

ANA CAROLINA MARTINS WILLE

**ESTUDO DOS EFEITOS CITOTÓXICOS DO VENENO DE *Loxosceles intermedia* E
DE TOXINAS RECOMBINANTES SOBRE CÉLULAS SUBENDOTELIAIS**

CURITIBA

2006

ANA CAROLINA MARTINS WILLE

**ESTUDO DOS EFEITOS CITOTÓXICOS DO VENENO DE *Loxosceles intermedia* E
DE TOXINAS RECOMBINANTES SOBRE CÉLULAS SUBENDOTELIAIS**

**Dissertação apresentada como requisito à obtenção
do grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular,
Programa de Pós-Graduação do Departamento de
Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas, da
Universidade Federal do Paraná**

**Orientadora Profa Dra Célia Regina Cavichiolo
Franco**

Co-orientador Prof Dr Silvio Sanches Veiga

CURITIBA

2006

PARECER

A banca examinadora, instituída pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, composta por


Dr^a Célia Regina Cavichiolo Franco
Orientadora Depto Biologia Celular – (UFPR)


Dr^a Márcia Regina Paes de Oliveira
Depto Biologia Estrutural-Molecular e Genética – (UEPG)


Dr Cláudio de Paula Soares Greca
Depto Biologia Celular – (UFPR)

após arguir o(a) mestrando(a) **Ana Carolina Martins Wille** em relação ao seu trabalho de dissertação intitulado "Estudo dos efeitos citotóxicos do veneno de *Loxosceles intermédica* e de toxinas recombinantes sobre células subendoteliais", é de parecer favorável a **APROVAÇÃO** do(a) acadêmico(a), habilitando-o(a) ao título de **Mestre** em Biologia Celular e Molecular, área de concentração em **BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

A obtenção do título de Mestre está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas nas Normas Internas deste curso de pós-graduação

Curitiba, 27 de abril de 2006


Célia Regina Cavichiolo Franco
Coordenadora do Curso

Ao Dr. Silvio Sanches Veiga pelo exemplo de competência, dedicação e seriedade na pesquisa científica e, acima de tudo por me ajudar a realizar este sonho. A você quero agradecer de forma especial e dedicar todo o meu trabalho.

Ao meu pai Martim pelo apoio e amor que sempre dedicou, e, especialmente a minha mãe Elizabeth, que mesmo não estando neste mundo, tenho a certeza de que de algum lugar torce por mim, alegrando-se das minhas alegrias, chorando com as minhas tristezas e vibrando com as minhas conquistas. A vocês dedico a realização deste trabalho.

A minha madrasta Marlene pela amizade e apoio dedicados a mim durante a realização desse trabalho. Muito obrigada.

Aos meus outros pais, Paulo e Josélia por todo estímulo e amor incondicional que dedicaram a mim em toda a minha existência. A vocês que compartilharam os meus ideais, apoiaram as minhas decisões e foram o alicerce dos meus sonhos, dedico este trabalho.

A minha além de irmã, prima e afilhada Jéssica pelo amor e carinho que sempre dedica a mim. Obrigada por você existir. Amo muito você!!!

***“ Quando estiver a beira do desânimo, acelere o passo e proíba-se de parar ”
(Chico Xavier)***

“Os frutos falam pelas árvores que os produzem. Nossas obras, na esfera viva de nossa consciência, são a expressão gritante de nós mesmos. A forma de nosso pensamento dá feição ao nosso destino.”

(Clarêncio)

AGRADECIMENTOS

À professora Dra Célia Regina Cavichiolo Franco, minha orientadora pela oportunidade de realizar o mestrado, não poupando ensinamentos para a realização deste trabalho

Ao professor Dr Silvio Sanches Veiga, meu co-orientador que sempre me ajudou com tanto carinho e dedicação. Foram muito valiosos seus conselhos tanto profissionais quanto pessoais. Obrigada por estar sempre enriquecendo meus conhecimentos.

Ao professor Dr Waldemiro Gremski, pelo exemplo de dedicação ao laboratório de Matriz Extracelular e ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular do Departamento de Biologia Celular da Universidade Federal do Paraná.

Ao professor Dr Oldemir Carlos Mangili por toda dedicação em ajudar o laboratório de Matriz Extracelular e Biotecnologia de venenos de animais peçonhentos.

À professora Dra Dorly Buchi de Freitas e ao professor Dr Silvio Marques Zanata, por todo auxílio prestado sempre que solicitados.

Aos demais professores do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Departamento de Biologia Celular da UFPR sempre solícitos a prestar auxílio e esclarecimentos.

Ao Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética do Setor de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Estadual de Ponta Grossa pelo apoio e compreensão em todas as horas, especialmente nos momentos de ausência.

Aos professores Ms José Rosa Gomes e Dra Célia Maria da Lozzo Lopes do Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética da UEPG por acreditarem em mim e por substituir a minha ausência nos momentos em que tive que me dedicar à realização deste projeto Estendo os meus agradecimentos as professoras Dra Mara Cristina de Almeida Matiello e a professora Dra Márcia Regina Paes de Oliveira

Aos colegas do laboratório de Matriz Extracelular que, de alguma forma me ajudaram, especialmente a Olga, a Kátia, a Luíza e a Márcia por toda paciência e ajuda científica, mas principalmente pela sincera amizade Ao Rafael Berton da Silveira pela amizade e por doar as toxinas recombinantes utilizadas neste trabalho Aos demais colegas do laboratório Youssef, Dilza, Jenifer, Reginaldo, Daniele, Luciellen (conterrânea), Sandra (nunca esquecerei o apoio que me deu), Valéria, Rodrigo, Ana Isabel, Elisângela e Simone A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho

À todos os colegas do Curso de Pós-Graduação do Departamento de Biologia Celular da UFPR pela boa convivência durante estes dois anos de curso

À coordenação do Curso de Pós-Graduação do Departamento de Biologia Celular da UFPR por dar toda a atenção necessária aos alunos e por estarem sempre preocupados com a melhoria do curso

À secretária do Curso de Pós-Graduação do Departamento de Biologia Celular, Marlene B Camargo, por todo auxílio prestado desde o momento de ingresso na pós-graduação até as etapas finais

SUMÁRIO

	Página
SUMÁRIO	IV
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	VII
LISTA DE TABELAS	IX
LISTA DE ABREVIATURAS	X
RESUMO	XII
ABSTRACT	XIII
1. INTRODUÇÃO	01
1 1 Aranhas	01
1 2 As aranhas do gênero <i>Loxosceles</i>	02
1 3 Distribuição geográfica	04
1 4 Loxoscelismo no Estado do Paraná	04
1 5 As características clínicas do envenenamento por aranhas do gênero <i>Loxosceles</i>	05
1 6 Quadro dermonecrótico ou cutâneo	06
1 7 Quadro cutâneo-visceral ou sistêmico	07
1 8 Ação do veneno do gênero <i>Loxosceles</i> nos vasos sanguíneos	09
1 9 Características bioquímicas dos venenos de <i>L. intermedia</i>	10
2. JUSTIFICATIVA	12
3. OBJETIVOS	14
3 1 Objetivos Gerais	14
3 2 Objetivos Específicos	14
4. MATERIAIS E MÉTODOS	16
4 1 Animais	16
4 2 Reagentes	16
4 3 Produção de anticorpos policlonais	17
4 4 Purificação de anticorpos	17
4 5 Imunoensaio por ELISA	18
4 6 Reações de Immunoblotting	18
4 7 Extração de veneno loxoscélico por eletrochoque	19
4 8 Esterilização de materiais	19
4 9 Dosagem de proteínas	19
4 10 Linhagem celular e condições de cultivo	20
4 11 Ação do veneno total sobre a morfologia de células RI	21
4 12 Ação da proteína recombinante dermonecrótica (LiRecDT1) sobre células RI	22

4 13 Inibição da atividade proteolítica do veneno loxoscélico por anticorpos hiperimunes que reconhecem LiRecMP1	22
4 14 Ensaio de Imunofluorescência	22
4 14 1 Ligação de toxinas do veneno na superfície celular	23
4 14 2 Comprometimento do citoesqueleto em células RI tratadas com veneno	23
4 15 Ensaio de Microscopia Eletrônica de Varredura (M E V)	24
4 15 1 Ação do veneno sobre a morfologia celular	24
4 16 Ensaio de Citometria de Fluxo	25
4 16 1 Análise da ligação das toxinas do veneno na superfície celular	25
4 17 Ensaio de Adesão Celular à fibronectina	25
4 18 Ensaio de Viabilidade Celular	27
4 18 1 Azul de Trypan	27
4 19 Ensaio de proliferação celular	28
4 19 1 MTT	28
4 20 Inibição da degradação da fibronectina pelo veneno de <i>L intermedia</i> por anticorpos que reconhecem LiRecMP1	28
4 21 Coloração dos géis de poli(acrilamida)	29
4 22 Ensaio para verificação da alteração da permeabilidade vascular induzida pelo veneno de <i>L intermedia</i>	29
4 23 Análise Estatística	30
5. RESULTADOS.....	31
5 1 Ação do veneno total de <i>L intermedia</i> sobre a morfologia de células RI	31
5 2 Mudanças morfológicas em células RI induzidas pelo veneno de <i>L intermedia</i> analisadas através de microscopia eletrônica de varredura (MEV)	35
5 3 Ligação de toxinas do veneno de <i>L intermedia</i> na superfície celular	38
5 4 Análise da ligação de toxinas do veneno na superfície de células RI	41
5 4 1 Análise da ligação do veneno sobre a superfície celular	41
5 4 2 Especificidade da ligação de toxinas do veneno sobre a superfície celular	41
5 5 Efeitos causados pelo veneno de <i>L intermedia</i> sobre a organização dos filamentos de actina no citoesqueleto em células RI	43
5 6 Ensaio de adesão celular sobre fibronectina	46
5 7 Viabilidade de células RI submetidas ao veneno de <i>L intermedia</i>	48
5 8 Efeito do veneno de <i>L intermedia</i> sobre a proliferação de células RI ..	48
5 9 Ação da proteína recombinante dermonecrótica (LiRecDT1) sobre células RI	54
5 10 Reação imunológica cruzada de anticorpos que reconhecem LiRecMP1 com toxinas nativas do veneno de <i>L intermedia</i>	58
5 11 Inibição da degradação da fibronectina causada pelo veneno por anticorpos que reconhecem LiRecMP1	61

5 12	Efeitos inibitórios de anticorpos que reconhecem LiRecMP1 sobre o aumento da permeabilidade vascular induzida pelo veneno de <i>L. intermedia</i>	63
5 13	Inibição da atividade desadesiva de células RI pelo veneno loxoscélico por anticorpos hiperimunes que reconhecem LiRecMP1	65
6.	DISCUSSÃO	67
7.	CONCLUSÕES.....	74
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76
9.	ANEXO.....	87

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1-	Lesão dermonecrótica provocada pela picada de <i>L. intermedia</i>	03
FIGURA 2-	Lesão dermonecrótica provocada pela picada de <i>L. intermedia</i>	07
FIGURA 3-	Alteração morfológica de células RI após tratamento por 24 horas com veneno de <i>L. intermedia</i>	32
FIGURA 4-	Alteração morfológica de células RI após tratamento por 48 horas com veneno de <i>L. intermedia</i>	33
FIGURA 5-	Alteração morfológica de células RI após tratamento por 72 horas com veneno de <i>L. intermedia</i>	34
FIGURA 6-	Alteração morfológica de células RI (subendoteliais) analisadas por microscopia eletrônica de varredura	37
FIGURA 7-	Ligação das toxinas do veneno de <i>L. intermedia</i> na superfície celular	40
FIGURA 8-	Análise da ligação de toxinas do veneno na superfície de células RI	41
FIGURA 9-	Efeito do veneno de <i>L. intermedia</i> sobre o arranjo e organização dos filamentos de actina	45
FIGURA 10-	Gráficos que mostram os efeitos do veneno de <i>L. intermedia</i> sobre a dinâmica de adesão de células RI em substrato de fibronectina	47
FIGURA 11-	Efeito do veneno de <i>L. intermedia</i> sobre a viabilidade das células RI após 24, 48 e 72 horas	50
FIGURA 13-	Análise morfológica de células RI após o tratamento por 24 horas	55

com a proteína recombinante dermonecrótica LiRecDT1

- FIGURA 14-** Análise morfológica de células RI após o tratamento por 48 horas com a proteína recombinante dermonecrótica LiRecDT1 **56**
- FIGURA 15-** Análise morfológica de células RI após o tratamento por 72 horas com a proteína recombinante dermonecrótica LiRecDT1 **57**
- FIGURA 16-** Reação Imunoenzimática (ELISA) de captura de anticorpo comparando veneno total e toxina recombinante LiRecMP1 **59**
- FIGURA 17-** Immunoblotting realizado a partir de gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12,5% (p/v) com veneno total de *L. intermedia* obtido por eletrochoque e com a proteína recombinante LiRecMP1 **60**
- FIGURA 18-** Ação inibitória de anticorpos hiperimunes contra LiRecMP1 sobre a atividade fibronectinolítica do veneno de *L. intermedia* **62**
- FIGURA 19-** Efeito inibitório de anticorpos que reconhecem LiRecMP1 sobre aumento da permeabilidade vascular induzida pelo veneno de *L. intermedia* **64**
- FIGURA 20-** Inibição da atividade desadesiva de células RI causado pelo veneno de *L. intermedia* por anticorpos que reconhecem LiRecMP1 **66**

LISTA DE TABELAS

TABELA 1-	Efeito do veneno de <i>L. intermedia</i> sobre a viabilidade das células RI após tratamento de 24, 48 e 72 horas	49
TABELA 2-	Porcentagem de proliferação das células RI na presença do veneno	52

LISTA DE ABREVIATURAS

BCIP/NBT- Bromo cloro indofenil fosfato/ Nitro blue tetrazolium

BSA – Albumina sérica bovina

Cel - célula

° C – Grau Celsius

cm- Centímetro

Da - Daltons

DAPI – 4-6-diamidino-2-fenilindole-dicloreto

DMSO – dimetilsulfóxido

EBSS – Solução salina balanceada de Earle

FN - Fibronectina

F12 - meio de cultura com L-glutamina, desprovido de bicarbonato de sódio

g- Grama

h – Hora

HI- Hiperimmune

IgG – Imunoglobulina G

IP- intraperitoneal

IRA – Insuficiência renal aguda

KDa – Quilodaltons (unidade de massa molecular equivalente a mil daltons)

m – Média

M – Molar

mL – Mililitro

mm - Milímetro

µg – Micrograma

μ L – Microlitro

MTT- brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólico

NHI- National Institute of Health (EUA)

N- Normal

nm – Nanômetros

OPD- o-fenilenodiamina

PBS – Solução salina-fosfato tamponada

% - Percentagem

pH – Potencial hidrogeniônico

PI -Pré-ímmune

p/v- peso molecular/volume

rpm – Rotações por minuto

SDS – Dodecil sulfato de sódio

SFB – Soro fetal bovino

SC- Subcutânea

TR- Tampão redutor

Tris- tris(hidroximetil)-aminoetano

VN – Veneno nativo da aranha marrom *Loxosceles intermedia*

v/v- volume/volume

WB- western blotting

RESUMO

Dentre os quadros clínicos produzidos por acidentes que envolvem animais peçonhentos, aqueles causados pelos aracnídeos são os de maior importância médica. Aranhas do gênero *Loxosceles*, conhecidas popularmente como aranhas marrom têm se tornado um problema de saúde pública no Estado do Paraná, pois as ocorrências notificadas têm aumentado de forma alarmante. O veneno das aranhas do gênero *Loxosceles* provoca o loxoscelismo que pode gerar até dois tipos de quadros clínicos: cutâneos ou dermonecroticos e cutâneo-viscerais ou sistêmicos. O quadro cutâneo caracteriza-se por uma lesão dermonecrotica com espalhamento gravitacional no local da picada e o quadro cutâneo-visceral ou sistêmico se caracteriza por distúrbios hematológicos, alterações nas paredes dos vasos e disfunção renal, sendo esta última a responsável pela morte das vítimas. Desta forma, esta dissertação teve por objetivo avaliar os efeitos citotóxicos do veneno de aranhas *L. intermedia* e de toxinas recombinantes sobre células subendoteliais (células musculares lisas, provenientes da túnica média de aorta de coelho) visando uma melhor compreensão da ação do veneno sobre as alterações nas paredes dos vasos. Os resultados apontaram claramente que o veneno de *L. intermedia* provocou alterações na morfologia das células subendoteliais. Ensaio de citotóxicidade fluorescente mostraram que o veneno foi capaz de provocar reorganização dos filamentos de actina. Outras alterações como a diminuição da viabilidade e da proliferação foram avaliadas pelos métodos de exclusão com Azul de Trypan e MTT, respectivamente. Ensaio de imunofluorescência e de Citometria de Fluxo apontaram que o veneno se liga diretamente a superfície das células. Ensaio empregando a toxina recombinante LiRecDT1 na linhagem subendotelial demonstraram que esta toxina não foi capaz de causar alterações morfológicas. Anticorpos que reconhecem LiRecMP1 foram capazes de inibir a ação de metaloproteases presentes no veneno de *L. intermedia*, impedindo que ocorressem alterações morfológicas nas células subendoteliais, degradação de fibronectina (eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE) e aumento da permeabilidade vascular, detectada em camundongos pelo corante vital Azul de Evans. Os resultados obtidos permitiram sugerir que metaloproteases da família das astacinas presentes no veneno, análogas a LiRecMP1 são responsáveis por muitos dos danos causados pelo veneno de *L. intermedia* em células subendoteliais, provavelmente por degradar moléculas de fibronectina (importante molécula da matriz extracelular produzida por células subendoteliais) além de poderem ser fatores de espalhamento de outras toxinas do veneno na matriz extracelular contribuindo para o aumento da permeabilidade nos vasos sanguíneos. A ação das metaloproteases presentes no veneno de *L. intermedia* na matriz extracelular de células subendoteliais e de outras células que produzam fibronectina poderão futuramente ser melhor investigadas, permitindo uma melhor compreensão destas moléculas no loxoscelismo.

ABSTRACT

Accidents caused by brown spiders (*Loxosceles* Genus) are normally associated with necrotic lesions of skin with gravitational spreading and systemic manifestations such as thrombocytopenia, hemolysis and renal disturbances. The mechanism by which the venom exerts these noxious effects is currently under investigation. Brown spider venom has a complex composition containing many different toxins, of which metalloproteases have been described in many different species of this Genus. These toxins may produce degradation of extracellular matrix constituents such as fibronectin, fibrinogen, entactin and endothelial heparan sulfate proteoglycan and putatively may act as spreading factor for other venom toxins. Here, we studied the *L. intermedia* venom effect upon RI sub endothelial cells. The venom was cytotoxic upon cells by inducing morphologic alterations and causing disturbs in cell adhesion to culture substrate. Employing a cDNA library of *L. intermedia* venom gland, we cloned and expressed a recombinant metalloprotease that we named LiRecMP1 (900bp cDNA) that encodes for a signal peptide and a pro-protein. Nucleotide, deduced amino acid, phylogenetic analysis and computer modeling revealed a structural relationship for this toxin with astacin family of metalloproteases. A recombinant molecule expressed as N-terminal His-tag fusion protein in *Escherichia coli*, was purified to homogeneity from cell lysates by Ni²⁺-chromatography, resulting in a protein of 30kDa. Purified recombinant toxin was used to produce a polyclonal antiserum from which were purified hyperimmune antibodies that showed reactivity to LiRecMP1 and cross-reactivity to a native venom protein at 30kDa. The presence and involvement of this astacin-like metalloproteases on the noxious activity of the venom as a spreading factor was strengthened by the inhibitory activity of hyperimmune antibodies against LiRecMP1 upon venom-dependent desadhesive cell effect, fibronectinolysis and venom-dependent increase of vascular permeability. These molecular biology and functional studies suggest for the first time the existence of an astacin-like toxin in an animal venom secretion and make this recombinant toxin suitable for future structural and functional studies about venom and astacin family.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aranhas

As aranhas e os seres humanos têm compartilhado os mesmos habitats desde que os homens existem sobre a Terra. Estes animais são um grupo antigo, com o fóssil mais velho datando de 300 milhões de anos atrás no Período Carbonífero. Encantamento, fascínio, pavor, ódio, pânico e medo são algumas das palavras usadas pelo homem para manifestar o que sente em relação às aranhas. Devido às inúmeras reações que os humanos sentem em relação a estes animais eles têm um lugar reservado na mitologia de muitas culturas ao redor do mundo bem como na cultura popular atual.

