

**CEZAR CAPRIGLIONI CARVALHO JUNIOR**

**EFEITOS DA TOXINA RECOMBINANTE *LiRecDT* – COMPONENTE DO  
VENENO DA ARANHA MARROM – *Loxosceles intermedia* Mello Leitão, 1934  
(Araneae, Sicariidae) – SOBRE O METABOLISMO OXIDATIVO DE  
MITOCÔNDRIAS ISOLADAS DO CÓRTEX DE RIM DE RATO**

Monografia apresentada como requisito parcial à conclusão da modalidade Bacharelado do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná – Setor de Ciências Biológicas – Departamento de Fisiologia.

Orientador: Prof. Dr. Oldemir Carlos Mangili

**CURITIBA**

**2005**



PARECER DA COMISSÃO DE AVALIAÇÃO  
DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DA DISCIPLINA  
DE ESTÁGIO CURRICULAR

Aos 22 dias do mês de DEZ de 2005, a Comissão de Avaliação da Monografia de Estágio Curricular do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, composta por PROFA. DRA. MARIA BENIGNA MARTINELLI DE OLIVEIRA, PROF. DR. ANA LUCIA TARARATHUCH e PROF. DR. OCEMIR CARLOS MANGILI, reuniu-se para proceder a avaliação da Monografia de autoria do acadêmico CEZAR CASRIGLIONI CARVALHO JUNIOR.

A Comissão julgou o trabalho e atribuiu a nota 10 (dez).

Prof. (a) Orientador(a)

Membro da Comissão  
Maria Benigna M. de Oliveira

Membro da Comissão  
Nome por extenso e assinatura  
ANA LUCIA TARARATHUCH

Curitiba, 22 de dezembro de 2005.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Oldemir Carlos Mangili, pela orientação, incentivo e por ter acreditado em mim durante esta caminhada.

A Prof.<sup>a</sup> Dra. Maria Benigna Martinelle de Oliveira, pela atenção, compreensão, esclarecimentos de dúvidas e por ter me recebido tão bem no Laboratório de Oxidações Biológicas.

A Prof.<sup>a</sup> Dr. Maria Eliane Merlin Rocha, pelo incentivo e motivação durante a realização deste projeto.

Ao Prof. Dr. Silvio Sanches Veiga pela gentil cessão da toxina recombinante *LiRecDT*, sem a qual este projeto não poderia ser realizado.

Aos meus pais e irmãos pelo apoio sempre presente.

A Prof.<sup>a</sup> Dra. Silvia Maria Suter Correia Cadena pelo auxílio que me deu durante a fase experimental desta monografia.

A colega Tatiana Herrerias pela amizade e por me ensinar o procedimento de isolamento mitocondrial, assim como, por ter me assistido nos experimentos.

A colega Amanda pela amizade e apoio constante durante os experimentos.

A todos os outros colegas do Laboratório de Oxidações Biológicas pelo carinho e pelos conselhos.

A colega Camila Coelho pelo auxílio durante a elaboração da parte escrita da monografia.

Ao Prof. Juarez Gabardo e ao colega Nicolás Zendonadi dos Santos pela realização das análises estatísticas.

Ao Prof. Dr. Rosalvo Tadeu H. Fogaça pela gentileza da cessão do ATP utilizado nestes experimentos.

A todas as pessoas que contribuíram para a realização deste trabalho, mesmo que seus nomes não estejam aqui presentes.

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	viii
RESUMO.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. JUSTIFICATIVA.....	11
3. OBJETIVOS GERAIS.....	12
3.1. Objetivos específicos.....	12
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	13
4.1 Local dos experimentos.....	13
4.2 Materiais para o isolamento de mitocôndrias.....	13
4.3 Animais.....	14
4.4 Toxina recombinante ( <i>LiRecDT</i> ).....	14
4.5 Isolamento de mitocôndrias de rim de rato.....	14
4.6 Composição do meio de reação para avaliação do controle respiratório mitocondrial.....	16
4.7 Preparo do meio de incubação mitocondrial para análise polarográfica do consumo de oxigênio.....	16
4.8 Abordagem experimental dos ensaios <i>in vitro</i> .....	16
4.9 Análises polarográficas do consumo de oxigênio na preparação de mitocôndrias isoladas.....	16
4.10 Preparo da suspensão de mitocôndrias rompidas para determinação das atividades enzimáticas mitocondriais.....	18
4.11 Determinação da atividade ATPásica em mitocôndrias intactas.....	19
4.11.1 Método.....	19
4.11.2 Procedimento Experimental.....	19
4.12 NADH oxidase (NADH: oxigênio óxido-redutase).....	19

4.13 Succinato oxidase (Succinato: oxigênio óxido-redutase).....	20
4.14 Tratamento estatístico dos resultados.....	20
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
6. CONCLUSÃO.....	33
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela I:</b> Efeito da toxina recombinante <i>LiRecDT</i> sobre a velocidade de consumo de oxigênio no estado III e razão ADP/O em mitocôndrias de córtex renal de rato, em diferentes tempos de incubação.....	24
<b>Tabela II:</b> Efeito da toxina recombinante <i>LiRecDT</i> sobre a velocidade de consumo de oxigênio no estado IV e razão ADP/O em mitocôndrias de córtex renal de rato, em diferentes tempos de incubação.....	24
<b>Tabela III:</b> Efeitos de diferentes concentrações da toxina recombinante <i>LiRecDT</i> sobre a velocidade de consumo de oxigênio no estado III e razão ADP/O em mitocôndrias de córtex renal de rato.....	26
<b>Tabela IV:</b> Efeitos de diferentes concentrações da toxina recombinante <i>LiRecDT</i> sobre a velocidade de consumo de oxigênio no estado IV e razão ADP/O em mitocôndrias de córtex renal de rato.....	27
<b>Tabela V:</b> Efeito da toxina recombinante <i>LiRecDT</i> sobre a atividade da enzima NADH oxidase da cadeia respiratória mitocondrial.....	29
<b>Tabela VI:</b> Efeito da toxina recombinante <i>LiRecDT</i> sobre a atividade da enzima Succinato oxidase da cadeia respiratória mitocondrial.....	30
<b>Tabela VII:</b> Efeito da toxina recombinante <i>LiRecDT</i> sobre a atividade da enzima F <sub>1</sub> F <sub>o</sub> -ATPase.....	31

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Aranha Marrom – <i>Loxosceles intermedia</i> .....	1
<b>Figura 2.</b> <i>Loxosceles intermedia</i> em ambiente intradomiciliar.....	2
<b>Figura 3.</b> <i>Loxosceles intermedia</i> em ambiente natural.....	2
<b>Figura 4.</b> Perfil sazonal característico dos acidentes com <i>Loxosceles sp.</i> , Curitiba/Pr – 1992.....	4
<b>Figura 5.</b> Série histórica dos acidentes com <i>Loxosceles sp.</i> Curitiba/Pr – 1990/2004.....	4
<b>Figura 6.</b> Loxoscelismo cutâneo - lesão dermonecrotica em lactente.....	6
<b>Figura 7.</b> Material de procedimento cirúrgico para a retirada dos rins de rato.....	13
<b>Figura 8.</b> Tecido cortical renal de rato preparado para experimentação.....	15
<b>Figura 9.</b> Câmara com meio de incubação termostaticado a 28°C – 1.3 mL.....	17
<b>Figura 10.</b> Oxígrafo Gilson - determinação polarográfica do consumo de oxigênio.....	18
<b>Figura 11.</b> Registro do consumo de oxigênio por mitocôndrias isoladas de rim de rato – experimento representativo.....	23
<b>Figura 12.</b> Registro do consumo de oxigênio por mitocôndrias isoladas de rim de rato, incubadas por 6 minutos com a toxina <i>LiRecDT</i> – experimento representativo.....	23
<b>Figura 13.</b> Esquema representativo dos complexos enzimáticos da cadeia respiratória mitocondrial.....	28

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

*LiRecDT* – Toxina Recombinante Dermonecrótica da aranha *Loxosceles intermedia*

ADP – adenosina 5' difosfato

ADP/O – quociente entre nmol de ADP e nanoátomos de oxigênio consumidos durante o estado III

ATP – adenosina 5' trifosfato

ATPase – adenosinatrifosfatase

BSA – albumina de soro bovino

RC – controle respiratório

EDTA – ácido etileno diamino tetracético

FCCP – carbonil cianeto de p-trifluormetoxifenilhidrazona

HEPES – N-(2hidroxietil) piperazina N'(ácido 2-etano sulfônico)

NAD<sup>+</sup> - nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma oxidada)

NADH - nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)

Pi – fosfato inorgânico

TCA – ácido tricloroacético

Tris – tris (hidrometil) amino metano

UQ - ubiquinona

X - média

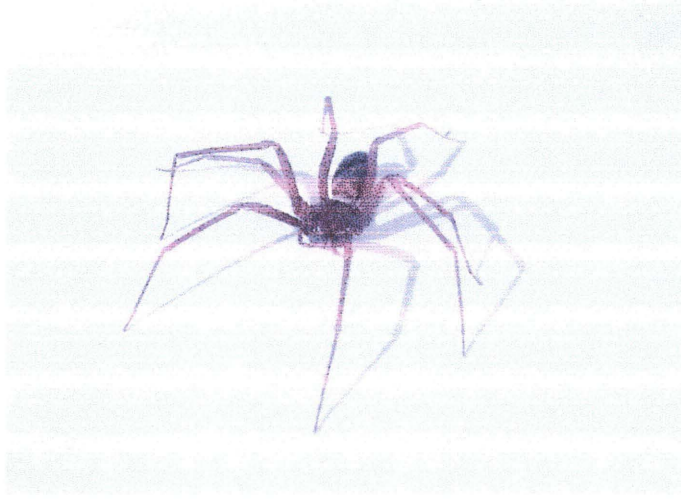
## RESUMO

No sul do Brasil, o *Loxoscelismo* tem mostrado ser importante particularmente no Estado do Paraná. Os mecanismos que respondem pelo efeito dermonecrótico do veneno da aranha marrom são ainda inconclusivos devido a sua grande complexidade química e as inúmeras ações tóxicas dos seus componentes. O veneno da aranha marrom é uma mistura homogênea de toxinas protéicas com diferentes massas moleculares. Algumas destas têm sido identificadas e bioquimicamente bem caracterizadas, incluindo a fosfatase alcalina, fosfohidrolase ribonucleotídeo, hialuronidase, serinoproteases, metaloproteases e esfingomielinase-D. O objetivo deste trabalho foi investigar o potencial de toxicidade da proteína recombinante *LiRecDT*, obtida por clonagem molecular a partir da glândula de veneno da aranha marrom, sobre os parâmetros do metabolismo oxidativo mitocondrial do córtex renal de rato. Mitocôndrias deste tecido foram isoladas seguindo o método de VOSS *et al.* (1987), com algumas modificações. Para análises polarográficas do consumo de oxigênio na preparação de mitocôndrias isoladas, os experimentos foram realizados em volume final de 1.3 ml, sob agitação constante em câmara termostatizada a 28°C. Foi determinada a atividade ATPásica em mitocôndrias intactas, assim como investigadas as atividades enzimáticas mitocondriais, a saber, NADH oxidase e Succinato oxidase. Os parâmetros avaliados foram: velocidade respiratória na presença de ADP (estado III), velocidade respiratória após o consumo de ADP (estado IV), a razão ADP/O e o Coeficiente de Controle Respiratório (RC). Com a finalidade de padronizar o tempo de incubação da preparação mitocondrial com a *LiRecDT*, foi desenvolvido um estudo de cinética de consumo de oxigênio sob diferentes tempos de incubação, sendo escolhido o tempo de 6 minutos. Os experimentos que avaliaram o efeito de diferentes concentrações da toxina sobre a velocidade respiratória mitocondrial, mostraram efeito inibidor do estado III para as três concentrações utilizadas. Esta resposta sugere várias possibilidades de mecanismos de ação desta toxina, como a inibição dos complexos enzimáticos da cadeia respiratória, inibição das desidrogenases do substrato ou ainda inibição da atividade do translocador de nucleotídeos da adenina. A atividade da enzima Succinato oxidase não sofreu inibição significativa, já para a NADH oxidase observou-se discreta inibição, indicando que a *LiRecDT* possa atuar sobre o complexo I da cadeia respiratória mitocondrial. Embora os experimentos de mensuração da atividade da enzima ATPase não tenham mostrado diferenças estatisticamente significativas, os resultados obtidos na presença da toxina *LiRecDT* mostraram uma tendência de estímulo da atividade hidrolítica da enzima. Esse efeito poderia interferir na produção de ATP, ocasionando um aumento da osmolaridade celular, dependente da retenção do sódio, levando a formação de edema celular. Esta situação pode acarretar prejuízos para os mecanismos fisiológicos que respondem pelo transporte de eletrólitos pelo néfron e contribuir para a instalação da insuficiência renal, como já demonstrado ocorrer em humanos e em animais de experimentação.

