

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

**EFEITOS CARDIOTÓXICOS DO VENENO TOTAL
E DA PROTEÍNA DERMONECRÓTICA
RECOMBINANTE DA ARANHA *Loxosceles
intermedia***

Camila Dias Lopes

BELO HORIZONTE - 2009

CAMILA DIAS LOPES

**EFEITOS CARDIOTÓXICOS DO VENENO TOTAL
E DA PROTEÍNA DERMONECRÓTICA
RECOMBINANTE DA ARANHA *Loxosceles*
*intermedia***

Dissertação de mestrado apresentada ao Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção de título de mestre em Bioquímica e Imunologia.

Orientador: Prof. Carlos Chávez Olórtegui

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

BELO HORIZONTE – 2009

DEDICATÓRIA

Aos meus pais e minha irmã pela presença, amizade e carinho.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Minas Gerais, pela oportunidade de fazer parte desta instituição desde o ensino fundamental;

Ao Prof. Dr. Carlos Chávez, por todas as oportunidades, pelo exemplo, orientação, amizade, confiança e ensinamento constante;

À Dra. Liza Felicori, pelos conselhos, ensinamentos, incentivos, disponibilidade e amizade;

À Dra. Larissa Alvarenga, pela disponibilidade, amizade e oportunidade de trabalharmos juntas;

À Gabriela Guimarães, por toda a ajuda nos experimentos, pela amizade, pelas idéias e disponibilidade;

À Profa. Dra. Sílvia Guatimosim e Éneas Gomes pela ajuda nos experimentos do confocal e pelos ensinamentos;

Ao Prof. Dr. Jader Cruz e Danilo Roman pela ajuda nos experimentos de patch clamp e pelos ensinamentos;

Ao Prof. Dr. Alvair Pinto de Almeida e Denis Damasceno pela ajuda nos experimentos com coração isolado;

À Profa. Marília Martins pelo auxílio nos ensaios bioquímicos;

Ao Dr. Claude Granier, pela ajuda na correção do artigo;

À Clara Duarte, pela ajuda com o monoclonal, pela paciência, pelos ensinamentos e pela amizade;

À Paula Batista, pelo auxílio nos ensaios bioquímicos;

Ao Prof. Tomaz Santos, pelos ensinamentos de imunologia;

Aos demais colegas do Laboratório de Imunoquímica de Proteínas pelo auxílio e convivência: Eric, Diogo, Miguel, Ricardo, Eduardo, Mariana, Dulcilene, Fernanda, Clóvis, Gabriella, Lourena, Marina, Fabíola, Luciana, Vivian;

Ao departamento de Bioquímica e Imunologia, por proporcionar essa oportunidade de aprendizado;

À Celize, Grazielle e Poliana, pela disponibilidade e carinho para resolução de problemas;

Às agências financiadoras CAPES, CNPq e FAPEMIG, pelo apoio financeiro;

Aos colegas do curso de Bases Moleculares, pela amizade, tranquilidade e discussões prazerosas;

Aos colegas e professores da Farmácia, pelo exemplo, apoio e amizade;

À minha família, por ser alegre e estar sempre presente nos momentos importantes da minha vida;

Ao Vítor Pimentel, pelo amor, paciência e carinho;

Às amigas do COLTEC, pela verdadeira amizade;

Aos amigos do GJeSCLa, por acreditarem em mim;

E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Picadas de aranhas do gênero *Loxosceles* causam numerosos acidentes em humanos no mundo todo. No Brasil, constitui a terceira maior causa de acidentes envolvendo animais venenosos. Injeção, em modelos animais, do veneno de *Loxosceles intermedia* ou da toxina dermonecrótica recombinante (LiD1r) produzem alterações cutâneas e sintomas sistêmicos similares àqueles encontrados em humanos. O intuito deste trabalho foi caracterizar os efeitos cardíacos, em camundongos, induzidos pelo veneno de *L. intermedia* e LiD1r. Antígenos do veneno foram detectados, por ELISA, no rim, coração, pulmão e fígado de camundongos experimentalmente envenenados. A atividade da enzima creatina quinase e sua fração MB encontraram-se elevadas no soro de animais tratados, por isso foi investigada uma possível ação cardíaca deste veneno. A ligação de LiD1r à cardiomiócitos foi demonstrada pela técnica de imunofluorescência usando microscopia confocal. Preparações de coração isolado de animais envenenados, usando o sistema de perfusão Langendorff, mostraram um prejuízo *in vitro* das funções cardíacas nestes animais. Cardiomiócitos ventriculares isolados de camundongos envenenados apresentaram um aumento significativo da densidade de corrente nos canais de cálcio de tipo L e do transiente intracelular de cálcio. Em suma, os resultados deste trabalho, caracterizam os efeitos cardiotoxícos do veneno da aranha *L. intermedia*. Uma proteína da família das esfingomielinases, presente neste veneno, apresenta um papel chave na disfunção cardíaca dos camundongos, como constatado pela atividade cardíaca exercida pela toxina recombinante LiD1r.

Palavras chave: *Loxosceles intermedia*, proteína dermonecrótica, LiD1r, cardiotoxicidade, cálcio.

ABSTRACT

Loxosceles spider bites cause numerous accidents in humans worldwide. In Brasil, loxoscelism brown spider envenomation constitutes the third cause of accidents by venomous animals. Injections of the whole *Loxosceles intermedia* venom or of recombinant toxin derivated of it (rLiD1) produce in animal models skin-tissue changes and systemic symptoms similar to those detected in humans. The aim of our work was to characterize de cardiac effects induced in mice by *L. intermedia* venom and rLiD1. *L. intermedia* antigens were detected in the kidney, heart, lung and liver of experimental envenomed mice by ELISA. Since serum creatine kinase and creatine kinase MB isoenzyme activities were elevated in treated mice, a cardiac action of the venom was further investigated. The binding of rLiD1 to cardiomyocytes was demonstrated by means of an immunofluorescence technique using confocal microscopy. Isolated Langendorff-perfused heart preparations from envenomed mice presented an impairment of the *in vitro* heart functions. Ventricular cardiomyocytes isolated from envenomed mice showed a significant increase of L-type calcium current density and intracellular Ca^{2+} transients. Taken together, our findings establish the cardiotoxic effects of *Loxosceles intermedia* spider venom. A protein from sphingomyelinase family plays a key role in the heart mice dysfunction, as attested by cardiac activity of the recombinant toxin rLiD1.

Keywords: *Loxosceles intermedia*, dermonecrotic protein, LiD1r, cardiotoxicity, calcium.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 AS ARANHAS.....	1
1.2 ARANHAS DO GÊNERO <i>Loxosceles</i>	2
1.3 EPIDEMIOLOGIA.....	3
1.4 LOXOSCELISMO.....	5
1.5 DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DO LOXOSCELISMO.....	8
1.6 O VENENO E SEU MECANISMO DE AÇÃO.....	10
1.7 O CORAÇÃO.....	14
2. OBJETIVOS.....	19
2.1 GERAL.....	19
2.2 ESPECÍFICOS.....	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
3.1 ANIMAIS E VENENOS.....	20
3.2 ANTICORPOS.....	20
3.3 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA DERMONECRÓTICA RECOMBINANTE (LID1R).....	21
3.4 ADMINISTRAÇÃO DO VENENO, COLETA DA AMOSTRA E QUANTIFICAÇÃO DO ANTÍGENO.....	21
3.5 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS.....	22
3.6 PREPARAÇÃO DO CORAÇÃO ISOLADO.....	22
3.7 PERFUSÃO NO SISTEMA DE LANGENDORFF.....	23
3.8 ISOLAMENTO DE CARDIOMIÓCITOS.....	24

3.9	ENSAIOS DE IMUNOFLUORESCÊNCIA.....	24
3.10	PATCH CLAMP.....	25
3.11	TRANSIENTE DE CÁLCIO.....	27
4.	RESULTADOS.....	28
4.1	CINÉTICA DE DISTRIBUIÇÃO DO VENENO	28
4.2	ANÁLISE DE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS.....	32
4.3	AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO CARDÍACA.....	33
4.4	ENSAIOS DE IMUNOFLUORESCÊNCIA.....	37
4.5	CORRENTE DE CÁLCIO.....	40
4.6	TRANSIENTE DE CÁLCIO.....	45
5.	DISCUSSÃO.....	47
6.	CONCLUSÕES.....	54
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55
8.	ANEXO.....	67

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Morfologia das aranhas.....	1
FIGURA 2: Aranha marrom.....	3
FIGURA 3: Distribuição geográfica dos casos de loxoscelismo no Brasil no ano de 2006.....	4
FIGURA 4: Notificações de picadas de aranhas do gênero <i>Loxosceles</i> em minas gerais no período de 2001 a 2006.....	5
FIGURA 5: Loxoscelismo cutâneo.....	6
FIGURA 6: Loxoscelismo víscero-cutâneo.....	7
FIGURA 7: Atividade elétrica no tecido cardíaco.....	14
FIGURA 8: Maquinaria contrátil da célula muscular cardíaca.....	15
FIGURA 9: Dinâmica de cálcio nos cardiomiócitos ventriculares.....	16
FIGURA 10: Patch-clamp convencional.....	17
FIGURA 11: Protocolo para obtenção de $I_{Ca,L}$	26
FIGURA 12: Concentração do veneno no soro de camundongos, encontrada por ELISA, em diferentes tempos após a injeção do veneno..	28
FIGURA 13: Concentração do veneno no rim de camundongos, encontrada por ELISA, em diferentes tempos após a injeção do veneno.....	29
FIGURA 14: Concentração do veneno no coração de camundongos, encontrada por ELISA, em diferentes tempos após a injeção do veneno..	30
FIGURA 15: Concentração do veneno no pulmão e fígado de camundongos, encontrada por ELISA, em diferentes tempos após a injeção do veneno.....	30
FIGURA 16: Biodistribuição do veneno de <i>L. intermedia</i> no rim, coração, pulmão e fígado, determinado por ELISA, após a injeção subcutânea em camundongos de 2,5 µg do veneno.....	31

FIGURA 17: Níveis de creatina quinase total, no soro dos camundongos, após o envenenamento com o veneno de <i>L. intermedia</i> ou a toxina LiD1r ou após a injeção de PBS (grupo controle).....	32
FIGURA 18: Níveis da isoenzima MB da creatina quinase, no soro dos camundongos, após o envenenamento com o veneno de <i>L. intermedia</i> ou a toxina LiD1r ou após a injeção de PBS (grupo controle).....	33
FIGURA 19: Tensão sistólica dos corações isolados de camundongos que receberam injeções de veneno <i>L. intermedia</i> , LiD1r ou PBS (controle).....	35
FIGURA 20: Frequência cardíaca dos corações isolados de camundongos que receberam injeções de veneno <i>L. intermedia</i> , LiD1r ou PBS (controle).....	36
FIGURA 21: Localização de LiD1r por imunofluorescência em cardiomiócitos de camundongos.....	38
FIGURA 22: Imagens representativas do ensaio de competição.....	39
FIGURA 23: Diminuição da intensidade de fluorescência após pré-incubação com LimAb7.....	40
FIGURA 24: Traçados representativos da corrente de pico de cálcio em células controle e tratadas.....	41
FIGURA 25: Média das capacitâncias dos cardiomiócitos avaliados nos grupos controle e tratado.....	41
FIGURA 26: Densidade de corrente versus voltagem e dependência de voltagem para ativação de I_{Ca} na célula de animais tratados e controle....	42
FIGURA 27: Cinética de ativação de $I_{Ca,L}$ nos cardiomiócitos tratados e controle.....	44
FIGURA 28: Transiente global de Ca^{2+} em cardiomiócitos de animais controle e tratados com a proteína dermonecrótica recombinante (LiD1r).....	46

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Número de notificações de acordo com o gênero da aranha e o tempo gasto entre a picada e o atendimento médico.....	5
TABELA 2: Tratamento do loxoscelismo preconizado pelo Ministério da Saúde.....	10
TABELA 3: Transcritos de maior abundância na glândula do veneno de <i>L. laeta</i>	11
TABELA 4: Parâmetros para ativação de I_{Ca} encontrados nas células dos grupos controle e tratado com LiD1r.....	43

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Sigla/Abreviatura	
ATP	Adenosina trifosfato
AV	A trio- v entricular
C1q	Subunidade q da enzima C1
CK-MB	C reatina q uinase isoenzima MB
CK-T	C reatina q uinase t otal
CRO-alfa	G rowth-regulated o ncogene- alpha
DMEM	D ulbecco's M odified E agle M edium
ELISA	E nzyme L inked I mmuno S orbent A ssay
GM-CSF	G ranulocyte M onocyte C olony S timulating F actor
HPLC	H igh p erformance l iquid c hromatography
IgG	I munoglobulina G
I _{Ca,L}	Corrente nos canais de cálcio do tipo L
IL8	I nterleucina 8
i.p	I ntraperitoneal
KDa	K ilo d alton
Li	<i>Loxosceles intermedia</i>
LiD1	<i>Loxosceles intermedia</i> proteína d ermonecrótica 1
LiD1r	<i>Loxosceles intermedia</i> proteína d ermonecrótica 1 recombinante
LimAb7	<i>Loxosceles intermedia</i> m onoclonal A ntibody 7
LPA	Ácido lisofosfatídico
MCP-1	M onocyte c hemotactic p rotein- 1
PBS	Tampão salina fosfato
PI	P ré- i mmune
rpm	R otações p or m inuto
s.c.	subcutânea
Smase	Esfingomielinase
SA	S ino- a trial
VD	V entrículo d ireito
VE	V entrículo e squerdo

1 INTRODUÇÃO

1.1 AS ARANHAS

As aranhas são animais pertencentes ao filo dos artrópodes, classe dos aracnídeos, que se diferenciaram a mais de 300 milhões de anos na evolução. Existem 40.700 espécies de aranhas descritas e estima-se um total de 170.000 espécies no mundo. (Platnick, 2009); (Rash e Hodgson 2002); (Vetter e Visscher 1998).

As aranhas podem ser encontradas em quase todos os ambientes terrestres, do litoral às regiões altas e de desertos às regiões de florestas tropicais. A maioria das aranhas não tem comportamento agressivo e seu veneno geralmente tem pouco ou nenhum efeito sobre o tecido dos mamíferos. Poucas espécies podem causar efeitos deletérios ao homem, mas a maioria produz apenas pequenas feridas. (Rash e Hodgson 2002); (Swanson e Vetter, 2005).

Todas as aranhas são carnívoras, alimentando-se principalmente de insetos, exercendo grande importância para o equilíbrio ecológico. Apresentam o corpo dividido em cefalotórax (união entre cabeça e tórax) e abdômen. No cefalotórax articulam-se quatro pares de pernas, um par de pedipalpos e um par de quelíceras. O abdômen pode conter de duas a oito fiandeiras. (Lucas, 1988); (Ruppert, 1996).

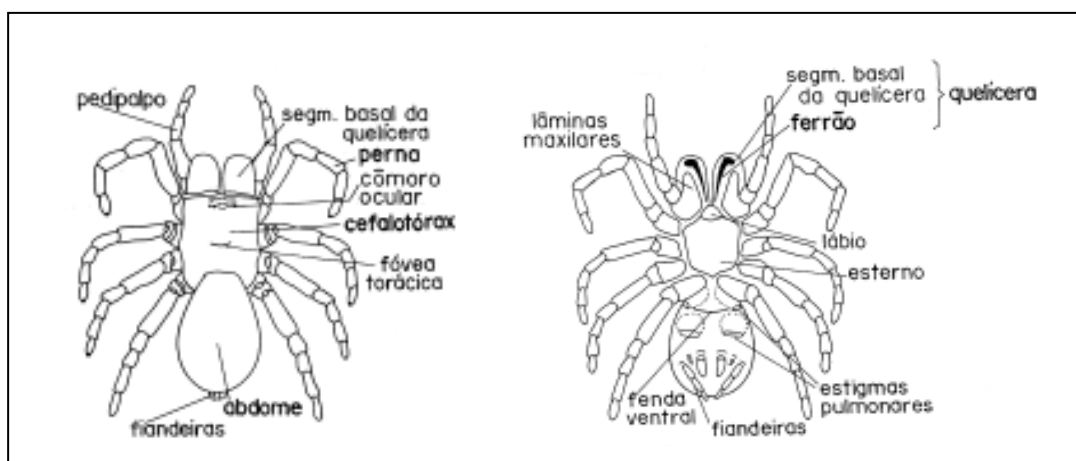


Figura 1: Morfologia externa das aranhas. Representação esquemática das estruturas e da divisão corporal do animal em vista dorsal (esquerdo) e ventral (direita). (Ministério da Saúde, 2001).

Existem dois grupos principais de aranhas: o Orthognatha (ou Migalomorfa) e o Labdognatha (ou Araneomorfa). No primeiro, as quelíceras projetam-se para frente do cefalotórax enquanto as presas posicionam-se para baixo. Já no segundo grupo, as quelíceras são posicionadas verticalmente e, em conjunto com os ferrões, se movem lateralmente como pinças. Os três gêneros de maior importância médica no Brasil encontram-se no grupo das araneomorfas: *Lactrodectus* (viúva negra), *Loxosceles* (aranha marrom ou violino) e *Phoneutria* (armadeira). (Rash e Hodgson 2002); (Vetter e Visscher 1998).

1.2 ARANHAS DO GÊNERO *Loxosceles*

A aranha cujas proteínas e veneno fazem parte deste trabalho, são classificadas como pertencentes ao filo Artropoda, subfilo *Chelicerata*, ordem *Araneae*, subordem *Araneomorpha*, família *Sicariidae*, gênero *Loxosceles*. (Platnick, 2009).

Os representantes deste gênero apresentam coloração marrom que varia de marrom pálido (*L. laeta*) a chocolate escuro (*L. gaucho*). Devido a este fato são popularmente conhecidos como aranhas marrons. Também são chamados de aranhas-violino, já que, podem apresentar uma mancha escura na região dorsal do cefalotórax na forma de um violino (Fig. 2A), porém ela nem sempre é visível. (Futrell, 1992); (da Silva et al., 2004).

São aranhas muito pequenas, medem de 2 a 3 cm de perna a perna. As pernas e o corpo são cobertos com pêlos finos. A característica mais consistente e mais fácil para identificação de aranhas deste gênero é o padrão dos olhos: apresenta 6 olhos arranjados aos pares (Fig. 2B) (Futrell, 1992); (Vetter e Visscher, 1998).

As aranhas *Loxosceles* não são agressivas, são mais ativas à noite e podem estar presentes em ambientes intradomiciliares, podendo infestar casas em grandes números. (Vetter e col., 2002). O surgimento destas grandes populações, em condições adversas, pode ser explicado por observações em um estudo do comportamento alimentar destes animais que demonstrou sua preferência por presas mortas às vivas, tolerando até o uso de inseticidas (Sandidge, 2003).

Estes aracnídeos podem ser encontrados em armários, sótãos e atrás de móveis, pois preferem lugares escuros e secos, e escondem-se também em roupas, lençóis e calçados. A maioria dos acidentes em humanos ocorre quando as aranhas são pressionadas contra o corpo (Lucas, 1988); (Sezerino et al., 1998); (Schenone e Reyes, 1963).



Figura 2: Aranha marrom. (A) Aspecto geral de uma aranha do gênero *Loxosceles*. (Pereira, 2009). (B) *Loxosceles reclusa* mostrando o padrão dos 6 olhos arranjados aos pares e mancha em forma de violino (Swanson e Vetter, 2005).

1.3 EPIDEMIOLOGIA

Os representantes do gênero *Loxosceles* estão distribuídos amplamente em regiões temperadas e regiões tropicais. É possível encontrar espécies de importância clínica na América do Norte e do Sul, África, Europa (Wasserman e Andeson, 1983); (Futrell, 1992); (White et al. 1995) e Oceania (Southcott, 1976). Várias são as espécies deste gênero descritas no Brasil, sendo as principais causadoras de acidentes: *L. intermedia*, *L. laeta* e *L. gaucho*.

Há registros de casos de loxoscelismo em todo o país, atingindo 7.540 casos em 2006 (Fig. 3). A maior incidência de acidentes ocorre na região Sul do país, onde foram notificados 92% dos casos registrados em 2006. (Ministério da Saúde, 2005); (Ministério da Saúde, 2006).

A maioria dos casos são intradomiciliares e ocorrem quando os pacientes estão se vestindo (21,7%), dormindo (17,2%) ou fazendo alguma atividade em casa (15,4%).

As picadas ocorrem mais em mulheres e em maior número nos meses de verão (outubro a março). (Sezerino et al. 1998); (Ribeiro et al. 1993).

