Thr495 (sítio de inativação), foi mensurada após estímulo dos anéis de aorta em tempos distintos com veneno (16 µg/mL). Verificou-se que o veneno ativa a eNOS por aumentar a fosforilação do sítio de ativação e a desfosforilação do sítio de inativação. A fosforilação ocorre por via independente da PI3K/Akt. As frações do veneno F4, F5 e F10 também foram testadas em sistema de vaso isolado. F4 e F5 promoveram potente vasodilatação concentração-dependente em anéis de aorta de rato. F10 não mostrou efeito relaxante. Os resultados permitem concluir que o veneno bruto causa hipotensão e bradicardia no rato anestesiado por ações diretas no coração e nos vasos sanguíneos e que o NO endotelial tem papel fundamental no efeito relaxante do veneno em aorta de rato.

ABSTRACT

The spider venoms are complex mixtures of substances with great pharmacological potential. *Lasiadora* spiders (Mygalomorphae suborder, Theraphosidae family) are widely distributed in Brazil, where they are commonly known as *caranguejeiras*. Even venoms of low toxicity, like *Lasiadora* venom, may be sources of important instruments for the discovery of molecular and physiological processes in vertebrates. Our research group has fractionated the *Lasiadora* sp. venom by applying HPLC techniques and obtained 12 fractions (F1 to F12). This group has also demonstrated that *Lasiadora* sp. venom causes bradycardia in the isolated rat heart. Several venoms of venomous animals act on the cardiovascular system and have therapeutic potential against many cardiovascular diseases. Therefore, the goals of the present study were to evaluate the effect of the *Lasiadora* sp. crude venom, related to cardiovascular parameters, in anaesthetized rats and also to evaluate the effects of the crude venom and the fractions F4, F5, F10 on the vascular function of rat aortic rings. Both femoral artery and femoral vein of the rats were cannulated for cardiovascular parameters measurements and for venom and drugs administration. On vascular reactivity assays, the rat thoracic aorta was removed, cut into rings and set up in appropriate apparatus. In normotensive anaesthetized rats, the crude venom caused acute hypotension and bradycardia after endovenous administration of different doses (2, 5, 10, 15 and 20 μg). Atropine, a muscarinic receptor antagonist, reduced the hypotension and bradycardia induced by the venom (2 μg). The L-NAME, which inhibits the production of nitric oxide (NO), reduced only the venom's hypotensive effect. In rat aortic rings, the crude venom produced a potent concentration-dependent vasodilation. The vascular endothelium removal and the pre-incubation of the vessels with L-NAME abolished the relaxant effect of the venom (8 $\mu\text{g}/\text{mL}$). In aortic rings without functional endothelium, the crude venom (16 $\mu\text{g}/\text{mL}$) increased the vasorelaxant effect of three NO donors, sodium nitroprussiate, SIN-1 and SNAP, which indicates that the venom prevents NO breakdown and increases NO bioavailability. We have also investigated a possible venom action of inducing NO production through endothelial nitric oxide synthase (eNOS) activation. The phosphorylation of the enzyme on two regulatory

residues, Ser1177 (activation site) and Thr495 (deactivation site), has been measured after stimulation of the aortic rings at different times with the crude venom (16 µg/mL). The results have showed that the venom activates eNOS by improving the phosphorylation of the activation site and the dephosphorylation of the deactivation site. The phosphorylation occurs by PI3K/Akt independent pathways. The fractions of the venom F4, F5 and F10 were also tested in the isolated vessels model. F4 and F5 produced a potent concentration-dependent vasodilation in rat aortic rings. F10 did not show any relaxant effect. The results indicate that the crude venom causes hypotension and bradycardia in anaesthetized rats by direct actions on the heart and on the blood vessels. Endothelial NO plays a major role in the vasorelaxant effect of the venom.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	A aranha <i>Lasiadora</i> sp.	11
Figura 2.	Esquema representativo da parede arterial (à esquerda) e corte histológico de artéria (à direita), evidenciando a organização da parede arterial em três camadas	16
Figura 3.	Mecanismos envolvidos na contração e no relaxamento do músculo liso vascular	22
Figura 4.	Esquema representativo da liberação de fatores relaxantes das células endoteliais e seus efeitos em células musculares lisas	26
Figura 5.	(A) Conexão do anel de aorta às hastes metálicas e o acoplamento dessas a transdutores isométricos. (B) Sistema de banho de órgãos utilizado para experimentos de reatividade vascular no Laboratório de Fisiologia Cardiovascular do ICB	40
Figura 6.	Esquema representativo da curva de relaxamento concentração-resposta cumulativa induzida pelo veneno bruto da aranha <i>Lasiadora</i> sp. em vasos pré-contraídos com fenilefrina (Fen)	41
Figura 7.	Perfil cromatográfico do veneno bruto da aranha <i>Lasiadora</i> sp. em coluna preparativa C4	49
Figura 8.	Traçado representativo de um rato mostrando as alterações na frequência cardíaca (FC, bpm) e na pressão arterial pulsátil (PAP, mmHg) em resposta à injeção endovenosa do veneno bruto (5 µg) da aranha <i>Lasiadora</i> sp.	50
Figura 9.	Variações na pressão arterial média (Δ PAM, mmHg) e na frequência cardíaca (Δ FC, bpm) produzidas pela injeção endovenosa de diferentes doses do veneno bruto da aranha <i>Lasiadora</i> sp. em ratos anestesiados	52
Figura 10.	Valores de pressão arterial média (PAM, mmHg) (A) e variação de frequência cardíaca (Δ FC, bpm) (B) em relação ao tempo (segundos) após administração endovenosa (no tempo 0) do veneno bruto da aranha <i>Lasiadora</i> sp. (2, 5, 10, 15 e 20 µg) em ratos anestesiados.....	54

Figura 11.	Efeito induzido pela injeção endovenosa do veneno bruto da aranha <i>Lasiadora</i> sp. (2 µg) em ratos anestesiados, antes e após a administração de indometacina 2 mg/kg via intraperitoneal (A), L-NAME 10 mg/kg via endovenosa (B) ou atropina 1 mg/kg via endovenosa	56
Figura 12.	Efeito relaxante induzido pelo veneno bruto da aranha <i>Lasiadora</i> sp. (A) e pelas frações do veneno F4 (B), F5 (C) e F10 (D) em anéis de aorta de rato contendo endotélio funcional	58
Figura 13.	Efeito relaxante induzido pelo veneno bruto da aranha <i>Lasiadora</i> sp. (8 µg/mL) em anéis de aorta de rato contendo (E+) ou não (E-) endotélio funcional	60
Figura 14.	Efeito relaxante induzido pelo veneno bruto da aranha <i>Lasiadora</i> sp. (8 µg/mL) em anéis de aorta de rato, contendo endotélio funcional, na presença e na ausência de indometacina 10 µM (A) ou L-NAME 300mM (B)	61
Figura 15.	Efeito relaxante induzido pelo veneno bruto da aranha <i>Lasiadora</i> sp. (8 µg/mL) em anéis de aorta de rato, contendo endotélio funcional, na presença e na ausência de atropina 1 µM (A), pirilamina 1 µM (B), HOE 140 1 µM (C) e suramina 100 µM (D)	62
Figura 16.	Efeito relaxante induzido pelo veneno bruto da aranha <i>Lasiadora</i> sp. (8 µg/mL) ou pela nifedipina (10^{-6} M) em anéis de aorta de rato, contendo endotélio funcional, pré-contraídos com solução de Krebs-Henseleit com concentração de KCl de 50 mM	64
Figura 17.	Efeito relaxante induzido por nitroprussiato de sódio (A), SIN-1 (B) e SNAP (C) em anéis de aorta de rato sem endotélio funcional, na presença e na ausência do veneno bruto da aranha <i>Lasiadora</i> sp. (16 µg/mL)	66
Figura 18.	Fosforilação da eNOS promovida pelo veneno bruto da aranha <i>Lasiadora</i> sp. (16 µg/mL) e por acetilcolina (0,1 µM) em anéis de aorta de rato. Efeitos do veneno bruto (Ven) e da acetilcolina (Ach) na fosforilação dos sítios Ser1177 (sítio de ativação) (A) e Thr495 (sítio de inativação) (B), em diferentes tempos de estimulação (5, 15 e 30 minutos). GAPDH foi utilizado como controle	69
Figura 19.	Efeito relaxante induzido pelo veneno bruto da aranha <i>Lasiadora</i> sp. (8 µg/mL) em anéis de aorta de rato, contendo endotélio funcional, na presença e na ausência de LY 294002 20 µM	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Drogas utilizadas e descrição de suas ações farmacológicas	35
Tabela 2.	Valores de pressão arterial média (PAM, mmHg) e de frequência cardíaca (FC, bpm) antes e após a administração de veneno bruto em diferentes doses, bem como a variação desses parâmetros	53
Tabela 3.	Valores basais de pressão arterial média (PAM, mmHg) e de frequência cardíaca (FC, bpm), bem como a variação de PAM (Δ PAM) e de FC (Δ FC), em valores absolutos e relativos (%), após a administração de 2 μ g de veneno bruto sob diferentes condições experimentais	57
Tabela 4.	Valores de EC_{50} e E_{max} para veneno bruto e frações F4, F5 e F10	59
Tabela 5.	Valores de % de relaxamento para o veneno bruto (8 μ g/mL) em anéis de aorta de rato, sob diferentes condições experimentais	63
Tabela 6.	Valores de EC_{50} e E_{max} para nitroprussiato de sódio, SIN-1 e SNAP, na presença e na ausência de veneno bruto (16 μ g/mL)	67

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

AA	Ácido araquidônico
AC	Adenilil-ciclase
Ach	Acetilcolina
ACN	Acetonitrila
ADP	Difosfato de adenosina
AMP	Monofosfato de adenosina
AMPC	Adenosina monofosfato cíclica
ATP	Trifosfato de adenosina
bpm	Batimentos por minuto
C4	Clorobutilsilano
C18	Octadecilsilano
Ca ²⁺ -ATPase	Bomba de Ca ²⁺ dependente de ATP
Ca ²⁺ -CaM	Complexo cálcio-calmodulina
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
[Ca ²⁺] _i	Concentração intracelular de cálcio
CaM	Calmodulina
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
CO ₂	Gás carbônico
COX	Cicloxigenase
Da	Dalton
DAB	3-3'-diaminobenzidina
DAG	Diacilglicerol
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EC ₅₀	Concentração que produz 50% do efeito máximo da droga
ECA	Enzima conversora de angiotensina
EDHF	Fator hiperpolarizante derivado do endotélio
E _{max}	Efeito máximo da droga
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial

EPM	Erro padrão da média
EST	Expressed Sequence Tags – etiquetas de sequência expressa
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo
FC	Frequência cardíaca
FMN	Flavina mononucleotídeo
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GC	Guanilil-ciclase
GCs	Guanilil-ciclase solúvel
GMP _c	Guanosina monofosfato cíclica
GTP	Trifosfato de guanosina
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HCl	Ácido clorídrico
HOE-140	DesArg9-D-Arg[Hyp3,Thi5,D-Tic7,Oic8]bradicinina
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
IP ₃	Inositol 1,4,5-trifosfato
K _{ATP}	Canais para potássio sensíveis a variações de ATP intracelular
KDa	KiloDalton
KH ₂ PO ₄	Fosfato de potássio monobásico
L-NAME	N ^G -nitro-L-arginina metil ester
mA	Mili Ampère
MgSO ₄	Sulfato de magnésio
MLC	Cadeia leve de miosina
MLCK	Quinase da cadeia leve de miosina
mmHg	Milímetros de mercúrio
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
mV	Mili Volts
NaCl	Cloreto de sódio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio
NCX	Transportador de troca Na ⁺ -Ca ²⁺

NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
O ₂	Oxigênio
O ²⁻	Superóxido
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PAM	Pressão arterial média
PAP	Pressão arterial pulsátil
PBS	Tampão salina fosfato
PDE	Fosfodiesterase
p-eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial fosforilada
PGG ₂	Prostaglandina G ₂
PGH ₂	Prostaglandina H ₂
PGI ₂	Prostaciclina
PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinase
PIP ₂	Fosfatidilinositol bifosfato
PKA	Proteína quinase dependente de AMPc
PKG	Proteína quinase dependente de GMPc
PLC	Fosfolipase C
PSA	Persulfato de amônia
PVDF	Fluoreto de polivinilideno
RNA	Ácido ribonucléico
SDS	Sódio dodecil sulfato
Ser1177	Resíduo de serina posição 1177
SERCA	Ca ²⁺ -ATPase do retículo sarcoplasmático
SIN-1	3-morfolino-sidnonimina
SNAP	S-nitroso-N-acetilpenicilamina
SOD	Superóxido dismutase
TBS	Tampão salina tris
TBS-T	Tampão salina tris-Tween
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamino

TFA Ácido trifluoroacético

Thr495 Resíduo de treonina posição 495

Tris [2-amino-2-(hidroximetil)propano-1,3-diol,(tris)]

TTX Tetrodotoxina

V Volts

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	2
1.1.	Aranhas: aspectos gerais	2
1.1.1.	Venenos de aranhas	3
1.1.2.	Aranhas da subordem Mygalomorphae	6
1.1.3.	Aranhas do gênero <i>Lasiadora</i>	9
1.1.4.	Venenos de aranhas do gênero <i>Lasiadora</i>	11
1.2.	O sistema cardiovascular	15
1.2.1.	Regulação do tônus do músculo liso vascular	16
1.2.2.	Papel do endotélio no controle do tônus vascular	22
1.2.3.	Doenças cardiovasculares	27
1.3.	Estudo de venenos como potencial terapêutico	28
1.3.1.	Venenos como potencial terapêutico para doenças cardiovasculares	28
2.	OBJETIVOS	32
2.1.	Objetivo Geral	32
2.2.	Objetivos Específicos	32
3.	MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1.	Drogas utilizadas	34
3.2.	Animais	35
3.3.	Obtenção do veneno bruto da aranha <i>Lasiadora</i> sp.	36
3.4.	Fracionamento do veneno bruto da aranha <i>Lasiadora</i> sp.	36
3.5.	Quantificação de proteínas	37
3.6.	Procedimentos experimentais no animal anestesiado	37
3.6.1.	Canulação de veia e artéria femoral	37
3.6.2.	Registro da pressão arterial e da frequência cardíaca	37
3.6.3.	Avaliação do efeito do veneno bruto sobre os parâmetros cardiovasculares em ratos anestesiados	38
3.7.	Procedimentos experimentais em vaso isolado	38
3.7.1.	Preparação e montagem dos anéis de aorta de rato	38
3.7.2.	Avaliação da reatividade vascular do veneno bruto e de frações do veneno da aranha <i>Lasiadora</i> sp.	40
3.7.3.	Avaliação da participação do endotélio no efeito vasodilatador do veneno bruto em anéis de aorta de rato	41
3.7.4.	Avaliação da participação de canais para cálcio no efeito vasodilatador do veneno bruto em anéis de aorta de rato	42
3.7.5.	Avaliação do efeito do veneno bruto no relaxamento induzido por doadores de NO em anéis de aorta de rato	43
3.7.6.	Verificação da ativação da eNOS pelo veneno bruto em anéis de aorta de rato	43
3.7.6.1.	Estimulação dos anéis de aorta	43
3.7.6.2.	Extração de proteínas.....	44
3.7.6.3.	Separação eletroforética em gel de acrilamida	45
3.7.6.4.	Western Blot	45

3.7.7.	Verificação da participação da via PI3K/Akt na ativação da eNOS pelo veneno bruto em anéis de aorta de rato	46
3.7.8.	Análise estatística	47
4.	RESULTADOS	49
4.1.	Fracionamento do veneno bruto da aranha <i>Lasiadora</i> sp.	49
4.2.	Procedimentos experimentais no animal anestesiado	50
4.2.1.	Efeito do veneno bruto sobre os parâmetros cardiovasculares em ratos anestesiados	50
4.3.	Procedimentos experimentais em vaso isolado	57
4.3.1.	Reatividade vascular do veneno bruto e de frações do veneno da aranha <i>Lasiadora</i> sp.	57
4.3.2.	Participação do endotélio no efeito vasodilatador do veneno bruto em anéis de aorta de rato	59
4.3.3.	Participação de canais para cálcio no efeito vasodilatador do veneno bruto em anéis de aorta de rato	64
4.3.4.	Efeito do veneno bruto no relaxamento induzido por doadores de NO em anéis de aorta de rato	65
4.3.5.	Ativação da eNOS pelo veneno bruto em anéis de aorta de rato	67
4.3.6.	Verificação da participação da via PI3K/Akt na ativação da eNOS pelo veneno bruto em anéis de aorta de rato	70
5.	DISCUSSÃO	72
6.	CONCLUSÃO	91
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aranhas: aspectos gerais

As aranhas pertencem ao filo dos artrópodes, que se divide em três subfilos, Trilobita, Mandibulata e Chelicerata. O último é composto de várias classes, destacando-se a dos aracnídeos e a dos insetos. A classe dos aracnídeos (Arachnida) apresenta duas ordens de interesse médico, que são a das aranhas (Araneae) e a dos escorpiões (Scorpionidae) (Campolina *et al.*, 2001). As aranhas compõem um grupo antigo, sendo que o fóssil mais velho conhecido data de 300 milhões de anos, do período Carbonífero (Rash & Hodgson, 2002).

A diversidade biológica e ecológica das aranhas é imensa: 40024 espécies são agrupadas em 3681 gêneros e 108 famílias (Platnick, 2008).

As aranhas têm o corpo dividido em cefalotórax e abdômen e possuem aparelho inoculador de peçonha, chamado de quelícera, na porção anterior do cefalotórax. A grande maioria possui duas glândulas de veneno. Os seus corpos são formados por artículos móveis e exoesqueleto de quitina (Bücherl, 1972; Lucas, 1988).

É de suma importância considerar de que modo as quelíceras se articulam em relação ao eixo longitudinal do corpo e em que direção se abrem e fecham os dois ferrões. Se forem orientados paralelamente em relação ao eixo longitudinal do corpo e se a aranha picar verticalmente (de cima para baixo), trata-se de uma “caranguejeira”, pertencente à subordem Mygalomorphae (Orthognatha). Se, ao contrário, a articulação for transversal e

a aranha picar horizontalmente (de fora para dentro), trata-se de uma “aranha verdadeira” da subordem Araneomorphae (Labidognatha) (Bücherl, 1972).

As aranhas são importantes na natureza e contribuem para a manutenção do equilíbrio ecológico. Elas são consideradas relevantes predadores de insetos (Lucas, 1988). Muitas aranhas alimentam-se predominantemente de insetos e de outros artrópodes, e as espécies de maior tamanho caçam e comem lagartos, sapos e pequenos roedores (Rash & Hodgson, 2002).

Muitas aranhas não são naturalmente agressivas e de modo geral são inofensivas a humanos. No entanto, algumas espécies são perigosas. As aranhas que podem provocar envenenamentos graves em humanos e até morte pertencem à subordem Araneomorphae, incluindo a armadeira (gênero *Phoneutria*), a viúva negra (gênero *Latrodectus*) e a aranha marrom (gênero *Loxosceles*) (Lucas, 1988; Escoubas *et al.*, 2000; Corzo & Escoubas, 2003).

1.1.1. Venenos de aranhas

A finalidade primária do veneno de uma aranha é paralisar ou matar suas presas. Possivelmente o veneno também serve como mecanismo de autodefesa contra seus predadores. É importante destacar que o uso do veneno tem sido fundamental na evolução bem sucedida das aranhas (Rash & Hodgson, 2002).

Os venenos de aranhas são misturas complexas. As interações entre as diversas classes químicas presentes nos venenos e o papel das mesmas no processo de envenenamento ainda não foram bem definidos. Eles contêm proteínas, componentes de baixa massa molecular, polipeptídeos,

acilpoliaminas. Além disso, estão presentes íons, sais, ácidos livres, glicose, aminoácidos, aminas biogênicas e neurotransmissores. O papel destes últimos constituintes é incerto, embora possam potencializar a ação de neurotoxinas em alguns casos. Também podem representar produtos de degradação de outros compostos do veneno (Welsh & Batty, 1963; Jackson & Parks, 1989; Odell *et al.*, 1991; Escoubas *et al.*, 2000).

As três principais classes de componentes são: moléculas orgânicas de baixa massa molecular (massa molecular < 1000 Da), polipeptídeos (massa molecular de 3000 a 10000 Da) e proteínas de alta massa molecular (massa molecular > 10000 Da) (Escoubas *et al.*, 2000; Sollod *et al.*, 2005).

As acilpoliaminas, caracterizadas pela primeira vez em venenos de aranhas, são compostos de baixa massa molecular e de caráter hidrofílico que agem em canais iônicos e receptores de glutamato. Possuem atividade inseticida por induzir rapidamente paralisia através de bloqueio reversível da junção neuromuscular no inseto. Peptídeos de baixa massa molecular também são encontrados nos venenos de aranhas (Estrada *et al.*, 2007).

A grande maioria das toxinas de aranhas identificadas até o momento são polipeptídeos com massa molecular variando aproximadamente entre 3000 e 8000 Da. Em combinação com poliaminas, os peptídeos representam o principal arsenal tóxico das aranhas. A atividade das toxinas pode ser específica para alguns grupos zoológicos (vertebrados, insetos, crustáceos). Os alvos principais dos polipeptídeos são os canais iônicos (Corzo & Escoubas, 2003; Belebony *et al.*, 2004).

Algumas toxinas de alta massa molecular também foram descritas em venenos de aranhas, como um grupo de toxinas presentes no veneno de

aranhas do gênero *Latrodectus*, denominadas latrotoxinas, que possuem massa molecular superior a 100 kDa (Grishin, 1998).

Apesar de a maioria das proteínas e dos peptídeos isolados dos venenos das aranhas serem neurotoxinas, vários peptídeos com novas atividades não-neurotóxicas vêm sendo descobertos (Rash & Hodgson, 2002). Trabalhos descrevem alguns peptídeos não-neurotóxicos isolados do veneno da aranha *Phoneutria nigriventer*, como PNV1 que contrai artéria pulmonar e veias mesentéricas de coelho (Marangoni *et al.*, 1993), PNV2 que contrai músculo liso vascular de coelhos (Bento *et al.*, 1993), PNV3 que é responsável pelo aumento da permeabilidade microvascular em pele de coelho (Bento *et al.*, 1995) e PNV4 que causa relaxamento do corpo cavernoso de coelho (Rego *et al.*, 1996).

Devido à riqueza de componentes presentes nos venenos de aranhas, há um grande interesse de grupos de pesquisa em entender a natureza desses venenos e explorar seu potencial farmacológico.

Nos últimos anos houve um incremento no estudo e na descoberta de novas toxinas isoladas a partir de venenos de aranhas devido à aplicação de novos métodos de separação por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e ao uso extensivo de técnicas de espectrometria de massa associadas a técnicas de separação. O fracionamento de veneno direcionado a ensaios biológicos tem sido usado para identificar peptídeos de interesse dentre as diversas moléculas presentes nos venenos animais (Escoubas, 2006).

Além disso, técnicas modernas de biologia molecular para manipulação de DNA e RNA permitem a construção de bibliotecas genômicas e de cDNA a

partir das glândulas de veneno e também a extração subsequente de informações sobre os componentes dos venenos por seqüenciamento de clones dessas bibliotecas (De Castro *et al.*, 2004; Escoubas *et al.*, 2006).

Apesar dos avanços tecnológicos, alguns fatores ainda dificultam o estudo desses venenos, como a identificação correta da aranha e a obtenção de pequenas quantidades de veneno (Geren & Odell, 1984). Há dificuldades também na expressão funcional de toxinas, obtidas a partir de manipulação de DNA ou RNA, para uso posterior em ensaios biológicos.

1.1.2. Aranhas da subordem Mygalomorphae

As espécies de aranhas pertencentes à subordem Mygalomorphae são conhecidas vulgarmente no Brasil por caranguejeiras. Quase todas as aranhas dessa subordem são de tamanho superior à média, e algumas, tais como as dos gêneros *Grammostola* e *Lasiadora*, são verdadeiros gigantes entre os aracnídeos (Brazil & Vellard, 1926). Espécimes com tamanho entre 8 e 13 cm são facilmente encontradas (Kalapothakis, comunicação pessoal).

O termo tarântula é erroneamente aplicado a qualquer aranha com grande número de pêlos, pois apenas os membros da família Theraphosidae, que pertence à subordem Mygalomorphae, são considerados tarântulas verdadeiras. De acordo com Platnick (2008), 906 espécies de aranhas agrupadas em 112 gêneros compõem essa família. Como as áreas tropicais permanecem pouco exploradas, acredita-se que muitas novas espécies ainda serão descritas.

Aranhas da família Theraphosidae são distribuídas por todo o mundo. Na América do Sul, são encontradas principalmente as espécies *Lasiadora*

parahybana, *Grammostola spatulata* e *Paraphysa manicata*. Apesar de serem mais comumente encontradas em áreas tropicais ou semi-tropicais, possuem extensa distribuição ecológica que inclui áreas úmidas ou secas, savanas, desertos, selvas e habitats com clima semi-temperado. A variedade de nichos ecológicos promove diferenças no comportamento das aranhas predadoras, o que proporciona uma grande diversidade na composição dos venenos (Escoubas & Rash, 2004).

Os venenos de tarântulas parecem afetar tanto vertebrados quanto invertebrados com potências distintas, e isso se relaciona provavelmente com os hábitos alimentares naturais. Muitos venenos de tarântulas possuem forte atividade inseticida (Nicholson, 2007). Um *screening* parcial mostrou que venenos de 35 espécies de tarântulas apresentaram forte atividade parálitica, com doses efetivas de 50% (ED₅₀) variando de 0,017 a 0,726 nL de veneno/mg inseto (Escoubas & Rash, 2004).

Um estudo observou o tempo de morte de camundongos após a administração intracerebroventricular de 0,1 µL de veneno bruto de 55 espécies diferentes de tarântulas. Os resultados revelaram diferenças dramáticas na atividade dos venenos. Os venenos mais ativos causaram sintomas de neurotoxicidade seguidos de morte dentro de 3 a 5 minutos, enquanto outros provocaram apenas sintomas leves de neurotoxicidade e a morte ocorria após um período de 2 horas ou mais (Escoubas & Rash, 2004).

Não há registros de acidentes graves em humanos provocados por picadas de aranhas da família Theraphosidae no Brasil (Lucas *et al.*, 1994) ou em outros países (Schmidt, 1989; Isbister *et al.*, 2003).

Lucas *et al.* (1994) realizaram estudo clínico e epidemiológico considerando registros de acidentes por picadas de aranhas da subordem Mygalomorphae no Hospital Vital Brazil, Instituto Butantan, num período de 25 anos (1966 a 1991). Picadas causadas por aranhas pertencentes a essa subordem representaram menos de 1% de todos os acidentes com artrópodes registrados. Aranhas da família Theraphosidae são responsáveis pela maioria dos acidentes (53%). Predominaram acidentes envolvendo crianças entre 1 e 7 anos de idade (25,3%) e adultos entre 21 e 35 anos de idade (20,9%), sendo mais freqüentes os casos envolvendo pessoas do sexo masculino (68%). As regiões mais afetadas foram mãos e dedos (42,9%), além dos pés (31,9%). Os principais sintomas observados foram dor local apenas, dor e edema locais, dor e eritema. Houve formigamento e prurido em alguns casos. Dos 91 acidentes registrados, apenas 48 necessitaram de tratamento, que normalmente consiste em anestesia local e administração oral de analgésicos e/ou de anti-histamínicos.

A dor decorrente da picada pode estar relacionada a uma combinação de injúria mecânica (provocada pelas grandes quelíceras), baixo pH do veneno (tipicamente pH 5) e efeitos de aminas biogênicas (serotonina e histamina), adenosina e ATP (Schanbacher *et al.*, 1973; Chan *et al.*, 1975; Odell *et al.*, 1989).

Como as aranhas da família Theraphosidae possuem pêlos urticantes no abdômen, que são liberados quando há ameaça ou perturbação, pode haver irritação de pele e mucosas no indivíduo afetado. Em alguns casos, desencadeia-se reação de hipersensibilidade com prurido, exantema e, ocasionalmente, tosse (Cooke *et al.*, 1973).