Os aracnídeos são um grupo bem sucedido, com um estilo de vida baseado na predação principalmente de insetos, outro grupo igualmente bem sucedido, contudo existem algumas espécies maiores que podem capturar e comer sapos, lagartos, pequenos pássaros e roedores.

Algumas adaptações notáveis que possibilitam a captura desses organismos incluem a existência de glândulas de veneno, cujas secreções podem ser injetadas nas presas paralisando a vítima e iniciando um processo de digestão extracorpórea, e a produção de seda, um fenômeno na construção das teias das aranhas.

As aranhas possuem o corpo dividido em dois segmentos, o cefalotórax (união da cabeça com o tórax) e o abdômen. Apresentam quatro pares de patas, quelíceras e pedipalpos.

Há cerca de 40.000 aranhas descritas na Terra (PLATINICK, 1993), sendo que provavelmente existam mais de 100.000 espécies ainda não descritas. Das espécies descritas, estima-se que menos de 100 são potencialmente perigosas ao homem (BARBARO *et. al.*, 1995; RUPPERT e BARNES, 1996). Na maioria das vezes elas assustam, embora poucas sejam capazes de trazer prejuízos ao homem. Na realidade, as aranhas são extremamente importantes para o equilíbrio da natureza.

Há dois grupos principais de aranhas: o *Ortognatha* ou migalomorfa (aranha primitiva ou “trapdoor”) cuja quelícera se projeta à frente partindo do cefalotórax

enquanto as presas se posicionam para baixo e existe também o grupo Labidognatha ou araneomorfa, no qual os representantes possuem as quelíceras posicionadas verticalmente e que conjuntamente com as presas se movem lateralmente como pinças (RASH e HODGSON, 2002).

As espécies mais perigosas de aranhas são encontradas no grupo das Labidognathas (araneomorfas): *Latrodectus* (viúva negra – Theridiidae) *Loxosceles* (aranha violino ou aranha marrom – Loxoscelidae) *Phoneutria* (aranha banana – Ctenidae), as quais são responsáveis por muitos casos de envenenamentos graves e registros de óbito. Muitas outras famílias são consideradas perigosas, Segestriidae, Agelenidae, Salticidae, Gnaphosidae, Thomisidae, Heteropodidae, Clubionidae e Lycosidae, embora a maioria das notificações de envenenamentos não sejam adequadamente documentadas. Como dado, apenas três gêneros, *Atrax*, *Latrodectus* e *Loxosceles* são apontados como responsáveis por acidentes culminando em óbito nos humanos (ESCOUBAS *et al.*, 2000).

1.2 As aranhas do gênero *Loxosceles*

As aranhas do gênero *Loxosceles*, pertencem à família Loxoscelidae, sub ordem Labdognatha, ordem Araneida, classe Arachnida e filo Arthropoda (RUPPERT e BARNES, 1996; SOEREENSEN, 1996).

O gênero *Loxosceles* apresenta aranhas com um colorido uniforme, variando entre marrom claro até marrom escuro, podendo apresentar uma mancha clara (*L. gaúcho*) ou mancha escura (*L. laeta*). As aranhas do gênero *Loxosceles* possuem o comprimento corporal que varia entre 8 a 15 mm e as patas variando entre 8 a 30 mm e seu corpo pode apresentar escassos pêlos curtos. Machos têm o corpo menor e patas mais longas que as fêmeas. O cefalotórax é baixo, não ultrapassando em altura o abdômen (BÜCHERL, 1972). São aranhas sedentárias e possuem hábitos noturnos, desta forma preferem locais secos e escuros. Vivem sob tijolos e telhas empilhados, pedras, troncos de árvores, fendas de muros e cavernas. Em algumas situações habitam as residências humanas, onde encontram o ambiente ideal para a sua sobrevivência.

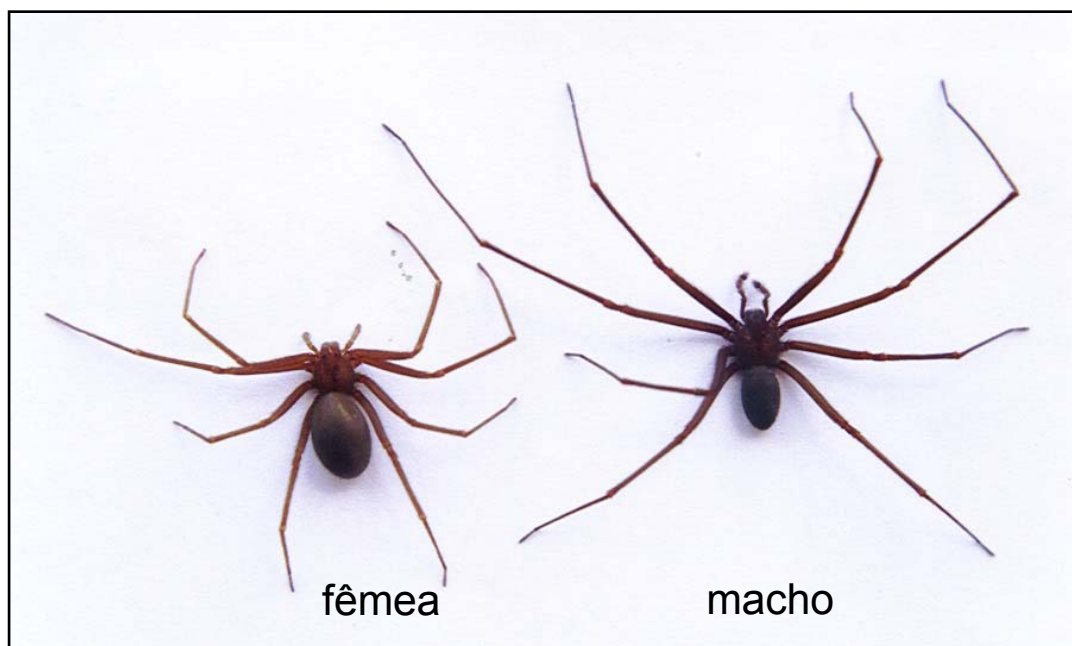


Figura 1: *L. intermedia* – Foto comparativa entre macho e fêmea (aumento de 2x).

A maior incidência de acidentes com o homem deve-se ao fato da aranha ter adquirido hábitos intradomiciliares. As aranhas deste gênero não são agressivas e só picam o homem quando comprimidas inadvertidamente contra a pele no ato de vestir-se, enxugar-se ou durante o sono (SUAREZ, 1971; LUCAS, 1988; FUTRELL, 1992).

As fêmeas em geral são maiores que os machos e o seu veneno possui maior concentração de proteínas. Tal característica, associada com a grande produção de veneno, aumenta o potencial tóxico do envenenamento pela aranha fêmea (da SILVA *et al.*, 2004).

As aranhas que pertencem a este gênero reproduzem-se facilmente em ambientes desfavoráveis. Podem resistir à temperaturas entre 8 e 43° C, com maior ocorrência de picadas nos meses quentes do ano. Machos e fêmeas podem sobreviver por vários dias sem água e comida (LOWRIE, 1980; FUTRELL, 1992; da SILVA *et al.*, 2004).

1.3 Distribuição geográfica

As aranhas do gênero *Loxosceles* têm vasta distribuição pelo mundo tropical, subtropical e temperado, principalmente no continente americano. São encontradas na América do Sul (SEZERINO *et al.*, 1998; SCHENONE, 1998), América do Norte (FUTRELL, 1992; ESCALANTE-GALINDO *et al.*, 1999), Europa (NICHOLSON e GRAUDINS, 2003), África (FUTRELL, 1992; NICHOLSON e GRAUDINS, 2003), Oriente Médio e algumas regiões da Ásia (NICHOLSON e GRAUDINS, 2003), Israel (BORKKAN *et al.*, 1995; COHEN *et al.*, 1999) e Austrália (YOUNG e PINCUS, 2001; NICHOLSON e GRAUDINS, 2003). Existem mais de 50 espécies nas Américas do Norte e do Sul (FUTRELL, 1992; da SILVA *et al.*, 2004).

GERTSCH e ENNIK (1983) fizeram uma revisão do gênero *Loxosceles*, descrevendo as espécies que ocorrem no continente americano. Citaram 18 espécies para a América do Norte, América Central e Antilhas, e 30 espécies para a América do Sul. No Brasil ocorrem 7 espécies, que são *L. gaucho* em São Paulo e Rio Grande do Sul; *L. similes* na Paraíba, São Paulo e Minas Gerais; *L. adelaide*, no Rio de Janeiro; *L. hirsuta* no Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná; *L. intermedia* do Rio Grande do Sul ao Rio de Janeiro; *L. amazonica* no Amazonas e Ceará e *L. laeta* encontrada na região sul e leste. No Sul e Sudeste do Brasil as espécies *L. gaucho*, *L. laeta* e *L. intermedia* são as predominantes.

1.4 Loxoscelismo no Estado do Paraná

No Brasil o Loxoscelismo não é muito freqüente, com exceção do Estado do Paraná, particularmente em Curitiba e Região Metropolitana. No Paraná, na região de Curitiba, no ano de 2002 foram registrados 4268 casos de notificações por acidentes causados por aranhas do gênero *Loxosceles*, em 2003 o total de acidentes chegou a 5219, no ano de 2004 foram 5416 e em 2005 ocorreram 4423 casos (comunicação pessoal da 2ª Regional de Saúde do Estado do Paraná, que abrange Curitiba e Região Metropolitana).

Conforme foi verificado, a espécie predominante é a de *L. intermedia* mas, em algumas regiões, pode-se encontrar em menor população as espécies *L. laeta*

e *L. gaucho*. É provável que o aumento do número de acidentes envolvendo a aranha marrom em Curitiba e região Metropolitana nos últimos anos deva-se a desequilíbrios ambientais e ecológicos, tais como desmatamentos e extinção de predadores naturais, o que poderia impedir a manutenção da densidade populacional da espécie em níveis estáveis (BARBARO *et al.*, 1995).

1.5 As características clínicas do envenenamento por aranhas do gênero *Loxosceles*

Os acidentes com *L. intermedia* representam hoje um sério problema de saúde para o Estado do Paraná, devido ao elevado índice de morbidade e às seqüelas estéticas e funcionais que podem advir dos acidentes. Há muita dificuldade em enfrentar as lesões, pelo desconhecimento existente em relação às características do veneno dessa aranha, o que provoca longos períodos de tratamento, com freqüente recorrência e/ou evolução do processo que pode culminar com a perda do órgão afetado. Em casos onde o processo torna-se sistêmico, o quadro em geral evolui para uma insuficiência renal aguda (IRA), tendo sido registrado vários óbitos, principalmente entre crianças e/ou pessoas de saúde delicada ou idosos (BARBARO, *et al.*, 1995, da SILVA *et al.*, 2004).

As aranhas do gênero *Loxosceles* provocam um conjunto de sinais e sintomas nos acidentados denominado loxoscelismo, o qual pode gerar dois tipos de quadros clínicos distintos: o quadro cutâneo ou dermonecrótico e o quadro cutâneo-visceral ou sistêmico. O desenvolvimento de um ou outro quadro, ou de ambos vai depender de alguns fatores relacionados com o indivíduo acidentado, como estado nutricional, idade, local da picada, quantidade de veneno inoculado, susceptibilidade ao veneno e o tempo que esse indivíduo leva para procurar um tratamento adequado (GAJARDO-TOBAR, 1966; SCHENONE *et al.*, 1989; BARBARO *et al.*, 1994a; da SILVA *et al.*, 2004).

1.6 Quadro Dermonecrótico ou Cutâneo

O quadro cutâneo caracteriza-se por dermonecrose no local da inoculação do veneno (REES, *et al.*, 1984). A picada inicial, por ser pouco dolorosa, geralmente passa despercebida pelo paciente, após 2 a 8 horas, a dor pode variar de moderada a severa e é descrita como dor local do tipo “queimação” ou ardência. Pode ser acompanhada por prurido, edema, eritema, sensação de mal-estar geral e podendo em alguns casos ocorrer febre. Em seguida, pode surgir uma lesão de 1 a 30 cm de diâmetro, circundada por um halo vermelho e uma zona pálida, denominada placa marmórea (RODRIGUES *et al.*, 1986; FUTRELL, 1992). Após 3 a 5 horas do acidente pode ocorrer acúmulo de leucócitos polimorfonucleares, os quais participam do surgimento e desenvolvimento do quadro dermonecrótico (FUTRELL, 1992; OSPEDAL, *et al.*, 2002, da SILVA *et al.*, 2004). Em alguns casos a lesão cutânea necrótica evolui em 2 a 6 semanas, com formação de uma escara de difícil cicatrização e pode dar origem a seqüelas deformantes de importância (FUTRELL, 1992., da SILVA *et al.*, 2004).

Por razões óbvias, não foram executadas biópsias consecutivas do desenvolvimento do loxoscelismo cutâneo em humanos. Porém, as mudanças histopatológicas informadas incluem edema e espessamento do endotélio dos vasos sanguíneos, presença de células inflamatórias, vasodilatação, coagulação intravascular, degeneração da parede dos vasos sanguíneos, hemorragia dérmica e até mesmo subcutânea (FUTRELL, 1992, da SILVA *et al.*, 2004).

O estudo histopatológico detalhado da dermonecrose induzida por veneno de *L. intermedia* em coelhos mostra aparecimento de injúria tecidual a partir de 4 horas após a injeção do veneno chegando a um pico máximo de dano tecidual, inclusive com lise dos tecidos mais profundos que a derme (mionecrose e necrose coagulativa) em 5 dias, com aparecimento de tecido conjuntivo de reparo (OSPEDAL *et al.*, 2002), além de lesão de vasos sanguíneos com aparecimento de bolhas no endotélio, fibrinogénólise e trombose (VEIGA, *et al.*, 2001 a; VEIGA, *et al.*, 2001b; ZANETTI *et al.*, 2002).

A necrose formada pode ser determinante para o advento de outros problemas, como por exemplo, a contaminação secundária da ferida por agentes bacterianos e fúngicos patogênicos. Estudos recentes têm mostrado que a

contaminação da lesão dermonecrótica com microrganismos anaeróbios tais como *Clostridium perfringens*, presentes na própria quelícera da aranha, pode potencializar o efeito dermonecrótico do veneno (MONTEIRO *et al.*, 2002).

Efeitos da ativação plaquetária induzidos pela toxina da aranha marrom na microcirculação podem ser responsáveis pela trombose vascular, isquemia tecidual e perda da pele no local da picada (FUTRELL, 1992., da SILVA *et al.*, 2004). Além disso, componentes plasmáticos também parecem ser requeridos para efeitos nocivos do veneno (REES *et al.*, 1988).



Figura 2: Lesão dermonecrótica em coelho provocada pelo veneno de *L. intermedia*. Seta indica o local onde foi injetado o veneno e cabeça de seta indica que houve espalhamento gravitacional.

1.7 Quadro cutâneo-visceral ou sistêmico

O loxoscelismo cutâneo-visceral é menos freqüente, atingindo 14% dos casos e com as primeiras manifestações ocorrendo geralmente nas primeiras 24 horas pós-acidente (SCHENONE e LETONJA, 1975; MARTINEZ-VARGAS, 1987; SCHENONE, 1989; FUTRELL., 1992; COUTINHO, 1996; da SILVA *et al.*, 2004). Este inclui o aparecimento de astenia, febre, cefaléia, alterações sensoriais, insônia, podendo chegar eventualmente ao coma. As manifestações sistêmicas incluem alterações no quadro hematológico, podendo chegar a coagulação intravascular disseminada, agregação plaquetária e anemia hemolítica (FORRESTER *et al.*, 1978; BASCUR *et al.*, 1982; RESS *et al.*, 1988, da SILVA *et al.*, 2003; da SILVA *et al.*, 2004).

Estudos histopatológicos analisaram efeitos do veneno da “aranha-marrom”, e nestes foram observados a oclusão de vênulas e artérias, tanto em lesões humanas como em coelhos. Além disso, nos pacientes que foram a óbito em consequência do loxoscelismo sistêmico, as autópsias realizadas, mostraram alterações degenerativas nos parênquimas de vários órgãos. Edema, congestão, hemorragia e erosões da mucosa digestiva, estavam presentes e associados a estas lesões, além de lesões tubulares renais do tipo nefrose hemoglobinúria (PIZZI, *et al.*, 1957; SCHENONE e LETONJA, 1975; SCHENONE, 1989). PIZZI *et al.* (1957) verificaram que em órgãos como o pulmão, fígado e rins ocorriam efeitos sobre os vasos sanguíneos (vênulas e artérias). MARTINEZ-VARGAS, 1987 relata que em 62% dos casos de loxoscelismo cutâneo-visceral, o rim acha-se comprometido, atingindo o estado de insuficiência renal aguda (IRA). COUTINHO (1996) em animais inoculados verificou a presença de hemólise intravascular, diminuição do hematócrito e elevação dos níveis plasmáticos de bilirrubina.

Experimentos de imunomarcção e microscopia confocal, mostraram a ligação de toxinas do veneno à membrana basal glomerular de rins de camundongos tratados com veneno (LUCIANO *et al.*, 2004). Membranas basais desempenham diversas funções vitais, tanto em tecidos embrionários, como em adultos, em condições normais e patológicas. No caso específico da membrana basal glomerular, está estabelecido que a mesma aja como uma barreira seletiva, regulando a filtração, tanto em carga quanto em tamanho de moléculas do plasma que passam pelo espaço urinário; e que os sítios aniônicos regularmente distribuídos na mesma são representados por proteoglicanos e glicosaminoglicanos, principalmente heparan sulfato e ácido hialurônico. Sendo as membranas basais, estruturas fundamentais dos glomérulos renais (estruturas envolvidas na formação da urina), o efeito degradativo que ocorre com seus constituintes, poderia explicar, em parte, os problemas renais provocados pelo veneno (VEIGA *et al.*, 1999; LUCIANO *et al.*, 2004). Assim, a ausência de proteoglicanos ou um bloqueio de suas funções, influencia o processo de filtração renal, levando em geral a situação de proteinúria.

COUTINHO (1996) verificou também intensa proteinúria nos animais envenenados, sugerindo que esta alteração é decorrência de alterações na membrana basal glomerular. COUTINHO (1996) também afirma que o efeito

hemolítico contribui decididamente na injúria renal, sugerindo uma resposta patológica, representada pela redução do ritmo de filtração glomerular, desencadeando a IRA.

CHAIM *et al.*, 2006; estudou o efeito do veneno de *L. intermedia* associando a ação “in vitro” e “in vivo” da toxina recombinante LiRecDT1 (família esfingomielinase-D) sobre o modelo renal e observou o efeito citotóxico, sugerindo, desta forma, que estas toxinas têm ação direta sobre o tecido renal.