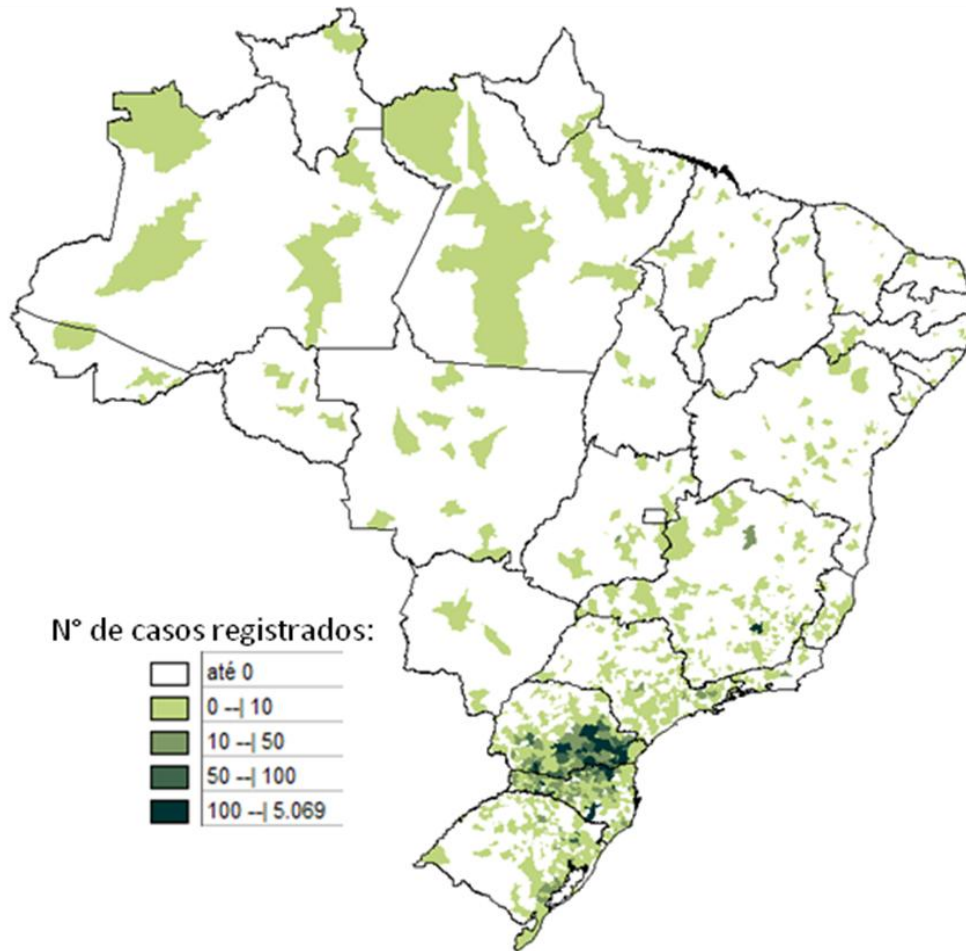


Figura 3: Distribuição geográfica dos casos de loxoscelismo Brasil no ano de 2006. (Ministério da Saúde, 2006); (Wen, 2006).

As regiões do corpo onde as picadas são mais freqüentes são os membros inferiores e superiores. Em 2006, 73,4% dos casos foram classificados como leves, 23,6% moderados e 1,9% graves. No período de 2001 a 2006, o número de curas com seqüelas foi de 475. (Sezerino et al. 1998); (Ministério da Saúde, 2006).

Diferentemente dos casos com aranhas de outros gêneros, a maioria dos acidentados leva 12 horas ou mais para procurar atendimento médico já que uma grande parcela não sente a picada (Tabela 1). Dificilmente o paciente vê aranha e menos de 10% levam a aranha ao local de atendimento médico (Ribeiro et al., 1993); (Ministério da Saúde, 2006).

Tabela 1: Número de notificações de acordo com o gênero da aranha e o tempo gasto entre a picada e o atendimento médico. (Ministério da Saúde, 2006)

Gênero da aranha	Ign/Branco	0-1 hora	1-3 horas	3-6 horas	6-12 horas	12 e + horas
<i>Phoneutria</i>	131	1127	813	261	133	210
<i>Loxosceles</i>	940	542	705	586	830	4016
<i>Latrodectus</i>	7	22	25	9	7	17
Outros gêneros	88	480	309	132	112	297

Em Minas Gerais, o número de casos vem aumentando nos últimos anos (Fig.4). Na capital, foram encontradas aranhas em algumas casas no bairro como Belvedere, Serra e Cidade Jardim. Representantes da espécie *L. similis* também foram encontradas no interior e exterior de casas na capital. (Silvestre et al., 2005); (Ministério da Saúde, 2006).

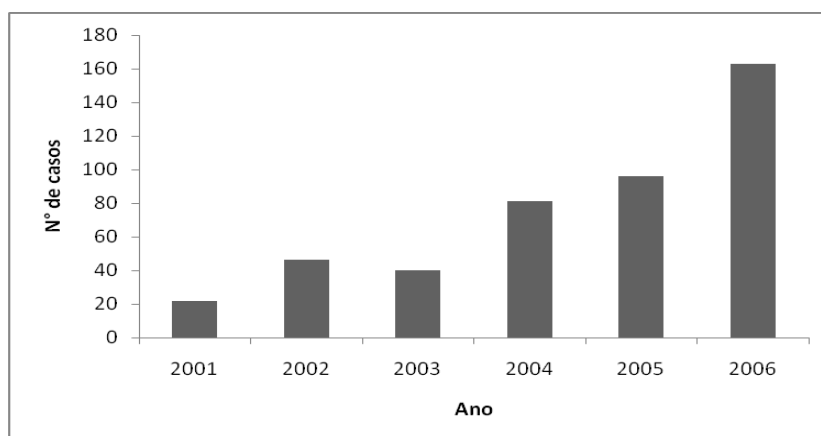


Figura 4: Notificações de picadas de aranhas do gênero *Loxosceles* em Minas Gerais no período de 2001 a 2006. (Ministério da Saúde, 2006)

1.4 LOXOSCELISMO

Os sinais e sintomas clínicos desenvolvidos após o envenenamento por aranhas do gênero *Loxosceles* são conhecidos como loxoscelismo (Schenone et al., 1989); (Ribeiro et al., 1993).

Uma das apresentações clínicas do loxoscelismo é a forma cutânea (Fig. 5). Ela é caracterizada pela lesão dermonecrotica no local da picada, podendo levar semanas

para cicatrização. Em casos mais raros, além da lesão local, há o desenvolvimento do loxoscelismo viscero-cutâneo que envolve efeitos sistêmicos, entre os quais se destacam: distúrbios da hemostase e falência renal aguda (Schenone et al., 1989); (Futrell, 1992).



Figura 5: Loxoscelismo cutâneo. Evolução de um paciente com quadro de loxoscelismo cutâneo, mostrando os dias 5 (A), 27 (B), 41 (C) e 76 (D) após a picada. (Wen, 2009)

Inicialmente o local da picada é relativamente indolor e o paciente, geralmente, não descobre que foi picado. A dor, variando de moderada a grave, se inicia de 2 a 8 horas após a picada. Pode ocorrer também o aparecimento de pus, eritema transiente, com coceira e febre. Com o passar das horas ou dias a lesão adquire um aspecto que é denominado de placa marmórea e, vesículas e bolhas de conteúdo hemorrágico podem se formar. Após 3 a 7 dias, a área dermonecrótica se torna bem delimitada e uma escara é formada. A escara pode se soltar deixando uma úlcera profunda que pode se cicatrizar ou não, podendo levar a seqüelas deformantes e causar, até mesmo, prejuízo funcional (Futrell, 1992).

Existem muitas condições de diferentes etiologias (infecciosas e não infecciosas) que geram uma lesão dermonecrótica, levando a um diagnóstico errôneo pelos profissionais da saúde. A lesão geralmente é confundida com outras doenças de pele como infecção por *Staphylococcus* ou *Streptococcus*, antrax cutâneo, infecções por herpes e *Varicella zoster*, picadas de insetos e até mesmo com quadros de úlcera diabética. Um estudo realizado em 4 estados norte-americanos mostrou que, há um

número alto de diagnóstico de picadas em locais não-endêmicos, onde nunca foram coletadas aranhas do gênero *Loxosceles* (Vetter et al., 2003); (Swanson e Vetter, 2005).

A forma víscero-cutânea é bem menos comum que a cutânea, atingindo 3 (Cardoso et al., 1988) a 13% dos pacientes (Sezerino et al., 1998), mas pode ser também a causa de complicações e, até mesmo, de mortes. Os sintomas sistêmicos incluem febre, náusea, vômito, calafrios, febre, cefaléia e erupção cutânea. (Martinez-Vargas, 1987); (Lung e Mallory, 2000).



Figura 6: Loxoscelismo víscero-cutâneo. Evolução da urina de um paciente com loxoscelismo víscero-cutâneo. (Maguiña-Vargas, 2006)

Entre as alterações hematológicas estão presentes agregação plaquetária, gerando um quadro de trombocitopenia (Bascur et al. 1982), anemia hemolítica e coagulação intravascular disseminada (Williams et al. 1995) provocando alterações nos exames laboratoriais como hemoglobinemia, hiperbilirrubinemia indireta, hemoglobinúria. A insuficiência renal aguda, conseqüência da nefrotoxicidade causada pelo veneno, também é bem descrita levando a hematúria e proteinúria. (Futrell, 1992); (Wasserman e Anderson, 1984); (Lung e Mallory, 2000); (Luciano et al, 2004).

Aumento dos níveis plasmáticos humanos de enzimas hepáticas com alanina aminotransferase e aspartato aminotransferase também já foram relatados e já foi demonstrado efeito hepatotóxico em ratos tratados com o veneno. (França et al., 2002); (De Souza et al., 2008); (Christoff et al., 2008).

O desenvolvimento e evolução de cada forma clínica dependem de fatores relacionados ao paciente como predisposição genética, idade e condição imunológica

(Barreto et al., 1985); (Sezerino et al., 1998); (Wasserman e Anderson, 1983). A quantidade de veneno injetado, a espécie e sexo da aranha, o tempo para procura ao atendimento e a presença de bactérias como *Clostridium perfringens* também podem influenciar no prognóstico do paciente (Barbaro et al., 1994); (Oliveira et al., 1999); (Ministério da Saúde, 2001); (Monteiro et al. 2002).

1.5 DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DO LOXOSCELISMO

O diagnóstico padrão dos acidentes com aranhas é a coleta e identificação correta da aranha responsável pela lesão encontrada (Swanson e Vetter, 2006). Porém o diagnóstico do loxoscelismo, na maioria dos casos, não é baseado na identificação da aranha, uma vez que, o paciente raramente leva a aranha quando procura atendimento. Desta forma, supõe-se que o paciente foi picado por uma aranha do gênero *Loxosceles* através de dados históricos e epidemiológicos ou sintomas e sinais clínicos (Vetter, 1999); (Málaque et al., 2002). Dependendo do local geográfico que a lesão dermonecrótica ocorre, outras etiologias devem ser consideradas, já que diagnósticos errados são freqüentes (Swanson e Vetter, 2005).

Já foram desenvolvidos ensaios imunoenzimáticos para o diagnóstico da lesão através da identificação do veneno no tecido lesionado (Cardoso *et. al.*, 1990), no soro (Chávez-Olórtegui et al., 1998) e em aspirados, cabelos e biópsias da pele (Krywko e Gomez, 2002). Apesar do grande potencial dos testes laboratoriais, ainda é preciso uma melhor correlação clínica e uma análise estatística mais apurada. Também não se encontra disponível no mercado nenhum kit comercial (Da Silva et al., 2004).

Na forma víscero-cutânea do envenenamento, alguns testes laboratoriais e características clínicas podem ser úteis na determinação da presença da forma sistêmica e da sua gravidade. Entre eles, estão a evidência de reticulocitose, aumento dos níveis de haptoglobina livre, lactato desidrogenase e bilirrubina indireta. Os níveis de creatina quinase devem ser monitorados, principalmente quando os pacientes apresentarem uma extensa lesão dermonecrótica e apresentarem sintomas clínicos sistêmicos (Hogan et al., 2004). A coloração da urina também deve ser observada, já

que a hemoglobínúria pode ser um indicativo de hemólise intravascular (Bernstein e Ehrlich, 1986).

Ainda não existe um tratamento definido para os casos de loxoscelismo. Vários tratamentos já foram descritos, com vantagens e desvantagens, mas todos eles dependem do tempo levado entre a picada e a apresentação do paciente ao atendimento médico. Não há nenhum consenso sobre a eficácia de nenhuma das terapias já descritas. Tem sido utilizada a administração de dapsona nos Estados Unidos e no Brasil, apesar dos dados na literatura serem bastante contraditórios (Hogan et al., 2004) e do grande número de potenciais efeitos colaterais. Também são empregados anti-histamínicos e corticóides (Schenone, 2003), analgésicos e antibióticos para prevenção de infecção secundária (Rees et al. 1987).

No Brasil, o Ministério da Saúde preconiza o uso de soroterapia apenas em casos moderados a graves (Tabela 2). Está disponível para utilização o soro antiloxoscélico, produzido pelo Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos do Estado do Paraná (CPPI), contendo anticorpos contra o veneno das principais espécies do gênero *Loxosceles* causadoras de acidentes no Brasil (*L. gaucho*, *L. laeta* e *L. intermedia*) e o soro anti-aracnídico (AAS), do Instituto Butantan, que é produzido a partir de venenos de *Loxosceles gaucho*, *Phoneutria nigriventer* e *Tityus serrulatus*. A limitação do uso de antiveneno é dita como decorrente do diagnóstico tardio, com a lesão dermonecrótica já bem delimitada. Nestes casos, recomenda-se o uso de antissépticos, lavagem com permanganato de potássio diluído e curativos locais até que ocorra a remoção da escara e o acompanhamento cirúrgico para o manejo da úlcera e correção da cicatriz (Ministério da saúde, 2005).

Tabela 2: Tratamento do loxoscelismo preconizado pelo Ministério da saúde (Ministério da Saúde, 2005).

Acidente	Soro	Gravidade	Nº de ampolas
Loxoscelismo	Antiloxoscélico (SALox) ou antiaracnídico (SAA)	Leve: aranha identificada, lesão inaracterística, ausência de comprometimento sistêmico	-
		Moderada: independentemente da identificação do agente, lesão sugestiva ou característica, manifestações sistêmicas inespecíficas (exantema, febre), ausência de hemólise	5*
		Grave: lesão característica, manifestações clínicas e/ou evidências laboratoriais de hemólise intravascular	10*

*Recomenda-se a associação com prednisona (adultos: 40mg/dia; crianças: 1mg/kg/dia) durante 5 dias.

Mesmo tendo-se constatado a eficiência do tratamento com antivenenos, seu emprego deve ser cauteloso uma vez que 6,5% (Sezerino et al., 1998) a 20% (Pinhati et al., 1999) dos pacientes apresentam reações adversas à administração do antiveneno.

1.6 O VENENO E SEU MECANISMO DE AÇÃO

O principal propósito do veneno é paralisar ou matar a presa, e, também, propiciar uma digestão primária. Também é provável que o veneno atue como um mecanismo de defesa contra possíveis predadores (Rash e Hodgson, 2002).

A quantidade de veneno obtida experimentalmente varia de acordo com a espécie do gênero *Loxosceles*. A eletroestimulação (Maretic, 1987) é um dos métodos mais eficazes para tal, entretanto o veneno pode ser também obtido através das quelíceras, das glândulas de veneno ou do cefalotórax, porém nestes métodos a aranha pode, voluntariamente, regular a liberação do veneno ou também pode haver contaminação com outros constituintes, uma vez que os extratos do cefalotórax contêm muitas impurezas.

A aranha *L. reclusa* libera 4 µL de veneno com 65 a 100 µg de proteína enquanto a aranha *L. intermedia* secreta entre 35 e 40 µg de veneno por extração (Forrester et al., 1978); (Tambourgi et al., 2004).

O veneno das diferentes espécies do gênero *Loxosceles* é uma mistura de proteínas com perfil eletroforético semelhante, contendo um grupo de proteínas de

baixo peso molecular (5-40kDa), um grupo de proteínas dermonecróticas com a massa molecular variando de 30 a 40 kDa, um grupo de metaloproteases de ampla faixa de peso molecular e serinoproteases de alto peso molecular (60 a 95 kDa) (Barbaro et al., 1992); (Veiga et al., 2000a); (da Silva et al., 2004).

Um estudo do transcriptoma das glândulas do veneno da aranha *L. laeta* revelou como transcrito mais abundante a esfingomielinase D (Tabela 3), proteína já descrita em vários trabalhos como a principal causadora dos efeitos locais e sistêmicos advindos do envenenamento. Além dela, dentre os transcritos classificados como “possíveis toxinas”, foram encontrados metaloproteases, serinoproteases, hialuronidases, lipases, C-lectinas, cisteino peptidases e inibidores, nucleotidases, quitinases e neurotoxinas (Fernandes-Pedrosa et al., 2008).

Tabela 3: Transcritos de maior abundância na glândula do veneno de *L. laeta* (Fernandes-Pedrosa et al., 2008).

Groups	Number of clusters	Number of clones	Clones/clusters	% of total	Putative identification
1	542	741	1.37	24.6	No Hit*
2	91	489	5.37	16.3	Sphingomyelinase D*
3	59	248	4.20	8.2	Metalloproteinase*
4	83	105	1.27	3.5	Unknown Function*
5	9	75	8.33	2.5	Troponin
6	4	55	13.75	1.8	Actin
7	14	46	3.29	1.5	Hsp*
8	7	43	6.14	1.4	Elongation Factor
9	7	41	5.86	1.4	Salivary protein*
10	3	38	12.67	1.3	5'-nucleotidase*
11	7	36	5.14	1.2	Myosin
12	5	26	5.20	0.9	Chitinase*
13	4	23	5.75	0.8	Tubulin
14	2	23	11.50	0.8	LIM protein
15	6	22	3.67	0.7	PDI*
16	2	18	9.00	0.6	Venom allergen III*
17	6	15	2.50	0.5	Lectin*
18	12	14	1.17	0.5	Serine Protease*
19	2	13	6.50	0.4	ATP-binding
20	9	12	1.33	0.4	Ubiquitin

The (*) designates the detection of a putative signal peptide, predicted by using SignalP 3.0 program [54].

O mecanismo de ação do veneno ainda está sob investigação, uma vez que ele é um processo complexo e multifatorial envolvendo interações com a membrana celular assim como componentes da matriz extracelular, levando a ativação de plaquetas, complemento e células polimorfonucleares, com a liberação de citocinas e quimiocinas.

A enzima hialuronidase degrada ácido hialurônico, componente presente na matrix extracelular de vertebrados, sendo por isso, considerada a responsável por aumentar a difusão de toxinas e ajudar no espalhamento gravitacional da lesão, uma característica do envenenamento loxoscélico (Futrell, 1992); (Young e Pincus, 2001); (da Silva *et. al.*2004).

Veiga e colaboradores (2000b) detectaram, usando cortes de tecido tratados com o veneno, uma destruição na estrutura da membrana basal do tecido conectivo e uma degradação parcial de constituintes da matriz extracelular. Também já foi demonstrado a ação proteolítica de metaloproteinases do veneno na fibronectina e fibrinogênio (loxolisina A) e gelatina (loxolisina B) sugerindo a sua participação no processo dermonecrótico (Feitosa *et. al.* 1998).

O veneno loxoscélico também induz a produção de quimiocinas em células endoteliais, promovendo a liberação de IL-8, GRO-alfa, MCP-1 e GM-CSF, como também estimulando a expressão de E-selectina. Estes mediadores amplificam a resposta inflamatória responsável pelo aumento da lesão local e reação sistêmica ao veneno (Patel *et al.* 1994); (Gomez *et al.* 1999).

A esfingomielinase D, também chamada de proteína dermonecrótica, é a molécula mais bem caracterizada no veneno. Ela realiza a catálise da esfingomielina, através de uma reação ácido-base, dependente do íon magnésio, envolvendo 2 histidinas. Os produtos gerados pela quebra deste fosfolípido, presente em membranas celulares, são fosforilcolina e ceramida 1-fosfato (Goni e Alonso, 2002); (Murakami, 2006).

Esta enzima também catalisa a hidrólise da lisofosfatidil colina, gerando o mediador lipídico ácido lisofosfatídico (LPA), um conhecido indutor de agregação plaquetária, permeabilidade endotelial e respostas pro-inflamatórias. (Meeteren *et al.* 2004). As esfingomielinases das aranhas do gênero *Loxosceles* são capazes de produzir lesões dermonecróticas, hemólise e agregação plaquetária (Kurpiewski *et al.*, 1981); (Tambourgi *et al.*, 1998).

As toxinas esfingomielinásicas do veneno de *Loxosceles intermedia* também induzem a lise de eritrócitos, por ação indireta, através da ativação do complemento. A

toxina induz a clivagem das glicoforinas da superfície celular através da ativação de metaloproteinases endógenas, facilitando a ativação da via alternativa do complemento (Tambourgi et al., 2000). Outros resultados sugerem que a susceptibilidade das hemácias à ação do complemento, pode ser causada, também, pela perda da assimetria da célula devido à exposição de fosfatidilserinas (Tambourgi et al. 2002). Subseqüentes trabalhos realizados pelo mesmo grupo mostraram que o início da cascata de complemento se dá pela ligação direta de C1q às células tratadas com a toxina dermonecrótica recombinante (Tambourgi et al., 2007).

Chaim e colaboradores (2006) demonstraram que camundongos expostos a uma proteína dermonecrótica recombinante de *L. intermedia* sofrem lesão renal semelhante aquela obtida anteriormente com o veneno total (Luciano et al. 2004), provocando alterações que incluíam edema glomerular e necrose tubular, mostrando uma ação direta desta toxina sobre este tecido. Posteriormente, o mesmo grupo evidenciou que uma isoforma desta proteína mutada no sítio catalítico (sem atividade fosfolipásica) não tem ação nefrotóxica, concluindo que a ação nefrotóxica é dependente da atividade catalítica (Kusma et al. 2008). Um recente trabalho também mostrou o efeito do veneno e da proteína recombinante sobre o fígado de ratos. Porém, com relação à ação hepatotóxica do veneno, a proteína dermonecrótica parece ser apenas parcialmente responsável (Christoff et al., 2008).

Apesar de alguns sinais clínicos do loxoscelismo terem sido bem relatados, e moléculas presentes no veneno e eventos fisiopatológicos envolvidos na destruição celular serem caracterizados como descrito anteriormente, informações sobre a cinética de distribuição do veneno e, ainda, sobre o efeito do veneno em outros órgãos, como coração, ainda são limitados. Este trabalho tem o propósito de avaliar este efeito e por isso torna-se necessária uma breve introdução sobre a fisiologia cardíaca.