O tamanho das tarântulas não se correlaciona com a toxicidade de seus venenos a humanos. Os venenos de aranhas da família Theraphosidae de um modo geral ainda não foram estudados sistematicamente, pois os trabalhos iniciais com venenos dedicaram-se ao estudo de espécies de importância médica. Porém, acredita-se que a afinidade de toxinas para alvos de interesse fisiológico não seja sempre relacionada à toxicidade total do veneno. Portanto, mesmo venenos de baixa toxicidade podem ser fontes de ferramentas importantes para a descoberta de processos moleculares e fisiológicos nos vertebrados (Escoubas & Rash, 2004).

1.1.3. Aranhas do gênero *Lasiadora*

As aranhas do gênero *Lasiadora* (Figura 1) pertencem à família Theraphosidae. As diferentes espécies de *Lasiadora* são dificilmente distinguidas, pois os caracteres discriminativos, como cor, tamanho, relação dos diferentes segmentos dos membros, entre outros, estão sujeitos a grandes variações individuais ou sexuais (Brazil & Vellard, 1926; Schiapelli & De Pikelin, 1967).

O quadro abaixo mostra a classificação taxonômica das aranhas do gênero *Lasiadora*:

CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA

Super reino	Eukaryota
Reino	Metazoa
Filo	Arthropoda
Subfilo	Chelicerata
Classe	Arachnida
Ordem	Araneae
Subordem	Mygalomorphae (Orthognatha)
Família	Theraphosidae
Gênero	<i>Lasiadora</i> (C.L. Koch, 1851)

Essas aranhas vivem em locais diversos, como árvores em florestas, no meio de culturas (em especial nas de milho), ocultando-se sob folhas secas de plantas e nos buracos de barrancos. São igualmente freqüentes nos ranchos de sapé, em porões ou forros de casas velhas, em lugares escuros das habitações e debaixo de leitos (Brazil & Vellard, 1926). São encontradas na Floresta Atlântica do Nordeste e em parte do Sudeste e Centro-oeste do Brasil ou em áreas abertas, seguindo a vegetação ciliar (Bertani, 2001). Nas coleções do Instituto Butantan, há material procedente dos estados Bahia, Espírito Santo, Goiás, Mato Grosso, Minas Gerais, Piauí, Rio de Janeiro e São Paulo (Lucas, 1982).

Durante o dia, as mesmas permanecem imóveis em seus esconderijos, isoladas do solo e da umidade, e à noite saem à caça (Brazil & Vellard, 1926). Assim como outras aranhas da mesma família, alimentam-se geralmente de insetos e de pequenos vertebrados (Schvartsman, 1992).



Figura 1: A aranha *Lasiodora* sp.

1.1.4. Venenos de aranhas do gênero *Lasiodora*

Os grupos de pesquisa que trabalham com o veneno de aranhas do gênero *Lasiodora* encontram dificuldades na identificação de espécies, bem como na pouca disponibilidade de veneno e na falta de estudos preliminares que possam indicar alvos potenciais para as toxinas.

Escoubas *et al.* (1997) estudaram o veneno da aranha *Lasiodora parahybana*, espécie encontrada no nordeste do Brasil. Em um bioensaio usando o veneno total, os autores observaram que, após injeção intracerebroventricular em camundongos, o veneno provocou aumento da atividade motora e perturbação, com paralisia e morte após 40 minutos. Em grilos, o veneno da *Lasiodora parahybana* provocou paralisia rápida seguida de morte após injeção intratorácica. O veneno total foi fracionado em coluna de troca iônica em HPLC, resultando em 26 frações. A partir das frações 8 e 11,

foram isolados dois peptídeos neurotóxicos, denominados lasiotoxina 1 e 2 (LpTx1 e LpTx2). Essas toxinas apresentaram grande homologia com toxinas previamente identificadas de outras duas espécies de caranguejeiras, ESTX de *Eurypelma californicum* e BsTx de *Brachypelma smithii*.

Experimentos do nosso grupo realizados com o veneno de aranhas *Lasiodora* sp., encontradas em Minas Gerais, identificaram algumas das ações farmacológicas desse veneno, como o bloqueio de canal para Ca^{2+} do tipo L e modulação da cinética e da dependência de voltagem de canais para Na^+ . Os experimentos demonstraram que, ao ser aplicado em células GH3 na presença de tetrodotoxina (TTX), o veneno aboliu as oscilações de Ca^{2+} e reduziu o nível basal de cálcio intracelular. Na ausência de TTX, o veneno aboliu as oscilações de Ca^{2+} numa fase inicial (fase 1) e logo depois provocou um aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) (fase 2). Como a única diferença experimental foi a presença ou a ausência de TTX, concluiu-se que, além de seus efeitos sobre os canais para Ca^{2+} do tipo L, o veneno age sobre canais para Na^+ . Observou-se também que, quando o veneno foi administrado em altas concentrações ou aplicado na presença de nifedipina ou de Cd^{2+} (ambos bloqueadores de canais do tipo L), não ocorreu aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ na fase 2, o que sugere que esse efeito depende da disponibilidade de canais para Na^+ e para Ca^{2+} do tipo L. O veneno então provoca aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ na fase 2 via abertura de canais para Na^+ , causando despolarização da membrana e entrada de Ca^{2+} via canais para cálcio regulados por voltagem. O efeito do veneno sobre as correntes de Na^+ foi avaliado e constatou-se que o veneno não modificou a ativação da corrente, mas causou diminuição de sua cinética de

inativação, além de deslocar negativamente sua dependência de voltagem (Kushmerick *et al.*, 2001).

O veneno bruto da aranha *Lasiadora* sp. também foi estudado quanto a sua atividade em coração isolado de rato. O veneno provocou bradicardia concentração-dependente, com parada cardíaca transitória e distúrbios rítmicos após aplicação *in bolus* de quantidade equivalente a 100 µg. O efeito do veneno foi potencializado pelo anticolinesterásico neostigmina, abolido pelo antagonista muscarínico atropina e inibido por vesamicol, que é um inibidor da captação vesicular de acetilcolina. A TTX não alterou a ação do veneno. Os resultados obtidos demonstraram que o veneno bruto provoca um aumento na liberação vesicular de acetilcolina nas terminações nervosas parassimpáticas, por ativar canais para Na⁺ resistentes à TTX (Kalapothakis *et al.*, 2003).

O fracionamento do veneno bruto da aranha *Lasiadora* sp. foi realizado por nosso grupo, sendo utilizada cromatografia de fase reversa em sistema HPLC, com coluna preparativa C4, resultando em vinte frações. Tais frações foram reunidas em doze, denominadas F1 a F12. As frações F3 a F11 apresentaram ação tóxica para camundongos, sendo que F6 e F7 foram letais. Bioensaios preliminares também demonstraram que quatro frações (F2, F10, F11 e F12) possuem ação inseticida para larvas de *Spodoptera frugiperda* e *Anticarsia gemmatalis*, que afetam as lavouras de milho e soja, respectivamente (De Deus, 2003).

Nosso grupo também realizou caracterizações bioquímicas, biológicas e moleculares do veneno bruto da aranha *Lasiadora* sp. Silvestre (2005) observou que o perfil protéico do veneno bruto obtido pela técnica de eletroforese bidimensional (IPG/SDS-PAGE) mostra presença de proteínas de

baixa e de alta massa molecular, além de proteínas com massa molecular intermediária. O ponto isoelétrico dessas proteínas variou entre pH 4 e 9, com predominância de proteínas básicas. Ensaio bioquímico revelou que o veneno não apresenta atividades hemolítica e esfingomielinásica, porém possui alta atividade proteolítica sobre dimetilcaseína, mesmo em baixas concentrações. Bioensaios demonstraram que não foi possível determinar a dose letal 50% (DL₅₀) para camundongos, pois a aplicação do veneno bruto até a alta dose de 250 µg não resultou em letalidade significativa para a continuação dos ensaios. A biblioteca de cDNA construída a partir do mRNA foi caracterizada e mostrou-se eficiente no isolamento de proteínas presentes no veneno da aranha.

Ao realizarem varredura na biblioteca de cDNA da glândula de veneno da aranha *Lasiadora* sp., Vieira *et al.* (2004) identificaram três toxinas, denominadas LTx1, LTx2 e LTx3. Após análise das toxinas no banco de dados *GenBank*, os autores observaram que elas possuem similaridade significativa com toxinas das seguintes aranhas da família Theraphosidae: *Lasiadora parahybana*, *Eurypelma californicum*, *Brachypelma smithii* e *Selenocosmia huwena*. A toxina LTx1 é idêntica à toxina LpTx1 descrita por Escoubas *et al.* (1997).

Após clonagem e expressão da toxina LTx2, Dutra *et al.* (2008) revelaram que a toxina recombinante bloqueia canais para Ca²⁺ do tipo L em células BC3H1. Supõe-se que LTx1 e LTx3 também sejam ativas em canais para Ca²⁺ devido à similaridade estrutural entre elas e a LTx2, porém apenas a expressão e a caracterização biológica dessas duas toxinas podem revelar seus alvos moleculares.

1.2. O sistema cardiovascular

O coração é o órgão central do sistema cardiovascular que bombeia o sangue do ventrículo esquerdo para os órgãos através das artérias. As artérias ramificam-se ao longo de seu curso e terminam em pequenos vasos denominados arteríolas, que resultam em uma rede de vasos microscópicos denominados capilares. Os capilares coalescem para formar vênulas pós-capilares, vênulas e veias cada vez maiores, levando o sangue ao coração direito (Gray, 1988).

As artérias constituem um extenso sistema de vasos que carregam o sangue do coração para a rede de capilares. Os ramos arteriais se estreitam e suas paredes ficam mais finas à medida que se aproximam da periferia (Levy, 2004). Classificam-se em artérias de condutância, que acomodam o fluxo sanguíneo proveniente do ventrículo esquerdo, e artérias de resistência, que contribuem para a distribuição do fluxo sanguíneo aos tecidos e para a resistência periférica (Bohlen, 1986; Pohl *et al.*, 2000).

A parede das artérias organiza-se basicamente em três camadas (Figura 2): a camada interna ou endotelial (túnica íntima), composta por uma camada única de células escamosas orientadas longitudinalmente; a camada média ou muscular (túnica média), formada por células musculares lisas; e a camada externa (túnica adventícia), que contém fibroblastos e fibras colágenas associadas (Gray, 1988; Fawcett, 1994).

Adicionalmente, há uma lâmina elástica interna entre as túnicas íntima e média, composta por fibras elásticas, que é bem desenvolvida em artérias de médio calibre. A espessura dessa lâmina é considerável em artérias de grande calibre, especialmente na aorta. Essa característica é fisiologicamente

importante, pois torna esses vasos facilmente distensíveis para acomodação do sangue ejetado do coração e subsequente distribuição para os órgãos do corpo. Entre as túnicas média e adventícia, uma lâmina elástica externa mais delicada é também distinguível em muitas artérias (Fawcett, 1994).

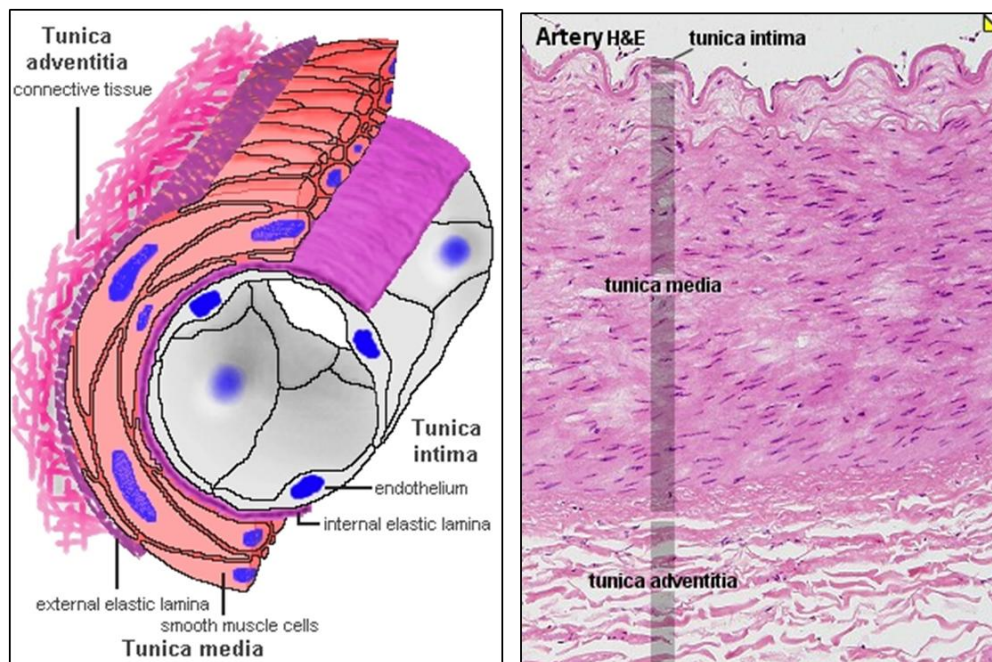


Figura 2: Esquema representativo da parede arterial (à esquerda) e corte histológico de artéria (à direita), evidenciando a organização da parede arterial em três camadas (Fonte: <http://www.lab.anhb.uwa.edu.au/mb140/CorePages/Vascular/Vascular.htm>).

1.2.1. Regulação do tônus do músculo liso vascular

Os principais fatores que regulam o estado contrátil das células do músculo liso vascular são as mudanças na concentração de cálcio no meio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) e o grau de fosforilação das fibras contráteis, que pode ou não depender de mudanças na $[Ca^{2+}]_i$. O aumento e a diminuição na $[Ca^{2+}]_i$ resultam em contração e relaxamento do músculo liso vascular, respectivamente (Karakı *et al.*, 1997). Em condições fisiológicas, as células musculares lisas dos vasos encontram-se parcialmente contraídas (tônus

vasomotor) sob a influência de vários tipos de sinais regulatórios, como neural, endotelial, humoral e miogênico (Akata, 2007a).

Em resposta a um estímulo contrátil, o Ca^{2+} é mobilizado de estoques intracelulares (retículo sarcoplasmático) ou do meio extracelular. A contribuição relativa dessas duas fontes de Ca^{2+} varia em função das diferentes células musculares lisas e do tipo de estímulo (Lesh *et al.*, 1998).

Quando há um aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$, o íon liga-se à proteína citoplasmática ligante calmodulina (CaM), induzindo uma alteração conformacional dessa molécula. O complexo Ca^{2+} -CaM liga-se e ativa a quinase da cadeia leve de miosina (MLCK). O complexo quinase ativo subsequente fosforila a cadeia leve da miosina (MLC) em um sítio específico, permitindo a contração muscular como resultado da interação entre actina e miosina. Por outro lado, quando a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ diminui, seja por extrusão desse íon da célula ou por recaptção para os estoques intracelulares, o complexo Ca^{2+} -CaM dissocia-se da MLCK, inativando-a. Ocorre desfosforilação da MLC pela enzima miosina fosfatase e alteração da interação entre actina e miosina, causando relaxamento muscular (Figura 3) (Allen & Walsh, 1994; Orallo, 1996; Akata, 2007a).

O aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ pode ser causado por despolarização da membrana (acoplamento eletromecânico). Em repouso, o potencial de membrana de uma célula muscular lisa de artéria varia de -45 a -70 mV (Orallo, 1996).

Um estímulo que despolariza a membrana da célula muscular lisa permite a entrada de quantidades substanciais de Ca^{2+} através de canais para cálcio regulados por voltagem. Sabe-se que ao menos dois tipos desses canais

estão presentes nas células do músculo liso vascular: os tipos L e T, sendo o primeiro mais numeroso e mais importante (Abernethy & Soldatov, 2002; Cribbs, 2006).

Nas células musculares lisas, há diferentes tipos de canais para K^+ que possuem um papel fundamental na manutenção do potencial de repouso da membrana. Ao menos quatro tipos de canais para K^+ estão presentes nessas células, e sua distribuição e regulação variam de acordo com fatores dependentes do tipo de vaso sanguíneo: canais para potássio ativados por voltagem (K_v), canais para potássio sensíveis à concentração de cálcio intracelular (K_{Ca}), canais para potássio sensíveis a variações de ATP intracelular (K_{ATP}) e canais para potássio retificadores de entrada (K_{IR}). O bloqueio de canais para K^+ resulta em despolarização da membrana celular e aumento do influxo de Ca^{2+} através de canais para cálcio regulados por voltagem (Standen & Quayle, 1998; Ko *et al.*, 2008).

O aumento da $[Ca^{2+}]_i$ também pode ser causado por ligação de agonistas a receptores específicos na membrana celular sem que haja mudanças prévias no potencial de membrana (acoplamento farmacomecânico). No entanto, mudanças no potencial de repouso da membrana podem ocorrer secundariamente ao acoplamento farmacomecânico (Orallo, 1996).

Um dos principais mecanismos desse tipo de acoplamento envolve a ativação da fosfolipase C (PLC), que é uma enzima ligada à membrana celular. Tal ativação ocorre após ligação de um agonista (norepinefrina, angiotensina II, endotelina, por exemplo) a um receptor específico acoplado à proteína G. A PLC cliva os fosfolípidios de membrana (PIP_2) em diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3), os quais atuam como segundos mensageiros. O IP_3

difunde-se da membrana celular para o citosol, liga-se ao seu receptor específico no retículo sarcoplasmático e estimula a liberação de Ca^{2+} a partir dos estoques (Marín *et al.*, 1999; Barlow *et al.*, 2006). Secundariamente, ocorre a ativação de dois tipos de canais para Ca^{2+} presentes na membrana plasmática, com conseqüente entrada de Ca^{2+} para a célula. A depleção dos estoques do retículo sarcoplasmático ativa os canais para cálcio operados pelas reservas, e o IP_3 também ativa um tipo de canal operado por ligante, o canal para cálcio operado por segundos mensageiros (Marks, 1992; Leung *et al.*, 2008). Após a ligação de certos agonistas a seus receptores no músculo liso, pode ocorrer também ativação secundária de canais catiônicos, seletivos ou não para o Ca^{2+} , presentes na membrana plasmática. Por exemplo, a ligação do ATP ao seu receptor ativa um tipo de canal operado por ligante, o canal para cálcio operado por receptores (Orallo, 1996; Jackson, 2000). A maquinaria contrátil da célula é por sua vez ativada.

Há mecanismos regulatórios que controlam a sensibilidade dos miofilamentos ao Ca^{2+} e, conseqüentemente, a maquinaria contrátil. Algumas substâncias, como os inibidores da enzima miosina fosfatase, podem aumentar a fosforilação da MLC de modo independente de qualquer alteração na $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Somlyo & Somlyo, 2003; Akata, 2007b).

Ao contrário da contração do músculo liso vascular, a vasodilatação ocorre principalmente por inibição da mobilização de Ca^{2+} e da sensibilidade dos miofilamentos a esse íon (Figura 3) (Allen & Walsh, 1994).

A inibição da mobilização de Ca^{2+} consiste em diminuição do influxo de Ca^{2+} por canais presentes na membrana plasmática ou retirada desse íon da célula muscular, o que leva a uma redução da $[\text{Ca}^{2+}]_i$. O Ca^{2+} pode ser retirado

da célula através da bomba de Ca^{2+} dependente de ATP da membrana plasmática (Ca^{2+} -ATPase) e do transportador de troca Na^+ - Ca^{2+} (NCX). A Ca^{2+} -ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA) transporta o Ca^{2+} ativamente para os estoques do retículo (Floyd & Wray, 2007).

Os principais mecanismos mediadores da vasodilatação envolvem ativação de canais para K^+ e aumento da concentração intracelular de nucleotídeos cíclicos (GMPc e AMPc) (Karaki *et al.*, 1997).

A ativação de canais para K^+ nas células musculares lisas resulta em efluxo de íons K^+ , causando hiperpolarização da membrana celular e diminuição do influxo de Ca^{2+} através de canais para cálcio regulados por voltagem (Sorbey, 2001).

Algumas substâncias vasodilatadoras (adenosina, isoprenalina, prostaciclina) ligam-se a receptores acoplados à proteína G na membrana da célula muscular lisa e ativam a enzima adenilil-ciclase (AC). Tal enzima, ligada à membrana celular, produz AMPc a partir do ATP e esse nucleotídeo cíclico ativa a proteína quinase dependente de AMPc (PKA). A ação da PKA culmina em diminuição da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ através de estimulação da bomba Ca^{2+} -ATPase, do NCX, da SERCA e de canais para K^+ . Também inibe a PLC e os canais para Ca^{2+} e diminui a sensibilidade dos miofilamentos ao Ca^{2+} , por fosforilação e inativação da MLCK (Kawada *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 2004).

Outros vasodilatadores ativam a enzima guanilil-cilase (GC). O óxido nítrico (NO) ativa a forma citoplasmática solúvel da guanilil-ciclase (GCs), enquanto peptídeos vasodilatadores, como o peptídeo natriurético atrial (ANP) e o peptídeo C natriurético (CNP), ligam-se a receptores de membrana com atividade de guanilil-ciclase intrínseca (guanilil-ciclase particulada). Tal enzima

aumenta a produção de GMPc a partir do GTP e ocorre então ativação da proteína quinase dependente de GMPc (PKG). A PKG reduz a $[Ca^{2+}]_i$ por ativação da SERCA, da bomba Ca^{2+} -ATPase e do NCX. Também ativa os canais para K^+ , causando hiperpolarização da membrana. Inibe os canais para Ca^{2+} regulados por voltagem direta (por desfosforilação do canal devido à fosforilação da proteína fosfatase 2A) e indiretamente (por hiperpolarização celular). Fosforila e inibe os receptores de IP_3 presentes no retículo sarcoplasmático, inibindo a saída de Ca^{2+} a partir dos estoques. Por fim, a PKG regula positivamente a atividade da enzima miosina fosfatase, acelerando a desfosforilação da MLC (Dostmann *et al.*, 2002; Birschmann & Walter, 2004; Akata, 2007b).

Os nucleotídeos cíclicos são hidrolisados dentro das células por uma família de enzimas, as fosfodiesterases (PDEs). Há diferentes subtipos de PDEs, que são seletivos para AMPc ou GMPc (Omori & Kotera, 2007). Existem substâncias que reforçam os efeitos vasodilatadores dos nucleotídeos cíclicos por inibição de PDEs. Um exemplo importante de fármaco é o sildenafil (Viagra[®]), que inibe seletivamente a PDE₅, e aumenta os efeitos mediados pelo GMPc (Corbin & Francis, 1999).

A figura 3 mostra um esquema que resume os principais mecanismos envolvidos na contração e no relaxamento do músculo liso vascular.

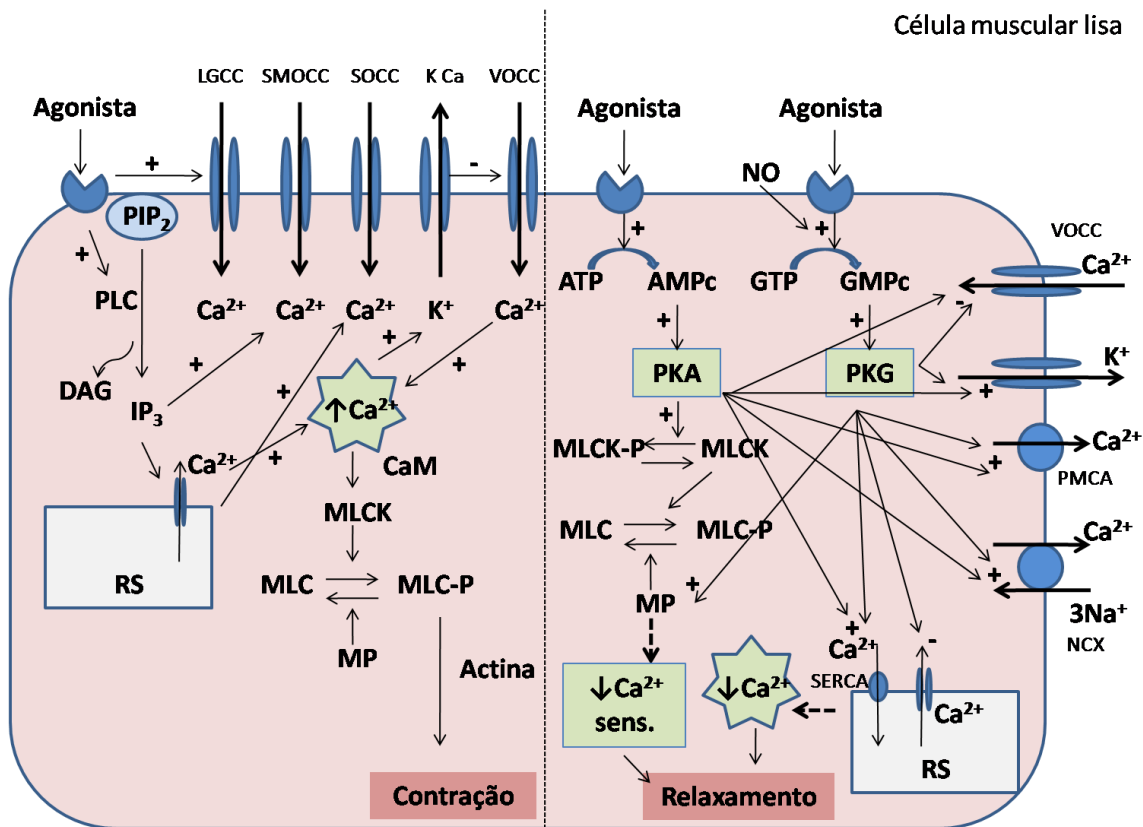


Figura 3: Mecanismos envolvidos na contração e no relaxamento do músculo liso vascular. Adaptado de Akata (2007 a,b). Legenda (itens ausentes no texto): Ca^{2+} sens., sensibilidade dos miofilamentos ao Ca^{2+} ; LGCC, canais para cálcio operados por ligantes; $K Ca$, canais para potássio sensíveis à concentração de cálcio intracelular; $MLC-P$, cadeia leve de miosina fosforilada; $MLCK-P$, quinase da cadeia leve de miosina fosforilada; MP , miosina fosfatase; $PMCA$, bomba de Ca^{2+} dependente de ATP da membrana plasmática; RS , retículo sarcoplasmático; $SMOCC$, canais para cálcio operados por segundos mensageiros; $SOCC$, canais para cálcio operados pelas reservas; $VOCC$, canais para cálcio regulados por voltagem.

1.2.2. Papel do endotélio no controle do tônus vascular

Entre as inúmeras funções do endotélio, destaca-se a regulação do tônus vascular através da liberação de várias substâncias vasoativas, que podem causar vasodilatação ou vasoconstrição (Carvalho *et al.*, 2001; Triggle *et al.*, 2003).

As principais substâncias vasodilatadoras derivadas do endotélio são o óxido nítrico (NO), a prostaciclina (PGI_2) e o fator hiperpolarizante derivado do

endotélio (EDHF) (Figura 4). Os principais fatores contráteis são endotelina-1, angiotensina-II, tromboxano A_2 , prostaglandinas contráteis e ânions superóxido (O_2^-) ou espécies reativas de oxigênio (ROS). Em condições fisiológicas, a produção de fatores relaxantes é mais importante (Mombouli & Vanhoutte, 1999; Kurahashi *et al.*, 2003; Khazaei *et al.*, 2008).

O NO é gerado através da conversão do aminoácido L-arginina em L-citrulina pela enzima óxido nítrico sintase (NOS). A NOS requer as flavinas FAD e FMN, bem como NADPH e tetraidrobiopterina (BH_4), para catalisar a oxidação da L-arginina. Três isoformas da NOS foram identificadas: NOS-I, NOS-II e NOS-III. A NOS-I ou NOS neuronal (nNOS) é encontrada predominantemente no sistema nervoso central. A NOS-II ou NOS induzível (iNOS) é encontrada em macrófagos, neutrófilos e outras células inflamatórias. Por fim, a NOS-III ou NOS endotelial (eNOS) é encontrada em células endoteliais, cardiomiócitos, osteoblastos e osteoclastos (Alderton *et al.*, 2001; Ricciardolo *et al.*, 2004; Khazaei *et al.*, 2008).