1.8 Ação do veneno do gênero *Loxosceles* nos vasos sanguíneos

Estudos experimentais histológicos realizados por vários autores relatam edema difuso com extravasamento de leucócitos e eritrócitos de intensidade variável, necrose de extensão variável da epiderme, acompanhada de vacuolizações das células da camada basal. Os vasos sanguíneos de pequeno porte apresentam necrose, arterite e trombose.

PIZZI *et al.* (1957) fizeram o primeiro estudo sistemático e detalhado das lesões histológicas produzidas experimentalmente pelo veneno de *Loxosceles laeta*. O estudo das lesões locais, em cobaias e coelhos, demonstrou a existência precoce de intensas alterações vasculares, caracterizadas essencialmente por vasoconstrição inicial das arteríolas e posteriormente, por vasodilatação acentuada. A parede dos vasos da área afetada foi intensamente comprometida, apresentando fenômenos degenerativos e trombóticos. Nas primeiras horas a formação de um intenso edema com extravasamento de células sanguíneas, inclusive eritrócitos.

Em estudos realizados em coelhos, com veneno de *L. laeta* e *L. reclusa*, as amostras histopatológicas mostraram após 3 horas, o acúmulo de leucócitos polimorfonucleares ao redor de vênulas e eritrócitos extravasculares sugerindo perda de integridade vascular. Nas arteríolas foi verificado somente edema de células endoteliais. Após 6 horas, havia edema da derme e epiderme, infiltração de leucócitos polimorfonucleares nas paredes das vênulas, vasodilatação, coagulação intravascular, hemorragia volumosa subcutânea, e até mesmo no músculo, necrose, vacuolização das paredes das arteríolas e destruição da integridade das

mesmas. Após 48 horas, o infiltrado de leucócitos polimorfonucleares continua crescendo (SMITH e MICKS, 1970; FUTRELL, 1992; OSPEDAL *et al.*, 2002).

Por outro lado, PIZZI *et al.* (1957) salientaram ainda, que a intensidade das lesões locais esteve, em geral, em relação inversa com a severidade das lesões de outros órgãos (rim, pulmão, S.N.C., etc) e com a gravidade do envenenamento. Com isso, inferiram que as importantes alterações vasculares locais, assim como a grande intensidade do edema, poderiam ser fatores que impediriam uma rápida ação sistêmica do veneno. Células inflamatórias (especialmente polimorfonucleares) acumuladas no local do envenenamento exercem alguma atividade nesta função (PATEL *et al.*, 1994). De acordo com SMITH E MICKS (1970), a infiltração leucocitária precoce nos vasos sanguíneos no local da picada, implicando em injúria dos vasos sanguíneos, foi considerada como patologia base para a perda da pele.

1.9 Características bioquímicas dos venenos de *L. intermedia*

O veneno da “aranha-marrom”, gênero *Loxosceles* é um líquido protéico, produzido por glândulas apócrinas situadas no cefalotórax do animal, as quais comunicam-se com o exterior através do aparelho inoculador, constituído por um par de quelíceras (GAJARDO-TOBAR, 1966; MARTINEZ-VARGAS, 1987; dos SANTOS *et al.*, 2000, da SILVEIRA *et al.*, 2002).

A atividade biológica de três espécies de aranhas do gênero *Loxosceles* no sul do Brasil foi estudada por BARBARO *et al.* (1996), os quais reconheceram que o veneno de *L. intermedia* é o mais letal para camundongos, seguido do veneno de *Loxosceles gaucho* e finalmente o veneno de *L. laeta*.

Nas aranhas do gênero *Loxosceles* o veneno apresenta alguma ação enzimática proteolítica e por isso pode ser comparado a alguns venenos de serpentes, onde os estudos demonstraram a presença de enzimas em sua composição (MARTINEZ-VARGAS, 1987). No gênero *Loxosceles* a presença destas proteases foi detectada no extrato da glândula de *L. intermedia* descartando-se a contaminação por egesto digestivo, que poderia estar presente na coleta por eletrochoque (da SILVEIRA *et al.*, 2002). Vários constituintes incluindo hialuronidases, serino proteases, metaloproteases e esfingomielinase-D

foram identificadas no gênero *Loxosceles* (FUTRELL, 1992; FEITOSA *et al.*, 1998; VEIGA *et al.*, 2000a; YOUNG e PINCUS, 2001; da SILVA *et al.*, 2004). Esfingomielinase-D, ou toxina dermonecrótica, em condições de laboratório mostrou ser capaz de produzir hemólise, agregação plaquetária, distúrbios renais, dermonecrose em coelhos e resposta inflamatória no local da injeção (FUTRELL, 1992, da SILVA *et al.*, 2004; CHAIM *et al.*, 2006). Atualmente se sabe que a esfingomielinase-D compreende uma família de toxinas presentes nas espécies do gênero *Loxosceles* (FUTRELL, 1992; TAMBOURGI *et al.*, 1995; BARBARO *et al.*, 1996; da SILVA *et al.*, 2004; BINFORD *et al.*, 2005., CHAIM *et al.*, 2006).

Metaloproteases foram primeiramente identificadas no veneno de *L. intermedia* como descrito por FEITOSA *et al.*, 1998. Estes autores descrevem duas moléculas no veneno denominadas Loxolisina A (20-28 kDa) com atividades fibronectinolítica e fibrinogenolítica e Loxolisina B (32-35 kDa), com atividade gelatinolítica. As atividades fibronectinolítica, fibrinogenolítica e gelatinolítica dependentes de metaloproteases foram comprovadas por da SILVEIRA *et al* (2002) em extratos de glândulas de veneno de *L. intermedia* e *L. laeta*. ZANETTI *et al.*, 2002 descrevem a atividade fibrinogenolítica dependente de metaloprotease no veneno de *L. gaucho* e purificaram uma molécula de 30kDa com atividade fibrinogenolítica de aranhas do gênero *Loxosceles*. YOUNG e PINCUS (2001), estudando o veneno de *L. rufescens* descrevem metaloproteases com atividades caseinolíticas, gelatinolíticas e fibrinogenolíticas. Duas outras atividades proteolíticas também foram descritas no veneno de *L. intermedia*. Veiga *et al* (2002) identificaram duas serino proteases (85 e 95kDa) e GASPARELLO-CLEMENTE (2002) e da SILVEIRA *et al* (2002) identificaram uma amino peptidase básica e prolildipeptidil aminopeptidase.

2. JUSTIFICATIVA

Em algumas localidades, tanto a freqüência dos acidentes causados por aracnídeos, quanto a evolução clínica dos quadros pode caracterizá-los como fator de interesse em nível de saúde pública (FUTRELL, 1992; da SILVA *et al.*, 2004; APPEL *et al.*, 2005). Nos últimos anos, o Estado do Paraná e em especial a região metropolitana de Curitiba, tem sido acometida por inúmeros acidentes causados por aracnídeos, popularmente conhecidos como “aranhas-marrom”. No Paraná os acidentes com aranhas, comparado a outros acidentes com animais peçonhentos, ocupa o primeiro lugar. Até o ano de 1999 a cidade de Curitiba e região metropolitana, vinha notificando aproximadamente 2.000 casos por ano de acidentes com aranhas do gênero *Loxosceles* (da SILVA *et al.*, 2004). Atualmente este número vem aumentando, à partir de 2002 ocorreram aproximadamente 4000 notificações por ano chegando a 4423 casos em 2005 (comunicação pessoal da 2ª Regional de Saúde do Estado do Paraná, que abrange Curitiba e Região Metropolitana).

Diante desta altíssima casuística que atinge o Estado do Paraná, o conhecimento científico sobre o modo de atuação do veneno deste animal, bem como um melhor aprendizado técnico-científico se faz necessário, o qual futuramente poderá propiciar soluções para esta endemia.

No nível celular e biomolecular a compreensão do loxoscelismo ainda deve ser amplamente estudada. Estudos mais recentes citados por APPEL *et al.*, (2005) evidenciaram que as toxinas dos venenos das aranhas do gênero *Loxosceles* são um grupo de proteínas com grande número de diferentes atividades. Atualmente estão ocorrendo muitos estudos que visam descobrir a ação destas toxinas e, conseqüentemente, o mecanismo pelo qual os venenos loxoscélicos causam a dermonecrose e efeitos sistêmicos como por exemplo alterações dos vasos sangüíneos e danos nos rins.

A ampliação do conhecimento sobre a ação das toxinas de venenos em diversas linhagens celulares tem sido uma tendência internacional na indústria farmacêutica tanto de forma direta ou como modelo para a elaboração de drogas. Países desenvolvidos buscam na biodiversidade de moléculas ferramentas para a construção de fármacos biologicamente ativos.

Diante da tão relevante importância clínica, faz-se pertinente um estudo da ação destes venenos, especificamente em linhagens RI (subendoteliais), sendo este o principal enfoque desse trabalho, acrescido do interesse biotecnológico.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais:

Avaliar os efeitos citotóxicos do veneno de *L. intermedia* sobre células subendoteliais.

3.2 Objetivos Específicos:

1. Avaliar as possíveis alterações morfológicas e ultraestruturais induzidas pelo veneno de *L. intermedia* em células RI.
2. Verificar se existe ligação de toxinas do veneno sobre a superfície de células RI submetidas ao tratamento.
3. Avaliar uma possível desorganização do citoesqueleto, especificamente dos microfilamentos de actina nas células RI submetidas ao tratamento com veneno.
4. Avaliar os efeitos do veneno sobre a viabilidade e proliferação das células RI.
5. Avaliar a degradação de moléculas de fibronectina pelo veneno e a importância desta molécula para a adesão das células RI.
6. Verificar a atividade citotóxica da proteína recombinante (dermonecrótica-LiRecDT1), quanto a alterações morfológicas sobre as células RI.
7. Produzir anticorpos que reconhecem a toxina recombinante LiRecMP1 (metaloprotease).

8. Com o emprego de anticorpos que reconhecem LiRecMP1 avaliar a função de metaloproteases na degradação da fibronectina causada pelo veneno de *L. intermedia*.
9. Com a utilização de anticorpos que reconhecem LiRecMP1 verificar a função de metaloproteases na formação de agregados celulares induzidos após a ação das toxinas do veneno sobre células RI.
10. Com a utilização de anticorpos que reconhecem LiRecMP1 verificar o papel de metaloproteases no aumento da permeabilidade capilar 'in vivo' induzida do veneno.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados neste trabalho indivíduos adultos de aranhas *L. intermedia* coletados em Curitiba e Região Metropolitana.

Camundongos suíços albinos pesando aproximadamente 20g adquiridos do Biotério Central da Universidade Federal do Paraná foram usados para a produção de anticorpos IgG policlonais contra veneno bruto de *L. intermedia* e contra a toxina LiRecMP1, assim como para ensaios de permeabilidade vascular.

Todos os protocolos experimentais utilizando animais foram realizados de acordo com os “Princípios dos cuidados com animal de laboratório” (NHI Publicação nº 85-23, revisado em 1985) e de acordo com os procedimentos do Comitê de Ética de Experimentação Animal do Setor de Ciências Biológicas da UFPR (Certificado nº 126 “Biodiversidade, toxinas e aplicações biotecnológicas”, responsáveis: Dr. Silvio Sanches Veiga, Dr. Oldemir Carlos Mangili e Dra. Célia Regina Cavichiolo Franco; comprovante em anexo à dissertação).

4.2 Reagentes

Anticorpos policlonais para as toxinas do veneno total de *L. intermedia* bem como para a toxina recombinante LiRecMP1 foram produzidos em camundongos de acordo com HARLOW e LANE, 1988; LUCIANO *et al.*, 2004. As placas de ELISA (96 poços) de plásticos Polysorp® e Maxysorp® foram obtidas da Nalgene Nunc International Corporation (Naperville, EUA). As cromatografias de afinidade (Proteína-G Sepharose, Proteína-A Sepharose) foram processadas por meio de resinas adquiridas da GE (Piscataway, EUA). Os anticorpos secundários conjugados com fosfatase alcalina e peroxidase que reconhecem IgG de camundongo, bem como os adjuvantes completo e incompleto de Freund, marcadores de massa molecular para SDS-PAGE, o corante azul de Coomassie, e a albumina de soro bovino foram adquiridos da Sigma (Saint Louis, EUA). Soluções para o preparo dos meios de cultura (F12) também foram adquiridas da Sigma e da Cultilab (Campinas, Brasil). Os substratos cromógenos OPD (reação da

peroxidase) foram obtidos da Gibco BRL (Bethesda, EUA). A água oxigenada analítica foi proveniente da Merck (Damstadt, Alemanha). O corante Azul de Evans foi adquirido da Vetec (São Paulo, Brasil), formamida da Merck. A fibronectina foi obtida a partir de plasma humano por cromatografia de afinidade em gelatina-sepharose (Sigma) como descrito por ENGVALL e RUOSLAHTI, 1977. Outros reagentes que se fizeram necessários, foram obtidos de fornecedores confiáveis como, Gibco, Amersham Biosciences, Merck, Bio-Rad Laboratories, entre outros.

4.3 Produção de anticorpos policlonais

Visando a obtenção de anticorpos policlonais que reconheçam as proteínas do veneno da aranha marrom e as proteínas recombinantes com possíveis atividades tóxicas, camundongos BALB-c foram sensibilizados com injeções de emulsão de veneno de aranha marrom (10 μ g) e/ou proteínas recombinantes (10 μ g) divididas em duas inoculações de 50 μ L cada (vias intraperotinal IP e subcutânea SC). Antecedendo a imunização o sangue dos animais foi coletado (soro pré-imune). Com o auxílio de uma pipeta *Pasteur* de vidro, introduzida na conjuntiva de um dos olhos do animal, recolheu-se cerca de 300 μ L de sangue. Foi utilizado adjuvante de Freund completo na primeira sensibilização, seguido de reforços, em média a cada 21 dias, com adjuvante de Freund incompleto ou óleo mineral estéril. A resposta imunológica foi avaliada coletando-se sangue da conjuntiva (veia ocular). O sangue total era mantido por 16 horas à 4°C para adquirir a retração do coágulo e facilitar a separação do soro por centrifugação (5 minutos a 3000rpm). O material obtido foi, então, armazenado em microtubos à -80°C (HARLOW e LANE, 1988).

4.4 Purificação de anticorpos

Anticorpos que reconhecem a metaloprotease LiRecMP1 e anticorpos de soro normal de camundongo, foram purificados respectivamente a partir de uma mistura de soros de camundongos BALB-c imunizados com esta toxina recombinante purificada, ou uma mistura de soros de camundongos pré-ímenes. Os soros foram

cromatografados numa mistura de resinas contendo proteína-A e proteína-G na proporção de 1:1 (Sigma) por 16 horas. As imunoglobulinas foram eluídas das resinas com glicina 0,1M pH 3,0 e tiveram suas concentrações determinadas por espectrofotometria em 280nm. As imunoglobulinas hiperimunes ou pré-imunes foram aliqüotadas em soluções de 1mg/mL previamente neutralizadas a pH 7,0 com Tampão Tris 1M pH 9,0.

4.5 Imunoensaio por ELISA

Primeiramente foram adicionados antígenos à placa de ELISA, os poços sensibilizados com 50 μ L da solução de veneno de *L. intermedia* e/ou solução de proteína recombinante metaloprotease (10 μ g/poço) à temperatura ambiente por 16 horas. Retirada essa solução por inversão, adicionava-se 100 μ L de PBS-molico 3% para bloquear sítios inespecíficos o qual permanecia por duas horas à temperatura ambiente. Após, três lavagens com 200 μ L de solução PBS-Tween 0,01%.

A segunda etapa consistia na incubação dos anticorpos primários a serem avaliados, tendo como controle negativo os soros pré-imunes dos animais. Depois de bloqueada com PBS-molico 3% a placa era exposta à incubação por duas horas à temperatura ambiente e então lavada três vezes com PBS-Tween 0,01%.

Posteriormente incubava-se a placa com anticorpos secundários anti-imunoglobulina de camundongo conjugado com peroxidase durante duas horas à temperatura ambiente e ao abrigo de luz. A revelação era feita com OPD (o-fenilenodiamina) (50 μ L/poço, 1mg/mL de tampão citrato pH 4,5 com 1 μ L de H₂O₂ /2,5mL de solução), em torno de cinco minutos à temperatura ambiente e ao abrigo de luz. As reações foram interrompidas pela adição de H₂SO₄ 3N (50 μ L/poço). Fazia-se então a leitura no aparelho de ELISA (Automated Microplate Reader ELX 800 – Bio-Tek® Instruments, Los Angeles, EUA) a 492nm (HARLOW E LANE, 1988).

4.6 Reações de Imunoblotting

Para análise da presença da toxina imunologicamente análoga a LiRecMP1 no veneno nativo de *L. intermedia* foram realizados ensaios de imunoblotting. Para tanto as proteínas do veneno total nativo bem como a proteína recombinante LiRecMP1 foram transferidas para membranas de nitrocelulose, durante a noite, como descrito por TOWBIN *et al.* (1979). As fitas de nitrocelulose, contendo o material para análise, foram previamente bloqueadas com tampão PBS/Molico (ou PBS/ leite desnatado) 5% (p/v), por uma hora, e incubadas por 2 horas à temperatura ambiente e sob agitação constante em soro policlonal adequado diluído em PBS/Molico 5% (p/v) em diluição apropriada, lavado 5 vezes com o mesmo tampão, mas sem o soro, sendo posteriormente, a reação revelada com anticorpo conjugado com fosfatase alcalina que reconhece imunoglobulinas de camundongos e os cromógenos BCIP/ NBT, conforme a metodologia descrita na metodologia de WB (VEIGA *et al.*, 1995).

4.7 Extração do veneno loxoscélico por eletrochoque

O veneno de *L. intermedia* foi obtido de aranhas adultas mantidas em condições apropriadas e submetidas a eletrochoque de 15 volts no cefalotórax (FEITOSA *et al.*, 1998). Após a coleta, os venenos foram mantidos à temperatura de -80°C até o momento do uso.

4.8 Esterilização de materiais

Todo material de vidro que foi utilizado para os procedimentos de cultivo de células foram esterilizados em autoclave vertical (Phoenix, São Paulo, Brasil) à 120°C, durante 40 minutos, à 1 atm.

4.9 Dosagem de proteínas

A dosagem da concentração de proteínas presentes no veneno de *L. intermedia* bem como das proteínas recombinantes e da fibronectina foi feita pelo método do Azul de Coomassie como descrito por BRADFORD (1976). A leitura do produto das reações colorimétricas foi feita através de leitor de ELISA em placa de 96 poços (microensaio), adaptação que aumenta a sensibilidade do método.

4.10 Linhagem celular e condições de cultivo

Para o desenvolvimento deste trabalho foi utilizado a linhagem celular RI - subendotelial (célula muscular lisa de aorta de coelho) (BUONASSISI e VENTER, 1976), cedidas pela Profa Dr^a. Helena Bonciani Nader – UNIFESP). A referida linhagem foi mantida em meio F₁₂ com L-glutamina, desprovido de bicarbonato de sódio, comercializado pela Gibco BRL, (Grand Island, NY, USA), com 10% de soro fetal bovino (SFB), adquirido da Cultilab, acrescido de sulfato de gentamicina (GARAMICINA-fabricado pela indústria Schering Corporation, EUA, adquirida em farmácia comercial) na concentração de 40mg/mL. O meio com antibiótico foi esterilizado com membrana de acetato de celulose 0,22 µm, modelo Seterifi D-6S da Millipore Corp. (Bedford, MA, USA).