**Palavras-chave:** *Loxosceles intermedia*, *LiRecDT*, Metabolismo Energético Mitocondrial.

## 1. INTRODUÇÃO

A aranha marrom (**Figura 1**), pertence ao filo *Arthropoda*, subfilo *Chelicerata*, ordem *Araneae*, subordem *Araneomorpha*, família *Sicariidae*, gênero *Loxosceles* (PLATNICK, 2004).



**Figura 1:** Aranha Marrom – *Loxosceles intermedia*.

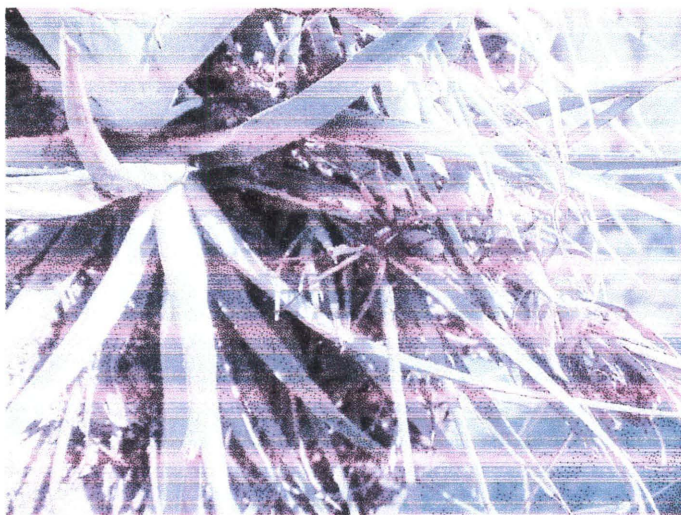
Esses aracnídeos possuem tamanho corpóreo entre 8mm e 15 mm e apêndices locomotores entre 8mm e 30 mm. Segundo FUTRELL (1992), o cefalotórax dessas aranhas exibe características que lembram o formato de um violino, e por isso são também chamadas de aranhas violino. O aparelho visual é composto de seis olhos, arranjados aos pares e dispostos em três díades, uma anterior e duas em posição lateral. Tal organização é uma das importantes características morfológicas utilizadas para a identificação deste animal (VETTER & VISSCHER, 1998).

Aranhas *Loxosceles* sp. possuem hábitos noturnos e não são agressivas. No ambiente natural, vivem sob rochas, dentro de fendas de árvores, por entre entulhos, restos de materiais de construção armazenados e outros lugares secos e de pouca manipulação que podem servir como abrigo (**Figuras 2 e 3**) (GERTSCH, 1967; GERTSCH & ENNIK, 1983; GALIANO, 1967). Essas aranhas mostram ser resistentes a temperaturas que variam entre 8°C e 43°C, podendo sobreviver por vários dias ou meses sem comida e

água (FUTRELL, 1992). Suas teias são produzidas de forma irregular, com aspecto de algodão esfiapado (FUTRELL, 1992).



**Figura 2:** *Loxosceles intermedia* em ambiente intradomiciliar.



**Figura 3:** *Loxosceles intermedia* em ambiente natural.

As glândulas de veneno de *L. intermedia* são compostas de duas camadas de fibras musculares estriadas, uma externa e a outra interna em contato com uma estrutura subjacente que separa as células musculares das células epiteliais da glândula de veneno, a qual, internamente encontra-se no

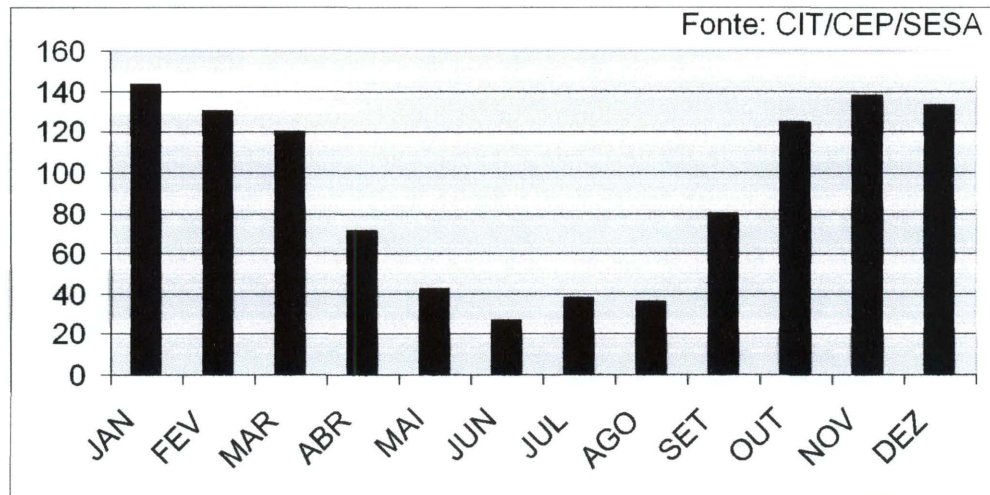
epitélio secretor, um epitélio glandular simples. As células epiteliais são arranjadas lado a lado e emitem projeções para o lúmen das glândulas, as quais são ricas em vesículas secretoras contendo o veneno. A lâmina basal que separa as células epiteliais secretoras das glândulas das células musculares contém glicoproteínas, resíduos de sulfato glicosaminoglicana, laminina e entactina (DA SILVA, 2004).

Esses aracnídeos são de grande relevância médica em vários lugares do mundo, principalmente no continente americano onde habitam várias espécies, entre elas: *L. amazonica*, *L. hirsuta*, *L. reclusa*, *L. gaucho*, *L. laeta*, *L. similis* e *L. intermedia* (FUTRELL, 1992).

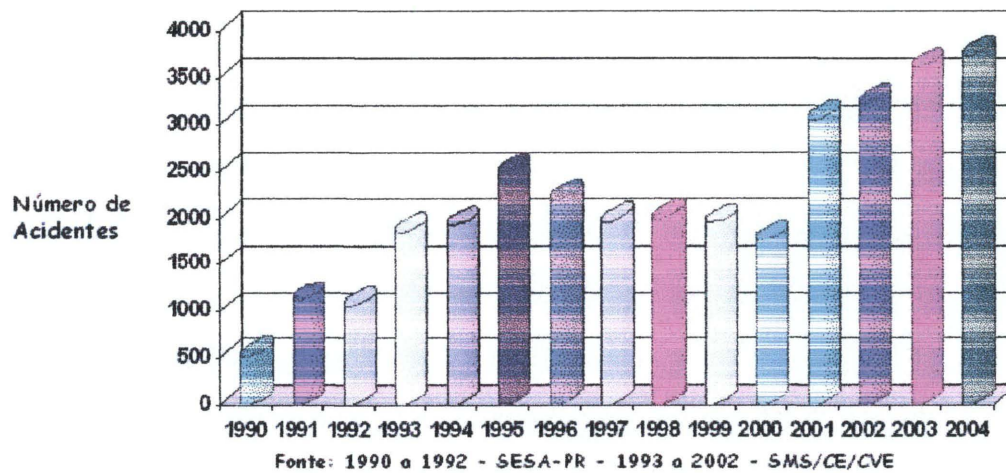
Loxoscelismo é o termo utilizado para descrever, além do contexto epidemiológico dos acidentes, sintomas e sinais clínicos decorrentes das picadas dessa aranha (FUTRELL, 1992; VEIGA *et al.*, 2001; LUCIANO *et al.*, 2004).

No sul do Brasil, o Loxoscelismo tem mostrado ser importante particularmente no Estado do Paraná. Com efeito, nos últimos quinze anos, acidentes com a aranha marrom na cidade de Curitiba e Região Metropolitana, têm alcançado níveis bastante significativos, com recorrência epidemiológica a cada ano. Entre 1993 e 2001, a incidência de picadas de aranha marrom era de 1,4 casos por 1000 habitantes sendo que 23% das picadas ocorreram em coxa, 16,7% no tronco, 14% nos braços e 13% na perna. Quanto ao estadiamento, a maioria dos casos era classificada como moderado (leves) e somente 1% evoluiu para a forma grave (SECRETARIA DE SAUDE DE CURITIBA, PR, 2002; DA SILVA, 2004). Tais acidentes obedecem a perfil sazonal característico, sendo mais freqüentes nos meses quentes do ano (**Figura 4**) (VETTORELLO, 2002).

Dados epidemiológicos oriundos dos órgãos oficiais vinculados a Saúde Pública do Estado do Paraná e do Município de Curitiba, mostram que a espécie predominante tem sido a *L. intermedia* e que o número de acidentes com esse aracnídeo tem aumentado significativamente nos últimos anos. Em 1992, cerca de 1100 notificações foram registradas e no ano de 2004, os acidentes loxoscélicos abrangeram mais de 3700 casos (SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE, Curitiba, dados não publicados). (**Figura 5**)



**Figura 4:** Perfil sazonal característico dos acidentes com *Loxosceles sp.*, Curitiba/Pr – 1992.



**Figura 5:** Série histórica dos acidentes com *Loxosceles sp.*, Curitiba/Pr - 1990/2004.

Sua casuística, “*per se*”, define o fenômeno como de importância clínica considerável e tem mobilizado recursos institucionais do Estado e Município para o treinamento de profissionais das áreas médicas e para-médicas, visando aprimorar o diagnóstico e tratamento dos acidentes, bem como para viabilizar a produção do soro Antiloxoscélico. Campanhas de parcerias interinstitucionais, de conteúdo educativo dirigido à população, têm sido utilizadas como mecanismo de prevenção visando diminuir a proliferação deste aracnídeo e minimizar seu potencial de risco.

A grande maioria desses acidentes tem ocorrido no ambiente intradomiciliar quando a aranha é pressionada contra o corpo da vítima, seja no ato de vestir, na manipulação de entulhos ou mesmo quando a pessoa deita para dormir e a aranha está presente nas roupas de cama.

