

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ - UFPR  
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS GRAGUAÇÃO EM FISIOLOGIA

JOÃO VICTOR CAPELLI PEIXOTO

ESTUDO DOS EFEITOS DA TOXINA RECOMBINANTE DA ARANHA MARROM  
(*Loxosceles intermedia*) (LiRECDT1) NA PRODUÇÃO DE FORÇA E NO  
PROCESSO DE ACOPLAMENTO EXCITAÇÃO-CONTRAÇÃO DE MÚSCULO  
CARDÍACO E LISO DE RATO

CURITIBA  
2013

JOÃO VICTOR CAPELLI PEIXOTO

ESTUDO DOS EFEITOS DA TOXINA RECOMBINANTE DA ARANHA MARROM  
(*Loxosceles intermedia*) (LiRECDT1) NA PRODUÇÃO DE FORÇA E NO  
PROCESSO DE ACOPLAMENTO EXCITAÇÃO-CONTRAÇÃO DE MÚSCULO  
CARDÍACO E LISO DE RATO

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa  
de Pós-Graduação em Fisiologia, Setor de Ciências  
Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Rosalvo T. H. Fogaça

CURITIBA  
2013



Ministério da Educação  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
Setor de Ciências Biológicas  
Departamento de Fisiologia  
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia



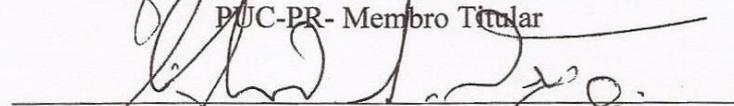
## PARECER

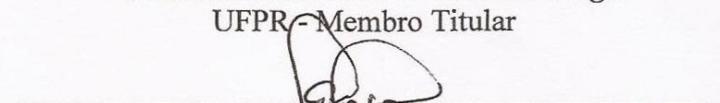
Os abaixo-assinados, membros da Banca Examinadora da Defesa de Dissertação de Mestrado, a qual se submeteu **JOÃO VICTOR CAPELLI PEIXOTO** para fins de obter o título de Mestre em Fisiologia pela Universidade Federal do Paraná, são de parecer unânime à APROVAÇÃO do acadêmico.

A obtenção do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento interno deste Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 16 de setembro de 2013.

  
\_\_\_\_\_  
**Professor Doutor Julio Cesar Francisco**  
PUC-PR - Membro Titular

  
\_\_\_\_\_  
**Professor Doutor Silvio Sanches Veiga**  
UFPR - Membro Titular

  
\_\_\_\_\_  
**Professor Doutor Rosalvo Tadeu Hochmuller Fogaça**  
UFPR - Orientador e Presidente da Banca Examinadora

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus pelo berço onde nasci.

A meus pais Ecléia Capelli Peixoto e Claudio Aurélio Peixoto pelo amor e educação que me deram.

À minha irmã Janaína Capelli Peixoto pelo amor pela motivação e apoio.

Ao meu orientador, Professor Dr. Rosalvo T.H. Fogaça pela precisa orientação, por acreditar na minha capacidade e compartilhar comigo seu conhecimento.

Ao Professor Dr. Carlos Estevan Nolf Damiani por toda assistência ao longo desse período.

Ao Professor Dr. Fernando Augusto Lavezzo Dias pela importante colaboração nos experimentos e na fase final do projeto.

A Professora Dra. Ilana Kassouf Silva pelas boas ideias e pelo incentivo.

Ao Professor Dr. Silvio Sanches Veiga por fornecer a toxina Fosfolipase D e pelas boas conversas no caminho de casa.

À Professora Dra. Ana Lúcia Tararthuck pelo incentivo e motivação num momento decisivo deste trabalho.

Aos meus colegas de laboratório Robson Olivoto, Fabrício Furtado Vieira e Priscyla Oliveira da Silva pela amizade e pela ajuda prestada na fase inicial do projeto.

À Elisiane Santos da Cruz, Jorge Masaaki Ido Filho, Claudio Augusto Fontana, Jeferson Eurich e Leandro Tomazoni por acreditarem no meu trabalho e dividirem comigo bons momentos durante esses anos.

À minha namorada e futura esposa Danieli Conte pelo amor, carinho e apoio e, por estar sempre ao meu lado.

Agradeço a todos que participaram direta ou indiretamente desse trabalho.

“O dado mais importante que separa o ser humano de todos os seus irmãos e primos na escala filogenética é o conhecimento. Só o conhecimento liberta o homem. Só através do conhecimento o homem é livre. E em sendo livre ele pode aspirar uma condição melhor de vida para si e todos os seus semelhantes”.

Enéas Carneiro

## RESUMO

As aranhas do gênero *Loxocles* são espalhadas mundialmente e suas picadas podem se manifestar em indivíduos de duas formas, primeiro como quadro cutâneo ou dermonecrótico e segundo como quadro sistêmico, sendo consideradas como problema de saúde pública. Independente da espécie da aranha, o veneno pode causar dermonecrose, hemólise, disfunção renal e resposta inflamatória sistêmica. De acordo com estudos, um importante componente do veneno responsável por hemólise e dermonecrose é a Fosfolipase D. Os objetivos deste trabalho foram avaliar os efeitos diretos e sistêmicos da toxina recombinante Fosfolipase D (PLD) em músculos papilares, anéis de aorta e corações isolados perfundidos. Avaliamos em músculo cardíaco e liso de ratos Wistar parâmetros de contratilidade como geração de força e pressão, velocidade máxima de contração e de relaxamento. Nossos estudos demonstraram que em corações isolados de animais pré-tratados, a administração intraperitoneal de fosfolipase D reduziu o valor máximo de pressão intraventricular, a velocidade máxima de relaxamento ( $-dP/dt$ ). Não foram observados efeitos diretos da toxina em parâmetros de contratilidade de músculos papilares isolados e anéis de aorta. Esses dados sugerem que o efeito da Fosfolipase D é decorrente de sua ação sistêmica.

Palavras-chave: Músculo cardíaco. Músculo liso. Fosfolipase D.

## ABSTRACT

Loxocles spiders gender are worldwide spread and it's bites can cause in individuals two types of injury. The first is a dermonecrotic process and the second is a systemic frame, being considered a public health problem. Independently on spider species, it's poison can cause dermonecrotic frame, hemolysis, kidney dysfunction and systemic inflammatory responses. According with studies, an important component of poison, responsible for hemolyis and dermonecrotic frame is phospholipase D (PLD). The objectives of this work were to evaluate direct and systemic effects of recombinant toxin phospholipase D in papillary muscles, aortic rings and isolated perfused hearts. Wistar rats were used to evaluated contractile parameters as force and pressure generation, maximum speed of contraction and relaxation. Our studies showed in isolated hearts that the i.p. administration of phospholipase d reduced the maximum value of intraventricular pressure and the speed of relaxation (-dP/dt). We didn't find direct effects of toxin in contractile parameters of isolated papillary muscles and aortic rings. These data suggest that the effect of phospholipase D is due to a systemic action.

Key-words: Cardiac muscle. Smooth muscle. Phospholipase D.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|           |     |  |    |
|-----------|-----|--|----|
| FIGURA 1  | –   | REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA DO RETÍCULO SARCOPLASMÁTICO .....   | 30 |
| FIGURA 2  | –   | REPRESENTAÇÃO DOS MEDIADORES PRIMÁRIOS DA HOMEOSTASE DO CÁLCIO NO MÚSCULO LISO .....   | 39 |
| FIGURA 3  | –   | SDS-PAGE DA PURIFICAÇÃO DA TOXINA LiReCDT1.....  | 54 |
| FIGURA 4  | –   | ENSAIO DE ATIVIDADE ESFINGOMIELINÁSICA DA ISOFORMA LiRecDT1.....   | 55 |
| FIGURA 5  | –   | REGISTRO ORIGINAL DA VARIAÇÃO DA PRESSÃO INTRAVENTRICULAR ESQUERDA, VARIAÇÃO DA GERAÇÃO DA PRESSÃO EM FUNÇÃO DO TEMPO (+dP/dt e – dP/dt) E REGISTRO ELETROCARDIOGRÁFICO DO GRUPO CONTROLE DOS CORAÇÕES ISOLADOS.....     | 56 |
| FIGURA 6  | –   | REGISTRO ORIGINAL DA VARIAÇÃO DA PRESSÃO INTRAVENTRICULAR ESQUERDA, VARIAÇÃO DA GERAÇÃO DA PRESSÃO EM FUNÇÃO DO TEMPO (+dP/dt e – dP/dt) E REGISTRO ELETROCARDIOGRÁFICO DO GRUPO EXPERIMENTAL DOS CORAÇÕES ISOLADOS..... | 57 |
| FIGURA 7  | –   | CORAÇÃO DE RATO ISOLADO EM SOLUÇÃO BANHO.....  | 62 |
| FIGURA 8  | –.  | REGISTRO ORIGINAL DE UM EXPERIMENTO TÍPICO DA FORÇA DE CONTRAÇÃO DE MÚSCULO PAPILAR E DA VELOCIDADE MÁXIMA DE CONTRAÇÃO E RELAXAMENTO (+df/dt e –df/dt) NO GRUPO CONTROLE.....   | 63 |
| FIGURA 9  | –.. | REGISTRO ORIGINAL DE UM EXPERIMENTO TÍPICO DA FORÇA DE CONTRAÇÃO DE MÚSCULO PAPILAR E DA VELOCIDADE MÁXIMA DE CONTRAÇÃO E RELAXAMENTO (+df/dt e –df/dt) NO GRUPO EXPERIMENTAL.....                                       | 64 |
| FIGURA 10 | –   | MÚSCULO PAPILAR DE VENTRÍCULO DIREITO DE RATO EM SOLUÇÃO BANHO.....  | 67 |
| FIGURA 11 | –   | REGISTRO ORIGINAL DE EXPERIMENTO TÍPICO DA FORÇA DE CONTRAÇÃO DE ANEL DE AORTA DO GRUPO CONTROLE.....  | 68 |

|   |    |
|---|----|
| FIGURA 12 – REGISTRO ORIGINAL DE EXPERIMENTO TÍPICO DA FORÇA DE CONTRAÇÃO DE ANEL DE AORTA DO GRUPO EXPERIMENTAL..... | 69 |
| FIGURA 13 – SEGMENTO DE ARTÉRIA AORTA TORÁXICA DE RATO E ANÉIS DE AORTA OBTIDOS DESTE SEGMENTO.....                   | 73 |

## LISTA DE GRÁFICOS

|   |    |
|---|----|
| GRÁFICO 1 – PRESSÃO INTRAVENTRICULAR ESQUERDA .....   | 58 |
| GRÁFICO 2 – VELOCIDADE MÁXIMA DE DESENVOLVIMENTO DE PRESSÃO<br>INTRAVENTRICULAR ESQUERDA (+dP/dt MÁX) ..... | 59 |
| GRÁFICO 3 – VELOCIDADE MÁXIMA DE RELAXAMENTO MÁXIMO (- dP/dt MÁX)<br>.....                                  | 60 |
| GRÁFICO 4 – FREQUÊNCIA CARDÍACA DE CORAÇÕES ISOLADOS .....  | 61 |
| GRÁFICO 5 – FORÇA MÁXIMA DESENVOLVIDA POR MÚSCULOS PAPILARES<br>.....                                       | 65 |
| GRÁFICO 6 – VELOCIDADE MÁXIMA DE FORÇA DESENVOLVIDA (+df/dt) POR<br>MÚSCULOS PAPILARES .....                | 66 |
| GRÁFICO 7 – VELOCIDADE MÁXIMA DE RELAXAMENTO DESENVOLVIDO<br>(-df/dt) POR MÚSCULOS PAPILARES .....          | 67 |
| GRÁFICO 8 – FORÇA MÁXIMA DESENVOLVIDA POR ANÉIS DE AORTA .....  | 70 |
| GRÁFICO 9 – RELAXAMENTO DESENVOLVIDO POR ANÉIS DE AORTA (30 – 30<br>MINUTOS) .....                          | 71 |
| GRÁFICO 10 – RELAXAMENTO DESENVOLVIDO POR ANÉIS DE AORTA (3 – 3<br>HORAS) .....                             | 72 |

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

|        |   |
|--------|---|
| AEC –  | Acoplamento excitação contração             |
| AMPC – | Monofosfato cíclico de adenosina            |
| ATP –  | Adenosina trifosfato                        |
| CASQ – | Calsequestrina                              |
| CICR – | Cálcio que induz a liberação de cálcio      |
| DAG –  | Diacilglicerol                              |
| DDL –  | Despolarização diastólica lenta             |
| DHP –  | Receptor diidropiridínico                   |
| eNOS – | Óxido nítrico sintetase                     |
| GMPc – | Monofosfato cíclico de guanosina            |
| IP3 –  | Inositol 1,4,5 trifosfato                   |
| IP3R – | Receptor de inositol 1,4,5 trifosfato       |
| IPTG – | Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo |
| NAV –  | Nodo átrio ventricular                      |
| NCX –  | Trocador sódio cálcio                       |
| NO –   | Óxido nítrico                               |
| NSA –  | Nodo sino atrial                            |
| PA –   | Potencial de ação                           |
| PBS –  | Tampão fosfato salino                       |
| PKA –  | Proteína quinase A                          |
| PKC –  | Proteína quinase C                          |
| PKG –  | Proteína quinase G                          |
| PLB –  | Fosfolambano                                |
| PLD –  | Fosfolipase D                               |
| PMCA – | Bomba de cálcio da membrana plasmática      |

|          |   |
|----------|---|
| RS –     | Retículo sarcoplasmático                            |
| SACC –   | Canais ativados por estiramento                     |
| SERCA –  | Bomba de cálcio do reticulo sarcoplasmático         |
| SOCC –   | Canais de cálcio ativados para estocagem            |
| STOC –   | Corrente espontânea transiente para fora            |
| RyR –    | Receptor de rianodina                               |
| TRIZMA – | Hidroximetil amino metano                           |
| +df/dt – | Primeira derivada da produção de força no tempo     |
| -df/dt – | Primeira derivada de decréscimo de força no tempo   |
| +dP/dt – | Primeira derivada da produção de pressão no tempo   |
| -dP/dt – | Primeira derivada de decréscimo de pressão no tempo |

## LISTA DE SÍMBOLOS

|                    |                     |
|--------------------|---------------------|
| $\text{Ca}^{++}$ – | Íon cálcio          |
| $\text{Cl}^-$ –    | Íon cloreto         |
| $\text{CaCl}_2$ –  | Cloreto de cálcio   |
| $\text{HCl}$ –     | Ácido clorídrico    |
| $\text{K}^+$ –     | Íon potássio        |
| $\text{KCl}$ –     | Cloreto de potássio |
| $\text{MgCl}_2$ –  | Cloreto de magnésio |
| $\text{Na}^+$ –    | Íon sódio           |
| $\text{NaCl}$ –    | Cloreto de sódio    |
| $\text{NaOH}$ –    | Hidróxido de sódio  |
| $\text{NO}$ –      | Óxido nítrico       |

## SUMÁRIO

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO .....</b>  | <b>15</b> |
| 1.1 CORAÇÃO .....  | 18        |
| 1.2 SISTEMA DE CONDUÇÃO DO CORAÇÃO .....   | 20        |
| 1.3 CÉLULAS E ORGANELAS DO CORAÇÃO .....   | 22        |
| 1.3.1 Sarcolema .....  | 22        |
| 1.3.2 Comunicação .....  | 22        |
| 1.3.3 Túbulo transverso e retículo sarcoplasmático .....   | 23        |
| 1.3.4 Miofilamentos .....  | 23        |
| 1.3.5 Citoesqueleto .....  | 25        |
| 1.4 CANAIS, BOMBAS E TROCADORES NO MÚSCULO CARDÍACO .....  | 26        |
| 1.4.1 Bomba de cálcio da membrana sarcoplasmática (PMCA) .....                                   | 26        |
| 1.4.2 Trocador sódio/cálcio (NCX) .....  | 27        |
| 1.4.3 Receptores Diidropiridínicos (DHP).....  | 27        |
| 1.4.4 Receptores de rianodina (RyR) .....  | 28        |
| 1.4.5 Bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático (SERCA).....                                   | 28        |
| 1.4.6 Fosfolambano (PLB).....  | 29        |
| 1.4.7 Proteínas associadas ao retículo sarcoplasmático: Calsequestrina, Triadina e Junctina..... | 30        |
| 1.4.8 Processo de acoplamento excitação-contração (AEC) do músculo cardíaco ..                   | 31        |
| 1.5 MÚSCULO LISO VASCULAR .....  | 32        |
| 1.5.1 Canais iônicos no músculo liso .....   | 34        |
| 1.5.2 Sarcolema .....  | 35        |
| 1.5.3 Retículo sarcoplasmático .....   | 36        |
| 1.5.4 Processo de acoplamento excitação-contração (AEC) do músculo liso vascular .....           | 37        |
| 1.5.5 Relaxamento e Óxido Nítrico (NO).....  | 40        |
| 1.6 SINALIZAÇÃO CELULAR: RECEPTORES ACOPLADOS À PROTEÍNA G .....                                 | 41        |

|   |           |
|---|-----------|
| 1.6.1 AMP cíclico.....  | 42        |
| 1.6.2 Fosfolipase C .....                                       | 43        |
| 1.6.3 GMP cíclico .....   | 43        |
| 1.7 JUSTIFICATIVA .....   | 44        |
| <b>2 OBJETIVOS.....</b>   | <b>46</b> |
| 2.1 GERAL .....   | 46        |
| 2.2 ESPECÍFICOS .....   | 46        |
| <b>3 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>                               | <b>47</b> |
| 3.1 ELETROFORESE DE PROTEÍNAS EM GEL DE POLIACRILAMIDA .....    | 48        |
| 3.2 ENSAIO DE ATIVIDADE ESFINGOMIELINÁSICA .....                | 48        |
| 3.3 CORAÇÃO ISOLADO .....                                       | 49        |
| 3.4 EXPERIMENTOS COM MÚSCULOS PAPILARES ISOLADOS INTACTOS ..... | 50        |
| 3.5 EXPERIMENTOS COM MÚSCULO LISO DE AORTA .....                | 52        |
| 3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....                                   | 53        |
| <b>4 RESULTADOS.....</b>  | <b>54</b> |
| 4.1 ELETROFORESE DE PROTEÍNAS EM GEL DE POLIACRILAMIDA .....    | 54        |
| 4.2 ENSAIO DE ATIVIDADE ESFINGOMIELINÁSICA .....                | 55        |
| 4.3 CORAÇÃO ISOLADO .....                                       | 56        |
| 4.4 MÚSCULOS PAPILARES ISOLADOS INTACTOS .....                  | 63        |
| 4.5 MÚSCULO LISO DE AORTA .....                                 | 68        |
| <b>5 DISCUSSÃO .....</b>  | <b>74</b> |
| <b>6 CONCLUSÃO .....</b>  | <b>79</b> |
| <b>REFERÊNCIAS .....</b>  | <b>80</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

As aranhas são animais peçonhentos comuns, encontrados em grande número em quase todos os ambientes, incluindo habitats urbanos (ISBISTER; GRAY, 2002). Praticamente todas as aranhas são venenosas, mas poucas são capazes de picar os seres humanos de forma significativa devido ao seu pequeno tamanho. A morbidade clinicamente significativa decorrente da picada da aranha é restrita a um número pequeno de espécies e o índice de óbitos é bastante pequeno (WHITE et al., 2003). As picadas das aranhas do gênero *loxosceles* causam morbidade e mortalidade significativas e, por isso devem ser consideradas um problema de saúde pública (CHAIM et al., 2011).

As aranhas do gênero *loxosceles* recebem o nome popular de aranha marrom por apresentarem coloração que varia do marrom claro ao escuro. São encontradas em regiões de clima equatorial a temperado, espalhadas pelos cinco continentes, onde existe registro de acidentes com seres humanos (DUNCAN et al., 2010; SAUPE et al., 2011; VETTER; ISBISTER, 2008). Em algumas regiões do Brasil, Chile e Perú, os acidentes provocados por aranhas do gênero *loxosceles* são um problema de saúde pública significativo (DA SILVA et al., 2004). Essas aranhas não são agressivas e os acidentes ocorrem quando as pessoas comprimem a aranha ao vestir-se, enxugar-se ou durante o sono, ocorrendo a picada como forma de defesa (FUTRELL, 1992).

Acidente loxoscélico ou loxoscelismo é a designação do quadro clínico desenvolvido por indivíduos picados por aranhas do gênero *loxosceles* (FUTRELL, 1992). Esse quadro clínico pode se manifestar de duas formas, primeiro como quadro cutâneo ou dermonecrótico (84-97% dos casos) e segundo como quadro sistêmico (3-16% dos casos) (BARBARO et al., 1992). Os efeitos sistêmicos do veneno são potencialmente fatais devendo ser clinicamente abordados de forma rápida e objetiva (PETERSON, 2006). A gravidade do acidente e o desenvolvimento de determinado quadro clínico dependerá de fatores relacionados com a espécie da aranha marrom, seu sexo, o estágio de desenvolvimento (GONÇALVES DE ANDRADE et al.,

1999) e a quantidade de veneno inoculado (SEZERINO et al., 1998). Além disso, dependerá das características genéticas do indivíduo acidentado (BARRETTO; CARDOSO; DE CILLO, 1985), estado nutricional da vítima, local da picada, susceptibilidade ao veneno e o tempo que o acidentado leva para obter tratamento correto (BARBARO; EICKSTEDT, 1994). Apenas uma picada pode ser fatal.

O quadro cutâneo é caracterizado por dermonecrose na região da picada. A picada pode não ser sentida pelo indivíduo no momento, mas após duas a oito horas, surge a dor, que é caracterizada por ser local e do tipo queimação ou ardência. Ocorre também edema, mal estar e febre. Após três a cinco dias pode ocorrer necrose e formação de abscesso. Em alguns casos a necrose evolui em duas a seis semanas para formação de uma escara de difícil cicatrização, podendo originar sequelas deformantes (FUTRELL, 1992).

Algumas vítimas podem desenvolver loxoscelismo sistêmico, que pode ser acompanhado de loxoscelismo dermonecrótico. Pode ocorrer anemia hemolítica, trombocitopenia decorrente da agregação plaquetária e coagulação intravascular, eventos esses que culminam na diminuição do hematócrito (FUTRELL, 1992; PETERSON, 2006). Pode ocorrer ainda insuficiência renal aguda, associada com a obstrução da luz tubular, fator principal de morte nos casos de loxoscelismo.

No Brasil as espécies de aranha mais relacionadas com acidentes do gênero *Loxosceles* são as espécies *Loxosceles gaucha*, *Loxosceles laeta* e *Loxosceles intermedia*. Independente da espécie, este veneno pode causar dermonecrose, hemólise, disfunção renal e resposta inflamatória sistêmica (BARBARO et al., 2005; CHAIM et al., 2011; DA SILVA et al., 2004). De acordo com estudos, o componente do veneno responsável por hemólise e dermonecrose é a esfingomielinase D, devido a habilidade de hidrolisar esfingomielina (FUTRELL, 1992). Entretanto o termo fosfolipase D é mais correto porque os membros desta família de toxinas hidrolisam esfingolipídeos e lisoglicerofosfolipídeos (CHAIM et al., 2011; LEE; LYNCH, 2005).