A linhagem foi mantida em estufa (SANYO, modelo MCO-1SAC, Tóquio, Japão), à 37°C, com uma atmosfera de 5% CO₂.

Os subcultivos foram realizados após as células atingirem a confluência. As células foram primeiramente lavadas com solução de EBSS-solução salina balanceada de Earle (6,8g NaCl; 0,4g KCl; 1,14g Na₂HPO₄; 0,2g KH₂PO₄; 0,14g Na₂HPO₄ x 1 H₂O; 2,2g NaHCO₃; da Merck, 1,0g D-glucose e 0,01g de Vermelho Fenol da Sigma, em um litro de água destilada, previamente passada em um Sistema de purificador de água modelo Permutation (Curitiba, Brasil), sem cálcio e sem magnésio. A seguir, adiciona-se a enzima viocase diluída em solução de EBSS em uma concentração de (1:9). O complexo enzimático de pancreatina (viocase) é composto por collagenases, elastases, esterases, nucleases e peptidases. Este complexo enzimático é extraído do pâncreas suíno e foi adquirido

da Gibco Life Technologies. As células permaneceram sob ação enzimática por um período de 10 minutos. Decorrido este período, foram coletadas por centrifugação e re-suspensas em meio F₁₂, posteriormente as mesmas foram re-suspensas no mesmo meio acrescido de 10% de SFB. Permaneceram em cultura até atingirem a confluência, havendo troca do meio de cultura a cada 2 dias. Todas as células foram cultivadas em garrafas de 75, 100 ou 150 cm² da (TPP, Trasadingen, Suíça) bem como em Placas para cultura de células de poliestireno de 60 x 10mm ou 35 x 10mm de diâmetro (P-60/P-35) da TPP.

Estoques celulares foram armazenados em frascos de congelamento da TPP em meio de congelamento composto de 40% de meio F₁₂, acrescido de 50% de soro fetal bovino e 10 % de DMSO-(dimetilsulfóxido da Aldrich Chemical Company, Inc. Milwaukee, WI, EUA). O protocolo empregado para o congelamento celular, consistia em manter as células à 4°C por 10 minutos, 16 horas à a -80°C e, posteriormente, estas foram devidamente armazenadas em “container” de nitrogênio líquido.

4.11 Ação do veneno total sobre a morfologia de células RI

As células RI foram mantidas em cultura, após removidas das garrafas de cultivo com solução de pancreatina diluída 1:9 à 37°C por 10 minutos. Posteriormente foram lavadas duas vezes com meio F₁₂ contendo 10% de Soro Fetal Bovino, e quantificadas em Câmara de Neubauer. Padronizou-se para o experimento $0,3 \times 10^2$ células, as quais foram colocadas em placa de 24 poços.

A placa contendo as células foi colocada em estufa à 37°C e 5% de CO₂ por 40 minutos, tempo para que as células pudessem aderir sobre a lamínula. Posteriormente, os poços foram preenchidos com 500 µL de meio F₁₂ onde permaneceram por cinco dias em cultura. Após este período as células de alguns poços foram mantidas com meio de cultura sem veneno enquanto outras foram expostas a veneno diluído em meio de cultura a uma concentração de 10, 25, 40 e 100µg/mL por 24, 48 e 72 horas.

Ao completar 24, 48 e 72 horas as células foram fotografadas em microscópio invertido (Leica – DMIL, Wetzlar, Alemanha).

4.12 Ação da proteína recombinante dermonecrótica (LiRecDT1) sobre células RI

Células RI, mantidas sob as condições de cultura já descritas foram plaqueadas em uma placa de 24 poços com uma densidade de $0,3 \times 10^3$ células por poço onde permaneceram por cinco dias em cultura.

Alguns poços foram mantidos com meio de cultura sem veneno enquanto em outros foi acrescentado veneno diluído em meio de cultura nas concentrações de 10, 25, 40 e $100 \mu\text{g/mL}$ da proteína recombinante dermonecrótica (LiRecDT1) por 24, 48 e 72 horas.

Após o tratamento as células foram fotografadas em microscópio invertido (Leica).

4.13 Inibição da atividade proteolítica do veneno loxoscélico por anticorpos hiperimunes que reconhecem LiRecMP1

Células RI, plaqueadas a uma densidade de $0,5 \times 10^3$, mantidas por quatro dias em cultura foram tratadas com $2 \mu\text{g/mL}$ de veneno na presença de anticorpos purificados pré-ímunos ou hiperimunes para LiRecMP1 (100 e $200 \mu\text{g}$), por duas horas à temperatura ambiente. Como controle positivo da ação do veneno sobre células RI, estas foram incubadas com veneno ($2 \mu\text{g/mL}$) na ausência de qualquer anticorpo. Como controle da qualidade da cultura, células RI foram mantidas somente na presença do substrato de cultura (controle negativo). Todos os ensaios foram realizadas em triplicata. Depois de 4 horas foram observadas as alterações morfológicas induzidas pelo veneno. As células foram fotografadas em microscópio invertido (Leica).

4.14 Ensaios de Imunofluorescência

Células RI foram plaqueadas em placas de 24 poços sobre lamínulas esterilizadas (13mm de diâmetro) na densidade de $0,3 \times 10^3$ células durante um período de cinco dias. Posteriormente as células foram expostas ao veneno na concentração de $40 \mu\text{g/mL}$ por 3 e 24 horas. Em todos os ensaios foram realizados

controles negativos em que as células RI foram mantidas apenas em meio de cultura F12. Após o tratamento, as células foram fixadas com uma solução de paraformaldeído 2% diluído em PBS por 30 minutos e depois lavadas 10 vezes em PBS. Radicais aldeídicos foram bloqueados com solução de glicina 0,1M por 2 minutos, posteriormente foram feitas 10 lavagens em PBS. Sítios inespecíficos foram bloqueados empregando uma solução de PBS/BSA1% por 20 minutos. Após o bloqueio, os poços foram lavados 10 vezes com PBS. Após a fixação as células foram incubadas com anticorpos conjugados de acordo com a descrição a seguir.

4.14.1 Ligação de toxinas do veneno na superfície celular

Após a realização dos procedimentos descritos acima as células foram então incubadas durante 1 hora com anticorpos policlonais produzidos em camundongos que reconhecem as toxinas do veneno. Em seguida as células foram incubadas por 40 minutos com anticorpo secundário conjugado com TexasRed (Molecular Probes, Eugene, EUA), para evidenciar a localização do veneno sobre as células. Simultaneamente foi feita marcação do núcleo com Sytox Green 1:100 (Molecular Probes) por 2 minutos, seguido de 10 lavagens com PBS. Depois das 10 lavagens com PBS as lamínulas foram mergulhadas rapidamente em água destilada, e então impostas sobre uma lâmina contendo uma gota de fluormont-G (EMS Science, Hatfield, EUA) diluído em PBS (2 partes de fluormont-G para 1 parte de PBS). Posteriormente, as lamínulas foram armazenadas à 4°C e observadas no microscópio confocal (Confocal Scanning System Radianes 2100 BioRad) e em fotomicroscópio Axio Phot (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha).

4.14.2 Comprometimento do citoesqueleto em células RI tratadas com o veneno

Após as 10 lavagens em PBS descritas acima no protocolo geral de imunofluorescência, as células foram então incubadas durante 20 minutos com faloidina conjugada com Alexa-Flúor 488 (Molecular Probes), para evidenciar os filamentos de actina (microfilamentos do citoesqueleto). Simultaneamente foi feita

marcação do núcleo com DAPI (Molecular Probes) por 2 minutos, seguido de 10 lavagens com PBS.

As lamínulas foram retiradas da placa de 24 poços, mergulhadas em água destilada, e colocadas sobre uma lâmina com uma gota de fluormont-G (EMS Science) diluído em PBS (2 partes de fluormont-G para 1 parte de PBS). Posteriormente, as lamínulas foram armazenadas à 4°C e observadas no microscópio confocal (Confocal Scanning System Radianes 2100 BioRad).

4.15. Ensaios de Microscopia Eletrônica De Varredura

4.15.1 Ação do veneno sobre a morfologia celular

Células RI em uma densidade de $0,5 \times 10^4$ células por poço foram plaqueadas em uma placa de 24 poços sobre lamínulas esterilizadas (13mm de diâmetro).

Após um período de quatro dias em cultura as células de alguns poços foram expostas a uma concentração de 40µg/mL de veneno por 4 horas. Como controle negativo as células de alguns poços permaneceram apenas sobre o substrato de cultura.

Após o período de tratamento com veneno as células foram lavadas em tampão cacodilato 0,1M , pH 7,4 e fixadas por 60 minutos em glutaraldeído 2,5% acrescido de tampão cacodilato. Depois foram novamente lavadas em tampão cacodilato e posteriormente desidratadas em concentrações crescentes de etanol a fim de que fosse realizado o ponto crítico em CO₂ e metalização em ouro.

Após os procedimentos realizados acima, as células foram observadas com um Microscópio Eletrônico de Varredura JEOL J.S.M – 6360 L.V. (Mariland, EUA).

4.16 Ensaios de Citometria De Fluxo

4.16.1 Análise da ligação das toxinas do veneno na superfície celular

Após a manutenção das células RI em cultura em atmosfera de 5% de CO₂ à 37° C, as células foram soltas das garrafas e re-suspensas em meio de cultura (grupo controle) ou meio de cultura acrescido de veneno (40µg/mL) em uma densidade de 1x10⁶ células/mL. As células foram mantidas em rotação por 3h nas condições de cultivo. Após tratamento com PBS/BSA 1% elas foram incubadas com anticorpos policlonais IgG produzidos em camundongos que reconhecem as toxinas do veneno de *L. intermedia* (1:1000). Após 10 lavagens com PBS as células foram incubadas com PBS/BSA 1% e posteriormente tratadas com anticorpo secundário conjugado Alexa-488 que reconhece IgG de camundongo (1:250). Foram analisados 10.000 eventos para cada amostra no citômetro de fluxo FACScalibur (Becton-Dickinson Imunocitometria Systems, San Jose, CA, EUA – análise em programa FACScan. Para legitimar a ligação de toxinas do veneno à superfície de células RI, bem como a especificidade dos anticorpos primários utilizados, concomitantemente ao tratamento de células com veneno por um período de 3 horas, foram também tratadas células com veneno previamente incubado por uma hora com anticorpo policlonal anti-veneno de *L. intermedia* (1:1000) (ensaio de competição). Após o tratamento as células foram lavadas 10X em PBS, incubadas com anticorpo secundário conjugado Alexa Fluóor-488 (1:250) diluído em PBS/BSA1%, fixadas em paraformaldeído 1% e posteriormente a quantificação da fluorescência foi mensurada através do citômetro de fluxo. Foram analisados 10.000 eventos para cada amostra.

4.17 Ensaios de adesão celular à fibronectina

Placas de 24 poços de poliestireno, foram sensibilizadas por 2 horas em estufa à 37°C, 5% CO₂, com fibronectina intacta diluída em PBS estéril numa concentração fixa de 10µg/mL (previamente padronizada). Posteriormente, a solução protéica contendo a fibronectina foi aspirada dos poços, estes foram então lavados com PBS estéril e bloqueados com solução de albumina 1% em PBS.

Parte dos poços foram incubados com veneno com uma concentração de 40µg/mL diluído em PBS estéril durante 2, 6 e 18 horas à 37°C. Após a incubação, esses poços foram novamente lavados com PBS estéril, os sítios inespecíficos foram então bloqueados com BSA 1%, diluído em PBS estéril por 1 hora à 37°C, 5% CO₂. Poços controles, não sensibilizados com fibronectina, e contendo apenas uma solução de albumina 1% (BSA) foram utilizados como controle negativo e poços contendo fibronectina intacta foram utilizados como controle positivo da adesão.

Para esse ensaio células RI foram mantidas em cultura conforme descrito anteriormente, durante 5 dias, após esse período as células foram removidas das garrafas com solução de pancreatina diluída 1:9 à 37°C por 10 minutos, lavadas duas vezes com meio F12 contendo 10% de soro fetal bovino, e quantificadas em Câmara de Neubauer. Parte das células foram colocadas para aderir em substrato de fibronectina tratado previamente com veneno ou nos poços sensibilizados com BSA (controle negativo). Concomitantemente a sensibilização dos poços, algumas células foram tratadas por 2, 6 e 18 horas, à 37°C com veneno na concentração de 40µg/mL diluído em meio F12 e posteriormente colocadas para aderir em substrato de fibronectina intacto. Padronizou-se para este ensaio um total de 5x10⁴ células por poço.

Após 4 horas de adesão, as células não aderidas foram removidas por aspiração, posteriormente submetidas a lavagens sucessivas com PBS estéril. As células aderidas foram fixadas com metanol por 10 minutos, coradas com Cristal Violeta 0,8% dissolvido em metanol 20% por 20 minutos à temperatura ambiente e só então lavadas 10 vezes com PBS. O corante foi eluído tratando as células com 1mL de citrato de sódio 0,1M, 50% em etanol, por 30 minutos. A concentração do corante de cada poço foi quantificada por leitura de absorvância a 550nm, em Leitor tipo ELISA.

As absorvâncias dos corantes contidos nas células aderidas em cada poço foram expressas em relação ao grupo controle negativo (adesão sobre a albumina). Cada variável foi processada em quadruplicata.

4.18 Ensaios de Viabilidade Celular

4.18.1 Azul de Trypan

Após a manutenção das células RI em cultura, as células foram soltas das garrafas e re-suspensas em meio de cultura. Após removidas das garrafas de cultivo foram quantificadas em Câmara de Neubauer. Padronizou-se para o experimento $0,5 \times 10^4$ células para cada poço de uma placa com 24 poços. As placas contendo as células foram colocadas em estufa à 37°C e 5% de CO₂ por 40 minutos. Posteriormente, os poços foram preenchidos com 500 µL de meio F₁₂ onde permaneceram por 24 horas em cultura. Após este período as células foram deixadas por 6 horas com meio de cultura desprovido de Soro Fetal Bovino. Posteriormente foi colocado em todos os poços, meio de cultura acrescido de 10% de Soro Fetal Bovino. Decorrido um tempo de 16 horas as células foram incubadas com o veneno de *L. intermedia* (40mg/mL) a fim de que permanecessem por 24, 48 e 72 horas sob tratamento. Após cada período de tratamento as células foram lavadas em EBSS, deslocadas da placa com pancreatina (viocase) 1:9 e re-suspensas em PBS. A seguir adicionou-se o corante Azul de Trypan e as células foram contadas na Câmara de Neubauer em microscópio invertido (Leica). Os ensaios foram realizados em pentaplicata. O percentual de viabilidade foi calculado conforme:

$$CV(\%) = 100x (NC/NC + C)$$

onde:

CV = células viáveis;

NC = células não coradas;

C = células coradas pelo Azul de Trypan

4.19 Ensaios de Proliferação Celular

4.19.1 MTT

A proliferação celular foi avaliada através do ensaio de MTT (Sigma). Células RI foram plaqueadas em placas de 96 poços em uma densidade de $0,1 \times 10^3$. Após serem plaqueadas as células foram mantidas em meio de cultura acrescido de 10% de soro fetal bovino em estufa à 37°C com 5% de CO₂ por aproximadamente 24 horas. Posteriormente foi adicionado meio de cultura desprovido de soro fetal bovino para que todas as células sincronizassem na fase G₀ do ciclo celular. Após 24 horas, o meio foi aspirado e adicionou-se meio F12 acrescido de soro fetal bovino (10%). As células foram então incubadas com 2 e 20µg de veneno por 24, 48 e 72 horas. Após o tratamento das células o substrato de cultura foi retirado e então foi adicionado 3-(4,5-dimetilazil-2-il)-2,5 difenil tetrazólico (MTT) (Sigma) 500µg/mL dissolvido em PBS. Este método baseia-se na atividade metabólica de células viáveis, formando um produto colorido (sal formazan, que é insolúvel em água). Após incubação por 3 horas à 37°C em estufa com 5% de CO₂, o sobrenadante foi removido e o solvente DMSO foi adicionado para solubilizar os cristais de formazan formados. A absorbância da solução resultante foi determinada em leitor de microplaca (Bio-Rad) utilizando filtro de 550nm com referência em 655nm, onde o branco foi o DMSO. Os ensaios foram realizados em octuplicata.

4.20 Inibição da degradação da fibronectina pelo veneno de *L. intermedia* por anticorpos que reconhecem LiRecMP1

Amostras de veneno de *L. intermedia* na concentração de 5 µg/mL foram incubadas por duas horas com anticorpos pré-ímunes ou hiperímunes para a metaloprotease LiRecMP1 (100 e 200 µg) à temperatura ambiente. Posteriormente foi adicionado a cada uma das amostras 25µg de fibronectina. Como controle positivo para a degradação da fibronectina pelo veneno em uma das amostras foi adicionado veneno em uma concentração de 5 µg/mL e 25µg de fibronectina na ausência de qualquer anticorpo. Uma amostra contendo apenas 25µg de

fibronectina foi aplicada na ausência de veneno e de anticorpo pré ou hiperimune, para análise da estabilidade da fibronectina nas condições experimentais.

Todas as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE na concentração de 7,5% em condições redutoras como descrito por LAEMMLI *et al.* (1970).

4.21 Coloração de géis de poliacrilamida

Géis de poliacrilamida foram corados pelo Azul brilhante de Coomassie, com solução corante composta de Azul brilhante de Coomassie 0,02% (p/v), dissolvido em metanol 50% (v/v), ácido acético 10% (v/v) e água deionizada qsp 100% (v/v). Os géis foram mantidos nesta solução corante por vinte minutos à temperatura ambiente, sob agitação constante e descorados nas mesmas condições da coloração, com sucessivas trocas de solução descorante (metanol 50% (v/v), ácido acético 10% (v/v), água destilada qsp 100mL) (FAIRBANKS *et al.*, 1971).

4.22 Ensaio para verificação da alteração permeabilidade vascular induzida pelo veneno de *L. intermedia*

Com a finalidade de verificar alterações causadas por metaloproteases presentes no veneno de *L. intermedia*, amostras de veneno foram incubadas com anticorpos que reconhecem LiRecMP1 e testadas quanto ao aumento da permeabilidade vascular. Foram realizados ensaios utilizando o corante Azul de Evans em que proteínas extravasadas do plasma na pele de camundongos albinos tornam-se fortemente coradas em uma região extravascular. Primeiramente os camundongos albinos receberam por injeção intravenosa o corante Azul de Evans (Sigma) diluído em solução salina (30mg/Kg), 5 minutos antes das injeções contendo as amostras em análise. Amostras contendo 10 μ g de veneno total e 10 μ g de veneno total previamente incubado por 2 horas com anticorpos purificados que reconhecem LiRecMP1 ou imunoglobulinas purificadas de soro pré-imune (100 μ g), foram injetadas intradermicamente na região dorsal de 5 camundongos. Após 30

minutos, os animais foram anestesiados com Ketamina (Agribands, Paulínia, Brasil) e Acepromazina (Univet, São Paulo, Brasil), sacrificados e a pele dorsal foi removida para visualização e extração do corante. Posteriormente os pedaços da pele removida foram incubados em 2mL de formamida, onde foram mantidos por 5 dias à 37°C. Após esse período o sobrenadante foi removido e a absorbância foi determinada a 595nm. Nas mesmas condições experimentais o grupo controle recebia apenas PBS. Camundongos são os melhores modelos animais para experimentos de permeabilidade vascular, pois quando tratados com veneno de *L. intermedia* não desenvolvem dermonecrose e hemorragias locais, evitando, desta forma, falsas interpretações sobre alterações na permeabilidade vascular (FUTRELL, 1992; da SILVA *et al.*, 2004).