A eNOS está ancorada à membrana da célula endotelial, em microdomínios denominados cavéolas. Sua atividade é regulada pelo complexo intracelular Ca^{2+} -CaM. O controle é exercido por aumento da $[Ca^{2+}]_i$ e sua ativação consiste em translocação para o citosol e subsequente ligação a Ca^{2+} -CaM. A ligação da CaM desloca um *loop* autoinibitório adjacente na eNOS. A fosforilação de resíduos específicos na enzima, que a torna mais ou menos ativa em determinadas concentrações de Ca^{2+} -CaM, pode ser considerada um mecanismo adicional de modulação da atividade da eNOS (Fulton *et al.*, 2001; Fleming & Busse, 2003).

A enzima eNOS pode ser fosforilada em resíduos de serina, treonina e tirosina. Há numerosos sítios potenciais de fosforilação, mas é sabido que a fosforilação da eNOS em Ser1177 e Thr495 modula a atividade da enzima. Enquanto a fosforilação de Ser1177 implica na ativação da enzima, a fosforilação de Thr495 decresce a atividade enzimática (Fulton *et al.*, 2001; Brixius *et al.*, 2004).

A fosforilação da eNOS em Ser1177 pode ocorrer por um mecanismo dependente do aumento da $[Ca^{2+}]_i$, via proteína quinase dependente de calmodulina (CaMKII), proteína quinase dependente de AMPc (PKA) ou proteína quinase ativada por AMP (AMPK). De outra forma, pode ocorrer por um mecanismo independente de Ca^{2+} , via ativação de fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) com conseqüente ativação da serina quinase Akt, também denominada proteína quinase B. Quando o resíduo de Ser1177 é fosforilado, o fluxo de elétrons através do domínio redutase da eNOS e, conseqüentemente, a produção de NO são aumentados (Chen *et al.*, 1999; Dimmeler *et al.*, 1999; Fulton *et al.*, 1999; Alderton *et al.*, 2001; Fleming & Busse, 2003).

O resíduo de Thr495 é constitutivamente fosforilado em células endoteliais não estimuladas, provavelmente pela proteína quinase C (PKC). O *link* entre fosforilação e produção de NO pode ser explicado pela interferência com a ligação da CaM ao seu domínio de ligação na eNOS. Quando o sítio de Thr495 está desfosforilado, mais CaM liga-se a eNOS, ativando-a. Aparentemente, as fosfatases PP1 e PP2A são responsáveis pela desfosforilação (Fleming *et al.*, 2001; Michell *et al.*, 2001).

O NO é sintetizado nas células endoteliais em resposta a estímulos fisiológicos como força de cisalhamento ou a estímulos químicos como

acetilcolina, bradicinina, ATP, histamina, substância P. A força de cisalhamento, que é a força exercida pelo fluxo sanguíneo sobre a parede vascular, induz ativação da eNOS via PI3K/Akt. Já os agonistas citados ligam-se a receptores específicos na membrana das células endoteliais, induzindo aumento da $[Ca^{2+}]_i$ e promovendo ativação da eNOS principalmente via mecanismos dependentes de Ca^{2+} . Alguns trabalhos indicam outras vias de fosforilação, independentes de Ca^{2+} , por ação de algumas dessas substâncias (Harris *et al.*, 2001; Zecchin *et al.*, 2007). Por outro lado, agonistas como estrógeno e fator de crescimento derivado do endotélio vascular (VEGF) agem em receptores específicos no endotélio e fosforilam a eNOS via PI3K/Akt (Lüscher & Noll, 1995; Fleming & Busse, 1999; Dimmeler *et al.*, 2000; Fisslthaler *et al.*, 2000; Boo & Jo, 2003).

O NO sintetizado difunde-se do endotélio para o lúmen vascular e para o músculo liso vascular. No interior da célula muscular, o NO interage com o ferro do grupo heme da enzima guanilil-ciclase solúvel, ativando-a e promovendo então um aumento da formação de GMPc (Figuras 3 e 4) (Dusse *et al.*, 2003; Krumenacker *et al.*, 2004).

Os prostanóides são produzidos pela ação de enzimas cicloxigenases (COX), que convertem o ácido araquidônico (AA) em endoperóxidos cíclicos (PGG₂ e PGH₂). Enzimas adicionais produzem as prostaglandinas, como a prostaciclina sintase, responsável pela síntese de PGI₂. A prostaciclina é produzida por células endoteliais; no entanto, ao contrário do NO, seu efeito vasodilatador é determinado pela expressão de receptores específicos acoplados à proteína G nas células musculares lisas. Os receptores de PGI₂

ativam a adenilil-ciclase, o que eleva os níveis intracelulares de AMPc (Figuras 3 e 4) (Coleman *et al.*, 1994; Vane & Corin, 2003; Wise, 2003).

O EDHF é definido como um mediador do relaxamento vascular via mecanismo independente de NO e de PGI₂ que envolve hiperpolarização de membrana nas células musculares lisas. A natureza exata do EDHF permanece não elucidada, mas vários estudos apontam candidatos, como ácidos epoxieicosatrienólicos (EETs), íons potássio e peróxido de hidrogênio. A contribuição da resposta do EDHF em artérias é significativamente maior em vasos de resistência (Figura 4) (Medhora *et al.*, 2001; Matoba & Shimokawa, 2003; Félétou & Vanhoutte, 2006; Campbell & Falck, 2007).

A figura 4 esquematiza a liberação das principais substâncias vasodilatadoras derivadas do endotélio e seus efeitos no músculo liso.

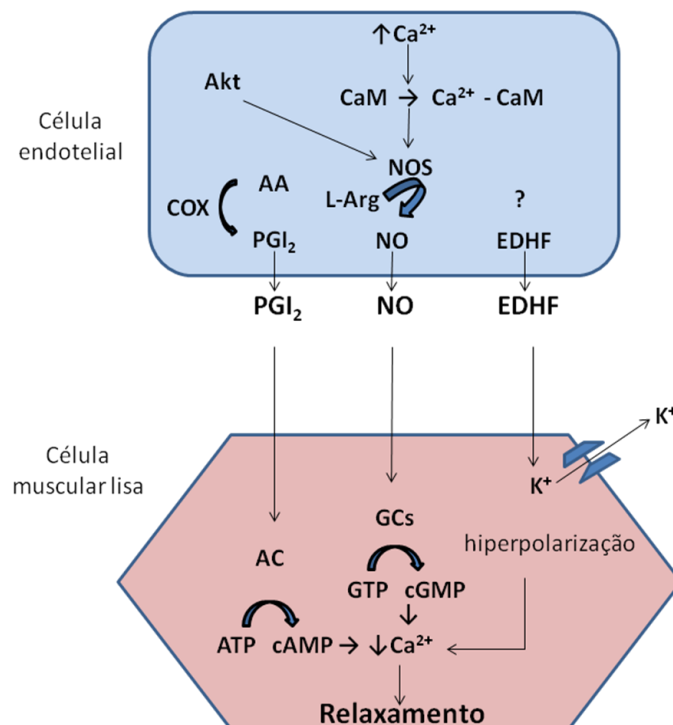


Figura 4: Esquema representativo da liberação de fatores relaxantes das células endoteliais e seus efeitos em células musculares lisas. Adaptado de Mombouli & Vanhoutte (1999).

1.2.3. Doenças cardiovasculares

As doenças cardiovasculares incluem doenças cardíacas isquêmicas, doença cerebrovascular, hipertensão arterial, doença arterial periférica, doença cardíaca reumática, doença cardíaca congênita e falência cardíaca. Em todo o mundo, as doenças cardiovasculares são a causa principal de morte. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que 17,5 milhões de pessoas morreram por doenças cardiovasculares em 2005, o que representa 30% do total de mortes. Caso essa tendência continue, estima-se que, em 2015, 20 milhões de pessoas morrerão em decorrência de tais doenças (World Health Organization, 2005).

A hipertensão arterial é um fator de risco de alta prevalência para doenças cardiovasculares. Possui um papel etiológico importante no desenvolvimento de doença cerebrovascular, doença cardíaca isquêmica, falência cardíaca e falência renal (Kohlman-Trigoboff, 2004; Luft, 2004; Williams, 2008). O tratamento da hipertensão tem sido associado a aproximadamente 40% de redução do risco de acidente vascular cerebral e 15% de redução do risco de infarto agudo do miocárdio (Collins *et al.*, 1990; World Health Organization & International Society of Hypertension, 2003).

O desenvolvimento de compostos com ação vasodilatadora contribui para o avanço no tratamento das doenças cardiovasculares. Muitos vasodilatadores são utilizados clinicamente para o tratamento de hipertensão arterial, insuficiência cardíaca e angina (Julius *et al.*, 2004; Arshad *et al.*, 2008; Daiber *et al.*, 2008).

1.3. Estudo de venenos como potencial terapêutico

A evolução do aparato venenoso em animais, como meio de predação ou defesa, é considerada uma conquista biológica marcante (Escoubas *et al.*, 2008).

Tal riqueza farmacológica acumulada pela natureza ao longo da evolução resultou em misturas extremamente complexas de farmacóforos, uma biblioteca de centenas de milhares de moléculas potencialmente ativas (Theakston & Kamiguti, 2002). Os componentes presentes nos venenos têm como alvo diferentes mecanismos celulares.

Devido à alta potência e seletividade das proteínas e dos peptídeos presentes nos venenos, os mesmos tornaram-se ferramentas valiosas para pesquisa, descoberta e desenvolvimento de drogas (Lewis & Garcia, 2003). Algumas toxinas isoladas de venenos já foram aprovadas pelo FDA (*Food and Drug Administration*) como terapêuticas, enquanto outras se encontram em estágios variados de experimentação clínica como drogas potenciais para inúmeras indicações, incluindo dor e doenças neurológicas e cardiovasculares (Lewis & Garcia, 2003; Bogin, 2005).

1.3.1. Venenos como potencial terapêutico para doenças cardiovasculares

O primeiro exemplo bem sucedido de droga baseada em veneno é o captopril, que inibe a enzima conversora de angiotensina (ECA), essencial para a produção de angiotensina II, que por sua vez é potente vasoconstritora e associada à hipertensão arterial. Estudos com o veneno da serpente *Bothrops jararaca* revelaram que o mesmo continha substâncias capazes de inibir a ECA (Ferreira, 1965; Greene *et al.*, 1972). Como os peptídeos provenientes do

veneno da serpente eram inadequados para utilização como fármacos, em razão de sua baixa absorção oral, a indústria farmacêutica elaborou o captopril para combinar as propriedades estéricas de tais antagonistas peptídicos em uma molécula não-peptídica. A estrutura do captopril foi projetada a partir do peptídeo teprotida, isolado do veneno da serpente. Os inibidores de ECA ainda são uma classe importante de agentes anti-hipertensivos (Lewis & Garcia, 2003; Smith & Vane, 2003). Os venenos de serpente também são muito estudados para uso como antitrombóticos e anti-hemorrágicos (Borkow *et al.*, 1994; Borkow *et al.*, 1995; Chang *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2000).

Há muitos trabalhos na literatura que descrevem venenos brutos ou toxinas isoladas de venenos de animais peçonhentos como ativos no sistema cardiovascular, com potencial terapêutico para algumas doenças desse sistema.

Sharpe *et al.* (2001) isolaram do veneno do molusco marinho *Conus tulipa* um peptídeo que é inibidor seletivo e não-competitivo dos receptores α 1-adrenérgicos, com grande potencial terapêutico para o tratamento da hipertensão arterial.

Suchyna *et al.* (2000) isolaram do veneno da aranha *Grammostola spatulata* o peptídeo GsMTx-4, que foi capaz de diminuir arritmias cardíacas em ratos e coelhos. Esse peptídeo bloqueia canais iônicos ativados por estiramento, suprimindo o número e a duração dos ataques de fibrilação. Essa descoberta pode gerar um biomedicamento para o tratamento da fibrilação, uma complicação cardíaca muito comum que pode levar à morte (Nattel & Carlsson, 2006).

Outro estudo investigou o mecanismo envolvido na contração de artérias mesentérica e celíaca induzida pelo veneno da aranha *Phoneutria nigriventer*. Os achados indicaram que o veneno dessa aranha contrai o músculo liso vascular, principalmente pelo aumento do influxo de Ca^{2+} proveniente do meio extracelular (Teixeira *et al.*, 2004).

Costa *et al.* (1996) observaram que a administração endovenosa do veneno da aranha armadeira *Phoneutria nigriventer* em ratos anestesiados provocou um breve e reversível decréscimo de pressão arterial média quando administrado em baixas doses. Já a aplicação de uma dose maior promoveu um efeito bifásico caracterizado por atenuada hipotensão, seguida de hipertensão sustentada (40-50 minutos). Após investigação do mecanismo de ação, os resultados indicaram que a breve hipotensão induzida pelo veneno foi causada por ativação de canais para K^+ do tipo K_{ATP} . A hipertensão prolongada resulta da entrada direta de íons Ca^{2+} em células musculares cardíacas e/ou vasculares.

Como exposto anteriormente, sabe-se que o veneno bruto da aranha *Lasiodora* sp. causa bradicardia concentração-dependente em coração isolado de rato por indução da liberação de acetilcolina das terminações nervosas parassimpáticas (Kalapothakis *et al.*, 2003). Diante desses resultados, o presente trabalho visa investigar o efeito desse veneno na preparação *in vivo* e também em vasos isolados.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Estudar os efeitos cardiovasculares do veneno da aranha *Lasiadora* sp. e buscar elucidar os mecanismos implicados em sua ação.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar o efeito do veneno bruto da aranha *Lasiadora* sp. sobre a pressão arterial média (PAM) e a frequência cardíaca (FC) em ratos anestesiados;
- Verificar o mecanismo do efeito do veneno bruto sobre PAM e FC no animal anestesiado;
- Avaliar o efeito do veneno bruto da aranha *Lasiadora* sp., bem como das frações disponíveis F4, F5 e F10 do veneno, sobre a função vascular em modelo de aorta isolada de rato;
- Verificar o mecanismo da ação do veneno bruto no modelo de aorta isolada de rato.

Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Drogas utilizadas

O veneno bruto da aranha *Lasiadora* sp. foi diluído em solução de salina fisiológica para os procedimentos experimentais no animal anestesiado. Para os procedimentos experimentais em vaso isolado, veneno bruto e frações foram diluídos em solução de Krebs-Henseleit.

Acetilcolina, carbacol, fenilefrina, indometacina, L-NAME, atropina, pirilamina, HOE 140, nifedipina, nitroprussiato de sódio, SIN-1 e SNAP foram adquiridos da Sigma (St. Louis, MO, USA). Suramina e LY 294002 foram procedentes da Calbiochem (EMD Chemicals Inc., Darmstadt, Germany).

Uma solução estoque de indometacina na concentração de 10^{-2} M foi dissolvida em solução 0,5% peso/volume (p/v) de bicarbonato de sódio e diluída posteriormente em solução de Krebs-Henseleit nas concentrações desejadas. O LY 294002 foi dissolvido em álcool etílico para preparo de uma solução estoque de 10^{-2} M, que foi diluída posteriormente em solução de Krebs-Henseleit nas concentrações desejadas. Os outros compostos foram dissolvidos em água destilada ou em solução de salina fisiológica, no caso dos experimentos realizados *in vivo*.

A tabela 1 mostra as drogas utilizadas nos procedimentos experimentais e descreve suas ações farmacológicas.

Tabela 1: Drogas utilizadas e descrição de suas ações farmacológicas

Droga	Ação farmacológica
Acetilcolina	Agonista de receptores colinérgicos
Atropina	Antagonista não seletivo de receptores muscarínicos
Carbacol	Agonista de receptores colinérgicos
Fenilefrina	Agonista do receptor α 1-adrenérgico
HOE 140	Antagonista do receptor B2 de bradicinina
Indometacina	Inibidor não seletivo das cicloxigenases
L-NAME	Inibidor não seletivo das óxido nítrico sintases
LY 294002	Inibidor seletivo da PI3K
Nifedipina	Bloqueador de canais para cálcio do tipo L
Nitroprussiato de sódio	Doador de óxido nítrico
Pirilamina	Antagonista do receptor histaminérgico H1
SIN-1	Doador de óxido nítrico
SNAP	Doador de óxido nítrico
Suramina	Antagonista de receptores purinérgicos P2

3.2. Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos, com idade entre 12 e 14 semanas, (250-300 g) provenientes do Centro de Bioterismo (CEBIO) da UFMG. Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG, em ciclos de claro-escuro, com livre acesso a água e ração.

Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG, sob os protocolos 022/07 e 166/07.

3.3. Obtenção do veneno bruto da aranha *Lasiadora* sp.

As aranhas caranguejeiras (*Lasiadora* sp.) foram coletadas em Uberlândia - MG e criadas em cativeiro no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. Um espécime dessa aranha foi depositado na coleção do Instituto Butantan de São Paulo com o número IBSP 8539.

A extração do veneno foi feita por choque elétrico na quelícera (15 V). As amostras obtidas de diversas aranhas foram reunidas, diluídas em água destilada e centrifugadas a 4°C para a eliminação de impurezas. O sobrenadante foi liofilizado e estocado a -20°C para uso posterior.

3. 4. Fracionamento do veneno bruto da aranha *Lasiadora* sp.

Para o fracionamento do veneno bruto da aranha, utilizou-se cromatografia líquida de fase reversa em sistema HPLC (Shimadzu Co., Japan) com coluna preparativa C4 (Grace Vydac, Inc., USA, dimensões 300 Å, 12 µm, 10 x 250 mm), segundo método descrito por De Deus (2003). O veneno (10 mg) foi diluído em 1 mL de ácido trifluoracético (TFA) 0,1% em água e aplicado na coluna previamente equilibrada com o mesmo solvente. A fase móvel consistiu em TFA 0,1% em acetonitrila (ACN). O gradiente utilizado foi por etapas (*stepwise*), sendo que de 20 a 100 minutos foi de 0 a 25% de ACN e de 100 a 175 minutos foi de 25 a 70% de ACN. Seguiu-se lavagem com TFA 0,1% em ACN por um período de 55 minutos. O fluxo foi de 1 mL por minuto. As amostras foram monitoradas em absorbância de 241 nm.

As amostras de frações obtidas foram liofilizadas e estocadas a -20°C para uso posterior.

3. 5. Quantificação de proteínas

A quantificação de proteínas do veneno bruto e das frações obtidas foi realizada segundo método descrito por Bradford (1976), utilizando-se albumina de soro bovino (BSA, fração 5) como padrão de proteínas.

3.6. Procedimentos experimentais no animal anestesiado

3.6.1. Canulação de veia e artéria femoral

Foram utilizadas cânulas confeccionadas a partir de um tubo de polietileno PE-10 (4,5 cm para artéria e 2 cm para veia) ligado em outro tubo de polietileno PE-50 (10 cm). O animal foi anestesiado com uretana (1,2 g/kg de peso) e as cânulas preenchidas previamente com solução de salina fisiológica foram introduzidas na aorta abdominal, através da artéria femoral, e na veia femoral. A cânula arterial foi utilizada para registro dos parâmetros cardiovasculares e a cânula venosa para administração sistêmica de veneno e drogas. Os animais foram mantidos em uma manta aquecida a cerca de 37°C desde a cirurgia até os procedimentos experimentais.

3.6.2. Registro da pressão arterial e da frequência cardíaca

A cânula arterial foi conectada a um transdutor de pressão ligado a um amplificador e a um conversor analógico/digital (Biopac Systems, Inc., Santa Bárbara, CA, USA). Os sinais foram registrados em um microcomputador contendo o *software* de aquisição de dados Acqknowledge (Biopac Systems, Inc.). Após calibração do equipamento, foram registradas pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC). A PAM e a FC foram calculadas pelo *software* a partir dos valores de PAP.

3.6.3. Avaliação do efeito do veneno bruto sobre os parâmetros cardiovasculares em ratos anestesiados

Após estabilização dos parâmetros cardiovasculares, o veneno bruto era injetado no animal através da cânula venosa previamente implantada. Diferentes doses do veneno (2, 5, 10, 15 e 20 µg) foram administradas em animais diferentes. O mesmo volume de solução fisiológica de salina era injetado anteriormente ao veneno como controle negativo.

A fim de investigar o mecanismo envolvido no efeito do veneno bruto sobre os parâmetros cardiovasculares no animal anestesiado, a dose de 2 µg do veneno foi injetada através da cânula venosa antes e 30 minutos após a administração de 2 mg/kg de indometacina (inibidor não seletivo das COX), por via intraperitoneal, ou 15 minutos após a administração endovenosa de 10 mg/kg de L-NAME (inibidor não seletivo das NOS) ou 1 mg/kg de atropina (antagonista não seletivo de receptores muscarínicos). Antes do teste do veneno bruto, respostas controle de carbacol (1 µg/kg) foram obtidas para confirmar a ação da atropina. Para cada protocolo experimental foram utilizados pelo menos quatro animais.

3.7. Procedimentos experimentais em vaso isolado

3.7.1. Preparação e montagem dos anéis de aorta de rato

Os animais foram sacrificados por decapitação e exsanguinação. Os anéis de aorta foram montados conforme descrito por Lemos *et al.* (1999).

Após o sacrifício dos animais, a aorta torácica foi cuidadosamente removida, isolada de tecido adiposo e de tecido conjuntivo e transferida para uma placa de Petri contendo solução de Krebs-Henseleit (mM): NaCl 110,8;

KCl 5,9; NaHCO₃ 25,0; MgSO₄ 1,07; CaCl₂ 2,49; KH₂PO₄ 2,33 e glicose 11,51. Em seguida, a aorta foi cortada em anéis de aproximadamente 3-4 mm de comprimento. Quando necessário, o endotélio vascular era removido mecanicamente através de fricção direta das células endoteliais contra uma haste metálica transpassada pelo lúmen arterial. Hastes metálicas triangulares foram passadas através do lúmen de cada anel e essas hastes foram acopladas a transdutores isométricos. A preparação ficou suspensa em cubas de vidro com capacidade para 10 mL e mantida em solução de Krebs-Henseleit aerada com carbogênio (95% O₂ e 5% de CO₂), a 37°C (Figura 5). Os vasos foram mantidos a uma tensão de 1g, que foi regulada durante a primeira hora do experimento para estabilização da preparação. Durante a estabilização, a solução contida nas cubas foi trocada a cada 15 minutos, a fim de evitar o acúmulo de produtos do metabolismo dos vasos. Após o período de estabilização, os vasos foram contraídos com fenilefrina (0,3 µM) e, uma vez que a contração atingiu um platô, a presença de endotélio funcional foi confirmada com a administração de acetilcolina (10 µM). Apenas os anéis de aorta que apresentavam relaxamento superior a 60% em relação à contração máxima induzida pela fenilefrina eram utilizados em protocolos experimentais que necessitavam de vasos com endotélio funcional. Quando o endotélio dos vasos era retirado mecanicamente, a retirada era confirmada pela ausência de efeito relaxante em resposta à administração de acetilcolina. Após o teste de reatividade vascular, os anéis de aorta foram lavados e seguiu-se outro período de estabilização de 30 minutos antes do início dos protocolos experimentais, com troca da solução de Krebs-Henseleit a cada 15 minutos.

As respostas foram registradas utilizando-se transdutores de tensão isométrica (World Precision Instruments, Inc., Sarasota, FL, USA) conectados a um amplificador (TBM-4; World Precision Instruments, Inc.) e a um computador equipado com placa conversora analógico/digital (AD16JR; World Precision Instruments, Inc.). O programa Windaq (DATAQ Instruments, Inc., USA) foi usado para aquisição de dados.

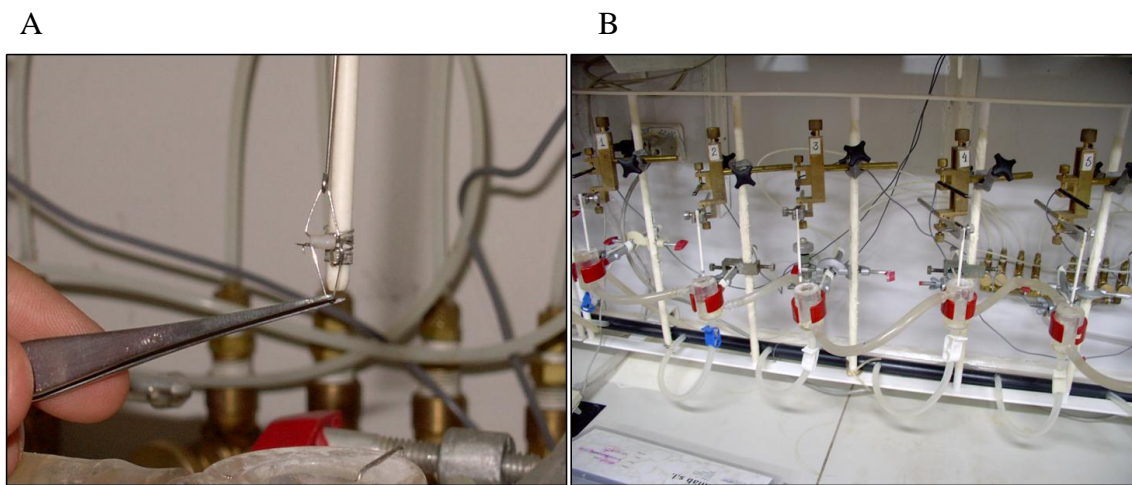


Figura 5: (A) Conexão do anel de aorta às hastes metálicas e o acoplamento dessas a transdutores isométricos. (B) Sistema de banho de órgãos utilizado para experimentos de reatividade vascular no Laboratório de Fisiologia Cardiovascular do ICB.

3.7.2. Avaliação da reatividade vascular do veneno bruto e de frações do veneno da aranha *Lasiodora* sp.

Após o teste de funcionalidade do endotélio e período de estabilização, os vasos foram pré-contraídos com fenilefrina ($0,1 \mu\text{M}$) e, durante a fase tônica da contração, foram construídas curvas concentração-resposta cumulativas com o veneno bruto ($0,06$ a $32 \mu\text{g/mL}$) (Figura 6), F4 ($0,12$ a $64 \mu\text{g/mL}$), F5

(0,12 a 16 $\mu\text{g/mL}$) e F10 (0,25 a 16 $\mu\text{g/mL}$). As frações utilizadas foram as que apresentaram maior quantidade protéica.

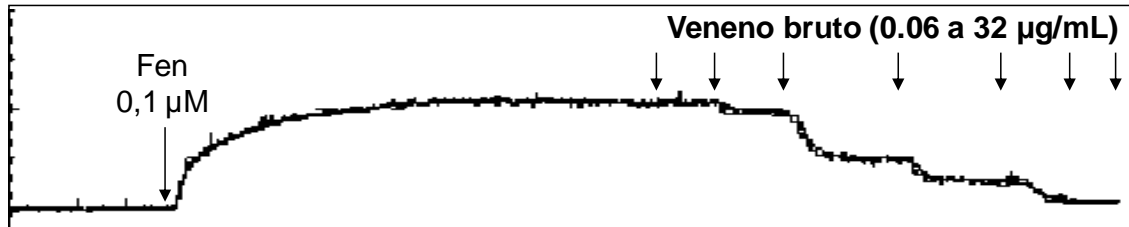


Figura 6: Esquema representativo da curva de relaxamento concentração-resposta cumulativa induzida pelo veneno bruto da aranha *Lasiodora* sp. em vasos pré-contraídos com fenilefrina (Fen).

3.7.3. Avaliação da participação do endotélio no efeito vasodilatador do veneno bruto em anéis de aorta de rato

Após a obtenção da curva concentração-resposta do veneno bruto, a concentração que promove 50% de redução da contração máxima induzida pela fenilefrina (EC_{50}) foi calculada e utilizada nos protocolos seguintes.

Para avaliar o papel do endotélio no efeito vasodilatador do veneno bruto, esse foi administrado na concentração de 8 $\mu\text{g/mL}$ (EC_{50}) em vasos desprovidos de endotélio funcional e pré-contraídos com fenilefrina 0,1 μM . Os resultados foram comparados com os obtidos após administração da mesma concentração de veneno em vasos com endotélio funcional pré-contraídos com fenilefrina 0,1 μM .