O veneno da aranha marrom é uma mistura de proteínas no qual existe predominância de proteínas de baixa massa molecular, entre 5 e 40 kDa e o total de veneno injetado possui em média 10 microgramas de

proteína (DA SILVA et al., 2004; FUTRELL, 1992; SAMS et al., 2001; SWANSON; VETTER, 2006). Algumas toxinas presentes no veneno foram identificadas, como diferentes formas de fosfolipase D, que ocasiona dermonecrose, hidrólise de fosfolípidos, hemólise e distúrbio renal. Metaloproteases, serino proteases e hialuronidasas, que degradam matriz extracelular (CHAIM et al., 2011; CHAVES-MOREIRA et al., 2009; GREMSKI et al., 2010; TREVISAN-SILVA et al., 2010). A fosfolipase D interage com os fosfolípidos e os degrada, gerando ceramida-1-fosfato e ácido lisofosfatídico, iniciando uma cascata que permite que o cálcio entre na célula pelos canais do tipo L, contribuindo para hemólise (CHAVEZ-MOREIRA, D.; VEIGA, 2011).

Embora as vítimas procurem atendimento médico dentro das primeiras 24 horas após o acidente (RODRIGUES et al., 1986) é sabido que os componentes do veneno permanecem na lesão durante um longo período de tempo (CARDOSO et al., 1990). O teste de ELISA detectou antígenos circulantes nos rins, coração, pulmão e fígado de ratos envenenados. Este mesmo estudo revelou que corações de camundongos intoxicados por fosfolipase D têm aumento na corrente de cálcio pelos canais do tipo L e aumento também no transiente de cálcio, embora a força de contração sistólica seja diminuída (DIAS-LOPES et al., 2010). Este é o único estudo relacionando fosfolipase D e coração na literatura, mesmo o coração sendo o segundo órgão mais afetado pelo veneno. Não existem dados na literatura relacionando os efeitos da fosfolipase D e na mecânica cardíaca ou no acoplamento excitação contração.

## 1.1 CORAÇÃO

A existência do coração já era conhecida pelos antigos gregos, que deram o nome de *kardia*. Os romanos modificaram *kardia* para *cor*. A palavra teutônica *herton*, também derivada de *cor* originou a palavra *heart*, através do inglês medieval *heorte*.

Galeno, o pai da fisiologia experimental, por volta de 200 A.C., sabia que o coração punha o sangue em movimento. Ele descobriu que as artérias continham sangue e, não ar. Galeno pensava que havia poros entre o lado direito e esquerdo do coração e, que o espírito vital era formado nos pulmões a partir de uma mistura de ar e sangue.

Anos mais tarde, Versalius (1514-1564) mostrou claramente através de dissecações que não havia poros, mas sim um septo separando o lado direito do esquerdo. O ponto crucial foi quando Servetus (1511-1553) identificou a circulação direita e a circulação esquerda (OPIE, 1998).

O coração é um órgão em forma de cone, com o tamanho aproximado de uma mão fechada, e localizado por entre os pulmões num espaço denominado mediastino, onde se situa obliquamente. É descrito como possuindo uma base, um ápice, faces diafragmática e esternocostal (SILVERTHORN, 2003; SPENCE, 1991). A base do coração está voltada para cima, para trás e para direita, ao nível da segunda e terceiras costelas. É formada pelo átrio esquerdo, átrio direito, e a porção proximal dos grandes vasos que penetram pela parte posterior do coração. O ápice é localizado ao nível do quinto espaço intercostal esquerdo. A face diafragmática é a região entre a base e o ápice que repousa sobre o músculo diafragma. Esta envolve os ventrículos direito e esquerdo. A face esternocostal é a face anterior do coração, formada pelo ventrículo e átrio direitos.

O coração apresenta quatro câmaras: átrio direito, átrio esquerdo, ventrículo direito e ventrículo esquerdo. Os átrios são menores e se localizam na parte superior do coração, os ventrículos são maiores e constituem o volume principal do órgão. Os átrios são separados entre si por um septo interatrial e os ventrículos separados por um septo interventricular (POWERS, S.K. ; HOWLEY, 2000).

Vasos sanguíneos de grande calibre entram ou saem do coração pela sua base, como veia cava superior e veia cava inferior, que trazem o sangue venoso para o átrio direito, artéria tronco pulmonar que se divide em artéria pulmonar direita e esquerda, e que levam o sangue do ventrículo direito para os pulmões, veias pulmonares, duas direitas e duas esquerdas, que trazem o sangue do pulmão para o átrio esquerdo e artéria aorta, que leva o sangue do ventrículo esquerdo para o corpo (SILVERTHORN, 2003; SPENCE, 1991).

Existem quatro grupos de válvulas cardíacas que direcionam o fluxo sanguíneo através das câmaras cardíacas, impedindo que o sangue reflua. São as valvas atrioventriculares (direita e esquerda) e as valvas semilunares (pulmonar e aórtica).

Localizadas entre os átrios e os ventrículos, as duas válvulas atrioventriculares são pregas de endocárdio com uma estrutura de tecido conjuntivo. As cúspides são ancoradas aos músculos papilares dos ventrículos através de cordas tendíneas. Os papilares que são prolongamentos de miocárdio exercem tensão sobre as cúspides das valvas, impedindo que as valvas sejam forçadas para o interior dos átrios quando da contração ventricular, sendo que a valva atrioventricular direita possui três cúspides, e por isso denominada tricúspide e a valva atrioventricular esquerda possui duas cúspides e é conhecida como bicúspide ou mitral.

Após a contração ventricular o sangue é impedido de retornar aos ventrículos pela função das válvulas semilunares. Ambas possuem três cúspides e estão presas às paredes dos vasos. Quando os ventrículos se contraem, a força do sangue empurra as cúspides contra as paredes dos vasos, abrindo-as e, quando os ventrículos relaxam, o próprio sangue, ao retornar fecha as valvas (OPIE, 1998; SILVERTHORN, 2003; SPENCE, 1991).

O coração é constituído por três camadas: 1) Camada externa: O coração está envolvido pelo pericárdio, cujas duas superfícies podem ser imaginadas, se concebermos o coração como uma mão empunhada e mergulhada dentro de um balão. A superfície do balão em contato íntimo com a mão é análoga ao pericárdio visceral, ou epicárdio. Essa superfície envolve o coração, prolongando-se por vários centímetros sobre cada um dos grandes vasos. Depois ela se volta, como a superfície externa do balão, para formar o

pericárdio parietal. As duas superfícies pericárdicas são formadas por tecido seroso liso e brilhante, e separadas por uma fina camada de líquido lubrificante que permite ao coração movimentar-se livremente dentro do pericárdio parietal. O pericárdio parietal é ligado, através de ligamentos, ao manúbrio, ao processo xifoide, à coluna vertebral e ao diafragma. Normalmente, há cerca de 10 a 20 ml de líquido pericárdico que umedece as superfícies contrárias dos pericárdios visceral e parietal. 2) Camada média: É o miocárdio, ou seja, o músculo cardíaco a que corresponde a maioria da espessura da parede do coração. Este tecido é formado por inúmeras estruturas de fibras musculares estriadas, semelhantes às que constituem os músculos esqueléticos, mas que ao contrário destas não são controladas pela vontade. 3) Camada interna: É o endocárdio, uma fina e delicada túnica de tecido epitelial que reveste por completo os átrios, os ventrículos e as valvas cardíacas. (OPIE, 1998; POWERS, S.K. ; HOWLEY, 2000; SPENCE, 1991).

A parede ventricular esquerda é três vezes mais espessa que a parede ventricular direita e possui fibras dispostas em várias camadas. Nas camadas interna e externa as fibras correm longitudinalmente do ápice em direção a base do coração. Com este padrão de fibras, quando o músculo se contrai, ele não apenas impulsiona o sangue, mas gira o coração pra frente em direção ao tórax, de forma que isso pode ser sentido pelo lado de fora, e é conhecido como Impulso apical (OPIE, 1998).

## 1.2 SISTEMA DE CONDUÇÃO DO CORAÇÃO

O músculo cardíaco é inervado pelo sistema nervoso autônomo, isto é, pelo simpático e pelo parassimpático. Do simpático, o coração recebe os nervos cardíacos simpáticos, sendo três cervicais e quatro ou cinco torácicos. As fibras parassimpáticas que chegam ao coração seguem pelo nervo vago (X par craniano), do qual derivam os nervos cardíacos parassimpáticos, sendo dois cervicais e um torácico. Todavia, o coração apresenta um sistema de condução. Tal sistema de condução é formado por um conjunto de fibras musculares excitatórias e condutoras especializadas. Estruturalmente, é formado pelo Nodo Sino-atrial (NSA), Nodo Átrio-ventricular (NAV), Vias de condução intermodais, Feixe de His e Fibras de Purkinje. A excitação rítmica

começa no NSA, situado na parede atrial direita, inferior à abertura da veia cava superior. São descritas três vias de condução que facilitam a condução do impulso elétrico entre os nodos SA e AV. Essas três vias são chamadas de Feixes Internodais anterior, médio e posterior. O Feixe internodal anterior, ou Feixe de Bachman, cursa anteriormente ao redor da veia cava superior, e para baixo ao longo do septo atrial até o Nodo AV. Fibras dessa via também se ramificam para o átrio esquerdo. O Feixe internodal médio parte do Nodo SA e curva posteriormente ao redor da veia cava superior, indo até o Nodo AV. O Feixe internodal posterior corre posteriormente através da crista terminal e depois pelo septo atrial posterior para alcançar o Nodo AV.

As células do NSA, do NAV e as Fibras de Purkinje não necessitam de estímulo externo para iniciar um potencial de ação, sendo estas células marca passo em potencial. Esta propriedade é chamada de automatismo e é característico dessas células. Nestes tecidos, não existe um potencial de repouso fixo, sendo a repolarização ao final de um potencial de ação (PA) seguida de uma despolarização lenta da membrana denominada despolarização diastólica lenta (DDL) ou fase 4 dos potenciais de ação automáticos. Esta fase prossegue até um valor de potencial (potencial limiar), a partir do qual ocorre a ativação da corrente de cálcio ( $I_{Ca,L}$ ) e consequente despolarização celular (fase 0). Nas células nodais, a despolarização se dá por ativação de  $I_{Ca,L}$  e nas Fibras de Purkinje isso acontece devido à abertura dos canais rápidos de sódio ( $I_{Na}$ ). Por outro lado, as fibras de trabalho atriais e ventriculares não apresentam DDL, e permanecem, após o final de um PA, em seu potencial de repouso estável até serem estimuladas novamente.

Dentre os tecidos dotados de automatismo, as células do NSA são as que mostram fase 4 mais inclinada (DDL mais rápida), o que se traduz em maior frequência de disparo, garantindo a esta estrutura a condição de marca-passo cardíaco primário (AIRES, 2012; COSTANZO, 2004).

## 1.3 CÉLULAS E ORGANELAS DO CORAÇÃO

### 1.3.1 Sarcolema

O miocárdio é constituído de células musculares estriadas ramificadas e com núcleo central. Sua membrana superficial é denominada sarcolema e é de natureza lipoprotéica. A porção lipídica é formada por moléculas fosfolipídicas contendo duas cadeias de ácidos graxos na parte central e ligadas a porções globulares fosfatadas nas regiões periféricas. A porção proteica tem forma globular, localizando-se na porção interna ou externa da membrana, ou ainda transpassando-a completamente. São geralmente de natureza glicoproteica, com funções diversas (ex., receptores de hormônios e neurotransmissores, enzimas e canais iônicos). As células do miocárdio ou cardiomiócitos são menores que as células esqueléticas e têm em média 10 a 20 micrômetros de diâmetro e 100 micrômetros de comprimento (AIRES, 2012). No interior das células musculares encontramos o seu citoplasma (sarcoplasma), organelas e sistemas tubulares. Das organelas celulares, cabe lembrar o papel das mitocôndrias. Estas funcionam como usinas geradoras de energia, sintetizando ATP a partir da atividade da cadeia respiratória. Esta energia provém da metabolização aeróbica de glicose e de ácidos graxos, sendo então utilizada para a execução da contração. É provável que haja função das mitocôndrias no controle da concentração de cálcio mioplasmático. (AIRES, 2012; SOMMER; WAUGH, 1976; STENGER; SPIRO, 1961).

### 1.3.2 Comunicação

Nas regiões de contato entre as células encontramos inúmeras especializações, tais como desmossomos, regiões de ancoramento e junções de baixa resistência elétrica do tipo gap. As junções do tipo gap permitem ao miocárdio se comportar como um sincício funcional. Estas interconexões por

discos intercalares permitem os íons atravessar a célula de um lado a outro, permitindo a transmissão de impulsos nervosos de uma célula à outra. Assim, quando a célula é despolarizada e se contrai, as células conectadas se contraem junto, como uma unidade. As células dos átrios não se comunicam com as células dos ventrículos, sendo separados por uma camada de tecido conjuntivo que não permite a transmissão de impulsos elétricos. Desta forma os átrios se contraem separadamente dos ventrículos (ALBERTS, 2006; BERNE; LEVY, 2000; POWERS, S.K. ; HOWLEY, 2000).

### **1.3.3 Túbulo transverso e retículo sarcoplasmático**

Nas células musculares, encontramos sistemas tubulares. Um deles, o sistema transverso ou túbulo-T que se caracteriza como uma invaginação do próprio sarcolema que penetra e percorre transversalmente as células e, ramificando-se, envolve os sarcômeros nos discos Z. O outro, o retículo sarcoplasmático (RS), tem localização estritamente intracelular. É composto por túbulos que correm longitudinalmente por entre as miofibrilas e, no disco Z, formam cisternas que entram em contato com o sistema transverso. A região do RS que entra em contato com o sistema transverso e constitui cisternas laterais é denominada retículo juncional. A combinação entre um túbulo transverso e duas cisternas laterais do RS recebe o nome de tríade. No miocárdio, também é comum a visualização de cisternas do RS em contato com a membrana superficial (sarcolema) e, nesse caso, são denominadas díades (AIRES, 2012; SOMMER; WAUGH, 1976; STENGER; SPIRO, 1961). Estes sistemas tubulares desempenham papel importante na ativação da contração muscular.

### **1.3.4 Miofilamentos**

Dentro das células musculares, existe o material contrátil. Este encontra-se organizado, formando uma estrutura repetitiva, o sarcômero, considerado como a unidade contrátil básica do músculo. O sarcômero é

limitado por duas linhas ou discos Z. Entre eles, há regiões claras e escuras denominadas, respectivamente, bandas I e A. A banda I é uma região isotrópica, não desvia a luz polarizada e é composta por filamentos finos que se ligam à linha Z. Assim, de cada lado da linha Z, temos uma hemibanda I. A banda A é anisotrópica, desvia a luz polarizada, daí sua aparência escura quando vista ao microscópio de polarização. É constituída por filamentos grossos. Nas porções laterais da banda A, existe uma região de superposição de filamentos grossos e finos e, entre estas, temos uma região onde só se encontram filamentos grossos. A esta última região, localizada no meio da banda A, chamamos de banda H. Na porção mediana dos sarcômeros, no meio da banda A, os filamentos grossos apresentam um espessamento que gera a linha M. Em condição de repouso, os sarcômeros medem cerca de 2,02  $\mu\text{m}$  de comprimento.

Os filamentos finos, medidos a partir da linha Z até sua extremidade, têm 1,6  $\mu\text{m}$ , enquanto os grossos, em média, 1,5  $\mu\text{m}$ . É nestes miofilamentos que vamos encontrar as proteínas que participam do processo da contração. Os filamentos grossos também se ligam à linha Z, por meio de um filamento de conexão. São nestes filamentos que se encontram as proteínas que participam do processo de contração. Os filamentos espessos são compostos pela proteína miosina, contendo seis cadeias polipeptídicas, um par de cadeias pesadas e dois pares de cadeias leves. A cadeia pesada da miosina é composta pela porção S1, que contém a cabeça da miosina e S2, que contém parte da cauda em alfa hélice. As quatro cadeias leves são localizadas nas cabeças globulares da molécula de miosina, que possui um sítio de ligação para a actina, necessário para a formação das pontes cruzadas. Os filamentos finos são compostos por proteínas, actina, tropomiosina e troponina. A actina é uma proteína globular chamada de actina G. Nos filamentos finos ela é formada por dois cordões em forma de alfa hélice formados por actina filamentosa, ou actina F. A tropomiosina é uma proteína filamentosa em forma de bastão que se localiza na fenda de cada filamento torcido de actina. Seu propósito é bloquear os locais de ligação entre a miosina e a actina. Para que ocorra a contração, a tropomiosina deve se mover para que haja interação entre miosina e actina. A troponina é uma

proteína disposta ao longo da tropomiosina, é formada por um complexo de proteínas globulares, troponina T, troponina I e troponina C. A troponina T é referente à tropomiosina, ou seja, o local de ligação da troponina, troponina I referente à inibição do sítio de interação da actina com a miosina e a troponina C, referente ao sítio de ligação do cálcio, desempenhando papel no início da contração (AIRES, 2012; GAUTEL; GOULDING, 1996; SCHIAFFINO; REGGIANI, 1996; SOLARO; RARICK, 1998).

### **1.3.5 Citoesqueleto**

As proteínas do citoesqueleto são proteínas cuja função principal é manter a estrutura celular, não só conservando a forma e a posição de organelas celulares como também mantendo a estrutura da membrana celular.

Entretanto, estas proteínas estão envolvidas em vários outros processos fundamentais do funcionamento celular, quais sejam: adesão celular, interações célula a célula, manutenção de especializações regionais das células e transferência de informação da superfície celular ao citoplasma. Para exercer estas diversas funções, as proteínas do citoesqueleto precisam ancorar-se nas membranas (externa e de organelas). Os principais locais de ancoramento na membrana externa são os desmossomos e os costâmeros. A placa do desmossomo tem proteínas que se ligam aos filamentos intermediários. Os costâmeros funcionam como ancoradouros de proteínas diversas (vinculina, talina, alfa-actinina e espectrina) no disco Z. Outras proteínas que se ligam à membrana celular são as anquirinas e a distrofina. Estas parecem desempenhar papel na regulação da estabilidade sarcolemal e na sua permeabilidade (SCHIAFFINO; REGGIANI, 1996).

A distrofina ancora os filamentos finos no citoesqueleto, através da membrana, na matriz extracelular. As proteínas longitudinais do citoesqueleto incluem a titina, que está associada aos filamentos espessos e se estende das linhas M aos discos Z. A titina centraliza os filamentos espessos no sarcômero (COSTANZO, 2004). A nebulina está associada aos filamentos finos, se estendendo de uma extremidade à outra, regulando o comprimento

dos filamentos finos. A alfa actinina ancora os filamentos finos aos discos Z (AIRES, 2012; BERNE; LEVY, 2000).

#### 1.4 CANAIS, BOMBAS E TROCADORES NO MÚSCULO CARDÍACO

##### 1.4.1 Bomba de cálcio da membrana sarcoplasmática (PMCA)

Na membrana plasmática localiza-se uma bomba de  $\text{Ca}^{++}$  chamada Bomba de Cálcio da Membrana Plasmática, todavia, seu nome segue a palavra em inglês, ou seja, Plasma membrane  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase. A PMCA tem alta afinidade por cálcio e baixa velocidade de transporte. Foi proposto que seu papel na regulação diastólica é sutil e a contribuição em retirar cálcio da célula é de menor importância. Assim sendo, foi postulado que a PMCA serve para o ajuste fino da concentração de cálcio intracelular (CARONI; ZURINI; CLARK, 1982).

A PMCA é reguladora da oxido nítrico sintetase. Isso representa consequências funcionais no AMP cíclico e no GMP cíclico, que regulam a contração cardíaca. Segundo Mohamed *et al*, 2011 a PMCA é um transportador de cálcio que tem papel exclusivo na sinalização celular, mais especificamente por ligar a NO sintetase na membrana cardíaca. Afirma ainda que a PMCA não contribua pra remoção global do cálcio e não contribui para a diástole. O autor conclui que a PMCA regula a contração cardíaca através de um mecanismo que liga e modula a NO sintetase. Quando a frequência da modulação está menos intensa, existem diminuições nos níveis de GMP cíclico, acompanhado de uma elevação nos níveis de AMP cíclico. A atividade da PKA e a fosforilação dos receptores de rianodina no sítio ser 2808 é aumentada, alterando a amplitude do transiente de cálcio, aumentando efeitos inotrópicos e cronotrópicos (MOHAMED *et al.*, 2011).

### 1.4.2 Trocador sódio/cálcio (NCX)

Localizado na membrana sarcoplasmática, o NCX funciona como um trocador eletrogênico, contribuindo para o potencial de repouso da célula, uma vez que troca 3 sódio pra 1 cálcio. No modo à frente, o NCX faz o efluxo do cálcio sendo responsável por remover aproximadamente 28% do cálcio do citosol (BERS, 2002). No modo reverso, o NCX permite o influxo de cálcio. Segundo Bers, 2008 este influxo seria centenas de vezes menor do que o influxo via canais tipo L. Alguns autores admitem a possibilidade disso contribuir para a liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático induzida por cálcio (CLARK, R.B. ; BOUCHARD, R.A. ; GILES, 1996; SATOH et al., 2003), mas outros dizem que não (LINES et al., 2006; SHAM; CLEEMANN; MORAD, 1992). No músculo cardíaco o que permite o modo reverso do NCX são o potencial positivo de membrana e o aumento do sódio intracelular (LARBIG et al., 2010). Segundo Evans e Cannell, 1997, em animais transgênicos, a ausência de NCX causou efeitos modestos na função cardíaca e os miócitos se adaptaram a falta do mecanismo de efluxo de cálcio, diminuindo o influxo de cálcio para a célula para cerca de 80%. A diminuição do influxo de cálcio deve-se a mecanismos auto-regulatórios nos canais do tipo L. Os autores afirmam que nos miócitos com NCX intactos, a corrente de sódio aumentou o transiente de cálcio, mas nos miócitos nocaute para NCX a corrente de sódio não alterou o transiente de cálcio. Assim sendo, podemos concluir que o mecanismo sarcolemal da troca  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$  deve ser encarado como um processo importante na regulação da contratilidade miocárdica, posto que é capaz de modular a força de contração.