As notáveis diferenças de gravidade entre os acidentes loxoscélicos podem ser devidas a espécie da aranha (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1998), sexo (OLIVEIRA et al., 1999), estágio de desenvolvimento da aranha (ANDRADE et al., 1999) e quantidade de veneno inoculada (SEZERINO et al., 1998), assim como a idade, resistência imunológica e características genéticas do paciente (GUILHERME et al., 2001).

No local da picada (Loxoscelismo cutâneo), ocorre hemorragia subcutânea e, dependendo da quantidade de veneno inoculada, instala-se processo inflamatório intenso associado a eritema, edema e necrose (**Figura 6**), além da infiltração maciça de polimorfonucleares (FUTRELL, 1992; DA SILVA et al., 2004). Manifestações sistêmicas podem também ocorrer e são caracterizadas por hemólise, coagulação intravascular disseminada, alterações na agregação plaquetária, trombocitopenia e insuficiência renal (FUTRELL, 1992; COUTINHO, 1996; VEIGA et al., 2001a; ZANETI et al., 2002).

Os mecanismos que respondem pelo efeito dermonecrótico do veneno da aranha marrom são ainda inconclusivos devido a sua grande complexidade química e as inúmeras ações tóxicas dos seus componentes.

Contudo, os resultados mais recentes advindos da experimentação *in vivo* e *in vitro* fortalecem a hipótese de que o processo de degradação protéica parece ser desencadeado por complexos enzimáticos, incluindo as esfingomielinases, hialuronidases e metaloproteases, a partir de suas interações com componentes moleculares da membrana celular e da matriz

extracelular, como condroitin sulfato proteoglicanas, heparan sulfato proteoglicanas, entactina, fibronectina e fibrinogênio (FUTRELL, 1992; DA SILVA *et al.*, 2004).

Outros achados evidenciaram o papel da esfingomielinase do veneno sobre a esfingomielina das hemácias, ação essa que é capaz de clivar as glicoforinas e então induzir a ativação do Sistema Complemento, um importante componente do complexo imunológico de defesa do organismo. A ativação desse sistema parece promover então a lise das hemácias e responder pelas severas conseqüências deste efeito (TAMBOURGI *et al.*, 2000).



**Figura 6:** Loxoscelismo cutâneo - lesão dermonecrótica em lactente.

Uma terapia definitiva para o tratamento do Loxoscelismo ainda não foi estabelecida (WHITE *et al.*, 1995; GUILHERME *et al.*, 2001). No Brasil, a soroterapia com soro antiaracnídico, produzido pelo Instituto Butantan em São Paulo ou o antiloxoscélico, produzido pela Secretaria de Estado da Saúde do Paraná e a administração de corticóides são as abordagens terapêuticas mais empregadas (GUILHERME *et al.*, 2001).

Esses soros antiveneno são produzidos a partir da imunização de cavalos com uma mistura de venenos de aracnídeos (*Tityus serrulatus* e *Tityus bahiensis*, *Phoneutria nigriventer* e *Loxosceles gaucho*) (FURLANETTO et al., 1962a,b; BRAZ et al., 1999), ou no caso do antiloxoscélico, com apenas o veneno extraído da aranha marrom.

Os soros antiaracnídico e antiloxoscélico são ambos eficientes. Entretanto, o soro antiloxoscélico reage mais fortemente, provavelmente porque somente um tipo de veneno foi utilizado para produzir anticorpos (BRAZ et al., 1999).

O soro antiloxoscélico tem uma eficiência mais alta na neutralização da atividade letal com potência de 3,2, enquanto que o soro antiaracnídico polivalente tem 0,8. O soro antiloxoscélico monovalente é também mais eficiente na neutralização da atividade dermonecrótica, a qual representa o efeito tóxico mais relevante do veneno de *L. intermedia*. Desta maneira, 1ml de soro antiloxoscélico neutraliza 15 DMN (dose mínima necrosante), enquanto 1ml de soro polivalente neutraliza menos do que 6 DMN (Braz et al., 1999).

Em mais de 90% dos casos de suspeita de picada por aranhas, a aranha não está disponível para que o acidente seja corretamente identificado. Assim, o diagnóstico é feito, via de regra, com base nos relatos dos pacientes, o que dificulta o tratamento (KRYWKO et al., 2002).

Visando aprimoramento do diagnóstico e uma melhor utilização racional dos soros, estudos presentemente estão sendo conduzidos no sentido de produzir um método imuno-enzimático capaz de quantificar e qualificar o veneno circulante nas vítimas do Loxoscelismo (CHÁVEZ - OLÓRTEGUI et al., 1998; GUBERT, I.C., 2005)

O veneno da aranha marrom é uma mistura homogênea de toxinas protéicas e moléculas de baixo peso molecular (5kDa – 40kDa) (MOTA & BÁRBARO, 1995; DA SILVA et al., 2004; DA SILVEIRA et al., 2002). Algumas toxinas presentes no veneno da aranha marrom têm sido identificadas e bioquimicamente bem caracterizadas, incluindo a fosfatase alcalina, fosfohidrolase ribonucleotídeo, hialuronidase, serinoproteases, metaloproteases e esfingomielinase-D (FEITOSA et al., 1998; FUTRELL, 1992; DA SILVA et al., 2004; VEIGA et al., 2001a).

As toxinas do veneno de *L. gaucho*, *L. laeta* e *L. intermedia* podem ser separadas em três frações maiores (A, B e C) e as atividades dermonecrótica e letal parecem ser encontradas somente na fração A (BARBARO et al., 1996a; DA SILVA et al., 2004). A proteína da fração A tem peso molecular de aproximadamente 35kDa em *L. gaucho* e *L. intermedia* e 32kDa em *L. laeta*. A alta porcentagem de seqüências idênticas N-terminais da toxina dermonecrótica de *L. gaucho*, *L. intermedia* e *L. laeta* sugere fortemente que estas proteínas são similares (BARBARO et al., 1996b; DA SILVA et al., 2004).

As proteínas com massa molecular na faixa de 32 – 35 kDa com atividade esfingomielinase são consideradas como os componentes mais tóxicos e imunogênicos do veneno de *Loxosceles* (ALVARENGA, 2003). Anticorpos monoclonais ou policlonais contra a fração dermonecrótica (DNF), mostraram ser eficientes na neutralização da atividade dermonecrótica do veneno de *Loxosceles* (REES et al., 1981; GUILHERME et al., 2001; ALVARENGA et al., 2003).

Vários estudos utilizando animais de experimentação, bem como diferentes ensaios *in vitro*, investigando os efeitos tóxicos do veneno da aranha marrom têm sido conduzidos por diferentes grupos de pesquisa.

Experimentos com injeção do veneno bruto da aranha marrom em ratos mostraram, em períodos de 12, 24 e 48 horas pós-inoculação, proteinúria maciça, glicosúria e colabamento obstrutivo do túbulo renal, induzido por evidente edema intracelular (COUTINHO, 1996).

Monteiro et al. (2002), isolaram e identificaram diferentes bactérias das quelíceras e do veneno da aranha *L. intermedia*, incluindo a *Clostridium perfringens*, tendo sido possível comparar, experimentalmente em coelhos, a lesão dermonecrótica produzida pela inoculação do veneno, isoladamente, e pela combinação do veneno com esta bactéria anaeróbica. Os resultados mostraram que essa combinação resulta em uma notável potencialização do tamanho da lesão, a qual mostrou resposta de regressão com o uso de penicilina G. Esta constatação indica que a gravidade de algumas lesões pode ser resultado não só da ação das enzimas proteolíticas presentes na composição do veneno, mas também da ação de toxinas liberadas por bactérias oportunistas. Esses achados experimentais apontam para a

possibilidade de inclusão da antibioticoterapia no protocolo de tratamento de alguns casos de Loxoscelismo.

Metaloproteinases com atividade gelatinolítica, fibronectinolítica e fibrinogenolítica (FEITOSA *et al.*, 1998; BRAZ *et al.*, 1999), e peptídeos neurotóxicos foram caracterizados como componentes individuais em *L. intermedia* e podem ser responsáveis pelos efeitos mais letais e potentes do veneno (BARBARO *et al.*, 1994; BRAZ *et al.*, 1999).

Estudos recentes têm mostrado que as proteínas do veneno da aranha marrom possuem atividades enzimáticas diferenciadas, agindo sobre vários substratos orgânicos. Deste modo, podem exercer papel importante não só na evolução da lesão dermonecrotica, como também nos distúrbios hemodinâmicos e nas injúrias morfológica e funcional de vários órgãos alvo, como mostrado ocorrer com o parênquima renal, em diferentes modelos de experimentação animal (COUTINHO, 1996; CHAIM *et al.*, 2005, in press; LUCIANO, 2004; VEIGA *et al.*, 2001a).

LUCIANO *et al.* (2004), mostraram que em camundongos tratados com veneno de *L. intermedia*, ocorre um complexo modelo de nefrotoxicidade. Nesses experimentos foram observados acúmulo de material proteináceo na cápsula de Bowman, material eosinofílico na luz de túbulos corticais e medulares, edema intersticial com presença de hemáceas no espaço extravascular e degeneração vacuolar nos túbulos proximal e distal. Os mesmos autores relataram alterações ultraestruturais, destacando-se desorganização estrutural e vacuolização de mitocôndrias, aumento de retículo endoplasmático liso e presença de autofagossomos, indicando processo agudo de sofrimento necrótico celular, lesões importantes em glomérulos, com ruptura da membrana basal subepitelial, sinais de citotoxicidade nos podócitos e indícios de desorganização das janelas capilares.

Por outro lado, estudos de Biologia Molecular têm permitido obter diferentes toxinas recombinantes a partir da técnica de clonagem molecular, utilizando material genético das glândulas de veneno da aranha marrom, inserido no genoma de microorganismos, como a bactéria *E. coli*. Com essa técnica, Kalapothakis *et al.* (2002), obtiveram a expressão de uma proteína recombinante (LiD1) que apresentou importantes propriedades imunológicas. Esta mesma proteína, quando inoculada em coelhos foi capaz de gerar

anticorpos reativos contra o veneno bruto da aranha marrom e mostrar eficiência potencial como vacina (ARAUJO *et al.*, 2003).

Chaim *et al.* (2005, in press), mostraram efeitos dermonecrótico e nefrotóxico da proteína recombinante *LiRecDT*, recentemente clonada e expressa, a partir da utilização das glândulas de veneno da aranha *L. intermedia*. A inoculação experimental desta toxina provocou alterações histopatológicas na pele de coelho, mudanças na organização estrutural de rins de camundongos, bem como em cultura de células tubulares MDCK, estudadas *in vitro*. Tais alterações evidenciaram marcante citotoxicidade, incluindo edema de células tubulares, colapso focal da membrana basal glomerular, presença de eritrócitos na cápsula de Bowman, hialinização difusa com material proteináceo presente na luz dos túbulos proximal e distal e degeneração vacuolar difusa das células epiteliais tubulares, em ambos, túbulo proximal e distal.

## 2. JUSTIFICATIVA

Em decorrência desses diferentes achados experimentais que mostram, entre outros, o efeito nefrotóxico do veneno da aranha *L. intermedia*, manifesto sobre a organização ultraestrutural de organelas citoplasmáticas, em especial sobre mitocôndrias, o presente trabalho foi idealizado. Sua proposta visa investigar o potencial de toxicidade desse veneno sobre o metabolismo oxidativo mitocondrial, com o intuito de melhor entender as injúrias funcionais do tecido renal, detectadas em estudos anteriores.