1.7 O CORAÇÃO

O sistema cardiovascular tem como função primária a distribuição de sangue aos tecidos, fornecendo, por meio deste, os nutrientes essenciais para o metabolismo das células, enquanto, ao mesmo tempo, remove os produtos do metabolismo. O coração atua como uma bomba proporcionando o deslocamento de sangue ao longo da seqüência de vasos sanguíneos, já que, ao se contrair gera a pressão necessária (Constanzo, 2005).

A função mecânica normal do coração depende de uma função elétrica apropriada, refletida em uma ativação seqüencial de células especializadas, em regiões “marcapasso” e na propagação desta atividade através dos ventrículos (Nerbonne e Kass, 2005). Os potenciais de ação, gerados no nodo sinoatrial, são então, conduzidos por todo o miocárdio (fig. 7), em seqüência temporalmente definida e segue-se então a contração, também em seqüência específica, para a ejeção eficiente de sangue.

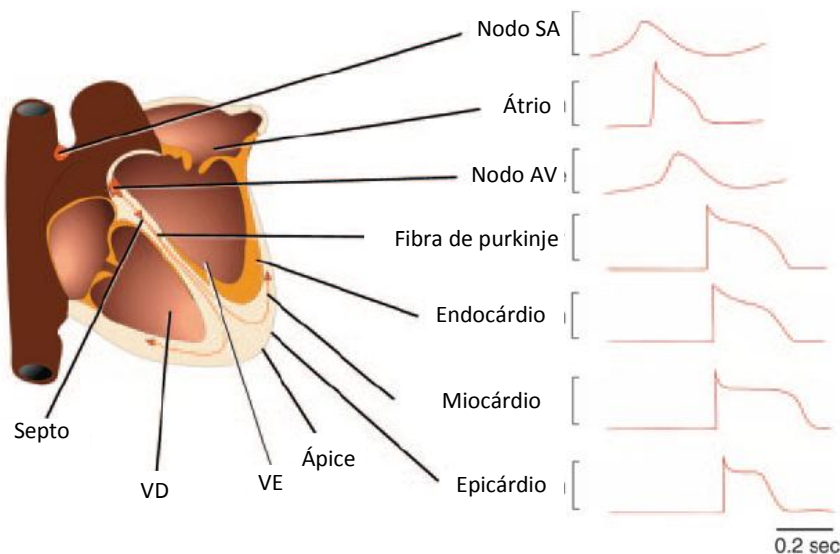


Figura 7: Atividade elétrica no tecido cardíaco. (Nerbonne e Kass, 2005)

A maquinaria contrátil básica do músculo cardíaco (fig. 8) é semelhante ao músculo esquelético. O batimento do coração depende da força gerada pelos sarcômeros, através da interação dos filamentos grossos, que são compostos de miosina, com os filamentos finos que contêm três proteínas: actina, tropomiosina e

troponina. A actina é uma proteína globular, que quando polimerizada, forma dois filamentos torcidos e contem um sítio fixador de miosina. A tropomiosina bloqueia o sítio ligação de miosina. A troponina é composta de três subunidades: C, T e I. A subunidade C se liga ao cálcio. Quando o cálcio se prende a troponina C, ocorre uma alteração conformacional, que remove o bloqueio, exercido pela tropomiosina, da interação actina-miosina, deflagrando a contração (Mudd e Kass, 2008).

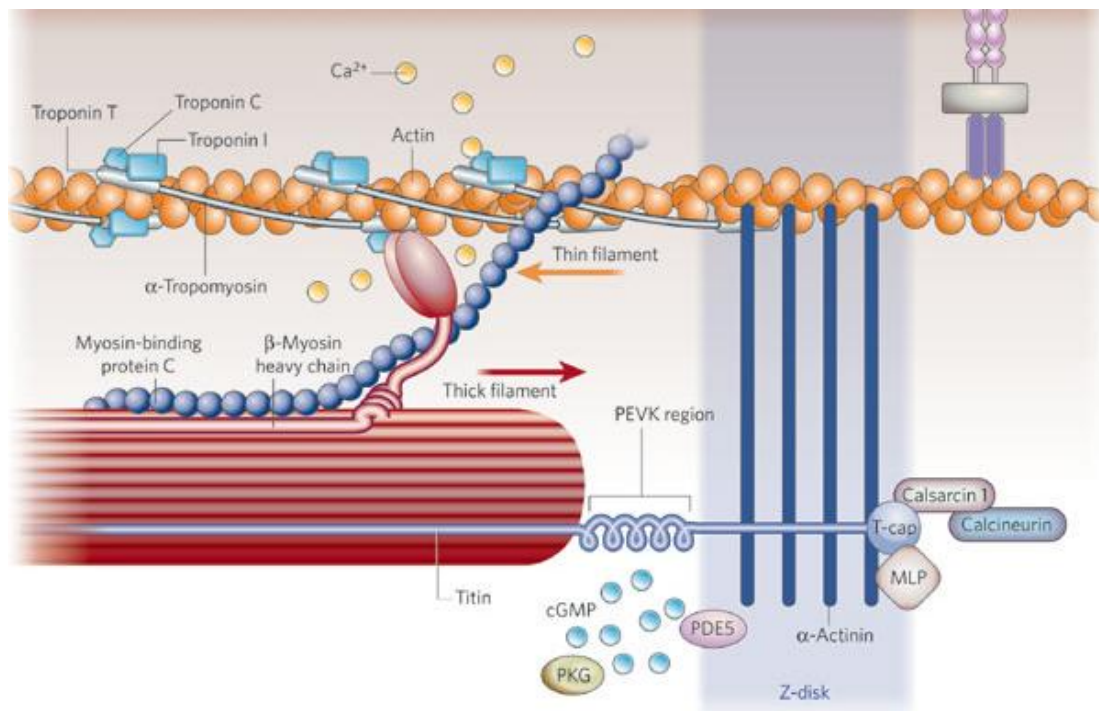


Figura 8: Maquinaria contrátil da célula muscular cardíaca (Mudd e Kass, 2008).

A entrada de cálcio na célula ocorre durante a despolarização da célula no potencial de ação (fig. 9), através da abertura dos canais de cálcio voltagem-dependente (canais do tipo L), que contribuem para o platô durante o potencial de ação. Esta entrada de cálcio provoca a liberação de cálcio pelo retículo sarcoplasmático (através do canal/receptor de rianodina –RyR). A combinação do influxo de cálcio e sua liberação provocam um aumento tempo-dependente da concentração intracelular de cálcio ($[Ca^{2+}]_i$), também chamado transiente de cálcio, permitindo que este íon se ligue a troponina C e, conseqüentemente, provocando a ativação da maquinaria contrátil, já descrita anteriormente (Bers, 2005).

Para que o relaxamento ocorra torna-se necessária a retirada do cálcio do citosol (fig. 9), processo que é mediado por ação da bomba Ca^{2+} ATPase do retículo sacoplasmático (SERCA2A), trocador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX), Ca^{2+} ATPase sarcolemal e pelo transportador de cálcio mitocondrial. (Bers, 2002)

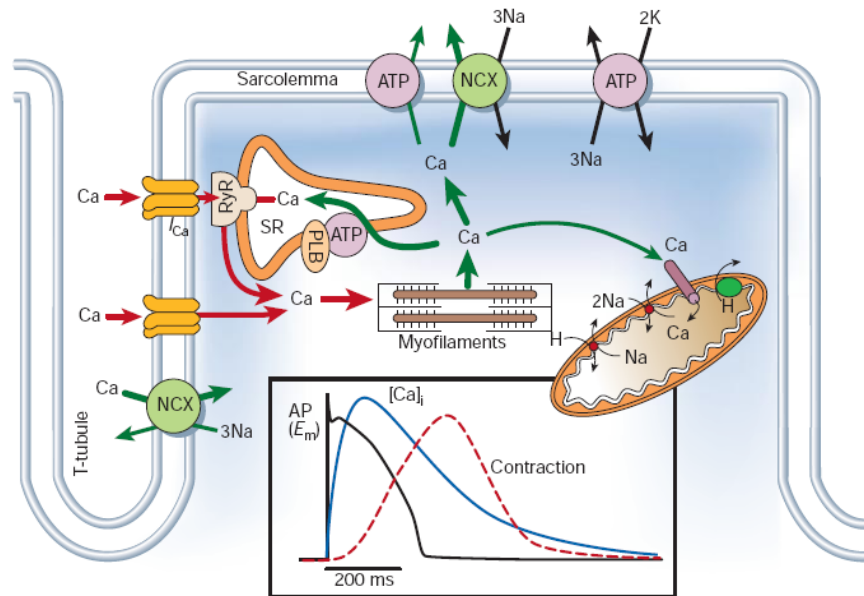


Figura 9: Dinâmica de cálcio nos cardiomiócitos ventriculares (Berbs, 2002) Representado no quadro inferior: o potencial de ação (linha preta), variação intracelular da concentração de cálcio (linha azul) e a contração/relaxamento do miócito cardíaco (linha vermelha).

Existem atualmente ferramentas muito úteis para verificar as alterações provocadas por diferentes substâncias sobre a fisiologia cardíaca. Uma metodologia simples, de baixo custo e que permite a medida de vários parâmetros é a perfusão de coração isolado de acordo com o sistema de Langendorff.

A preparação de coração isolado de mamíferos é feita através da retirada do coração e canulamento da aorta. A cânula é ligada a um reservatório contendo o líquido de perfusão, cuja as concentrações iônicas mimetizam aquelas que contêm o plasma, que é mantido a uma temperatura de 37°C e constantemente gaseificado com gás carbônico para atingir o pH fisiológico de 7,4.

O diferencial deste método está na presença de um órgão intacto que, quando provido de um ambiente propício (oxigenação, fluido de perfusão e temperatura), bate espontaneamente baseado na natureza miogênica da iniciação do impulso. Apesar do fato do coração estar isolado do corpo, o método continua fisiologicamente aceitável permitindo a medida de parâmetros como frequência cardíaca e força de contração (Skrzypiec-Spring et al., 2007).

Canais iônicos representam alvos altamente atrativos para drogas e estão implicados em uma diversa gama de alterações orgânicas, particularmente no sistema nervoso central e no sistema cardiovascular (Dulop et al., 2008).

O patch-clamp (fig. 10) é uma das técnicas mais poderosas disponíveis para o estudo dos aspectos funcionais de canais dependentes de voltagem. Mudanças na voltagem, produzidas por esta técnica, causam a mudança dos canais para diferentes estados, e estas transições são monitoradas através de mudanças na corrente da membrana. O patch-clamp pode ser usado para ativar diferentes populações de canais seletivamente (como por exemplo, os canais de cálcio tipo L presentes em cardiomiócitos), permitindo sua identificação e estudo detalhado após manipulação com uma diversidade de compostos como drogas ou toxinas (Jackson, 2001).

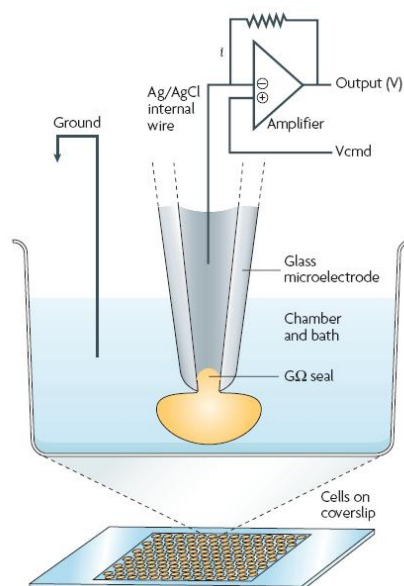


Figura 10: Patch-clamp convencional (Dulop et al., 2008).

No patch-clamp convencional usa-se microeletrodos de vidro que fazem uma sucção na superfície da célula com uma resistência em torno de gigaohms permitindo o acesso elétrico ao interior da célula e medidas de alta fidelidade das correntes iônicas que passam pelos canais presentes na membrana. O microeletrodo entra em contato com uma única célula por vez, para formação da vedação em gigaohms, e subseqüentemente, a região da membrana plasmática que está abaixo do selo é rompida, por uma pressão negativa, para ganhar acesso ao interior da célula e permitindo o controle da voltagem (Dulop et al., 2008).

Tendo em vista o grave problema do loxoscelismo no Brasil, o estudo da cinética de distribuição do veneno e ação deste veneno em diferentes tecidos torna-se relevante para o melhor entendimento do seu mecanismo de ação. Além disso, nas manifestações víscero-cutâneas algumas características clínicas e laboratorias podem auxiliar na determinação da presença e gravidade da doença.

A literatura atual é carente em dados que correlacionam alterações cardíacas e o loxoscelismo. Nesse sentido, o trabalho aqui apresentado contribui com a avaliação da presença do veneno em diferentes órgãos de animais tratados, em diferentes tempos após a injeção e, também, com as alterações provocadas pelo veneno e proteína dermonecrótica recombinante no coração.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAIS

Identificar a presença em diferentes tecidos e caracterizar a atividade cardiotoxica do veneno total de *L. intermedia* e da proteína dermonecrótica recombinante (LiD1r).

2.2 ESPECÍFICOS

- ❖ Determinar a cinética de distribuição do veneno em diferentes órgãos de camundongos, injetados com o veneno total de *L. intermedia*, através do método de ELISA.
- ❖ Analisar as alterações de parâmetros de contratilidade cardíaca, pelo veneno e LiD1r, através da perfusão de corações isolados de animais previamente tratados.
- ❖ Utilizar testes bioquímicos para investigar lesão cardíaca de camundongos experimentalmente envenenados.
- ❖ Avaliar a ligação direta da LiD1r a cardiomiócitos através de ensaios de imunofluorescência mediante microscopia confocal.
- ❖ Avaliar a inibição da ligação da proteína dermonecrótica recombinante à cardiomiócitos através de ensaios com anticorpos previamente caracterizados.
- ❖ Avaliar a funcionalidade do acoplamento excitação contração em camundongos envenenados com LiD1r.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS E VENENOS

Os camundongos utilizados nos experimentos foram fêmeas Balb/c e machos C57BL/6J de 8 a 10 semanas de idade, provenientes do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas (CEBIO) da UFMG. Os animais foram mantidos no biotério do departamento de Bioquímica e Imunologia do ICB e receberam água e ração sob condições ambientais controladas. Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com o guia para utilização de animais de laboratório e aprovado pelo Comitê de Ética de Experimentação Animal da UFMG, número 276/08.

O veneno das aranhas da espécie *Loxosceles intermedia* foi fornecido pelo Laboratório de Pesquisa com Animais Peçonhentos (LIPAPE) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, Brasil. O veneno foi obtido por eletrochoque de 15 V no cefalotórax das aranhas. Em seguida, o veneno foi liofilizado e armazenado em criotubos de polipropileno de 1,5mL, à -80°C até a utilização e, posteriormente, diluído em PBS.

3.2 ANTICORPOS

O plasma hiperimune de cavalo contra o veneno de *L. intermedia* foi obtido seguindo os protocolos convencionais de imunização Centro de Produção e pesquisa de imunobiológicos do Estado do Paraná (CPPI). Fragmentos F(ab')₂ foram obtidos pela precipitação com sulfato de amônio, digestão parcial com pepsina e purificados por cromatografia de afinidade numa coluna de sepharose ligada ao veneno de *L. intermedia* como descrito por Chávez-Olortegui et al. (1994).

Anticorpos murinos monoclonais neutralizantes contra proteínas dermonecróticas do veneno de *L. intermedia* (LimAb) foram produzidos como descrito por Alvarenga et al. (2003). LimAb7 foi purificado por cromatografia de afinidade numa coluna de sepharose ligada ao veneno de *L. intermedia* como descrito por Chávez-Olortegui et al. (1994).

3.3 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA DERMONECRÓTICA RECOMBINANTE (LiD1r)

A proteína dermonecrótica recombinante foi expressa em bactérias *Escherichia coli* BL21 usando o cDNA de LiD1 (Kalapothakis et al., 2002) subclonado no vetor pET11a e purificada por cromatografia de fase reversa em HPLC usando uma coluna C8 Vydac como descrito anteriormente por Felicori et al. (2006).

3.4 ADMINISTRAÇÃO DO VENENO, COLETA DA AMOSTRA E QUANTIFICAÇÃO DO ANTÍGENO

Vinte e oito camundongos receberam injeções subcutâneas de 100µL de PBS (tampão fosfato 0,05 M e 0,015 M de NaCl, pH 7,4), contendo 2,5 µg de veneno bruto de *Loxosceles intermedia*. Os animais foram divididos em grupos de 4 e mortos em 15 e 30 minutos e 1, 2, 3, 4 e 8 horas após a injeção do veneno. Quatro animais foram usados como controle e receberam apenas injeções de 100µL de PBS.

Após a coleta do sangue pela veia subclávica, os animais foram submetidos a uma perfusão vascular com 40 a 50 mL de solução salina 0,85% a 37°C através de um catéter colocado no ventrículo esquerdo. Amostras de tecido foram obtidas do coração (ápice), pulmão (lobo inferior direito), fígado (lobo direito), rim (pólo inferior direito) e cérebro (lobo frontal direito).

O soro foi separado do sangue logo depois da coleta por centrifugação à 3000 rpm por 5 minutos e congelado à -20°C. As amostras de tecido foram pesadas em uma balança analítica e 150mg de cada tecido coletado foi obtido e congelado a -20°C. O material foi posteriormente descongelado, macerado, diluído em PBS, sonificado e centrifugado por 10 minutos à 10.000 rpm em temperatura ambiente. O sobrenadante foi congelado e mantido à -20°C até a realização da ELISA.

A ELISA foi realizada no formato sanduíche, no qual são realizadas duas etapas contendo anticorpos, intercaladas com uma etapa de incubação da amostra que se deseja determinar a concentração do antígeno.

Microplacas de ELISA FALCON (BD Bioscience, USA) de 96 poços foram sensibilizadas durante à noite a 4°C com uma solução contendo 5 µg/mL de IgG F(ab')₂ anti-*L. intermedia* diluído em tampão bicarbonato de sódio 0,02M, pH 9,6. Após este período, as placas foram lavadas três vezes com solução de lavagem PBS 0,05% tween 20 (SL) e bloqueadas com solução de bloqueio (caseína 2% em PBS) por uma hora à 37°C. As placas foram novamente lavadas com SL e o sobrenadante do material obtido dos tecidos (100 µL) ou o soro na diluição 1:2 foram dispostos na placa, e incubados a 37°C por uma hora. Após nova lavagem com SL, a placa foi incubada com IgG F(ab')₂ anti-*L. intermedia* conjugado a enzima peroxidase por uma hora a 37°C. A ligação do anticorpo secundário é inferida pela atividade enzimática, utilizando a água oxigenada como substrato. Após a lavagem, coloca-se 100µL da solução de revelação (0,04% de OPD em 0,33mg/mL de tampão citrato pH 5,2 e 0,04% de água oxigenada). Após 15 minutos de incubação, a reação é interrompida pela adição de 20µL de ácido sulfúrico diluído 1:20.

Para determinação das concentrações de veneno nos tecidos foi feita uma curva padrão com o veneno contendo as seguintes concentrações: 0,1; 0,2; 0,4; 0,8; 1,6; 3,2; 6,4; 12,5; 25 e 50 ng/poço. O *cut-off* foi determinado usando os animais controle. As leituras da absorbância foram feitas a 492nm em um leitor de ELISA TITERTEK multiscan.

3.5 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

Para as análises bioquímicas, grupos de cinco camundongos C57BL/6J foram injetados com veneno bruto *L. intermedia* ou de LiD1r, por via intraperitoneal (i.p.), na dose de 1µg/g de camundongo. Como grupo controle, cinco animais receberam apenas PBS pela mesma via. Após quatro horas de envenamento, 500 µL de sangue foram coletados pela artéria femoral de camundongos anestesiados com uma associação de xilazina e ketamina. O sangue foi então centrifugado à 3.000 rpm por 5 minutos e soro utilizado para as análises bioquímicas. Os níveis da isoenzima MB da creatina quinase (CK-MB) e creatina quinase total foram determinados através da utilização de kits comerciais da Bioclin (Quibasa, Brasil) e as leituras foram feitas no aparelho TP Analyzer Basic (Thermo Plate).

3.6 PREPARAÇÃO DE CORAÇÃO ISOLADO

Os animais foram decapitados 10 a 15 minutos após injeção intraperitoneal com heparina 140 UI, diluída em 100 µL de salina. O tórax foi aberto e posteriormente as cartilagens condrocostais em ambos os lados e o esterno rebatido para cima, expondo dessa forma a cavidade torácica. Em seguida, seccionou-se a veia cava superior e inferior, e as artérias aorta e pulmonar, a traquéia, o esôfago, juntamente com parte dos pulmões, sendo dessa forma o coração retirado em bloco. Logo após, o coração foi colocado em uma placa de petri contendo 100 ml de solução tampão (ST) gelada (em mM: NaCl 130, Ácido Láctico 1, Ácido Pirúvico 3, HEPES 25, MgCl₂ 0.5, NaH₂PO₄ 0.33, D-glicose 22, e 5 µL de solução estoque de insulina a 100µg/ml , com pH em 7.4), que tinha como objetivo diminuir o metabolismo do tecido cardíaco. Na placa de petri todos os tecidos, exceto o coração, foram removidos, deixando amostra o coto da aorta. O coração foi canulado pelo coto da aorta, com o auxílio de duas pinças, e fixado na cânula por uma linha. O coração canulado foi então colocado no sistema de Langendorff para o início da perfusão retrógrada. Dependendo do procedimento experimental a ser realizado as células cardíacas isoladas foram obtidas ou o coração utilizado para avaliar a capacidade contrátil do órgão isolado.