### 1.4.3 Receptores Diidropiridínicos (DHP)

Os canais de  $\text{Ca}^{++}$  dependentes de voltagem, presentes em diferentes tipos celulares, também estão presentes nas fibras musculares cardíacas. Em geral, sua densidade nas membranas celulares é aproximadamente cem vezes menor do que a dos canais de  $\text{Na}^+$ , porém, seu mecanismo de ativação e de inativação é qualitativamente similar. No músculo cardíaco, estes canais

e/ou receptores, estão melhor expressos na membrana do túbulo-T. Existem diferentes tipos de canais de  $\text{Ca}^{++}$ . Os tipos T, L e N foram relativamente bem caracterizados. Os canais T (transitórios) são ativados com potenciais de membrana ( $E_m$ ) mais positivos que  $-70$  mV inativam-se rapidamente e são bloqueados por Flunarizina. Os L (lentos), são ativados com  $E_m$  mais positivos que  $-10$  mV e são bloqueados pelas diidropiridinas (nifedipina, nitrendipina, etc.); e são importantes na geração dos potenciais de ação cardíaco (HOUSSAY; CINGOLANI, 2004).

#### **1.4.4 Receptores de rianodina (RyR)**

Os receptores de rianodina (RyR) são canais que liberam o cálcio do retículo sarcoplasmático, sendo estes necessários para a contração muscular. Durante a despolarização da membrana sarcoplasmática, o cálcio entra na célula através de canais voltagem dependente conhecidos por receptores diidropiridínicos ou canais tipo L. O cálcio que influi, induz a liberação de cálcio das reservas no retículo sarcoplasmático através dos RyR para a contração muscular cardíaca. A isoforma encontrada no músculo cardíaco é RyR2 (BERS, 2002). Este processo é conhecido como cálcio induz a liberação de cálcio (CICR). A amplitude da liberação de cálcio pelo retículo determina a força da contração do músculo cardíaco (WEHRENS; LEHNART; MARKS, 2005).

#### **1.4.5 Bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático (SERCA)**

O retículo sarcoplasmático cardíaco não serve apenas como reservatório de cálcio, mas também para manter a concentração de cálcio no citoplasma durante a contração e o relaxamento muscular. Durante o acoplamento excitação contração o cálcio entra através dos canais tipo L ativando a liberação dos estoques de cálcio do retículo através dos receptores de rianodina. Isso aumenta o cálcio citoplasmático e inicia o processo de contração muscular. A concentração de cálcio no citosol determina a

extensão da contração muscular e o desenvolvimento da força. A remoção do cálcio do citosol pela bomba do retículo (SERCA) para o retículo resulta no relaxamento muscular. Em coelhos, a SERCA remove aproximadamente 70% do cálcio do citosol (BERS, 2002). A razão do relaxamento é determinado pela recaptação de cálcio pela SERCA 2a que é regulada por duas moléculas proteicas, o fosfolambano e a sarcolipina (PERIASAMY; BHUPATHY; BABU, 2008).

A SERCA 2a é a isoforma mais expressa no coração de mamíferos. Em roedores SERCA 2a é mais encontrada no átrio comparado com o ventrículo, sendo este um motivo para a duração da contração do átrio ser mais rápida que a do ventrículo. As expressões de SERCA 2a são alteradas conforme a idade, sendo relatado um decréscimo de quantidade e atividade de acordo com o envelhecimento, tanto em animais quanto em humanos. Esta diminuição está associada ao prolongamento da contração e diminuição da função cardíaca (BHUPATHY; BABU; PERIASAMY, 2007; PERIASAMY; BHUPATHY; BABU, 2008).

#### **1.4.6 Fosfolambano (PLB)**

A velocidade com que a SERCA bombeia o  $\text{Ca}^{++}$  é regulada no músculo cardíaco por outra proteína do RS, chamada Fosfolambano. Esta proteína também é expressa no músculo liso e no esquelético.

Um aumento ou diminuição nos níveis de PLB ou sua fosforilação impactam diretamente na recaptação de cálcio pelo retículo e na função contrátil do músculo. O PLB é expresso tanto nos átrios quanto nos ventrículos, mas em menores níveis nos átrios. Baixos níveis de PLB podem facilitar a recaptação de cálcio pelo retículo, provendo mais cálcio para a liberação (BLUHM et al., 2000).

### 1.4.7 Proteínas associadas ao retículo sarcoplasmático: Calsequestrina, Triadina e Junctina

Calsequestrina e triadina são proteínas localizadas em áreas especializadas do retículo (figura 1), onde este forma uma junção com o sarcolema, denominado retículo sarcoplasmático juncional. Calsequestrina, triadina e junctina formam um complexo protéico associado com RyR2 facilitando a liberação de cálcio que ocorre durante a contração muscular (KNOLLMANN, 2009; TERYTYEV et al., 2008; ZHANG, 1997).

A Calsequestrina 2 (Casq2) é a isoforma encontrada no músculo cardíaco, e sua principal função parece ser proteger o coração de liberações espontâneas de cálcio. O cálcio une-se à calsequestrina com alta capacidade e baixa afinidade. Aproximadamente 50% do cálcio armazenado no retículo sarcoplasmático está associado à calsequestrina. A Triadina prende RyR2 e Casq2 servindo como um link entre as duas, organizando estruturalmente o retículo (GUO; JORGENSEN; CAMPBELL, 1996). Um dos papéis propostos para triadina e junctina é de ancorar Casq2 aos RyR2 e contribuir para a retenção de Casq2 na junção do retículo. A ausência de triadina ocasiona uma remodelação dramática na junção do retículo com o sarcolema, reduzindo o contato entre estes, prejudicando o acoplamento excitação-contracção e a contracção do miócito (KNOLLMANN, 2009).

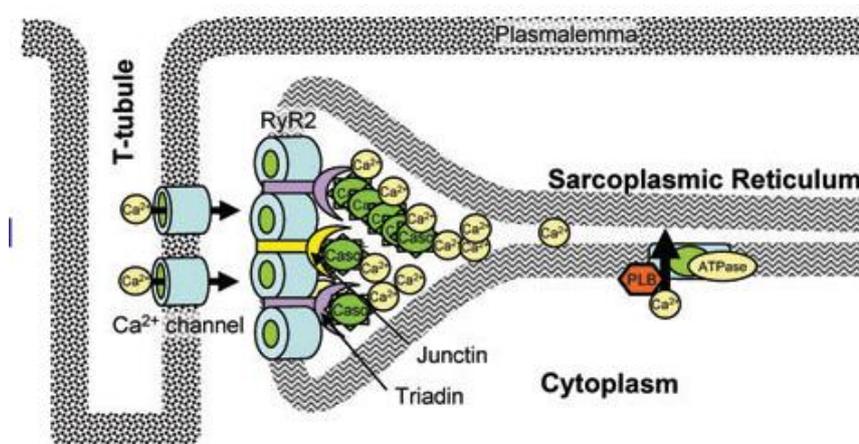


FIGURA 1 - ESTRUTURA INTERNA DO RETÍCULO SARCOPLASMÁTICO E O COMPLEXO PROTÉICO CALSEQUESTRINA/ TRIADINA / JUNCTINA.

FONTE : KNOLLMANN (2009)

#### **1.4.8 Processo de acoplamento excitação-contração (AEC) do músculo cardíaco**

O acoplamento excitação-contração (AEC) é composto por um conjunto de mecanismos que são desencadeados, normalmente, pela excitação elétrica gerada pelo potencial de ação e que vão promover a liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático (BERS, 2002). Na célula cardíaca, a propagação do potencial de ação através do sarcolema ativa canais de  $\text{Ca}^{++}$  dependentes de voltagem (tipo L), que rapidamente se abrem permitindo que ocorra um fluxo de  $\text{Ca}^{++}$  para o citoplasma. Estes canais de  $\text{Ca}^{++}$  voltagem dependentes são identificados como receptores diidropiridínicos (DHPRs). Esse  $\text{Ca}^{++}$  entrando na célula se liga a receptores de rianodina do tipo 2 (RyR2), localizados na membrana do RS e, promove uma mudança conformacional nestes, abrindo-os. Este  $\text{Ca}^{++}$  liberado pelo RS vai ativar outros RyRs/ $\text{Ca}^{++}$ e, conseqüentemente, aumentando ainda mais a liberação de  $\text{Ca}^{++}$ . Tal processo é conhecido como “ $\text{Ca}^{++}$ -induced  $\text{Ca}^{++}$ -release” (CICR); ou seja: liberação de  $\text{Ca}^{++}$  induzida por  $\text{Ca}^{++}$ ; e que no caso do músculo cardíaco o termo se refere à ativação de canais liberadores por  $\text{Ca}^{++}$  proveniente tanto do meio extracelular (através do trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$  no modo reverso) como do RS (BERS, 2002; SATOH et al., 2003).

A concentração citoplasmática de  $\text{Ca}^{++}$  aumentada ativa a maquinaria contrátil, produzindo força e, em seguida, o  $\text{Ca}^{++}$  é tanto recaptado para o interior do RS como removido da célula pelo trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$  e pela bomba de  $\text{Ca}^{++}$  da membrana plasmática (PMCA) (LAMB, 2000).

Uma vez recaptado pela SERCA, o  $\text{Ca}^{++}$  é armazenado ligado à calsequestrina, uma proteína que organiza o retículo sarcoplasmático e permite que o cálcio esteja pronto para ser liberado próximo ao receptor de rianodina. O  $\text{Ca}^{++}$  se liga à calsequestrina com alta capacidade e baixa afinidade (AIRES, 2012; KNOLLMANN, 2009; LAMB, 2000).

## 1.5 MÚSCULO LISO VASCULAR

Os músculos lisos encontrados nas paredes de órgãos como estômago, intestino e bexiga são classificados como fásicos, por se contraírem de forma rítmica ou intermitente. Os músculos lisos que constituem os esfíncteres, as paredes dos vasos sanguíneos e a parede das vias aéreas são classificados como tônicos, por estarem constantemente contraídos (BERNE; LEVI, 2000).

Nos vasos as células musculares estão arranjadas circunferencialmente de modo que a contração reduz o diâmetro do tubo, aumentando a resistência ao fluxo sanguíneo. A variedade de contatos especializados que existe entre as células musculares involuntárias servem para ligação mecânica e para comunicação. As células musculares cardíacas e lisas estão assim arranjadas porque devem ser ativadas e contrair-se no mesmo grau.

Existem tipos de junções encontradas no músculo liso, como as junções abertas que separa as membranas plasmáticas por um espaço de 2 a 3 nm. São vias de baixa resistência e permitem a comunicação química através da difusão de compostos de baixo peso molecular.

Estas células possuem de 2 a 10  $\mu\text{m}$  de diâmetro ao nível do núcleo e afinam-se nas suas extremidades. Quando contraídas tornam-se totalmente distorcidas como resultado das forças exercidas sobre a célula pelas junções com outras células ou com a matriz extracelular. As células lisas não possuem túbulos T, no entanto a membrana plasmática possui fileiras longitudinais de pequenas invaginações saculares denominadas cavéolas, que aumentam a área da superfície celular em aproximadamente 70% e são identificadas como sítio de ancoramento para inúmeras proteínas envolvidas na sinalização celular (BERNE; LEVI, 2000; FLOYD; WRAY, 2007; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

A membrana plasmática circunda os miofilamentos das células musculares lisas e durante a ativação o cálcio se difunde para o interior da célula através de canais de cálcio localizados na membrana. Cálcio este, oriundo do estoque de cálcio do líquido extracelular, importante para a regulação da contração. O músculo liso ainda possui retículo sarcoplasmático

que mantém estoques de cálcio intracelular. Este estoque pode ser mobilizado quando neurotransmissores excitatórios, hormônios ou drogas se liguem a receptores na membrana plasmática. Receptores acoplados a proteína G são presentes no sarcolema de células de músculo liso vascular. Suas interações com enzimas alvo provocam a produção de moléculas sinalizadoras intracelulares. Uma enzima frequente nas células dos músculos lisos é a fosfolipase C. Quando ativada a fosfolipase C degrada uma molécula lipídica componente da membrana plasmática, o fosfolípido de inositol, removendo um açúcar fosfato gerando inositol 1,4,5 trifosfato ou IP3. Este se difunde para o citoplasma e no retículo sarcoplasmático se liga a receptores de IP3, abrindo-os e iniciando a liberação de  $\text{Ca}^{++}$  para o meio citosólico. O volume do retículo sarcoplasmático é em média 6% do volume da célula muscular lisa e as mitocôndrias dispersas são suficientes para geração de ATP para contração (ALBERTS, 2004; FLOYD; WRAY, 2007; NELSON; COX, 2006; WRAY; BURDYGA; NOBLE, 2005).

O citoesqueleto atua como ponto de fixação para os filamentos delgados e permite a transmissão de força para as extremidades da célula. As estriações são ausentes assim como as linhas Z. Nas células musculares lisas os equivalentes aos discos Z são os corpos densos no citoplasma e as áreas densas que formam faixas ao longo do sarcolema. Essas estruturas são os pontos de ligação para os filamentos delgados e contém  $\alpha$ -actinina, uma proteína encontrada nos discos Z do músculo estriado. Os filamentos intermediários são proeminentes no músculo liso, compostos de polímeros de proteínas desmina ou vimentina e unem os corpos e as áreas densas à trama do citoesqueleto.

Os miofilamentos são pouco conhecidos. Faltam detalhes sobre a estrutura dos filamentos grossos e delgados e sua sobreposição. Os filamentos delgados possuem mesma estrutura e composição da actina e tropomiosina além de duas proteínas não encontradas nos músculos estriados, a qual sua função permanece desconhecida, mas parecem ser fundamentais para o ciclo das pontes cruzadas, sendo estas caldesmona e calponina. Diferenciam-se também por não possuírem troponina nem nebulina. O conteúdo de actina e tropomiosina no músculo liso é o dobro enquanto o conteúdo de miosina é um quarto do conteúdo encontrado no

músculo estriado. Grupos pequenos de 3 ou 5 filamentos grossos estão alinhados e são circundados por muitos filamentos delgados interdigitados, conectados a corpos ou áreas densas (BERNE; LEVI, 2000; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

### 1.5.1 Canais iônicos no músculo liso

O tônus vascular, a atividade contrátil das células lisas das paredes das pequenas artérias e arteríolas são o principal determinante da resistência ao fluxo sanguíneo através da circulação, regulando a pressão sanguínea e a distribuição do sangue para os órgãos e tecidos. Todo esse processo é dependente de estímulos vasoconstritores e vasodilatadores de hormônios circulantes, neurotransmissores, da pressão sanguínea e de produtos derivados do endotélio. Canais iônicos participam ativamente desse processo, como em todas as células musculares, o músculo liso usa  $\text{Ca}^{++}$  como gatilho para a contração, sendo assim, o influxo de  $\text{Ca}^{++}$  pelos canais da membrana, assim como as liberações intracelulares são a principal fonte de  $\text{Ca}^{++}$  no músculo liso vascular (JACKSON, 2000).

As células musculares lisas dos vasos expressam tipos diferentes de canais de  $\text{K}^+$  (JACKSON, 1998), canais de  $\text{Ca}^{++}$  voltagem dependentes (NELSON; QUAYLE, 1995), canais de  $\text{Cl}^-$  (GIBSON et al., 1998), canais catiônicos ativados por estiramento em suas membranas plasmáticas que estão relacionados com a regulação do tônus vascular (KNOT; ZIMMERMANN; NELSON, 1996).

Os canais de  $\text{K}^+$  são os condutores iônicos dominantes nas células vasculares. Sua atividade determina e regula o potencial de membrana e o tônus vascular (NELSON; QUAYLE, 1995). O gradiente eletroquímico para o  $\text{K}^+$  é tal que a abertura dos canais resulta na difusão do cátion para fora da célula causando hiperpolarização da membrana, e o contrário tem efeito oposto (JACKSON, 1998). Os canais de  $\text{Ca}^{++}$  voltagem dependentes tem um papel central na regulação do tônus vascular pelo potencial de membrana; a hiperpolarização da membrana fecha esses canais e leva a uma vasodilatação, a despolarização os abre causando uma vasoconstrição. Os

canais de  $\text{Ca}^{++}$  voltagem dependentes do tipo L parecem ser dominantes na maioria das células musculares vasculares embora também existam canais de  $\text{Ca}^{++}$  do tipo T (CRIBBS, 2001). O potencial de membrana não apenas regula os canais de  $\text{Ca}^{++}$  voltagem dependentes como parece ter influência sobre a liberação dos estoques intracelulares de  $\text{Ca}^{++}$  via inositol 1,4,5 trifosfato e o aumento da sensibilidade ao  $\text{Ca}^{++}$  pelo aparelho contrátil (VLADIMIR; GANITKEVICH; ISENBERG, 1993).

O influxo  $\text{Ca}^{++}$  não ocorre apenas por canais de  $\text{Ca}^{++}$  voltagem dependentes, mas também por canais operados para estocagem e ativados por estiramento. Os canais operados para estocagem (SOCC) são ativados quando os estoques intracelulares de  $\text{Ca}^{++}$  estão baixos ou vazios por uma via de sinalização não definida (GIBSON et al., 1998; GUIBERT; DUCRET; SAVINEAU, 2008).

O influxo de  $\text{Ca}^{++}$  também ocorre pelos canais ativados por estiramento (SACC). Esses canais são responsáveis em parte pela despolarização induzida por estiramento e resultam em um influxo de  $\text{Ca}^{++}$  suficiente para aumentar o  $\text{Ca}^{++}$  intracelular, mesmo quando os canais diidropiridínicos estão inativos. Esses canais podem estar envolvidos na regulação do tônus miogênico (GUIBERT; DUCRET; SAVINEAU, 2008; JI et al., 2002).

### **1.5.2 Sarcolema**

Os músculos lisos após um estímulo diminuem as concentrações de cálcio a partir dos picos iniciais. Essa redução é obtida pelo bombeamento de cálcio por transporte ativo para fora da célula através do sarcolema e por troca passiva acoplado à entrada de três íons sódio pela saída de um íon cálcio. A contração contínua do músculo liso é totalmente dependente dos estoques extracelulares de cálcio, o estado estável do cálcio citoplasmático e, portanto da fosforilação das pontes cruzadas são regulados pela soma dos processos dependentes de estímulos que governam as trocas de cálcio com os estoques extracelulares (BERNE; LEVI, 2000).

O cálcio entra no músculo liso através do potencial de membrana, que determina a abertura dos canais de cálcio do tipo L voltagem dependentes que são o principal tipo de canal de cálcio expresso no músculo liso. Esses canais dão aporte à quantidade de cálcio necessária para ativar os miofilamentos. Duas famílias de transportadores de cálcio são presentes na membrana dos músculos lisos, a bomba de cálcio ATPase ou PMCA e o trocador sódio cálcio ou NCX. Esses canais e trocadores se localizam nas cavéolas ou *rafts* lipídicos (FLOYD; WRAY, 2007).

### 1.5.3 Retículo sarcoplasmático

Local de reserva de cálcio intracelular, tanto no músculo estriado quanto no músculo liso (BERNE; LEVI, 2000). A liberação de  $\text{Ca}^{++}$  das reservas intracelulares pode ocorrer pelos receptores de rianodina, liberação essa chamada de *sparks* ou faíscas. Geralmente essa liberação de  $\text{Ca}^{++}$  sinaliza a formação de um segundo mensageiro como o inositol 1,4,5 trifosfato ou IP3, que se liga a receptores de IP3 na membrana do retículo e inicia outra liberação de  $\text{Ca}^{++}$ , liberação essa chamada de *puffs*, ou sopros (WRAY; BURDYGA; NOBLE, 2005). Entretanto essa liberação de  $\text{Ca}^{++}$  é acompanhada por uma fase sustentada de  $\text{Ca}^{++}$  oriundo do meio extracelular. Tem sido proposto com esses eventos que o  $\text{Ca}^{++}$  do meio intracelular é rapidamente depletado e então abrem-se canais que permitem o influxo de  $\text{Ca}^{++}$  do meio extracelular, onde o capacitor para isso é o  $\text{Ca}^{++}$  do meio intracelular. Esses canais são conhecidos como *store-operated*, ou estoque operados (LEUNG et al., 2008). Não se conhece a via de interação entre receptores de rianodina e os receptores IP3 mas existem sugestões de que os receptores IP3 estão localizados juntos a um grupo de receptores de rianodina e, a atividade de um aumenta a atividade do outro (WRAY; BURDYGA; NOBLE, 2005).

#### 1.5.4 Processo de acoplamento excitação-contração (AEC) do músculo liso vascular

In vivo as células musculares lisas vasculares são parcialmente contraídas com uma concentração intracelular de  $\text{Ca}^{++}$  de 100-300 nM. A pressão intraluminal aumentada induz despolarização gradual do músculo liso vascular via canais catiônicos ativados por estiramento. Tal estiramento, transduz o aumento da pressão luminal em uma despolarização via influxo de  $\text{Na}^+$ . Isto ativa os canais de  $\text{Ca}^{++}$  do tipo L voltagem dependentes ou DHP, localizados no sarcolema, permitindo influxo do  $\text{Ca}^{++}$  do meio extracelular. Por sua vez, este influxo de  $\text{Ca}^{++}$  ativa os receptores de rianodina (RyR) levando à liberação do  $\text{Ca}^{++}$  do retículo sarcoplasmático, fenômeno este conhecido como “liberação de  $\text{Ca}^{++}$  induzida por  $\text{Ca}^{++}$ ”.

Esta pequena liberação de  $\text{Ca}^{++}$  através dos receptores de rianodina denominado de *sparks* regula negativamente a contração, ativando os canais STOC (*spontaneous transient outward current*) ou correntes espontâneas transientes para fora. Esses canais são canais de  $\text{K}^+$  ativados por aumentos no transiente do  $\text{Ca}^{++}$  local oriundo do retículo sarcoplasmático (CHEUNG, 2003). Com isso ocorre efluxo de  $\text{K}^+$ , hiperpolarizando a membrana, fechando os canais de  $\text{Ca}^{++}$  do tipo L, inibindo o influxo de  $\text{Ca}^{++}$ . A depleção dos estoques intracelulares de  $\text{Ca}^{++}$  provoca a abertura de canais de  $\text{Ca}^{++}$  não-voltagem dependentes ou canais *store operated* (SOCC) permitindo um amplo influxo de  $\text{Ca}^{++}$  (BERNE; LEVY, 2000; KNOT; ZIMMERMANN; NELSON, 1996; MARCHAND, A.; ABI-GERGES, G.; SALIBA, Y.; MERLET, E.; LOMPRES, 2012; WRAY; BURDYGA; NOBLE, 2005).

O mecanismo do filamento deslizante – ponte cruzada fundamenta a contração do músculo liso nas similaridades do mecanismo do músculo estriado onde para um comprimento ótimo do tecido muscular liso a geração de força será máxima. Da mesma maneira a contração do músculo liso depende do aumento da concentração do cálcio citoplasmático. Entretanto o músculo liso não possui troponina e o cálcio regula indiretamente o ciclo das pontes cruzadas. A ligação das pontes cruzadas no músculo liso depende de fosforilação que ocorre quando uma quinase ligada a um sítio específico na

cadeia leve da miosina denominada miosina cinase é ativada pelo aumento do cálcio citoplasmático. Cálcio este que se associa a uma proteína de ligação de cálcio, a calmodulina, que possui quatro sítios de ligação com alta afinidade, formando o complexo  $4Ca^{++}$  - Calmodulina na miosina cinase, associado a transferência de um ATP para a ponte cruzada. Fosforilada a ponte cruzada pode ligar-se ao filamento fino e efetuar o ciclo com a hidrólise de um ATP por ciclo até que a concentração de cálcio citoplasmático diminua, a cinase torne-se inativa e as pontes cruzadas sejam desfosforiladas pela miosina fosfatase.