### 3. OBJETIVO GERAL

Investigar o potencial de toxicidade da proteína recombinante *LiRecDT*, obtida por clonagem molecular a partir da glândula de veneno da aranha marrom (*Loxosceles intermedia*), sobre os parâmetros do metabolismo oxidativo mitocondrial do tecido cortical de rim de rato.

#### 3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar os efeitos da toxina dermonecrótica recombinante *LiRecDT* sobre a velocidade de respiração de mitocôndrias isoladas do córtex de rim de rato.
- Avaliar os efeitos da toxina dermonecrótica recombinante *LiRecDT* sobre a atividade da enzima NADH oxidase.
- Avaliar os efeitos da toxina dermonecrótica recombinante *LiRecDT* sobre a atividade da enzima Succinato oxidase.
- Investigar os efeitos da toxina dermonecrótica recombinante *LiRecDT* sobre a atividade da enzima ATPase.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 LOCAL DOS EXPERIMENTOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Oxidações, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular e no Laboratório de Fisiologia Renal do Departamento de Fisiologia do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

### 4.2 MATERIAIS PARA ISOLAMENTO DE MITOCÔNDRIAS

Para proceder ao isolamento das mitocôndrias, utilizadas nesses estudos, foram necessários os seguintes materiais: duas tesouras (uma de ponta reta e outra de ponta curva), seis tubos de centrífuga, duas pinças, dois pistilos (um frouxo e outro justo), um tubo de Van-Potter, um pincel macio, um tubo cone, um tubo de ensaio pequeno, uma placa de Petri e quatro beckers. **(Figura 7)**

Todo material utilizado nestes ensaios foi lavado com água Mili-Q e deixado secar de um dia para o outro.



**Figura 7:** Material de procedimento cirúrgico para a retirada dos rins de rato.

### 4.3 ANIMAIS

#### BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Para o isolamento das mitocôndrias, foram utilizados ratos albinos, machos, da linhagem Wistar, pesando em torno de 250g, fornecidos pelo Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. Esses animais foram alimentados com ração Nuvilab® e antes dos experimentos foram colocados em jejum por 12 horas com água *ad libitum*. Os animais foram sacrificados por decapitação e, em seguida, o tecido do córtex renal externo foi removido e imediatamente transferido para o meio de isolamento. A preparação foi mantida em banho de gelo durante o processamento experimental.

Todos os protocolos experimentais com utilização de animais, previstos neste trabalho, foram desenvolvidos de acordo com as normas preditas pelos “Princípios de Cuidado com Animais de Laboratório” – “Principles of Laboratory Animal Care” – (NIH PUBLICATION nº 85-23, revised 1985) e as normativas estabelecidas pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Setor de Ciências Biológicas da UFPR e pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

### 4.4 TOXINA RECOMBINANTE (*LiRecDT*)

A toxina recombinante (*LiRecDT*) utilizada no presente estudo, foi fornecida pelo Laboratório de Matriz Extracelular do Departamento de Biologia Celular do Setor de Ciências Biológicas da UFPR. Essa toxina foi utilizada diretamente sobre a solução de mitocôndrias isoladas em 3 diferentes concentrações, a saber: 2.31 µg/mL, 3.85 µg/mL, 7.69 µg/mL..

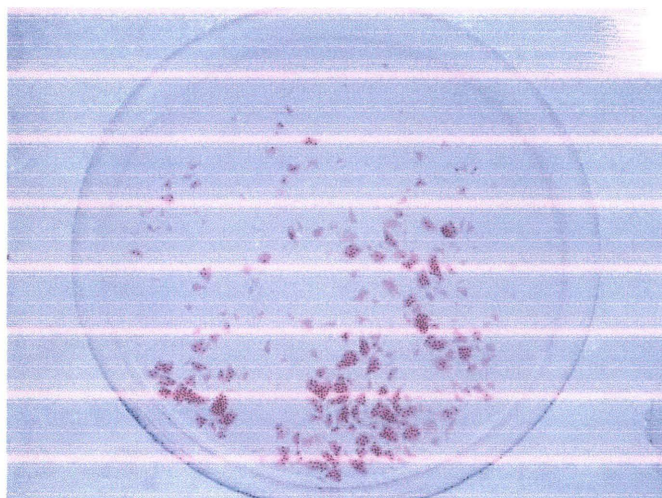
### 4.5 ISOLAMENTO DE MITOCÔNDRIAS DE RIM DE RATO

Mitocôndrias do córtex renal de rato foram isoladas seguindo o método de VOSS *et al.* (1987), com algumas modificações. O meio de isolamento ou de extração teve a seguinte composição: manitol 210 mM, sacarose 70 mM, Tris-HCl 10 mM, EDTA 0,5 mM, BSA 0,05g%, H<sub>2</sub>O mili Q, q.s.p. volume final de 300 mL. O pH desta solução foi ajustado para valor de 7,4.

Após o procedimento cirúrgico, ambos os rins foram manipulados com instrumental apropriado com o objetivo de isolar o parênquima cortical da região medular. Esse tecido, foi removido e colocado imediatamente no meio de isolamento (com cristais de gelo). Em seguida, o material foi picado com tesoura e homogeneizado com homogeneizador de Van-Potter, por 3 vezes com pistilo solto e por 2 vezes com pistilo apertado (**Figura 8**). O material homogenado foi então transferido para dois tubos de centrifuga (o peso foi acertado com o meio de isolamento) e então centrifugado a 2500 rpm por 5 minutos. Na seqüência, o sedimento foi desprezado e o sobrenadante centrifugado a 12500 rpm por 10 minutos. O sedimento contendo as mitocôndrias foi ressuspense e centrifugado a 10000 rpm por 10 minutos. Esse processo foi então repetido por mais uma vez. As mitocôndrias isoladas foram ressuspensas com aproximadamente 2 mL do meio de isolamento.

Concluído esse processo, a dosagem de proteína na solução de mitocôndrias isoladas foi procedida de acordo com o método de LOWRY *et al.* (1951), usando-se soroalbumina bovina como padrão.

Esse procedimento permitiu expressar indiretamente a quantidade de mitocôndrias presente na solução utilizada no ensaio *in vitro*. As leituras foram feitas em 700 nm utilizando-se espectrofotômetro Hitachi modelo U-2001 UV/Vis. Os resultados foram expressos como Média  $\pm$  E.P.M. de três diferentes diluições.



**Figura 8:** Tecido cortical renal picado com tesoura.

#### **4.6 COMPOSIÇÃO DO MEIO DE REAÇÃO PARA AVALIAÇÃO DO CONTROLE RESPIRATÓRIO MITOCONDRIAL**

O meio de reação para mensuração do controle respiratório mitocondrial, teve a seguinte composição: manitol 125 mM, KCl 65 mM, Hepes 10 mM, EGTA 0,1 mM, BSA 0,05 g% e H<sub>2</sub>O mili Q, q.s.p. volume final de 100 mL. O pH desta solução foi ajustado para valor de 7,2.

#### **4.7 PREPARO DO MEIO DE INCUBAÇÃO MITOCONDRIAL PARA ANÁLISE POLAROGRÁFICA DO CONSUMO DE OXIGÊNIO**

Alíquotas do meio de reação, descrito no item 4.6, foram suplementadas com glutamato de sódio 5 mM ou succinato de sódio 3 mM, Pi 1,6 mM e ADP 0,16 mM. A esta solução foi então adicionada 1mg de mitocôndrias isoladas (expressa em função da concentração de proteína presente no meio de isolamento). O volume final do meio de incubação mitocondrial foi então ajustado para 1,3 mL com o meio de reação.

#### **4.8 ABORDAGEM EXPERIMENTAL DOS ENSAIOS *in vitro***

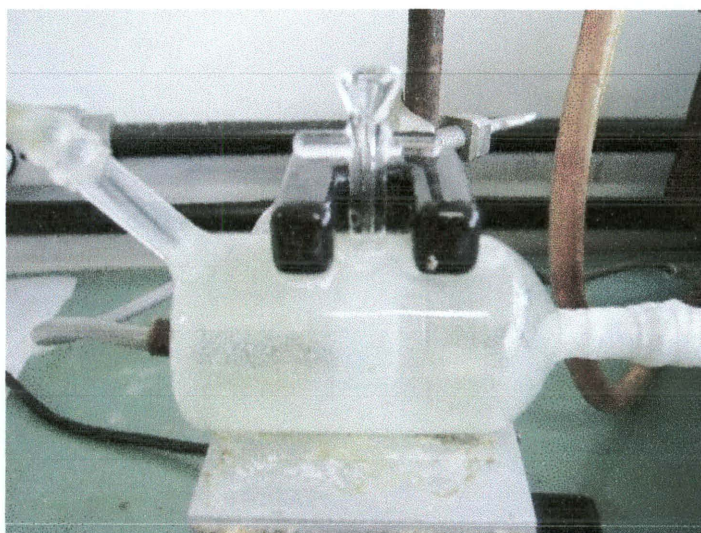
A toxina recombinante (*LiRecDT*), obtida da glândula de veneno da aranha marrom, foi adicionada ao meio em diferentes concentrações (2.31µg/ml, 3.85µg/ml e 7.69µg/ml) e permaneceu incubada por diferentes tempos em presença da proteína mitocondrial.

Inicialmente foi procedida uma cinética de tempo (T<sub>1</sub>=2min, T<sub>2</sub>=4min e T<sub>3</sub>=6min), utilizando uma concentração constante (3.85µg/mL), com a finalidade de padronização do tempo de exposição das mitocôndrias com a toxina em todos os experimentos posteriores.

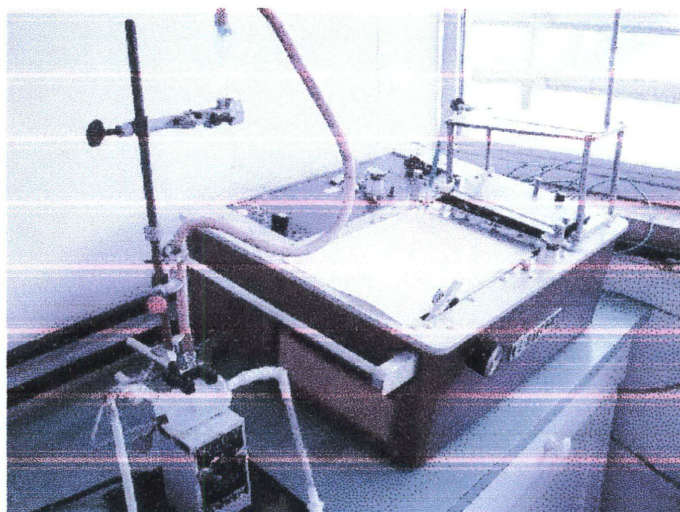
#### **4.9 ANÁLISES POLAROGRÁFICAS DO CONSUMO DE OXIGÊNIO NA PREPARAÇÃO DE MITOCÔNDRIAS ISOLADAS**

Os experimentos foram realizados em volume final de 1,3 mL, sob agitação constante em câmara termostatizada a 28°C (VOSS *et. al.*, 1961)

**(Figura 9).** O consumo de  $O_2$  nas mitocôndrias intactas presentes nas diferentes amostras, foi determinado polarograficamente em oxígrafo Gilson utilizando-se um eletrodo de oxigênio tipo Clark (Yellow Springs Instruments Co.) **(Figura 10).** Os resultados foram expressos em nanomoles de  $O_2$  consumido por mg de proteína mitocondrial por minuto ( $nMoles\ de\ O_2 \cdot mg^{-1} \cdot min^{-1}$ ), considerando-se que a solubilidade do  $O_2$  na água, a temperatura utilizada de  $28^\circ C$  e 1 atm, é de  $250\ mmol.L^{-1}$  (ESTABROOK, 1967). O Coeficiente de Controle Respiratório (CCR), foi obtido da relação entre a velocidade respiratória na presença de ADP (estado III) e a velocidade após o consumo de ADP (estado IV). A razão ADP/O foi então avaliada considerando-se a razão entre a concentração molar de ADP adicionado ao sistema (CHANCE & WILLIAMS, 1955) (ESTABROOK, 1967) e a quantidade de oxigênio consumido no estado III.