Para verificar a participação de mediadores endoteliais como NO e PGI_2 na resposta vasodilatadora promovida pelo veneno bruto, vasos contendo endotélio funcional foram pré-incubados por 30 minutos com 300 μM de L-NAME, inibidor não seletivo das NOS, ou com 10 μM de indometacina, inibidor

não seletivo das COX. Após esse período, os vasos foram contraídos com fenilefrina (0,1 μM) e o veneno bruto em concentração única (8 $\mu\text{g/mL}$) foi adicionado à cuba. Os resultados foram comparados ao efeito do veneno bruto obtido em outro anel de aorta do mesmo animal, em condições controle.

Com a finalidade de investigar uma possível ação do veneno bruto em receptores presentes na membrana das células endoteliais, vasos com endotélio funcional foram incubados por 30 minutos com 1 μM de atropina (antagonista não seletivo de receptores muscarínicos), 1 μM de pirilamina (antagonista do receptor histaminérgico H1), 1 μM de HOE 140 (antagonista do receptor B2) ou 100 μM de suramina (antagonista de receptores purinérgicos P2). Os anéis de aorta foram então contraídos com fenilefrina (0,1 μM) e o veneno bruto foi adicionado em concentração única (8 $\mu\text{g/mL}$). Os resultados foram comparados ao efeito do veneno bruto, em condições controle, obtido em outro anel de aorta do mesmo animal.

3.7.4. Avaliação da participação de canais para cálcio no efeito vasodilatador do veneno bruto em anéis de aorta de rato

A fim de investigar a possibilidade de o veneno bruto agir em canais para cálcio do tipo L nas células musculares lisas, esse foi administrado na concentração de 8 $\mu\text{g/mL}$ (EC_{50}) em vasos contendo endotélio funcional pré-contraídos com solução de Krebs-Henseleit com concentração de KCl de 50 mM. Os resultados foram comparados com os obtidos após administração de nifedipina 10^{-6} M, um bloqueador de canais para cálcio do tipo L, em anéis de aorta contraídos nas mesmas condições.

3.7.5. Avaliação do efeito do veneno bruto no relaxamento induzido por doadores de NO em anéis de aorta de rato

Para verificar uma possível ação do veneno de proteção da degradação do NO, curvas concentração-resposta cumulativas de diferentes doadores de NO foram feitas em anéis de aorta, sem endotélio funcional, pré-contraídos com fenilefrina (0,1 μM) e pré-incubados por 5 minutos com veneno bruto na concentração submáxima de 16 $\mu\text{g/mL}$. Os doadores de NO utilizados foram o nitroprussiato de sódio (0,0001 a 3 μM), o SIN-1 (0,0001 a 10 μM) e o SNAP (0,001 a 10 μM). Os resultados foram comparados ao efeito de cada droga na ausência de veneno bruto em outro anel de aorta do mesmo animal.

3.7.6. Verificação da ativação da eNOS pelo veneno bruto em anéis de aorta de rato

Os protocolos descritos a seguir foram realizados para investigar se o veneno bruto regula diferentemente a fosforilação da eNOS nos sítios Ser1177 (sítio de ativação) e Thr495 (sítio de inativação).

3.7.6.1. Estimulação dos anéis de aorta

Após sacrifício dos animais, a aorta torácica foi removida e dividida em anéis. Os anéis de aorta foram distribuídos em 8 poços de placa de cultura contendo 1 mL de solução de Krebs-Henseleit. Em cada poço foi feito um *pool* de anéis de aorta de quatro animais. A placa foi mantida a 37°C em incubadora com atmosfera umedecida a 95% O₂ e 5% CO₂.

Antes de iniciar os protocolos, houve um período de estabilização de 30 minutos em que o meio de incubação foi trocado a cada 15 minutos. Após esse

tempo de estabilização, os anéis de aorta foram incubados com concentrações submáximas de acetilcolina (0,1 μM) ou de veneno bruto (16 $\mu\text{g/mL}$). A acetilcolina foi utilizada como controle positivo. Havia quatro poços da placa para cada composto estimulador, acetilcolina ou veneno. No tempo zero de estimulação, os anéis de aorta do primeiro poço de cada estimulador eram retirados. Após 5 minutos da estimulação, os anéis presentes no segundo poço também eram retirados. Os anéis do terceiro poço foram retirados no tempo de 15 minutos de estimulação e os anéis do quarto poço no tempo de 30 minutos. A cada retirada, os vasos eram imediatamente transferidos a tubos de 1,5 mL e congelados em nitrogênio líquido.

3.7.6.2. Extração de proteínas

Os tecidos previamente congelados em nitrogênio líquido foram homogeneizados em homogeneizador de tecidos tipo turrax (Marconi, Brasil), em presença de tampão de lise (Gyorke, em mM: NaCl 150; Tris-base 50; EDTA.2Na 5; MgCl_2 1; pH8) acrescido de 1% de nonidet-P40; 0,3% de Triton X-100; 0,5% de SDS e um coquetel de inibidores de proteases (AEBSF 2 mM + EDTA 1 mM + bestatina 130 μM + E64 14 μM + leupeptina 1 μM + aprotinina 0,3 μM ; SigmaFast, Sigma). Um inibidor de fosfatase (NaF, 20 mM) foi usado para a determinação das proteínas fosforiladas. Utilizou-se a proporção de 25 mg de tecido para 100 μL de tampão de lise enriquecido. Após o processamento, as amostras foram centrifugadas a 3580 G por 10 minutos. O sobrenadante foi aliqotado e congelado a -70°C para uso posterior. A quantidade de proteínas das amostras foi mensurada de acordo com o método descrito por Lowry *et al.* (1951).

3.7.6.3. Separação eletroforética em gel de acrilamida

As amostras foram diluídas em tampão de amostra (Tris-HCl/SDS 4X pH 6,8; 3% glicerol; 1% SDS; 0,6% β -mercaptoetanol; 2% azul de bromofenol) e fervidas durante 5 minutos antes da aplicação no gel. Para separação, foram aplicados 60 μ g de proteína em gel de SDS-PAGE.

O gel de separação era constituído de 10% (v/v) de uma solução de acrilamida/bisacrilamida 29:1 (p/p); Tris-HCl 0,4 M pH 8,8; SDS 0,1% (p/v); 50 mM de persulfato de amônia (PSA) e 0,2% (v/v) de TEMED. O gel de concentração era constituído de 4% (v/v) de uma solução de acrilamida/bisacrilamida 29:1 (p/p); Tris-HCl 0,125 M pH 6,8; SDS 0,1% (p/v); 50 mM de PSA e 0,2% (v/v) de TEMED.

A eletroforese foi desenvolvida verticalmente durante 90 minutos a 110 V e 60 mA. O tampão de corrida era composto de 0,3% de Tris; 1,45% de glicina e 0,1% de SDS em água. Após a eletroforese, os géis foram utilizados na execução do Western Blot.

3.7.6.4. Western blot

Após serem separadas em gel, as proteínas foram transferidas para uma membrana de PVDF (Millipore, USA) com poro de 0,45 μ m, a 110 V e 450 mA por 3 horas. O tampão de transferência era composto de 0,3% de Tris; 1,45% de glicina e 20% de metanol em água.

A qualidade da transferência foi monitorada através da coloração da membrana com solução de Ponceau 0,3% em ácido acético. A membrana foi então lavada em água destilada e colocada por 1 hora em solução de bloqueio (TBS-Tween 0,1% com 2,5% de leite em pó desnatado). Após o bloqueio, a

membrana foi incubada, *overnight* ou por 3 horas em câmara fria (6-8°C), com o anticorpo primário específico diluído em TBS-Tween 0,1%. Os seguintes anticorpos primários foram utilizados: anti-p-eNOS Ser1177 (1:1000), anti-p-eNOS Thr495 (1:1000) (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA) e anti-GAPDH (1:3000, Sigma, St.Louis, MO, USA). A marcação do GAPDH foi realizada para controle da viabilidade das amostras.

Em seguida, a membrana foi submetida a três lavagens de 5 minutos com TBS contendo 0,3% de Tween 20 (TBS-T) e incubada por 2 horas, à temperatura ambiente, com o anticorpo secundário conjugado à peroxidase (HRP) (1:2000, anti-goat IgG-HRP e anti-rabbit IgG-HRP, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA). Após o período de incubação, a membrana foi novamente lavada em TBS-T (5 minutos por três vezes). A reação foi revelada pela adição do substrato da peroxidase, contendo solução 1:9 de 4-cloronaftol 5 mg/mL em metanol para 1,1 mg/mL de diaminobenzidina (DAB) em PBS 1X acrescida de 0,083% de H₂O₂ 30%. A intensidade das bandas foi avaliada por análise densitométrica através do *software* ImageQuant™.

Foram utilizados os sistemas Mini Protean III-Tetracell e Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell, ambos da BIO-RAD (CA, USA).

3.7.7. Verificação da participação da via PI3K/Akt na ativação da eNOS pelo veneno bruto em anéis de aorta de rato

Para investigar se a ativação da eNOS pelo veneno bruto ocorre por fosforilação mediada pela via PI3K/Akt, anéis de aorta com endotélio funcional foram pré-incubados por 30 minutos com 20 µM de LY 294002, inibidor seletivo

da PI3K. Após esse período, os vasos foram contraídos com fenilefrina (0,1 μ M) e o veneno bruto (8 μ g/mL) foi adicionado à cuba. Os resultados foram comparados ao efeito do veneno bruto, em condições controle, obtido em outro anel de aorta do mesmo animal.

3.7.8. Análise estatística

Todos os parâmetros avaliados foram representados como média \pm erro padrão da média (EPM).

Os resultados dos protocolos em animal anestesiado foram expressos como variação da pressão arterial média e da frequência cardíaca. Os resultados dos protocolos em vaso isolado foram expressos como diminuição percentual da contração máxima induzida por fenilefrina ou por solução com KCl 50 mM, sendo que o ponto onde a linha basal era alcançada foi considerado como 100%. Valores de EC_{50} foram calculados graficamente a partir das curvas concentração-resposta por regressão não-linear. Os valores de efeito máximo (E_{max}) foram estimados graficamente. Já os dados de Western Blot foram expressos como índice p-eNOS Ser1177 ou Thr495/GAPDH, em unidades arbitrárias.

Para a comparação das médias entre os grupos foram utilizados o teste t de Student e o teste ANOVA *One-way* seguido de Newman-Keuls. O teste ANOVA *Two-way*, seguido do teste de Bonferroni, foi utilizado para a comparação entre as médias de valores distintos de um grupo e as médias de valores de um segundo grupo. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Os cálculos e análises estatísticas foram realizados utilizando-se o programa Graph Pad Prism 4.0.

Resultados

4. RESULTADOS

4.1. Fracionamento do veneno bruto da aranha *Lasiodora* sp.

O fracionamento do veneno bruto em sistema HPLC utilizando coluna preparativa C4 resultou em 20 frações, que foram reunidas em 12, denominadas F1 a F12. A figura 7 mostra o perfil cromatográfico do veneno bruto, destacando as frações obtidas.

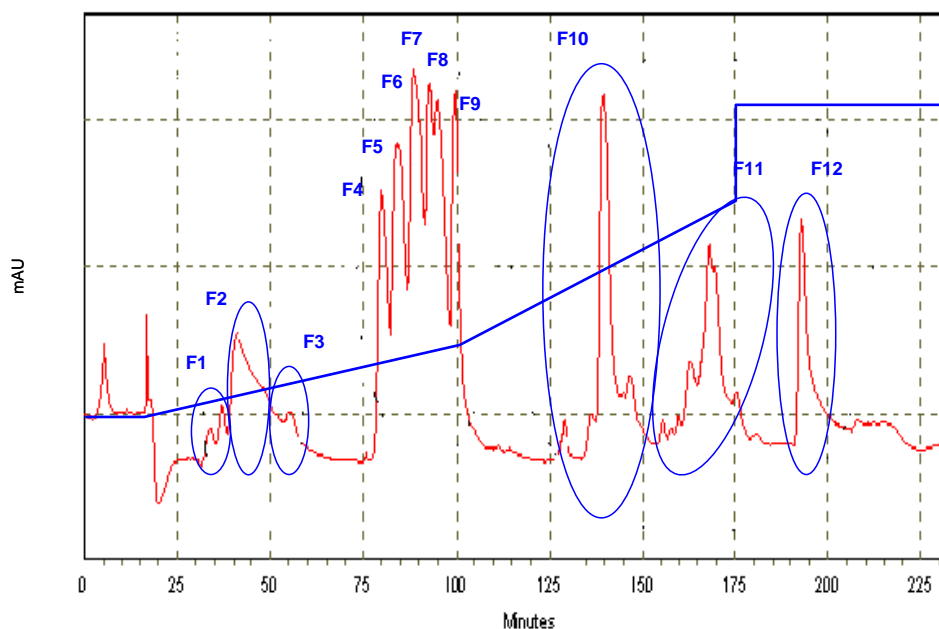


Figura 7: Perfil cromatográfico do veneno bruto da aranha *Lasiodora* sp. em coluna preparativa C4. O veneno (10 mg) foi diluído em 1 mL de ácido trifluoracético (TFA) 0,1% em água e aplicado na coluna previamente equilibrada com o mesmo solvente. A fase móvel consistiu em TFA 0,1% em acetonitrila (ACN). O gradiente utilizado foi por etapas (*stepwise*), sendo que de 20 a 100 minutos foi de 0 a 25% de ACN e de 100 a 175 minutos foi de 25 a 70% de ACN. Seguiu-se lavagem com TFA 0,1% em ACN por um período de 55 minutos. O fluxo foi de 1 mL por minuto. As amostras foram monitoradas em absorbância de 241 nm. Em destaque, as 12 frações (F1 a F12) obtidas pela cromatografia líquida.

4.2. Procedimentos experimentais no animal anestesiado

4.2.1. Efeito do veneno bruto sobre os parâmetros cardiovasculares em ratos anestesiados

O veneno bruto da aranha *Lasiadora* sp. induziu hipotensão e bradicardia agudas quando administrado por via endovenosa em ratos normotensos anestesiados.

A figura 8 corresponde a um traçado representativo de um animal estudado, mostrando as alterações da pressão arterial pulsátil (PAP, mmHg) e da frequência cardíaca (FC, bpm) em resposta à administração endovenosa de veneno bruto.

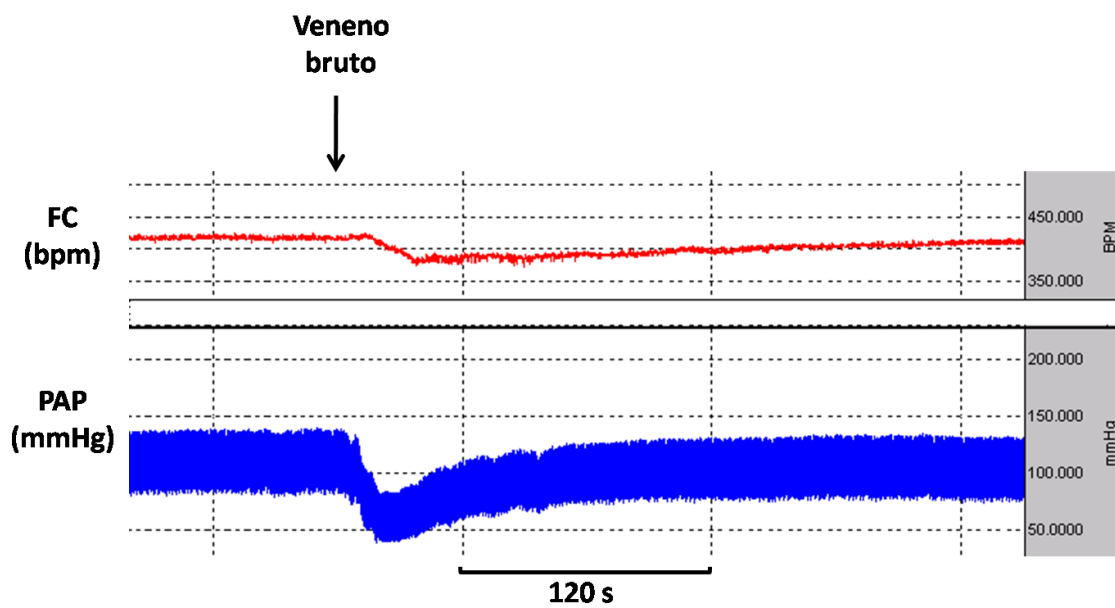


Figura 8: Traçado representativo de um rato mostrando as alterações na frequência cardíaca (FC, bpm) e na pressão arterial pulsátil (PAP, mmHg) em resposta à injeção endovenosa do veneno bruto (5 µg) da aranha *Lasiadora* sp.

A figura 9 mostra as variações de pressão arterial média (Δ PAM, mmHg) e de frequência cardíaca (Δ FC, bpm) obtidas a partir da administração endovenosa de diferentes doses de veneno bruto (2, 5, 10, 15 e 20 μ g) no animal anestesiado. Os valores representam as alterações médias máximas observadas com a administração do veneno. O veneno promoveu hipotensão e bradicardia. A administração prévia de salina realizada como controle não alterou de forma significativa os parâmetros avaliados. A dose de 10 μ g promoveu o efeito máximo.

A tabela 2 contém os valores médios de PAM e de FC antes e após a administração de diferentes doses do veneno bruto, bem como a variação desses valores. Vale ressaltar que não há diferença estatística entre os valores médios basais de cada grupo experimental.

Tanto a bradicardia quanto a hipotensão causadas pela administração do veneno bruto em ratos anestesiados são transitórias e dentro de alguns minutos os parâmetros avaliados retornam aos níveis basais. A figura 10 indica os valores de PAM (mmHg) e a variação de FC (bpm), em relação ao tempo (segundos), após administração endovenosa do veneno bruto (no tempo 0) nas doses de 2, 5, 10, 15 e 20 μ g em ratos anestesiados. O gráfico permite visualizar os efeitos hipotensor e bradicárdico agudos do veneno. Tanto a PAM quanto a FC retornam aos valores basais. O efeito bradicárdico é mais prolongado que a hipotensão.

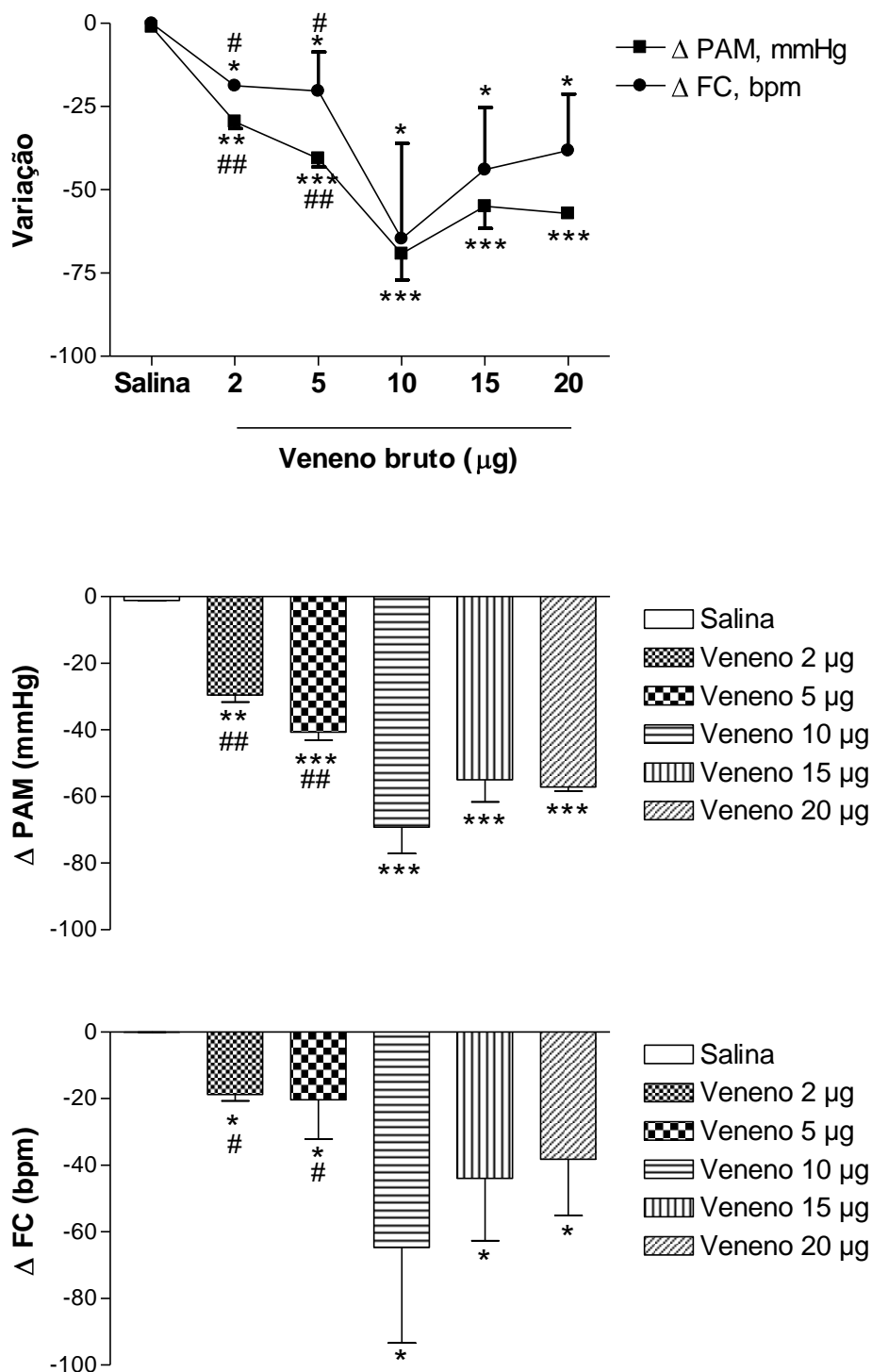


Figura 9: Variações na pressão arterial média (Δ PAM, mmHg) e na frequência cardíaca (Δ FC, bpm) produzidas pela injeção endovenosa de diferentes doses do veneno bruto da aranha *Lasiodora* sp. em ratos anestesiados. Os valores representam a alteração média máxima \pm EPM de quatro experimentos. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ comparado ao controle (salina). # $P < 0,05$; ## $P < 0,01$ comparado a 10 μ g (Teste ANOVA *One-way* seguido de Newman-Keuls).

Tabela 2: Valores de pressão arterial média (PAM, mmHg) e de frequência cardíaca (FC, bpm) antes e após a administração de veneno bruto em diferentes doses, bem como a variação desses parâmetros

Veneno	PAM, mmHg			FC, bpm			
	Dose (μg)	Antes	Após	ΔPAM	Antes	Após	ΔFC
2		104,6 \pm	75,0 \pm	-29,5 \pm	405,3 \pm	386,5 \pm	-18,8 \pm
		2,1	4,1	2,0	14,5	14,4	1,9
5		111,1 \pm	70,4 \pm	-40,6 \pm	441,9 \pm	421,6 \pm	-20,3 \pm
		6,1	4,8	2,4	11,6	23,3	11,7
10		110,9 \pm	41,6 \pm	-69,2 \pm	432,8 \pm	368,0 \pm	-64,7 \pm
		6,4	1,6	7,9	24,3	46,7	28,6
15		99,8 \pm	44,8 \pm	-55,0 \pm	323,8 \pm	279,8 \pm	-43,9 \pm
		7,0	3,0	6,6	17,2	20,5	18,6
20		103,2 \pm	46,0 \pm	-57,1 \pm	436,7 \pm	398,5 \pm	38,2 \pm
		3,1	2,8	1,2	21,8	15,3	16,9

Nota: Os valores representam a média \pm EPM.

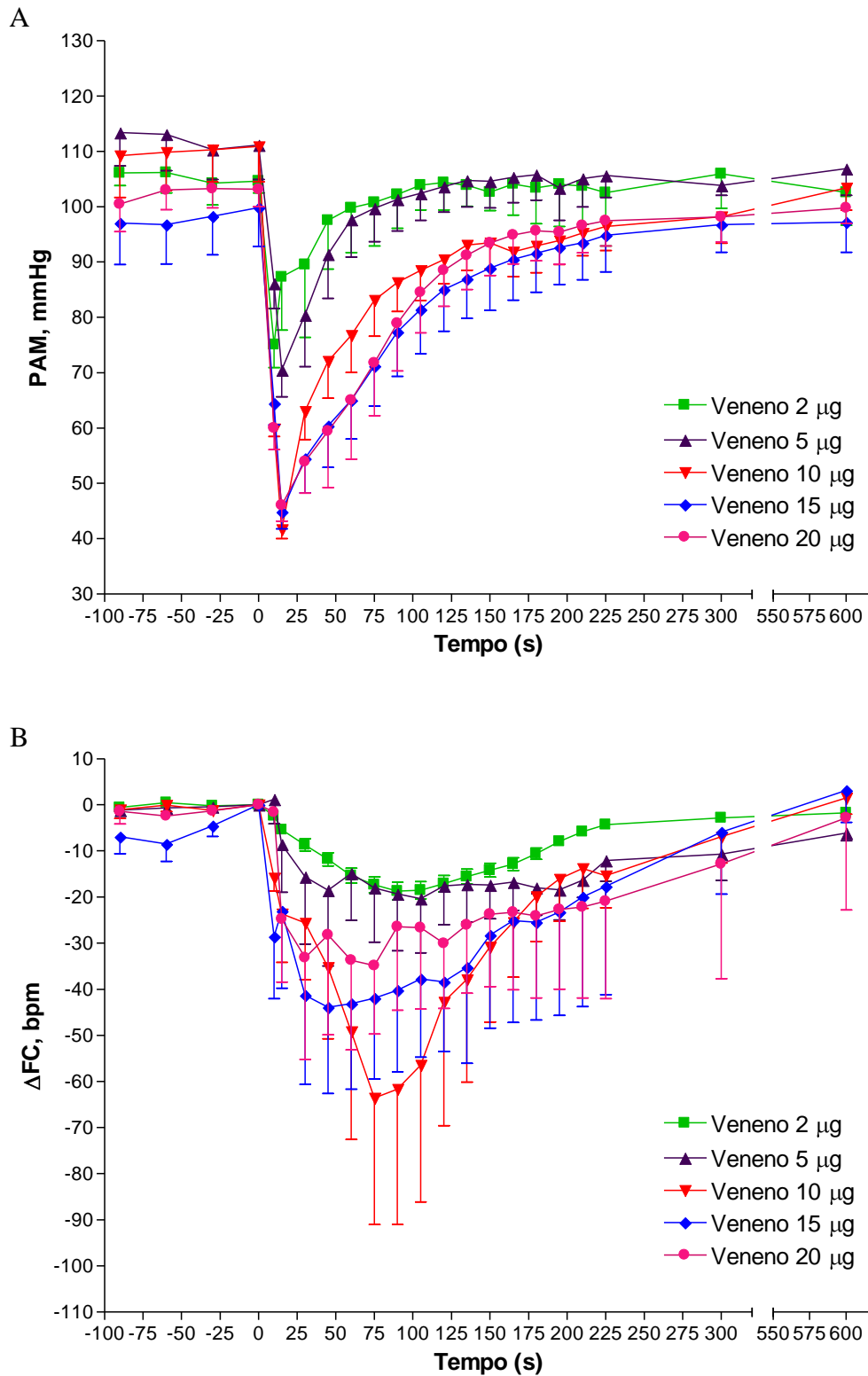


Figura 10: Valores de pressão arterial média (PAM, mmHg) (A) e variação de frequência cardíaca (ΔFC , bpm) (B) em relação ao tempo (segundos) após administração endovenosa (no tempo 0) do veneno bruto da aranha *Lasiodora* sp. (2, 5, 10, 15 e 20 μg) em ratos anestesiados. Cada ponto representa a média \pm EPM de quatro experimentos.

Para investigar o mecanismo envolvido no efeito do veneno bruto sobre os parâmetros cardiovasculares no animal anestesiado, a dose de 2 μ g do veneno foi injetada através da cânula venosa antes e após a administração de 2 mg/kg de indometacina por via intraperitoneal, 10 mg/kg de L-NAME por via endovenosa ou 1 mg/kg de atropina por via endovenosa.

A administração de indometacina não alterou os parâmetros avaliados, indicando que não há participação de produtos da ação das COX sobre os efeitos do veneno observados (Figura 11A).

No entanto, o L-NAME foi capaz de inibir de forma significativa a hipotensão provocada pela administração do veneno. A mesma droga não alterou a bradicardia causada pela injeção do veneno (Figura 11B). Esses dados sugerem uma participação do NO no efeito hipotensor provocado pelo veneno bruto da aranha *Lasiodora* sp. em ratos anestesiados.