Os níveis iniciais de cálcio não são sustentados durante as contrações tônicas, nas quais os valores da concentração de cálcio e da fosforilação das pontes cruzadas diminuem. Mesmo com essas diminuições as forças aumentam vagarosamente para altos valores próximos ao máximo com somente 20 a 30% das pontes cruzadas fosforiladas, consumindo cerca de trezentas vezes menos ATP em relação ao músculo estriado.

A energética do músculo liso é diferente do músculo estriado por duas razões. Primeiro a miosina do músculo liso tem a velocidade de desligamento muito lenta, mesmo quando fosforilada. Segundo, pelo retardo mais longo na velocidade do ciclo das pontes cruzadas causado pela diminuição na velocidade de fosforilação dependente de cálcio. O desligamento é etapa limitante na velocidade do ciclo das pontes cruzadas. No músculo liso quase todas as pontes ativas estão gerando força, ao contrário do músculo estriado onde muitas pontes estão nas porções sem ligação no ciclo, resultando na elevada produção de força e baixo consumo de ATP.

Para que ocorra o relaxamento é necessário remover o  $Ca^{++}$  do meio citosólico. Isso pode ocorrer de três maneiras: via bomba de  $Ca^{++}$  da membrana (PMCA), via trocador  $Na^+/Ca^{++}$  (NCX) ou via bomba de  $Ca^{++}$  do retículo (SERCA) (MARCHAND, A.; ABI-GERGES, G.; SALIBA, Y.; MERLET, E.; LOMPRES, 2012).

Comparado ao trocador sódio cálcio, a PMCA possui baixa capacidade de transporte de cálcio. No músculo liso a atividade da PMCA é regulada por GMP cíclico PKC e calmodulina. A regulação por  $Ca^{++}$  Calmodulina ocorre quando esta se liga a uma região auto inibitória da bomba e assim a estimula num processo que lembra a ativação da miosina pela

mesma  $\text{Ca}^{++}$  Calmodulina. Estudos mostram que tanto a PMCA quanto o NCX são importantes para a homeostasia e seu bloqueio inibe o efluxo de cálcio (FLOYD; WRAY, 2007).

O trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$  ou NCX utiliza o gradiente eletroquímico do sódio gerado pela  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase, para fazer o efluxo de  $\text{Ca}^{++}$ . Durante um ciclo 1  $\text{Ca}^{++}$  é trocado por  $3\text{Na}^+$ , sendo que o trocador pode transportar em ambas as direções, dependendo do potencial eletroquímico do  $\text{Na}^+$ . Se a concentração de  $\text{Na}^+$  é significativamente reduzida, o trocador passa a trabalhar no modo reverso, ocasionando influxo de  $\text{Ca}^{++}$ .

SERCA é a bomba que transporta o  $\text{Ca}^{++}$  do meio citosólico para o lúmen do retículo sarcoplasmático. No músculo liso SERCA 2b é a principal isoforma encontrada. Pouco é sabido sobre a capacidade da SERCA em diminuir o  $\text{Ca}^{++}$  citosólico, diminuindo a força de contração e induzindo o relaxamento. Em conjunto com NCX e PMCA, a SERCA é necessária para o funcionamento máximo dos mecanismos de extrusão do  $\text{Ca}^{++}$ , mas com NCX e PMCA bloqueadas a SERCA não se mostrou eficiente em diminuir a concentração de  $\text{Ca}^{++}$  citoplasmático (FLOYD; WRAY, 2007).

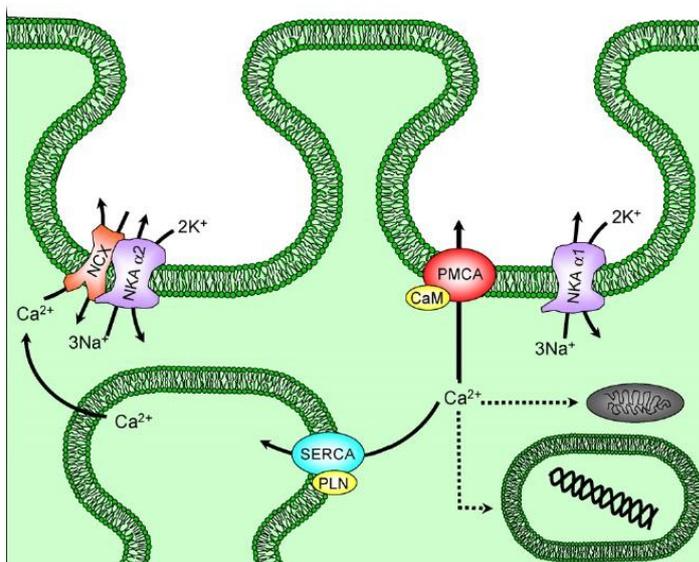


FIGURA 2 - MEDIADORES PRIMÁRIOS DA HOMEOSTASE DO  $\text{Ca}^{++}$  NO MÚSCULO LISO. NCX LOCALIZADO NA CAVÉOLA ASSOCIADOS À  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPASE A2. PMCA ASSOCIADA À CALMODULINA E  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPASE A1. NO RETÍCULO SARCOPLASMÁTICO A SERCA ASSOCIADA AO FOSFOLAMBANO.

FONTE: FLOYD, R. (2007)

### 1.5.5 Relaxamento e Óxido Nítrico (NO)

A dilatação dos vasos é iniciada nas células do endotélio vascular. O gás NO é produzido pela desaminação da arginina, catalizada pela enzima NO sintetase endotelial (eNOS). Como o NO é gás, ele atravessa a membrana plasmática, se difunde rapidamente pra fora da célula onde foi produzido e para as células vizinhas. Atua somente localmente porque tem uma meia vida curta, entre cinco a dez segundos no espaço extracelular, antes de se converter em nitratos e nitritos pela ação da água e do oxigênio. No músculo liso o NO se liga ao ferro no sítio ativo da enzima guanilil ciclase, estimulando-a a produzir GMP cíclico dependente de proteína quinase ou PKG (ALBERTS, 2006).

Uma variedade de drogas e hormônios relaxam os músculos lisos por aumentar as concentrações intracelulares de GMP cíclico (BERNE; LEVI, 2000). O NO é um sinal inibidor produzido pelas células endoteliais e causa vasodilatação dependente do endotélio em resposta a um agonista de dilatação. É o regulador primário do tônus vascular com capacidade de modular a ativação das células através dos canais de  $Ca^{++}$  do tipo L ou abrindo canais de  $K^+$  causando uma hiperpolarização. A liberação de NO estimula a produção de PKG e o relaxamento das células musculares lisas, como consequência da remoção citoplasmática de  $Ca^{++}$ , pela diminuição da sensibilidade do aparelho contrátil ao  $Ca^{++}$  via estimulação da miosina fosfatase e a desfosforilação da miosina cinase, pela inibição da liberação de  $Ca^{++}$  iniciado por IP<sub>3</sub>, ou aumento da velocidade da recaptção do  $Ca^{++}$  para o retículo pela SERCA. Porém esses efeitos dependem da capacidade dos músculos lisos em reduzir as concentrações de  $Ca^{++}$ . Essa capacidade varia de acordo com o tipo do vaso (HOVE et al., 2009; LINCOLN; KOMALAVILAS; CORNWELL, 1994).

Existe relato ainda que o NO é capaz de modular os canais SOCC, diminuindo a concentração intracelular de  $Ca^{++}$ , acelerando a recaptção para o retículo via SERCA pelo aumento da fosforilação do fosfolambano. Assim os estoques intracelulares se enchem de  $Ca^{++}$ , a entrada do meio extracelular é inibida e o tônus vascular reduzido (LEUNG et al., 2008). As consequências

de uma regulação ineficiente na concentração de  $\text{Ca}^{++}$  causariam uma hipercontratibilidade vascular e espasmo, oclusão do vaso, diminuição da perfusão tecidual podendo ocasionar morte tecidual, aumento do trabalho cardíaco podendo causar ineficiência cardíaca.

Alguns tecidos precisam de uma regulação via NO-PKG mais intensa que outros. Em aorta de ratos, por exemplo, o PKG atua mais intensamente no retículo sarcoplasmático onde o fluxo de  $\text{Ca}^{++}$  parece ser regulado via fosforilação de receptor de IP3 e fosfolambano, enquanto em outros vasos como na carótida a regulação dos canais de  $\text{K}^+$  ativados por  $\text{Ca}^{++}$  por PKG parece ser mais importante no controle da concentração de  $\text{Ca}^{++}$  (LINCOLN; KOMALAVILAS; CORNWELL, 1994).

## 1.6 SINALIZAÇÃO CELULAR: RECEPTORES ACOPLADOS À PROTEÍNA G

Uma proteína G é um interruptor molecular (BERNE; LEVY, 2000), constituídos de subunidades alfa, beta e gama (AIRES, 2008). A ligação de uma molécula sinalizadora extracelular ao receptor transmembrana sete passos, induz a uma mudança conformacional que permite ativar uma proteína G localizada na parte de dentro da membrana plasmática. Todas as proteínas G são semelhantes na sua estrutura e desempenham funções de forma semelhante, são formadas por três unidades, (alfa, beta e gama) duas das quais estão ligadas a membrana plasmática por caudas lipídicas curtas. No estado não estimulado a subunidade alfa possui uma GDP ligada e a proteína G está inativa. A ligação de um ligante extracelular com seu receptor causa sua alteração e consequente ativação da proteína G pela perda da afinidade da subunidade alfa por GDP, que é trocada por uma molécula de GTP. Esta ativação separa as subunidades da proteína G. A subunidade alfa ligada, em união a seu GTP, se separa do complexo beta/gama gerando duas moléculas separadas que se deslocam independentemente ao longo da membrana. As duas subunidades da proteína G ativada (subunidade alfa e o complexo beta/gama) podem interagir diretamente com as proteínas alvo localizadas na membrana plasmática, que por sua vez podem transmitir os sinais para outros destinos. O espaço de tempo que as unidades alfa e

beta/gama permanecem dissociadas e por tanto disponíveis para transmitir sinais é limitado pelo comportamento da subunidade alfa. Esta subunidade tem atividade de hidrólise de GTP (GTPase), hidrolisando sua GTP em GDP e associando novamente ao complexo beta/gama, desligando o sinal. Essa reassociação ocorre alguns instantes após a ativação da proteína G. Após reassociada, a proteína G está pronta para ser reativada por outro receptor ativo (AIRES, 2008; ALBERTS, 2006; BERNE; LEVY, 2000).

As proteínas alvo das subunidades da proteína G são canais iônicos ou enzimas ligadas à membrana. A interação das proteínas G com os canais iônicos causa uma mudança imediata no estado e comportamento da célula. Suas interações com enzimas alvo provocam a produção de moléculas sinalizadoras intracelulares adicionais. Os alvos mais frequentes são a adenilato ciclase, que é a enzima responsável pela síntese do AMP cíclico e a fosfolipase C, enzima responsável pela síntese das moléculas sinalizadoras trifosfato de inositol e diacilglicerol. As moléculas geradas nessas cascatas intracelulares são chamadas de segundos mensageiros. Os primeiros mensageiros são os sinais extracelulares. Os segundo mensageiros são produzidos em grande quantidade quando as enzimas adenilato ciclase ou a fosfolipase C são ativadas e transmitem o sinal por toda a célula (ALBERTS, 2006; NELSON; COX, 2006).

### **1.6.1 AMP cíclico**

Muitos sinais extracelulares que se ligam a receptores associados a proteína G afetam a atividade da adenilato ciclase e por tanto alteram a concentração intracelular da molécula mensageira AMP cíclico. A subunidade alfa da proteína G estimulada, ativa a adenilato ciclase causando aumento na síntese de AMP cíclico a partir do ATP. Esta proteína G é denominada G<sub>s</sub> porque estimula a ciclase. Uma segunda enzima denominada fosfodiesterase do AMP cíclico converte rapidamente o AMP cíclico em AMP para eliminar o sinal (ALBERTS, 2006; NELSON; COX, 2006).

O AMP cíclico exerce seus efeitos pela ativação da enzima proteínquinase dependente de AMP cíclico (PKA). Esta enzima é mantida

inativa em complexo com outra proteína. A ligação do AMP cíclico causa uma mudança conformacional deste complexo liberando a quinase ativa. A PKA ativada catalisa a fosforilação de serinas e treoninas específicas em determinadas proteínas intracelulares, alterando suas atividades (ALBERTS, 2006; NELSON; COX, 2006).

### **1.6.2 Fosfolipase C**

A fosfolipase C quando ativada propaga o sinal pela degradação de uma molécula lipídica que é um componente da membrana plasmática. A molécula é o fosfolipídio de inositol (um fosfolipídio que contém um açúcar de inositol ligado à sua cabeça polar) que está presente na face citosólica da bicamada lipídica da membrana plasmática. A cascata funciona quando a fosfolipase C remove o açúcar-fosfato do fosfolipídio de inositol e gera duas moléculas mensageiras, o 1,4,5 trifosfato de inositol (IP3) e o diacilglicerol (DAG). O IP3 se difunde para o citosol enquanto DAG permanece na membrana plasmática. Estas moléculas têm atuação na sinalização dentro da célula (ALBERTS, 2006; NELSON; COX, 2006).

O IP3 é liberado no citosol, chega ao retículo sarcoplasmático e se liga aos canais de cálcio do retículo, ou receptores de IP3 (IP3R), abrindo-os. O cálcio armazenado dentro do retículo é liberado para o citosol, causando aumento na concentração citoplasmática do íon. Juntamente com o cálcio, o diacilglicerol ativa uma proteinoquinase. Esta enzima é denominada proteinoquinase C (PKC), porque ela precisa se ligar ao cálcio para se tornar ativa. Uma vez ativada, a PKC fosforila um conjunto de proteínas intracelulares. A PKC tem o mesmo mecanismo de ação da PKA, mas suas proteínas alvo são diferentes.

### **1.6.3 GMP cíclico**

O GMP cíclico dependente de proteína quinase ou PKG é amplamente distribuído pelas células, mas suas concentrações mais elevadas

estão nos pulmões, cerebelo e músculos lisos. Na maioria dos outros tecidos a concentração de PKG é de 10 a 100 vezes menor que de PKA (FRANCIS; CORBIN, 1994; LOHMANN, S.M.; VAANDRAGER A.B.; SMOLENSKI, A.; WALTER, U.; DE JONGE, 1997). O PKG é encontrado no citoplasma e em frações da membrana, sendo sua distribuição tecido dependente. Nos pulmões e nos músculos lisos é predominante no citoplasma enquanto nos intestinos é predominante na membrana. Em músculo cardíaco, esquelético, fígado e adipócitos a concentração de PKG é mínimo (FRANCIS; CORBIN, 1994). A musculatura lisa vascular é uma rica fonte de PKG e o mecanismo preciso do relaxamento do músculo liso por esta via permanece incerto (LINCOLN; KOMALAVILAS; CORNWELL, 1994).

Sinais extracelulares como o peptídeo natriurético atrial, fatores de relaxamento derivados do endotélio ou nitro vasodilatadores se ligam a receptores de guanilato ciclase na membrana das células. Os efeitos dessa ligação são mediados via enzima óxido nítrico sintase dependente de  $Ca^{++}$ , que através da desaminação da arginina produz o gás óxido nítrico ou NO, um fator de relaxamento derivado do endotélio, ativando a guanilato ciclase solúvel, presente no citoplasma das células, aumentando os níveis de proteína quinase dependente de GMP cíclico ou PKG promove fosforilações em sítios específicos de serina e treonina atuando de forma semelhante ao PKA, porém suas funções são pouco conhecidas (LINCOLN; KOMALAVILAS; CORNWELL, 1994; LOHMANN, S.M.; VAANDRAGER A.B.; SMOLENSKI, A.; WALTER, U.; DE JONGE, 1997; NELSON; COX, 2006)

## 1.7 JUSTIFICATIVA

A aranha marrom *Loxosceles intermedia* é a espécie dominante no município de Curitiba (FISCHER, 2008). O aumento da sua população observada em Curitiba e região metropolitana são atribuídos ao crescimento das cidades com conseqüente destruição do seu habitat e desaparecimento dos seus predadores naturais. Como resultado desse desequilíbrio as aranhas encontram um excelente local para sua sobrevivência e reprodução no ambiente domiciliar, com conseqüente aumento dos casos de

loxoscelismo, sendo hoje considerado um problema de saúde pública (MARQUES-DA-SILVA; FISCHER, 2000).

Em 2001 os acidentes loxoscélicos atingiram o segundo lugar entre as ocorrências médico/ambulatoriais, sendo menor apenas para os casos de atendimento anti-rábico humano. Desde esta data até os dias de hoje, esta segunda posição continua sendo mantida (SESA/DEVA/DVVZI/SINAN, 2011).

Em 2011, Curitiba apresentou 76% dos casos de loxoscelismo do estado. Englobando Curitiba e região metropolitana este dado sobe para 92,9%. Em 2009 no Estado do Paraná ocorreram 5682 casos de loxocelismo, sendo que 72% do total ocorreram em Curitiba e região metropolitana e desse montante, 14 casos foram considerados muito graves. Isso justifica a necessidade do estudo da biologia da aranha marrom, das toxinas do seu veneno e da fisiologia dos efeitos sistêmicos dos órgãos expostos a essas toxinas.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 GERAL

Avaliar efeitos diretos e sistêmicos da toxina recombinante do veneno da aranha marrom fosfolipase D em parâmetros da atividade mecânica do músculo cardíaco e liso de aorta.

### 2.2 ESPECÍFICOS

1. Avaliar em coração perfundido de rato intoxicado com a toxina recombinante fosfolipase D nos parâmetros, de contratilidade (frequência cardíaca, produção de pressão, velocidade máxima de produção de pressão (+dp/dt) e de relaxamento (-dp/dt)) e da atividade elétrica mediante eletrocardiografia.

2. Avaliar os efeitos da toxina recombinante fosfolipase D, em músculos papilares isolados intactos estimulados eletricamente e em condições isométricas, parâmetros de contratilidade (força absoluta, velocidade máxima de produção de força (+df/dt) e de relaxamento (-df/dt).

3. Avaliar os efeitos da toxina recombinante fosfolipase D em músculo liso de artéria aorta sob condições isométricas, parâmetros de contratilidade (força absoluta e velocidade de relaxamento).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

A toxina recombinante foi fornecida pelo Laboratório de Matriz Extracelular e Biotecnologia de Venenos sob responsabilidade do Professor Doutor Silvio Sanches Veiga, do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Neste estudo experimental foram utilizados 52 ratos Wistar, 250-300g, fornecidos pelo Biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR. Os animais foram mantidos em gaiolas sob condições de controle de temperatura e um ciclo claro-escuro de 12 horas, tendo livre acesso à ração. A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA - 591), do Setor de Ciências Biológicas da UFPR em 28 de fevereiro de 2012.

Os animais foram divididos ao acaso em 8 grupos, sendo 4 experimental (n = 26) e 4 grupos controle (n = 26). Cada grupo experimental e seu respectivo controle foram empregados para a realização dos experimentos de: 1) coração isolado, 2) músculo papilar isolado intacto, 3) avaliação da produção de força máxima do músculo liso de aorta, 4) avaliação do tempo de relaxamento do músculo liso de aorta.

Os animais do grupo do coração isolado foram previamente tratados com a toxina recombinante fosfolipase D (240µg/kg) (LUCATO et al., 2011) administrada por via intraperitoneal. No grupo controle injetou-se o mesmo volume de PBS. O volume total injetado em ambos os grupos não excedeu 250 µl. A avaliação da performance cardíaca desses animais foi realizada 24 horas após a injeção.

Em todos os experimentos, os animais foram submetidos à anestesia geral com cloridrato de ketamina (50 mg/kg) e xilazina (20 mg/kg). Após a verificação da ausência de resposta a estímulos dolorosos, foi realizada a exsanguinação. Mediante toracotomia os corações foram removidos e transferidos para um copo de Becker contendo 20 ml de solução de Ringer. Esta solução teve a seguinte composição (em mM): NaCl=110; KCl=4,0; CaCl<sub>2</sub>=2,0; MgCl<sub>2</sub>=2,0; TRIZMA=10 e glicose=11, com pH ajustado para 7,4 com NaOH ou HCl e gaseificada com oxigênio puro. A fim de confirmar a integridade e a qualidade da Fosfolipase-D a pureza foi verificada por meio de

eletroforese e sua atividade foi avaliada utilizando ensaio esfingomielinásico. Em seguida o coração ou os vasos foram empregados nos experimentos descritos abaixo.

### 3.1 ELETROFORESE DE PROTEÍNAS EM GEL DE POLIACRILAMIDA

Eletroforeses foram realizadas em géis de poliacrilamida (12,5%) contendo detergente aniônico Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE) em condições redutoras. Os géis foram preparados utilizando o aparato comercial Mini-PROTEAN 3 (Bio-Rad, Hercules, EUA). A solução de poliacrilamida, contendo os catalisadores APS e TEMED, foi colocada entre placas de vidro e isolada com uma camada de isobutanol. Após a polimerização, foi removida a camada de água e isobutanol acima do gel com auxílio de papel filtro. A solução de empacotamento, contendo 5% de poliacrilamida e os catalisadores, foi colocada acima do gel e nela foi posicionado o pente para formação dos poços. Após a polimerização, o pente foi removido e os poços secos com auxílio de papel filtro. A separação das proteínas foi obtida mediante aplicação de corrente de 25 mA constante, até a separação total das proteínas. Os géis foram corados em solução contendo Azul de Coomassie Brilhante R-250 (Amresco, Ohio, EUA) 0,25%, metanol 50% e ácido acético 10% em água deionizada, durante 10 minutos à temperatura ambiente sob agitação constante. A descoloração foi realizada com metanol 50% em água deionizada, com sucessivas trocas da solução de metanol (HARLOW; LANE, 1988).

### 3.2 ENSAIO DE ATIVIDADE ESFINGOMIELINÁSICA

A atividade fosfolipásica foi mensurada utilizando o kit Amplex Red (Molecular Probes, Eugene, EUA). Neste ensaio, a atividade fosfolipásica é monitorada usando 10-acetil-3,7-dihidroxi-fenoxazine (reagente Amplex Red), um reagente fluorogênico sensível para  $H_2O_2$ . Primeiramente, a fosfolipas-D hidrolisa a esfingomielina à ceramida-1-fosfato e colina. A colina, por sua vez,

é oxidada pela enzima colina oxidase à betaina e  $H_2O_2$ . Finalmente, a  $H_2O_2$ , na presença da peroxidase reage com o Amplex Red estequiometricamente (1:1), gerando um produto altamente fluorescente, o Resorufin (APPEL et al., 2008; CHAVES-MOREIRA et al., 2011). Para mensurar a atividade fosfolipásica da toxina LiRecDT1, esta foi incubada com o Reagente Amplex Red, na concentração de 10  $\mu$ g em pentaplicata, à 37°C por 30 minutos. Foi utilizado como controle negativo apenas o Reagente Amplex Red sem a toxina, também em pentaplicata à 37°C por 30 minutos. A fluorescência foi mensurada em um fluorímetro (Tecan Infinite M200, Männedorf, Switzerland) usando comprimento de onda de excitação em 540 nm e emissão em 570 nm.