**Figura 9:** Câmara com meio de incubação termostatzado a  $28^\circ C$  – 1.3 mL.



**Figura 10:** Oxígrafo Gilson - determinação polarográfica do consumo de oxigênio.

#### **4.10 PREPARO DA SUSPENSÃO DE MITOCÔNDRIAS ROMPIDAS PARA DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADES ENZIMÁTICAS MITOCONDRIAIS**

Mitocôndrias isoladas do córtex renal de rato, conforme descrito anteriormente (item 4.5), foram congeladas em nitrogênio líquido até sua utilização, quando então foram rompidas por choque térmico (congelamento e descongelamento por 3 vezes), sendo mantidas em banho de gelo durante o tempo dos ensaios. Neste processo, foram obtidos fragmentos de membrana, nos quais todos os componentes da cadeia respiratória apresentaram atividade satisfatória.

## 4.11 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ATPásica EM MITOCÔNDRIAS INTACTAS

### 4.11.1 MÉTODO

A atividade da F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATPase (ATP fosfohidrolase) em mitocôndrias intactas foi determinada dosando-se o fosfato inorgânico (Pi) decorrente da hidrólise de ATP, segundo método descrito por PULMANN *et al.* (1960).

### 4.11.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

O ensaio foi realizado a 28°C, em sistema de reação constituído de sacarose 50 mmol.L<sup>-1</sup>, tampão Tris-HCl 12 mmol.L<sup>-1</sup> (pH 7,4), KCl 50 mmol.L<sup>-1</sup> e 3 mg de proteína mitocondrial. O volume final da reação foi de 1 mL. A reação foi iniciada pela adição de 3 mmol.L<sup>-1</sup> de ATP (T<sub>0</sub>) e mantida sob agitação constante, sendo interrompida após 10 minutos pela adição de 100 µL de solução de TCA a 5%. O material foi centrifugado a 10000 . g por 1 minuto, sendo então o fosfato inorgânico do sobrenadante dosado pelo método de SUMNER (1944).

A atividade da ATPase mitocondrial foi então expressa em µmols de Pi liberado . mg de proteína<sup>-1</sup>.

## 4.12 NADH OXIDASE (NADH: OXIGÊNIO ÓXIDO-REDUTASE)

A atividade da NADH oxidase foi determinada polarograficamente segundo SINGER (1974). O sistema de reação mantido a 28°C e em volume final de 1.3 mL, foi constituído de: tampão fosfato 80 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 7,4, EDTA 50 µmol.L<sup>-1</sup>, NADH 0,17 mmol.L<sup>-1</sup> e 1mg de proteína mitocondrial. A preparação foi incubada com a proteína recombinante *LiRecDT* por seis minutos e a reação iniciada pela adição de NADH. A velocidade de consumo de oxigênio foi então registrada pelo oxígrafo, sendo que os resultados foram expressos em nanomol de oxigênio consumido . min<sup>-1</sup> . mg de proteína<sup>-1</sup>.

#### **4.13 SUCCINATO OXIDASE (SUCCINATO: OXIGÊNIO ÓXIDO-REDUTASE)**

A atividade da enzima succinato oxidase foi determinada polarograficamente segundo SINGER (1974). O sistema de reação mantido a 28°C e em volume final de 1.3 mL, tinha a seguinte composição: tampão fosfato 80 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 7,4, EDTA 50 µmol.L<sup>-1</sup>, succinato 5 mmol.L<sup>-1</sup> e 0,5mg de proteína mitocondrial. A preparação foi então incubada com a toxina recombinante por seis minutos e a reação iniciada pela adição de succinato. A velocidade de consumo de oxigênio foi então registrada pelo oxígrafo, sendo que os resultados foram expressos em nanomol de oxigênio consumido . min<sup>-1</sup> . mg de proteína<sup>-1</sup>, considerando-se que a solubilidade do oxigênio em água e a 1 atm de 250 mMoles/L.

#### **4.14 TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS RESULTADOS**

Os resultados foram analisados considerando o delineamento inteiramente ao acaso. Nos casos onde se verificou significância foi realizada a análise de variância com o teste Tukey.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As mitocôndrias são organelas das células eucarióticas que possuem duas membranas, uma externa e outra interna. A membrana externa é facilmente permeável a pequenas moléculas e a íons, já a membrana interna é impermeável a pequenas moléculas, íons, incluindo os prótons ( $H^+$ ). As únicas espécies que atravessam a membrana interna são aquelas para as quais existem proteínas transportadoras específicas. Essa membrana, emite numerosas cristas para o interior da organela, aumentando substancialmente a sua superfície e possui também os componentes da cadeia respiratória e o complexo enzimático responsável pela síntese de ATP. A matriz mitocondrial contém enzimas (relacionadas principalmente com o ciclo de Krebs), ribossomos e o DNA mitocondrial (LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M., 2000).

Inseridos na membrana mitocondrial interna existem inúmeros transportadores de elétrons que formam a cadeia respiratória mitocondrial. Os elétrons são transferidos enzimaticamente através desses transportadores de acordo com um gradiente crescente de potenciais redox culminando com a redução do oxigênio à água (NICHOLLS & FERGUSON, 2003). Conforme os elétrons são transportados, ao mesmo tempo prótons são bombeados para o espaço intermembranas, gerando assim um gradiente de prótons, o qual é responsável pela formação de um potencial de membrana, também chamado de força próton motriz, responsável pela síntese de ATP (NICHOLLS & FERGUSON, 2003).

No metabolismo oxidativo de mitocôndrias, a fosforilação do ADP ocorre logo quando este substrato é adicionado ao sistema de reação; a este fenômeno dá-se o nome de estado III. Por outro lado quando a mitocôndria consome todo ADP, a reação é chamada estado IV. O Coeficiente de Controle Respiratório (RC) pode ser obtido pela razão entre esses dois estados. A razão ADP/O é resultante da razão entre a concentração molar da ADP adicionada ao sistema e a quantidade de oxigênio consumido durante todo estado III. Esses dois parâmetros (RC e ADP/O) avaliados no presente trabalho, podem refletir diretamente se, em uma dada condição experimental, a preparação ainda preserva a capacidade mitocondrial de fosforilação.

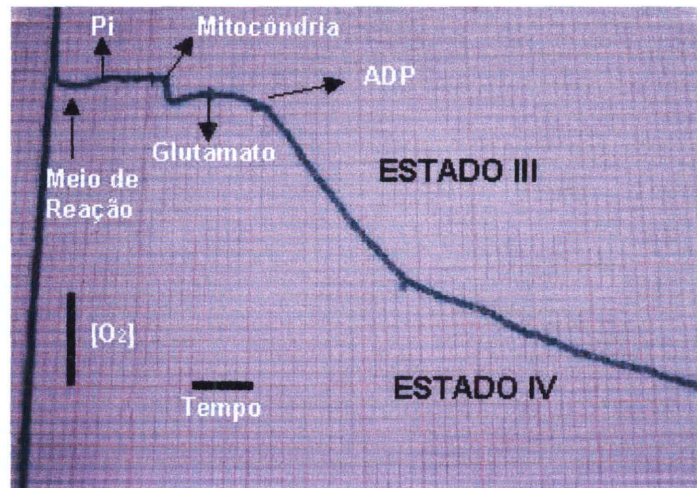
Foi recentemente demonstrado por microscopia eletrônica que a toxina recombinante *LiRecDT*, clonada e expressa a partir da utilização das glândulas de veneno da aranha *L. intermedia* (CHAIM *et al.*, 2005, in press), apresenta efeito tóxico sobre várias organelas em células do epitélio renal, incluindo mitocôndrias (LUCIANO, *et al.*, 2004). Com a finalidade de avaliar tal possibilidade, no presente trabalho utilizamos mitocôndrias isoladas (intactas e rompidas) de rim de rato. Para avaliar os efeitos da toxina sobre o metabolismo oxidativo, foi utilizado glutamato como substrato nas preparações de mitocôndrias intactas. Para todos os resultados experimentais, a quantidade de oxigênio total dissolvido foi igual a 250 $\mu$ mol/L.

No presente estudo os parâmetros avaliados foram: velocidade respiratória na presença de ADP (estado III), velocidade respiratória após o consumo de ADP (estado IV), a razão ADP/O e o Coeficiente de Controle Respiratório (RC).

As figuras 11 e 12 mostram experimentos representativos onde, a partir do traçado do oxígrafo pode-se identificar os estados III e IV da respiração mitocondrial na ausência (**Figura 11**) e presença da toxina (**Figura 12**).

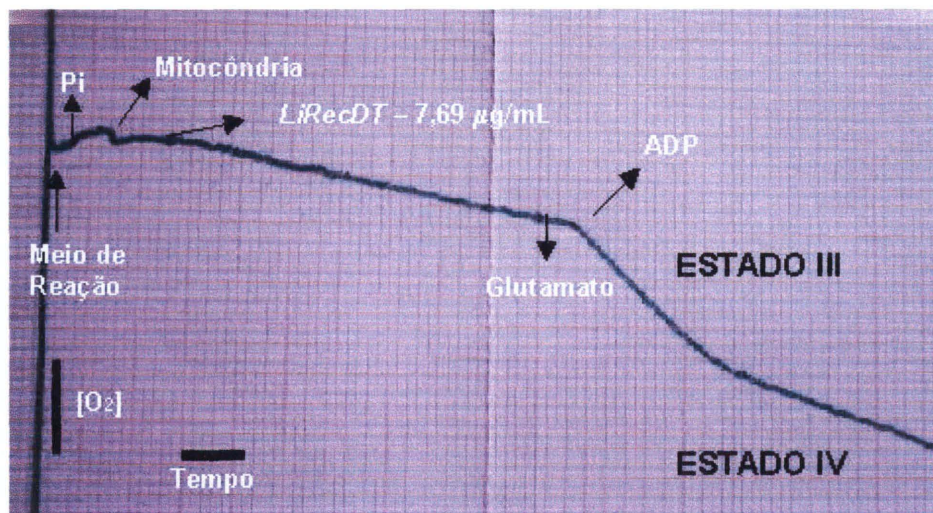
Com a finalidade de padronizar o tempo de incubação da preparação mitocondrial com a toxina recombinante, foi desenvolvido um estudo de cinética em diferentes tempos de incubação. A concentração de mitocôndrias utilizadas nesses experimentos foi de 1 mg/mL e a concentração da toxina foi de 3.85  $\mu$ g/mL.