Já a administração de atropina inibiu significativamente a hipotensão e a bradicardia induzidas pelo veneno bruto nos ratos anestesiados. Os resultados indicam que há participação de receptores muscarínicos ou do sistema nervoso parassimpático nos efeitos inibitórios do veneno sobre os parâmetros cardiovasculares (Figura 11C). Vale ressaltar que a dose de atropina utilizada foi capaz de anular os efeitos do carbacol (1 μ g/kg) sobre PAM e FC (dados não mostrados).

A tabela 3 contém os valores médios máximos das variações absoluta e percentual de PAM e de FC após a administração de 2 μ g do veneno bruto em diferentes condições experimentais, utilizadas para investigar os mecanismos envolvidos nos efeitos hipotensor e bradicárdico do veneno. Os valores médios

basais de PAM e de FC, registrados após a administração de cada droga e antes da administração do veneno bruto, também são mostrados na tabela.

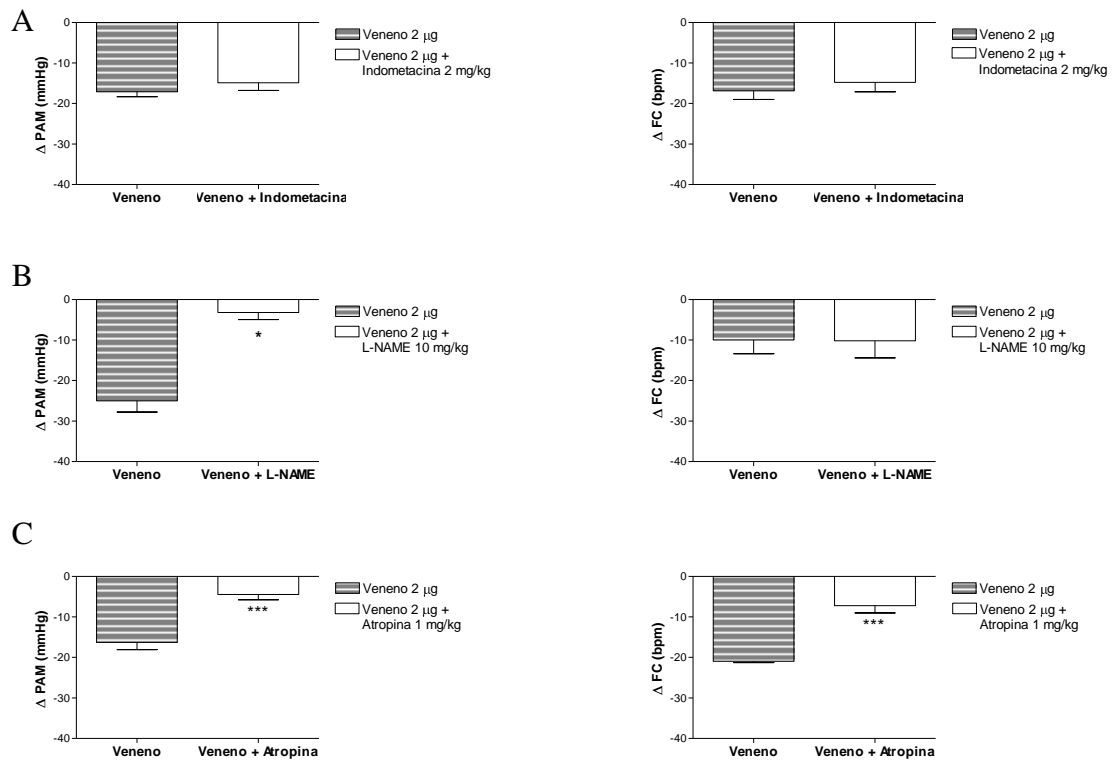


Figura 11: Efeito induzido pela injeção endovenosa do veneno bruto da aranha *Lasiodora* sp. (2 μ g) em ratos anestesiados, antes e após a administração de indometacina 2 mg/kg via intraperitoneal (A), L-NAME 10 mg/kg via endovenosa (B) ou atropina 1 mg/kg via endovenosa (C). Os valores representam a média \pm EPM de pelo menos quatro experimentos. *P<0,05; ***P<0,001 (Teste t de Student).

Tabela 3: Valores basais de pressão arterial média (PAM, mmHg) e de frequência cardíaca (FC, bpm), bem como variação de PAM (Δ PAM) e de FC (Δ FC), em valores absolutos e relativos (%), após a administração de 2 μ g de veneno bruto sob diferentes condições experimentais

Condição experimental	PAM, mmHg			FC, bpm		
	Valor basal	Δ PAM (mmHg)	Δ PAM (%)	Valor basal	Δ FC (bpm)	Δ FC (%)
Veneno bruto sem indometacina controle	100,2 \pm 3,7	-17,1 \pm 1,2	-16,8 \pm 2,1	365,3 \pm 18,4	-11,3 \pm 5,4	-4,6 \pm 0,6
Veneno bruto + indometacina	100,5 \pm 3,4	-14,8 \pm 1,9	-14,8 \pm 2,3	372,2 \pm 18,7	-13,4 \pm 6,0	-4,1 \pm 0,8
Veneno bruto sem L-NAME controle	107,3 \pm 4,1	-24,9 \pm 2,7	-23,2 \pm 2,3	416,3 \pm 19,0	-9,9 \pm 3,4	-2,5 \pm 0,9
Veneno bruto + L-NAME	136,8 \pm 7,1	-3,2 \pm 1,7*	-2,3 \pm 1,3*	428,7 \pm 17,2	-10,1 \pm 4,2	-2,4 \pm 1,0
Veneno bruto sem atropina controle	102,2 \pm 5,0	-16,3 \pm 1,8	-16,4 \pm 2,2	401,9 \pm 17,5	-20,9 \pm 0,3	-5,1 \pm 0,3
Veneno bruto + atropina	121,7 \pm 3,8	-4,4 \pm 1,3***	-3,6 \pm 1,0***	540,5 \pm 23,8	-7,2 \pm 1,8***	-1,3 \pm 0,3***

Notas: Os valores representam a média \pm EPM

*P<0,05; ***P<0,001 comparado ao controle (Teste t de Student).

4.3. Procedimentos experimentais em vaso isolado

4.3.1. Reatividade vascular do veneno bruto e de frações do veneno da aranha *Lasiodora* sp.

A figura 12A aponta o efeito relaxante induzido pelo veneno bruto (0,06 a 32 μ g/mL) em anéis de aorta de rato, contendo endotélio funcional, pré-contraídos com fenilefrina. O veneno bruto induziu um relaxamento concentração-dependente.

As figuras 12B e 12C mostram os efeitos relaxantes concentração-dependentes induzidos pelas frações F4 (0,12 a 64 μ g/mL) e F5 (0,12 a 16

$\mu\text{g/mL}$), respectivamente, em anéis de aorta de rato com endotélio funcional pré-contraídos com fenilefrina. A figura 12D indica que, ao contrário das frações F4 e F5, a fração F10 do veneno da aranha não induziu efeito relaxante significativo em anéis de aorta de rato, sob as mesmas condições.

A tabela 4 contém os valores médios de EC_{50} e E_{max} obtidos nas curvas concentração-resposta cumulativas para veneno bruto e frações. A fração F5 é pelo menos três vezes mais potente que o veneno bruto e sete vezes mais potente que a fração F4.

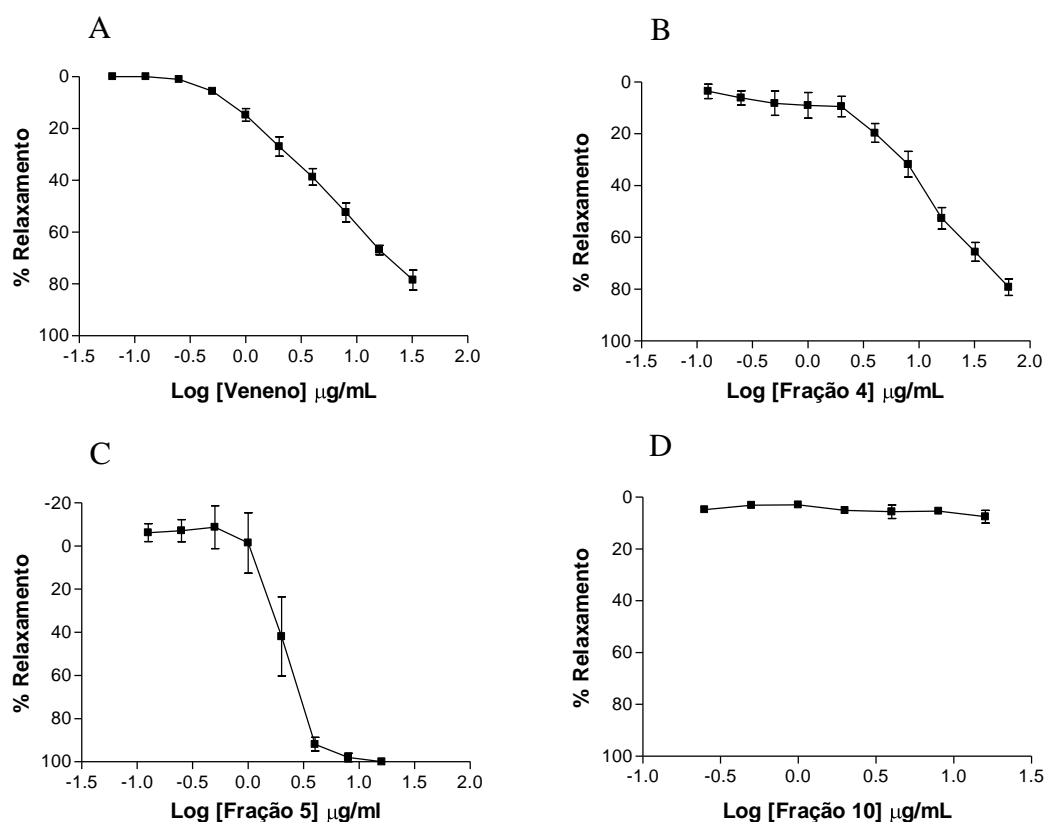


Figura 12: Efeito relaxante induzido pelo veneno bruto da aranha *Lasiodora* sp. (A) e pelas frações do veneno F4 (B), F5 (C) e F10 (D) em anéis de aorta de rato contendo endotélio funcional. Cada ponto representa a média \pm EPM de pelo menos quatro experimentos.

Tabela 4: Valores de EC₅₀ e E_{max} para veneno bruto e frações F4, F5 e F10

	EC ₅₀ (µg/mL)	E _{max} (% relaxamento)
Veneno bruto	7,1 ± 0,6	98,6 ± 0,4 [†]
F4	16,1 ± 2,8	97,3 ± 1,5 [†]
F5	2,0 ± 0,4	98,7 ± 0,9
F10	---	---

Nota: Os valores representam a média ± EPM

[†]Valores estimados graficamente

--- Valor indeterminado.

4.3.2. Participação do endotélio no efeito vasodilatador do veneno bruto em anéis de aorta de rato

Para avaliar o papel do endotélio no efeito vasodilatador do veneno bruto, esse foi administrado em concentração única em vasos com ou sem endotélio funcional.

A figura 13 aponta o efeito relaxante do veneno bruto na concentração de 8 µg/mL (EC₅₀) em anéis de aorta de rato, contendo ou não endotélio funcional, pré-contraídos com fenilefrina. O efeito vasodilatador do veneno foi abolido nos anéis desprovidos de endotélio funcional, indicando que o endotélio possui papel fundamental no efeito vasodilatador do veneno bruto em anéis de aorta de rato.

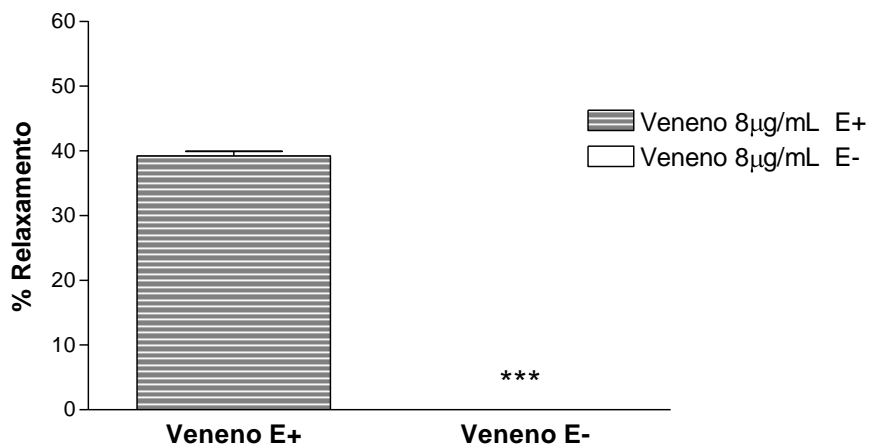


Figura 13: Efeito relaxante induzido pelo veneno bruto da aranha *Lasiodora* sp. (8 µg/mL) em anéis de aorta de rato contendo (E+) ou não (E-) endotélio funcional. Os valores representam a média ± EPM de quatro experimentos. ***P<0,001 (Teste t de Student).

A fim de verificar a participação de mediadores endoteliais como PGI₂ e NO na resposta vasodilatadora promovida pelo veneno bruto, esse foi administrado na concentração de 8 µg/mL em vasos contendo endotélio funcional, pré-incubados ou não com indometacina ou L-NAME.

A figura 14 mostra o efeito relaxante do veneno bruto em anéis de aorta de rato contendo endotélio funcional pré-contraídos com fenilefrina, na presença e na ausência de indometacina 10 µM (A) ou L-NAME 300 mM (B). A inibição das COX pela indometacina não causou modificação da resposta vasodilatadora promovida pelo veneno, excluindo a participação da PGI₂ nessa resposta. No entanto, a inibição das NOS pelo L-NAME aboliu a resposta relaxante do veneno, indicando que o NO é o mediador endotelial envolvido no efeito vasodilatador do veneno bruto da aranha *Lasiodora* sp. em anéis de aorta de rato.

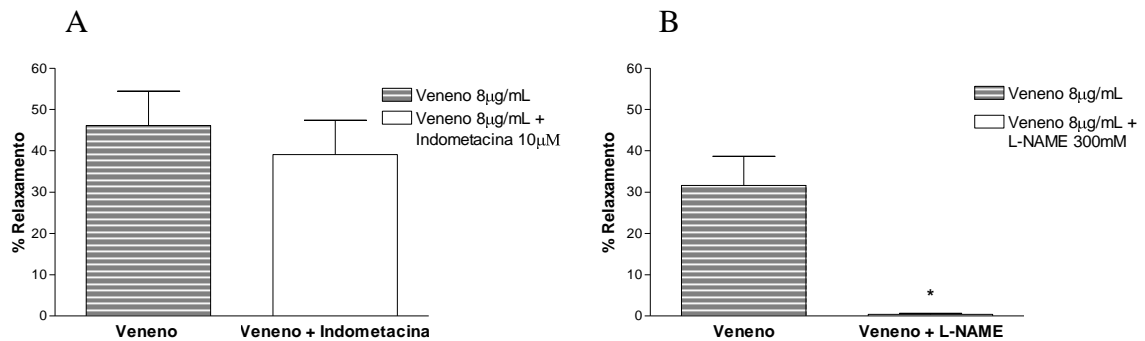


Figura 14: Efeito relaxante induzido pelo veneno bruto da aranha *Lasiadora* sp. (8 µg/mL) em anéis de aorta de rato, contendo endotélio funcional, na presença e na ausência de indometacina 10 µM (A) ou L-NAME 300mM (B). Os valores representam a média ± EPM de quatro experimentos. *P<0,05 (Teste t de Student).

Para investigar uma possível ação do veneno bruto em receptores presentes na membrana das células endoteliais, o veneno foi administrado na concentração de 8 µg/mL em vasos contendo endotélio funcional, pré-incubados ou não com diversos antagonistas de receptores.

A figura 15 indica o efeito relaxante do veneno bruto na concentração de 8 µg/mL (EC_{50}) em anéis de aorta de rato contendo endotélio funcional pré-contraídos com fenilefrina, na presença e na ausência de atropina 1 µM (A), pirilamina 1 µM (B), HOE 140 1 µM (C) e suramina 100 µM (D). Nenhuma droga inibiu de forma significativa o efeito vasodilatador do veneno bruto, demonstrando que o veneno não age nos receptores muscarínicos, histaminérgicos H1, B2 da bradiginina ou purinérgicos P2, respectivamente.

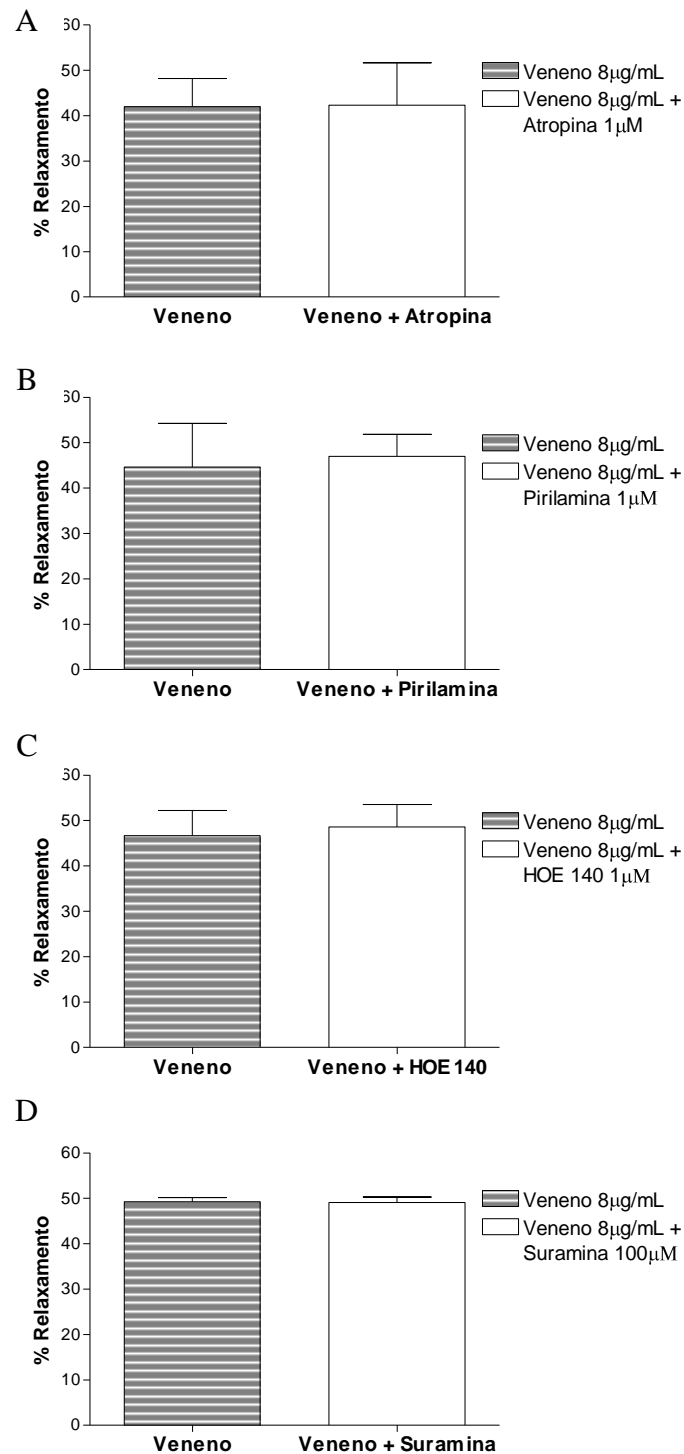


Figura 15: Efeito relaxante induzido pelo veneno bruto da aranha *Lasiodora* sp. (8 µg/mL) em anéis de aorta de rato, contendo endotélio funcional, na presença e na ausência de atropina 1 µM (A), pirilamina 1 µM (B), HOE 140 1 µM (C) e suramina 100 µM (D). Os valores representam a média ± EPM de quatro experimentos.

A tabela 5 contém os valores médios de percentagem de relaxamento dos anéis de aorta de rato após a administração do veneno bruto (8 µg/mL), em diferentes condições experimentais, utilizadas para avaliar o papel do endotélio vascular no efeito vasodilatador do veneno.

Tabela 5: Valores de % de relaxamento para o veneno bruto (8 µg/mL) em anéis de aorta de rato, sob diferentes condições experimentais

Condição experimental	Efeito (% relaxamento)
Veneno bruto controle E+	39,19 ± 0,72
Veneno bruto E-	0,56 ± 0,45***
Veneno bruto controle sem indometacina (E+)	46,11 ± 8,33
Veneno bruto + indometacina (E+)	39,07 ± 8,30
Veneno bruto controle sem L-NAME (E+)	31,63 ± 6,99
Veneno bruto + L-NAME (E+)	0,41 ± 0,26*
Veneno bruto controle sem atropina (E+)	41,93 ± 6,25
Veneno bruto + atropina (E+)	42,27 ± 9,35
Veneno bruto controle sem pirilamina (E+)	44,60 ± 9,66
Veneno bruto + pirilamina (E+)	46,97 ± 4,83
Veneno bruto controle sem HOE 140 (E+)	46,65 ± 5,56
Veneno bruto + HOE 140 (E+)	48,60 ± 4,93
Veneno bruto controle sem suramina (E+)	49,20 ± 0,94
Veneno bruto + suramina (E+)	49,05 ± 1,25

Notas: Os valores representam a média ± EPM

E+: vasos com endotélio funcional

E-: vasos sem endotélio funcional

*P<0,05; ***P<0,001 comparado ao controle (Teste t de Student).

4.3.3. Participação de canais para cálcio no efeito vasodilatador do veneno bruto em anéis de aorta de rato

A fim de verificar se o veneno bruto causa vasodilatação por bloqueio de canais para cálcio do tipo L nas células musculares lisas, anéis de aorta de rato com endotélio funcional foram pré-contraídos com solução de Krebs-Henseleit com concentração de KCl de 50 mM antes da administração de veneno (8 $\mu\text{g/mL}$, EC_{50}) ou de nifedipina (10^{-6} M).

A figura 16 aponta que o veneno bruto não apresentou efeito relaxante ($1,45 \pm 0,54\%$ de relaxamento) nos vasos pré-contraídos com solução de Krebs-Henseleit com concentração de KCl de 50 mM. Ao contrário do veneno, a nifedipina, que é um bloqueador de canais para cálcio do tipo L, promoveu potente vasodilatação ($94,47 \pm 1,84\%$ de relaxamento) nas mesmas condições experimentais. Os resultados indicam que a dilatação dos anéis de aorta de rato promovida pelo veneno bruto da aranha *Lasiodora* sp. não ocorre por bloqueio de canais para cálcio do tipo L na musculatura lisa vascular.

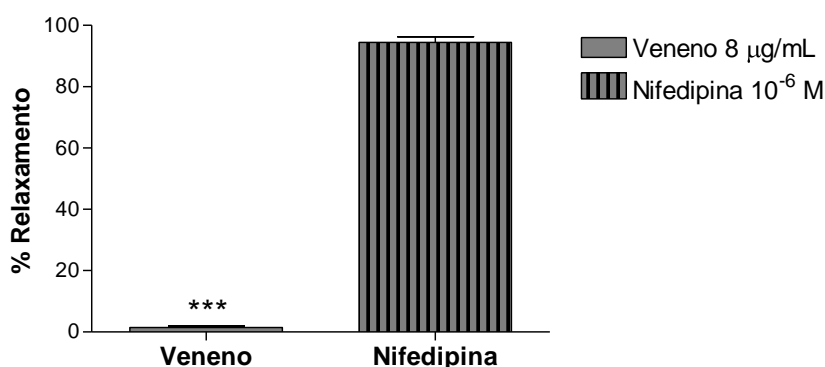


Figura 16: Efeito relaxante induzido pelo veneno bruto da aranha *Lasiodora* sp. (8 $\mu\text{g/mL}$) ou pela nifedipina (10^{-6} M) em anéis de aorta de rato, contendo endotélio funcional, pré-contraídos com solução de Krebs-Henseleit com concentração de KCl de 50 mM. Os valores representam a média \pm EPM de quatro experimentos. *** $P < 0,001$ comparado ao efeito da nifedipina (Teste t de Student).

4.3.4. Efeito do veneno bruto no relaxamento induzido por doadores de NO em anéis de aorta de rato

A fim de verificar uma possível ação do veneno em proteger a degradação do NO, curvas concentração-resposta cumulativas de diferentes doadores de NO foram feitas em anéis de aorta, sem endotélio funcional, pré-contráídos com fenilefrina e pré-incubados com veneno bruto na concentração submáxima de 16 µg/mL.

A figura 17 mostra o efeito relaxante induzido por nitroprussiato de sódio (0,0001 a 3 µM) (A), SIN-1 (0,0001 a 10 µM) (B) e SNAP (0,001 a 10 µM) (C) em anéis de aorta sem endotélio funcional, pré-incubados ou não com veneno bruto (16 µg/mL). Em todas as condições, o veneno bruto promoveu um desvio para a esquerda das curvas concentração-resposta dos doadores de NO, potencializando os efeitos vasodilatadores das três drogas. Os resultados indicam que o veneno protege a degradação do NO, aumentando sua disponibilidade biológica em anéis de aorta de rato.

A tabela 6 contém os valores médios de EC_{50} e E_{max} , obtidos nas curvas concentração-resposta cumulativas para nitroprussiato de sódio, SIN-1 e SNAP, na presença e na ausência do veneno bruto (16 µg/mL).

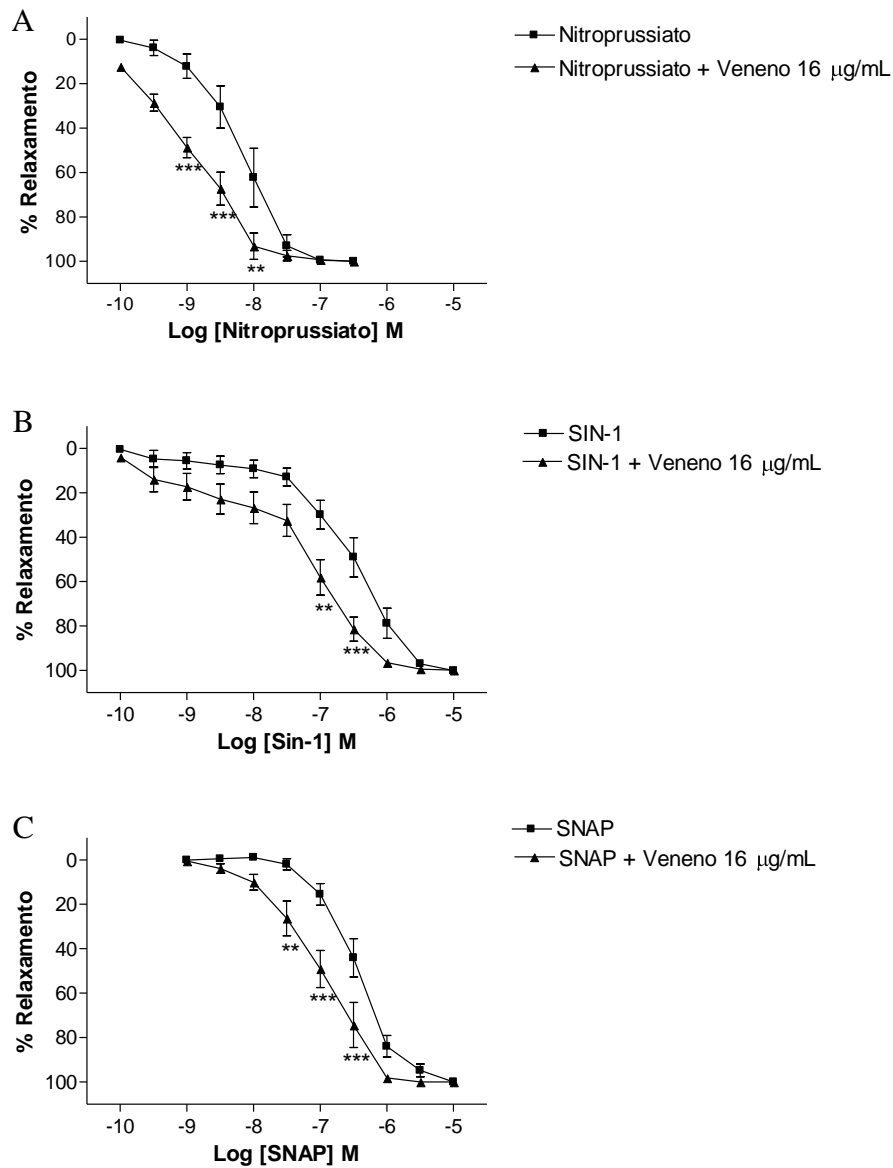


Figura 17: Efeito relaxante induzido por nitroprussiato de sódio (A), SIN-1 (B) e SNAP (C) em anéis de aorta de rato sem endotélio funcional, na presença e na ausência do veneno bruto da aranha *Lasiodora* sp. (16 µg/mL). Cada ponto representa a média ± EPM de pelo menos quatro experimentos. ***P<0,001; **P<0,01 (ANOVA *Two-way* seguido de Bonferroni).