### 3.3 CORAÇÃO ISOLADO

O coração removido foi retrogradamente perfundido através de uma cânula fixada no coto aórtico, com solução de Ringer continuamente oxigenada e mantida 32° C. A pressão de perfusão foi mantida constante (50 cm de altura). Mediante uma câmara com capacidade para 50 ml, o coração foi mantido imerso em solução de Ringer de idêntica composição. Foi realizada uma abertura na junção átrio ventricular esquerda para permitir a inserção de um balão na cavidade ventricular esquerda. Este balão foi confeccionado com filme plástico, teve uma capacidade para 200  $\mu$ l e foi fixado a extremidade de uma sonda uretral nº4 (Mark Med). A outra extremidade foi conectada a um transdutor de pressão (WPI-blpr) mediante uma válvula de 3 vias a qual foi empregada para o preenchimento do cateter e do balão com solução de Ringer. O balão foi somente inflado após ter sido cuidadosamente posicionado na cavidade ventricular esquerda com uso de uma seringa de capacidade de 1000  $\mu$ l. Tomou-se cuidado especial no preenchimento da cânula e do balão com o objetivo de evitar a presença de bolhas de ar. O transdutor de pressão foi conectado a uma unidade conversora analógico/digital/analógico (PowerLab 4/30, AD Instrument) e os dados foram armazenados e analisados em um computador, utilizando-se um software (Lab Chart versão 7.3.7). Os valores de  $+dp/dt$  e  $-dp/dt$  foram

calculados utilizando-se deste mesmo software. O enchimento do balão foi realizado de maneira gradual até obtenção do valor máximo na relação volume/pressão gerada pela contração miocárdica. O valor máximo de pressão diastólica intraventricular correspondeu a aproximadamente 5 mm de mercúrio. Foi realizada, antes de cada experimento, a curva de calibração do transdutor de pressão mediante o emprego de um manômetro de mercúrio.

O registro eletrocardiográfico foi obtido empregando-se a unidade Power Lab 26T conectado a um computador no módulo de ECG e com o uso do software Cardio Axis. O registro eletrocardiográfico de coração isolado foi realizado mediante quatro eletrodos mergulhados na solução de banho e posicionados lateralmente às preparações, para obtenção de derivações não convencionais. Esses eletrodos foram mantidos em posição estacionária e em todos os experimentos os corações foram montados sempre na mesma posição anatômica. Desta maneira foi possível a obtenção do registro eletrocardiográfico em duas derivações com um ângulo entre as mesmas de 60°. A mensuração de pressão intraventricular e o registro eletrocardiográfico foram obtidos simultaneamente.

### 3.4 EXPERIMENTOS COM MÚSCULOS PAPILARES ISOLADOS INTACTOS

O coração foi transferido para uma placa de Petri (contendo solução de Ringer) e, após a abertura do ventrículo direito foi realizada a dissecação dos músculos papilares com auxílio de um estéreo microscópio. Tal procedimento foi realizado com pinças e tesouras oftalmológicas. Preservou-se a extremidade tendínea e uma porção do miocárdio, as quais serviram para fixação da preparação.

O músculo papilar removido foi colocado em uma placa de Petri contendo solução Ringer e suas extremidades fixadas. Uma foi fixada em posição estacionária a um micromanipulador e a outra, a um transdutor de força (WPI-Fort 10, *Transuction Laboratories Co.*). A preparação então transferida para uma câmara contendo solução de Ringer (3 ml), continuamente oxigenada e mantida 32° C.

Os músculos papilares foram estimulados com pulsos supralimíares de voltagem (10 a 15 V), duração de no máximo de cinco milissegundos (ms), através de um par de eletrodos de platina posicionados ao longo de toda a extensão do músculo. Mediante o emprego do micromanipulador, procedeu-se o estiramento do músculo até L<sub>max</sub> (comprimento do músculo no qual a tensão ativa é máxima). A frequência de estimulação padrão foi de 1 Hz. Nestas condições, as preparações foram mantidas por um período de estabilização de 40 minutos e, em seguida realizados os protocolos experimentais. A força desenvolvida foi digitalizada por um sistema de aquisição de dados (PowerLab 4/30, AD Instrument) conectado a um computador. Os dados foram analisados com o emprego de um software (Lab Chart versão 7.3.7). Este software foi utilizado no cálculo da +df/dt e – df/dt.

Realizamos, antes de cada experimento, a curva de calibração do transdutor de força obtida com massas conhecidas (padrão). Mensuramos o diâmetro na porção central da preparação, com o uso de uma grátícula posicionada na ocular do estéreo microscópio. A área de secção transversa das preparações foi calculada através da seguinte fórmula:

$$A = \pi r^2$$

Assim, a força produzida pelos músculos papilares e os valores da +df/dt e – df/dt foram normalizadas pela área de secção transversa dos mesmos.

Para avaliarmos os possíveis efeitos da fosfolipase D sobre a força da contração isométrica era adicionada a câmara concentrações crescentes de fosfolipase D (8,3 e 16,6 µg/ml). Avaliaram-se os efeitos da toxina durante 30 minutos. Os experimentos do grupo controle foram realizados com volume equivalente de PBS.

Os dados de força obtidos na presença da toxina ou PBS estão expressos em valores percentuais em relação ao controle de cada um dos experimentos.

### 3.5 EXPERIMENTOS COM MÚSCULO LISO DE AORTA

O coração e os pulmões eram removidos e um segmento de aproximadamente 2 cm da aorta torácica dissecada. Este segmento foi transferido para uma placa de Petri contendo solução de Ringer. Com o auxílio de um estéreo microscópio foi realizada a remoção do tecido conjuntivo que recobre externamente a artéria e com tesoura oftalmológica foram obtidos anéis de aorta com cerca de três milímetros de largura.

Para a obtenção do registro de tensão isométrica, esses anéis foram transferidos para uma cuba com capacidade para 3 ml contendo solução de Ringer, continuamente gaseificados e mantidos a temperatura constante de 32° C. Duas hastes metálicas, uma mantida em posição estacionária e conectadas a um transdutor de força (Scientific Instruments, GMHB, Heidelberg, Alemanha) e a outra a um micromanipulador, foram posicionadas na luz de cada segmento aórtico. Assim procedeu-se o estiramento dos anéis de aorta até a obtenção de uma tensão basal de 200 mg. Foi mensurada a largura da preparação, com o uso de uma gráticula posicionada na ocular do estéreo microscópio. A produção de força das preparações foi normalizada através da seguinte fórmula:

Espessura da parede x 2 x largura

Assumimos que a espessura de cada parede era de 0,1mm

Assim, a força produzida pelos músculos lisos do anel de aorta foi normalizada pela sua área. Os dados de força foram armazenados em um micro computador mediante o emprego de um conversor analógico/digital/analógico (Power Lab 4/30, AD Instruments).

Avaliamos os efeitos da fosfolipase D nos níveis de tensão basal por 45 minutos, ou seja, imediatamente após o estiramento da preparação, estas foram expostas a toxina (16,6 µg/ml) ou a PBS. Na sequência, a preparação foi transferida para uma câmara contendo solução de isotônica Ringer com uma concentração de 80 mM de K<sup>+</sup> e 100 µM de fenilefrina. Com este protocolo avaliamos os efeitos da exposição previa das preparações à toxina na capacidade máxima de produção de força. Em outro grupo experimental, preparações previamente contraídas com K<sup>+</sup> e fenilefrina foram expostas à toxina (16,6 µg/ml) ou PBS com finalidade de avaliar o tempo e o valor

máximo de relaxamento. Avaliamos o relaxamento após o platô de contração de trinta em trinta minutos até o final da terceira hora e de três em três horas até o final da décima segunda hora.

### 3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados serão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média. Para comparação de uma única condição experimental em relação ao controle, será empregado o teste t-Student. Para múltiplas comparações, na mesma condição experimental será utilizado ANOVA. Para análise dos contrastes a posteriori será utilizado o teste de Tuckey. Para análise e plotagem dos dados será utilizado o programa GraphPad Prism 5 System (San Diego, CA, USA). Será aceita diferença estatisticamente significativa entre grupos, quando a probabilidade de ocorrência da hipótese nula for inferior ou igual a 5 % ( $P \leq 0,05$ ).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 ELETROFORESE DE PROTEÍNAS EM GEL DE POLIACRILAMIDA

Foi obtida a fosfolipase-D recombinante produzida em modelo procariótico *E.coli* BL21plySs. Com o intuito de verificar a pureza das alíquotas utilizadas nos ensaios foram feitas análises em SDS-PAGE. Na Figura 3 podemos observar a presença de uma banda evidente na altura entre 29-45kDa (seta) demonstrando uma boa eficiência na purificação.

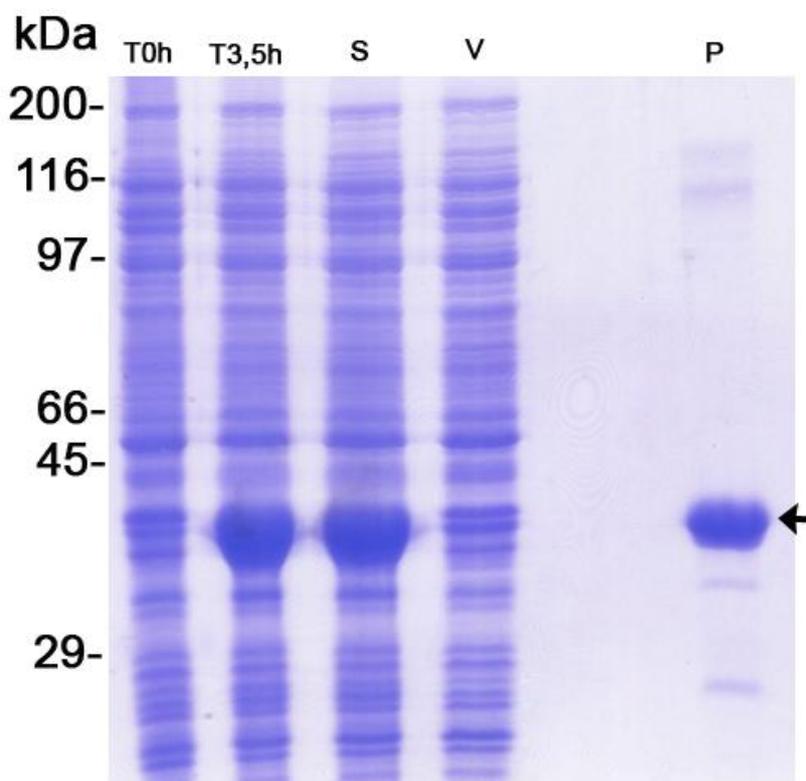


FIGURA 3 - SDS-PAGE DA PURIFICAÇÃO DA TOXINA LiRecDT1 POR MEIO DE CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE EM RESINA  $\text{Ni}^{+2}$ -NTA AGAROSE. À ESQUERDA, O INDICADOR DE MASSA MOLECULAR. A PROTEÍNA FOI EXPRESSA A 30 °C, NA CONCENTRAÇÃO DE INDUTOR (IPTG) 0.05MM POR 3,5H. NA COLUNA T0H OBSERVA-SE A CULTURA ANTES DA INDUÇÃO. EM T3,5H A CULTURA AO FINAL DA INDUÇÃO DA EXPRESSÃO. EM S TEM-SE A FRAÇÃO SOLÚVEL COM A PRESENÇA DA PROTEÍNA RECOMBINANTE. EM V (VOID) A FRAÇÃO NÃO LIGANTE DA RESINA NI-NTA. E NA PONTA DA SETA A INDICAÇÃO DA ALTURA DA PROTEÍNA RECOMBINANTE PURIFICADA.

## 4.2 ENSAIO DE ATIVIDADE ESFINGOMIELINÁSICA

Ensaio de determinação da atividade esfingomielinásica foram utilizados para avaliar a atividade da toxina dermonecrótica recombinante LiRecDT. Para estes ensaios de atividade esfingomielinásica foi utilizado o Kit Amplex Red Assay.

Como forma de controle negativo, foi utilizado apenas o reagente Amplex Red na ausência da LiRecDT1. E para constatação da atividade da esfingomielinásica da enzima foi utilizado 10 $\mu$ g da LiRecDT1, ao qual foi incubada com seu substrato por 30 minutos a 37°C.

A reação ocorre da seguinte forma: a enzima fosfolipase-D age em seu substrato, a esfingomielina, e cliva-a em colina e ceramida 1-fostato. A colina é oxidada por uma oxidase e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> do kit, e a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na presença de peroxidase horseradish reage com o reagente de Amplex na proporção de 1:1 gerando fluorescência. A amostra é então colocada em um fluorímetro (Shimadzu modelo RF-5301 PC Fluorescence Spectrophotometer) na excitação de 560nm e emissão 590nm.

A análise estatística da atividade da fosfolipase-D e reação da colina foi realizada com análises de variância (ANOVA) e teste de Tukey. Os dados foram comparados em GraphPad na versão 3.000 para Windows. Media  $\pm$  Desvio padrão na significância de  $p \leq 0,001$ .

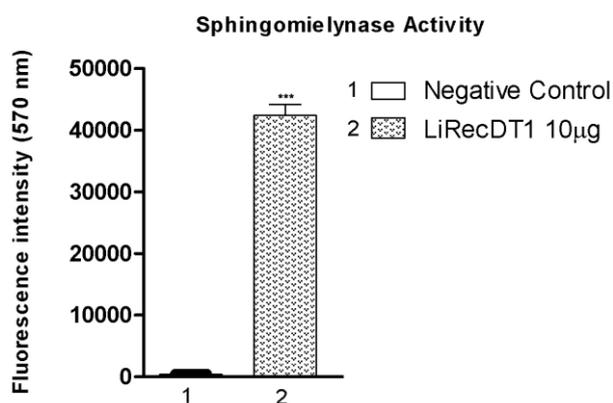


FIGURA 4 - ENSAIO DE ATIVIDADE ESFINGOMIELINÁSICA DA ISOFORMA LiRecDT1 SOBRE SEU SUBSTRATO ESFINGOMIELÍNICO. EM 2 MOSTRANDO ATIVIDADE DA LiReCDT1 COMPARADO AO SEU CONTROLE NEGATIVO EM 1.

### 4.3 CORAÇÃO ISOLADO

Na figura 5 e 6, A é um registro típico das variações de pressão intraventriculares no tempo. A figura B demonstra os valores  $+dp/dt$  e  $-dp/dt$  calculadas a partir do registro da figura A e a Figura C é o registro eletrocardiográfico da mesma preparação.

FIGURA 5

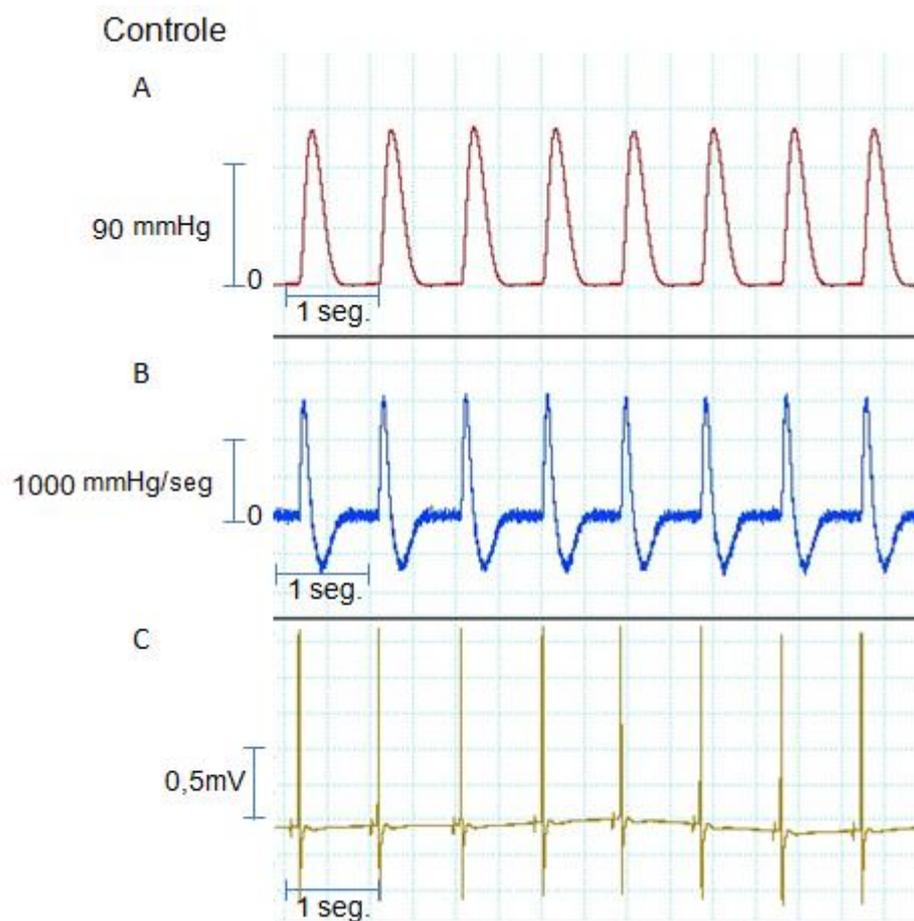
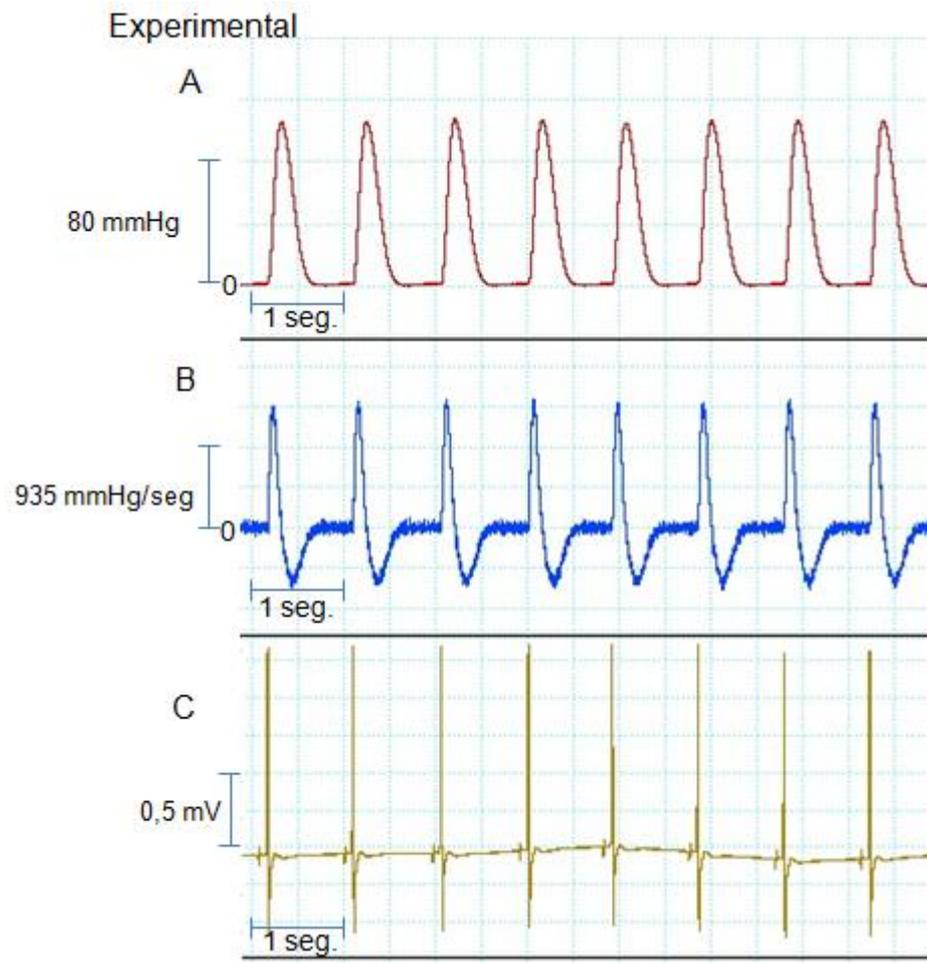


FIGURA 6



Os valores de pressão intraventricular máxima desenvolvida expressas em mmHg dos corações isolados foram de  $137,3 \pm 4,5$  no grupo controle (N=8) e de  $123,7 \pm 3,4$  no grupo experimental (N=8).

O gráfico 1 mostra os efeitos da fosfolipase D sobre a geração de pressão desenvolvida pelos corações isolados. O gráfico mostra que a fosfolipase D, na concentração empregada, foi capaz de interferir, diminuindo a pressão desenvolvida.

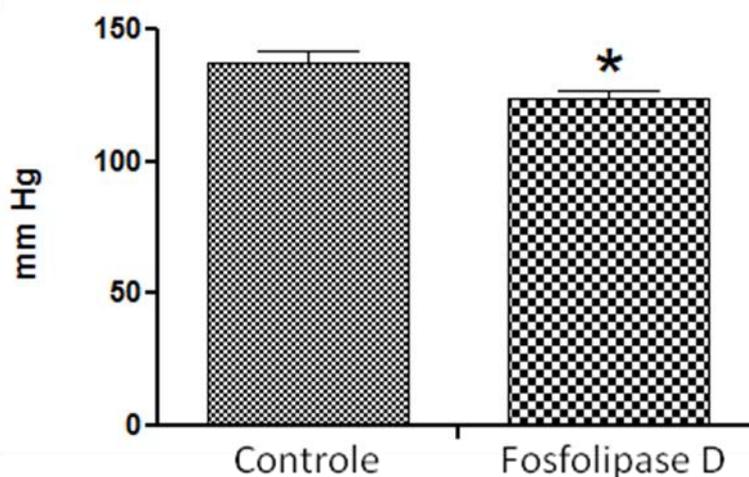


GRÁFICO1 - EFEITOS DA FOSFOLIPASE D (PLD) NA PRESSÃO DESENVOLVIDA PELO VENTRÍCULO ESQUERDO DE CORAÇÕES DE RATOS. OS RESULTADOS SÃO APRESENTADOS COMO MÉDIA  $\pm$  EPM. \* REPRESENTA DIFERENÇA ESTATISTICAMENTE SIGNIFICANTE DO GRUPO EXPERIMENTAL EM RELAÇÃO AO CONTROLE (P=0,0319).

Os valores de  $+dp/dt$  máxima e  $-dp/dt$  máxima em mmHg por segundo obtidos dos experimentos com corações isolados. Os valores de  $+dp/dt$  máxima e  $-dp/dt$  máxima foram respectivamente de  $1536,5 \pm 55,7$ ;  $-819,1 \pm 29,0$  no grupo controle (N=8) e de  $1392,8 \pm 37,6$ ;  $-710,3 \pm 23,0$  no grupo experimental (N=8).