Os resultados deste experimento estão apresentados nas tabelas I e II, que apresentam, respectivamente, os efeitos sobre os estados III e IV da respiração mitocondrial. O efeito da toxina, dependente do tempo de incubação, verificado na tabela I, mostra 55.44% de inibição do estado III para tempo de incubação de 6 minutos (padronizado em todos os outros experimentos), 39.69% de inibição para o tempo de 4 minutos e 20.52% para o tempo de 2 minutos. As médias das velocidades de respiração no estado III para estes três tempos foram, respectivamente, 11.16, 15.7 e 20.69 $\mu$ moles de O<sub>2</sub>/min/mg de proteína mitocondrial, sendo que 100% de atividade respiratória corresponde a 30.62  $\mu$ moles de O<sub>2</sub>/min/mg de proteína mitocondrial (**Tabela I**).



**Figura 11:** Consumo de oxigênio por mitocôndrias isoladas de rim de rato – experimento representativo.

**SISTEMA:** Manitol  $125 \text{ mmol.L}^{-1}$ , KCl  $65 \text{ mmol.L}^{-1}$ , Hepes  $10 \text{ mmol.L}^{-1}$ , EGTA  $0,1 \text{ mmol.L}^{-1}$ , BSA  $0,05 \text{ g\%}$ , pH 7.2, suplementado com glutamato de sódio  $5 \text{ mmoles.L}^{-1}$ , Pi  $1,54 \text{ mmoles.L}^{-1}$ , ADP  $0,15 \text{ mmoles.L}^{-1}$ , 1mg de proteína mitocondrial em volume final de 1.3 mL.



**Figura 12:** Consumo de oxigênio por mitocôndrias isoladas de rim de rato, incubadas 6 minutos com a toxina *LiRecDT* – experimento representativo.

**SISTEMA:** Manitol  $125 \text{ mmol.L}^{-1}$ , KCl  $65 \text{ mmol.L}^{-1}$ , Hepes  $10 \text{ mmol.L}^{-1}$ , EGTA  $0,1 \text{ mmol.L}^{-1}$ , BSA  $0,05 \text{ g\%}$ , pH 7.2, suplementado com glutamato de sódio  $5 \text{ mmoles.L}^{-1}$ , Pi  $1,54 \text{ mmoles.L}^{-1}$ , ADP  $0,15 \text{ mmoles.L}^{-1}$ , 1mg de proteína mitocondrial e *LiRecDT*  $7,69 \mu\text{g/mL}$  em volume final de 1.3 mL.

**TABELA I:** EFEITO DA TOXINA RECOMBINANTE *LIRECDT* SOBRE A VELOCIDADE DE CONSUMO DE OXIGÊNIO NO ESTADO III E RAZÃO ADP/O EM MITOCÔNDRIAS DE CÓRTEX RENAL DE RATO, EM DIFERENTES TEMPOS DE INCUBAÇÃO.

	Tempo (min)	X RC	X VELOC. ESTADO III	% ATIVIDADE	% INIBIÇÃO	RAZÃO ADP/O
<b>C</b>		2.16	26.03	100	0	2.07
<b>T<sub>1</sub></b>	2	1.6*	20.69*	79.48	20.52	2.05
<b>T<sub>2</sub></b>	4	1.6*	15.7*	60.31	39.69	2.03
<b>T<sub>3</sub></b>	6	1.23*	11.6*	44.56	55.44	2.08

\* Valor médio estatisticamente diferente do controle  $p < 0,01$

**SISTEMA:** Manitol 125 mmol.L<sup>-1</sup>, KCl 65 mmol.L<sup>-1</sup>, Hepes 10 mmol.L<sup>-1</sup>, EGTA 0,1 mmol.L<sup>-1</sup>, BSA 0,05 g%, pH 7.2, suplementado com glutamato de sódio 5 mmoles.L<sup>-1</sup>, Pi 1.54 mmoles.L<sup>-1</sup>, ADP 0.15 mmoles.L<sup>-1</sup>, 1mg de proteína mitocondrial e *LiRecDT* 5µg/mL em volume final de 1.3 mL. RC= Controle Respiratório, C= Controle e T= Tempo.

**TABELA II:** EFEITO DA TOXINA RECOMBINANTE *LIRECDT* SOBRE A VELOCIDADE DE CONSUMO DE OXIGÊNIO NO ESTADO IV E RAZÃO ADP/O EM MITOCÔNDRIAS DE CÓRTEX RENAL DE RATO, EM DIFERENTES TEMPOS DE INCUBAÇÃO.

	Tempo (min)	X RC	X VELOC. ESTADO IV	% ATIVIDADE	% INIBIÇÃO	RAZÃO ADP/O
<b>C</b>		2.16	12.01	100	0	2.07
<b>T<sub>1</sub></b>	2	1.6*	13.02	108.4	0	2.05
<b>T<sub>2</sub></b>	4	1.6*	9.6	79.93	20.07	2.03
<b>T<sub>3</sub></b>	6	1.23*	9.34	77.77	22.23	2.08

\* Valor médio estatisticamente diferente do controle  $p < 0,01$

**SISTEMA:** Manitol 125 mmol.L<sup>-1</sup>, KCl 65 mmol.L<sup>-1</sup>, Hepes 10 mmol.L<sup>-1</sup>, EGTA 0,1 mmol.L<sup>-1</sup>, BSA 0,05 g%, pH 7.2, suplementado com glutamato de sódio 5 mmoles.L<sup>-1</sup>, Pi 1.54 mmoles.L<sup>-1</sup>, ADP 0.15 mmoles.L<sup>-1</sup>, 1mg de proteína mitocondrial e *LiRecDT* 3.85µg/mL em volume final de 1.3 mL. RC= Controle Respiratório, C= Controle e T= Tempo.

Neste trabalho foi também avaliado o efeito de diferentes concentrações da toxina recombinante sobre a velocidade respiratória (estado III e IV), Coeficiente de Controle Respiratório e razão ADP/O. Para tal, foram administradas três doses diferentes da toxina, a saber, 2.31 $\mu$ g/mL, 3.85 $\mu$ g/mL e 7.69 $\mu$ g/mL (**Tabelas III e IV**), sendo utilizado o tempo de 6 minutos (padronizado pela cinética de tempo).

Resultados preliminares dos efeitos da toxina recombinante *LiRecDT* mostraram efeito inibidor do estado III (**Tabela III**) para as três doses utilizadas, sendo que houve 17.89% de inibição com a dose I, 20.41% para a dose II e 30.51% de inibição para a dose III. As médias das velocidades de respiração no estado III foram: 16.66, 16.15 e 14.10  $\mu$ moles de O<sub>2</sub>/min/mg de proteína mitocondrial, sendo que 100% de atividade respiratória corresponde a 20.29  $\mu$ moles de O<sub>2</sub>/min/mg de proteína mitocondrial (**Tabela III**). Estatisticamente, as médias das doses I e II, em relação ao controle, não foram diferentes.

Vale destacar que a maioria dos elétrons que entram na cadeia respiratória mitocondrial surge da ação de desidrogenases que coletam elétrons das reações oxidativas do complexo piruvato desidrogenase, do ciclo do ácido cítrico, da via da  $\beta$ -oxidação e das etapas oxidativas do catabolismo de aminoácidos e os canalizam na forma de pares para a cadeia respiratória. Essas desidrogenases usam pirimidina nucleotídeos (NAD<sup>+</sup> ou NADP<sup>+</sup>) ou flavina nucleotídeos (FMN ou FAD) como receptores de elétrons (LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M., 2000). Portanto, a inibição aparente do estado III, pela toxina recombinante (**Tabela III**), sugere várias possibilidades de mecanismos, como a inibição dos complexos enzimáticos da cadeia respiratória, inibição das desidrogenases do substrato ou ainda inibição da atividade do translocador de nucleotídeos da adenina. Um aspecto interessante de ser abordado refere-se ao fato de que a toxina *LiRecDT* pode possuir atividade de esfingomielinase. A esfingomielina é um lipídio que existe em baixas proporções na membrana mitocondrial interna (2%) (DEVLIN, T.M., 2003). Portanto, não se pode descartar a hipótese de que os efeitos observados sejam decorrentes da hidrólise do esfingolipídeo pela toxina, o que pode causar alterações de fluidez da membrana mitocondrial e, de fato, interferir também no funcionamento dos complexos enzimáticos nela inseridos,

com amplos efeitos mitocondriais. Já no estado IV (velocidade respiratória após o consumo de ADP) não houve inibição significativa em nenhum dos experimentos, sugerindo ausência de efeito desacoplador. (**Tabela IV e Figura 12**)

No experimento referente à padronização do tempo de incubação da preparação mitocondrial com a toxina recombinante, foi observado decréscimo no Coeficiente de Controle Respiratório (RC), parâmetro obtido pela razão entre o estado III e estado IV. Como se trata de uma relação, pode-se inferir que esse decréscimo ocorreu devido à inibição aparente do estado III. Contraditoriamente, esta inibição do Coeficiente de Controle Respiratório não foi evidente nos experimentos em que foram testadas concentrações diferentes da toxina.

As tabelas I, II, III e IV mostram também o efeito da *LiRecDT* sobre a relação ADP/O. Observou-se que para este parâmetro, a toxina não produziu alteração significativa entre as concentrações utilizadas e os controles, sugerindo que na presente condição experimental, apesar do decréscimo do RC, a preparação ainda preserva a capacidade mitocondrial para fosforilar o ADP.

**TABELA III: EFEITOS DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DA TOXINA RECOMBINANTE *LIRECDT* SOBRE A VELOCIDADE DE CONSUMO DE OXIGÊNIO NO ESTADO III E RAZÃO ADP/O EM MITOCÔNDRIAS DE CÓRTEX RENAL DE RATO.**

	<b>X RC</b>	<b>X VELOC. ESTADO III</b>	<b>% ATIVIDADE</b>	<b>% INIBIÇÃO</b>	<b>RAZÃO ADP/O</b>
<b>C</b>	3.25	20.29	100	0	2.41
<b>D1</b>	2.6	16.66*	82.11	17.89	2.35
<b>D2</b>	3.13	16.15*	79.59	20.41	2.61
<b>D3</b>	2.5	14.10*	69.49	30.51	2.79

\* Valor médio estatisticamente diferente do controle  $p < 0,01$

**SISTEMA:** Manitol 125 mmol.L<sup>-1</sup>, KCl 65 mmol.L<sup>-1</sup>, Hepes 10 mmol.L<sup>-1</sup>, EGTA 0,1 mmol.L<sup>-1</sup>, BSA 0,05 g%, pH 7.2, suplementado com glutamato de sódio 5 mmoles.L<sup>-1</sup>, Pi 1.54 mmoles.L<sup>-1</sup>, ADP 0.15 mmoles.L<sup>-1</sup>, 1mg de proteína mitocondrial e *LiRecDT* em três concentrações diferentes, a saber, 2.31µg/mL, 3.85µg/mL e 7.69µg/mL em volume final de 1.3 mL. RC= Controle Respiratório, C= Controle, D= Dose e T= Tempo. 100% de atividade corresponde a 20.29µmoles de O<sub>2</sub>/min/mg de proteína mitocondrial.