3.7 PERFUSÃO NO SISTEMA DE LANGENDORFF

Grupo de quatro camundongos, envenenados por uma hora com o veneno de *L. intermedia*, com LiD1r ou injetados i.p. com PBS como controle, tiveram seus corações isolados de acordo com o procedimento descrito acima. Os corações foram então perfundidos com uma solução de Krebs-Ringer (contendo em mM 118,4 NaCl, 4,7 KCl, 1,2 KH₂PO₄, 1,2 MgSO₄, 2,5 CaCl₂, 11,7 glicose, e 26,5 NaHCO₃). Colocou-se uma concentração alta de glicose para superar uma possível limitação da captação de glicose pelos cardiomiócitos. O fluxo de perfusão (2,3-2,6mL/min) foi mantido constante durante os experimentos a 37°C e sob constante oxigenação com 5% CO₂ e 95% O₂. Para averiguar a tensão sistólica, foi colocado no ápice do coração um transdutor de força previamente calibrado com por um peso padrão de 10 g, o qual permitia averiguar a força de contração (tensão, g.). Uma tensão diastólica de 0,2-0,5g foi aplicada ao coração. Tensão e pressão de perfusão foram constantemente

registradas. Estes parâmetros foram registrados em um computador através de um sistema de aquisição de dados (Biopac System, Inc., Santa Barbara, CA, USA). A pressão de perfusão coronariana foi medida através de um transdutor de pressão conectado a cânula aórtica e acoplado ao sistema de aquisição de dados. A frequência cardíaca foi inferida através de mudanças na tensão cardíaca. Após um período basal (20 minutos), os corações foram perfundidos por um período adicional de 30 minutos no qual foram gravados os parâmetros de interesse (Castro et. al., 2006).

3.8 ISOLAMENTO DOS CARDIOMIÓCITOS

Para a obtenção de cardiomiócitos utilizou-se o procedimento padrão para dissociação enzimática como descrito por Mitra e Morad (1985). Os corações colocados em um sistema de Langendorff, perfundidos por cerca de cinco minutos com ST. Posteriormente os corações foram perfundidos por 10 a 15 minutos com uma solução contendo 1mg/mL de colagenase tipo II (Worthington, USA) e 0,17 mg/mL protease tipo IX (Sigma). O coração digerido foi removido da cânula e a região dos ventrículos foi separada e cortada em pequenos pedaços. Células isoladas foram obtidas por isolamento mecânico. Após a dissociação dos cardiomiócitos ventriculares, as células foram colocadas em meio de cultura DMEN (Sigma) com soro fetal bovino à 10% (Cultilab, Brasil). Apenas células tolerantes ao cálcio, quiescentes e com estrias bem definidas foram utilizadas. Os cardiomiócitos foram usados até 2 a 3 horas após o final da preparação.

3.9 ENSAIOS DE IMUNOFLORESCÊNCIA

Para a realização dos ensaios de imunofluorescência, cardiomiócitos isolados (em 500 µL de DMEN contendo 10% soro fetal bovino) foram incubados com 10 µg de LiD1r por 30 minutos à temperatura ambiente (T.A.), sob agitação. As células foram então incubadas com 20 µg anticorpos monoclonais anti-*L. intermedia* neutralizantes (LimAb7) por 30 minutos à T.A. sob agitação. Após este período foi adicionado mais 500µL de meio, e a preparação foi incubada com anticorpos secundários (1:500) anti-IgG de camundongo conjugados com fluorescência Alexa Fluor 488 (Invitrogen, USA) cuja excitação é no comprimento de 488nm e emissão em 510nm. As células foram

rapidamente centrifugadas, o sobrenadante foi retirado e 1mL de meio foi adicionado ao tubo. Um microscópio confocal Zeiss 510 Meta foi utilizado para a visualização da fluorescência. As imagens obtidas foram então analisadas no programa Image J, onde foi obtida a relação pixels por área das células. Dois grupos controles foram realizados, um contendo apenas o anticorpo secundário e o outro contendo o anticorpo secundário e primário.

Para o ensaio de competição com o antígeno, o anticorpo monoclonal ou IgG pré-imune de camundongo separadamente (50 µg) foram pré-incubado, antes do contato com as células, com a toxina (10 µg) por 30 minutos, à T.A. sob agitação e o protocolo de imunofluorescência foi o mesmo descrito anteriormente.

3.10 PATCH-CLAMP

Um amplificador EPC 9.2 (HEKA Instruments, Germany) foi utilizado para estudar os parâmetros eletrofisiológicos de células ventriculares cardíacas isoladas. Todas as medidas foram realizadas utilizando-se as configurações 'whole-cell voltage-clamp', para medir as correntes totais de membrana de acordo com Hamill et al. (1981). Após a obtenção da configuração "whole-cell", foram esperados cerca de 3-5 minutos para permitir o equilíbrio entre solução de pipeta e citoplasma. As pipetas utilizadas nos experimentos possuíam resistência entre 1-3 MΩ. Todas as correntes foram filtradas com filtro no modo passa-baixa com frequência de corte de 2.9 kHz.

Para medir a corrente de cálcio (I_{Ca}) foi utilizado solução interna (mM): 120 CsCl, 20 TEA-Cl, 5 NaCl, 10 Hepes, 5 EGTA, pH 7.2 ajustado com CsOH, sendo a solução externa Tyrode. I_{Ca} foi medida entre os potenciais de -40 a 50 mV, com duração de 300 ms, com incrementos de 10 mV, partindo-se de um potencial de membrana de -80 mV. Um pré-pulso de 50 ms de duração, partindo do potencial de membrana a -40 mV foi aplicado para inativar as correntes de sódio (I_{Na}). A aquisição dos dados foi realizada com frequência entre pulsos de 0.1 Hz, e frequência de aquisição a 10 kHz.

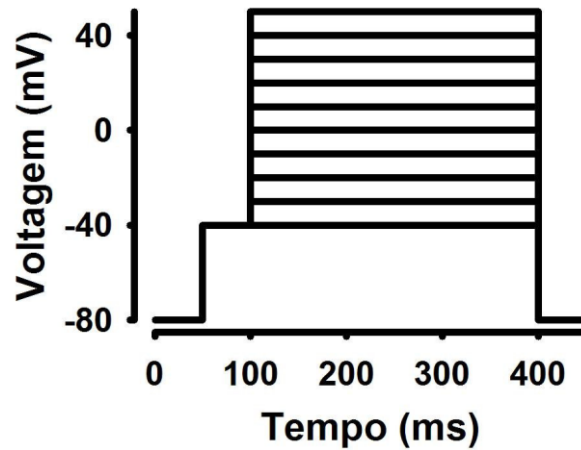


Figura 11: Protocolo para obtenção das $I_{Ca,L}$. Partindo-se de um potencial de membrana de -80 mV, é aplicado um pré-pulso a -40 mV, de 50ms de duração, com posterior incrementos de 10 mV até 50 mV, com pulso de duração de 300 ms.

As correntes foram analisadas quantificando o valor mínimo da correntes de entrada, normalizando os valores pelo valor de capacitância da célula. As correntes foram registradas e analisadas usando os programas Origin 8.0 e Sigmaplot 10.0. A constante de tempo do decaimento foi ajustada por uma ou a soma de duas funções exponenciais, segundo as equações 1 e 2.

$$f(t) = A_0 + [A \cdot \exp(-t/\tau)] \quad \text{equação (1)}$$

$$f(t) = A_0 + [A_{\text{rápido}} \cdot \exp(-t/\tau_{\text{rápido}})] + [A_{\text{lento}} \cdot \exp(-t/\tau_{\text{lento}})] \quad \text{equação (2)}$$

Sendo A_0 , corrente que não sofre inativação ao final do pulso; $A_{\text{rápido}}$, contribuição do componente rápido para o decaimento da corrente; A_{lento} , contribuição do componente lento para o decaimento da corrente; t , tempo; τ , constante de tempo para o decaimento da corrente; $\tau_{\text{rápido}}$, constante de tempo para o componente rápido da corrente; τ_{lento} , constante de tempo para o componente lento da corrente.

A relação da densidade de corrente versus voltagem foi ajustada, de acordo com a função não-linear (3):

$$I_v = G_{\text{max}} \cdot (V_m - E_k) / [1 + \exp(V_a - V_m)] \cdot S^{-1} \quad \text{equação (3)}$$

Onde, G_{max} , condutância máxima; V_m , potencial de membrana; E_k , potencial de equilíbrio eletroquímico do íon; V_a , voltagem que ativa 50% dos canais; S , slope factor.

Através dos valores obtidos do pico das correntes avaliadas foi calculada a condutância, bem como a dependência de voltagem para ativação, de acordo com as equações abaixo.

$$g = I_{pico} / (V_m - E_k) \quad \text{equação (4)}$$

$$g/g_{max} = 1 / (1 + \exp((V_m - V_{0,5})/S)) + 1 \quad \text{equação (5)}$$

Onde, I_{pico} , corrente máxima; V_m , potencial de membrana, E_k , potencial de equilíbrio eletroquímico do íon; g , condutância em um dado potencial; g_{max} , condutância máxima; $V_{0,5}$, potencial para ativar 50% dos canais; S , slope factor.

3.11 TRANSIENTE DE CÁLCIO

Para a realização da medida do transiente de cálcio intracelular, foi feita uma incubação dos cardiomiócitos com uma sonda fluorescente sensível a cálcio (fluo 4 AM – 5 μ mol/L), excitada no comprimento de onda 488nm e com emissão em 515nm, durante 30 minutos à T.A.. Após a marcação, o excesso de sonda foi removido e adicionado novamente DMEN para a realização dos experimentos. As células cardíacas foram estimuladas na frequência de 1 hertz, com um pulso quadrado de duração de 5ms e 30V. Após a aplicação de 8 pulsos elétricos foi feita uma varredura repetitiva ao longo de uma linha no eixo longitudinal das células (512 x 3000 pixels), com laser argônio (488nm) e frequência de aquisição de 1,54 ms, utilizando-se um microscópio confocal Zeiss 510 Meta (Guatimosim et al., 2001).

4 RESULTADOS

4.1 CINÉTICA DE DISTRIBUIÇÃO DO VENENO

A cinética de distribuição do veneno de *L. intermedia* foi estudada em camundongos experimentalmente envenenados. A concentração do veneno destas aranhas foi acompanhada através do tempo (10, 15, 30 minutos e 1, 2, 4 e 8 horas) retirando coração, pulmão, fígado, rim e cérebro dos animais tratados. As concentrações em cada tecido foram inferidas por ELISA sanduíche, usando-se o sobrenadante dos tecidos processados destes animais e uma curva padrão, contendo apenas o veneno.

A evolução temporal da concentração de antígenos do veneno no soro dos camundongos envenenados pode ser observada na figura 12. A concentração de antígenos circulantes tem um pico em cerca de 15 minutos após a injeção e os níveis detectados diminuem drasticamente após 4hs, mostrando uma cinética muito rápida no compartimento vascular.

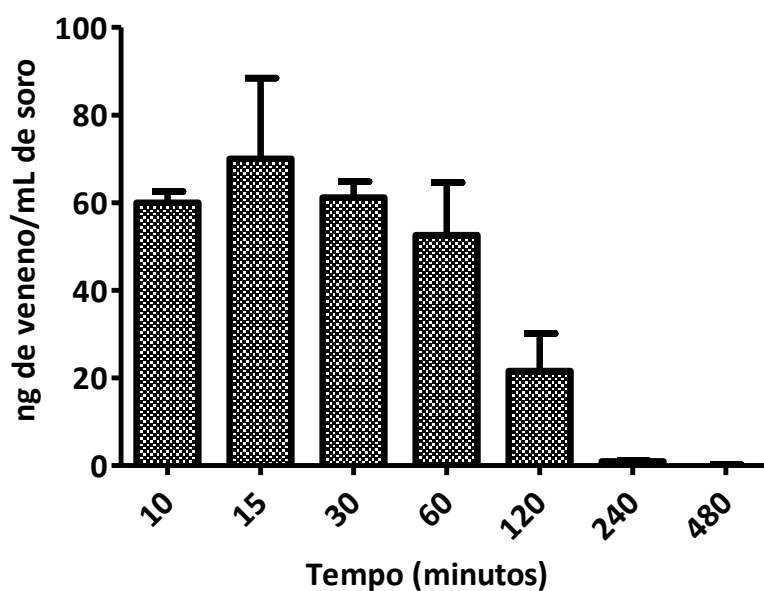


Figura 12: Concentração do veneno no soro dos camundongos, encontrada por ELISA, em diferentes tempos após a injeção do veneno. (Os dados são expressos em média±EPM)

As concentrações do veneno encontradas no rim, de acordo com o tempo decorrido após a injeção, estão mostradas na fig. 13. Foi visto que há uma alta concentração do veneno entre 10 minutos e 1 hora neste tecido, que não variou muito durante este período, permanecendo em torno de 12 ng por 150mg de tecido. Após 2 horas, a quantidade de veneno neste órgão reduziu enormemente, cerca de 50%, chegando a 6 ng por 150 mg de tecido e, após 8 horas, a quantidade reduziu mais 50%, atingindo cerca de 3 ng.

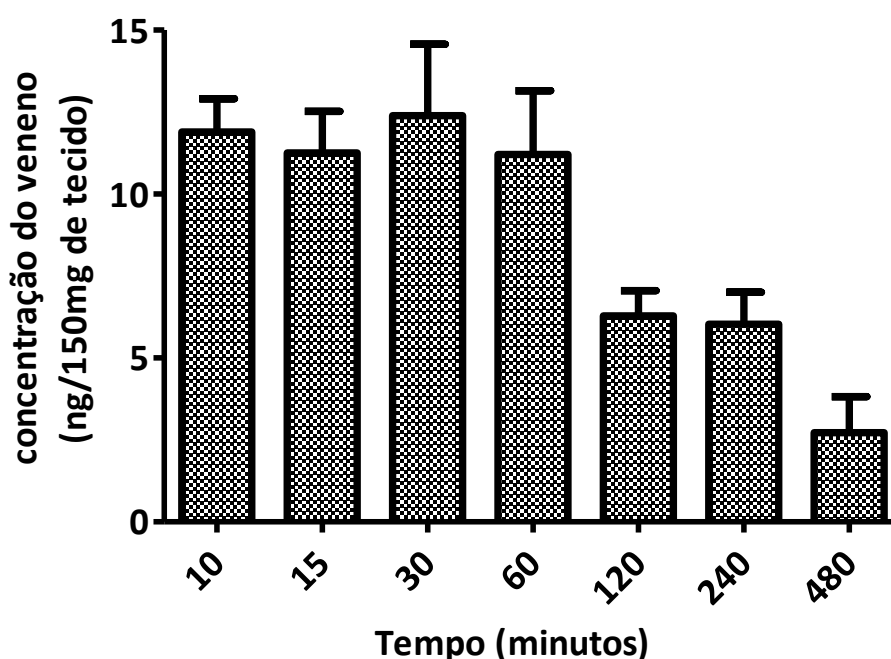


Figura 13: Concentração do veneno no rim dos camundongos, encontrada por ELISA, em diferentes tempos após a injeção do veneno. (Os dados são expressos em média±EPM)

No coração a concentração do veneno, 10 minutos após sua injeção, foi de 3,4 ng por 150mg de tecido (fig. 14). O pico máximo de concentração do veneno foi em torno dos 15 minutos, com uma concentração de aproximadamente 6 ng por 150 mg de tecido. A quantidade de veneno neste órgão caiu cerca de um terço após 2 horas e os níveis continuaram detectáveis após 8 horas.

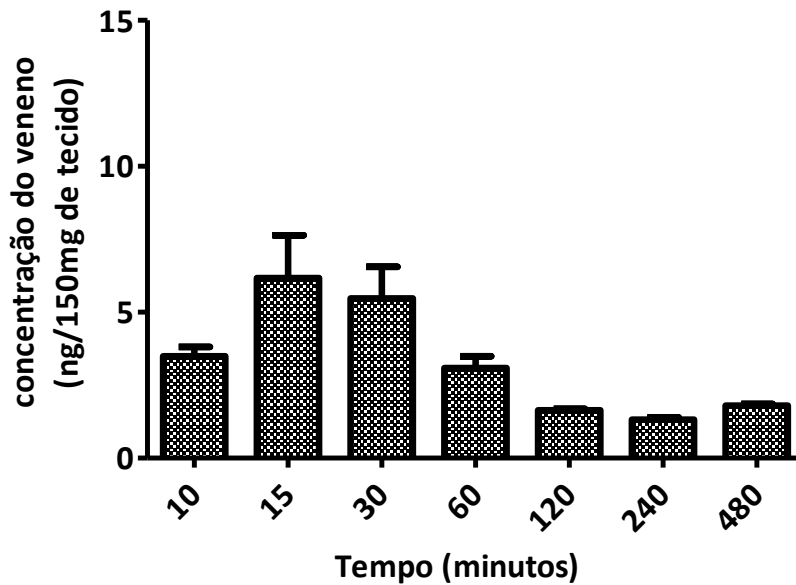


Figura 14: Concentração do veneno no coração dos camundongos, encontrada por ELISA, em diferentes tempos após a injeção do veneno. (Os dados são expressos em média±EPM)

Já no pulmão e fígado (fig. 15), os níveis máximos de veneno (4 e 2 ng por 150mg de tecido, respectivamente) ocorreram no tempo de 30 minutos. Ainda foi detectado veneno nestes tecidos 8 horas após a injeção. Não foi detectado veneno nos tecidos obtidos do sistema nervoso central dos camundongos.

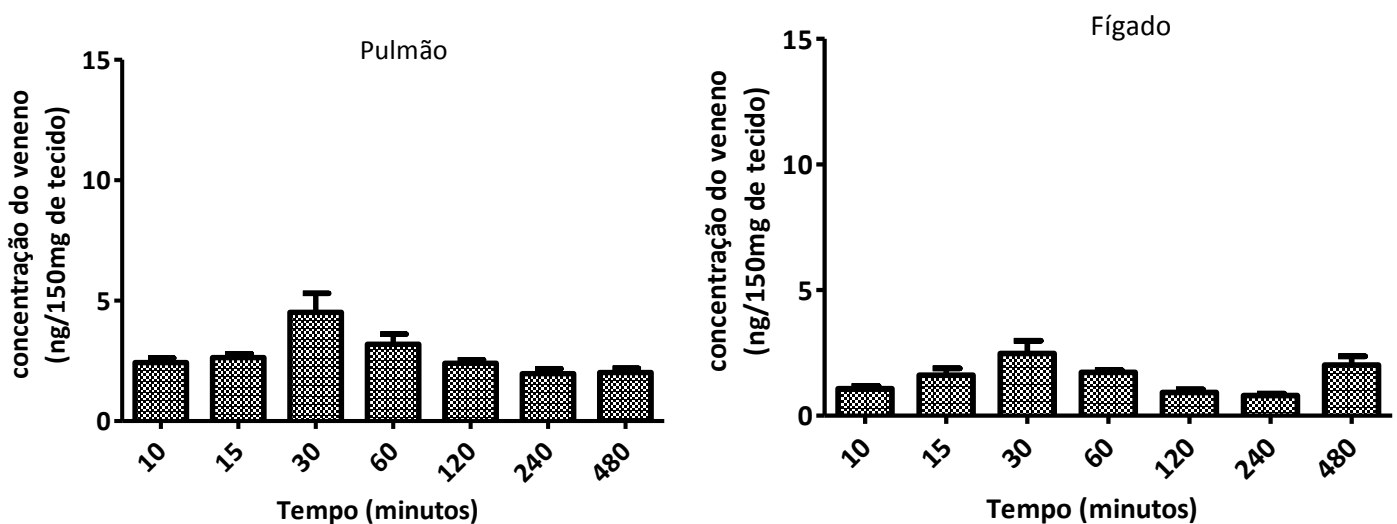


Figura 15: Concentração do veneno no pulmão e no fígado dos camundongos, encontrada por ELISA, em diferentes tempos após a injeção do veneno. (Os dados são expressos em média±EPM)

Comparando-se o acúmulo de veneno nos diferentes órgãos ao longo do tempo (fig.16), é possível notar que o rim foi o tecido onde o veneno se concentrou em maior quantidade no tempo avaliado. Após o rim, o coração foi o segundo órgão, dentre os estudados, com maior nível de veneno quantificado por ELISA, seguido do pulmão e fígado.

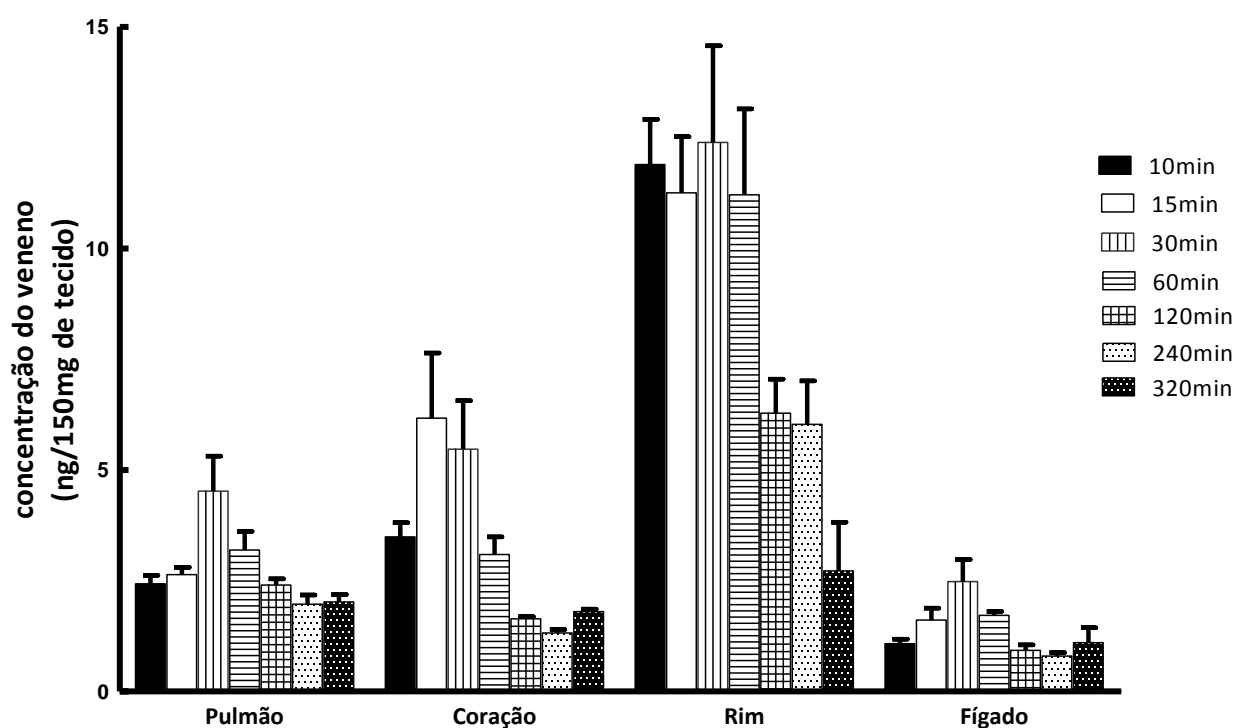


Figura 16: Biodistribuição do veneno total de *L. intermedia* no rim, coração, pulmão e fígado, determinado por ELISA, após uma injeção subcutânea em camundongos de 2,5 µg do veneno. (Os dados são expressos em média±EPM)

Devido a detecção da presença de componentes do veneno no coração em quantidades altas em relação à outros tecidos, onde já foi demonstrado toxicidade decorrente do envenenamento, este órgão tornou-se alvo de investigação de possíveis alterações após o tratamento com o veneno e com a proteína dermonecrótica recombinante.