O gráfico 2 mostra os efeitos da fosfolipase D na velocidade máxima de geração de pressão intraventricular ( $+df/dt_{\text{Máx}}$ ) pelos corações isolados. O gráfico mostra que a fosfolipase D, na concentração empregada, não foi capaz de interferir na velocidade da pressão desenvolvida.

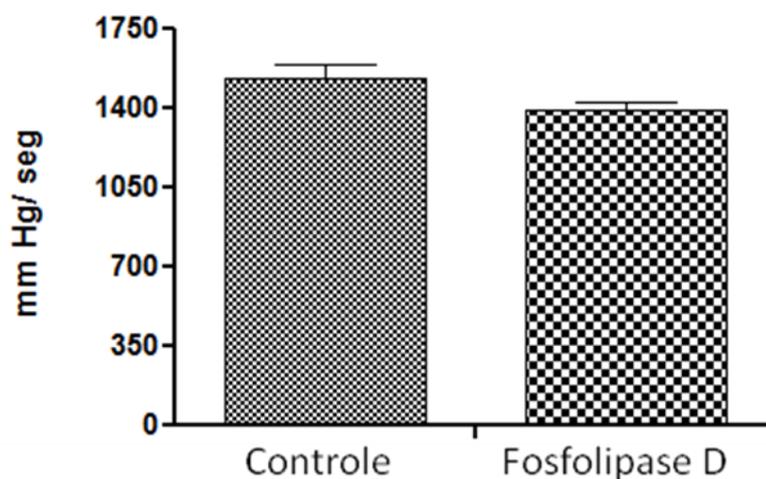


GRÁFICO 2 - EFEITOS DA FOSFOLIPASE D (PLD) NA VELOCIDADE MÁXIMA DE DESENVOLVIMENTO DE PRESSÃO INTRAVENTRICULAR ESQUERDA ( $+DP/DT_{\text{MÁX}}$ ) PELOS CORAÇÕES DE RATOS. OS RESULTADOS ESTÃO EXPRESSOS COMO MÉDIA  $\pm$  EPM (P=0,0508).

O gráfico 3 representa os dados de velocidade máxima de relaxamento ( $-df/dt_{\text{Min}}$ ) em corações isolados na presença e ausência da fosfolipase D.

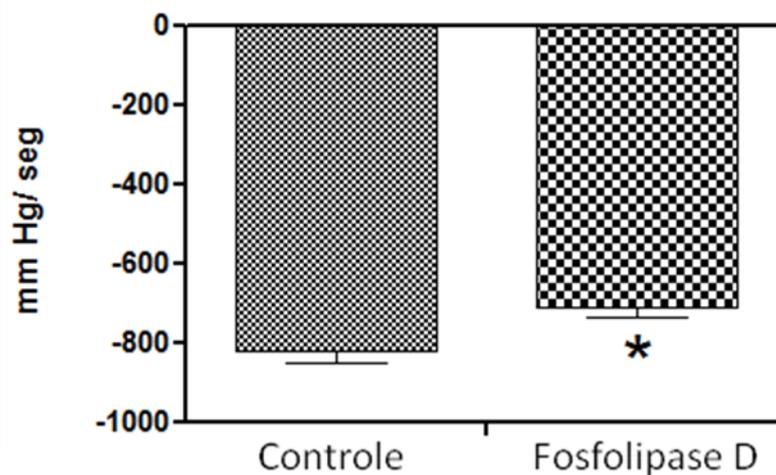


GRÁFICO 3 - EFEITOS DA FOSFOLIPASE D (PLD) NA VELOCIDADE MÁXIMA DE RELAXAMENTO MÁXIMO ( $-DP/DT_{\text{MIN}}$ ) PELOS CORAÇÕES ISOLADOS DE RATOS. OS RESULTADOS ESTÃO EXPRESSOS COMO MÉDIA  $\pm$  EPM ( $P=0,0108$ ). \* REPRESENTA DIFERENÇA ESTATISTICAMENTE SIGNIFICANTE DO GRUPO EXPERIMENTAL EM RELAÇÃO AO CONTROLE.

Os valores de frequência cardíaca obtidos de corações isolados foram respectivamente de  $84,9 \pm 6,5$  no grupo controle (N=8) e  $76,9 \pm 6,2$  no grupo experimental (N=8). Esses dados não diferiram de forma estatisticamente significativa.

O gráfico 4 representa os efeitos da fosfolipase D sobre a frequência de batimentos por minuto desenvolvida pelos corações isolados. O gráfico mostra que a fosfolipase D, na concentração empregada, foi incapaz de interferir na frequência cardíaca.

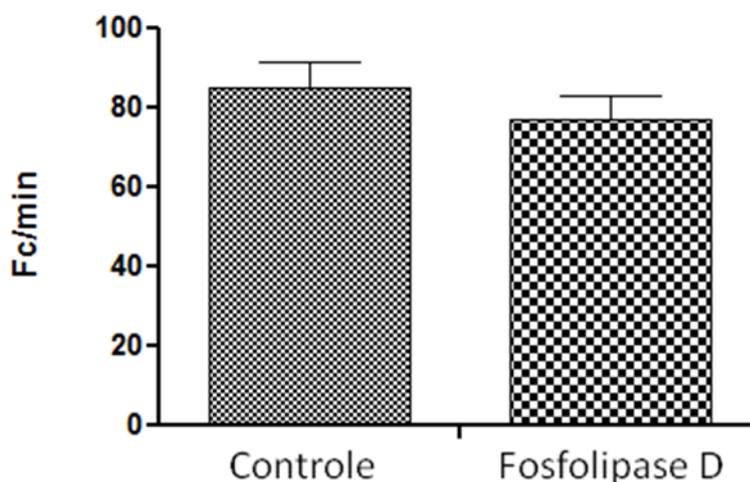


GRÁFICO 4 - EFEITOS DA FOSFOLIPASE D (PLD) NA FREQUÊNCIA DE BATIMENTOS DESENVOLVIDA PELOS CORAÇÕES DE RATOS. OS RESULTADOS SÃO APRESENTADOS COMO MÉDIA  $\pm$  EPM. N = 8, P=0,3896.

A análise do traçado eletrocardiográfico foi realizada numa derivação não convencional. Os animais do grupo controle e do grupo experimental mostraram eixo elétrico médio do complexo QRS normal, não sendo possível observar alterações quer na geração e/ou condução da frente de despolarização ou repolarização cardíaca, sendo que em todos os animais o ritmo foi sinusal. Desta forma podemos afirmar que as alterações verificadas não foram devido a alterações elétricas, na geração ou condução dos potenciais de ação.

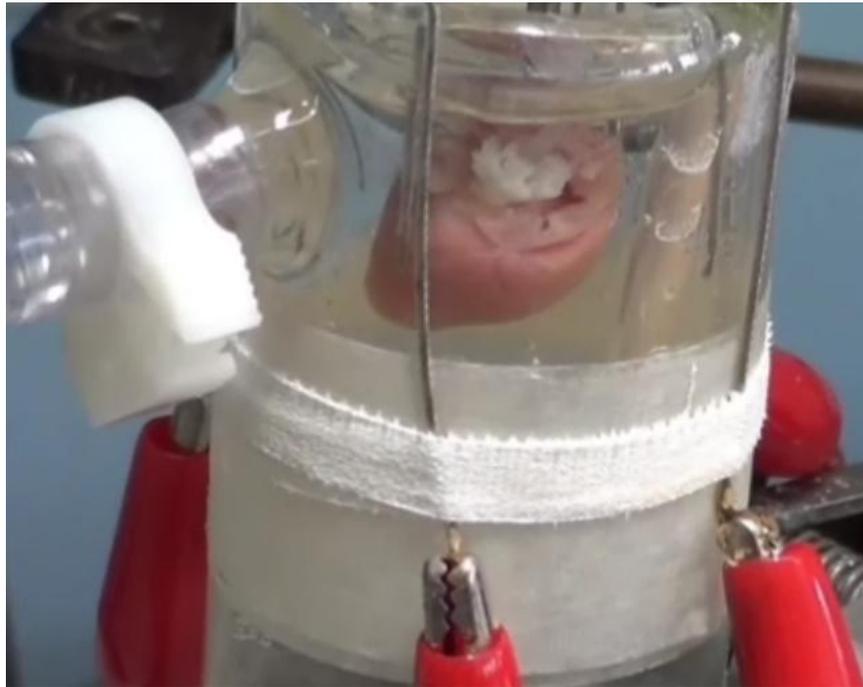
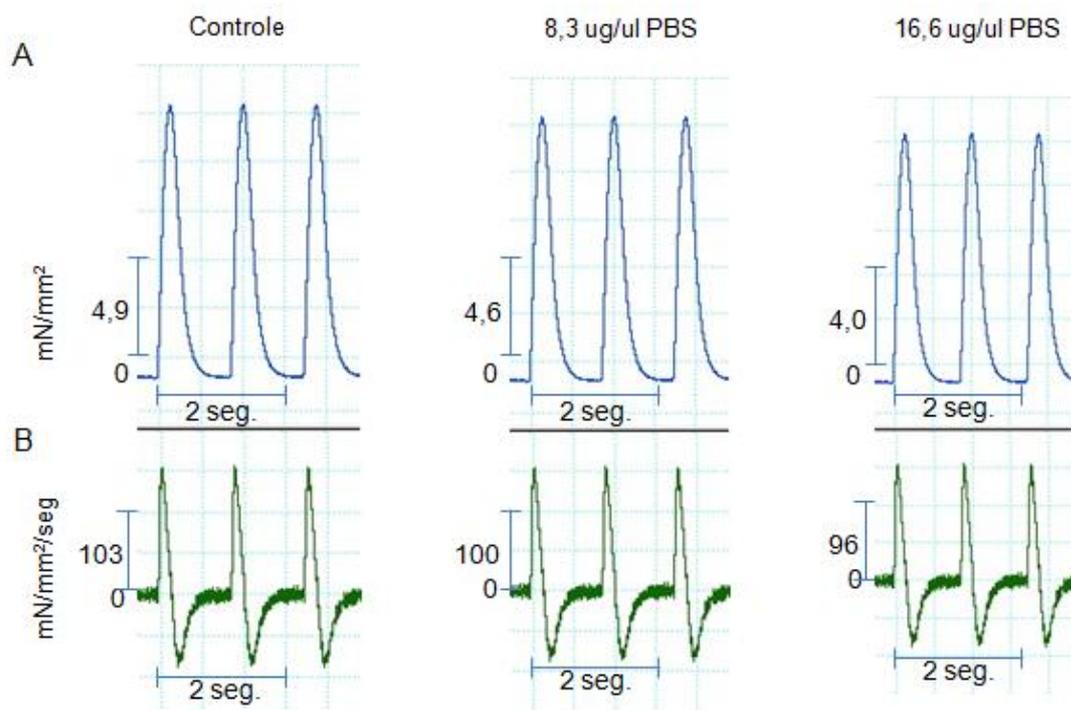


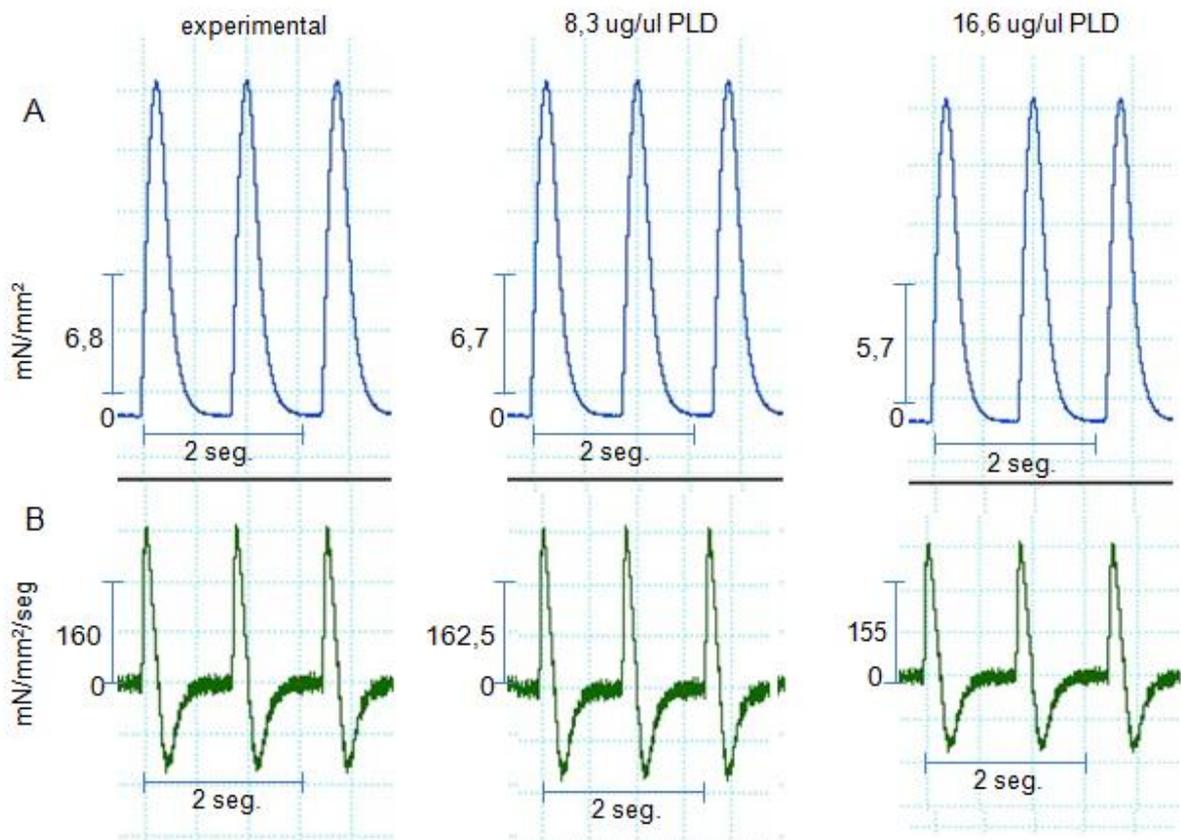
FIGURA 7 - CORAÇÃO DE RATO ISOLADO EM SOLUÇÃO BANHO

#### 4.4 MÚSCULOS PAPILARES ISOLADOS INTACTOS

A Figura 8 é o registro original de um experimento típico da força de contração de músculo papilar isolado em função do tempo em valores absolutos. Em 8A a força desenvolvida em função do tempo e em 8B a velocidade máxima de contração e relaxamento.



A Figura 9 é o registro original de um experimento típico da força de contração de músculo papilar isolado em função do tempo em valores absolutos. Em 9A a força desenvolvida em função do tempo e em 9B a velocidade máxima de contração e relaxamento.



Os valores de força máxima obtidos dos músculos papilares isolados intactos expressos em % dos valores obtidos no controle foram respectivamente de  $98,7 \pm 7,2$  e  $91,1 \pm 14,0$  para concentrações de  $8,3\mu\text{g}/\mu\text{l}$  e  $16,6\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de PBS (N=6) e  $108,5 \pm 14,9$  e  $97,0 \pm 15,4$  para concentrações de  $8,3\mu\text{g}/\mu\text{l}$  e  $16,6\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de PLD. (N=6). Esses dados não diferiram de forma estatisticamente significativa.

O gráfico 5 representa os efeitos da fosfolipase D (PLD) na força máxima desenvolvida por músculos papilares isolados intactos. O gráfico mostra que a fosfolipase D, na concentração empregada, foi incapaz de interferir na força desenvolvida.

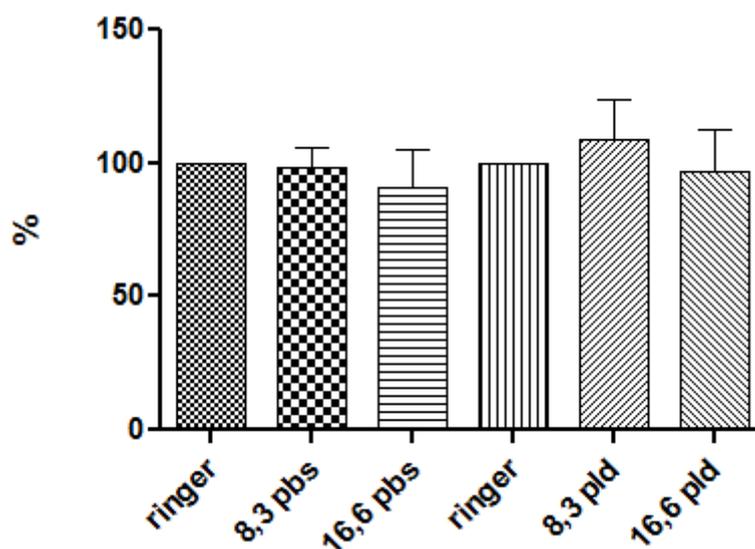


GRÁFICO 5 - EFEITOS DA FOSFOLIPASE D (PLD) NA FORÇA DESENVOLVIDA PELOS MÚSCULOS PAPILARES DE CORAÇÃO DE RATOS. OS RESULTADOS SÃO APRESENTADOS COMO MÉDIA  $\pm$  EPM N = 6, P=0,9264.

Os valores de  $+df/dt$  máxima e  $-df/dt$  máxima de músculos papilares isolados expressos em % dos valores obtidos dos controles, foram respectivamente de  $103,0 \pm 8,8$ ;  $-100,3 \pm 15,3$  para concentrações de  $8,3\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de PBS,  $107,6 \pm 20,2$ ;  $-108,0 \pm 23,2$  para concentrações de  $16,6\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de PBS (N=6),  $110,7 \pm 17,7$ ;  $-113,9 \pm 14,6$  para concentrações de  $8,3\mu\text{g}/\mu\text{l}$  PLD,  $105,8 \pm 15,5$ ;  $-110,5 \pm 18,4$  para concentrações de  $16,6\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de PLD (N=6). Esses dados não diferiram de forma estatisticamente significativa.

O gráfico 6 representa os efeitos da fosfolipase D (PLD) sobre a  $+df/dt$  máxima dos músculos papilares isolados intactos. O gráfico mostra que a fosfolipase D, na concentração empregada, foi incapaz de interferir na velocidade de produção de força desenvolvida.

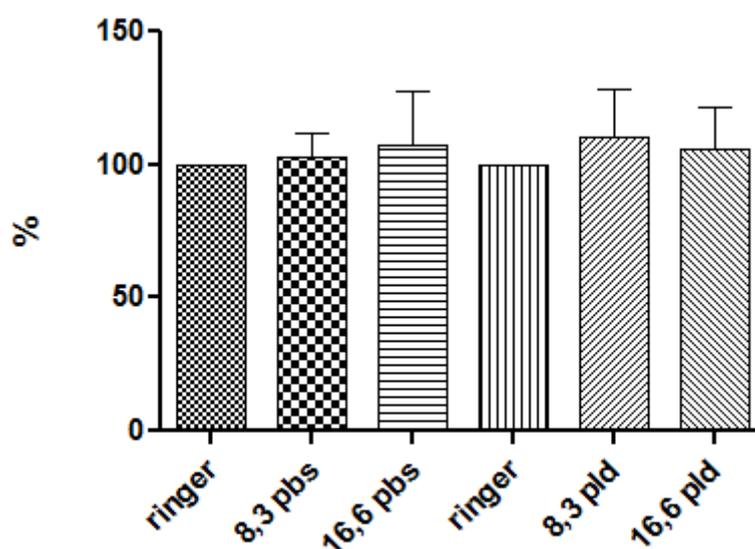


GRÁFICO 6 - EFEITOS DA FOSFOLIPASE D (PLD) NA  $+DF/DT$  MÁXIMA PELOS MÚSCULOS PAPILARES DE CORAÇÃO DE RATOS. OS RESULTADOS SÃO APRESENTADOS COMO MÉDIA  $\pm$  EPM. N = 6, P=0,9898.

O gráfico 7 representa os efeitos da fosfolipase D (PLD) sobre a  $-df/dt$  máxima dos músculos papilares isolados intactos. O gráfico mostra que a fosfolipase D, na concentração empregada, foi incapaz de interferir na velocidade do relaxamento.

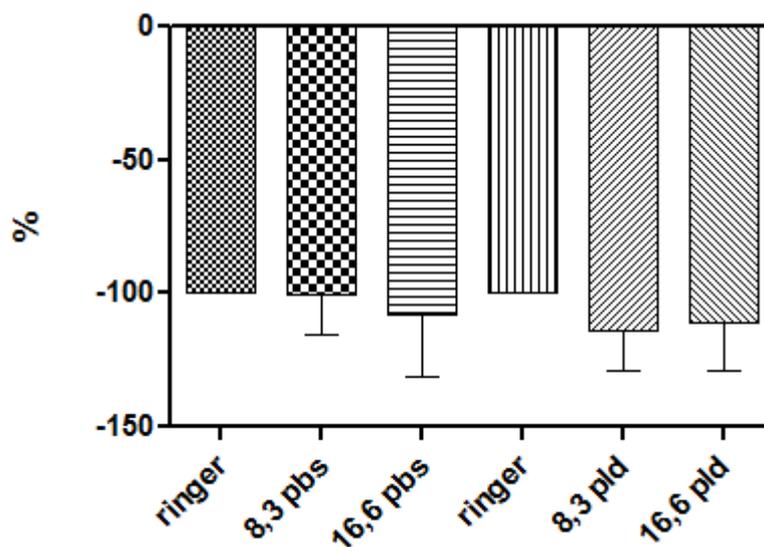


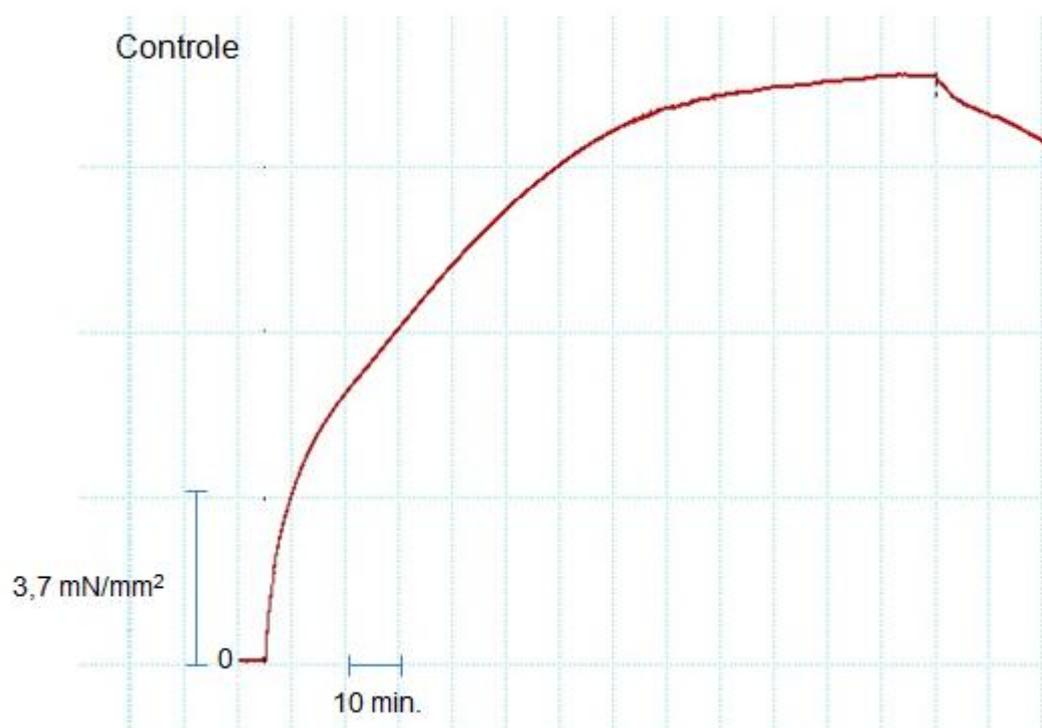
GRÁFICO 7 - EFEITOS DA FOSFOLIPASE D (PLD) NA  $-DF/DT$  MÁXIMA PELOS MÚSCULOS PAPILARES DE CORAÇÃO DE RATOS. OS RESULTADOS SÃO APRESENTADOS COMO MÉDIA  $\pm$  EPM. N = 6, P=0,9712.