4.23 Análise Estatística

Os resultados dos ensaios de viabilidade e proliferação foram submetidos à análise de variância (ANOVA), para avaliar as diferenças entre os tratamentos e os controles foi utilizado o teste de Tuckey que permite estabelecer a diferença mínima entre duas médias. A significância foi definida como $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Ação do veneno total de *L. intermedia* sobre a morfologia de células RI

Com objetivo de verificar se o veneno de *L. intermedia* foi capaz de causar danos morfológicos à linhagem celular RI, foram observados através de microscopia óptica, os efeitos causados por diferentes concentrações de veneno (10, 25, 40 e 100µg/mL) por 24, 48 e 72 horas sobre a morfologia celular. A ação do veneno em diferentes concentrações sobre a morfologia celular, mostrou que a linhagem RI, após 24 horas, teve sua forma alterada, as células se organizaram em agregados, evidenciando a ação citotóxica do mesmo (FIGURA 3C, D, e F) , diferente do controle (Figura 3A e B) em que as células permaneceram levemente alongadas (fusiformes). Nos agregados, as células periféricas se mostraram alongadas e as células centrais mais arredondadas. Nas células RI mantidas por 48 horas com veneno, os agregados ainda estavam bastante evidentes, como é possível observar na figura 4C ,D, E e F. Após 72 horas, as células da linhagem RI, tratadas com 10, 25, 40 e 100µg/mL de veneno mantiveram as mesmas alterações morfológicas descritas para o tempo de tratamento de 24 e 48 horas, ocorrendo pequenas alterações adicionais nas células expostas a 25, 40 e 100µg/mL de veneno, em que algumas células começaram a se desprender dos agregados (figuras 5D, E e F). Desta forma, os resultados mostram uma nítida alteração na forma das células RI quando estas foram submetidas ao tratamento com veneno em diferentes concentrações e em diferentes tempos.

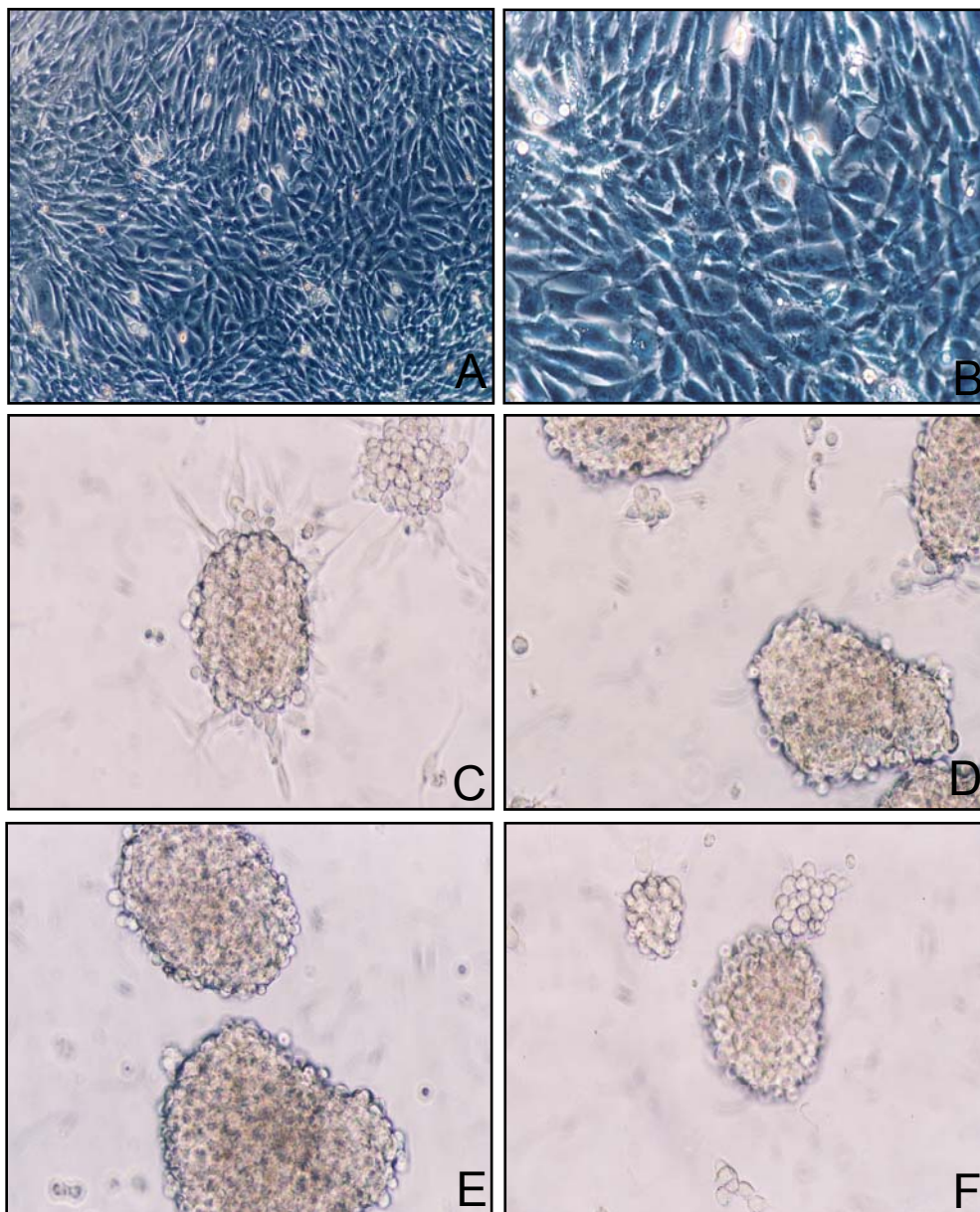


Figura 3: Alteração morfológica de células RI após tratamento por 24 horas com veneno de *L. intermedia*. Análise por microscopia invertida. (A e B) Células controle mantidas nas condições de cultivo na ausência de tratamento com veneno. Aumento de 100 e 200x respectivamente. (C, D, E e F) Células mantidas nas condições de cultivo tratadas respectivamente com 10, 25, 40 e 100µg/mL de veneno. Aumento de 200X.

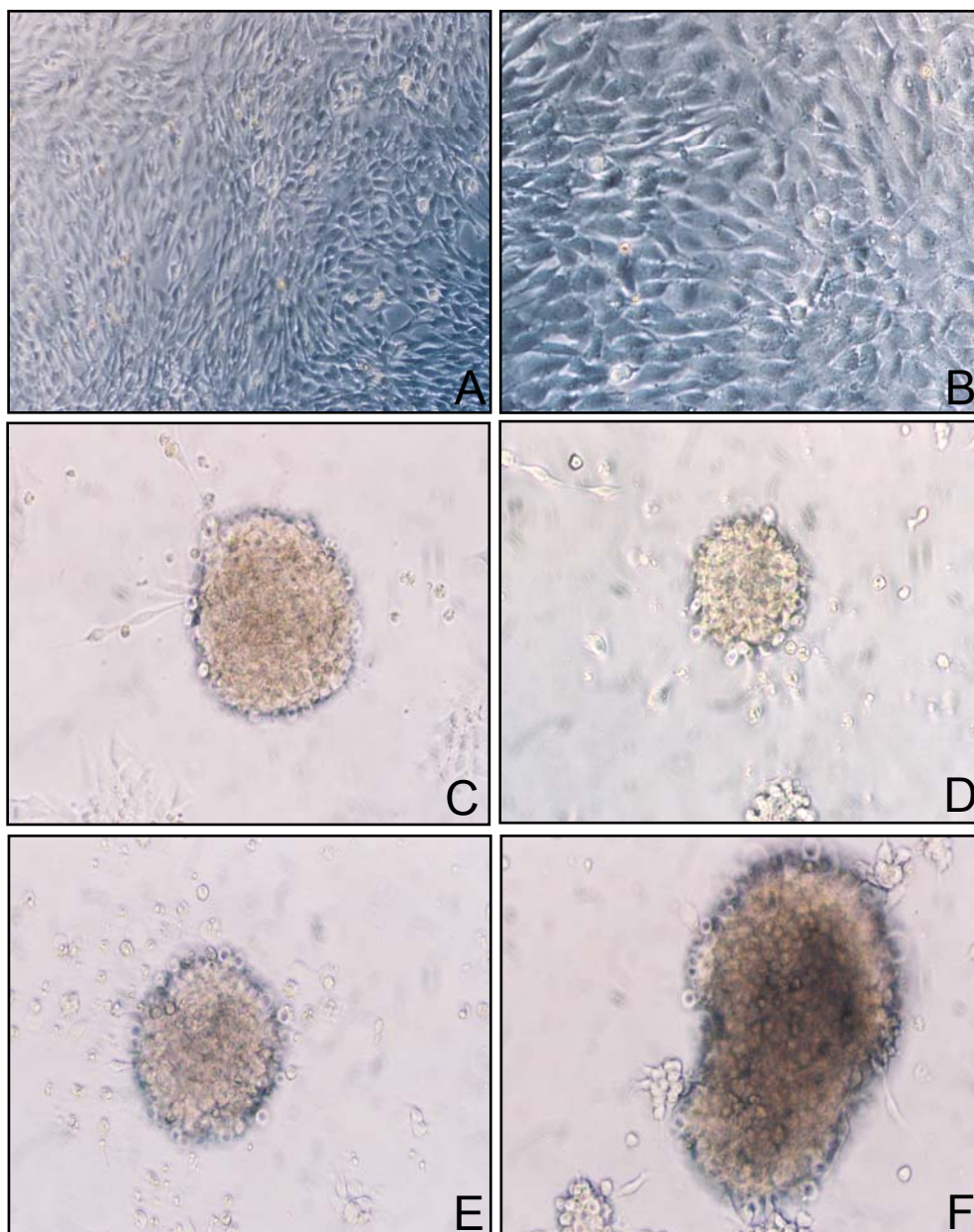


Figura 4: Alteração morfológica de células RI após tratamento por 48 horas com veneno de *L. intermedia*. Análise por microscopia invertida. (A e B) Células controle mantidas nas condições de cultivo na ausência de tratamento com veneno. Aumento de 100 e 200x respectivamente. (C, D, E e F) Células mantidas nas condições de cultivo tratadas respectivamente com 10, 25, 40 e 100µg/mL de veneno. Aumento de 200X.

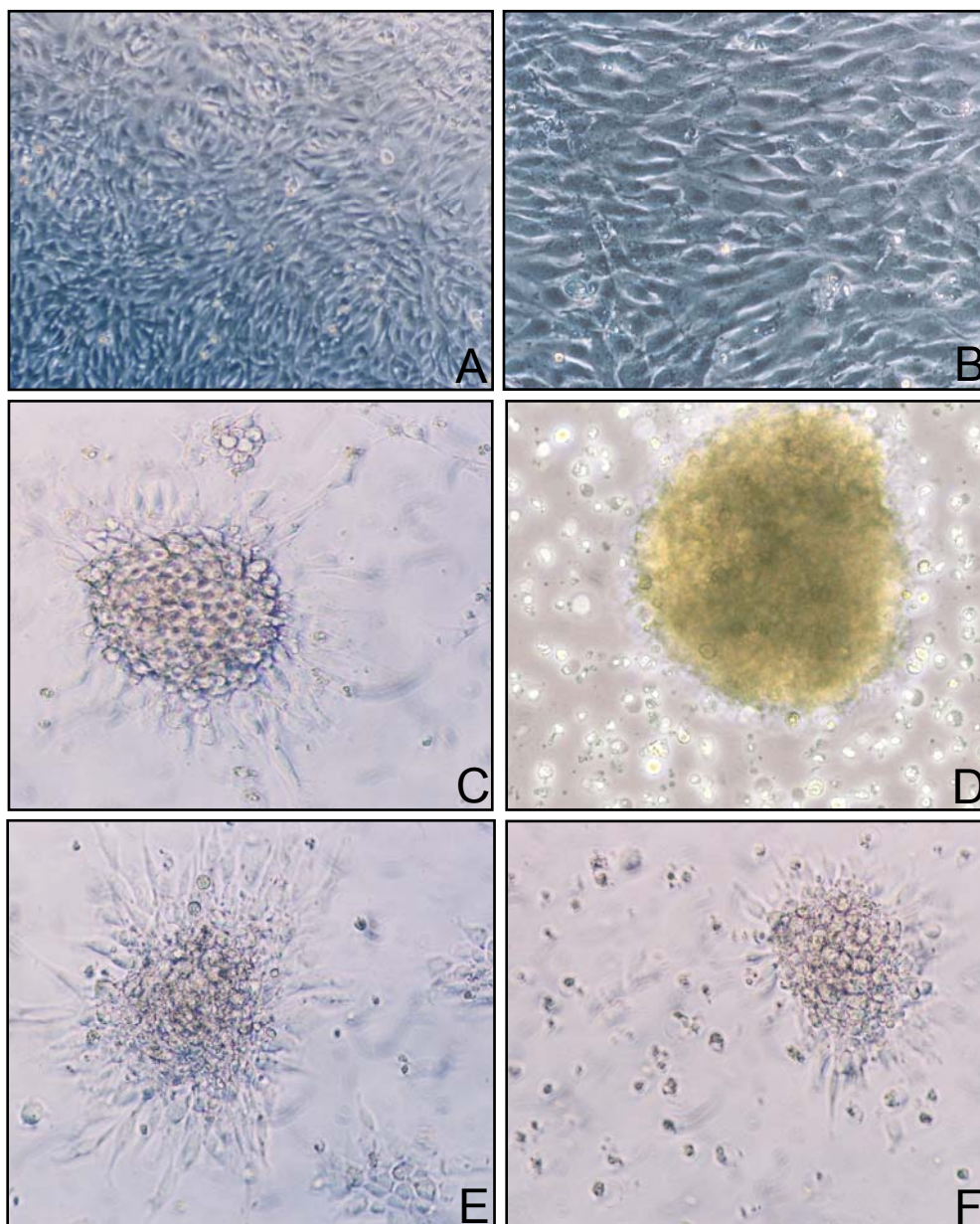


Figura 5: Alteração morfológica de células RI após tratamento por 72 horas com veneno de *L. intermedia*. Análise por microscopia invertida. (A e B) Células controle mantidas nas condições de cultivo na ausência de tratamento com veneno. Aumento de 100 e 200x respectivamente. (C, D, E e F) Células mantidas nas condições de cultivo tratadas respectivamente com 10, 25, 40 e 100µg/mL de veneno. Aumento de 200X.

5.2 Mudanças morfológicas em células RI induzidas pelo veneno de *L. intermedia* analisadas através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Células RI tratadas com 40µg/mL de veneno por 3 horas à 37°C quando observadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) mostram mudanças significativas na sua forma. As figuras 6A e C são eletromicrografias que mostram a típica morfologia de células RI em cultura. Detalhes das eletromicrografias 6A e C tais como lamelopódia e filopódia que conduzem a célula a uma perfeita adesão sobre o substrato são observados nas eletromicrografias 6B e D. As células expostas ao veneno (figuras 6E, F, G e H) apresentam retração do seu volume celular, tornando-se bastante alongadas. As eletromicrografias 6G e H representam ampliações da figura 6F e evidenciam projeções citoplasmáticas alongadas em forma de agulha, mostrando uma diminuição da ligação do corpo da célula ao substrato.

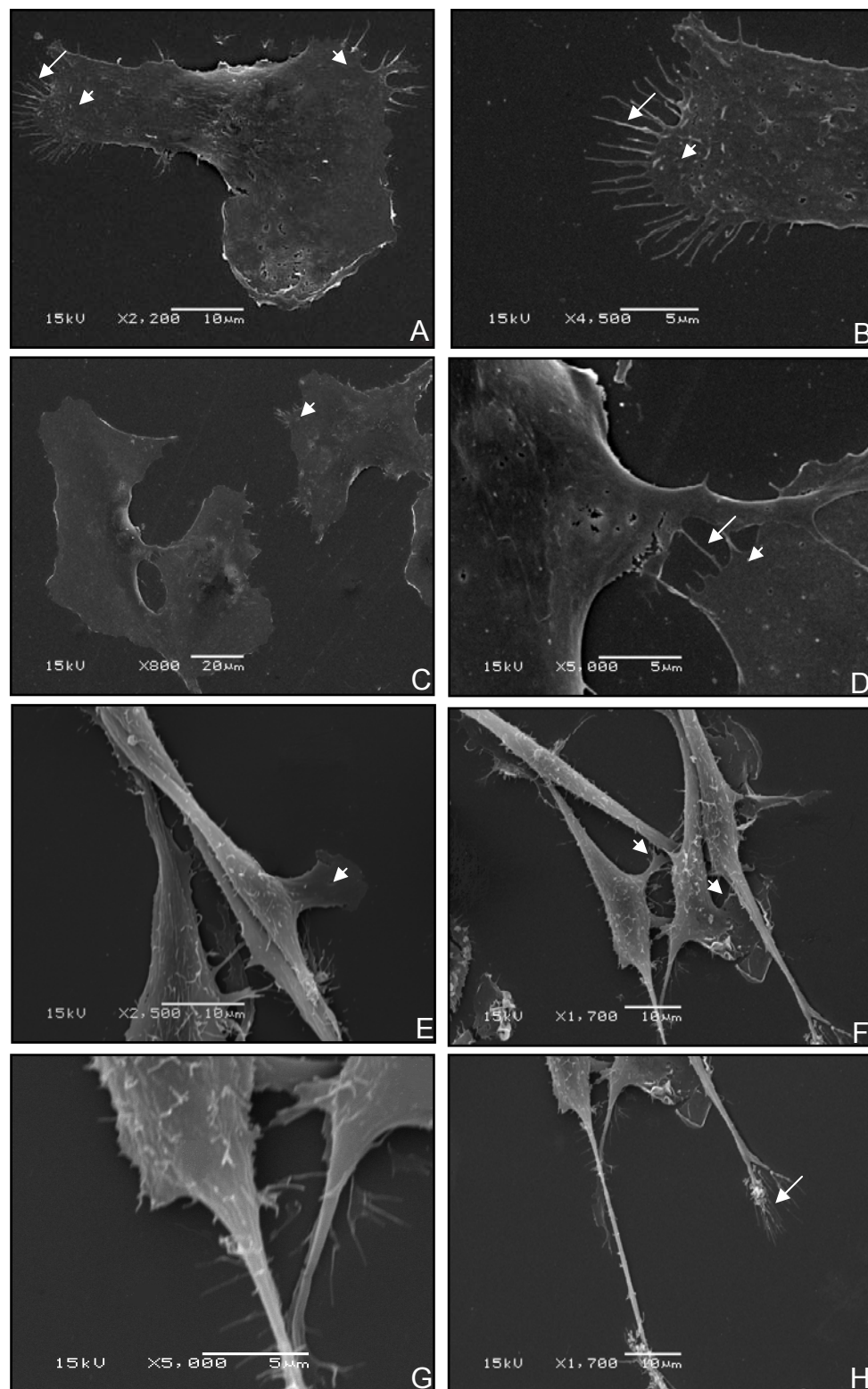


Figura 6: Alteração morfológica de células RI analisada por microscopia eletrônica de varredura. (A, B, C e D) Células controle mantidas nas condições de cultivo na ausência de tratamento com veneno. Cabeças de seta indicam as lamelopódia e setas indicam as filopódia. Aumento de 2200, 4500, 800 e 5000X respectivamente. **(E, F G e H)** Células mantidas nas condições de cultivo tratadas com 40µg/mL de veneno por um período de 3 horas. Cabeças de seta indicam as lamelopódia e setas indicam os filopódia. Aumento respectivo de 2500, 1700, 5000 e 1700X.