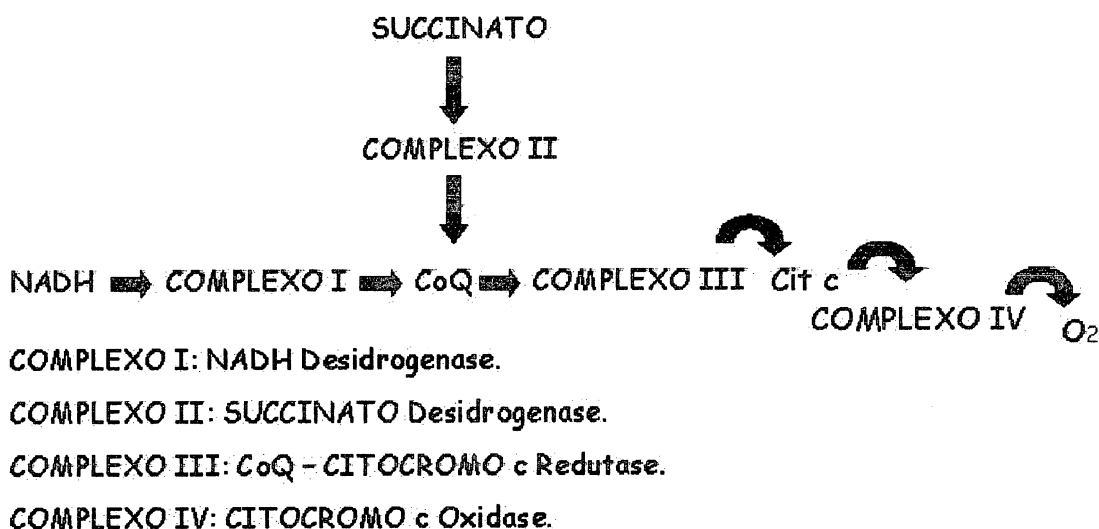
**TABELA IV:** EFEITOS DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DA TOXINA RECOMBINANTE *LIRECDT* SOBRE A VELOCIDADE DE CONSUMO DE OXIGÊNIO NO ESTADO IV E RAZÃO ADP/O EM MITOCÔNDRIAS DE CÓRTEX RENAL DE RATO.

	X RC	X VELOC. ESTADO IV	% ATIVIDADE	% INIBIÇÃO	RAZÃO ADP/O
<b>C</b>	3.25	6.41	100	0	2.41
<b>D1</b>	2.6	5.98	93.29	6.71	2.35
<b>D2</b>	3.13	5.13	80.03	19.97	2.61
<b>D3</b>	2.5	5.64	87.99	12.01	2.79

\* Valor médio estatisticamente diferente do controle  $p < 0,01$

**SISTEMA:** Manitol 125 mmol.L<sup>-1</sup>, KCl 65 mmol.L<sup>-1</sup>, Hepes 10 mmol.L<sup>-1</sup>, EGTA 0,1 mmol.L<sup>-1</sup>, BSA 0,05 g%, pH 7.2, suplementado com glutamato de sódio 5 mmoles.L<sup>-1</sup>, Pi 1.54 mmoles.L<sup>-1</sup>, ADP 0.15 mmoles.L<sup>-1</sup>, 1mg de proteína mitocondrial e *LiRecDT* em três concentrações diferentes, a saber, 2.31µg/mL, 3.85µg/mL e 7.69µg/mL em volume final de 1.3 mL. RC= Controle Respiratório, C= Controle, D= Dose e T= Tempo. 100% de atividade corresponde a 6.41µmoles de O<sub>2</sub>/min/mg de proteína mitocondrial.

O deslocamento dos elétrons pode ser feito a partir da NADH, succinato, flavoproteínas, ubiquinona (UQ), proteínas ferro enxofre, citocromos e O<sub>2</sub>. Espera-se que esses transportadores funcionem numa ordem de potenciais de redução crescentes e em complexos ordenados em série. Neste processo, estão envolvidos quatro complexos, onde cada um é capaz de catalisar a transferência dos elétrons ao longo de uma parte da cadeia respiratória. O fluxo de elétrons para a ubiquinona, pode ser realizado tanto pelo complexo I (NADH desidrogenase), quanto pelo complexo II (Succinato desidrogenase). O complexo III (UQ – citocromo c oxidoreductase) canaliza a transferência dos elétrons da UQ até o citocromo c (cit c). Por fim, o complexo IV (citocromo oxidase) canaliza a transferência de elétrons do citocromo c até o O<sub>2</sub> (LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M., 2000). **(Figura 13)**



**Figura 13:** Esquema representativo dos complexos enzimáticos da cadeia respiratória mitocondrial.

A diminuição do consumo de oxigênio motivou as investigações dos efeitos da *LiRecDT* sobre enzimas da cadeia respiratória mitocondrial. No presente trabalho, foram avaliados a NADH oxidase e a Succinato oxidase.

A NADH oxidase é o segmento que abrange toda cadeia respiratória, desde o NADH até o O<sub>2</sub>. Este parâmetro também foi investigado e os resultados são mostrados na tabela V, onde se verifica um pequeno decréscimo da atividade da NADH para as concentrações 3.85µg/mL e 7.69µg/mL de *LiRecDT*. Esta discreta inibição foi de 3.78% para ambas as concentrações, considerando que 100% de atividade da enzima corresponde a 19.33 µmoles de O<sub>2</sub>/min/mg de proteína mitocondrial. (**Tabela V**)

Com base nestes resultados, pode-se sugerir que a toxina recombinante possa atuar sobre o complexo I da cadeia respiratória mitocondrial (NADH desidrogenase), sendo que esta possibilidade fica em aberto como uma abordagem de investigação futura. Estes resultados estão de acordo com o efeito inibidor da toxina, onde se observou diminuição do consumo de O<sub>2</sub> durante a oxidação do glutamato. Porém, sendo de pequena magnitude, esta inibição não explica completamente o efeito observado sobre o estado III, onde a inibição observada foi de até aproximadamente 30% (**Tabela III**). Portanto, pode-se propor que a atividade da enzima glutamato desidrogenase possa ser afetada pela toxina, contribuindo para o efeito tóxico

da *LiRecDT*. No entanto, esta possibilidade deve ficar em aberto para investigação futura.

**TABELA V:** EFEITO DA TOXINA RECOMBINANTE *LIRECDT* SOBRE A ATIVIDADE DA ENZIMA NADH OXIDASE DA CADEIA RESPIRATÓRIA MITOCONDRIAL.

	X VELOC. RESPIRAÇÃO	% ATIVIDADE	% INIBIÇÃO
<b>C</b>	37.02	100	0
<b>D1</b>	37.33	100.84	0
<b>D2</b>	35.62*	96.22	3.78
<b>D3</b>	35.62*	96.22	3.78

\* Valor médio estatisticamente diferente do controle  $p < 0,01$

**SISTEMA:** Tampão fosfato  $80 \text{ mmol.L}^{-1}$ , pH 7,4, EDTA  $50 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ , NADH  $0,17 \text{ mmol.L}^{-1}$ , 1mg de proteína mitocondrial e *LiRecDT* em três concentrações diferentes, a saber,  $2,31 \mu\text{g/mL}$ ,  $3,85 \mu\text{g/mL}$  e  $7,69 \mu\text{g/mL}$  em volume final de 1.3 mL. C= Controle e D= Dose. 100% de atividade corresponde a  $37,02 \mu\text{moles de O}_2/\text{min/mg}$  de proteína mitocondrial.

Neste trabalho foi realizado um experimento que avaliou o efeito da toxina *LiRecDT* sobre a atividade da enzima succinato oxidase, que representa o segmento da cadeia respiratória compreendido desde a oxidação do succinato até o oxigênio. O resultado de tal experimento está apresentado na tabela VI, onde não se verifica inibição significativa desta enzima, fortalecendo, desta maneira, a idéia de que a toxina recombinante do veneno da aranha marrom, atue no início da cadeia respiratória, assim como descarta a hipótese de que a toxina tenha ação sobre as enzimas: succinato ubiquinona redutase, ubiquinona – citocromo c redutase e citocromo oxidase.

**TABELA VI:** EFEITO DA TOXINA RECOMBINANTE *LIRECDT* SOBRE A ATIVIDADE DA ENZIMA SUCCINATO OXIDASE DA CADEIA RESPIRATÓRIA MITOCONDRIAL.

	X VELOC. RESPIRAÇÃO	% ATIVIDADE	% INIBIÇÃO
<b>C</b>	19.33	100	0
<b>D1</b>	19.33	100	0
<b>D2</b>	18.74	96.95	3.05
<b>D3</b>	18.15	93.89	6.11

**SISTEMA:** Tampão fosfato 80 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 7,4, EDTA 50 µmol.L<sup>-1</sup>, succinato 5 mmol.L<sup>-1</sup>, 0,5mg de proteína mitocondrial e *LiRecDT* em três concentrações diferentes, a saber, 2.31µg/mL, 3.85µg/mL e 7.69µg/mL em volume final de 1.3 mL. C= Controle e D= Dose. 100% de atividade corresponde a 19.33µmoles de O<sub>2</sub>/min/mg de proteína mitocondrial.

A ATPsintase é um grande complexo proteína-membrana que sintetiza o ATP na membrana mitocondrial interna. Esse complexo possui dois componentes, ou também fatores, o Fo (proteína integral de membrana), que é um canal de H<sup>+</sup> e o F<sub>1</sub> (proteína periférica de membrana), que funciona como sítio catalítico (ERNSTER *et al.*, 1963).

O fluxo de elétrons através da UQ, do complexo I até o complexo III, é acompanhado pela movimentação de H<sup>+</sup> da matriz mitocondrial para o espaço intermembrana. Isso também ocorre no complexo III e IV, que funcionam como uma bomba de prótons. A transferência de elétrons na cadeia respiratória, é acompanhada por um fluxo de prótons para o espaço intermembrana (e.i.m.),. Este acúmulo de prótons gera um potencial químico ( $\Delta\text{pH}$ ), acidificando o e.i.m. em relação a matriz mitocondrial, sendo responsável pela gênese de um potencial elétrico ( $\Delta\Psi$ ). A soma desses potenciais ( $\Delta\text{pH} + \Delta\Psi$ ), gera uma força próton motriz, a qual impulsiona prótons novamente para a matriz (por intermédio da ATPsintase), fornecendo assim, energia para a síntese de ATP (LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M., 2000).

Neste experimento avaliou-se o efeito da toxina *LiRecDT* sobre a atividade ATPásica em mitocôndrias intactas de córtex renal de rato. Neste caso, a membrana mitocondrial está intacta e o acesso da toxina a regiões internas da membrana mitocondrial é limitado. Nestes ensaios utilizou-se também FCCP, um desacoplador clássico, que serviu como controle positivo

para o efeito desacoplador. Este agente permeabiliza a membrana mitocondrial interna, seletivamente a  $H^+$ , levando ao aumento da atividade hidrolítica. Os resultados de tais experimentos estão apresentados na Tabela VII, onde se verifica que a toxina, nas concentrações utilizadas, não interferiu na atividade da enzima, indicando que a *LiRecDT* não afeta diretamente a síntese de ATP.

**TABELA VII:** EFEITO DA TOXINA RECOMBINANTE SOBRE A ATIVIDADE  $F_1F_0$ -ATPase.

	X [Pi] $\mu$ moles
Meio+Mito+ATP	0.155
FCCP	0.400
Dose I	0.182
Dose II	0.207
Dose III	0.247

**SISTEMA:** Sacarose 50 mmol.L<sup>-1</sup>, tampão Tris-HCl 12 mmol.L<sup>-1</sup> (pH 7,4), KCl 50 mmol.L<sup>-1</sup> e 3 mg de proteína mitocondrial, e *LiRecDT* em três concentrações diferentes, a saber, 2.31 $\mu$ g/mL, 3.85 $\mu$ g/mL e 7.69 $\mu$ g/mL em volume final de 1 mL. A reação foi iniciada pela adição de 3 mmol.L<sup>-1</sup> de ATP (T0). O padrão utilizado neste experimento foi 0.6 $\mu$ moles de Pi. Controle positivo – FCCP 1 $\mu$ mol.L<sup>-1</sup>.