4.2 ANÁLISE DE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

Três grupos de cinco animais receberam injeções intraperitoneais de veneno bruto, LiD1r ou PBS. Decorridas quatro horas após a injeção, os animais foram anestesiados e foi retirado o sangue para determinação de parâmetros bioquímicos.

Com o intuito de verificar a presença de lesão cardíaca, foram determinadas as concentrações séricas da enzima creatina quinase total (CK-T), enzima que é encontrada no músculos cardíaco, esquelético e no cérebro e eleva-se rapidamente (3 a 6 horas) no soro quando ocorre lesão nestes tecidos . A fração MB desta enzima (CK-MB) também foi quantificada, uma vez que é encontrada em quantidades altas no sangue quando ocorre uma lesão no miocárdio.

O grupo tratado com o veneno e com a proteína dermonecrótica recombinante apresentaram diferença estatística, em comparação ao controle, tanto na dosagem de CK-T quanto na dosagem de CK-MB. Na dosagem de CK-T (fig. 17), o grupo controle apresentou uma média de 347,32 U/L, enquanto o grupo tratado com a proteína teve um aumento desta enzima no soro, apresentando como média 1006,64 U/L, este aumento também foi visto no grupo tratado com o veneno (1371,35 U/L).

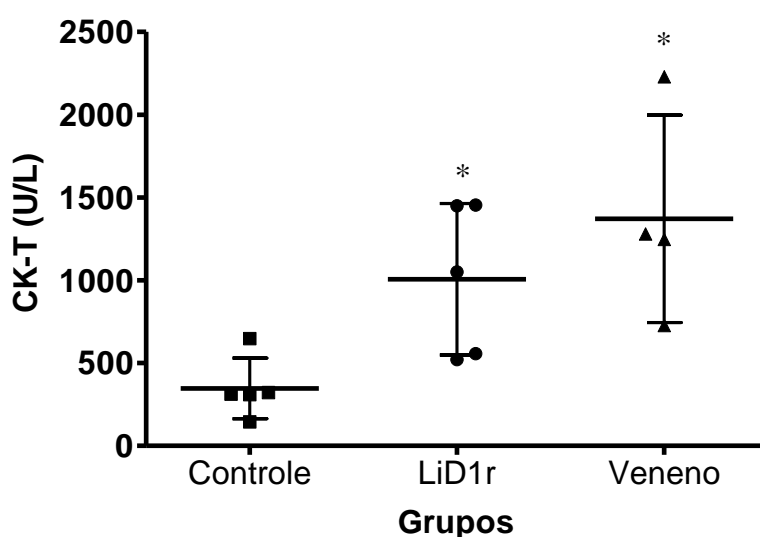


Figura 17: Níveis de creatina quinase total, no soro dos camundongos, após envenenamento com o veneno de *L. intermedia* ou a toxina LiD1r ou após injeção de

PBS (grupo controle). (As linhas expressam média±DP; *p < 0,05 em relação ao controle).

Na determinação de CK-MB (fig. 18), foi observado também um aumento da atividade da enzima no soro de camundongos tratados com a proteína (média de 313,12 U/L) e com o veneno (467,1 U/L) em relação ao grupo controle (210,62 U/L).

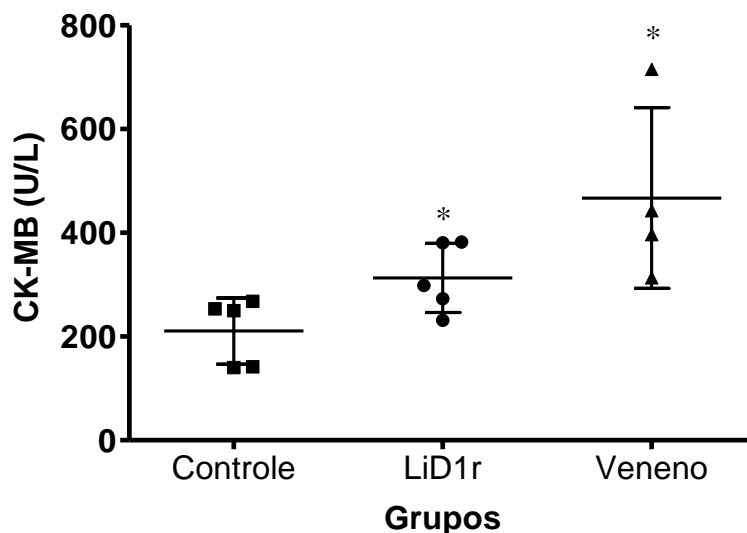


Figura 18: Níveis da isoenzima MB creatina quinase, no soro dos camundongos, após envenenamento com o veneno de *L. intermedia* ou a toxina LiD1r ou após injeção de PBS (grupo controle). (As linhas expressam média±DP; *p < 0,05 em relação ao controle).

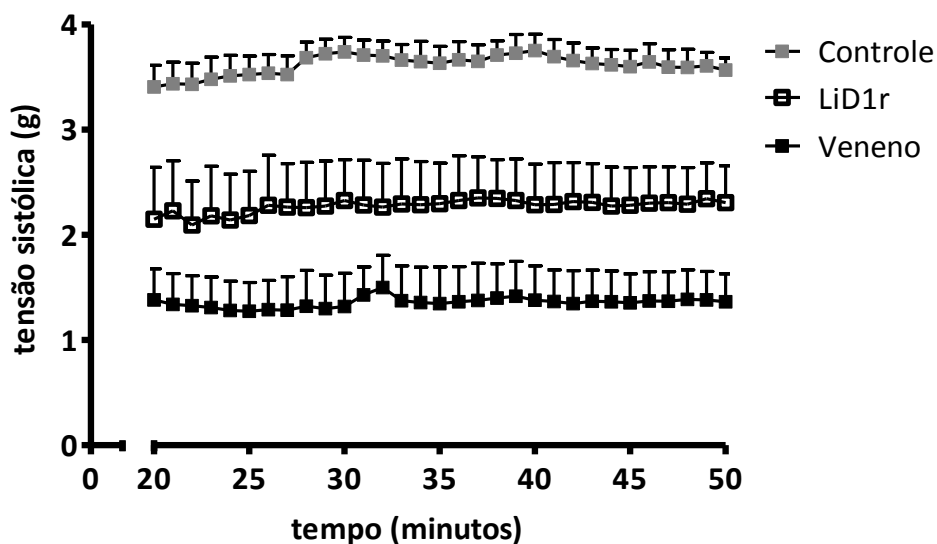
4.3 AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO CARDÍACA

O coração tem como função primária realizar trabalho mecânico para proporcionar o fluxo ao longo da seqüência de vasos sanguíneos, permitindo dessa forma que os nutrientes possam ser distribuídos adequadamente ao longo do corpo e resíduos metabólicos possam ser removidos. Assim, com objetivo de averiguar a presença de alguma disfunção cardíaca em animais envenenados, foi avaliada a capacidade contrátil do coração isolado.

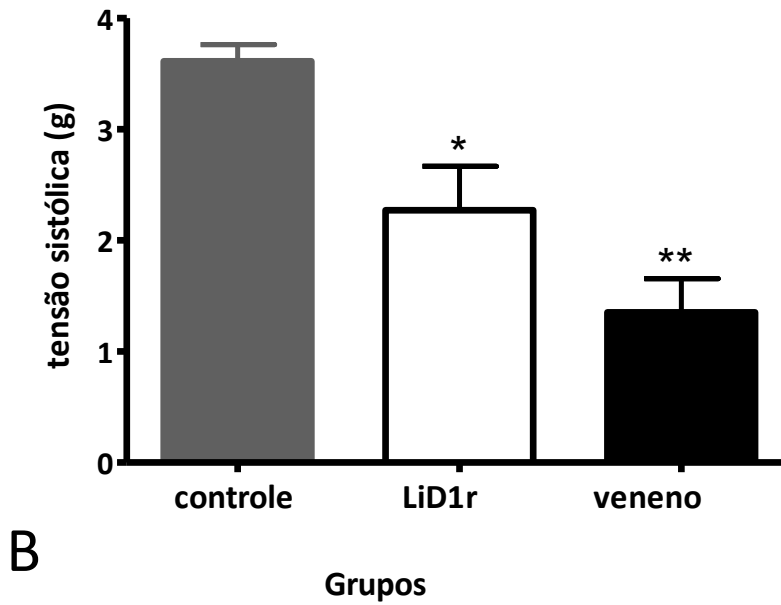
Para examinar a função cardíaca foram medidos parâmetros fisiológicos em corações de animais tratados. Para isto, foram realizadas preparações com corações isolados, no sistema de Langendorff, uma hora após envenenamento, com o veneno e com a proteína recombinante, de camundongos pela via intraperitoneal.

A tensão sistólica e a frequência cardíaca foram registradas ao longo do tempo (30 minutos), após um período de estabilização (20 minutos), e comparadas em relação ao controle.

A capacidade contrátil do órgão isolado encontra-se atenuada nos animais tratados. O veneno e a toxina foram capazes de reduzir a tensão sistólica do coração dos camundongos tratados, em relação ao grupo controle, ao longo do tempo (fig. 19A). Enquanto os animais controle apresentaram uma média (de todos os registros ao longo do tempo) da tensão sistólica de $3,62 \pm 0,16$ g (fig. 19B), o grupo tratado com a toxina e veneno tiveram tensões significativamente menores, $2,30 \pm 0,39$ (36% menor) e $1,37 \pm 0,30$ g (62% menor) respectivamente .



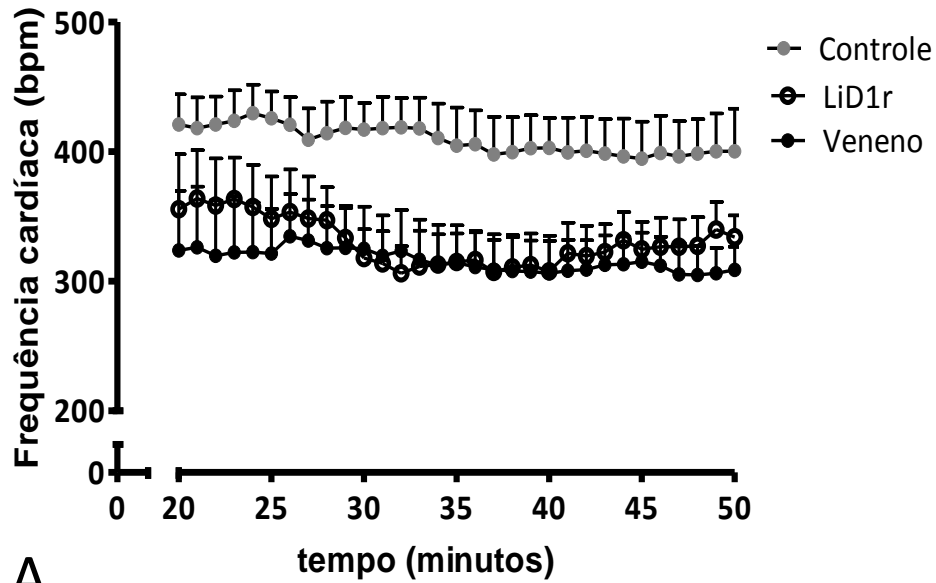
A



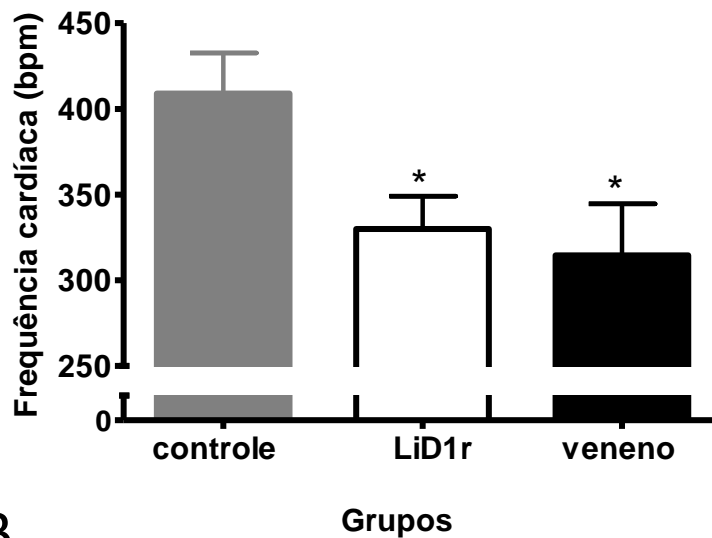
* $p < 0,05$ ** $p < 0,001$

Figura 19: Tensão sistólica dos corações isolados de camundongos que receberam injeções de veneno de *L. intermedia*, LiD1r ou PBS (controle) . (A) Curso de tempo da tensão sistólica (g) no órgão isolado, após um período de estabilização de 20 minutos, foi feito o registro por 30 minutos. (B) Médias dos registros em todo período avaliado (Os dados são expresso em média±EPM; * $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$ em relação ao controle).

Como pode ser visto na figura 20, a frequência cardíaca também foi alterada nos animais envenenados. Os corações isolados dos animais injetados com o veneno e também com a toxina apresentaram frequências cardíacas significativamente menores que o controle (314 ± 30 , 330 ± 19 e 409 ± 24 bpm, respectivamente).



A



B

* $p < 0,05$

Figura 20: Frequência cardíaca dos corações isolados de camundongos que receberam injeções de veneno de *L. intermedia*, LiD1r ou PBS (controle). (A) Curso de tempo da frequência cardíaca (bpm) no órgão isolado, após um período de estabilização de 20 minutos, foi feito o registro por 30 minutos. (B) Médias dos registros em todo período avaliado (Os dados são expresso em média±EPM; * $p < 0,05$ em relação ao controle).

Como a proteína dermonecrótica recombinante teve comportamento semelhante ao veneno provocando redução da frequência cardíaca (36,5% e 62,1% respectivamente) e da tensão sistólica (19,3% e 23,2% respectivamente) e, na elevação da atividade de CK-MB no soro, enzima que indica a presença de lesão cardíaca, a proteína dermonecrótica foi atribuída como a principal responsável pelos efeitos causados pelo veneno sendo, por isso, utilizada nos experimentos subseqüentes.

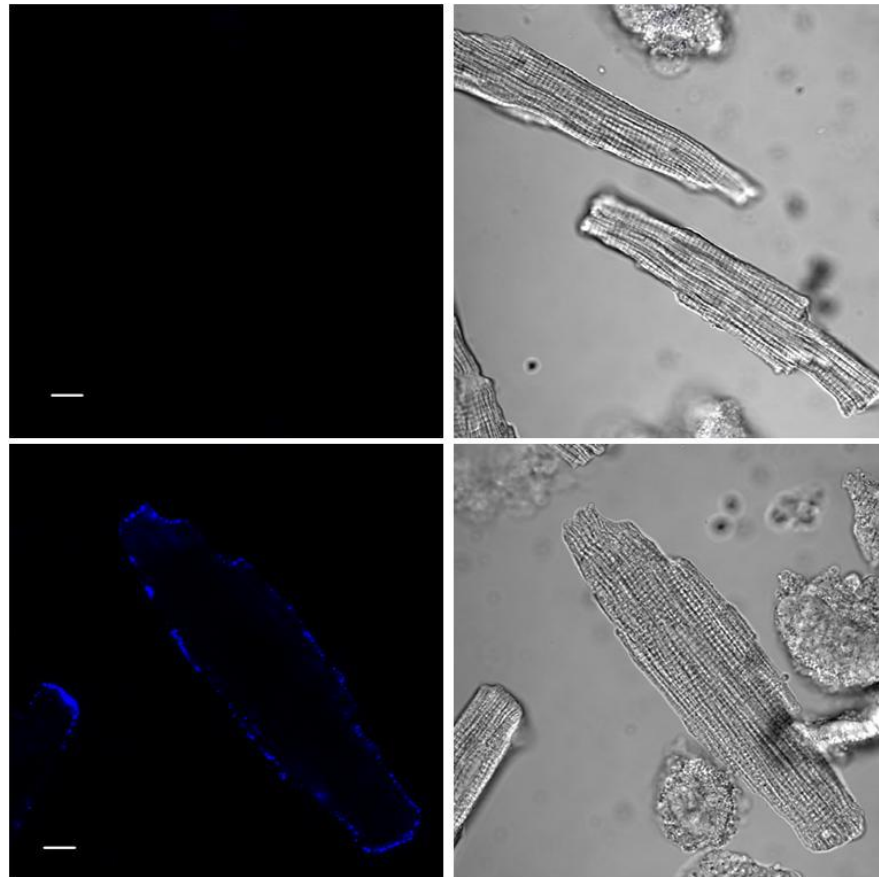
4.4 ENSAIOS DE IMUNOFLORESCÊNCIA

Após a demonstração de que o envenenamento, tanto pelo veneno total de *L. intermedia* quanto pela toxina dermonecrótica, provocam lesão levando à liberação de enzimas cardíacas e alterações em parâmetros fisiológicos em corações de camundongos, resolveu-se verificar a ligação destes componentes à cardiomiócitos.

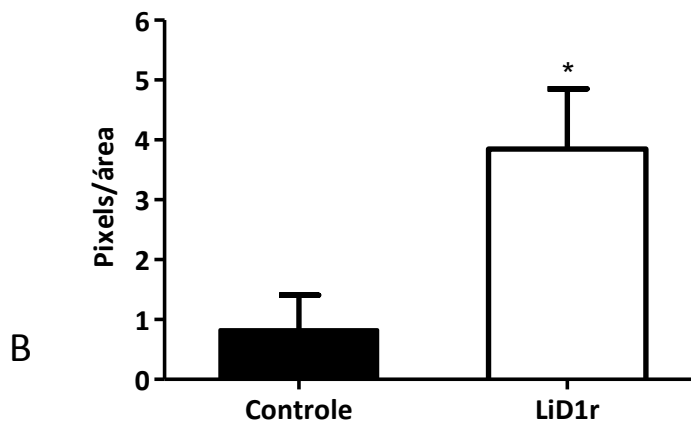
O ensaio de imunofluorescência foi realizado para investigar se a proteína dermonecrótica é um componente do veneno de *L. intermedia*, que se liga à cardiomiócitos. Cardiomiócitos enzimaticamente isolados foram colocados em contato com a toxina e posteriormente incubados com um anticorpo monoclonal anti-*L. intermedia* (LimAb7) e um anticorpo anti-IgG de camundongo marcado com fluorescência. As células foram então visualizadas em microscopia confocal.

Os resultados encontrados são mostrados na figura 21. Toda região da membrana celular exposta para o meio extracelular foi marcada pela fluorescência nas células tratadas com a proteína dermonecrótica (fig. 21A), enquanto que os grupos controles testados (apenas com o anticorpo secundário ou com o anticorpo primário e secundário) foram negativos para a marcação.

A intensidade de fluorescência nas células do grupo controle e tratado foram medidas no programa Image J e foram normatizadas dividindo-se pela área das mesmas. O gráfico obtido mostra uma maior fluorescência das células tratadas em relação as do controle (fig. 21B).



A



B

Figura 21: Localização de LiD1r por imunofluorescência em cardiomiócitos de camundongos. (A) Imagens representativas mostrando a ligação de LiD1r à membrana de cardiomiócitos (imagem inferior esquerda). Após a incubação das células com LiD1r, a marcação foi obtida com a incubação com anticorpos monoclonais anti-*Li* (Limab7) e posteriormente com anticorpos anti-camundongo maracados com Alexa Fluor 488. A imagem do controle (imagem superior esquerda) mostra a marcação obtida quando os cardiomiócitos foram tratados com descrito acima, exceto a primeira incubação com

LiD1r. (B) Análise da intensidade de fluorescência (pixels), normalizada pela área das células, do grupo controle e tratado. As imagens foram analisadas no programa Image J. (Os dados são expresso em média±EPM; * $p < 0,001$ em relação ao controle, barra representa 10 μ m)

Após a identificação da toxina na membrana plasmática dos cardiomiócitos, partiu-se para um ensaio de competição com o antígeno, para investigar se o anticorpo monoclonal inibia a ligação desta às células. Para isto, a toxina foi previamente incubada por 1 hora com LimAb7 ou IgG pré-imune de camundongo (PI), antes do contato com os cardiomiócitos.