Tabela 6: Valores de EC₅₀ e E_{max} para nitroprussiato de sódio, SIN-1 e SNAP, na presença e na ausência de veneno bruto (16 µg/mL)

Condição experimental	EC ₅₀ (µM)	E _{max} (% relaxamento)
Nitroprussiato de sódio controle	0,0064 ± 0,0022	100
Nitroprussiato de sódio + veneno bruto	0,0018 ± 0,0008***	100
SIN-1 controle	0,418 ± 0,143	100
SIN-1 + veneno bruto	0,0983 ± 0,0314***	100
SNAP controle	0,399 ± 0,092	100
SNAP + veneno bruto	0,173 ± 0,055***	100

Notas: Os valores representam a média ± EPM

***P<0,001 comparado ao controle (ANOVA *Two-way*).

4.3.5. Ativação da eNOS pelo veneno bruto em anéis de aorta de rato

Para verificar o papel do veneno bruto na ativação da eNOS, a fosforilação da enzima em dois sítios regulatórios, Ser1177 (sítio de ativação) e Thr495 (sítio de inativação), foi mensurada. Anéis de aorta de rato foram estimulados em tempos distintos com veneno (16 µg/mL) e o Western Blot do *pool* de tecidos foi realizado como descrito anteriormente. Os anéis de aorta também foram estimulados com acetilcolina (0,1 µM) como controle positivo.

A figura 18A indica que o veneno bruto aumenta de forma significativa a fosforilação de Ser1177 após 15 e 30 minutos de estimulação dos anéis de aorta. A acetilcolina também promove a fosforilação desse sítio e age mais rapidamente que o veneno, aumentando a fosforilação do sítio de ativação desde os 5 minutos de estimulação.

Ao contrário do sítio de ativação, o sítio de inativação em Thr495 é desfosforilado após 30 minutos de estimulação dos anéis de aorta com acetilcolina ou com veneno bruto. Em condições basais (tempo 0), esse sítio é normalmente fosforilado (Figura 18B).

Os resultados indicam que o veneno bruto da aranha *Lasiadora* sp. estimula a ativação da eNOS em anéis de aorta de rato.

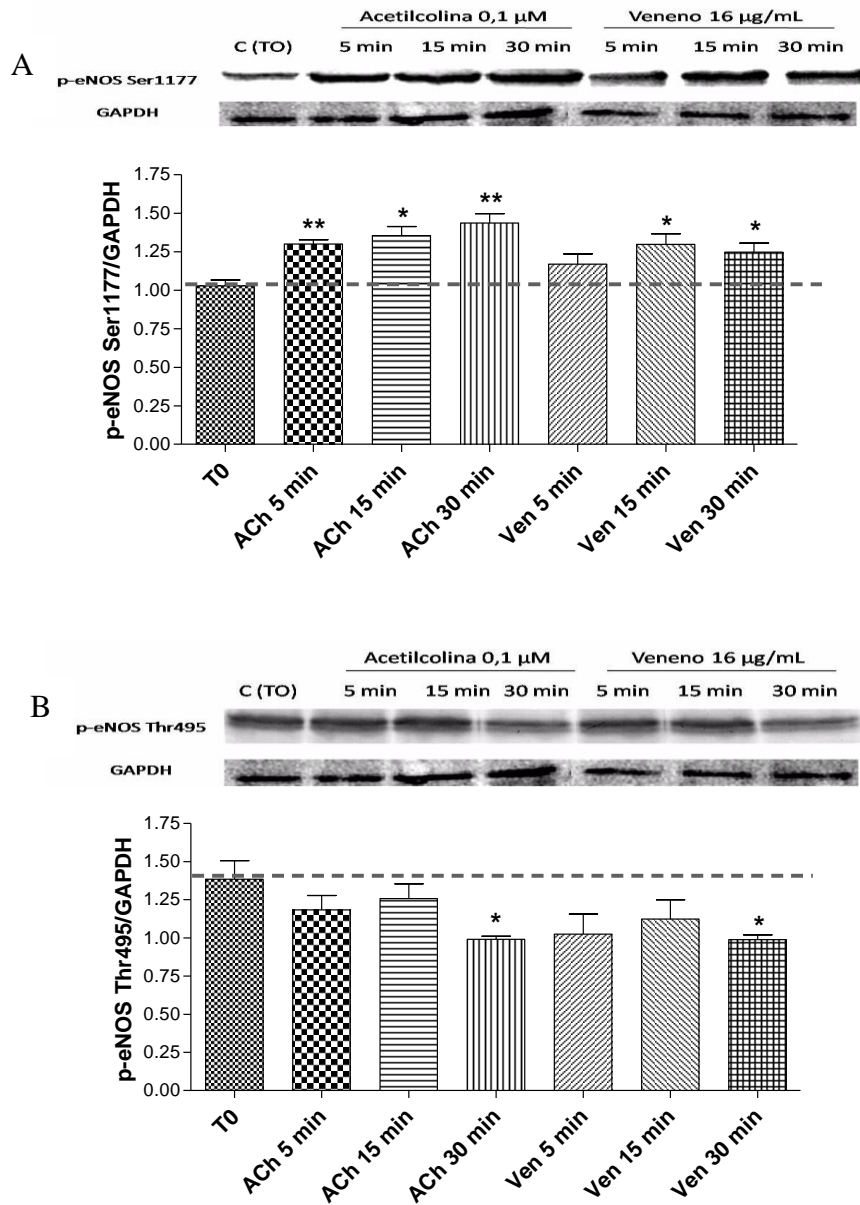


Figura 18: Fosforilação da eNOS promovida pelo veneno bruto da aranha *Lasiodora* sp. (16 $\mu\text{g/mL}$) e por acetilcolina (0,1 μM) em anéis de aorta de rato. Efeitos do veneno bruto (Ven) e da acetilcolina (ACh) na fosforilação dos sítios Ser1177 (sítio de ativação) (A) e Thr495 (sítio de inativação) (B), em diferentes tempos de estimulação (5, 15 e 30 minutos). GAPDH foi utilizado como controle. Os valores representam a média \pm EPM de três experimentos. ** $P < 0,01$, * $P < 0,05$ comparado ao tempo 0 (T0) (Teste t de Student).

4.3.6. Verificação da participação da via PI3K/Akt na ativação da eNOS pelo veneno bruto em anéis de aorta de rato

A fim de avaliar se a ativação da eNOS pelo veneno bruto ocorre por fosforilação mediada pela via PI3K/Akt, o veneno bruto foi administrado em anéis de aorta com endotélio funcional pré-incubados ou não com LY 294002, um inibidor seletivo da PI3K.

A figura 19 aponta o efeito relaxante do veneno bruto na concentração de 8 µg/mL (EC_{50}) em anéis de aorta de rato contendo endotélio funcional pré-contráídos com fenilefrina, na presença ($51,47 \pm 5,54\%$ de relaxamento) e na ausência ($44,40 \pm 4,68\%$ de relaxamento) de LY 294002. A inibição da PI3K não alterou o efeito vasodilatador do veneno, indicando que a via PI3K/Akt não está envolvida na fosforilação da eNOS pelo veneno bruto em anéis de aorta de rato.

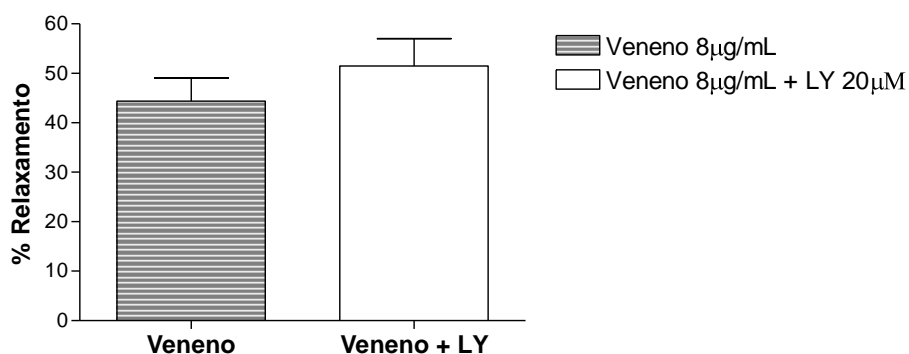


Figura 19: Efeito relaxante induzido pelo veneno bruto da aranha *Lasiodora* sp. (8 µg/mL) em anéis de aorta de rato, contendo endotélio funcional, na presença e na ausência de LY 294002 20 µM. Os valores representam a média ± EPM de quatro experimentos.

Discussão

5. DISCUSSÃO

Devido à baixa toxicidade a humanos, o veneno da aranha *Lasiadora* sp. foi pouco estudado sistematicamente até o momento. Nosso grupo de pesquisa realizou a maioria dos estudos existentes com o veneno dessa aranha.

O interesse pela ação desse veneno no sistema cardiovascular surgiu de duas observações importantes feitas pelo nosso grupo. Em 2003, Kalapothakis *et al.* descreveram a atividade bradicárdica do veneno bruto da aranha *Lasiadora* sp. em coração isolado de rato. Já Silvestre (2005), analisando ESTs geradas a partir da biblioteca de cDNA construída por extração total dos mRNAs da glândula de veneno da aranha *Lasiadora* sp., encontrou algumas ESTs que apresentaram similaridade com o peptídeo GsMTx4. Sabe-se que esse peptídeo, isolado do veneno da tarântula *Grammostola spatulata*, inibe a fibrilação atrial por bloqueio de canais iônicos ativados por estiramento (Suchyna *et al.*, 2000).

O estudo de substâncias que atuam no sistema cardiovascular objetiva avaliar o potencial terapêutico desses compostos para o avanço no tratamento das doenças cardiovasculares, que acometem uma parcela considerável da população mundial e apresentam elevado custo médico-social.

Assim como os venenos de animais peçonhentos, os produtos naturais derivados de plantas são muito estudados em diversos sistemas fisiológicos. Sabe-se que diversos deles possuem efeito vasodilatador. Uma revisão sistemática realizada por McNeill e Jurgens (2006) aponta que a maioria dos trabalhos utiliza aorta isolada de rato para a investigação do mecanismo vasodilatador desses produtos naturais. Algumas dessas substâncias provocam relaxamento por mecanismos dependentes do endotélio vascular.

Muitos trabalhos apontam o NO como mediador endotelial responsável por esse efeito e poucos estudos indicam a participação de PGI₂. Compostos que mimetizam a ação da enzima superóxido dismutase (SOD) ou que aumentam a produção de NO por ativação da NOS também causam vasodilatação. Outros produtos naturais ativam canais para K⁺ na musculatura lisa vascular. Um número significativo desses produtos causa vasodilatação por bloqueio de canais para Ca²⁺ presentes na membrana plasmática de células musculares lisas ou por inibição da liberação de Ca²⁺ dos estoques intracelulares. Vale ressaltar que algumas substâncias possuem mais de um mecanismo de ação. Estudos *in vivo* também são realizados com produtos naturais. Por exemplo, Pires *et al.* (2000) mostraram que o extrato etanólico de *Albizia inopinata* promoveu redução da resistência periférica em ratos não anestesiados e a hipotensão causada foi atenuada por L-NAME. Já em aorta de rato, esse mesmo extrato induziu relaxamento, que foi atenuado por L-NAME.

O presente trabalho demonstrou que o veneno bruto da aranha *Lasiodora* sp., quando administrado por via endovenosa em ratos anestesiados, provoca hipotensão e bradicardia agudas. Houve variação transitória de pressão arterial média (PAM) e de frequência cardíaca (FC) a partir da administração de diferentes doses do veneno (2, 5, 10, 15 e 20 µg, Figura 9).

O efeito do veneno bruto é transitório (Figura 10), provavelmente devido à metabolização de seus componentes ativos quando administrado no animal *in vivo* e também ao baroreflexo. Esse reflexo é uma resposta fisiológica compensatória que previne em curto prazo grandes flutuações na pressão arterial sanguínea (La Rovere *et al.*, 2008). No entanto, observamos que ocorre

a repetição de tal efeito. Quando testamos as diferentes doses do veneno nos ratos, esse era novamente injetado no mesmo animal cerca de 15 minutos depois da primeira administração. Constatamos que os efeitos provocados pela injeção endovenosa da segunda administração foram idênticos aos observados na primeira, para todas as doses (dados não mostrados).

A fim de investigar o mecanismo envolvido nos efeitos hipotensor e bradicárdico do veneno no animal anestesiado, a dose de 2 μg do veneno foi injetada através da cânula venosa antes e após a administração de algumas drogas. A dose única foi utilizada para economia de material biológico disponível. Essa dose, mesmo sendo a mais baixa utilizada, altera de forma significativa os parâmetros avaliados.

A indometacina não alterou os efeitos hipotensor e bradicárdico do veneno, excluindo a participação de produtos da ação das COX nesse efeito (Figura 11A).

Já a administração de atropina inibiu as alterações de PAM e de FC induzidas pelo veneno bruto nos animais anestesiados (Figura 11C). Os resultados obtidos com atropina já eram esperados, visto que Kalapothakis *et al.* (2003) observaram que o veneno bruto da aranha *Lasiadora* sp. induz bradicardia concentração-dependente por liberação de acetilcolina das terminações nervosas parassimpáticas no coração. Portanto, a ação do veneno bruto foi abolida pela atropina em coração isolado de rato. As concentrações utilizadas em sistema de coração isolado foram 10, 20, 50 e 100 μg e todas provocaram bradicardia significativa.

Dessa forma, podemos inferir que, quando o veneno bruto da aranha *Lasiadora* sp. é injetado por via endovenosa no animal anestesiado, ele age

diretamente no coração causando bradicardia por liberação de acetilcolina das terminações nervosas parassimpáticas. Assim, o débito cardíaco possivelmente diminui devido à alteração da frequência cardíaca, levando à diminuição da pressão arterial média. O efeito do veneno *in vivo* ocorre mesmo com a utilização de doses menores que as concentrações utilizadas no coração isolado.

Por fim, constatou-se que o L-NAME inibiu significativamente a hipotensão induzida pela administração do veneno, sem alterar a bradicardia (Figura 11B). Esses resultados sugerem uma participação do NO no efeito hipotensor provocado pelo veneno bruto da aranha *Lasiadora* sp. em ratos anestesiados. Como a variação na pressão arterial média é diretamente relacionada à resistência vascular, pensamos que, provavelmente, a hipotensão ocorre também por ação direta do veneno no sistema vascular, em um mecanismo adicional ao efeito cardíaco do veneno. Então, a partir dos dados obtidos no animal anestesiado, decidimos verificar a ação do veneno bruto em sistema de vaso isolado.

Na segunda etapa deste trabalho, foi demonstrado que o veneno bruto da aranha *Lasiadora* sp. induz um potente efeito relaxante concentração-dependente em anéis de aorta de rato (Figura 12A). É importante ressaltar que o veneno bruto não alterou a funcionalidade vascular e endotelial, pois os anéis de aorta foram capazes de responder à administração de fenilefrina e de acetilcolina após a exposição ao veneno e a um período de 1 hora de recuperação (dados não mostrados).

Foram realizadas curvas concentração-resposta de relaxamento também para três frações (F4, F5 e F10) do veneno obtidas em HPLC. As frações

utilizadas foram as que apresentaram maior quantidade protéica após a quantificação pelo método de Bradford, que foi suficiente para a realização dos experimentos. Novos fracionamentos não foram realizados para a obtenção de quantidade adequada das demais frações devido à escassez de veneno bruto.

As frações F4 e F5 apresentaram efeito relaxante nos anéis de aorta, porém a fração F10 não induziu relaxamento (Figura 12B,C,D). A comparação entre os valores de EC_{50} aponta que a fração F5 é pelo menos três vezes mais potente que o veneno bruto e sete vezes mais potente que F4. As curvas concentração-resposta do veneno bruto e da fração F4 atingiram valores próximos a 80% de relaxamento com a maior concentração utilizada. Concentrações maiores não foram adicionadas aos vasos a fim de economizar o estoque disponível de veneno e de fração, porém o valor de E_{max} foi estimado graficamente.

Os resultados indicam que, com a cromatografia, o componente do veneno responsável pelo efeito vasodilatador provavelmente foi eluído no intervalo de tempo entre 75 e 100 minutos, por isso está presente nas frações F4 e F5 e ausente em F10. O perfil cromatográfico do veneno mostra que não houve separação completa das frações obtidas (Figura 7). Há, então, possibilidade de que o componente ativo do veneno esteja dividido no grupo de frações F4 a F9, que não foi bem individualizado durante a cromatografia. Essa é uma suposição, pois não testamos todas essas frações no sistema de vaso isolado. Supõe-se ainda que o componente ativo esteja presente em maior quantidade na fração F5, visto que ela é mais potente que F4.

A característica do composto vasoativo do veneno é incerta, pois os venenos de aranhas são uma mistura de substâncias. Existe também a

possibilidade de que haja mais de um composto ativo. Dados obtidos em análise de espectrometria de massa de venenos de aranhas da subordem Mygalomorphae indicam que os polipeptídeos são os principais constituintes (Escoubas & Rash, 2004). Após cromatografia de fase reversa do veneno da aranha *Lasiadora parahybana* em coluna C18, análise de espectrometria de massa revelou que os primeiros componentes eluídos foram acilpoliaminas e aminas biogênicas, seguidos de peptídeos e proteínas (massa molecular de 3100 a 8500 Da) durante a maior parte do tempo da cromatografia. As últimas frações eluídas continham quatro componentes de alta massa molecular (Guette *et al.*, 2006). A análise do perfil protéico do veneno bruto da aranha *Lasiadora* sp. pelo sistema de eletroforese bidimensional revelou a presença de proteínas com massa molecular variável, de 6 até mais de 45 kDa (Silvestre, 2005).

O fracionamento do veneno da aranha *Lasiadora* sp. realizado por nosso grupo representou uma etapa inicial. Há perspectiva de realização de nova cromatografia com o intuito de individualizar ao máximo os componentes presentes no veneno. Espera-se que, com essa nova etapa de fracionamento, o composto vasoativo seja separado dos componentes do veneno presentes nas frações F3 a F11 que apresentaram diferentes graus de toxicidade a camundongos como descrito por De Deus (2003). Como as frações obtidas foram separadas por critério de hidrofobicidade, talvez a cromatografia de troca iônica seja mais indicada para o próximo passo de isolamento dos compostos.

Após a realização das curvas concentração-resposta de relaxamento em anéis de aorta de rato para veneno bruto e frações, os próximos experimentos foram feitos apenas com o veneno bruto da aranha *Lasiadora* sp., devido à

obtenção de pequenas quantidades de frações. Além disso, na maior parte dos protocolos seguintes, o veneno bruto foi utilizado na concentração única de 8 µg/mL, que correspondia ao EC₅₀ do veneno. A escassez de material é um fator comum nos estudos com venenos de aranhas, o que pode dificultá-los (Geren & Odell, 1984).

Essa concentração única do veneno bruto foi então administrada em anéis de aorta de rato após remoção mecânica do endotélio. A ausência de endotélio funcional aboliu o efeito vasodilatador induzido pelo veneno, indicando que tal efeito depende do endotélio vascular (Figura 13).

O endotélio vascular pode liberar algumas substâncias vasodilatadoras, como PGI₂, NO e EDHF (Mombouli & Vanhoutte, 1999; Triggle *et al.*, 2003). Foi, portanto, necessário investigar qual ou quais são os mediadores endoteliais envolvidos na ação vasorelaxante do veneno bruto. A contribuição da resposta do EDHF não foi avaliada, pois é significativamente maior nas artérias de resistência (Félétou & Vanhoutte, 2006). Quando os anéis de aorta foram pré-incubados com indometacina, inibidor não seletivo das COX, a adição do veneno bruto promoveu vasodilatação semelhante àquela promovida em vasos não incubados com o inibidor. A participação da PGI₂ foi, então, excluída. No entanto, a incubação dos vasos com L-NAME, inibidor não seletivo das NOS, aboliu o efeito vasodilatador do veneno (Figura 14). Esses resultados sugerem que o NO é o mediador endotelial envolvido no efeito vasorelaxante induzido pelo veneno bruto da aranha *Lasiodora* sp.

Estudos com o veneno da aranha armadeira *Phoneutria nigriventer* indicaram uma característica de indução da liberação de NO. Uma fração semi-purificada do veneno, que foi denominada fração liberadora de óxido nítrico

(NORF, *nitric oxide releasing fraction*), produziu relaxamento concentração-dependente em anéis de artéria mesentérica de rato. O efeito foi dependente do endotélio e abolido na presença de L-NAME. Os autores sugeriram que a NORF induziu a liberação de NO do endotélio de anéis de artéria mesentérica (Weinberg *et al.*, 2002). Também foi demonstrado que a toxina Tx2-6 da aranha *Phoneutria nigriventer* potencializa a função erétil em ratos por meio da liberação de NO. Essa função foi avaliada através de alterações no índice pressão intracavernosa/pressão arterial média (ICP/MAP) durante estimulação elétrica do gânglio pélvico maior nos animais anestesiados. A toxina Tx2-6, injetada por via subcutânea ou por via endovenosa, aumentou de forma significativa o índice ICP/MAP após estimulação ganglionar em ratos normotensos. A potencialização da função erétil pela toxina foi inibida por L-NAME. Após incubação de segmentos do corpo cavernoso com Tx2-6, a liberação de NO foi detectada utilizando microscopia confocal, em fatias do corpo cavernoso, com marcador de fluorescência DAF-FM (Nunes *et al.*, 2008).

No presente trabalho, observamos com os ensaios de reatividade vascular que a vasodilatação promovida pelo veneno bruto da aranha *Lasiodora* sp. depende do endotélio vascular e da síntese de NO. Correlacionando esses dados com os resultados obtidos no animal anestesiado, podemos supor que a hipotensão provocada pela administração do veneno em ratos ocorre também por uma ação vascular direta que é inibida por L-NAME, apesar de termos utilizado vasos de condutância em nossos ensaios. Em trabalhos futuros, podemos avaliar a ação do veneno bruto em vasos de resistência, que contribuem de forma mais significativa para o controle da pressão arterial.

Sabe-se que o NO pode ser produzido nas células endoteliais em resposta à ligação de certos agonistas a receptores presentes na membrana celular, como acetilcolina, histamina, bradicinina e ATP (Lüscher & Noll, 1995; Carvalho *et al.*, 2001). Avaliamos então a possibilidade de o veneno bruto agir por ativação desses receptores.

Demonstramos nos experimentos em animal anestesiado que a atropina inibe a hipotensão e a bradicardia induzidas pela administração do veneno bruto da aranha *Lasiodora* sp. Essa inibição poderia ocorrer não apenas por um bloqueio da ação da acetilcolina, cuja liberação no coração é induzida pelo veneno, mas também por uma ação vascular direta do veneno ligando-se a receptores muscarínicos nas células endoteliais. O veneno do peixe pedra *Synanceja trachynis*, que possivelmente é o peixe mais venenoso do mundo, induziu relaxamento em anéis de aorta de rato. Esse efeito foi inibido na presença de atropina, indicando que o veneno age via receptores muscarínicos (Church & Hodgson, 2000).

Assim, decidimos investigar a participação de receptores muscarínicos no efeito relaxante do veneno de *Lasiodora* sp. Em nossos experimentos, a atropina não foi capaz de inibir a ação vasodilatadora do veneno bruto da aranha em anéis de aorta de rato, indicando que esses receptores não participam na resposta do veneno (Figura 15A).

Aminas biogênicas estão comumente presentes nos venenos de animais peçonhentos, com a função principal de produzirem dor decorrente da picada (Weisel-Eichler & Libersat, 2004). O veneno bruto da aranha *Lycosa godeffroyi* possui efeito vasodilatador em anéis de aorta de rato. A resposta relaxante do veneno foi inibida pela retirada do endotélio, por um inibidor da NOS e por um

antagonista de receptores histaminérgicos H1. Um ensaio fluorimétrico detectou a presença de histamina no veneno e os autores concluíram que ela é o principal composto vasoativo do veneno dessa aranha (Rash *et al.*, 1998). Rattmann *et al.* (2008) observaram que o veneno bruto da aranha marrom *Loxosceles intermedia* promove relaxamento endotélio-dependente em anéis de aorta de rato. Esse efeito é inibido por L-NAME e por inibidores da guanilil-ciclase. O relaxamento dos vasos também é abolido por pirilamina e pelo composto 48/80, que induz a degranulação de mastócitos. Os resultados indicam que o veneno da aranha marrom promove degranulação de mastócitos com conseqüente liberação de histamina nos anéis de aorta de rato.

A partir dessas informações, investigamos as seguintes possibilidades: de um componente do veneno agir em receptores histaminérgicos, da presença de histamina como componente do veneno ou de indução da liberação de histamina no tecido vascular. Os resultados mostraram que o bloqueio de receptores histaminérgicos H1 pela pirilamina não inibiu a vasodilatação induzida pelo veneno bruto da aranha *Lasiodora* sp. (Figura 15B).

Lopes-Martins *et al.* (1994) descreveram que o veneno bruto da aranha *Phoneutria nigriventer* induz relaxamento concentração-dependente do músculo liso de corpo cavernoso de coelho. O relaxamento é abolido por L-NAME, HOE-140, aprotinina (inibidor de protease) e KIZD-06 (inibidor específico de calicreína tecidual). Os autores concluíram que o veneno da aranha armadeira ativa o sistema calicreína-cininogênio-cinina tecidual no corpo cavernoso de coelho, levando à liberação de NO. Alguns peptídeos provenientes de venenos de animais peçonhentos possuem características de

potencializar a ação da bradicinina, inibindo ou não a ECA adicionalmente (Joseph *et al.*, 2004; Verano-Braga *et al.*, 2008).

Para avaliarmos a possível ação de um composto do veneno de *Lasiadora* sp. em receptores B2, bem como a possibilidade de o veneno ativar o sistema calicreína-cinina tecidual, os anéis de aorta de rato foram pré-incubados com HOE-140 antes da administração do veneno bruto. A pré-incubação dos vasos com HOE-140 não inibiu a resposta vasodilatadora do veneno bruto da aranha *Lasiadora* sp., mostrando que os receptores B2 da bradicinina não estão envolvidos no efeito relaxante (Figura 15C).

O ATP é um componente comum nos venenos de aranhas. Chan *et al.* (1975) descobriram ATP, ADP e AMP em venenos de aranhas dos gêneros *Dugesiella* e *Aphonopelma*, pertencentes à família Theraphosidae. Já Savel-Niemann (1989) descreveu a presença de ATP, ADP e AMP no veneno da aranha *Eurypelma californicum*, também da citada família.

Dessa forma, o veneno da aranha *Lasiadora* sp. poderia conter ATP ou algum componente que ativasse seus receptores no endotélio vascular. Porém, quando os anéis de aorta de rato foram pré-incubados com suramina, o veneno bruto da aranha promoveu a mesma resposta relaxante observada na ausência da droga, indicando que os receptores purinérgicos P2 não participam da vasodilatação (Figura 15D).