Embora os experimentos de mensuração da atividade da enzima ATPase não tenham mostrado diferenças estatisticamente significativas, os resultados obtidos na presença da toxina *LiRecDT* mostram uma tendência de estímulo da atividade hidrolítica da enzima.

Vale destacar que a inibição observada no estado III (**Tabela III**), ao lado da tendência ao estímulo desta atividade hidrolítica, pode comprometer o ganho energético da função mitocondrial, traduzido pela diminuição da disponibilidade de ATP. O ATP é substrato para a enzima ATPase  $Na^+ - K^+$ , que é responsável pela manutenção dos gradientes iônicos celulares, referentes ao  $Na^+$  e  $K^+$ . Portanto, a ação tóxica dessa proteína recombinante sobre a produção de ATP, pode levar a um aumento da osmolaridade celular, dependente da retenção do sódio, o que resulta na formação de edema celular, como verificado em estudos anteriores (COUTINHO, 1996; CHAIM *et al.*, 2005,

in press). Experimentos futuros, com incremento no número de ensaios, deverão ser realizados, a fim de mostrar de forma mais sistemática e controlada esse efeito e, portanto, poder melhor justificar as alterações de volume celular descritas em estudos recentes com o veneno da *L. intermedia* (COUTINHO, 1996; CHAIM *et al.*, 2005, in press).

## 6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que:

A toxina *LiRecDT* interfere no metabolismo mitocondrial, provocando decréscimo do consumo de oxigênio na presença de ADP (estado III). Esse efeito pode comprometer o ganho energético causando prejuízo à síntese de ATP e interferir em outras funções celulares.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ANDRADE R.M.G., OLIVEIRA K.C., GIUSTI A.L., SILVA W.D., TAMBOURGI D.V., 1999. Ontogenetic development of *Loxosceles intermedia* spider venom. **Toxicon** 37: 627-632.

ARAUJO, S.C.; CASTANHEIRA, P.; ALVARENGA, L.M.; MANGILI, O.C.; KALAPOTHAKIS, E. CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. Protection against dermonecrotic and lethal activities of *Loxosceles intermedia* spider venom by immunization with a fused recombinant protein. **Toxicon**, v. 41, p. 261-267, 2003.

BARBARO, K.C.; FERREIRA, M.L.; CARDOSO, D.F.; EICKSTEDT, V.R.D.; MOTA, I. Identification and neutralization of biological activities in the venoms of *Loxosceles* spiders. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 29, p. 1491-1497, 1996.

BRADFORD, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** 72: 248-254.

BRAZ, A.; MONOZZO J.; ABREU J.C.; GUBERT, I.C.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI C. Development and evaluation of the neutralizing capacity of horse antivenom against the Brazilian spider *Loxosceles intermedia*. **Toxicon**, v. 37, p. 1323-1328, 1997).

CHAIM, O.M., SADE, Y.B., DA SILVEIRA, R.B., TOMA, L., KALAPOTHAKIS, E., CHAVES-OLÓRTEGUI, C., MANGILI, O.C., GREMSKI, W., DIETRICH, C.P., NADER, H.B., VEIGA, S.S., 2005. Brown spider dermonecrotic toxin directly induces nephrotoxicity. **Toxicology and Applied Pharmacology**, in press.

CHANCE B. & WILLIAMS G.R., 1955. The respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. I kinetics of oxygen utilization. **J. Biol. Chem.** 217, n. 1, p. 383-393.

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

COUTINHO, N.L.R. **Avaliação funcional e histopatológica das alterações renais induzidas pelo veneno da aranha marrom *Loxosceles intermedia***. Curitiba, 1996. 99p. Dissertação de Mestrado, Setor de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná.

DA SILVA, P.H., DA SILVEIRA, R.B., APPEL, M.H., MANGILI, O.C., GREMSKY, W., VEIGA, S.S., 2004. Brown spider and loxoscelism. **Toxicon** **44**: 693-709.

DA SILVEIRA, R.B., FILHO, J.F.S., MANGILI, O.C., VEIGA, S.S., GREMSKI, W., NADER, H.B., DIETRICH, C.P., 2002. Identification of proteases in the extract of venom glands from brown spiders. **Toxicon** **40**: 815–822.

DEVLIN, T.M. **Manual de Bioquímica com Correlações Clínicas**. 1º Edição. 2003, 442p.

ERNSTER, L.; DALLNER, G.; FELICE, G.A. Differential effects of rotenone and emytal on mitochondrial electron and energy transfer. **Journal Biological Chemistry**, V. 238, n.3, 1963.

ESTABROOK R.W., 1967. Mitochondrial respiratory control and the polarography measurement of ADP/O ratios. **Meth. Enzymol.** **10**, p. 41-47.

FEITOSA, L., GREMSKI, W., VEIGA, S.S., ELIAS, M.C.Q.B., GRANER, E., MANGILI, O.C., BRENTANI, R.R., 1998. Detection and characterization of metalloproteinases with gelatinolytic, fibronectinolytic and fibrinogenolytic activities in brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. **Toxicon** **36**: 1039–1051.

FURLANETTO, R.S.; BURCHERL, W.; ROSA, R.R.; SALIBA, F.; NAVAS J. Observação dos efeitos do veneno loxoscélico e avaliação de sua atividade. **Ciência e Cultura**, v. 14, p. 254, 1964b.

FUTRELL, J.M., 1992. Loxoscelism. **J. Med. Sci.**, **304**: 261–267.

GALIANO, M. E. 1967. Ciclo biológico e desarrollo de *Loxosceles laeta* (Nicolet, 1849). **Acta Zoologica Lilloana**, 23: 431- 464.

GERTSCH, W.J., 1967. The spider genus *Loxosceles* in South America (Araneae: Scytodidae). **Bull. Mus. Nat. Hist.**, **136**: 119–183.

GERTSCH, W.J., ENNIK, F., 1983. The spider genus *Loxosceles* in North America, Central América and the West Indies (Araneae: Loxoscelidae). **Bull. Mus. Nat. Hist.**, **175**: 263–360.

GUBERT, I.C. **Estudo Epidemiológico dos Acidentes com a Aranha Marrom *Loxosceles intermedia* em Curitiba, Estado do Paraná, e Avaliação do Método de ELISA como Ferramenta de Diagnóstico**. Belo Horizonte, 2005. 100p. Tese de Doutorado, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.

GUILHERME, P.; FERNANDES, I.; BARBARO, K.C. Neutralization of dermonecrotic and lethal activities and differences among 32-35kDa toxins of medically important *Loxosceles* spider venoms in Brazil revealed by monoclonal antibodies. **Toxicon**, v. 39, p. 1333-1342, 2001.

JUNG, K., REINHOLDT, C., SCHOLZ, D., 1987. Inhibited efficiency of kidney mitochondria isolated from rats treated with cyclosporin A. **Nephron** **45**, Basel: 43-45.

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

KRYWKO, D.M.; GOMEZ, H.F. Detection of *Loxosceles* species venom in dermal lesions: a comparison of 4 venom recovery methods. **Annals of Emergency Medicine**, v. 39, p. 475-480, 2002.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica**. 2º edição. São Paulo, 2000, 839p.

LUCIANO, M.N., SILVA, P.H., CHAIM, O.M., SANTOS, V.P., FRANCO, C.R.C., SOARES, M.F.S., ZANATA, S.M., MANGILI, O.C., GREMSKY, W., VEIGA, S.S., 2004. Experimental evidence for a direct cytotoxicity of *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom on renal tissue. **J. Histochem. Cytochem.** **52**: 455-467.

LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. *et. al.* 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** 193: 265-275.

MANFREDINI, L., MALUF, E.M.C.P.; CARVALHO, D.S.; OPABE, I.; MANGILI, O.C. *Loxosceles*: "Aranha Marrom". **Cadernos de Saúde**. Prefeitura da Cidade de Curitiba, ano 1, n.2, p. 1-10, 1993.

MOTA, I., BARBARO, K.C., 1995. Biological and biochemical-properties of venoms from medically important *Loxosceles* (Araneae) species in Brazil. **J. Toxicol., Toxin Rev.** **14**: 401-421.

NICHOLLS, D.G.; FERGUSON, S.J. **Bioenergetics** **2**. 3º edição. San Diego: Academic press, 1992, 255p.

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

PULLMAN M.E.; PENEFSKY H.S.; DATTA A.; RACKER E., 1960. Partial resolution of the enzymes catalysing oxidative phosphorylation. I. Purification and properties of soluble, dinitrophenol-stimulated adenosine triphosphatase. **Journal of Biological Chemistry** **235**, Bethesda, n. 11, p. 3322-3329.

REES, R.S.; ALTERNBERN D.P.; LYNCH, J.B.; LLOYD, E.K. Jr. brown recluse spider bites. A comparison of early surgical excision versus dapsone and delayed surgical excision. **Annals of Surgery**, n. 20, p. 633-659, 1985.

SEZERINO, U.M.; ZANNIN, M.; COELHO, L.K.; GONÇALVES, J.R.J.; GRANDO, M.; MATTOSINHO, S.G.; CARDOSO, J.L.; VON EICKSTEDT, V.R.; FRANÇA, F.O.; BARBARO, K.C.; FAN, H.W. A clinical and epidemiological study of *Loxosceles* spider envenoming in Santa Catarina, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Sept-Oct; v. 92, n.5, p. 546-8, 1998.

SUMNER, J.B., 1944. Scientific apparatus and laboratory methods. A method for the colorimetric determination of phosphorus. **Science** **100**, Washington, p. 413-414.

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

VEIGA, S.S., ZANETTI, V.C., FRANCO, C.R.C., TRINDADE, E.S., PORCIONATTO, M.A., MANGILI, O.C., GREMSKI, W., DIETRICH, C.P., NADER, H.B., 2001a. In vivo and in vitro cytotoxicity of brown spider venom for blood vessel endothelial cells. **Thromb. Res.** **102**: 229-237.

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

VETTORELLO, M. L. **Interferência da Temperatura, Umidade Relativa do Ar e Radiação Solar na Incidência dos Acidentes Loxoscélicos em Curitiba, Paraná, Brasil no Período de 1998 a 2001**. Curitiba, 2002. Monografia (Especialização), Curso de Pós-Graduação em Epidemiologia de vetores importantes em Saúde Pública. Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

VOSS, O.D.; CAMPELO A.P.; BACILA M, 1961. The respiration chain and the oxidative phosphorylation of rat brain mitochondria. **Biochem. Biophys. Res. Commol.** **4**, n.1, p. 48-51.

ZANETI, V.C., DA SILVEIRA, R.B., DREYFUSS, J.L., HAOACH, J., MANGILI, O.C., VEIGA, S.S., GREMSKI, W., 2002. Morphological and biochemical evidence of blood vessel damage and fibrinogenolysis triggered by brown spider venom. **Blood Coag. Fibrinol.** **13**: 135-148.

WHITE, J.; CARDOSO, J.L.C. & FAN, H.W. Clinical toxicology of spider bites, 1995. **Clinical toxicology of animal venoms and poisons**. Boca Raton, CRC Press, p. 259-330.