5.3 Ligação de toxinas do veneno de *L. intermedia* na superfície celular

Com objetivo de verificar a ligação de toxinas do veneno sobre a superfície de células RI foram realizados ensaios de imunofluorescência. Nesses ensaios todas as células foram submetidas ao veneno de *L. intermedia* na concentração de 10µg/mL. A detecção de toxinas no veneno foi realizada empregando anticorpos que reconhecem estas moléculas seguido por anticorpos conjugados fluorescentes. Nas células tratadas, os resultados demonstram claramente a localização de toxinas do veneno sobre a superfície celular (figuras 7C e D) e sobre a superfície das células que se organizaram em agregados, “rosetas” (figuras 7F, G e H), diferente do grupo controle (figura 7A) em que há resultado negativo para a presença do veneno. O veneno também não é observado nas figuras 7B e E em que as células após serem tratadas são incubadas apenas com anticorpos conjugados fluorescentes (controle de especificidade).

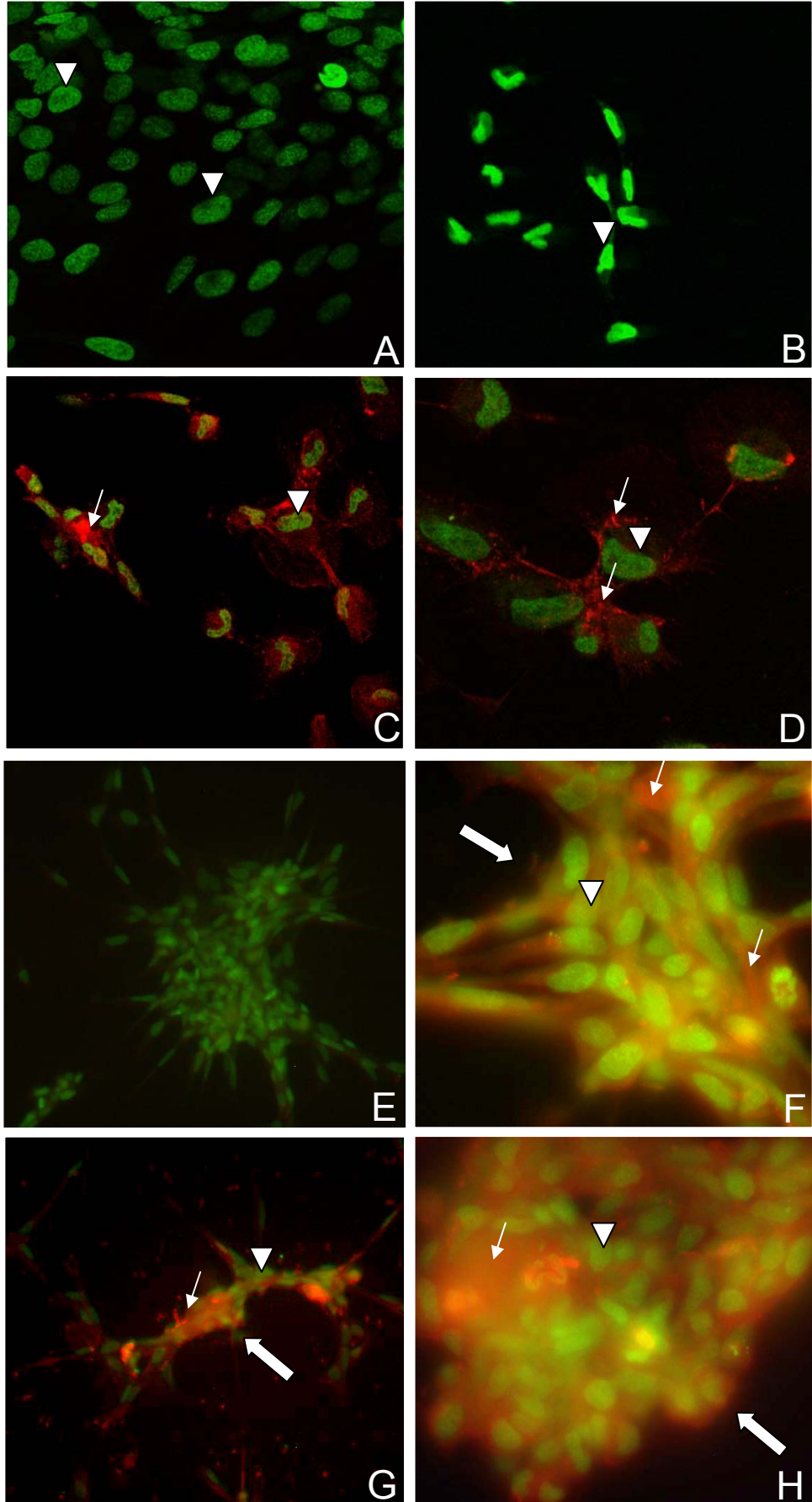


Figura 7: Ligação das toxinas do veneno de *L. intermedia* na superfície celular. (A, B, C e D) mostram imagens obtidas em microscópio confocal. **(E, F, G e H)** mostram imagens obtidas em microscópio de fluorescência convencional. **(A)** Micrografia mostrando controle da especificidade dos anticorpos que reconhecem as toxinas do veneno. Células não expostas ao veneno foram incubadas com anticorpos que reconhecem as toxinas do veneno e com o conjugado secundário fluorescente, pontas de seta apontam o núcleo corado em verde (citoquímica fluorescente com sytox). Aumento de 600X. **(B e E)** Micrografias que mostram o controle da especificidade dos anticorpos secundários conjugados. Células expostas ao veneno foram incubadas somente com anticorpo secundário fluorescente (pontas de seta mostram o núcleo). Aumento de 600 e 200X respectivamente. **(C e D)** Micrografias mostram células tratadas com veneno por um período de 3 horas e submetidas a reação de imunofluorescência com anticorpos que reconhecem as toxinas do veneno. Setas indicam a localização do veneno (em vermelho) e pontas de seta mostram o núcleo (em verde). Aumentos respectivos de 600 e 630X. **(F, G e H)** Micrografias mostram células tratadas por um período de 24 horas e posteriormente submetidas a reação de imunofluorescência. Setas maiores indicam agregados celulares “rosetas” e pontas de seta indicam o núcleo. Aumento de 600, 200. e 630X respectivamente.

5.4 Análise da ligação de toxinas do veneno na superfície de células RI

5.4.1 Análise da ligação do veneno sobre a superfície celular

Na figura A o histograma preto indica o grupo controle (células não expostas as toxinas do veneno), ou seja, a fluorescência das células endoteliais incubadas com anticorpos que reconhecem as toxinas do veneno (primário) e com o anticorpo conjugado fluorescente (secundário). O histograma branco representa o grupo de células tratadas com veneno por um período de três horas e posteriormente incubadas com os anticorpos primário e secundário. Este histograma indica forte reação positiva (83% das células estão imunomarcadas) para as toxinas presentes no veneno sobre sua superfície celular.

5.4.2 Especificidade da ligação de toxinas do veneno sobre a superfície celular

Na figura B o histograma preto indica a intensidade da fluorescência de células RI sem tratamento com veneno. O histograma branco evidencia as células incubadas com veneno submetido previamente a tratamento com anticorpos que reconhecem as toxinas de *L. intermedia*, buscando inibir a ligação das toxinas às células. Tanto células controle como as que receberam tratamento com veneno pré-incubado com anticorpo foram incubadas com anticorpos conjugados Alexa-488.

Os resultados mostram claramente um decréscimo da fluorescência, evidenciando que há marcação de apenas 1% sobre a superfície celular após a exposição de células RI à veneno previamente incubado com anticorpos que reconhecem as toxinas do veneno quando este é comparado com o ensaio evidenciado na figura 8A. Desta forma, podemos concluir neste ensaio, que a marcação se fez por especificidade e não por uma interação de carga ou adsorção ou inespecífica.

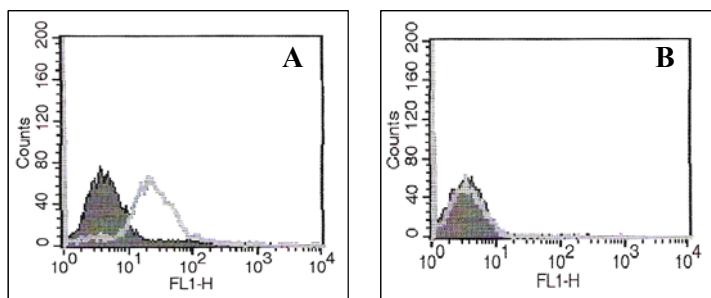


Figura 8: Análise da ligação de toxinas do veneno na superfície de células RI. (A) Análise da ligação do veneno sobre a superfície celular. **(B)** Especificidade da interação do veneno sobre a superfície celular. Na abscissa intensidade de fluorescência, na ordenada número de células contadas (Citometria de Fluxo).

5.5 Efeitos causados pelo veneno de *L. intermedia* sobre a organização dos filamentos de actina no citoesqueleto em células RI

Com objetivo de avaliar o comprometimento do citoesqueleto de actina em células RI submetidas ao tratamento com veneno de *L. intermedia* na concentração de 40µg/mL por 3 horas, foram realizados ensaios de citoquímica fluorescente (faloidina conjugada com Alexa Flúor-488, Molecular Probes) para marcação dos filamentos de actina. Os resultados obtidos mostram que nas células tratadas ocorre desorganização dos filamentos de actina, desestabilização das fibras de estresse e concomitantemente retração do volume celular (figuras 9D, E e F). A organização dos filamentos de actina é diferenciada nas células controle (figuras 9A, B e C) em que a marcação fluorescente revela alta organização dos filamentos e fibras de estresse.

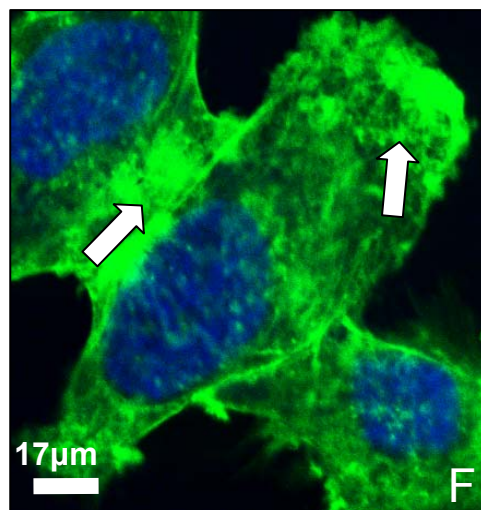
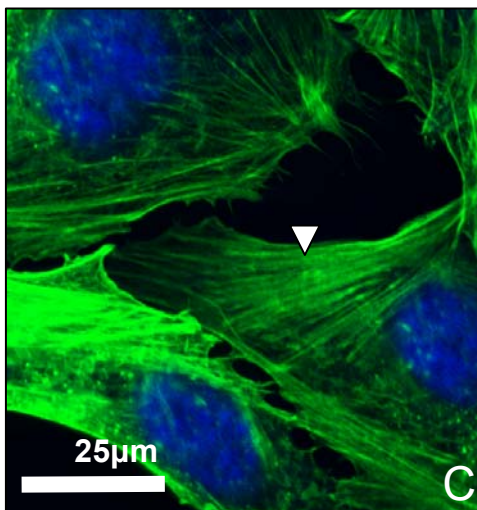
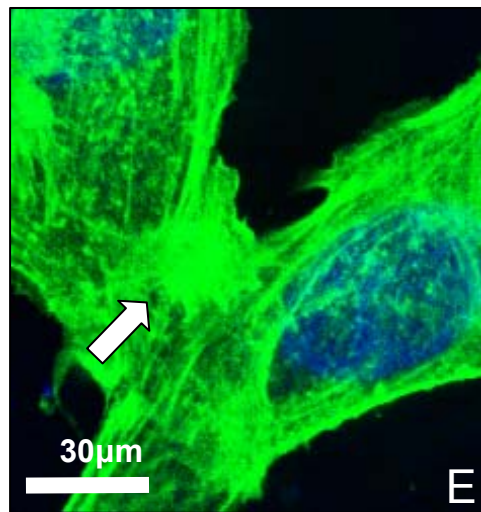
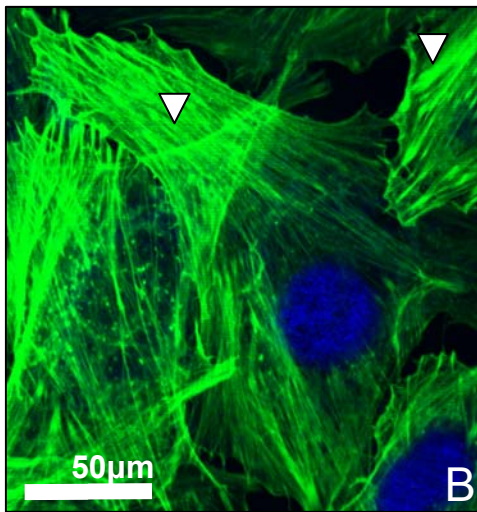
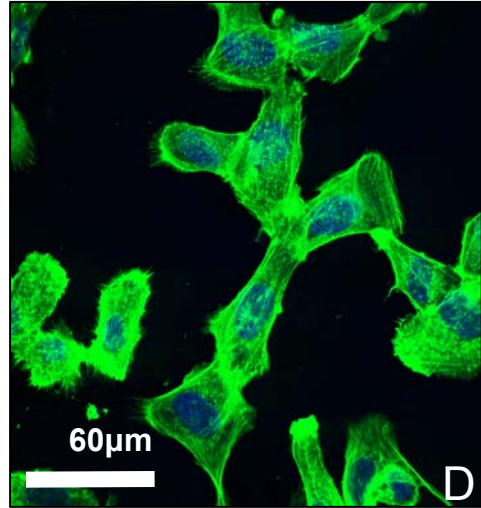
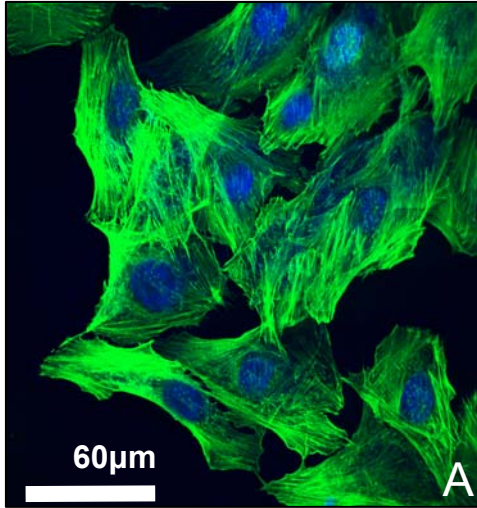


Figura 9: Efeito do veneno de *L. intermedia* sobre o arranjo e organização dos filamentos de actina. (A, B e C) Células controle (não tratadas com veneno) marcadas com faloidina conjugada com Alexa-488 e visualizadas por microscopia confocal fluorescente mostram filamentos de actina polimerizados e organizados na forma de fibras de estresse (cabeças de seta). Comparativamente as células tratadas com veneno **(D, E e F)** na concentração de 40µg/mL por 3 horas mostraram actina despolimerizada, filamentos desagregados e desorganizados por todo espaço celular (setas).

5.6 Ensaio de adesão celular sobre fibronectina

Em função das alterações morfológicas provocadas pela exposição das células RI ao veneno, além dos efeitos deste sobre o citoesqueleto e levando em conta dados publicados na literatura, os quais mostram ação de toxinas do veneno com atividade proteolítica sobre a matriz extracelular (FEITOSA *et al.*, 1998; VEIGA *et al.*, 2001), resolveu-se verificar a ação do veneno sobre a fibronectina, uma importante molécula da matriz extracelular produzida por células RI.

Desta forma, foram observadas a adesão das células RI sobre substrato de fibronectina submetido à ação do veneno por 2, 6 e 18 horas. Concomitantemente, células submetidas ao tratamento com veneno de *L. intermedia* por 2, 6 e 18 horas foram colocadas sobre o substrato de fibronectina intacto. Como controle positivo da adesão, células RI não tratadas com veneno foram colocadas para aderir sobre substrato de fibronectina. Como controle negativo da adesão, células RI não tratadas com veneno foram colocadas para aderir em substrato de albumina 1%.

Os resultados demonstram que a exposição por 2 horas do substrato de fibronectina ao veneno de *L. intermedia* induziu uma inibição 38,5% na adesão celular, após 6 horas houve uma inibição de 0% e após 18 horas a inibição da adesão celular foi de 57,4%. A exposição das células às toxinas do veneno também induziu uma inibição da adesão de 58,3% após 2 horas de tratamento, 31,8% após 6 horas e 36,9% após 18 horas (Figura 10).

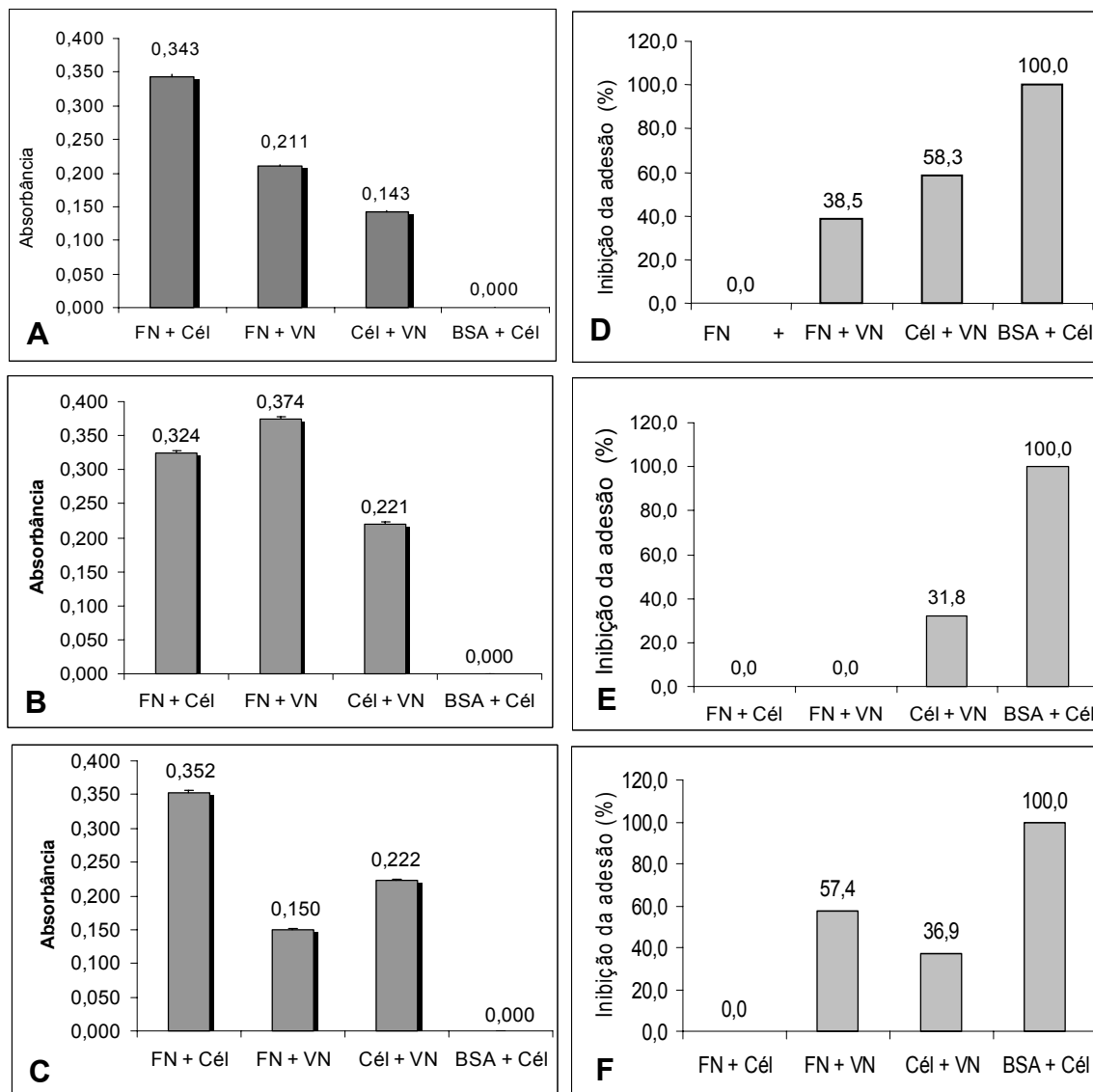


Figura 10: Os gráficos mostram os efeitos do veneno de *L. intermedia* sobre a dinâmica de adesão de células RI em fibronectina. Efeito do veneno de *L. intermedia* sobre adesão de células RI no substrato de fibronectina. (A, D) Efeito do veneno após 2 horas de incubação, (B,E) após 6 horas e (C,F) após 18 horas de incubação. O controle positivo da adesão é representado por FN + Cel (fibronectina + células); o controle negativo está representado como BSA + Cél (BSA + células); o grupo em que a fibronectina foi previamente degradada pelo veneno é representado por FN + VN; e a representação das células que foram incubadas com veneno por Cél + VN.