A ação do veneno da aranha *Lasiadora* sp. em outros receptores presentes nas células endoteliais, como os receptores de trombina, de CGRP (peptídeo relacionado ao gene da calcitonina) e de substância P, ainda precisa ser investigada. Além disso, é necessária a realização de ensaios em vasos de resistência como a artéria mesentérica, cujo tônus vascular é controlado

também por inervações simpáticas e não adrenérgicas, não colinérgicas (NANC), o que não ocorre na aorta. A estimulação dos terminais nervosos NANC pode levar à liberação de neurotransmissores vasoativos, como NO, CGRP, substância P e peptídeo intestinal vasoativo (Kawamura *et al.*, 1989; Goto *et al.*, 2000). A ação do veneno sobre a estimulação desses terminais nervosos também precisa ser investigada.

Algumas substâncias podem causar relaxamento do músculo liso vascular por bloqueio de canais para Ca^{2+} do tipo L presentes nas células musculares (Karaki *et al.*, 1997). No entanto, a verificação, no presente trabalho, de que o efeito relaxante do veneno bruto da aranha *Lasiodora* sp. em anéis de aorta de rato é totalmente dependente do endotélio diminui a possibilidade de o veneno agir de forma significativa em canais iônicos presentes no músculo liso vascular. Observamos ainda que, quando os anéis de aorta com endotélio funcional são contraídos com solução de Krebs-Henseleit com concentração de KCl de 50 mM, o veneno bruto não dilata os vasos significativamente. Ao contrário do veneno, a nifedipina promoveu vasorelaxamento (Figura 16). Considerando que a concentração elevada de K^+ no meio extracelular induz o influxo de Ca^{2+} através da ativação de canais para Ca^{2+} regulados por voltagem, o efeito inibitório da nifedipina na resposta contrátil em concentração elevada de KCl é atribuído à diminuição da entrada de Ca^{2+} na célula muscular lisa pelo bloqueio dos canais para Ca^{2+} do tipo L. Como o veneno bruto não apresentou efeito inibitório semelhante ao da nifedipina, é improvável que sua ação relaxante ocorra por bloqueio desses mesmos canais.

Sabe-se que os venenos de animais peçonhentos constituem uma rica fonte de toxinas ativas em canais iônicos, como os canais para Ca^{2+} , Na^+ e K^+ (Kushmerick *et al.*, 1999; Gomez *et al.*, 2002; Carneiro *et al.*, 2003; Rodrigues *et al.*, 2003; Fiedler *et al.*, 2008). Já foi demonstrado que o veneno bruto da aranha *Lasiadora* sp. age em canais iônicos. Kushmerick *et al.* (2001) mostraram que o veneno bruto bloqueia canais para Ca^{2+} do tipo L e modula a cinética e a dependência de voltagem de canais para Na^+ em células GH3. Existem quatro subtipos descritos de canais para Ca^{2+} do tipo L: $\text{Ca}_v1.1$, $\text{Ca}_v1.2$, $\text{Ca}_v1.3$ e $\text{Ca}_v1.4$, que possuem papel funcional importante em diferentes tipos celulares (Bourinet *et al.*, 2004). Uma justificativa plausível para o veneno bruto agir em canais para Ca^{2+} do tipo L em células GH3, e não nas células musculares lisas, é que nas primeiras há predominância do subtipo $\text{Ca}_v1.3$ (Kubista *et al.*, 2007) e nas últimas o subtipo $\text{Ca}_v1.2$ é o que exerce papel principal como via de entrada de Ca^{2+} (Cheng *et al.*, 2007). Então, a divergência dos resultados pode ser explicada pela diferença nos subtipos de canais para Ca^{2+} do tipo L de cada célula ou nas concentrações de veneno utilizadas. Kushmerick *et al.* (2001) utilizaram uma concentração única (400 $\mu\text{g/mL}$) de veneno bruto nos ensaios com células GH3 que é 50 vezes maior que a EC_{50} e 10 vezes maior que a concentração máxima utilizada em nossos experimentos em anéis de aorta de rato.

Apesar de não termos identificado um receptor específico de ação do veneno bruto da aranha *Lasiadora* sp., nossos resultados mostraram que o veneno promove vasodilatação dependente do endotélio e da produção de NO em anéis de aorta de rato. Diante desses dados, investigamos dois possíveis

mecanismos de ação do veneno: aumento da disponibilidade de NO ou indução da produção de NO por ativação da eNOS.

Dessa forma, foi avaliada a possibilidade de o efeito relaxante do veneno bruto resultar da prevenção da degradação do NO. Demonstrou-se que, em anéis de aorta de rato sem endotélio funcional, o veneno potencializou o efeito vasodilatador de três drogas doadoras de NO: nitroprussiato de sódio, SIN-1 e SNAP (Figura 17). É importante destacar que nesse protocolo o veneno foi utilizado em concentração submáxima (16 µg/mL) a fim de evitar degradação, já que os vasos foram pré-incubados por 5 minutos com o veneno e as respostas relaxantes das drogas utilizadas são lentas.

Sabe-se que o NO reage muito rapidamente com o superóxido (O_2^-), mesmo com baixas concentrações desse ânion, para produzir peroxinitrito ($ONOO^-$), resultando em diminuição da resposta vasodilatadora (Pacher *et al.*, 2007). A ação do veneno em modificar o relaxamento dos doadores de NO foi semelhante à observada quando os vasos são pré-incubados com a enzima superóxido dismutase (SOD), que remove o O_2^- extracelular (Lemos *et al.*, 1999).

Goto *et al.* (1999) observaram que um extrato da planta *Paeonia lactiflora* aumenta a atividade da SOD. A cicletanina, um composto vasodilatador, promove seu efeito vascular pela estimulação da liberação de NO e por agir como *scavenger* de O_2^- (Kalinowski *et al.*, 2001). Podemos supor que o veneno bruto da aranha *Lasiodora* sp. previne a degradação do NO pelo O_2^- por remoção desse ânion, apesar de experimentos adicionais serem necessários para confirmar essa ação do veneno. Podemos realizar

futuramente ensaios bioquímicos que medem o nível de O_2^- em sistema *cell-free*, como o ensaio da xantina-xantina oxidase (Hennebelle *et al.*, 2008).

Tal efeito de aumento da disponibilidade biológica de NO tem características antioxidantes. Há relatos da presença de compostos antioxidantes em venenos de animais. Foi demonstrado que o veneno do escorpião *Heterometrus fulvipes* possui atividade de SOD (Ramanaiah & Venkaiah, 1992). Outro estudo concluiu que o veneno do peixe leão *Pterios volitans* diminuiu o estresse oxidativo hepático em ratos com carcinoma ascítico de Ehrlich (Sri Balasubashini *et al.*, 2006). Peiren *et al.* (2008) separaram o material extraído de glândulas de veneno de abelhas *Apis mellifera carnica* por eletroforese bidimensional e alguns spots obtidos foram identificados por espectrometria de massa. A análise revelou a presença de quatro enzimas antioxidantes: CuZn superóxido dismutase (SOD1), glutathione-S-transferase sigma 1 isoforma A (GSTS1), peroxiredoxina 2540 (PXR2540) e tioredoxina peroxidase 1 isoforma A (TPX1).

Após verificarmos que o veneno bruto da aranha *Lasiodora* sp. potencializa o efeito vasodilatador de doadores de NO, investigamos também a possibilidade de indução da produção de NO pelo veneno via ativação da eNOS. Para isso, a fosforilação da enzima em dois sítios regulatórios, Ser1177 (sítio de ativação) e Thr495 (sítio de inativação), foi mensurada após estímulo dos anéis de aorta em tempos distintos com veneno e acetilcolina. Novamente, o veneno foi utilizado em concentração submáxima (16 $\mu\text{g/mL}$) para evitar degradação durante o tempo de incubação prolongado.

Os resultados mostraram que o veneno bruto aumenta de forma significativa a fosforilação de Ser1177 após 15 e 30 minutos de estimulação

dos anéis de aorta. O estímulo com acetilcolina fosforilou o resíduo de Ser1177 após 5, 15 e 30 minutos (Figura 18A). Zecchin *et al.* (2007) observaram aumento da fosforilação de resíduos de serina na eNOS após 10, 15 e 30 minutos de estimulação com acetilcolina.

O sítio de inativação em Thr495, que é constitutivamente fosforilado, sofre desfosforilação de forma significativa após 30 minutos de estimulação com acetilcolina e com veneno bruto (Figura 18B). Isso indica que após esse tempo de estimulação há aumento da ativação da eNOS, provavelmente por ativação de fosfatases que desfosforilam essa enzima.

O tempo necessário para fosforilação ou desfosforilação dos resíduos de eNOS varia de acordo com o agonista utilizado. Fleming *et al.* (2001) estimularam células endoteliais com bradicinina e observaram um aumento da fosforilação de Ser1177, com pico em 5 minutos após o estímulo e retorno aos níveis basais dentro de 15 minutos. A desfosforilação de Thr495 foi rápida, sendo observada após 30 segundos de estimulação. A amlodipina, um bloqueador de canais para Ca^{2+} do tipo L, aumenta de forma significativa a fosforilação de Ser1177 e desfosforila o resíduo de Thr495 após 10, 20 e 30 minutos de estimulação de células endoteliais (Lenasi *et al.*, 2003).

A ação relaxante do veneno bruto em anéis de aorta de rato é imediata. No entanto, o tempo necessário para a indução de fosforilação e de desfosforilação dos resíduos da eNOS pelo veneno, de acordo com os resultados de Western Blot, não se correlaciona com o tempo necessário para o início do efeito vasodilatador. É possível que, imediatamente após a administração do veneno, haja ativação da eNOS suficiente para promover o efeito biológico, mas a fosforilação e a desfosforilação não ocorrem de forma

tão intensa a ponto de serem detectadas pelo método do Western Blot nos primeiros minutos de estimulação. Há também a possibilidade da ativação da eNOS por fosforilação/desfosforilação não ser o mecanismo principal com que o veneno bruto promove sua ação biológica vasodilatadora.

Os dados de Western Blot indicam que o veneno bruto da aranha *Lasiodora* sp. estimula a ativação da eNOS em anéis de aorta de rato. Diante desse resultado, decidimos verificar se a via PI3K/Akt está envolvida na fosforilação da enzima mediada pelo veneno. Para isso, pré-incubamos anéis de aorta com LY 294002, inibidor seletivo da PI3K. O veneno bruto adicionado mostrou o mesmo perfil de relaxamento quando comparado ao grupo controle, sugerindo que não há ativação da eNOS pela via PI3K/Akt (Figura 19). Dessa forma, é possível que a fosforilação da eNOS pelo veneno ocorra por mecanismos dependentes de Ca^{2+} .

Sabe-se que a atividade da eNOS é regulada pelo complexo intracelular Ca^{2+} -CaM e, adicionalmente, pela fosforilação de resíduos específicos na enzima (Fulton *et al.*, 2001; Fleming & Busse, 2003). O veneno da aranha *Lasiodora* sp. pode causar vasodilatação por outros mecanismos além da fosforilação da enzima. Como há indícios de que a fosforilação da eNOS pelo veneno depende de Ca^{2+} , podemos pensar que, caso o veneno promova aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ no endotélio, outras vias regulatórias dependentes de Ca^{2+} também sejam ativadas. Futuramente, seria interessante a detecção da liberação de NO e das oscilações de Ca^{2+} , utilizando-se microscopia confocal com marcadores de fluorescência específicos, após a adição do veneno a células endoteliais.

Portanto, nossos resultados indicam que o veneno bruto aumenta a disponibilidade biológica do NO e também induz sua produção por ativação da enzima eNOS em anéis de aorta de rato. É provável que diferentes compostos presentes no veneno bruto produzam essas duas ações distintas e que existam mecanismos adicionais de ação do veneno a serem elucidados. A possibilidade de isolamento de substâncias a partir do veneno bruto que apresentem tais efeitos vasculares mostra-se muito interessante devido ao importante papel que o NO exerce no sistema vascular. Compostos com capacidade de restaurar os níveis de NO possuem potencial terapêutico para o tratamento de doenças como hipertensão arterial e aterosclerose, que são caracterizadas por disfunção do endotélio vascular com conseqüente redução da liberação, da disponibilidade biológica e da ação de fatores relaxantes derivados do endotélio (Boulanger, 1999; Shimokawa, 1999; Triggle *et al.*, 2003; Barbato & Tzeng, 2004).

Conclusão

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram um acentuado efeito do veneno bruto da aranha *Lasiadora* sp. de alteração dos parâmetros cardiovasculares em ratos anestesiados. O veneno promove hipotensão e bradicardia agudas. Esses efeitos podem ocorrer em consequência de uma ação direta do veneno no coração. Além disso, o NO está envolvido no efeito hipotensor do veneno bruto.

O veneno bruto da aranha *Lasiadora* sp. também promove uma vasodilatação dependente de NO endotelial na aorta de rato. É possível que o efeito hipotensor do veneno seja consequência também de sua ação direta sobre os vasos sanguíneos.

Nos anéis de aorta de rato, há indícios de que o veneno protege o NO de degradação, aumentando sua disponibilidade biológica. O veneno também ativa a enzima eNOS. É provável que compostos diferentes presentes no veneno bruto produzam essas duas ações distintas.

As frações do veneno F4, F5 e F10 obtidas a partir de cromatografia em sistema HPLC também foram testadas em vaso isolado. F4 e F5 causam relaxamento concentração-dependente dos anéis de aorta, sendo que F10 não possui efeito dilatador. A fração F5 é pelo menos três vezes mais potente que o veneno bruto e sete vezes mais potente que F4.

Diante dos resultados obtidos, concluímos que os efeitos observados com o veneno bruto possam ser atribuídos a diferentes componentes do veneno da aranha *Lasiadora* sp. A purificação desses componentes e posteriores estudos com substâncias puras são fundamentais para a elucidação dos mecanismos de ação e para a descoberta de alvos específicos.

Referências Bibliográficas

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABERNETHY, D.R.; SOLDATOV, N.M. Structure-functional diversity of human L-type Ca^{2+} channel: perspectives for new pharmacological targets. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* v. 300, n. 3, p. 724-728, 2002.

AKATA, T. Cellular and molecular mechanisms regulating vascular tone. Part 1: basic mechanisms controlling cytosolic Ca^{2+} concentration and the Ca^{2+} -dependent regulation of vascular tone. *J. Anesth.* v. 21, p. 220-231, 2007a.

AKATA, T. Cellular and molecular mechanisms regulating vascular tone. Part 2: regulatory mechanisms modulating Ca^{2+} mobilization and/or myofilament Ca^{2+} sensitivity in vascular smooth muscle cells. *J. Anesth.* v. 21, p. 232-242, 2007b.

ALDERTON, W.K.; COOPER, C.E.; KNOWLES, R.G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem. J.* v. 357, p. 593-615, 2001.

ALLEN, B.G.; WALSH, M.P. The biochemical basis of the regulation of smooth-muscle contraction. *Trends Biochem Sci.* v. 19, n. 9, p. 362-368, 1994.

ARSHAD, A.; MANDAVA, A.; KAMATH, G.; MUSAT, D. Sudden cardiac death and the role of medical therapy. *Prog. Cardiovasc. Dis.* v. 50, n. 6, p. 420-438, 2008.

BARBATO, J.E.; TZENG, E. Nitric oxide and arterial disease. *J. Vasc. Surg.* v. 40, n. 1, p. 187-193, 2004.

BARLOW, C.A.; ROSE, P.; PULVER-KASTE, R.A.; LOUNSBURY, K.M. Excitation-transcription coupling in smooth muscle. *J. Physiol.* v. 570, p. 59-64, 2006.

BELEBONI, R.O.; PIZZO, A.B.; FONTANA, A.C.K.; CAROLINO, R.O.G.; COUTINHO-NETTO, J.; SANTOS, W.F. Spider and wasp neurotoxins: pharmacological and biochemical aspects. *Eur. J. Pharmacol.* v. 493, p. 1-17, 2004.

BENTO, A.C.; NOVELLO, J.C.; MARANGONI, S.; ANTUNES, E.; GIGLIO, J.R.; OLIVEIRA, B.; DE NUCCI, G. Identification of a new vascular smooth muscle contracting polypeptide in *Phoneutria nigriventer* spider venom. *Biochem. Pharmacol.* v. 46, n. 6, p. 1092-1095, 1993.

BENTO, A.C.; REGO, E.; PEDROSO-MARIANI, S.R.; MANCUSO, L.C.; GIGLIO, J.R.; NOVELLO, J.C.; MARANGONI, S.; CARACELLI, I.; OLIVEIRA, B.; ANTUNES, E.; DE NUCCI, G. Isolation of a polypeptide from *Phoneutria nigriventer* spider venom responsible for the increased vascular permeability in rabbit skin. *Toxicon.* v. 33, n. 2, p. 171-178, 1995.

BERTANI, R. Revision, cladistic analysis and zoogeography of *Vitalius*, *Nhandu* and *Proshapadopus*, with notes on other Theraphosidae genera (Araneae, Theraphosidae). *Arq. Zool. S. Paulo*. v. 36, n. 3, p. 265-356, 2001.

BIRSCHMANN, I.; WALTER, U. Physiology and pathophysiology of vascular signaling controlled by guanosine 3', 5'-cyclic monophosphate-dependent protein kinase. *Acta Biochim. Pol.* v. 51, n. 2, p. 397-404, 2004.

BOGIN, O. Venom Peptides and their Mimetics as Potential Drugs. *Modulator*. v. 19, p. 14-20, 2005.

BOHLEN, H.G. Localization of vascular resistance changes during hypertension. *Hypertension*. v. 8, p. 181-183, 1986.

BOO, Y.C.; JO, H. Flow-dependent regulation of endothelial nitric oxide synthase: role of protein kinases. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* v. 285, n. 3, p. C499-508, 2003.

BORKOW, G.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J.M.; OVADIA, M. Effect of various Viperidae and Crotalidae snake venoms on endothelial cells in vitro. *Toxicon*. v. 32, n. 12, p. 1689-1695, 1994.

BORKOW, G.; GUTIÉRREZ, J.M.; OVADIA, M. In vitro activity of BaH1, the main hemorrhagic toxin of *Bothrops asper* snake venom on bovine endothelial cells. *Toxicon*. v. 33, n. 10, p. 1387-1391, 1995.

BOULANGER, C.M. Secondary endothelial dysfunction: hypertension and heart failure. *J. Mol. Cell. Cardiol.* v. 31, n. 1, p. 39-49, 1999.

BOURINET, E.; MANGONI, M.E.; NARGEOT, J. Dissecting the functional role of different isoforms of the L-type Ca²⁺ channel. *J. Clin. Invest.* v. 113, n. 10, p. 1382-1384, 2004.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry.* v. 72, p. 248-254, 1976.

BRAZIL, V.; VELLARD, J. Contribuição ao estudo do veneno das aranhas. *Mem. Inst. Butantan*, Tomo II, v. 23, p. 284-285, 1926.

BRIXIUS, K.; BLOCH, W.; POTT, C.; NAPP, A.; KRAHWINKEL, A.; ZISKOVEN, C.; KORILLER, M.; MEHLHORN, U.; HESCHELER, J.; FLEISCHMANN, B.; SCHWINGER, R.H. Mechanisms of β_3 -adrenoceptor-induced eNOS activation in right atrial and left ventricular human myocardium. *Br. J. Pharmacol.* v. 143, n. 8, p. 1014-1022, 2004.

BÜCHERL, W. *Invertebrados - As Aranhas*. 1. ed. São Paulo: EDART, 1972. 158 p.

CAMPBELL, W.B.; FALCK, J.R. Arachidonic acid metabolites as endothelium-derived hyperpolarizing factors. *Hypertension.* v. 49, n. 3, p. 590-596, 2007.

CAMPOLINA, D.; ANDRADE FILHO, A.; DIAS, M.B. Araneísmo. In: ANDRADE FILHO *et al.* (Org.). *Toxicologia na Prática Clínica*. Belo Horizonte: Folium, 2001. p. 81-89.

CARNEIRO, A.M.; KUSHMERICK, C.; KOENEN, J.; ARNDT, M.H.; CORDEIRO, M.N.; CHAVEZ-OLORTEGUI, C.; DINIZ, C.R.; GOMEZ, M.V.; KALAPOTHAKIS, E.; PRADO, M.A.; PRADO, V.F. Expression of a functional recombinant *Phoneutria nigriventer* toxin active on K⁺ channels. *Toxicon*. v. 41, n. 3, p. 305-313, 2003.

CARVALHO, M.H.C.; NIGRO, D.; LEMOS, V.S.; TOSTES, R.C.A.; FORTES, Z.B. Hipertensão arterial: o endotélio e suas múltiplas funções. *Rev. Bras. Hipertens*. v. 8, p. 76-88, 2001.

CHAN, T.K.; GEREN, C.R.; HOWELL, D.E.; ODELL, G.V. Adenosine triphosphate in tarantula spider venoms and its synergistic effect with the venom toxin. *Toxicon*. v. 13, p. 61-66, 1975.

CHANG, M.C.; LIN, H.K.; PENG, H.C.; HUANG, T.F. Antithrombotic effect of crotalin, a platelet membrane glycoprotein Ib antagonist from venom of *Crotalus atrox*. *Blood*. v. 91, n. 5, p. 1582-1589, 1998.

CHEN, Z.P.; MITCHELHILL, K.I.; MICHELL, B.J.; STAPLETON, D.; RODRIGUEZ-CRESPO, I.; WITTERS, L.A.; POWER, D.A.; ORTIZ DE MONTELLANO, P.R.; KEMP, B.E. AMP-activated protein kinase

phosphorylation of endothelial NO synthase. *FEBS Lett.* v. 443, n. 3, p. 285-289, 1999.

CHENG, X.; LIU, J.; ASUNCION-CHIN, M.; BLASKOVA, E.; BANNISTER, J.P.; DOPICO, A.M.; JAGGAR, J.H. A novel Ca(V)1.2 N terminus expressed in smooth muscle cells of resistance size arteries modifies channel regulation by auxiliary subunits. *J. Biol. Chem.* v. 282, n. 40, p. 29211-29221, 2007.

CHURCH, J.E.; HODGSON, W.C. Dose-dependent cardiovascular and neuromuscular effects of stonefish (*Synanceja trachynis*) venom. *Toxicon.* v. 38, n. 3, p. 391-407, 2000.

COLEMAN, R.A.; SMITH, W.L.; NARUMIYA, S. International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. *Pharmacol. Rev.* v. 46, n. 2, p. 205-229, 1994.

COLLINS, R.; PETO, R.; MACMAHON, S.; HEBERT, P.; FIEBACH, N.H.; EBERLEIN, K.A.; GODWIN, J.; QIZILBASH, N.; TAYLOR, J.O.; HENNEKENS, C.H. Blood pressure, stroke, and coronary heart disease: part 2, short-term reductions in blood pressure: overview of randomised drug trials in their epidemiological context. *The Lancet.* v. 335, n. 8693, p. 827-838, 1990.

COOKE, J.A.L.; MILLER, F.R.; WAND GROVER, R.; DUFFY, J.S. Urticaria caused by Tarantula hairs. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* v. 22, n. 1, p. 130-133, 1973.

CORBIN, J.D.; FRANCIS, S.H. Cyclic GMP Phosphodiesterase-5: target of sildenafil. *J. Biol. Chem.* v. 274, n. 20, p. 13729-13732, 1999.

CORZO, G.; ESCOUBAS, P. Pharmacologically active spider peptide toxins. *Cell. Mol. Life Sci.* v. 60, p. 2409-2426, 2003.

COSTA, S.K.; MORENO, H.Jr.; BRAIN, S.D.; DE NUCCI, G.; ANTUNES, E. The effect of *Phoneutria nigriventer* (armed spider) venom on arterial blood pressure of anaesthetised rats. *Eur. J. Pharmacol.* v. 298, n. 2, p. 113-120, 1996.

CRIBBS, L.L. T-type Ca^{2+} channels in vascular smooth muscle: multiple functions. *Cell Calcium.* v. 40, n. 2, p. 221-230, 2006.

DAIBER, A.; WENZEL, P.; OELZE, M.; MÜNDEL, T. New insights into bioactivation of organic nitrates, nitrate tolerance and cross-tolerance. *Clin. Res. Cardiol.* v. 97, n. 1, p. 12-20, 2008.

DE CASTRO, C.S.; SILVESTRE, F.G.; ARAÚJO, S.C.; YAZBECK, G.M.; MANGILI, O.C.; CRUZ, I.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C.; KALAPOTHAKIS, E. Identification and molecular cloning of insecticidal toxins from the venom of the brown spider *Loxosceles intermedia*. *Toxicon.* v. 44, n. 3, p. 273-80, 2004.

DE DEUS, Alessandra Duarte Torres. Isolamento dos componentes tóxicos do veneno bruto da aranha *Lasiodora* sp. 76 f. Orientador: Evanguedes

Kalapothakis. Dissertação (Mestrado em Farmacologia Bioquímica e Molecular) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2003.

DIMMELER, S.; FLEMING, I.; FISSLTHALER, B.; HERMANN, C.; BUSSE, R.; ZEIHNER, A. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature*. v. 399, p. 601-605, 1999.

DIMMELER, S.; DERNBACH, E.; ZEIHNER, A.M. Phosphorylation of the endothelial nitric oxide synthase at ser-1177 is required for VEGF-induced endothelial cell migration. *FEBS Lett.* v. 477, n. 3, p. 258-262, 2000.

DOSTMANN, W.R.; TEGGE, W.; FRANK, R.; NICKL, C.K.; TAYLOR, M.S.; BRAYDEN, J.E. Exploring the mechanisms of vascular smooth muscle tone with highly specific, membrane-permeable inhibitors of cyclic GMP-dependent protein kinase Ialpha. *Pharmacol. Ther.* v. 93, p. 203-15, 2002.

DUSSE, L.M.S.; VIEIRA, L.M.; CARVALHO, M.G. Revisão sobre óxido nítrico. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 39, n. 4, p. 343-350, 2003.

DUTRA, A.A.; SOUSA, L.O.; RESENDE, R.R.; BRANDÃO, R.L.; KALAPOTHAKIS, E.; CASTRO, I.M. Expression and characterization of LTx2, a neurotoxin from *Lasiodora* sp. effecting on calcium channels. *Peptides*. doi:10.1016/j.peptides.2008.05.001, 2008.

ESCOUBAS, P.; CÉLERIER, M.L.; ROMI-LEBRUN, R.; NAKAJIMA, T. Two novel peptide neurotoxins from the venom on the tarantula *Lasiodora parahybana*. *Toxicon*. v. 35, n. 6, p. 805-806, 1997.

ESCOUBAS, P.; DIOCHOT, S.; CORZO, G. Structure and pharmacology of spider venom neurotoxins. *Biochimie*. v. 82, p. 893-907, 2000.

ESCOUBAS, P.; RASH, L. Tarantulas: eight-legged pharmacists and combinatorial chemists. *Toxicon*, v. 43, p. 555-574, 2004.

ESCOUBAS, P. Mass spectrometry in toxinology: a 21st-century technology for the study of biopolymers from venoms. *Toxicon*. v. 47, n. 6, p. 609-613, 2006.

ESCOUBAS, P.; SOLLOD, B.; KING, G.F. Venom landscapes: mining the complexity of spider venoms via a combined cDNA and mass spectrometric approach. *Toxicon*. v. 47, n. 6, p. 650-663, 2006.

ESCOUBAS, P.; QUINTON, L.; NICHOLSON, G.M. Venomics: unraveling the complexity of animal venoms with mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* v. 43, p. 279-295, 2008.

ESTRADA, G.; VILLEGAS, E.; CORZO, G. Spider venoms: a rich source of acylpolyamines and peptides as new leads for CNS drugs. *Nat. Prod. Rep.* v. 24, p. 145-161, 2007.

FAWCETT, D.W. Blood and lymph vascular systems. In: *Bloom and Fawcett, a textbook of histology*. 12th ed. New York, London: Chapman & Hall, 1994. p. 368-409.

FÉLÉTOU M, VANHOUTTE PM. Endothelium-derived hyperpolarizing factor: where are we now? *Arterioscler. Thromb. Vasc.* v. 26, n. 6, p. 1215-1225, 2006.

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

FIEDLER, B.; ZHANG, M.M.; BUCZEK, O.; AZAM, L.; BULAJ, G.; NORTON, R.S.; OLIVERA, B.M.; YOSHIKAMI, D. Specificity, affinity and efficacy of iota-conotoxin RXIA, an agonist of voltage-gated sodium channels Na(V)1.2, 1.6 and 1.7. *Biochem. Pharmacol.* v. 75, n. 12, p. 2334-2344, 2008.