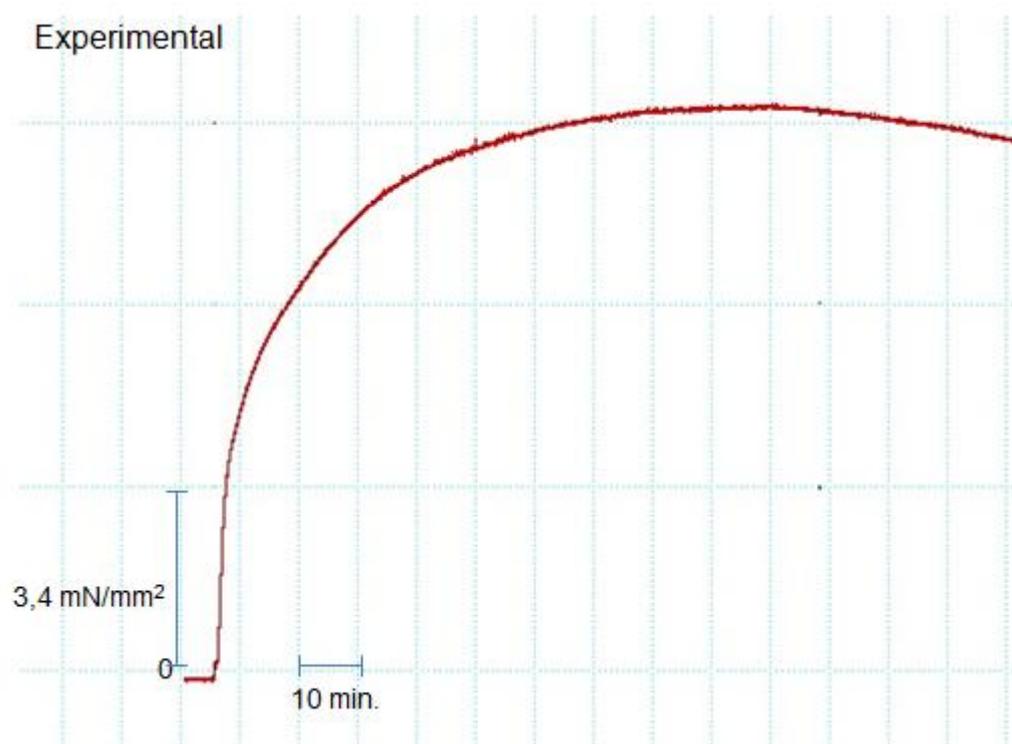
FIGURA 10 - MÚSCULO PAPILAR DE VENTRÍCULO DIREITO DE RATO EM SOLUÇÃO BANHO.

#### 4.5 MÚSCULO LISO DE AORTA

A Figura 11 é o registro original de um experimento típico da força de contração de anel de aorta em função do tempo em valores absolutos. A contração foi obtida pela exposição da preparação a uma solução isotônica de Ringer contendo 80 mM de KCl e 100uM de fenilefrina.



A Figura 12 é o registro original de um experimento típico da força de contração de anel de aorta em função do tempo em valores absolutos. A contração foi obtida pela exposição da preparação a uma solução isotônica de Ringer contendo 80 mM de KCl e 100uM de fenilefrina.



Os valores de força máxima obtidos dos anéis de aorta expressos em  $\text{mN/mm}^2$  foram respectivamente de  $13,0 \pm 1,1$  no grupo controle (N=6) e  $11,9 \pm 0,8$  no grupo experimental (N=6). Esses dados não diferiram de forma estatisticamente significativa.

O gráfico 8 representa os efeitos da fosfolipase D (PLD) sobre a força desenvolvida pelos anéis de aorta. O gráfico mostra que a fosfolipase D, na concentração empregada, foi incapaz de interferir na força desenvolvida.

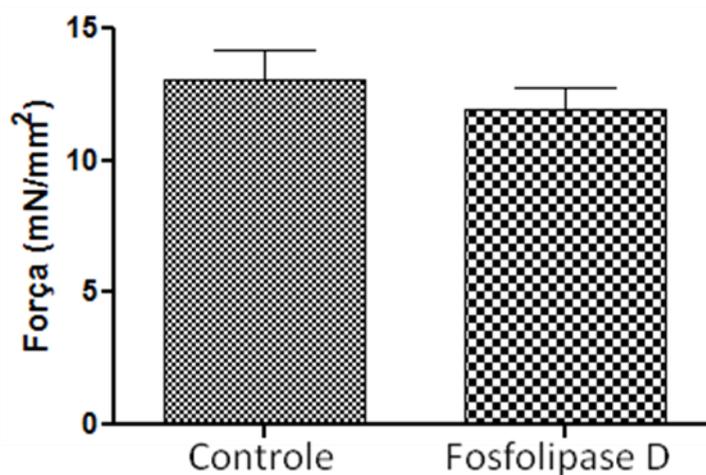


GRÁFICO 8 - EFEITOS DA FOSFOLIPASE D (PLD) SOBRE A FORÇA DESENVOLVIDA PELOS ANÉIS DE AORTA DE RATOS. OS RESULTADOS SÃO APRESENTADOS COMO MÉDIA  $\pm$  EPM. N = 6, P=0,4312.

Os valores de relaxamento de anéis de aorta expressos em % dos valores de força máxima foram dos grupos controle e experimental aos 30, 60, 90, 120, 150 e 180 foram respectivamente de:  $91,7 \pm 3,1$  e  $87,0 \pm 1,5$ ;  $79,1 \pm 5,9$  e  $76,4 \pm 3,2$ ;  $68,0 \pm 7,5$  e  $66,0 \pm 4,4$ ;  $61,7 \pm 8,1$  e  $59,0 \pm 4,8$ ;  $58,1 \pm 7,6$  e  $53,8 \pm 4,9$ ;  $56,5 \pm 7,4$  e  $50,1 \pm 4,9$ . Em todos os tempos a análise estatística demonstrou não existir diferença entre os grupos.

O gráfico 9 representa os dados dos efeitos da fosfolipase D (PLD) e do PBD no relaxamento dos anéis de aorta. O gráfico mostra que a fosfolipase D, na concentração empregada, foi incapaz de interferir no relaxamento.

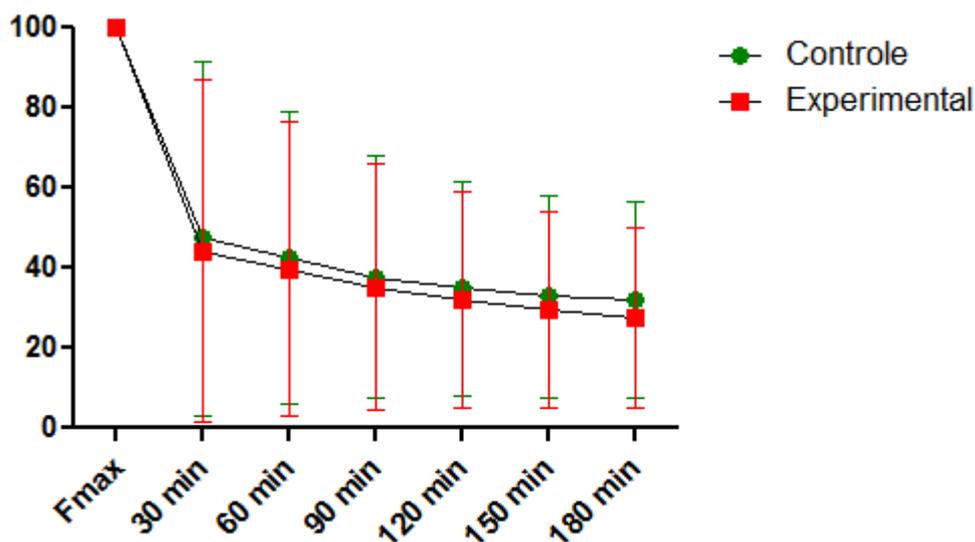


GRÁFICO 9 - EFEITOS DA FOSFOLIPASE D (PLD) SOBRE O RELAXAMENTO DOS ANÉIS DE AORTA DE RATOS. OS RESULTADOS SÃO APRESENTADOS COMO MÉDIA  $\pm$  EPM. N = 6. P=0,6083

Os valores de relaxamento obtidos dos anéis de aorta expressos em % dos valores de força máxima foram dos grupos controle e experimental às 3, 6, 9 e 12 horas foram respectivamente de  $56,3 \pm 7,2$  e  $50,1 \pm 4,9$ ;  $56,1 \pm 8,8$  e  $42,2 \pm 4,4$ ;  $50,6 \pm 7,0$  e  $40,4 \pm 3,7$ ;  $45,9 \pm 6,7$  e  $42,9 \pm 7,2$ . Esses dados não diferiram de forma estatisticamente significativa.

O gráfico 10 mostra os efeitos da fosfolipase D (PLD) e do PBS no relaxamento dos anéis de aorta. O gráfico mostra que a fosfolipase D, na concentração empregada, foi incapaz de interferir no relaxamento.

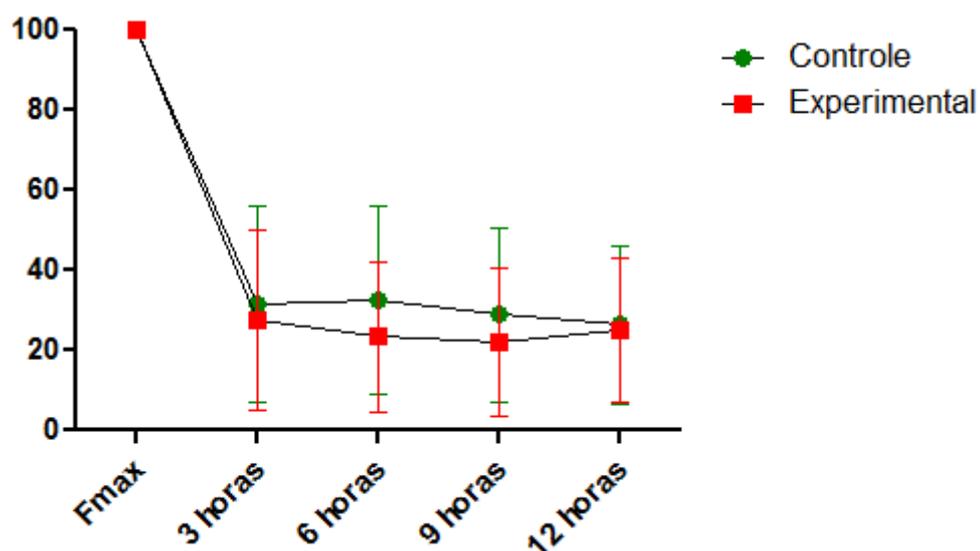


GRÁFICO 10 - EFEITOS DA FOSFOLIPASE D (PLD) NO RELAXAMENTO DOS ANÉIS DE AORTA DE RATOS. OS RESULTADOS SÃO APRESENTADOS COMO MÉDIA  $\pm$  EPM. N = 6. P=0,4234

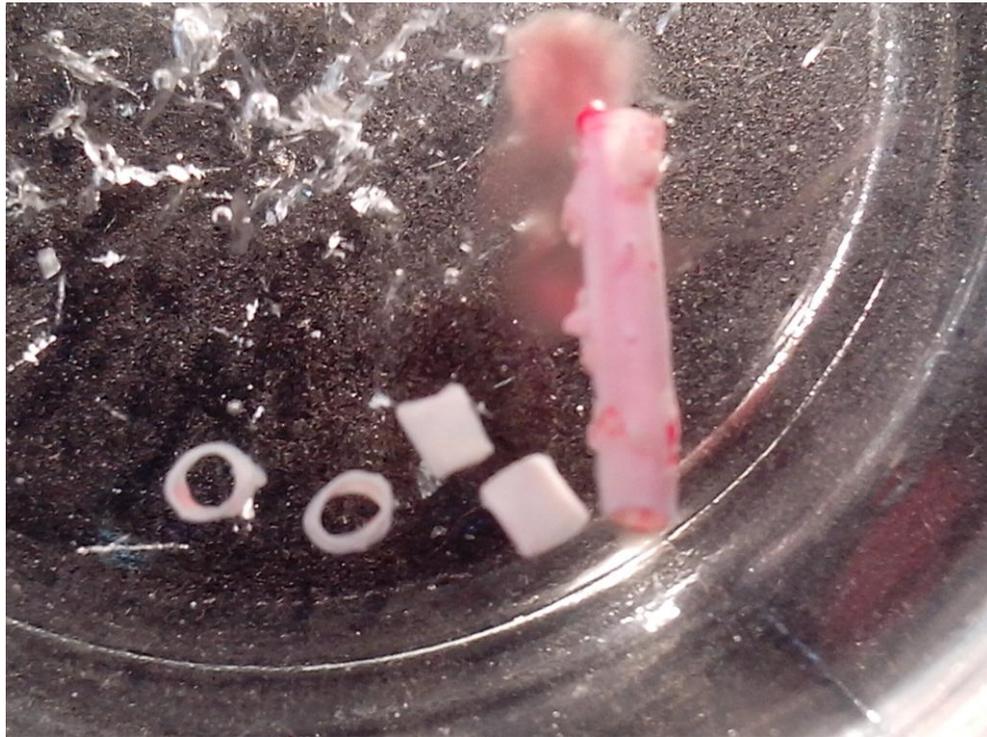


FIGURA 13 - SEGMENTO DE ARTÉRIA AORTA TORÁXICA DE RATO E ANÉIS DE AORTA OBTIDOS DESTE SEGMENTO.

## 5 DISCUSSÃO

Loxocelismo é a forma de designar os acidentes causados pelo envenenamento provocados por picadas de aranhas do gênero *Loxocles* as quais encontram-se distribuídas mundialmente (DA SILVA et al., 2004; FUTRELL, 1992). A picada da aranha marrom geralmente apresenta manifestações clínicas como lesão dermonecrotica com espalhamento gravitacional perto e no local da picada. O veneno desencadeia reações locais e sistêmicas. Como manifestação sistêmica do loxocelismo, tem sido descritos distúrbios hematológicos como agregação plaquetária a qual resulta em trombocitopenia e coagulação intravascular; hemólise e insuficiência renal. Efeitos sistêmicos são menos comuns que efeitos dermonecroticos, mas causam complicações sérias podendo ocasionar morte (KUSMA et al., 2008).

O veneno é constituído de uma mistura de toxinas proteicas de baixo peso molecular (5 a 40 kDa). Estimativas demonstram que o volume total de veneno injetado numa picada pode ser de 1 a 2 µl. Este veneno contém dezenas de microgramas de proteína dentre as quais fosfatase alcalina, hialuronidases, metaloproteases e fosfolipase D ou toxina dermonecrotica. Esta ultima tem sido melhor caracterizada e tem demonstrado intensa atividade. Tem sido demonstrado que a fosfolipase D hidrolisa glicerofosfolipideos e esfingolipideos presentes na membrana plasmática, gerando respectivamente ácido lisofosfatídico e ceramida-1-fosfato (KUSMA et al., 2008).

Derivados de esfingomielina como esfingosina e ceramida modulam a atividade celular potentemente e isso ocorre pela ativação de uma proteína G e por mecanismos de cascata que culminam com alterações nas concentrações de  $Ca^{++}$  intracelular (TORNQUIST et al., 2004) afetando as enzimas envolvidas na regulação do  $Ca^{++}$  assim como modulando os níveis intracelulares de  $Ca^{++}$ , sendo que em alguns tipos celulares induzem um rápido aumento no  $Ca^{++}$  citoplasmático enquanto em outras nada ocorre (COLINA et al., 2005). Fatores extracelulares como TNF- $\alpha$ , interferon, interleucina-1, queimaduras, agentes quimioterápicos entre outros causam a ativação de uma esfingomielinase que hidrolisa esfingomielina da membrana

plasmática gerando ceramida. Ceramida parece servir como um segundo mensageiro que tem papel importante em vários processos biológicos fundamentais como funções em receptores de membrana, proliferação celular, diferenciação celular, apoptose, função imune e respostas inflamatórias. Ceramida pode ser fosforilada por ceramida quinase convertendo-se em ceramida-1-fosfato (HANNUN, 1996).

Ceramida-1-fosfato pode ligar-se a receptores para esfingolipídeos presentes nas membranas de células de pituitária aumentando de maneira dose dependente o influxo de  $\text{Ca}^{++}$ . Este efeito provavelmente envolve a ativação da fosfolipase C, pois quando inibida a PKC os efeitos de ceramida-1-fosfato nos canais de  $\text{Ca}^{++}$  dependentes de voltagem diminuem. Observou também que ceramida-1-fosfato inicia uma pequena, mas significativa formação de fosfatos de inositol, contudo seu efeito é dependente do  $\text{Ca}^{++}$  do meio extracelular. Na presença de Nimodipina, um bloqueador de canais de  $\text{Ca}^{++}$  dependentes de voltagem, o efeito foi abolido (TORNQUIST et al., 2004).

Colina *et al.* demonstrou que em linfócitos T ceramida e esfingosina provocam aumento no  $\text{Ca}^{++}$  intracelular, essencial para a ativação do sistema imune. Ceramida-1-fosfato nos linfócitos é capaz de formar IP<sub>3</sub>, liberando  $\text{Ca}^{++}$  dos estoques intracelulares provocando a abertura dos canais SOCC na membrana desencadeando o influxo do  $\text{Ca}^{++}$  do meio extracelular (COLINA et al., 2005).

Chaves-Moreira *et al.* demonstrou que a fosfolipase D promove hemólise de eritrócitos humanos. Este efeito foi dependente do influxo de  $\text{Ca}^{++}$  pois bloqueadores de canais de  $\text{Ca}^{++}$  do tipo L bloquearam esses efeitos (CHAVEZ-MOREIRA, D.; VEIGA, 2011).

Demonstrando que o efeito depende de célula para célula, Zheng *et al.* utilizou anéis de aorta de ratos pré contraídos com fenilefrina e adicionou uma esfingomielinase específica para hidrolisar esfingomielina. A vasoconstrição e o aumento intracelular de  $\text{Ca}^{++}$  foram diminuídos de maneira significativa. Foi relatado que não houve diminuição no aumento inicial do  $\text{Ca}^{++}$  citosólico (dependente dos estoques intracelulares), mas causou um rápido declínio na segunda fase da contração (dependente dos estoques extracelulares) de maneira diferente do grupo controle, levando à hipótese de que a

esfingomielinase bloqueou o influxo de  $\text{Ca}^{++}$  através dos canais tipo L ou canais SOCC (ZHENG et al., 2000).

Biosinais lipídicos envolvidos na mobilização do  $\text{Ca}^{++}$  em diferentes tipos de células são descritos na literatura. Efeitos sistêmicos da fosfolipase D em órgãos também são descritos:

Dias-Lopes *et al.* investigou os efeitos do veneno bruto e da toxina dermonecrótica recombinante da *Loxocles intermédia* em camundongos. Verificou a presença da toxina nos rins, coração, pulmões e fígado. Em outro experimento isolou corações e observou que a força de contração cardíaca e a frequência cardíaca dos animais tratados com veneno bruto ou fosfolipase D eram menores que os animais controle. Níveis de creatina quinase sérica estavam aumentados em relação ao grupo controle, indicando lesão cardíaca. Demonstrou com imunofluorescência que a toxina se liga à membrana dos cardiomiócitos e com *patch clamp* que a corrente de influxo pelos canais de  $\text{Ca}^{++}$  do tipo L estava 25% aumentada em relação ao grupo controle (DIAS-LOPES et al., 2010). Leskova e Kryzhanovsky discutem que é essa acumulação excessiva de  $\text{Ca}^{++}$  nos cardiomiócitos é um dos fatores chave para a injúria cardíaca (LESKOVA; KRYZHANOVSKY, 2011).

Roman *et al.* utilizou ratos transgênicos sem os sítios de fosforilação de PKC na troponina I no coração. Através de ecocardiografia mostrou não haver diferença na frequência cardíaca entre os grupos, mas houve diferença significativa na geração da pressão sistólica intraventricular esquerda,  $+dP/dt$  e  $-dP/dt$  que foram maiores nos animais transgênicos em níveis basais, resultados muito parecidos com os encontrados em nosso laboratório. Quando estimulou esses corações com isoproterenol e fenilefrina notou que os animais controle respondiam a isso com mudanças inotrópicas positivas, enquanto que nos animais transgênicos nada ocorria. O autor então concluiu que a fosforilação por PKC na troponina I diminui a sensibilidade ao  $\text{Ca}^{++}$  nos miofilamentos e deprime a velocidade das pontes cruzadas. Nos animais transgênicos a falta de fosforilação nesses sítios tira o coração do seu estado inibido, levando as funções cardíacas próximas à cinética máxima de contração e relaxamento, ou seja, PKC fosforila troponina I, regulando negativamente a contração cardíaca (ROMAN et al., 2004).

Dong *et al.* utilizou ratos Wistar Kyoto (animal modelo para disfunção cardíaca induzida por hipertensão) e utilizou espectrometria de massas e Western blot para estudar fosforilação em troponina I *in vivo*. Verificou que não houve alteração na fosforilação por PKA entre os grupos, mas no grupo hipertenso teve um aumento significativo na fosforilação de troponina I por PKC em relação ao grupo controle, dando suporte à hipótese de que a fosforilação inadequada de troponina I por PKC pode ser associado à disfunção cardíaca (DONG *et al.*, 2012).