5.7 Viabilidade de células RI submetidas a ação do veneno de *L. intermedia*

Para verificação da viabilidade celular foram realizados ensaios utilizando o método de exclusão do Azul de Trypan. As células foram submetidas a ação do veneno de *L. intermedia* por 24, 48 e 72 horas nas concentrações de 10, 40 e 100µg/mL. Os efeitos do veneno sobre a viabilidade das células RI estão mostrados na Tabela 1 e Figura 11. Verificou-se que a partir de 48 horas em todas as concentrações de veneno utilizadas, houve diminuição significativa da viabilidade das células, evidenciando a ação citotóxica.

24 HORAS

Concentração de veneno de <i>L.intermedia</i>	Controle	10µg/mL	40µg/mL	100µg/mL
% número de células ± (d.p.)	100±0	100±0	100±0	100±0

48 HORAS

Concentração de veneno de <i>L.intermedia</i>	Controle	10µg/mL	40µg/mL	100µg/mL
% número de células ± (d.p.)	99±1,0	89±3,0 ***	91±2,0**	82,33±3,0***

72 HORAS

Concentração de veneno de <i>L.intermedia</i>	Controle	10µg/mL	40µg/mL	100µg/mL
% número de células ± (d.p.)	97±2,0	86,5±2,5***	84,5±2,5***	80,5±2,5***

Tabela 1: Porcentagem de viabilidade das células RI na presença do veneno. A viabilidade celular foi avaliada através do método de exclusão com Azul de Trypan após 24, 48 e 72 horas de incubação com as concentrações de veneno indicadas. Resultados expressos em média ± desvio padrão (m ± d.p.), ** p < 0,01, p, *** < 0,001, obtidos de experimentos realizados em pentaplicata.

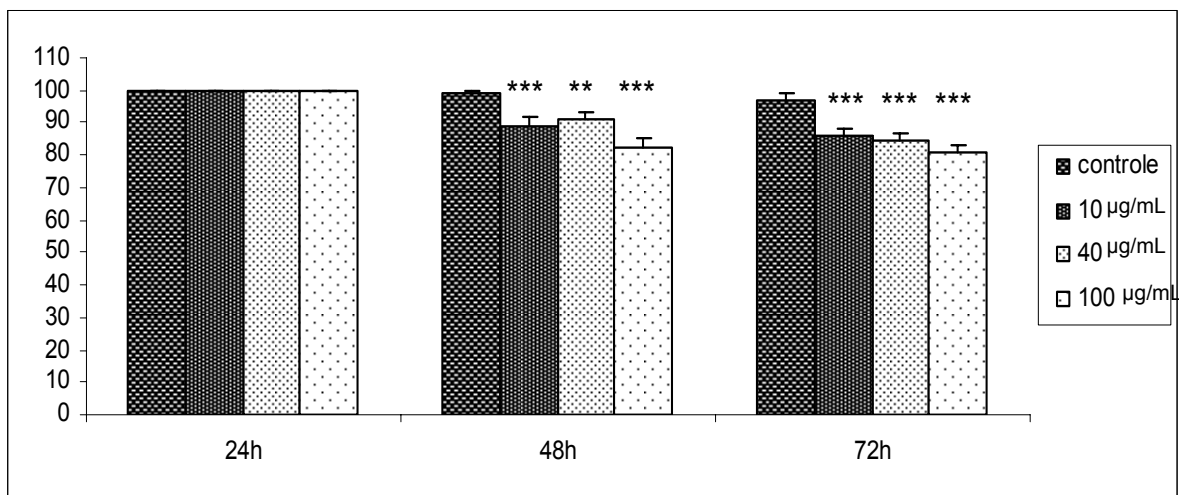


Figura 11: Efeito do veneno de *L. intermedia* sobre a viabilidade das células RI após 24, 48 e 72 horas. Resultados expressos em média \pm desvio padrão (m \pm d.p.). ** p < 0,01, p, *** < 0,001, obtidos de experimentos realizados em pentaplicata.

5.8 Efeito do veneno de *L. intermedia* sobre a proliferação de células RI

Para verificar a ação do veneno sobre a proliferação de células RI, foi empregado o método de MTT (MOSMANN, 1983) no tempo de 24, 48 e 72 horas após a incubação com o veneno, nas concentrações de 2 e 20µg/mL. Os efeitos sobre a proliferação celular estão mostrados na Tabela 2 e Figura 12. Verificou-se que com 24 e 48 horas de incubação com veneno a proliferação diminuiu significativamente na concentração de 20µg/mL quando comparada ao grupo controle. Após um período de 72 horas de tratamento, as células tratadas nas concentrações de 2 e 20µg/mL diminuíram significativamente a proliferação quando comparadas ao grupo controle, diferindo dos tempos de 24 e 48 horas, em que o efeito significativo ocorria apenas para a concentração de 20µg/mL.

24 HORAS

Concentração de veneno de <i>L.intermedia</i>	Controle	2µg/mL	20µg/mL
% número de células ± (d.p.)	27 ± 6,5	19 ± 2,8	14 ± 1,7 *

48 HORAS

Concentração de veneno de <i>L.intermedia</i>	Controle	2µg/mL	20µg/mL
% número de células ± (d.p.)	53 ± 9,0	42 ± 8,2	41 ± 4,6 *

72 HORAS

Concentração de veneno de <i>L.intermedia</i>	Controle	2µg/mL	20µg/mL
% número de células ± (d.p.)	86 ± 7,9	53 ± 4,0 **	53,51 ± 13 **

Tabela 2: Porcentagem de proliferação das células RI na presença do veneno. A proliferação celular foi avaliada através do método de MTT após 24, 48 e 72 horas de incubação com as concentrações de veneno indicadas. Resultados expressos em média ± desvio padrão (m ± d.p.). *, p < 0,1, ** p < 0,01, obtidos de experimentos realizados em octoplicata.

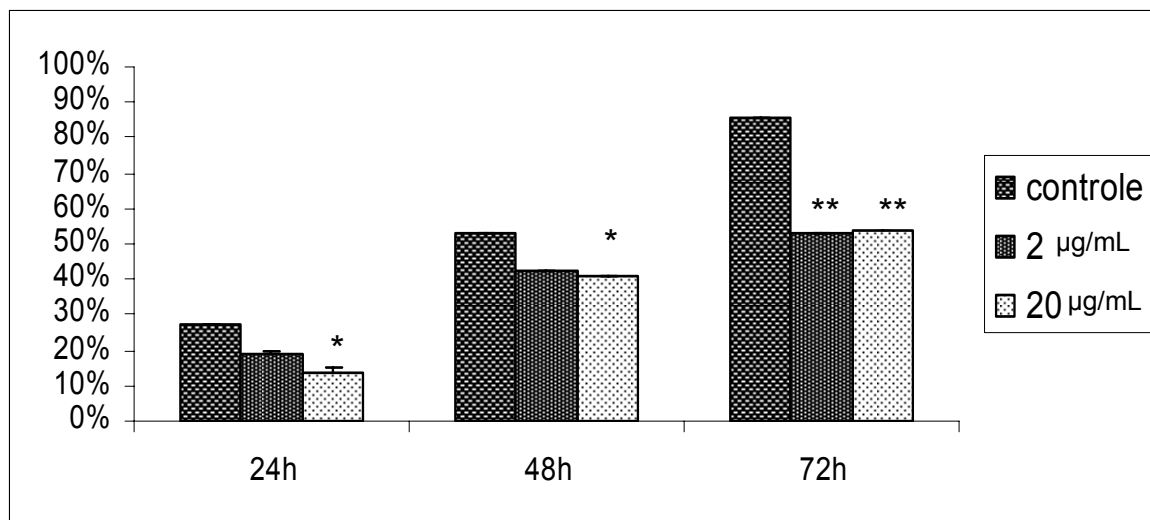


Figura 12: Efeito do veneno de *L. intermedia* sobre a proliferação de células RI após 24, 48 e 72 horas. Resultados expressos em média \pm desvio padrão ($m \pm d.p.$). *, $p < 0,1$, ** $p < 0,01$, obtidos de experimentos realizados em octoplicata.

5.9 Ação da proteína recombinante dermonecrótica (LiRecDT1) sobre células RI

Após a observação de que as células RI submetidas ao tratamento com veneno de *L. intermedia* em diferentes concentrações e por diferentes tempos se organizam em agregados, o enfoque deste trabalho passou a ser a descoberta de qual das toxinas presentes no veneno foi capaz de causar a formação destes agregados celulares.

Desta forma, neste ensaio, células RI foram submetidas a incubação com (LiRecDT1) uma proteína recombinante, da família das proteínas dermonecróticas encontradas no veneno da aranha *L. intermedia*, cuja atividade é do tipo esfingomielinase e está relacionada com dermonecrose, resposta inflamatória induzida pelo veneno, agregação plaquetária e atividade nefrotóxica (CHAIM *et al.*, 2006; da SILVEIRA *et al.*, 2006).

As células, submetidas ao tratamento com 10, 25, 40 e 100 µg/mL de (LiRecDT1) por um período de 24 horas (Figuras 13C, D, E e F) permaneceram iguais ao grupo controle (Figuras 13A e B) não mostrando alteração na morfologia da linhagem RI. O mesmo resultado ocorreu quando as células tratadas nas concentrações de 10, 25, 40 e 100 µg/mL permaneceram por 48 (Figuras 14B, C, D e E) e 72 horas de tratamento (Figuras 15C, D, E e F). Deste modo, células RI, submetidas a diferentes concentrações de (LiRecDT1) por diferentes tempos, não sofreram alterações morfológicas.

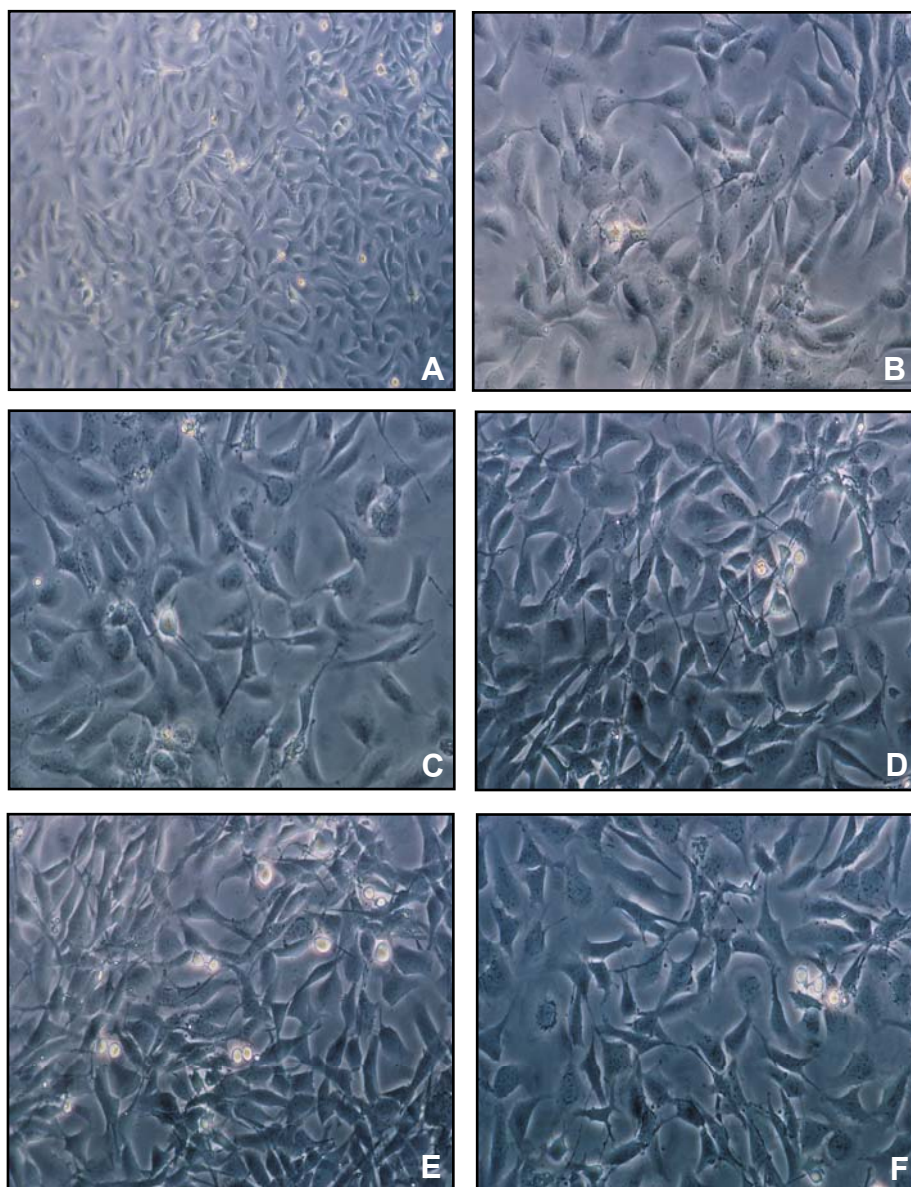


Figura 13: Análise morfológica de células RI após o tratamento por 24 horas com a proteína recombinante dermonecrótica LiRecDT1. Imagens obtidas por microscopia invertida. (A e B) Células mantidas nas condições de cultivo na ausência de LiRecDT1. Aumento de 100 e 200X respectivamente. (C, D, E e F) Células mantidas nas condições de cultivo tratadas respectivamente com 10, 25, 40 e 100µg/mL de LiRecDT1. Aumento de 200X.

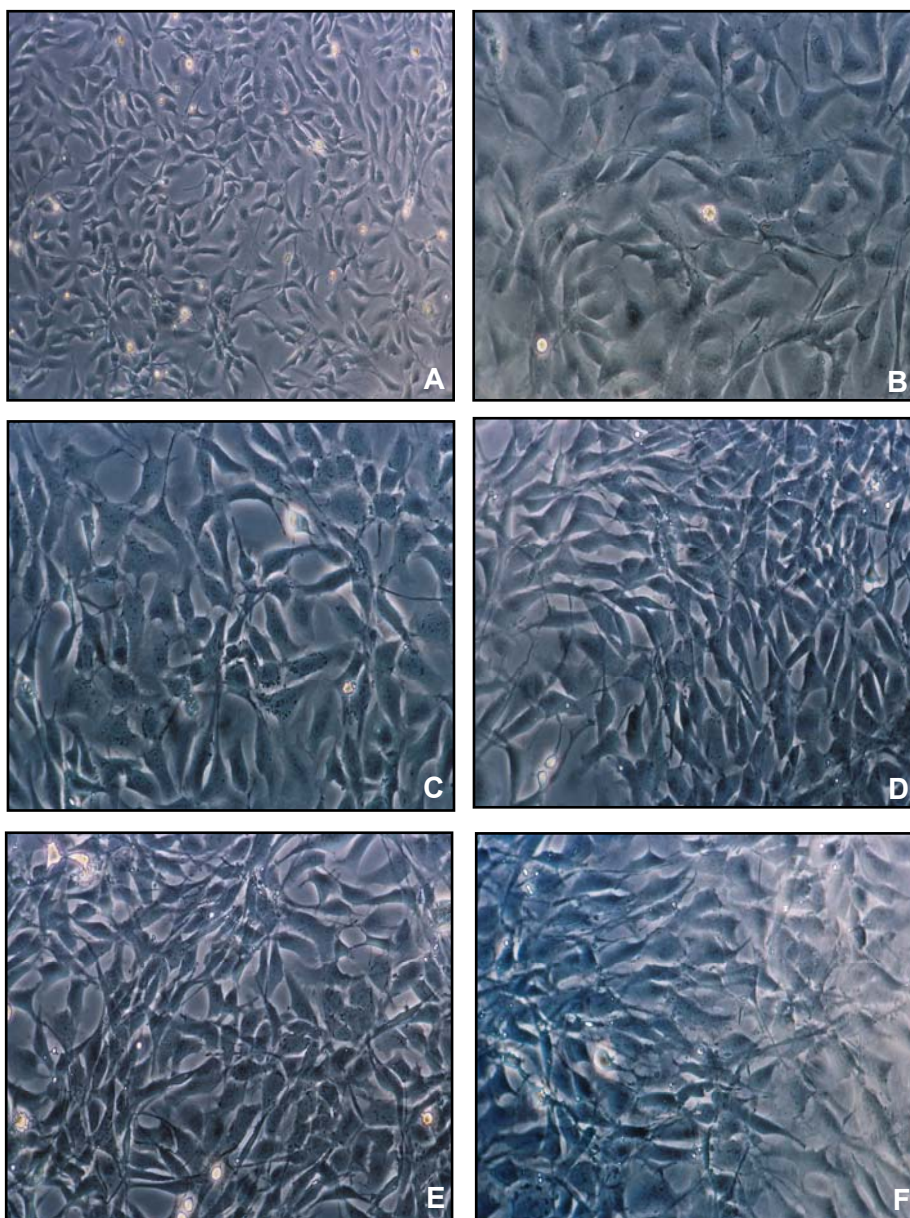


Figura 14: Análise morfológica de células RI após o tratamento por 48 horas com a proteína recombinante dermonecrótica LiRecDT1. Imagens obtidas por microscopia invertida. (A e B) Células mantidas nas condições de cultivo na ausência de LiRecDT1. Aumento de 100 e 200X respectivamente. (C, D, E e F) Células mantidas nas condições de cultivo tratadas respectivamente com 10, 25, 40 e 100µg/mL de LiRecDT1. Aumento de 200X.