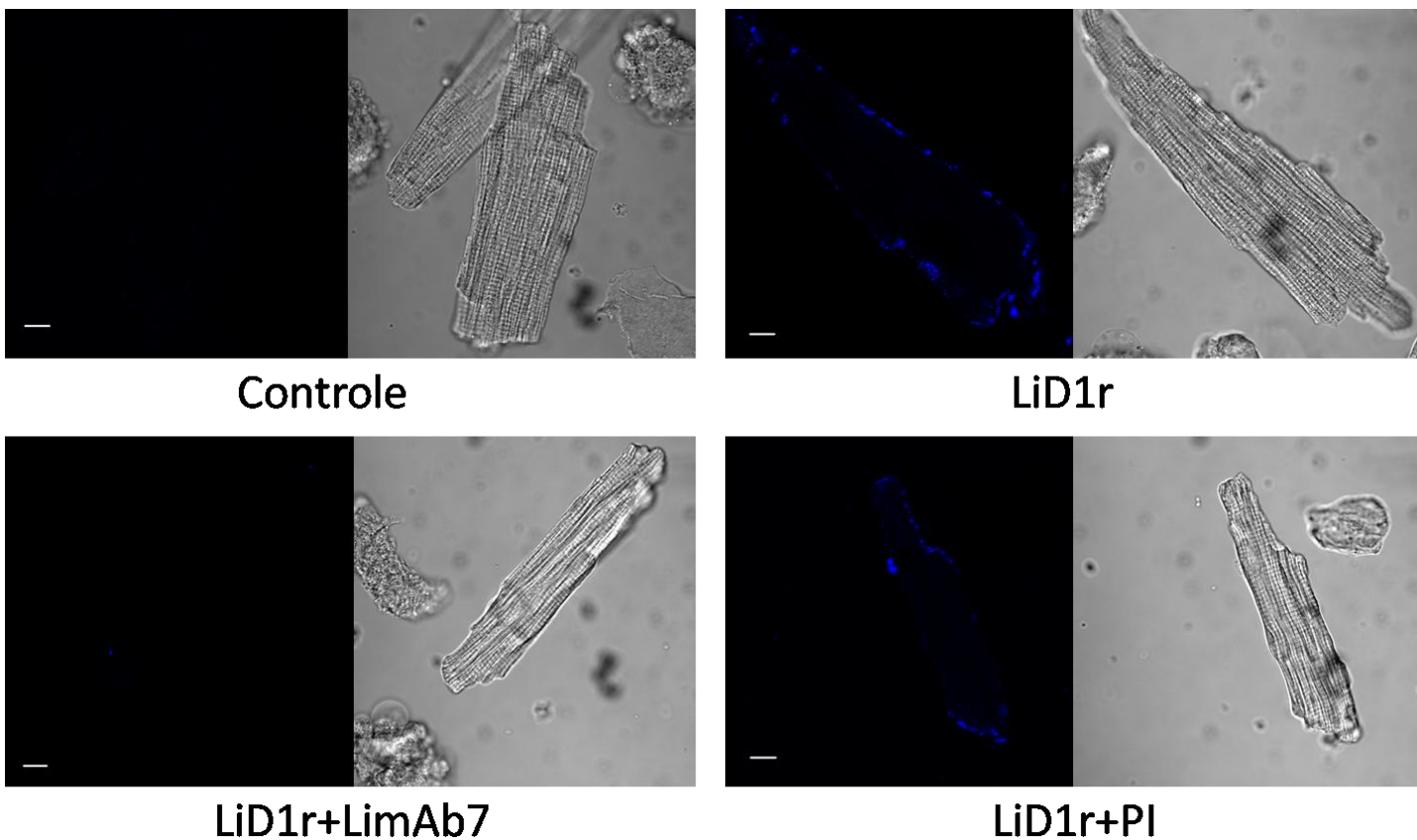


Figura 22: Imagens representativas do ensaio de competição. A LiD1r foi pré-incubada com LimAb7 ou com IgG pré-imune de camundongo (PI) antes da incubação com os cardiomiócitos. Como controle positivo, a LiD1r foi incubada por 1h sem a presença de anticorpos. O controle negativo foi o mesmo do experimento anteriormente descrito (barra representa 10 μ m).

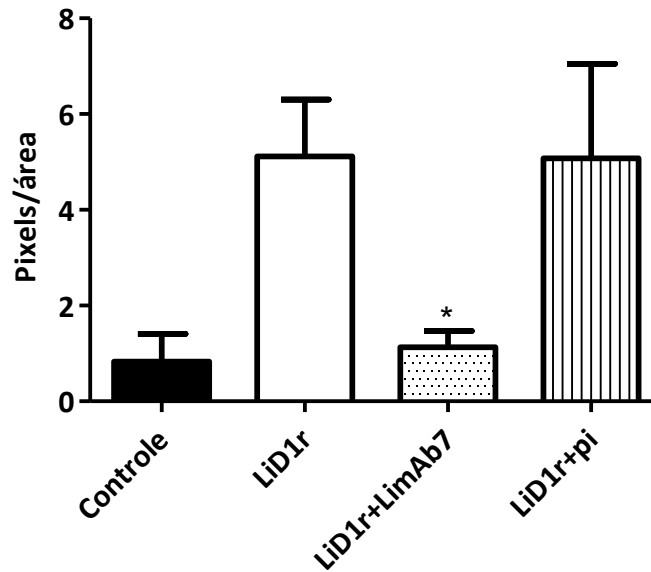


Figura 23: Diminuição da intensidade de imunofluorescência após pré-incubação de LiD1r com LimAb7. Análise intensidade de fluorescência (pixels) normalizada pela área das células, do grupo controle, LiD1r, LiD1r pré-incubada com LimAb7 (LiD1r+LimAb7) ou pré-incubada com IgG pré-imune (LiD1r+PI). As imagens foram analisadas no programa Image J (Os dados são expresso em média±EPM; * $p < 0,0001$ em relação ao grupo LiD1r)

A figura 23 mostra o resultado do ensaio de competição com o antígeno. O anticorpo monoclonal foi capaz de inibir, significativamente, em cerca de 90% a ligação da toxina aos cardiomiócitos.

4.5 CORRENTE DE CÁLCIO

Visto que a proteína dermonecrótica recombinante é capaz de se ligar a cardiomiócitos e, também, provoca alterações nas funções cardíacas de animais tratados, o próximo passo deste trabalho foi procurar estabelecer o mecanismo celular que desencadeia a depressão na função cardíaca.

Para isso, cardiomiócitos de camundongos, tratados pela via intraperitoneal por 1 hora com LiD1r ou PBS, foram isolados e a corrente de cálcio dos canais do tipo L ($I_{Ca,L}$) foi investigada através da técnica whole-cell voltage-clamp. Estes canais foram

estabelecidos como alvo de estudo, uma vez que, estão envolvidos na ativação da contração celular dos miócitos ventriculares.

A figura 24 apresenta os traçados representativos da corrente de pico de cálcio a uma voltagem de 0mV. Como pode ser notada, a densidade da corrente de cálcio presente nos animais tratados é maior do que a do controle. Além disso, uma análise mais cuidadosa revela que o processo de inativação nos animais tratados é mais rápido.

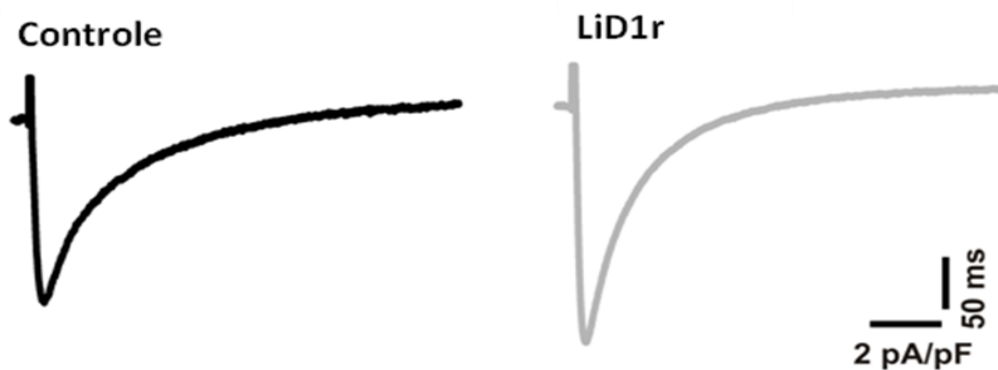


Figura 24: Traçados representativos da corrente de pico de cálcio em células controle (esquerda) e tratadas (direita).

A capacitância das células estudadas, que é diretamente proporcional à área, não foi diferente entre os grupos como mostrado na figura 25.

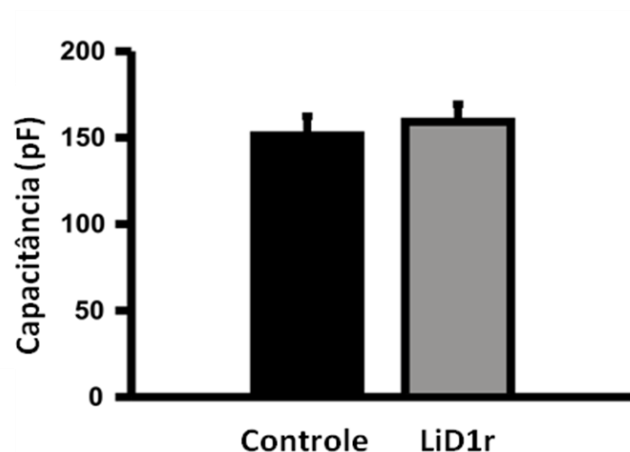


Figura 25: Média das capacitâncias dos cardiomiócitos avaliados nos grupo controles e tratado.

A figura 26A representa a relação da densidade de corrente mínima normalizada pela capacitância das células, em função do potencial de membrana. Entre os potenciais avaliados (-40 a 50mV) os cardiomiócitos dos camundongos tratados com LiD1r apresentaram um maior $I_{ca,L}$ nos potenciais de -20 a 10mV. Por exemplo, as densidades de corrente em 0 mV foram $-7,1 \pm 0,4$ (n=18) e $-9,1 \pm 0,4$ (n=21), para grupo controle e tratado, respectivamente (aumento de 28,2% no grupo tratado em relação ao controle).

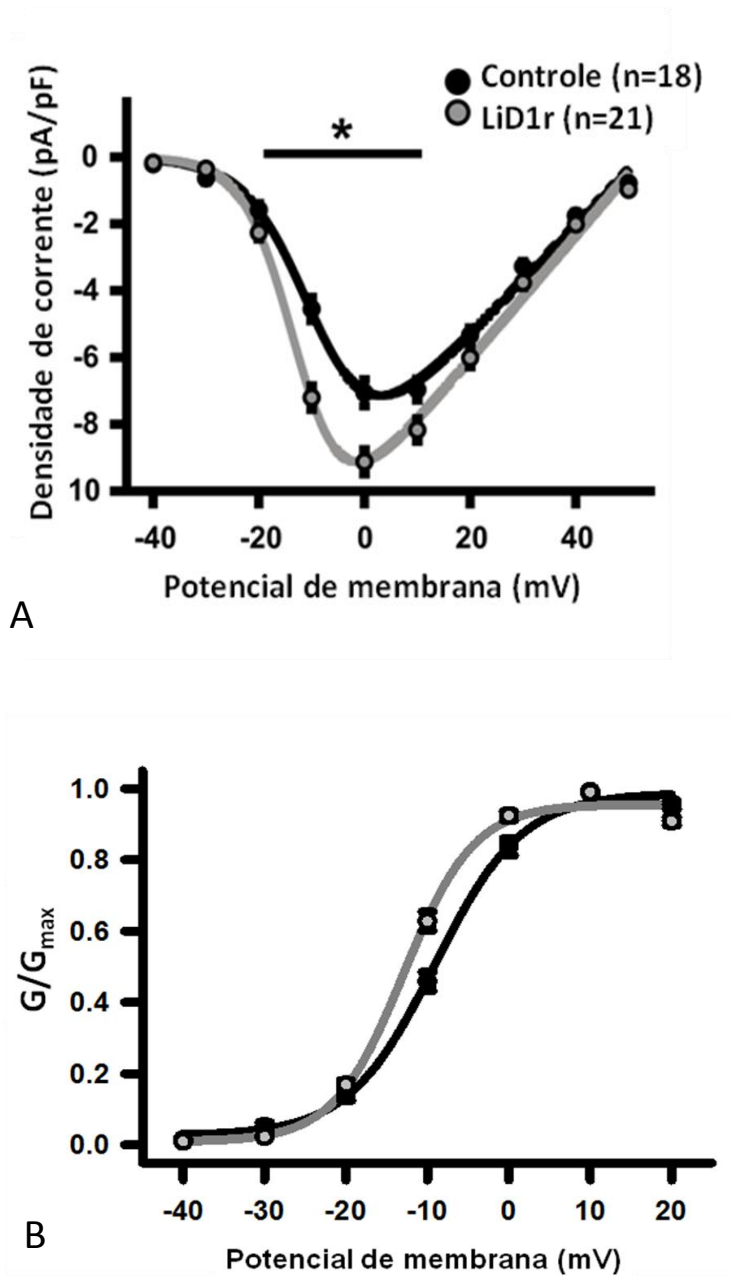


Figura 26: Densidade de corrente versus voltagem e dependência de voltagem para ativação de I_{ca} nas células de animais tratado e controle. (A) Relação da corrente de

pico normalizada pela capacitância celular, em função da voltagem. As linhas contínuas representam os ajustes segundo equação 3 (ver seção 3.10 de materiais e métodos) . (B) Dependência de voltagem para ativação. As linhas contínuas representam o ajuste da equação 5. (Os círculos representam média \pm EPM, sendo que os círculos em preto representam o controle (n=18) e os em cinza representam o grupo tratado (n=21). * p < 0,05, em relação ao controle).

A dependência de voltagem para a ativação não foi alterada como pode ser visualizado na figura 26B. As linhas contínuas na figura 26B representam o melhor ajuste obtido na equação 5. Os parâmetros desta equação representam a dependência de voltagem para a ativação, sumarizadas na tabela 4.

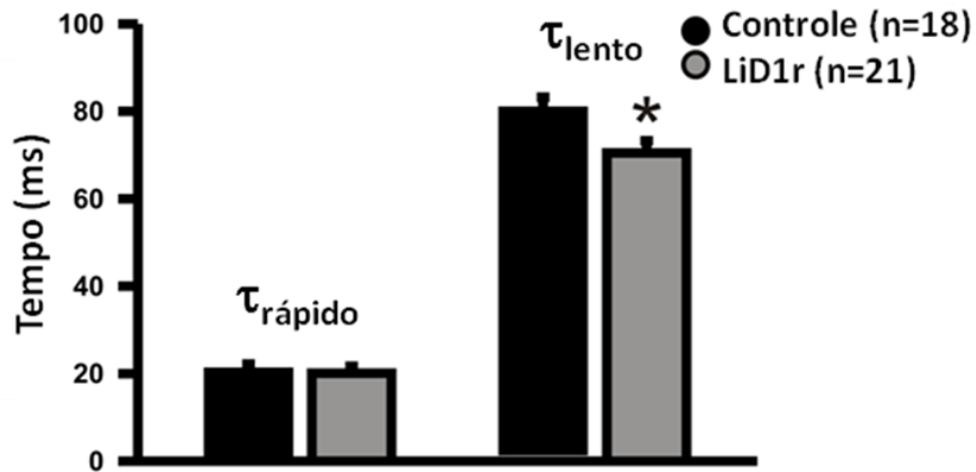
Tabela 4: Parâmetros para ativação de I_{Ca} encontrados nas células dos grupos controle e tratado com LiD1r.

Grupo	V1/2 (mV)	Slope Factor (mV)
Controle	-8,6 \pm 0,7	5,3 \pm 0,5
LiD1r	-12,7 \pm 0,5	4,3 \pm 0,2

É possível verificar, observando os traçados da figura 24, que o processo de inativação da corrente nos canais de cálcio do tipo L é mais rápido nas células tratadas do que nas células controle. Para melhor caracterizar os parâmetro de I_{Ca} avaliamos também o processo de inativação, ajustado pela equação 1-2.

Está envolvido na inativação da corrente nos canais de cálcio um mecanismo que é dependente de cálcio (componente rápido) e dependente da voltagem (componente lento) (Kass e Sanguinetti, 1984). Como pode ser notado pela figura 27A, para o grupo tratado com LiD1r, os valores do componente rápido ($\tau_{rápido}$) do processo de inativação, obtido pela equação 2, não difere entre os grupos. Entretanto o componente lento (τ_{lento}) foi significativamente menor nas células tratadas, quando comparadas ao controle (fig. 22). Por exemplo, em 0mV, $\tau_{rápido}$ do grupo controle é de 20,3 \pm 1,9 ms e do grupo LiD1r é de 20,1 \pm 1,6 ms enquanto τ_{lento} do controle é 79.8 \pm 3.2

ms e do tratado é de 70.5 ± 2.8 ms. A figura 27B ilustra os traçados no processo de inativação da I_{Ca} no potencial de 0mV, mostrando que o processo de inativação foi mais rápido nas células do animais tratados do que nas do controle.



A



B

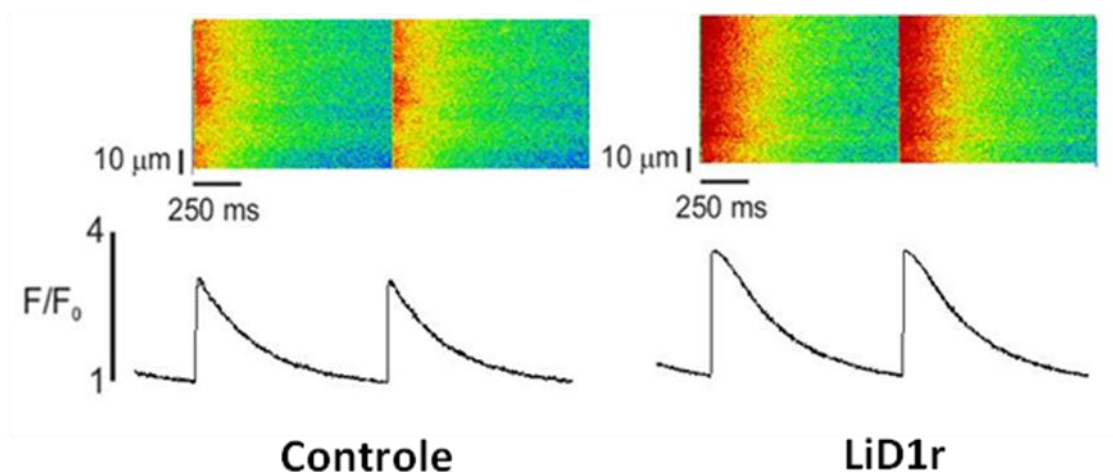
Figura 27: Cinética de inativação da $I_{Ca,L}$ nos cardiomiócitos tratados e controle. (A) Constantes de tempo rápida ($\tau_{rápida}$) e lenta (τ_{lenta}) em ms, obtidas pela equação 1-2, representando o processo de inativação da corrente, nas células controle e tratadas. (B) Curvas de inativação da $I_{Ca,L}$ de ambos os grupos, controle e tratado em 0 mV. (Os dados são expressos como média \pm EPM, a linha preta representa o grupo controle e a linha cinza o grupo tratado, * $p < 0,05$ em relação ao controle)

4.6 TRANSIENTE DE CÁLCIO

De posse da evidência do aumento da corrente de cálcio do tipo L, nos animais tratados com a toxina, e sabendo que estes canais estão envolvidos, juntamente com a liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático, no aumento de cálcio intracelular que ativa a contração, foi investigado também o transiente de cálcio, ou seja, o aumento tempo-dependente da concentração intracelular de cálcio.

Para medir o pico do transiente de cálcio, cardiomiócitos de camundongos, tratados pela via intraperitoneal por 1 hora com LiD1r ou PBS, foram isolados e posteriormente incubados com uma sonda fluorescente sensível ao cálcio. As células receberam pulsos elétricos e foi feita uma varredura utilizando um microscópio confocal.

O pico de cálcio, dado pela razão entre fluorescência máxima e fluorescência basal (F/F_0), durante o transiente foi significativamente maior nas células dos animais tratados com LiD1r quando comparadas às células do controle. Enquanto o controle apresentou valores de $2,75 \pm 0,09$ no pico de Ca^{2+} , o grupo tratado com LiD1r obteve uma relação no transiente de $3,44 \pm 0,16$.



A

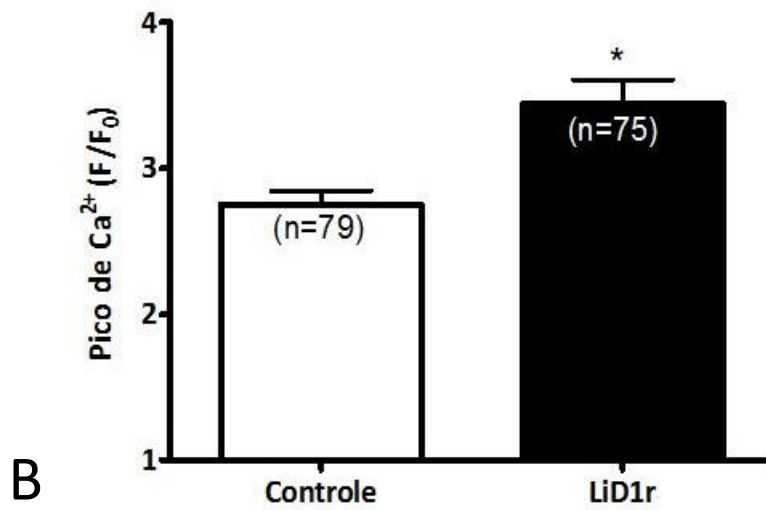


Figura 28: Transiente global de Ca²⁺ em cardiomiócitos de animais controle e expostos à proteína dermonecrótica recombinante (LiD1r). (A) Imagens representativas da varredura de cardiomiócitos incubados com a sonda sensível a Ca²⁺, estimulados com pulsos elétricos de animais previamente expostos com PBS (controle) e LiD1r. (B) Pico do transiente de cálcio, relação entre fluorescência máxima sobre a fluorescência basal. (Os dados são expresso como média±EPM, * p < 0,001 em relação ao controle)

5 DISCUSSÃO

As aranhas do gênero *Loxosceles* são responsáveis por mais de 7.000 acidentes de envenenamento, por ano, no Brasil (Ministério da Saúde, 2006). De fato, constitui a terceira maior causa de acidentes envolvendo animais venenosos (Pauli et al., 2006). Os acidentes com estas aranhas estão classicamente associados ao desenvolvimento de lesões dermonecroticas e manifestações sistêmicas. Apesar da forma viscerocutânea do loxoscelismo ser menos comum (3-13% dos casos) que a forma cutânea, ela é atribuída como a principal causa de complicações clínicas e, até mesmo, de morte decorrente do envenenamento (Futrell, 1992; Cardoso et al. 1988; Sezerino 1998; da Silva et al. 2004).