Nossos resultados dos efeitos diretos da toxina recombinante fosfolipase D em músculos papilares intactos e anéis de aorta nas concentrações utilizadas, não apresentaram efeitos diretos na produção de força. Concluímos que o decréscimo na produção de força foi tempo-dependente e não pela ação da fosfolipase D. Em contra partida os resultados observados nos efeitos sistêmicos da fosfolipase D sobre o coração foram significantes. Observamos que existe diminuição de 11% na produção de pressão ventricular esquerda no grupo experimental e nestes mesmos experimentos foram também observadas reduções significativas na velocidade de relaxamento miocárdico ( $-dP/dt_{máx}$ ) avaliados pela velocidade máxima de redução da pressão intraventricular em 15,35%.

Segundo Leskova e Kryzhanovsky a quantidade de esfingomielina em cardiomiócitos de gatos seria entre 3,2 a 9,4% da membrana plasmática (LESKOVA; KRYZHANOVSKY, 2011). De acordo com os artigos supracitados a ação da fosfolipase D acarreta uma hidrolise de fosfolipídios de membrana, mais especificamente esfingomielina e um dos produtos dessa degradação são a ceramida-1-fosfato. A ceramida-1-fosfato interage com receptores de esfingolipídeos na membrana das células e aumenta de maneira dose dependente o influxo de  $Ca^{++}$  nas células, parecendo envolver a ativação da fosfolipase C, ativando fosfolipídios de inositol e também PKC aumentando a concentração de  $Ca^{++}$  citosólico e regulando negativamente a cinética de contração cardíaca.

Com o  $Ca^{++}$  citosólico aumentado e a expressão de SERCA e NCX normais, o miócito não diminui a concentração intracelular de  $Ca^{++}$  de maneira satisfatória para a diástole, o que pode ser um fator para injúria cardíaca (LESKOVA; KRYZHANOVSKY, 2011), além de fosforilação aumentada em

troponina I por PKC, o que pode ser um marcador de disfunção cardíaca (DONG et al., 2012; HINKEN et al., 2012; WALKER; FULLERTON; BUTTRICK, 2013), regulando negativamente a cinética de contração cardíaca. Apenas a disfunção diastólica não promove o desenvolvimento de insuficiência cardíaca, mas aumenta a tendência (KINDERMANN et al., 2008).

O conhecimento científico que norteia o loxocelismo relacionado à função cardiovascular é escasso. Desta forma é difícil explicar à luz da literatura os eventos subsequentes à intoxicação por fosfolipase D e os efeitos cardiovasculares encontrados em nosso trabalho. Encontramos estudos que relatam os efeitos da fosfolipase D em diferentes tipos de células, o que nos dá uma ideia dos efeitos fisiológicos, mas que por muitas vezes são diferentes de célula para célula. Nossa hipótese para os mecanismos de ação da fosfolipase D no músculo cardíaco são especulativos uma vez que não obtivemos dados de sinalização intracelular nem de marcadores bioquímicos em nosso trabalho.

## 6 CONCLUSÃO

A fosfolipase D é um potente agente biológico. Seus efeitos são descritos em diversos tipos de células e tecidos, mas no sistema cardiovascular são escassos. De acordo com nossos estudos, não foram encontrados efeitos diretos da toxina sobre parâmetros de contratilidade em músculos papilares isolados ou anéis de aorta. Porém em corações isolados de animais pré-tratados com fosfolipase D obtivemos redução na geração de pressão intraventricular esquerda e diminuição da velocidade máxima de relaxamento (-dP/dt). Tem sido demonstrado que a ação da fosfolipase D envolve a degradação da esfingomiélin e a geração de subprodutos como ceramida 1 fosfato. Este subproduto se liga a receptores de membrana e ativam uma proteína G, a qual se liga a fosfolipase C originando o inositol 1,4,5 trifosfato e o diacilglicerol. O inositol 1,4,5 trifosfato se liga a receptores no retículo sarcoplasmático, o que causa a liberação de  $Ca^{++}$  do retículo sarcoplasmático promovendo a ativação do diacilglicerol da membrana plasmática, formando a proteína quinase C ou PKC. Esta provoca fosforilações em sítios específicos de canais de  $Ca^{++}$  do tipo L e na troponina I. Isto reduz a sensibilidade dos miofilamentos ao  $Ca^{++}$  e deprime também a velocidade das pontes cruzada ocasionando efeito inotrópico e lusiotrópico negativo. Essa hipótese é especulativa, uma vez que não temos dados de sinalização intracelular ou marcadores bioquímicos nesses corações.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIRES, M. M. . ET AL. **Fisiologia**. [s.l.] Guanabara Koogan, 2008.
- \_\_\_\_\_. **Fisiologia**. [s.l.] Guanabara Koogan, 2012.
- ALBERTS, B. . ET AL. **Biologia molecular da célula**. [s.l.] Artmed, 2004.
- \_\_\_\_\_. **Fundamentos da biologia celular**. [s.l.] Artmed, 2006.
- APPEL, M. H. et al. Identification, cloning and functional characterization of a novel dermonecrotic toxin (phospholipase D) from brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1780, n. 2, p. 167–78, fev. 2008.
- BARBARO, K. C. et al. Dermonecrotic and lethal components of *Loxosceles gaucho* spider venom. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 30, n. 3, p. 331–8, mar. 1992.
- \_\_\_\_\_. Enzymatic characterization, antigenic cross-reactivity and neutralization of dermonecrotic activity of five *Loxosceles* spider venoms of medical importance in the Americas. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 45, n. 4, p. 489–99, 15 mar. 2005.
- BARBARO, K. C.; EICKSTEDT, V. R. Adjuvant effect of *Loxosceles gaucho* (South American brown spider) venom. **Toxicon**, v. 32(6), p. 687–693, 1994.
- BARRETTO, O. C.; CARDOSO, J. L.; DE CILLO, D. Viscerocutaneous form of loxoscelism and erythrocyte glucose-6-phosphate deficiency. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 27, n. 5, p. 264–7, 1985.
- BERNE, R. M. ; LEVY, M. N. **Fisiologia**. [s.l.] Guanabara Koogan, 2000.
- BERS, D. M. Cardiac excitation contraction coupling. **Nature**, v. 415, p. 198–215, 2002.
- \_\_\_\_\_. Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes. **Annual review of physiology**, v. 70, p. 23–49, jan. 2008.
- BHUPATHY, P.; BABU, G. J.; PERIASAMY, M. Sarcolipin and phospholamban as regulators of cardiac sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase. **Journal of molecular and cellular cardiology**, v. 42, n. 5, p. 903–11, maio. 2007.
- BLUHM, W. F. et al. Phospholamban: a major determinant of the cardiac force-frequency relationship Phospholamban: a major determinant of the cardiac force-frequency relationship. **Am. J. Physiol. Heart**, v. 278, p. H249–H255, 2000.

CARDOSO, J. L. C. et al. 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, p. 608–609, 1990.

CARONI, P.; ZURINI, M.; CLARK, A. The calcium-pumping ATPase of heart sarcolemma. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 402, n. 7, p. 402–21, jan. 1982.

CHAIM, O. M. et al. Phospholipase-D activity and inflammatory response induced by brown spider dermonecrotic toxin: endothelial cell membrane phospholipids as targets for toxicity. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1811, n. 2, p. 84–96, fev. 2011.

CHAVES-MOREIRA, D. et al. Identification of a direct hemolytic effect dependent on the catalytic activity induced by phospholipase-D (dermonecrotic toxin) from brown spider venom. **Journal of cellular biochemistry**, v. 107, n. 4, p. 655–66, 1 jul. 2009.

CHAVES-MOREIRA, D. et al. The relationship between calcium and the metabolism of plasma membrane phospholipids in hemolysis induced by brown spider venom phospholipase-D toxin. **Journal of cellular biochemistry**, v. 112, n. 9, p. 2529–40, set. 2011.

CHEUNG, D. W. Modulation of spontaneous transient  $\text{Ca}^{2+}$ -activated K<sup>+</sup> channel currents by cADP-ribose in vascular smooth muscle cells. **European journal of pharmacology**, v. 458, n. 1-2, p. 57–9, 1 jan. 2003.

CLARK, R.B.; BOUCHARD, R.A.; GILES, W. R. Action potential duration modulates calcium influx,  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchange and intracellular calcium release in rat ventricular myocytes. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 779, p. 417–429, 1996.

COLINA, C. et al. Ceramide-1-P induces  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization in Jurkat T-cells by elevation of  $\text{Ins}(1,4,5)\text{-P}_3$  and activation of a store-operated calcium channel. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 336, n. 1, p. 54–60, 14 out. 2005.

COSTANZO, L. S. **Fisiologia**. [s.l.] Elsevier, 2004.

CRIBBS, L. L. Vascular Smooth Muscle Calcium Channels: Could T<sup>+</sup> Be a Target? **Circulation Research**, v. 89, p. 560–562, 2001.

DA SILVA, P. H. et al. Brown spiders and loxoscelism. **Toxicon**, v. 44, n. 7, p. 693–709, dez. 2004.

DIAS-LOPES, C. et al. cardiotoxic effects of *Loxosceles intermedia* spider venom and the recombinant venom toxin rLiD1. **Toxicon**, v. 56, p. 1426–1435, 2010.

DONG, X. et al. Augmented phosphorylation of cardiac troponin I in hypertensive heart failure. **The Journal of biological chemistry**, v. 287, n. 2, p. 848–57, 6 jan. 2012.

DUNCAN, R. P. et al. Diversity of *Loxosceles* spiders in Northwestern Africa and molecular support for cryptic species in the *Loxosceles rufescens* lineage. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 55, n. 1, p. 234–48, abr. 2010.

EVANS, A M.; CANNELL, M. B. The role of L-type  $\text{Ca}^{2+}$  current and  $\text{Na}^{+}$  current-stimulated  $\text{Na}/\text{Ca}$  exchange in triggering SR calcium release in guinea-pig cardiac ventricular myocytes. **Cardiovascular research**, v. 35, n. 2, p. 294–302, ago. 1997.

FISCHER, M. L. Descrição do comportamento agonístico de *Loxosceles laeta*, *L. hirsuta* e *L. intermedia* (Araneae: Sicariidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 25, n. 4, p. 579–586, 2008.

FLOYD, R.; WRAY, S. Calcium transporters and signalling in smooth muscles. **Cell calcium**, v. 42, n. 4-5, p. 467–76, 2007.

FRANCIS, S. H.; CORBIN, J. D. Structure and function of cyclic nucleotide-dependent protein kinases. **Annual review of physiology**, v. 56, p. 237–72, jan. 1994.

FUTRELL, J. M. Loxocelism. **Am. J. Med. Sci**, v. 304, p. 261–267, 1992.

GAUTEL, M.; GOULDING, D. A molecular map of titin/connectin elasticity reveals two different mechanisms acting in series. **FEBS letters**, v. 385, n. 1-2, p. 11–4, 29 abr. 1996.

GIBSON, A. et al. Capacitative  $\text{Ca}^{2+}$  entry and the regulation of smooth muscle tone. **Journal Citation Report**, v. 19, p. 266–269, 1998.

GONÇALVES DE ANDRADE, R. M. et al. Ontogenetic development of *Loxosceles intermedia* spider venom. **Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology**, v. 37, n. 4, p. 627–32, abr. 1999.

GREMSKI, L. H. et al. A novel expression profile of the *Loxosceles intermedia* spider venomous gland revealed by transcriptome analysis. **Molecular bioSystems**, v. 6, n. 12, p. 2403–16, dez. 2010.

GUIBERT, C.; DUCRET, T.; SAVINEAU, J.-P. Voltage-independent calcium influx in smooth muscle. **Progress in biophysics and molecular biology**, v. 98, n. 1, p. 10–23, set. 2008.

GUO, W.; JORGENSEN, A.; CAMPBELL, K. P. Triadin , a Linker for Calsequestrin and the Ryanodine Receptor Identification of Triadin. **Soc. Gen. Physiol. Ser.**, v. 51, p. 19–28, 1996.

HANNUN, Y. A. Functions of ceramide in coordinating cellular responses to stress. **Science (New York, N.Y.)**, v. 274, n. 5294, p. 1855–9, 13 dez. 1996.

HARLOW, E.; LANE, D. **Antibodies: A laboratory manual**. [s.l.] New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1988.

HINKEN, A. C. et al. Protein kinase C depresses cardiac myocyte power output and attenuates myofilament responses induced by protein kinase A. **Journal of muscle research and cell motility**, v. 33, n. 6, p. 439–48, dez. 2012.

HOUSSAY, A. B. ; CINGOLANI, H. E. . **Fisiologia Humana**. Artmed. 2004.

HOVE, C. E. VAN et al. Vasodilator efficacy of nitric oxide depends on mechanisms of intracellular calcium mobilization in mouse aortic smooth muscle cells Abbreviations : **British Journal of Pharmacology**, v. 158, p. 920–930, 2009.

ISBISTER, G. K.; GRAY, M. R. A prospective study of 750 definite spider bites , with expert spider identification. **QJM**, v. 95, p. 723–731, 2002.

JACKSON, W. F. Potassium Channels and Regulation of the Microcirculation. **Microcirculation**, v. 5, p. 85–90, 1998.

JACKSON, W. F. Ion Channels and Vascular Tone. **Hypertension**, v. 35, p. 173–178, 2000.

JI, G. et al. Stretch-induced Calcium Release in Smooth Muscle. **Journal of General Physiology**, v. 119, p. 533–543, 2002.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. [s.l.] Guanabara Koogan, 2004.

KINDERMANN, M. et al. Heart failure with normal left ventricular ejection fraction: what is the evidence? **Trends in cardiovascular medicine**, v. 18, n. 8, p. 280–92, nov. 2008.

KNOLLMANN, B. C. New roles of calsequestrin and triadin in cardiac muscle. **The Journal of physiology**, v. 587, n. Pt 13, p. 3081–7, 1 jul. 2009.

KNOT, H. J.; ZIMMERMANN, P. A; NELSON, M. T. Extracellular K(+)-induced hyperpolarizations and dilatations of rat coronary and cerebral arteries involve inward rectifier K(+) channels. **The Journal of Physiology**, v. 492, n. Pt 2, p. 419–430, 1996.

KUSMA, J. et al. Nephrotoxicity caused by brown spider venom phospholipase-D (dermonecrotic toxin) depends on catalytic activity. **Biochimie**, v. 90, n. 11-12, p. 1722–36, 2008.

LAMB, G. D. Excitation contraction coupling in skeletal muscle: comparisons with cardiac muscle. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 27, p. 216–224, 2000.

LARBIG, R. et al. Activation of reverse  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  exchange by the  $\text{Na}^+$  current augments the cardiac  $\text{Ca}^{2+}$  transient: evidence from NCX knockout mice. **The Journal of physiology**, v. 588, n. Pt 17, p. 3267–76, 1 set. 2010.

LEE, S.; LYNCH, K. R. Brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*) venom phospholipase D (PLD) generates lysophosphatidic acid (LPA). **The Biochemical journal**, v. 391, n. Pt 2, p. 317–23, 15 out. 2005.

LESKOVA, G. F.; KRYZHANOVSKY, G. N. Changes in phospholipid composition of cardiomyocyte plasma membranes during hemorrhagic shock. **Bulletin of experimental biology and medicine**, v. 151, n. 3, p. 284–7, jul. 2011.

LEUNG, F. P. et al. Store-operated calcium entry in vascular smooth muscle. **British Journal of Pharmacology**, v. 153, n. 5, p. 846–857, 29 jan. 2008.

LINCOLN, T. M.; KOMALAVILAS, P.; CORNWELL, T. L. Pleiotropic regulation of vascular smooth muscle tone by cyclic GMP-dependent protein kinase. **Hypertension**, v. 23, n. 6\_Pt\_2, p. 1141–1147, 1 jun. 1994.

LINES, G. T. et al. Contribution of the  $\text{Na}^+$ / $\text{Ca}^{2+}$  exchanger to rapid  $\text{Ca}^{2+}$  release in cardiomyocytes. **Biophysical journal**, v. 91, n. 3, p. 779–92, 1 ago. 2006.

LOHMANN, S.M.; VAANDRAGER A.B.; SMOLENSKI, A.; WALTER, U.; DE JONGE, H. R. Distinct and specific functions of cGMP dependent protein kinases. **Trends Biochem Sci**, v. 3, n. 97, p. 0–5, 1997.

LUCATO, R. V et al. *Loxosceles gaucho* venom-induced acute kidney injury--in vivo and in vitro studies. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 5, n. 5, p. e1182, jan. 2011.

MARCHAND, A.; ABI-GERGES, G.; SALIBA, Y.; MERLET, E.; LOMPRES, A. M. Calcium signaling in vascular smooth muscle cells: From physiology to pathology. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 740, p. 795–810, 2012.

MARQUES-DA-SILVA, E.; FISCHER, M. L. Occurrence of species of the genus *Loxosceles* Heineken & Lowe, 1832 (Araneae: Sicariidae) in the Paraná State. **Anais da Reunião Científica Anual do Instituto Butantan**, v. 51, 2000.

MOHAMED, T. M. A et al. Plasma membrane calcium pump (PMCA4)-neuronal nitric-oxide synthase complex regulates cardiac contractility through modulation of a compartmentalized cyclic nucleotide microdomain. **The Journal of biological chemistry**, v. 286, n. 48, p. 41520–9, 2 dez. 2011.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger-Princípios de bioquímica**. [s.l.] Sarvier, 2006.

NELSON, M. T.; QUAYLE, J. M. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. **American Journal of Physiology and Cell Physiology**, v. 268, p. C799–C822, 1995.

OPIE, L. H. **The heart**. [s.l.] Lippincott Raven Publishers, 1998.

PERIASAMY, M.; BHUPATHY, P.; BABU, G. J. Regulation of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase pump expression and its relevance to cardiac muscle physiology and pathology. **Cardiovascular research**, v. 77, n. 2, p. 265–73, 15 jan. 2008.

PETERSON, M. E. Brown spider envenomation. **Clinical techniques in small animal practice**, v. 21, n. 4, p. 191–3, nov. 2006.

POWERS, S.K.; HOWLEY, E. T. **Fisiologia do exercício**. III ed ed. [s.l.] Manole, 2000.

RODRIGUES, J. H. C. et al. Acidentes com Aracnideos. **Revista do Hospital das Clínicas de Porto Alegre**, v. 6, p. 91–96, 1986.

ROMAN, B. B. et al. Inhibition of PKC phosphorylation of cTnl improves cardiac performance in vivo. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 286, n. 6, p. H2089–95, jun. 2004.

SAMS, H. H. et al. Necrotic arachnidism. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 44, n. 4, p. 561–73; quiz 573–6, abr. 2001.

SATOH, H. et al. Importance of Ca<sup>2+</sup> influx by Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange under normal and sodium-loaded conditions in mammalian ventricles. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 242, n. 1-2, p. 11–7, jan. 2003.

SAUPE, E. E. et al. Tracking a medically important spider: climate change, ecological niche modeling, and the brown recluse (*Loxosceles reclusa*). **PloS one**, v. 6, n. 3, p. e17731, jan. 2011.

SCHIAFFINO, S. .; REGGIANI, C. . Molecular diversity of myofibrillar proteins: Gene regulation and funcional significance. **Physiological Reviews**, v. 76, p. 371–423, 1996.

SEZERINO, U. M. et al. A clinical and epidemiological study of *Loxosceles* spider envenoming in Santa Catarina, Brazil. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 92(5), p. 546–548, 1998.

SHAM, J. S.; CLEEMANN, L.; MORAD, M. Gating of the cardiac Ca<sup>2+</sup> release channel: the role of Na<sup>+</sup> current and Na(+)-Ca<sup>2+</sup> exchange. **Science (New York, N.Y.)**, v. 255, n. 5046, p. 850–3, 14 fev. 1992.

SILVERTHORN, D. U. **Fisiologia Humana: Uma Abordagem Integrada.** [s.l.] Manole, 2003.

SOLARO, R. J.; RARICK, H. M. Troponin and Tropomyosin: Proteins That Switch on and Tune in the Activity of Cardiac Myofilaments. **Circulation Research**, v. 83, n. 5, p. 471–480, 7 set. 1998.

SOMMER, J. R. .; WAUGH, R. A. The ultrastructure of mammalian cardiac muscle cell with special emphasis on the tubular membrane systems. **Am. J. Pathol.**, v. 82, p. 192–217, 1976.

SPENCE, A. P. **Anatomia Humana Básica.** [s.l.] Manole, 1991.

STENGER, R. J. .; SPIRO, D. . The ultrastructure of of mammalian cardiac muscle. **J. Bioph. Biochem. Citol.**, v. 9, p. 325–51, 1961.

SWANSON, D. L.; VETTER, R. S. Loxocelism. **Clinics. Dermatol.**, v. 24, p. 213–221., 2006.

TERENTYEV, D. et al. Modulation of SR Ca release by luminal Ca and calsequestrin in cardiac myocytes: effects of CASQ2 mutations linked to sudden cardiac death. **Biophysical journal**, v. 95, n. 4, p. 2037–48, ago. 2008.

TORNQUIST, K. et al. Ceramide 1 phosphate enhances calcium entry through voltage operated calcium channels by a protein kinase C dependent mechanism in GH4C1 rat pituitary cells. **Biochem. J.**, v. 380, p. 661–668, 2004.

TREVISAN-SILVA, D. et al. Astacin-like metalloproteases are a gene family of toxins present in the venom of different species of the brown spider (genus *Loxosceles*). **Biochimie**, v. 92, n. 1, p. 21–32, jan. 2010.

VETTER, R. S.; ISBISTER, G. K. Medical aspects of spider bites. **Annual review of entomology**, v. 53, p. 409–29, jan. 2008.

VLADIMIR, B. Y.; GANITKEVICH, Y. A.; ISENBERG, G. Membrane potential modulates inositol 1,4,5 trisphosphate mediated Ca<sup>2+</sup> transient in guinea-pig coronary myocytes. **Journal of Physiology**, v. 470, p. 35–44, 1993.

WALKER, L. A; FULLERTON, D. A; BUTTRICK, P. M. Contractile protein phosphorylation predicts human heart disease phenotypes. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 304, n. 12, p. H1644–50, 15 jun. 2013.

WEHRENS, X. H. T.; LEHNART, S. E.; MARKS, A. R. Intracellular calcium release and cardiac disease. **Annual review of physiology**, v. 67, p. 69–98, jan. 2005.

WHITE, J. et al. Clinical Toxicology—Where Are We Now? **Clinical Toxicology**, v. 41, n. 3, p. 263–276, jan. 2003.

WRAY, S.; BURDYGA, T.; NOBLE, K. Calcium signalling in smooth muscle. **Cell calcium**, v. 38, n. 3-4, p. 397–407, 2005.

ZHANG, L. Complex Formation between Junctin, Triadin, Calsequestrin, and the Ryanodine Receptor. PROTEINS OF THE CARDIAC JUNCTIONAL SARCOPLASMIC RETICULUM MEMBRANE. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 37, p. 23389–23397, 12 set. 1997.

ZHENG, T. et al. Effects of neutral sphingomyelinase on phenylephrine-induced vasoconstriction and Ca(2+) mobilization in rat aortic smooth muscle. **European journal of pharmacology**, v. 391, n. 1-2, p. 127–35, 10 mar. 2000.