FISSLHALER, B.; DIMMELER, S.; HERMANN, C.; BUSSE, R.; FLEMING, I. Phosphorylation and activation of the endothelial nitric oxide synthase by fluid shear stress. *Acta Physiol. Scand.* v. 168, n. 1, p. 81-88, 2000.

FLEMING, I.; BUSSE, R. NO: the primary EDRF. *J. Mol. Cell Cardiol.* v. 31, n. 1, p. 5-14, 1999.

FLEMING, I.; FISSLHALER, B.; DIMMELER, S.; KEMP, B.E.; BUSSE, R. Phosphorylation of Thr(495) regulates Ca(2+)/calmodulin-dependent endothelial nitric oxide synthase activity. *Circ. Res.* v. 88, n. 11, p. E68-75, 2001.

FLEMING, I.; BUSSE, R. Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* v. 284, n. 1, p. R1-R12, 2003.

FLOYD, R.; WRAY, S. Calcium transporters and signalling in smooth muscles. *Cell Calcium.* v. 42, p. 467-76, 2007.

FULTON, D.; GRATTON, J.P.; MCCABE, T.J.; FONTANA, J.; FUJIO, Y.; WALSH, K.; FRANKE, T.F.; PAPAPETROPOULOS, A.; SESSA, W.C. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature.* v. 399, n. 6736, p. 597-601, 1999.

FULTON, D.; GRATTON, J.P.; SESSA, W.C. Post-translational control of endothelial nitric oxide synthase: why isn't calcium/calmodulin enough? *J. Pharmacol. Exp. Ther.* v. 299, n. 3, p. 818-824, 2001.

GEREN, C.R.; ODELL, G.V. The biochemistry of spider venoms. In: TU, A.T. (Ed.). *Handbook of Natural Toxins: Insect poisons, allergens and other invertebrate venoms.* New York: Marcel Dekker, 1984. v. 2, p. 441-481.

GOMEZ, M.V.; KALAPOTHAKIS, E.; GUATIMOSIM, C.; PRADO, M.A. *Phoneutria nigriventer* venom: a cocktail of toxins that affect ion channels. *Cell. Mol. Neurobiol.* v. 22, p. 579-588, 2002.

GOTO, H.; SHIMADA, Y.; TANAKA, N.; TANIGAWA, K.; ITOH, T.; TERASAWA, K. Effect of extract prepared from the roots of *Paeonia lactiflora* on endothelium-dependent relaxation and antioxidant enzyme activity in rats administered high-fat diet. *Phytother. Res.* v. 13, n. 6, p. 526-528, 1999.

GOTO, K.; FUJII, K.; ABE, I.; FUJISHIMA, M. Sympathetic control of arterial membrane potential by ATP-sensitive K(+)-channels. *Hypertension.* v. 35, n. 1 Pt 2, p. 379-384, 2000.

GRAY, H. O coração. In: *Anatomia.* 29. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988. p. 433-461.

GREENE, L.J.; CAMARGO, A.C.; KRIEGER, E.M.; STEWART, J.M.; FERREIRA, S.H. Inhibition of the conversion of angiotensin I to II and potentiation of bradykinin by small peptides present in *Bothrops jararaca* venom. *Circ Res.* v. 31, n. 9, Suppl. 2, p. 62-71, 1972.

GRISHIN, E.V. Black widow spider toxins: the present and the future. *Toxicon.* v. 36, p. 1693-1701, 1998.

GUETTE, C.; LEGROS, C.; TOURNOIS, G.; GOYFFON, M.; CÉLÉRIER, M.L. Peptide profiling by matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry of the *Lasiodora parahybana* tarantula venom gland. *Toxicon.* v. 47, n. 6, p. 640-649, 2006.

HARRIS, M.B.; JU, H.; VENEMA, V.J.; LIANG, H.; ZOU, R.; MICHELL, B.J.; CHEN, Z.P.; KEMP, B.E.; VENEMA, R.C. Reciprocal phosphorylation and regulation of endothelial nitric-oxide synthase in response to bradykinin stimulation. *J. Biol. Chem.* v. 276, n. 19, p. 16587-16591, 2001.

HENNEBELLE, T.; SAHPAZ, S.; GRESSIER, B.; JOSEPH, H.; BAILLEUL, F. Antioxidant and neurosedative properties of polyphenols and iridoids from *Lippia alba*. *Phytother. Res.* v. 22, n. 2, p. 256-258, 2008.

ISBISTER, G.K.; SEYMOUR, J.E.; GRAY, M.R.; RAVEN, R.J. Bites by spiders of the family Theraphosidae in humans and canines. *Toxicon*, v. 41, p. 519-524, 2003.

JACKSON, H.; PARKS, T.N. Spider toxins: Recent applications in neurobiology. *Ann. Rev. Neurosci.* v. 12, p. 405-414, 1989.

JACKSON, W.F. Ion channels and vascular tone. *Hypertension*. v. 35, n. 2, p. 173-178, 2000.

JOSEPH, R.; PAHARI, S.; HODGSON, W.C.; KINI, R.M. Hypotensive agents from snake venoms. *Curr. Drug Targets Cardiovasc. Haematol. Disord.* v. 4, n. 4, p. 437-459, 2004.

JULIUS, S.; KJELDSEN, S.E.; WEBER, M.; BRUNNER, H.R.; EKMAN, S.; HANSSON, L.; HUA, T.; LARAGH, J.; MCINNES, G.T.; MITCHELL, L.; PLAT, F.; SCHORK, A.; SMITH, B.; ZANCHETTI, A. Outcomes in hypertensive patients at high cardiovascular risk treated with regimens based on valsartan or amlodipine: the VALUE randomised trial. *Lancet*. v. 363, n. 9426, p. 2022-2031, 2004.

KALAPOTHAKIS, E.; KUSHMERICK, C.; GUSMÃO, D.R.; FAVARON, G.O.C.; FERREIRA, A.J.; GÓMEZ, M.V.; ALMEIDA, A.P. Effects of the venom of a mygalomorph spider (*Lasiadora* sp.) on the isolated rat heart. *Toxicon*. v. 41, p. 23-28, 2003.

KALINOWSKI, L.; DOBRUCKI, I.T.; MALINSKI, T. Cicletanine stimulates nitric oxide release and scavenges superoxide in endothelial cells. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* v. 37, n. 6, p. 713-724, 2001.

KARAKI, H.; OZAKI, H.; HORI, M.; MITSUI-SAITO, M.; AMANO, K.; HARADA, K.; MIYAMOTO, S.; NAKAZAWA, H.; WON, K.J.; SATO, K. Calcium movements, distribution, and functions in smooth muscle. *Pharmacol. Rev.* v. 49, n. 2, p. 157-230, 1997.

KAWADA, T.; TOYOSATO, A.; ISLAM, M.O.; YOSHIDA, Y.; IMAI, S. cGMP-kinase mediates cGMP- and cAMP-induced Ca^{2+} desensitization of skinned rat artery. *Eur. J. Pharmacol.* v. 323, n. 1, p. 75-82, 1997.

KAWAMURA, K.; ANDO, K.; TAKEBAYASHI, S. Perivascular innervation of the mesenteric artery in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. v. 14, n. 6, p. 660-665, 1989.

KHAZAEI, M.; MOIEN-AFSHARI, F.; LAHER, I. Vascular endothelial function in health and diseases. *Pathophysiology*. v. 15, n. 1, p. 49-67, 2008.

KO, E.A.; HAN, J.; JUNG, I.D.; PARK, W.S. Physiological roles of K⁺ channels in vascular smooth muscle cells. *J. Smooth Muscle Res.* v. 44, n. 2, p. 65-81, 2008.

KOHLMAN-TRIGOBOFF, D. Hypertension management in patients with vascular disease. *J. Vasc. Nurs.* v. 22, p. 53-56, 2004.

KRUMENACKER, J.S.; HANAFY, K.A.; MURAD, F. Regulation of nitric oxide and soluble guanylyl cyclase. *Brain Res. Bull.* v. 62, n. 6, p. 505-515, 2004.

KUBISTA, H.; MAFRA, R.A.; CHONG, Y.; NICHOLSON, G.M.; BEIRÃO, P.S.; CRUZ, J.S.; BOEHM, S.; NENTWIG, W.; KUHN-NENTWIG, L. CSTX-1, a toxin from the venom of the hunting spider *Cupiennius salei*, is a selective blocker of L-type calcium channels in mammalian neurons. *Neuropharmacology*. v. 52, n. 8, p. 1650-1662, 2007.

KURAHASHI, K.; NISHIHASHI, T.; TRANDAFIR, C.C.; WANG, A.M.; MURAKAMI, S.; JI, X. Diversity of endothelium-derived vasocontracting factors

- arachidonic acid metabolites. *Acta Pharmacol. Sin.* v. 24, n. 11, p. 1065-1069, 2003.

KUSHMERICK, C.; KALAPOTHAKIS, E.; BEIRÃO, P.S.; PENAFORTE, C.L.; PRADO, V.F.; CRUZ, J.S.; DINIZ, C.R.; CORDEIRO, M.N.; GOMEZ, M.V.; ROMANO-SILVA, M.A.; PRADO, M.A. *Phoneutria nigriventer* toxin Tx3-1 blocks A-type K⁺ currents controlling Ca²⁺ oscillation frequency in GH3 cells. *J. Neurochem.* v. 72, n. 4, p. 1472-1481, 1999.

KUSHMERICK, C.; CARVALHO, F.M.; MARIA, M.; MASSENSINI, A.R.; ROMANO-SILVA, M.A.; GOMEZ, M.V.; KALAPOTHAKIS, E.; PRADO, M.A.M. Effects of a *Lasiodora* spider venom on Ca²⁺ and Na⁺ channels. *Toxicon.* v. 39, p. 991-1002, 2001.

LA ROVERE, M.T.; PINNA, G.D.; RACZAK, G. Baroreflex sensitivity: measurement and clinical implications. *Ann. Noninvasive Electrocardiol.* v. 13, n. 2, p. 191-207, 2008.

LEE, M.Y.; LEUNG, S.W.; VANHOUTTE, P.M.; MAN, R.Y. Genistein reduces agonist-induced contractions of porcine coronary arterial smooth muscle in a cyclic AMP-dependent manner. *Eur. J. Pharmacol.* v. 503, p. 165-172, 2004.

LEMOES, V.S.; FREITAS, M.R.; MULLER, B.; LINO, Y.D.; QUEIROGA, C.E.; CÔRTEZ, S.F. Dioclein, a new nitric oxide- and endothelium-dependent vasodilator flavonoid. *Eur. J. Pharmacol.* v. 386, n. 1, p. 41-46, 1999.

LENASI, H.; KOHLSTEDT, K.; FICHTLSCHERER, B.; MÜLSCH, A.; BUSSE, R.; FLEMING, I. Amlodipine activates the endothelial nitric oxide synthase by altering phosphorylation on Ser1177 and Thr495. *Cardiovasc. Res.* v. 59, n. 4, p. 844-853, 2003.

LESH, R.E.; NIXON, G.F.; FLEISCHER, S.; AIREY, J.A.; SOMLYO, A.P.; SOMLYO, A.V. Localization of ryanodine receptors in smooth muscle. *Circ. Res.* v. 82, p. 175-178, 1998.

LEUNG, F.P.; YUNG, L.M.; YAO, X.; LAHER, I.; HUANG, Y. Store-operated calcium entry in vascular smooth muscle. *Br J Pharmacol.* v. 153, n. 5, p. 846-857, 2008.

LEVY, M.N. O sistema arterial. In: BERNE, R.M.; LEVY, M.N.; KOEPPEN, B.M.; STANTON, B.A. *Fisiologia*. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. p. 373-386.

LEWIS, R. J.; GARCIA, M. L. Therapeutic potential of venom peptides. *Nat. Rev. Drug. Disc.* v. 2, n. 10, p. 790-802, 2003.

LI, S.; JI, H.; CHENG, X.; LI, B.X.; NG, T.B. Antithrombotic and thrombolytic activities of Agkisacutacin, a snake venom proteinase, in experimental models. *Gen. Pharmacol.* v. 35, n. 4, p. 179-187, 2000.

LOPES-MARTINS, R.A.; ANTUNES, E.; OLIVA, M.L.; SAMPAIO, C.A.; BURTON, J.; DE NUCCI, G. Pharmacological characterization of rabbit corpus cavernosum relaxation mediated by the tissue kallikrein-kinin system. *Br. J. Pharmacol.* v. 113, n. 1, p. 81-86, 1994.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

LUCAS, S. Sobre a distribuição geográfica dos gêneros da subfamília *Theraphosinae* Thorell, 1870 no Brasil (Araneae, Theraphosidae). *Mem. Inst. Butantan.* v. 46, p. 339-352, 1982.

LUCAS, S. Spiders in Brazil. *Toxicon*, v. 26, n. 9, p. 759-772, 1988.

LUCAS, S.; DA SILVA JR, P.I.; BERTANI, R.; CARDOSO, J.L.C. Mygalomorph spider bites: a report on 91 cases in the state of São Paulo, Brazil. *Toxicon*, v. 32, n. 10, p. 1211-1215, 1994.

LUFT, F.C. Hypertensive nephrosclerosis: update. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* v. 13, p. 147-154, 2004.

LÜSCHER, T.F.; NOLL, G. The pathogenesis of cardiovascular disease: role of the endothelium as a target and mediator. *Atherosclerosis.* v. 118, Sup, p. S81-90, 1995.

MARANGONI, S.; BORGES, N.C.; MARANGONI, R.A.; ANTUNES, E.; VIEIRA, C.A.; NOVELLO, J.C.; DOMONT, G.B.; GIGLIO, J.R.; OLIVEIRA, B.; DE NUCCI, G. Biochemical characterization of a vascular smooth muscle contracting polypeptide purified from *Phoneutria nigriventer* (armed spider) venom. *Toxicon*. v. 31, n. 4, p. 377-384, 1993.

MARÍN, J.; ENCABO, A.; BRIONES, A.; GARCÍA-COHEN, E.C.; ALONSO, M.J. Mechanisms involved in the cellular calcium homeostasis in vascular smooth muscle: calcium pumps. *Life Sci*. v. 64, n. 5, p. 279-303, 1999.

MARKS, A.R. Calcium channels expressed in vascular smooth muscle. *Circulation*. v. 86, n. 6, Sup 3, p. III 61-67, 1992.

MATOBA, T.; SHIMOKAWA, H. Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in animals and humans. *J. Pharmacol. Sci*. v. 92, n. 1, p. 1-6, 2003.

MCNEILL, J.R.; JURGENS, T.M. A systematic review of mechanisms by which natural products of plant origin evoke vasodilatation. *Can. J. Physiol. Pharmacol*. v. 84, n. 8-9, p. 803-821, 2006.

MEDHORA, M.; NARAYANAN, J.; HARDER, D.; MAIER, K.G. Identifying endothelium-derived hyperpolarizing factor: recent approaches to assay the role of epoxyeicosatrienoic acids. *Jpn. J. Pharmacol*. v. 86, n. 4, p. 369-75, 2001.

MICHELL, B.J.; CHEN, ZP.; TIGANIS, T.; STAPLETON, D.; KATSIKIS, F.; POWER, D.A.; SIM, A.T.; KEMP, B.E. Coordinated control of endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation by protein kinase C and the cAMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* v. 276, n. 21, p. 17625-17628, 2001.

MOMBOULI; J.V.; VANHOUTTE, P.M. Endothelial dysfunction: from physiology to therapy. *J. Mol. Cell Cardiol.* v. 31, p. 61-74, 1999.

NATTEL, S.; CARLSSON, L. Innovative approaches to anti-arrhythmic drug therapy. *Nat. Rev Drug Discov.* v. 5, n. 12, p. 1034-1049, 2006.

NICHOLSON, G.M. Insect-selective spider toxins targeting voltage-gated sodium channels. *Toxicon.* v. 49, p. 490-512, 2007.

NUNES, K.P.; COSTA-GONÇALVES, A.; LANZA, L.F.; CORTES, S.F.; CORDEIRO, M.N.; RICHARDSON, M.; PIMENTA, A.M.; WEBB, R.C.; LEITE, R.; DE LIMA, M.E. Tx2-6 toxin of the *Phoneutria nigriventer* spider potentiates rat erectile function. *Toxicon.* v. 51, n. 7, p. 1197-1206, 2008.

ODELL, G.V.; HUDIBURG, S.A.; HERRERO, M.; CABBINESS, S.G.; CHAN, T.K.; AIRD, S.D.; KAISER, I. Tarantula venom components: *Brachypelma smithii*, *Brachypelma emilia*, *Dugesiella hentzi* and *Aphonopelma seemanni*. *Toxicon.* v. 27, p. 67, 1989.

ODELL, G.V.; HUDIBURG, S.A.; OWNBY, C.; GRISHIN, E.; MILLS, J.; AIRD, S.; MORRIS, J. Characterization of theraphosidae spider venom components. *Toxicon*. v. 29, n. 3, p. 292, 1991.

OMORI, K.; KOTERA, J. Overview of PDEs and their regulation. *Circ Res*. v. 100, n. 3, p. 309-327, 2007.

ORALLO, F. Regulation of cytosolic calcium levels in vascular smooth muscle. *Pharmacol. Ther.* v. 69, n. 3, p. 153-171, 1996.

PACHER, P.; BECKMAN, J.S.; LIAUDET, L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol. Rev.* v. 87, n. 1, p. 315-424, 2007.

PEIREN, N.; DE GRAAF, D.C.; VANROBAEYS, F.; DANNEELS, E.L.; DEVREESE, B.; VAN BEEUMEN, J.; JACOBS, F.J. Proteomic analysis of the honey bee worker venom gland focusing on the mechanisms of protection against tissue damage. *Toxicon*. doi:10.1016/j.toxicon.2008.05.003, 2008.

PIRES, S.L.; DE ASSIS, T.S.; DE ALMEIDA, R.N.; FILHO, J.M.; JULIEN, C.; DE MEDEIROS, I.A. Endothelium-derived nitric oxide is involved in the hypotensive and vasorelaxant responses induced by the aqueous fraction of the ethanolic extract of the leaves of *Albizia inopinata* (Harms) G. P. Lewis in rats. *Phytomedicine*. v. 7, n. 2, p. 91-98, 2000.

PLATNICK, N.I. The world spider catalog. Version 8.5. New York: American Museum of Natural History, 2008. Disponível em: <<http://research.amnh.org/entomology/spiders/catalog/index.html>>. Acesso em: 20 Fev. 2008.

POHL, U.; DE WIT, C.; GLOE, T. Large arterioles in the control of blood flow: role of endothelium-dependent dilation. *Acta Physiol. Scand.* v. 168, p. 505-510, 2000.

RAMANAIAH, M.; VENKAIAH, B. Characterization of superoxide dismutase from south Indian scorpion venom. *Biochem. Int.* v. 26, n. 1, p. 113-123, 1992.

RASH, L.D.; KING, R.G.; HODGSON, W.C. Evidence that histamine is the principal pharmacological component of venom from an Australian wolf spider (*Lycosa godeffroyi*). *Toxicon.* v. 36, n. 2, p. 367-375, 1998.

RASH, L.D.; HODGSON, W.C. Pharmacology and biochemistry of spider venoms. *Toxicon.* v. 40, p. 225-254, 2002.

RATTMANN, Y.D.; PEREIRA, C.R.; CURY, Y.; GREMSKI, W.; MARQUES, M.C.; DA SILVA-SANTOS, J.E. Vascular permeability and vasodilation induced by the *Loxosceles intermedia* venom in rats: involvement of mast cell degranulation, histamine and 5-HT receptors. *Toxicon.* v. 51, n. 3, p. 363-372, 2008.

REGO, E.; BENTO, A.C.; LOPES-MARTINS, R.A.; ANTUNES, E.; NOVELLO, J.C.; MARANGONI, S.; GIGLIO, J.R.; OLIVEIRA, B.; DE NUCCI, G. Isolation and partial characterization of a polypeptide from *Phoneutria nigriventer* spider venom that relaxes rabbit corpus cavernosum in vitro. *Toxicon*. v. 34, n. 10, p. 1141-1147, 1996.

RICCIARDOLO, F.L.; STERK, P.J.; GASTON, B.; FOLKERTS, G. Nitric oxide in health and disease of the respiratory system. *Physiol. Rev.* v. 84, n. 3, p. 731-765, 2004.

RODRIGUES, A.R.; ARANTES, E.C.; MONJE, F.; STÜHMER, W.; VARANDA, W.A. Tityustoxin-K(alpha) blockade of the voltage-gated potassium channel Kv1.3. *Br. J. Pharmacol.* v. 139, n. 6, p. 1180-1186, 2003.

SAVEL-NIEMANN, A. Tarantula (*Eurypelma californicum*) venom, a multicomponent system. *Biol. Chem. Hoppe Seyler.* v. 370, n. 5, p. 485-498, 1989.

SCHANBACHER, F.L.; LEE, C.K.; HALL, J.E.; WILSON, I.B.; HOWELL, D.E.; ODELL, G.V. Composition and properties of tarantula *Dugesiella hentzi* (Girard) venom. *Toxicon*. v. 11, p. 21-29, 1973.

SCHIAPELLI, R.D.; DE PIKELIN, B.S.G. Estudio sistemático comparativo de los generos "Theraphosa" Walck., 1805; "Lasiodora" C. L. Koch, 1851 y

“Sericopelma” Ausserer, 1875 (Araneae, Theraphosidae). *Atas do Simpósio sobre a Biota Amazônica*. v. 5 (Zoologia), p. 481-494, 1967.

SCHMIDT, G. Efficacy of bites from Asiatic and African tarantulas. *Trop. Med. Parasitol.* v. 40, p. 114, 1989.

SCHVARTSMAN, S. Acidentes por Aranhas (Araneísmo). In: *Plantas Venenosas e Animais Peçonhentos*. São Paulo: Sarvier, 1992. p. 189-210.

SHARPE, I.A.; GEHRMANN, J.; LOUGHNAN, M.L.; THOMAS, L.; ADAMS, D.A.; ATKINS, A.; PALANT, E.; CRAIK, D.J.; ADAMS, D.J.; ALEWOOD, P.F.; LEWIS, R.J. Two new classes of conopeptides inhibit the α 1-adrenoceptor and noradrenaline transporter. *Nature Neurosci.* v. 4, p. 902-907, 2001.

SHIMOKAWA, H. Primary endothelial dysfunction: atherosclerosis. *J. Mol. Cell. Cardiol.* v. 31, n. 1, p. 23-37, 1999.

SILVESTRE, Flávia Galindo. Caracterização bioquímica, imunológica e molecular do veneno das aranhas do gênero *Loxosceles* e *Lasiadora*. 185 f. Orientador: Evanguedes Kalapothakis. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2005.

SMITH, C.G.; VANE, J.R. The discovery of captopril. *FASEB J.* v. 17, n. 8, p. 788-789, 2003.

SOLLOD, B.L.; WILSON, D.; ZHAXYBAYEVA, O.; GOGARTEN, J.P.; DRINKWATER, R.; KING, G.F. Were arachnids the first to use combinatorial peptide libraries? *Peptides*. v. 26, p. 131-139, 2005.

SOMLYO, A.P.; SOMLYO, A.V. Ca^{2+} sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiol Rev*. v. 83, n. 4, p. 1325-1358, 2003.

SORBEY, C.G. Potassium channel function in vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. v. 21, n. 1, p. 28-38, 2001.

SRI BALASUBASHINI, M.; KARTHIGAYAN, S.; SOMASUNDARAM, S.T.; BALASUBRAMANIAN, T.; VISWANATHAN, V.; RAVEENDRAN, P.; MENON, V.P. Fish venom (*Pterios volitans*) peptide reduces tumor burden and ameliorates oxidative stress in Ehrlich's ascites carcinoma xenografted mice. *Bioorg. Med. Chem. Lett*. v. 16, n. 24, p. 6219-6225, 2006.

STANDEN, N.B.; QUAYLE, J.M. K^+ channel modulation in arterial smooth muscle. *Acta Physiol. Scand*. v. 164, p. 549-557, 1998.

SUCHYNA, T.M.; JOHNSON, J.H.; HAMER, K.; LEYKAM, J.F.; GAGE, D.A.; CLEMO, H.F.; BAUMGARTEN, C.M.; SACHS, F. Identification of a peptide toxin from *Grammostola spatulata* spider venom that blocks cation-selective stretch-activated channels. *J. Gen. Physiol*. v. 115, n. 5, p. 583-598, 2000.

TEIXEIRA, C.E.; CORRADO, A.P.; DE NUCCI, G.; ANTUNES, E. Role of Ca²⁺ in vascular smooth muscle contractions induced by *Phoneutria nigriventer* spider venom. *Toxicon*. v. 43, n. 1, p. 61-68, 2004.

THEAKSTON, R.D.; KAMIGUTI, A.S. A list of animal toxins and some other natural products with biological activity. *Toxicon*. v. 40, n. 5, p. 579-651, 2002.

TRIGGLE, C.R.; HOLLENBERG, M.; ANDERSON, T.J.; DING, H.; JIANG, Y.; CERONI, L.; WIEHLER, W.B.; NG, E.S.; ELLIS, A.; ANDREWS, K.; MCGUIRE, J.J.; PANNIRSELVAM, M. The endothelium in health and disease - a target for therapeutic intervention. *J. Smooth Muscle Res.* v. 39, n. 6, p. 249-267, 2003.

VANE, J.; CORIN, R.E. Prostacyclin: a vascular mediator. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* v. 26, n. 6, p. 571-8, 2003.

VERANO-BRAGA, T.; ROCHA-RESENDE, C.; SILVA, D.M.; IANZER, D.; MARTIN-EAUCLAIRE, M.F.; BOUGIS, P.E.; DE LIMA, M.E.; SANTOS, R.A.; PIMENTA, A.M. *Tityus serrulatus* Hypotensins: a new family of peptides from scorpion venom. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* v. 371, n. 3, p. 515-520, 2008.

VIEIRA, A.L.; MOURA, M.B.; BABÁ, E.H.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C.; KALAPOTHAKIS, E.; CASTRO, I.M. Molecular cloning of toxins expressed by the venom gland of *Lasiadora* sp. *Toxicon*. v. 44, n. 8, p. 949-952, 2004.

WEINBERG, M.; CORDEIRO, M.N.; DE LIMA, M.E.; OLIVEIRA, L.C.; DINIZ, C. R. Endothelium-dependent relaxation of rat mesenteric arterial rings by a *Phoneutria nigriventer* venom fraction. *Jpn. J. Pharmacol.* v. 88, n. 2, p. 189-196, 2002.

WEISEL-EICHLER, A.; LIBERSAT, F. Venom effects on monoaminergic systems. *J. Comp. Physiol. A. Neuroethol. Sens. Neural Behav. Physiol.* v. 190, n. 9, p. 683-690, 2004.

WELSH, J.H.; BATTY, C.S. 5-hydroxytryptamine content of some arthropod venoms and venom-containing parts. *Toxicon*, v. 1, p. 165-173, 1963.

WILLIAMS, B. The year in hypertension. *J. Am. Coll. Cardiol.* v. 51, n. 18, p. 1803-1817, 2008.

WISE, H. Multiple signaling options for prostacyclin. *Acta Pharmacol. Sin.* v. 24, n. 7, p. 625-630, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Cardiovascular Diseases. Disponível em: < http://www.who.int/cardiovascular_diseases/en/>. Acesso em: 17 jun. 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION; INTERNATIONAL SOCIETY OF HYPERTENSION. 2003 World Health Organization (WHO) / International Society of Hypertension (ISH) statement on management of hypertension. *Journal of Hypertension.* v. 21, p. 1983-1992, 2003. Disponível em: <

http://www.who.int/cardiovascular_diseases/guidelines/hypertension_guidelines.pdf>. Acesso em: 17 jun. 2008.

ZECCHIN, H.G.; PRIVIERO, F.B.; SOUZA, C.T.; ZECCHIN, K.G.; PRADA, P.O.; CARVALHEIRA, J.B.; VELLOSO, L.A.; ANTUNES, E.; SAAD, M.J. Defective insulin and acetylcholine induction of endothelial cell-nitric oxide synthase through insulin receptor substrate/Akt signaling pathway in aorta of obese rats. *Diabetes*. v. 56, n. 4, p. 1014-1024, 2007.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)