A cinética do veneno da aranha *L. intermedia* no compartimento vascular já foi estudada, observando-se a evolução temporal dos níveis de seus antígenos, pelo método ELISA, no soro de camundongos envenenados (Chávez-Olórtegui et. al., 1998). Também já foi demonstrada a presença do veneno nos tecidos hepático e renal de camundongos experimentalmente envenenados e o efeito nestes órgãos já foi avaliado (Luciano et al., 2004; Christoff et al. 2008). A partir dos dados encontrados neste presente trabalho foi possível acrescentar mais informações sobre a cinética de distribuição do veneno para compartimentos extravasculares (tecidos) e em que proporção este se acumula nos diferentes tecidos.

A toxicocinética foi realizada pelo método ELISA sanduíche, visto que, trabalhos anteriores observaram que este método é mais confiável na descrição da cinética de toxinas ativas do que a marcação com radioisótopos, uma vez que, a degradação das toxinas pode ocorrer *in vivo* e estas continuam sendo quantificadas por radiatividade, mas não por ELISA, devido à perda de epitopos reconhecidos pelos anticorpos antiveneno (Rivière et al. 1997, Krifi et al. 2005, Hammoudi-Triki et al. 2007). A via escolhida para a avaliação da cinética foi a subcutânea para tentar refletir o que acontece em um envenenamento real.

Primeiramente, foi visto que o veneno de *L. intermedia* apresenta uma cinética muito rápida no soro de camundongos, com pico de concentração de antígenos

circulantes em torno de 15-30 minutos e que, estes valores caem drasticamente 4 horas após a injeção subcutânea do veneno. Estes resultados são muito similares aqueles encontrados nos trabalhos anteriores (Chávez-Olortegui, 1998; Alvarenga et al., 2003).

A extensão de distribuição depende de duas propriedades físico-químicas principais da toxina: ligação à proteína e coeficiente de partição (Hammoudi-Triki et al. 2007). Como os camundongos selecionados apresentavam pesos semelhantes, apenas o parâmetro de ligação protéica parece estar envolvido.

O método de ELISA sanduíche empregado detectou antígenos do veneno nos rins e fígado dos camundongos envenenados, corroborando com trabalhos anteriores que mostraram a ligação do veneno à estes tecidos através de ensaios de imunofluorescência (Luciano et al., 2004; Christoff et al. 2008).

O perfil toxicocinético nos animais envenenados permitiu evidenciar que o veneno também atinge outros tecidos como o pulmão e o músculo cardíaco. Dentre os tecidos avaliados, as maiores concentrações de veneno no compartimento extravascular são encontradas no rim, provavelmente devido ao fato da excreção ocorrer através deste órgão. A concentração do veneno no músculo cardíaco é a segunda maior. Não foi detectado veneno no sistema nervoso central, indicando que o veneno não atravessa a barreira hemato-encefálica.

Posteriormente, foi realizada uma avaliação dos efeitos tóxicos no coração de animais experimentalmente envenenados, visto que, nenhum trabalho anterior investiga os efeitos do veneno no tecido cardíaco e este é o segundo órgão alvo de concentração do veneno. Para averiguar os parâmetros neste órgão, tanto o veneno quanto a proteína dermonecrótica recombinante, foram administrados por via intraperitoneal por ser uma via de mais rápida absorção e que permite uma liberação mais uniforme para a circulação. A quantidade de veneno foi estabelecida de acordo com trabalhos anteriores que avaliaram o efeito do mesmo veneno em outros tecidos, usando o mesmo modelo animal (Chaim et al., 2006).

28 . Os marcadores bioquímicos escolhidos para avaliação de lesão do miocárdio foram a creatina quinase (CK) total e a fração MB, já que sua determinação no soro já é bem estabelecida e é um método aceito amplamente para o diagnóstico laboratorial e acompanhamento do infarto do miocárdio (Bachmaier et al., 1995).

A CK catalisa a reação de transferência de grupamentos fosfato de alta energia entre creatina fosfato e adenosina trifosfato. A presença desta enzima intacta é crítica para a função normal do miocárdio (Califf et al., 1998). As isoenzimas da creatina quinase são proteínas diméricas compostas de 2 subunidades sintetizadas no citossol dos miócitos (Adams et al., 1992). As isoenzimas são compostas de 2 subunidade M (CK-MM), duas subunidades B (CK-BB) ou uma subunidade B e uma M (CK-MB). CK-MM é mais abundante no músculo, CK-BB é mais abundante no cérebro e CK-MB no coração (Trask et Billadello, 1990).

Aproximadamente 15% da atividade de CK no miocárdio é exercida pela isoenzima MB, enquanto no músculo esquelético essa isoenzima é responsável por 2% da atividade de CK (Califf et al., 1998). Por esta razão, os níveis circulantes de CK-MB também podem ser aumentados após uma lesão muscular aguda.

A medida da atividade de CK total não é recomendada para o diagnóstico de lesão no miocárdio porque ela é amplamente distribuída nos tecidos. Porém, CK total vem sendo avaliada a anos e utilizada para propósitos epidemiológicos e científicos. Em tais casos, sua avaliação deve ser acompanhada com um biomarcador mais sensível como CK-MB (Alpert et al., 2000).

O mecanismo patogênico da liberação da enzima miocárdica inclui a depleção de componentes fosfato de alta energia e acúmulo de íons hidrogênio (H^+) e fosfato levando a solubilização de CK e extravasamento da enzima através da membrana plasmática rompida. A maioria dos estudos indica que CK-MB só é liberada quando há presença de necrose de miócitos. A concentração de CK total e CK-MB se elevam no sangue 3 a 6 horas após a lesão. (Califf et al., 1998)

França e colaboradores (2002) descreveram 2 casos de loxoscelismo viscerocutâneo em que os níveis de creatina quinase estavam elevados, com valores de 6841

U/L e 1718 U/L, 48 horas e 6 horas após a picada respectivamente. Esta elevação foi atribuída como decorrente de uma rabdomiólise. Outro caso reportado, em que houve a confirmação de uma picada da aranha do gênero *Loxosceles*, também foi visto, dentre os resultados laboratoriais, um aumento de CK, atingindo 1631 U/L em 24 horas (valores de referência: 25-195 U/L). Em nenhum dos casos foi avaliada a concentração de CK-MB no soro dos pacientes (de Souza et al., 2008).

O veneno da aranha *L. intermedia* e a proteína recombinante provocaram o aumento de CK-total e CK-MB no soro dos camundongos, 4 horas após o envenenamento. Os animais expostos ao veneno apresentaram níveis médios de CK no soro de 1371,35 U/L.

A observação deste marcador bioquímico sugere a presença de lesão cardíaca, porém outros parâmetros foram avaliados, uma vez que estes isolados não permitem afirmar que houve dano neste tecido, já que CK-MB também está presente no músculo esquelético ainda que em menores proporções.

Sendo assim, para melhor compreensão de quais alterações ocorrem na fisiologia do coração de animais expostos ao veneno de *L. intermedia* e se elas realmente existem, estudou-se o órgão isolado. Primeiramente foi avaliada a função contrátil do coração e foi observado que o órgão isolado dos animais tratados apresentou alterações em sua capacidade de desenvolver tensão ao longo do tempo. Os animais tratados com o veneno e a proteína dermonecrótica recombinante apresentaram uma grande redução na tensão sistólica, 62,1% e 36,5% respectivamente, indicando que os processos envolvidos na regulação da capacidade contrátil do órgão isolado estão alterados nestes animais. Outro parâmetro que se apresentou reduzido nos grupos veneno e toxina em relação ao controle foi a frequência cardíaca, com redução de 23,2% e 19,3% respectivamente.

O veneno e a LiD1r provocaram alterações semelhantes no coração, sugerindo que o efeito cardiotoxico provocado pelo veneno tem, entre seus componentes, a proteína dermonecrótica como principal atuante, assim como foi demonstrado para a nefrotoxicidade (Chaim et al., 2006) e diferente do que já foi descrito para a lesão hepática, em que a proteína dermonecrótica é apenas parcialmente responsável

(Christoff et al., 2008). Os efeitos foram mais pronunciados no grupo envenenado provavelmente devido à presença no veneno de outros componentes que podem ajudar no seu espalhamento rápido (hialuronidase) ou que potencializam o efeito da toxina ou, também, porque existem variantes moleculares da esfingomielinase no veneno (Kalapothakis, 2007) ou, ainda, porque o veneno apresenta uma atividade esfingomielinásica superior ao da proteína dermonecrótica recombinante (Felicori et al., 2006).

Objetivando averiguar os mecanismos envolvidos no processo da disfunção mecânica encontrada, utilizou-se o miócito cardíaco isolado como alvo de estudo. A primeira hipótese levantada foi quanto à interação direta da proteína dermonecrótica recombinante ao cardiomiócito, uma vez que já foi demonstrada esta interação do tecido renal e hepático (Chaim et al., 2006; Christoff et al., 2008).

A presença de LiD1r em toda superfície de cardiomiócitos foi claramente demonstrada através das imagens obtidas por imunofluorescência em microscopia confocal. Para este ensaio foi utilizado um anticorpo monoclonal anti-veneno de *L. intermedia* (LimAb7) que é capaz de neutralizar a atividade dermonecrótica do veneno de *L. intermedia* (Alvarenga et al., 2003). Para estudar a capacidade destes anticorpos em inibir a ligação da LiD1r na superfície de cardiomiócitos um ensaio de competição foi realizado. Neste experimento os anticorpos foram pré-incubados com a toxina antes do contato com os cardiomiócitos e o LimAb7 foi capaz de inibir a ligação desta à superfície das células.

Esse resultados mostraram que o anticorpo LimAb7 não se liga em LiD1r no mesmo sítio que esta se liga nos cardiomiócitos, pois no primeiro experimento foi visto que, depois da ligação da LiD1r às células, o anticorpo ainda era capaz de se ligar à toxina. Ao pré-incubar o anticorpo com a LiD1r, ele deve se ligar de forma a provocar um desarranjo no sítio de ligação à célula ou causar um impedimento estérico entre o sítio de interação na toxina e a célula.

Como foi observada uma redução acentuada na capacidade contrátil dos animais envenenados e a ligação da toxina na superfície de cardiomiócitos, partiu-se para investigação do mecanismo envolvido nestes efeitos tóxicos. Sabe-se que a

homeostase das concentrações de Ca^{2+} , K^+ e Na^+ nos cardiomiócitos é de extrema importância, já que estes íons regulam a contratilidade cardíaca. A função fundamental do Ca^{2+} é ativar o acoplamento excitação-contração, através do aumento dos níveis de Ca^{2+} no citoplasma via canais presentes no sarcolema e também no retículo sarcoplasmático. O Ca^{2+} então induz contração se ligando a troponina C e permitindo a interação entre actina e miosina. A recaptação de cálcio deve ser rápida para o relaxamento. Alterações em qualquer um dos passos acima descritos podem levar a falência cardíaca.

A corrente de cálcio nos canais tipo L presentes na membrana dos cardiomiócitos foram avaliados através da técnica de patch-clamp. Os dados obtidos demonstram uma alteração nesta família de correntes. Os traçados representativos dos grupos estudados e a relação densidade de corrente versus voltagem mostraram um aumento na densidade de corrente, que é estatisticamente significativa nos potenciais de -20 a +10mV. Sendo que no pico, em 0mV, ocorreu um aumento de 28,2% em relação ao controle.

O processo de inativação de I_{Ca} pode ser descrito por uma soma de duas exponenciais, sendo que um componente da exponencial representa o processo de inativação dependente da voltagem e o outro representa o dependente de cálcio (Kass e Sanguietti, 1984). Observou-se que apenas o componente lento da inativação encontra-se menor no grupo LiD1r, levando a um processo mais rápido da inativação. Este resultado indica que a liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático, responsável pelo processo de inativação dependente de Ca^{2+} , encontra-se aumentada nos animais tratados com a toxina. Não foi observadas alterações no componente rápido de inativação. Apesar do grupo tratado com a toxina apresentar alterações na cinética de I_{Ca} , essas alterações não explicam uma redução na força de contração cardíaca.

Outro parâmetro relacionado à dinâmica de Ca^{2+} nos cardiomiócitos também foi investigado a fim de avaliar a liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares. Para isto, foi utilizada uma sonda fluorescente sensível a cálcio em cardiomiócitos e a dinâmica do Ca^{2+} foi registrada através de microscopia confocal. A relação entre a fluorescência máxima e a fluorescência basal, um indicador da liberação de cálcio do

retículo sarcoplasmático, encontra-se aumentada nas células cardíacas dos animais tratados. Os dados encontrados no transiente de cálcio corroboram com os resultados anteriores que mostraram um aumento de I_{Ca} , bem como uma redução no tempo para inativação do componente lento de I_{Ca} .

O mecanismo envolvido na redução da tensão sistólica do coração não pode ser explicado através das alterações na dinâmica de cálcio encontradas. Sabe-se que a proteína dermonecrótica é capaz de clivar a esfingomielina, fosfolípido presente nas membranas celulares e que os produtos gerados são a fosforilcolina e ceramida 1-fosfato (Murakami, 2006). Ceramida 1-P é um dos fosfolípidos mais simples encontrados nas membranas biológicas e sua concentração nestas é geralmente muito pequena (Kooijman, 2008). Evidências recentes sugeriram um importante papel deste lipídeo como um segundo mensageiro, com papéis importantes nos processos celulares diversos como fagocitose, respostas inflamatória, sobrevivência celular e na gênese do tumor (Hinkovska-Galcheva et al. 2005; Pettus et al. 2004; Gomez-Munoz et al. 2004). Colina e colaboradores (2005) evidenciaram que ceramida 1-P induz o aumento da concentração de cálcio intracelular nas células Jurkat T, linhagem de linfócitos T derivada de linfoma de células T. Estes mediadores lipídicos produzidos pela quebra da esfingomielina podem explicar em parte os resultados encontrados neste trabalho, porém experimentos mais específicos precisam ser realizados para caracterização dos mecanismos envolvidos.

Os resultados encontrados neste trabalho apontam pela primeira vez que o veneno de *L. intermedia* produz efeitos tóxicos no coração de camundongos e mostram que a toxina recombinante está diretamente envolvida nestes efeitos uma vez que ela se liga a superfície de cardiomiócitos.

6 CONCLUSÕES

- i. O veneno da aranha de *Loxosceles intermedia* tem uma rápida absorção e uma grande distribuição nos compartimentos extravasculares.
- ii. A técnica de ELISA sanduíche permitiu detecção e quantificação dos componentes do veneno em quantidades decrescentes no rim, coração, pulmão e fígado. Não foi detectado veneno no sistema nervoso central.
- iii. Camundongos envenenados, com o veneno de *L. intermedia* e com LiD1r, apresentaram elevação da atividade das enzima CK e de sua fração MB no soro.
- iv. A tensão sistólica e frequência cardíaca encontraram-se reduzidas nos corações isolados de camundongos previamente injetados com veneno e com LiD1r.
- v. A proteína dermonecrótica recombinante (LiD1r) é capaz de se ligar a superfície de cardiomiócitos.
- vi. O anticorpo monoclonal LimAb7 é capaz de inibir a ligação de LiD1r aos cardiomiócitos.
- vii. Camundongos tratados com LiD1r apresentam cardiomiócitos com correntes de cálcio do tipo L aumentadas, com redução do tempo de inativação, para o componente rápido.
- viii. O transiente global de cálcio é maior nos cardiomiócitos de animais envenenados com LiD1r do que nos cardiomiócitos dos animais controle.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS J.E. 3rd, ABENDSCHEIN D.R., JAFFE A.S. Biochemical markers of myocardial injury. Is MB creatine kinase the choice for the 1990s? **Circulation** v. 88, n. 2, p. 750-63, 1993.

ALPERT J.S., THYGESEN K., ANTMAN E., BASSAND J.P. Myocardial infarction redefined-- a consensus document of The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the redefinition of myocardial infarction. **J Am Coll Cardiol.** v. 36, n. 3, p. 959-969, 2000.

ALVARENGA L.M., MARTINS M.S., MOURA J.F., KALAPOTHAKIS E., OLIVEIRA J.C., MANGILI O.C., GRANIER C., CHÁVEZ-OLÓRTEGUI C. Production of monoclonal antibodies capable of neutralizing dermonecrotic activity of *Loxosceles intermedia* spider venom and their use in a specific immunometric assay. **Toxicon** v. 42, n. 7, p. 725-731, 2003.

BACHMAIER K., MAIR J., OFFNER F., PUMMERER C., NEU N. Serum cardiac troponin T and creatine kinase-MB elevations in murine autoimmune myocarditis. **Circulation** v. 92, p. 1927-1932, 1995.

BARBARO K.C., CARDOSO J.L., EICKSTEDT V.R., MOTA I. Dermonecrotic and lethal components of *Loxosceles gaucho* spider venom. **Toxicon** v. 30, n. 3, p. 331-338, 1992.

BARBARO K.C., EICKSTEDT V.R.D., MOTA I. Antigenic cross-reactivity of venoms from medically important *Loxosceles (Araneae)* species in Brazil. **Toxicon** v. 32, p. 113-120, 1994.

BARRETO O.C.O., CARDOSO J.L., DE CILLO D. Viscerocutaneous form of loxoscelism and erythrocyte glucose-6-phosphate deficiency. **Revista do Instituto de Medicina Tropical** v. 27, n. 5, p. 264-267, 1985.

BASCUR L., YEVENES I., BARJA P. Effects of *Loxosceles laeta* spider venom on blood coagulation. **Toxicon** v. 20, p. 795-796, 1982.

BERNSTEIN B., EHRLICH F. Brown recluse spider bites. **J Emerg Med** v. 4, n. 6, p. 457-462, 1986.

BERS D.M. Cardiac excitation-contraction coupling. **Nature** v. 415, n. 198-204, 2002.

BERS D.M. Altered cardiac myocyte Ca regulation in heart failure. **Physiology** v. 21, p.380-387, 2006.

BETTINI S., BRIGNOLI P.M. Review of the spider families. In: BETINNI, S. **Handbook of experimental pharmacology**. New York: Springer-Verlag, 1978. Vol. 48, p. 101-120.

CALIFF R.M., ABDELMEGUID A.E., KUNTZ R.E., POPMA J.J., DAVIDSON C.J., COHEN E.A., KLEIMAN N.S., MAHAFFEY K.W., TOPOL E.J., PEPINE C.J., LIPICKY R.J., GRANGER C.B., HARRINGTON R.A., TARDIFF B.E., CRENSHAW B.S., BAUMAN R.P., ZUCKERMAN B.D., CHAITMAN B.R., BITTL J.A., OHMAN E.M. Myonecrosis after revascularization procedures. **J Am Coll Cardiol**. v. 31, n. 2, p. 241-51, 1998.

CARDOSO J.L.C, FERANÇA C.D.S., VON EIKSTEDT V.R.D., BORGES I., NOGUEIRA M.T. Loxoscelismo. Estudo de 242 casos (1980-1984). **Rev Soc Bras Toxicol** v.1, p. 50-60, 1988.

CARDOSO J.L., WEN F.H., FRANÇA F.O., WARREL D.A., THEAKSTON R.D. Detection by enzyme immunoassay of *Loxosceles gaucho* venom in necrotic skin lesions caused by spider bites in Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg** v. 84, n. 4, p. 608-609, 1990.

CASTRO C.H., SANTOS R.A., FERREIRA A.J., BADER M., ALENINA N., ALMEIDA A.P. Effects of genetic deletion of angiotensin-(1-7) receptor Mas on cardiac function during ischemia/reperfusion in the isolated perfused mouse heart. **Life Sci**. v.80, n. 3, p. 264-268, 2006.

CHAIM O.M., SADE Y.B., OLIVEIRA R.B., TOMA L., KALAPOTHAKIS E., CHÁVEZ-OLORTEGUI C., MANGILI O.C., GREMSKI W., VON DIETRICH C.P., NADER H.B., VEIGA S.S. Brown spider dermonecrotic toxin directly induces nephrotoxicity. **Toxicol Appl Pharmacol** v. 211, n. 1, p. 64-77, 2006.

CHÁVEZ-OLÓRTEGUI C., FONSECA S.C., CAMPOLINA D., AMARAL C.F., DINIZ C.R. ELISA for the detection of toxic antigens in experimental and clinical in experimental and clinical envenoming by *Tityus serrulatus* scorpion venom. **Toxicon** v. 32, n. 12, p. 1649-1656, 1994.

CHÁVEZ-OLÓRTEGUI C., ZANETTI V. C., FERREIRA A.P., MINOZZO J.C., MANGILI O.C., GUBERT I.C. ELISA for the detection of venom antigens in experimental and clinical envenoming by *Loxosceles intermedia* spiders. **Toxicon** v. 36, n. 4, p. 563-569, 1998.

COLINA C., FLORES A., CASTILLO C., GARRIDO MDEL R., ISRAEL A., DIPOLO R., BENAÏM G. Ceramide-1-P induces Ca²⁺ mobilization in Jurkat T-cells by elevation of Ins(1,4,5)-P₃ and activation of a store-operated calcium channel. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 336, n. 1, p. 54-60, 2005.

COSTANZO, L. S. Fisiologia cardiovascular. In: COSTANZO L.S. **Fisiologia**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. Cap. 4, p. 93-149.

CRISTOFF A.O., DE OLIVEIRA A, CHAIM O.M., LUGARINI D., PEREIRA A.L.B.P., PALUDO K.S., TELLES J.E.Q., BRACHT A., VEIGA S.S., ACCO A. Effects of the venom and the dermonecrotic toxin LiRecDT1 of *Loxosceles intermedia* in the rat liver. **Toxicon** v. 52, n. 6, p. 695-70, 2008.

DA SILVA, P.H., DA SILVEIRA R.B., APPEL M.H., MANGILI O.C., GREMSKI W., VEIGA, S.S. Brown spiders and loxoscelism. **Toxicon** v. 44, n.7, p. 693-709, 2004.

DE SOUZA A.L., MALAQUE C.M., SZTAJNBOX J., ROMANO C.C., DUARTE A.J., SEGURO, A.C. *Loxosceles* venom-induced cytokine activation, hemolysis, and acute kidney injury. **Toxicon** v. 51, n. 1, p. 151-156, 2008.

DULOP J., BOWLBY M., PERI R., VASILYEV D., ARIAS R. High-throughput electrophysiology: an emerging paradigm for ion-channel screening and physiology. **Nat Rev Drug Discov** v. 7, n. 4, p. 358-368, 2008

FEITOSA, L., GREMSKI W., VEIGA S.S., ELIAS M.C., GRANER E., MANGILI O.C., BRENTANI R.R. Detection and characterization of metalloproteinases with gelatinolytic,

fibronectinolytic and fibrinogenolytic activities in brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. **Toxicon** v. 36, n. 7, p. 1039-1051, 1998.

FELICORI L., ARAUJO S.C., DE AVILA R.A., SANCHEZ E.F., GRANIER C., KALAPOTHAKIS E., CHÁVEZ-OLÓRTEGUI C. Functional characterization and epitope analysis of a recombinant dermonecrotic protein from *Loxosceles intermedia* spider. **Toxicon** v. 48, n. 5, p. 509-519, 2006.

FERNANDES-PEDROSA M.F., JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO I.L.M., GONÇALVES-DE-ANDRADE R.M., KOBASHI L.S., ALMEIDA D.D., HO, P.L., TAMBOURGI D.V. Transcriptome analysis of *Loxosceles laeta* (Araneae, Sicariidae) spider venomous gland using expressed sequence tags. **BMC Genomics** v. 9, n. 1, p. 279-291, 2008.

FORRESTER L.J., BARRETT J.T., CAMPBELL B.J. Red blood cell lysis induced by the venom of the brown recluse spider: the role of sphingomyelinase D. **Arch Biochem Biophys** V. 187, n. 2, p. 355-365, 1978.

FRANÇA F.O.S., BARBARO K.C., ABDULKADER R.C.R.M. Rhabdomyolysis in presumed viscerocutaneous loxoscelism: report of two cases. **Trans R Soc Trop Med Hyg** v. 96, n. 3, p. 287-290, 2002.

FUTRELL J.M. Loxoscelism. **The Am J Med Sci** v. 304, p. 261-267, 1992.

GOMEZ, H.F., MILLER M.J., DESAI A., WARREN J.S. *Loxosceles* spider venom induces the production of alpha and beta chemokines: implications for the pathogenesis of dermonecrotic arachnidism. **Inflammation** v. 23, n. 3, p. 207-215, 1999.

GOMEZ-MUNOZ A. Ceramide-1-phosphate: a novel regulator of cell activation. **FEBS Lett.** v. 562, p. 5–10, 2004.

GONI F.M., ALONSO A. Sphingomyelinases: enzymology and membrane activity. **FEBS Lett** v. 531, n. 1, p. 38-46, 2002.

GUATIMOSIM S., SOBIE E.A., DOS SANTOS CRUZ J., MARTIN L.A., LEDERER W.J. Molecular identification of a TTX-sensitive Ca²⁺ current. **Am J Physiol Cell Physiol.** v. 280, n. 5, p. 1327-1339, 2001.

HAMIL O. P., MARTY A., NEHER E., SAKMANN B., SIGWORTH F.J. Improved patch clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. **Pflugers Archives** v. 391, p. 85-100, 1981.

HAMMOUDI-TRIKI D., LEFORT J., ROUGEOT C., ROBBE-VINCENT A., BON C., LARABADJEBARI F., CHOUMET V. Toxicokinetic and toxicodynamic analyses of *Androctonus australis* hector venom in rats: optimization of antivenom therapy. **Toxicol Appl Pharmacol.** v. 218, n. 3, p. 205-14, 2007.

HINKOVSKA-GALCHEVA V., BOXER L.A., KINDZELSKII A., HIRAOKA M., ABE A., GOPARJU S., SPIEGEL S., PETTY H.R, SHAYMAN J.A. Ceramide 1-phosphate, a mediator of phagocytosis. **J. Biol. Chem.** v. 280, p. 26612–26621, 2005.

HOGAN, C. J., BARBARO K. C, WINKEL K.. Loxoscelism: old obstacles, new directions. **Ann Emerg Med** v. 44, n. 6, p. 608-624, 2004.

JACKSON M.B. Whole-cell voltage clamp recording. **Curr Protoc Neurosci** v. 6, n. 6.6, p. 1-30, 2001.

KALAPOTHAKIS E., ARAUJO S.C., de CASTRO C.S., MENDES T.M., GOMEZ M.V., MANGILI O.C., GUBERT I.C., CHÁVEZ-OLÓRTEGUI C. Molecular cloning, expression and immunological properties of LiD1, a protein from the dermonecrotic family of *Loxosceles intermedia* spider venom. **Toxicon** v. 40, n. 12, p. 1691-1699, 2002.

KALAPOTHAKIS E, CHATZAKI M, GONÇALVES-DORNELAS H, DE CASTRO CS, SILVESTRE FG, LABORNE FV, DE MOURA JF, VEIGA SS, CHÁVEZ-OLÓRTEGUI C, GRANIER C, BARBARO KC. The Loxtox protein family in *Loxosceles intermedia* (Mello-Leitão) venom. **Toxicon** v. 50, p. 938-46, 2007.

KASS R.S., SANGUINETTI M.C. Inactivation of calcium channel current in the calf cardiac Purkinje fiber. Evidence for voltage- and calcium-mediated mechanisms. **J Gen Physiol.** v. 84, p. 705-726, 1984.

KOOIJMAN E.E., SOT J., MONTES L.R., ALONSO A., GERICKE A., DE KRUIJFF B., KUMAR S., GOÑI F.M. Membrane organization and ionization behavior of the minor but crucial lipid ceramide-1-phosphate. **Biophys J.** v. 94, n. 11, p. 4320-4330, 2008.

KRIFI M.N., SAVIN S., DEBRAY M., BON C., EL AYEYEB M., CHOUMET V. Pharmacokinetic studies of scorpion venom before and after antivenom immunotherapy. **Toxicon** v. 45, n. 2, p. 187-98, 2005.

KRYWKO D. M., GOMEZ H. F. Detection of *Loxosceles* species venom in dermal lesions: a comparison of 4 venom recovery methods. **Ann Emerg Med** v. 39, n. 5, p. 475-480, 2002.

KURPIEWSKI G., FORRESTER L.J., BARRETT J.T., CAMPBELL B.J. Platelet aggregation and sphingomyelinase D activity of a purified toxin from the venom of *Loxosceles reclusa*. **Biochim Biophys Acta** v. 678, n. 3, p. 467-476, 1981.

KUSMA J., CHAIM O.M., WILLE A.C., FERRER V.P., SADE Y.B., DONATTI L., GREMSKI W., MANGILI O.C., VEIGA S.S. Nephrotoxicity caused by brown spider venom phospholipase-D (dermonecrotic toxin) depends on catalytic activity. **Biochimie** v. 90, n. 11-12, p. 1722-1736, 2008.

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

LUCIANO M.N., SILVA P.H., CHAIM O.M., SANTOS V.L P., FRANCO C.R.C., SOARES M.F.S., ZANATA S.M., MANGILI O.C., GREMSKI W., VEIGA S.S. Experimental evidence for a direct cytotoxicity of *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom in renal tissue. **J. Histochem. Cytochem** v. 52, p. 457-467, 2004.

LUNG J.M., MALLORY S.B. A child with spider bite and glomerulonephritis: a diagnostic challenge. **Int. J. Dermatol.** v. 39, p. 287-289, 2000.

MÁLAQUE C.M.S., CASTRO-VALENCIA J.E., CARDOSO J.L.C., FRANÇA F.O.S., BARBARO K.C., FAN H.W. Clinical and epidemiological features of definitive and presumed loxoscelism in São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina tropical** v. 44, n. 3, p. 139-143, 2002.

MARETIC Z. Spider venoms and their effect. **Zoological Record** v. 124, n. 12, p. 142-159, 1987.

MARTINEZ-VARGAS A.Z. Loxoscelismo, um problem de salud en El Perú. **Bol. Sanit. Panam** v. 103, n. 4, p. 378-386, 1987.

MAGUIÑA-VARGAS C. Loxoscelismo viscerohemolitico, Perú. 2006. 1 fotografia.

MEETEREN L.A.V., FREDERIKS F., GIEPMANS B.N., PEDROSAM.F., BILINGTON S.J., JOST B.H., TAMBOURGI D.V., MOOLENAAR W.H. Spider and bacterial sphingomyelinases D target cellular lysophosphatidic acid receptors by hydrolyzing lysophosphatidylcholine. **J Biol Chem** v. 279, n. 12, p. 10833-10336, 2004.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. 2 ed. Brasília: Fundação Nacional da Saúde (FUNASA), 2001.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Acidentes por animais peçonhentos. In: MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia de vigilância Epidemiológico**. 6 ed. Brasília: Ministério da saúde, 2005. Cap. 5, p. 93-117.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Tabulação de dados. **Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN)**, 2006. Disponível em: < <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/>>. Acesso em: 31 mai 2009.

MITRA R, MORAD M. A uniform enzymatic method for dissociation of myocytes from hearts and stomachs of vertebrates. **American Journal of Physiology** v. 249, n.5, p. H1056-1060, 1985.

MONTEIRO C.L.B., RUBEL R., COGO L.L., MANGIL, O.C., GREMSKI W., VEIGA S.S. Isolation and identification of *Clostridium perfringens* in the venom and fangs of *Loxosceles intermedia* (brown spider): enhancement of the dermonecrotic lesion in loxoscelism. **Toxicon** v. 40, p. 409-418, 2002.

MUDD J.O., KASS D.A. Tackling heart failure in the twenty-first century. **Nature** v. 51, n. 7181, p. 919-928, 2008.

MURAKAMI M.T., FERNANDES-PEDROSA M.F., DE ANDRADE S.A., GABDOULKHAKOV A., BETZEL C., TAMBOURGI D.V., ARNI R.K. Structural insights into the catalytic mechanism of sphingomyelinases D and evolutionary relationship to glycerophosphodiester phosphodiesterases. **Biochem Biophys Res Commun** v. 342, n. 1, p. 323-329, 2006.

NERBONNE J.M., KASS R.S. Molecular physiology of cardiac repolarization. **Physiol Rev** v. 85, n. 4, p. 1205-1253, 2005.

OLIVEIRA K.C., ANDRADE R.M.G., GIUSTI A.L., SILVA, W.D., TAMBOURGI D.V. Sex-linked variation of *Loxosceles intermedia* spider venoms. **Toxicon** v. 37, p. 217-221, 1999.

PATEL, K. D., MODUR V., ZIMMERMAN G.A., PRESCOTT S.M., MCLNTYRE T.M. The necrotic venom of the brown recluse spider induces dysregulated endothelial cell-dependent neutrophil activation. Differential induction of GM-CSF, IL-8, and E-selectin expression. **J Clin Invest** v. 94, n. 2, p. 631-642, 1994.

PAULI I., PUKA J., GUBERT I.C., MINOZZO J.C. The efficacy of antivenom in loxoscelism treatment. **Toxicon** v. 48, n. 2, p. 123-137, 2006.

PEREIRA, MNA. *Loxosceles intermedia*, FUNED, Belo Horizonte. 2009. 1 fotografia.

PETTUS B. J., BIELAWSKA A., SUBRAMANIAN P., WIJESINGHE D.S., MACEYKA M., LESLIE C.C., EVANS J.H., FREIBERG J., RODDY P., HANNUN Y.A., CHALFANT C.E. Ceramide 1-phosphate is a direct activator of cytosolic phospholipase A2. **J. Biol. Chem.** v.279, p. 11320–11326, 2004.

PINHATI H.M.S., KONO A., CARDOSO J.L.C., MÁLAQUE C.M.S, FAN H.M. Reações adversas precoces ao soro anti-aracnídico em pacientes picados por *Loxosceles*, Phoneutria e escorpião. **Rev Soc Bras Med Trop** v. 32, n. 1, p. 497-498, 1999.

PLATNICK, N. I.. The world spider catalog, version 9.5. **American Museum of Natural History**, 2009. Disponível em: <<http://research.amnh.org/entomology/spiders/catalog/index.html>>. Acesso em: 31 mai. 2009.

RASH L.D., HODGSON W.C. Pharmacology and biochemistry of spider venom. **Toxicon** v. 40, n. 3, p. 225-254, 2002.

REES R., CAMBELL D., RIEGER, E., KING L.E. The diagnosis and treatment of brown recluse spider bites. **Annals of Emergency Medicine** v. 16, p. 945-949, 1987.

RIBEIRO L.A., Von EICKSTEDT V.R., RÚBIO G.B.G., KONOLSAISEN J.F., HANDAR Z., ENTRES M., CAMPOS V.A.F.P., JORGE M.T. Epidemiologia do acidente por aranhas do gênero *Loxosceles* Heinecken & Lowe no estado do Paraná (Brasil). **Mem Inst Butantan** v. 55, p. 19-26, 1993.

RIVIÈRE G., CHOUMET V., AUDEBERT F., SABOURAUD A., DEBRAY M., SCHERRMANN J-M., BON C. Effect of antivenom on venom pharmacokinetics in experimentally envenomed rabbits: toward an optimization of antivenom. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** v. 281, p. 1–8. 1997.

RUPPERT, E.E.; BARNES, R.D. **Zoologia dos invertebrados**. 6 ed. São Paulo: Editora Roca, 1996.

SANDIDGE J.S. Arachnology: scavenging by brown recluse spiders. **Nature** v. 30, p. 426-430, 2003.

SCHENONE H., REYES H. Loxoscelismo. Nociones sobre su epidemiologia y profilaxis. **Boletin Chileno de Parasitologia** v. 18, p. 38-39, 1963.

SCHENONE H., SAAVEDRA T, ROJAS A, VILLARROEL, F. Loxoscelismo en Chile. Estudios epidemiológicos, clínicos y experimentales. **Rev. Inst. Med. Trop.** v. 31, p. 403-415, 1989.

SCHENONE H. Toxic pictures produced spiders bites in Chile: latrodectism and loxoscelism. **Rev Med Chil** v. 131, n. 4, p. 437-444, 2003.

SEZERINO U.M., ZANNIN M., COELHO L.K., GONÇALVES J., GRANDO M., MATTOSINHO S.G., CARDOSO J.L.C., FRANÇA F.O.S., BARBARO K.C., FAN H.W. A clinical and

epidemiological study of *Loxosceles* spider in Santa Catarina, Brazil. **Trans Royal Soc Trop Med Hyg** v. 92, p. 546-548, 1998.

SILVESTRE F.G., DE CASTRO C.S., MOURA J.F., GIUSTA M.S., DE MARIA M, ÁLVARES ESS, LOBATO, F.C.F., ASSIS R.A., GONÇALVES L.A, GUBERT I.C., CHÁVEZ-OLÓRTEGUI C., KALAPOTHAKIS E. Characterization of the venom from the Brazilian Brown Spider *Loxosceles similis* Moenkhaus, 1898 (Araneae, Sicariidae). **Toxicon** v. 46, n. 8, p. 927-936, 2005.

SKRZYPIEC-SPRING M., GROTHUZZ B., SZELAG A., SCHULZ R. Isolated heart perfusion according to Langendorff – Still viable in the new millennium. **J Pharmacol Toxicol Methods** v. 55, p. 113-126, 2007.

SOUTHCOTT R.V. Spiders of the genus *Loxosceles* in Australia. **Med J Aust** v. 1, p. 406-408, 1976.

SWANSON D.L., VETTER, R.S. Medical progress: Bites of brown recluse spiders and suspected necrotic arachnidism. **N Engl J Med** v. 352, n. 7, p. 700-707, 2005.

SWANSON D. L., VETTER, R.S. Loxoscelism. **Clin Dermatol** v. 24, n. 3, p. 213-221, 2006.

TAMBOURGI D. V., MAGNOLI F.C., VAN DEN BERG C.W., MORGAN B.P, DE ARAUJO P.S., ALVES E.W., DA SILVA W.D. Sphingomyelinases in the venom of the spider *Loxosceles intermedia* are responsible for both dermonecrosis and complement-dependent hemolysis. **Biochem Biophys Res Commun** v. 251, n. 1, p. 366-373, 1998.

TAMBOURGI D.V., MORGAN B.P., DE ANDRADE R.M., MAGNOLI F.C.,VAN DEN BERG C.W. *Loxosceles intermedia* spider envenomation induces activation of an endogenous metalloproteinase, resulting in cleavage of glycophorins from the erythrocyte surface and facilitating complement-mediated lysis. **Blood** v. 95, n. 2, p. 683-691, 2000.

TAMBOURGI D. V., DE SOUSA DA SILVA M, BILINGTON S.J., GONÇALVES-DE-ANDRADE R.M., MAGNOLI F.C., SONDER J.G., VAN DEN BERG C.W. Mechanism of induction of complement susceptibility of erythrocytes by spider and bacterial sphingomyelinases. **Immunology** v. 107, n. 1, p. 93-101, 2002.

TAMBOURGI D.V., PEDROSA M.F.F, VAN DEN BERG C.W., GONÇALVES-DE-ANDRADE R.M., FERRACINI M., PAIXÃO-CAVALCANTI D., MORGAN B.P., RUSHMERE N.K. Molecular cloning, expression, function and immunoreactivities of members of a gene family of sphingomyelinases from *Loxosceles* venom glands. **Mol Immunol** v. 41, n. 8, p. 831-840, 2004.

TAMBOURGI D.V., PEDROSA M.F.F, GONÇALVES-DE-ANDRADE R.M., BILINGTON S.J., GRIFFITHS M., VAN DEN BERG C.W. Sphingomyelinases D induce direct association of C1q to the erythrocyte membrane causing complement mediated autologous haemolysis. **Mol Immunol** v. 44, n. 4, p. 576-582, 2007.

TRASK RV, BILLADELLO JJ. Tissue-specific distribution and developmental regulation of M and B creatine kinase mRNAs. **Biochim Biophys Acta** v. 1049, n. 2, p. 182-188, 1990.

VEIGA, S. S., DA SILVEIRA R.B., DREYFUS J.L., HAOACH J., PEREIRA A. M., MANGILI O.C., GREMSKI W. Identification of high molecular weight serine-proteases in *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. **Toxicon** v. 38, n. 6, p. 825-839, 2000.

VEIGA S.S., FEITOSA L., DOS SANTOS V.L., DE SOUZA G.A., RIBEIRO A.S., MANGILI O.C., PORCIONATTO M.A, NADER H.B., DIETRICH C.P., BRETANI R.R., GREMSKI W. Effect of brown spider venom on basement membrane structures. **Histochem J** v. 32, n. 7, p. 397-408, 2000.

VETTER, R.S., VISSCHER P.K. Bites and stings of medically important venomous arthropods. **Int J Dermatol** v. 37, n. 7, p. 481-496, 1998.

VETTER, R.S. Identifying and misidentifying the brown recluse spider. **Dermatol. Online J.** v. 5, n. 3, p. 7, 1999.

VETTER R.S., CUSHING P.E., CRAWFORD R.L., ROYEE L.A. Diagnoses of brown recluse spider bites (loxoscelism) greatly outnumber actual verifications of the spider in four western American states. **Toxicon** v. 42, p. 413-418, 2003.

WASSERMAN G.S., ANDERSON P.C. Loxoscelism and necrotic arachnidism. **J Toxicol Clin Toxicol.** v. 21, p. 451-472, 1983.

WEN, F.H. **Loxoscelism in Brazil**. Butantan. 2006.

WEN, F.H. **Evolução loxoscelismo cutâneo**. 2009. 4 fotografias.

WHITE J., CARDOSO J.L., FAN H.W.. Clinical toxicology of spider bites. In: MEIER, J. WHITE J. **Handbook of Clinical Toxicology in Animals Venoms and Poison**, vol. 1. 2 ed. Boca Raton, FL CRC Press, 1995. Cap. 3. p. 261-329.

WILLIAMS S.T., KHARE V.K., JOHNSTON G.A., BLACKALL D.P. Severe intravascular hemolysis associated with brown recluse spider envenomation. A report of two cases and review of the literature. **Am J Clin Pathol** v. 104, n. 4, p. 463-4677, 1995.

YOUNG A.R., PINCUS S.J. Comparison of enzymatic activity from three species of necrotising arachnids in Australia: *Loxosceles rufescens*, *Badumna insignis* and *Lampona cylindrata*. **Toxicon** v. 39, n. 2, p. 391-400, 2001.

8 ANEXO

Os dados deste trabalho foram compilados em um artigo que foi publicado na revista *Toxicon*, este arquivo encontra-se em anexo.