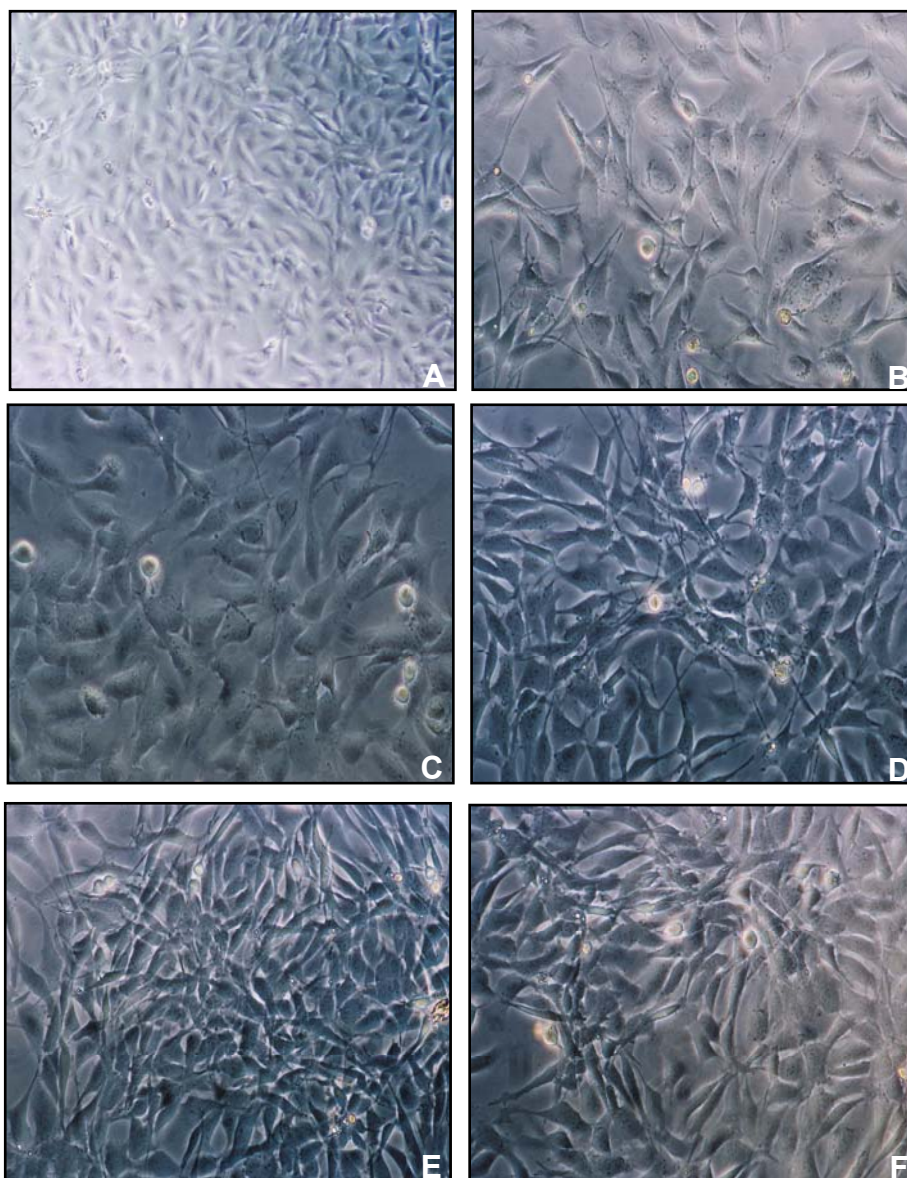


Figura 15: Análise morfológica de células RI após o tratamento por 72 horas com a proteína recombinante dermonecrótica LiRecDT1. Imagens obtidas por microscopia invertida. (A e B) Células mantidas nas condições de cultivo na ausência de LiRecDT1. Aumento de 100 e 200X respectivamente. (C, D, E e F) Células mantidas nas condições de cultivo tratadas respectivamente com 10, 25, 40 e 100µg/mL de LiRecDT1. Aumento de 200X.

5.10 Reação imunológica cruzada de anticorpos que reconhecem LiRecMP1 (metaloprotease-1 recombinante do veneno de *L. intermedia*) com toxinas nativas do veneno

Com a finalidade de avaliar a relação entre a toxina recombinante LiRecMP1 com toxinas nativas do veneno da aranha *L. intermedia*, anticorpos pré-ímmunes e anticorpos que reconhecem LiRecMP1 foram submetidos a reação com LiRecMP1 e com as toxinas nativas do veneno por imunoensaio de ELISA (Figura 16). Os resultados apontam uma forte reação positiva para LiRecMP1 incubada com anticorpos que reconhecem essa toxina e, reação positiva, em menor intensidade, para toxinas nativas do veneno de *L. intermedia*. Tal fato se justifica devido à quantidade da toxina metaloprotease encontrada no veneno nativo ser menor do que na proteína recombinante LiRecMP1 isolada, pois no veneno nativo existem vários outros tipos de toxinas. Anticorpos pré-ímmunes inespecíficos apontam reação negativa tanto para as toxinas nativas do veneno quanto para a proteína recombinante LiRecMP1.

Ensaio de imunoblotting (Figura 17) foram realizados para comprovar a especificidade dos anticorpos que reconhecem LiRecMP1 e mostraram reações positivas para a toxina recombinante LiRecMP1 incubadas por anticorpo primários que a reconhecem (Figura 17, Coluna 1) assim como para as toxinas nativas do veneno total (Figura 17, Coluna 2), confirmando, desta forma, os resultados obtidos pelo imunoensaio enzimático ELISA.

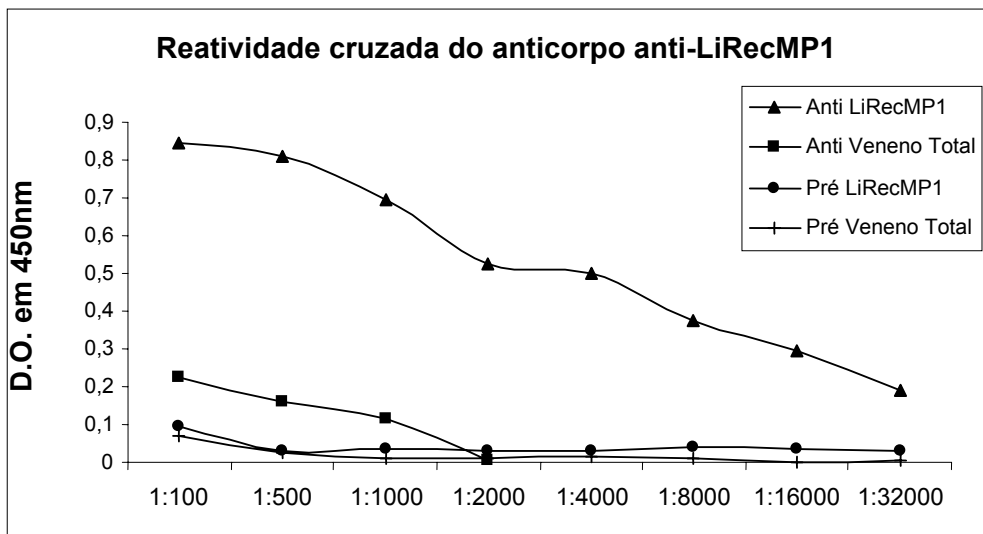


Figura 16: Reatividade Imunológica cruzada comparando veneno total e toxina recombinante LiRecMP1. Ensaio imunoenzimático de captura de anticorpos (ELISA) utilizando-se como antígenos veneno total e toxina recombinante LiRecMP1 (10 μ g/mL), imobilizados na fase sólida. Anticorpos primários purificados que reconhecem a toxina LiRecMP1, nas concentrações indicadas (abcissa) foram incubados por 2 horas à temperatura ambiente, seguida de reação com anticorpos secundários conjugados com peroxidase que reconhecem imunoglobulinas de camundongo. Imunoglobulina pré-imune foi utilizada como controle negativo para as reações. Na ordenada são vistas as absorbâncias das reações colorimétricas observadas.

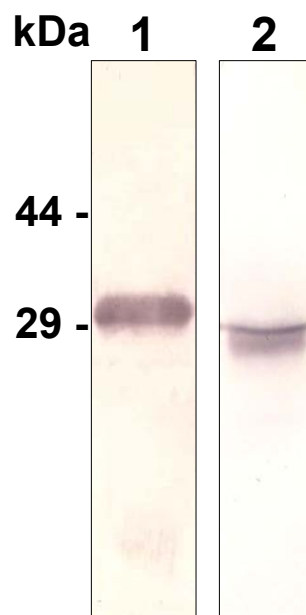


Figura 17: Imunoblotting realizado a partir de gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12,5% (p/v) com veneno total de *L. intermedia* obtido por eletrochoque e com a proteína recombinante LiRecMP1. Coluna 1: Reação cruzada utilizando-se como antígenos a toxina recombinante LiRecMP1 (5 μ g) e anticorpos primários purificados que reconhecem a toxina recombinante LiRecMP1 seguida de reação com anticorpos secundários conjugados com fosfatase alcalina que reconhecem imunoglobulinas de camundongo. Coluna 2: Reação cruzada utilizando-se como antígeno veneno total (10 μ g) e anticorpos primários purificados que reconhecem a toxina recombinante LiRecMP1 seguida de reação com anticorpos secundários conjugados com fosfatase alcalina que reconhecem imunoglobulinas de camundongo.

5.11 Inibição da degradação da fibronectina causada pelo veneno por anticorpos que reconhecem LiRecMP1

Com objetivo de verificar a ação de metaloproteases presentes no veneno de *L. intermedia* sobre a matriz extracelular foram realizados ensaios de eletroforese em gel de poliacrilamida 7,5% SDS-PAGE com amostras contendo fibronectina tratada com veneno, submetido a ação de anticorpos pré ou hiperimunes para LiRecMP1. O controle positivo da degradação foi a fibronectina tratada com veneno (Figura 18, coluna 2) e o controle negativo foi a fibronectina na ausência de veneno ou anticorpos (Figura 18, coluna 1). Os resultados mostram que o veneno incubado com anticorpos hiperimunes para LiRecMP1 (100 e 200 μ g) diminui a degradação da fibronectina (Figura 18, colunas 4 e 6), fato que não ocorre com o veneno incubado com 100 e 200 μ g de anticorpos pré-imunes (Figura 18, colunas 3 e 5) e com o controle negativo (Figura 18, coluna 2).

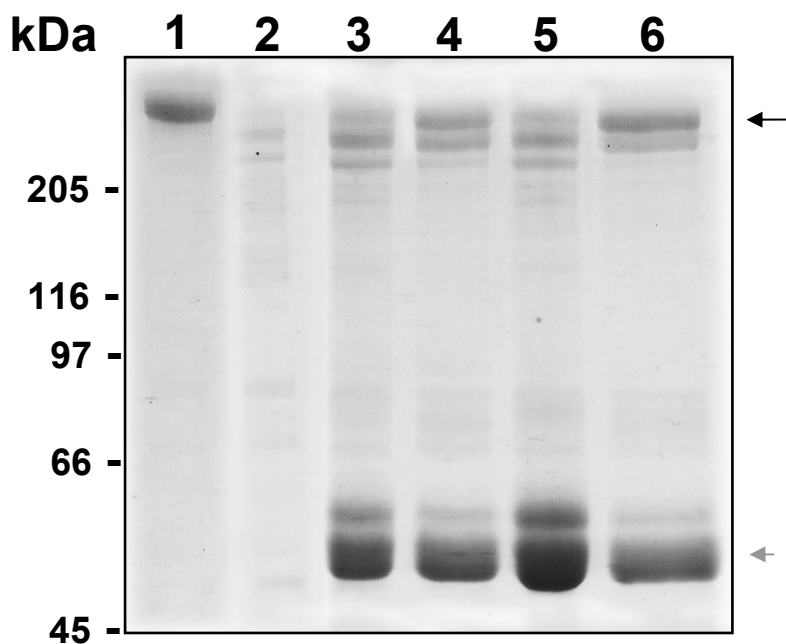


Figura 18: Ação inibitória de anticorpos hiperimunes contra LiRecMP1 sobre a atividade fibronectinolítica do veneno de *L. intermedia*. A figura mostra um gel SDS-PAGE corado pelo Azul de Coomassie. Coluna 1: Fibronectina purificada (FN) na ausência de veneno (VN) incubada com Tampão redutor (TR) (controle negativo de proteólise). Coluna 2: FN tratada com 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de VN incubado com TR. Coluna 3: FN tratada com VN na concentração de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ exposta à 100 μg de anticorpos pré-ímmunes (PI) por duas horas e incubados com TR. Coluna 4: FN tratada com VN na concentração de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ exposta à 100 μg de anticorpos que reconhecem metaloproteases (HI) por duas horas e incubados com TR. Coluna 5: FN tratada com VN na concentração de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ exposta à 200 μg de anticorpos pré-ímmunes (PI) por duas horas e incubados com TR. Coluna 6: FN tratada com VN na concentração de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ exposta à 200 μg de anticorpos que reconhecem metaloproteases (HI) por duas horas e incubados com TR. Seta escura indica a inibição da degradação da fibronectina por anticorpos HI. Seta clara mostra posição das cadeias pesadas das imunoglobulinas.

5.12 Efeitos inibitórios de anticorpos que reconhecem LiRecMP1 sobre aumento da permeabilidade vascular induzida pelo veneno de *L. intermedia*

Ensaio utilizando o corante Azul de Evans para verificar alterações na permeabilidade vascular sob a pele de camundongos albinos mostram que o veneno incubado com anticorpos que reconhecem LiRecMP1 induz menor alteração da permeabilidade capilar. É possível visualizar que ocorre diminuição da coloração na região extravascular (Figura 19D) evento que não acontece nos animais tratados apenas com veneno (Figura 19B) ou com veneno pré-incubado por anticorpos inespecíficos pré-ímmunes (Figura 19C) em que são observadas proteínas extravasadas do plasma fortemente coradas por Azul de Evans .

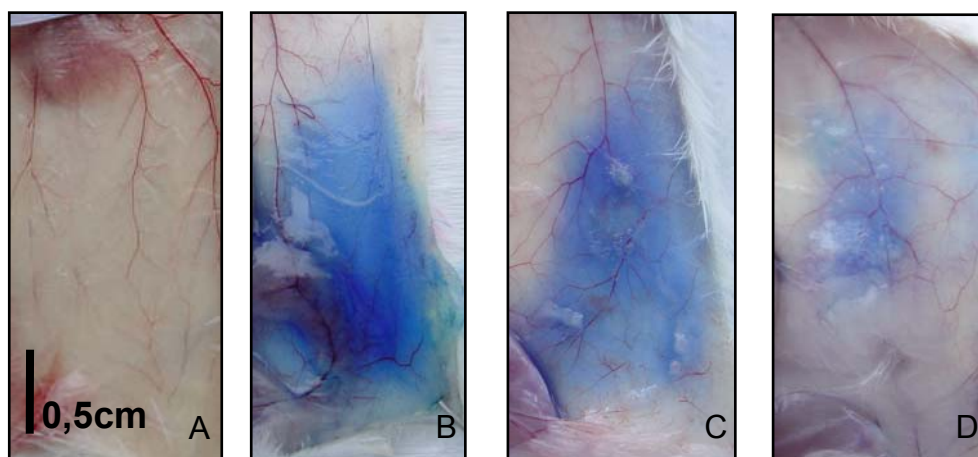
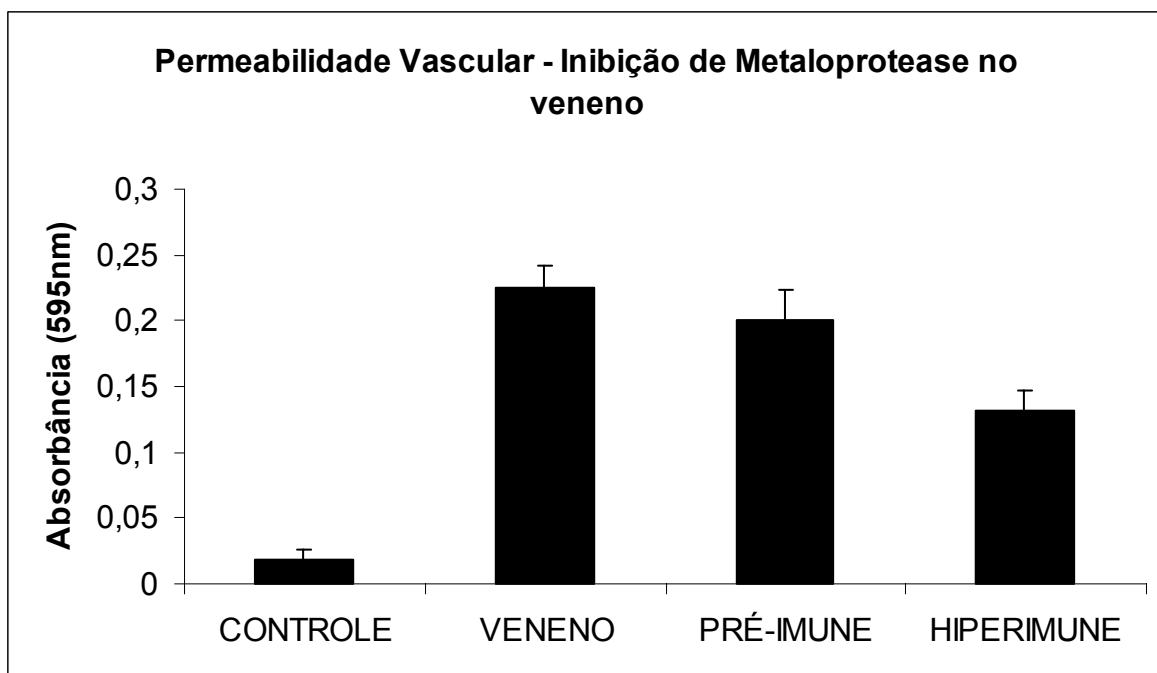


Figura 19: Efeito inibitório de anticorpos que reconhecem LiRecMP1 sobre aumento da permeabilidade vascular induzida pelo veneno de *L. intermedia*. (A) Animal submetido a injeção intradérmica de PBS (controle). **(B)** Animal submetido ao tratamento com 10 μ g de veneno. **(C)** Animal submetido ao tratamento com 10 μ g de veneno pré-incubado com 100 μ g de anticorpos pré-ímunes. **(D)** Animal submetido ao tratamento com 10 μ g de veneno pré-incubado com 100 μ g de anticorpos que reconhecem LiRecMP1.

5.13 Inibição da atividade desadesiva de células RI pelo veneno loxoscélico por anticorpos hiperimunes que reconhecem LiRecMP1

Com objetivo de verificar a ação de metaloproteases presentes no veneno de *L. intermedia* sobre a atividade adesiva de células RI, veneno na concentração de 5µg/mL foi previamente incubado com anticorpos pré e hiperimunes para LiRecMP1 (40 e 80 µg) por duas horas e depois colocado sobre as células. Como controle positivo da reação, algumas células foram expostas a ação do veneno na concentração de 5µg/mL na ausência de anticorpos. Como controle negativo, células RI foram mantidas apenas ao substrato de cultura. Os resultados evidenciam claramente que tanto as células do controle positivo (Figura 20B) quanto as células submetidas a ação do veneno previamente incubado com anticorpos pré-ímmunes (Figuras 20C e E) mostram a formação de agregados celulares, “rosetas”. Os agregados também estão presentes na Figura 20D em que as células foram submetidas a ação de veneno previamente incubado com 40µg de anticorpos hiperimunes para LiRecMP1. Células submetidas ao veneno incubado com 80µg de anticorpos hiperimunes para LiRecMP1 (Figura 20F) e o controle negativo (Figura 20A) não formam agregados celulares. Desta forma neste ensaio se pode afirmar que veneno de *L. intermedia* na concentração de 5µg/mL foi inibido por 80µg de anticorpos hiperimunes para LiRecMP1, evidenciando que as metaloproteases têm grande influência na organização das células RI em agregados, provavelmente por causar degradação da matriz extracelular.

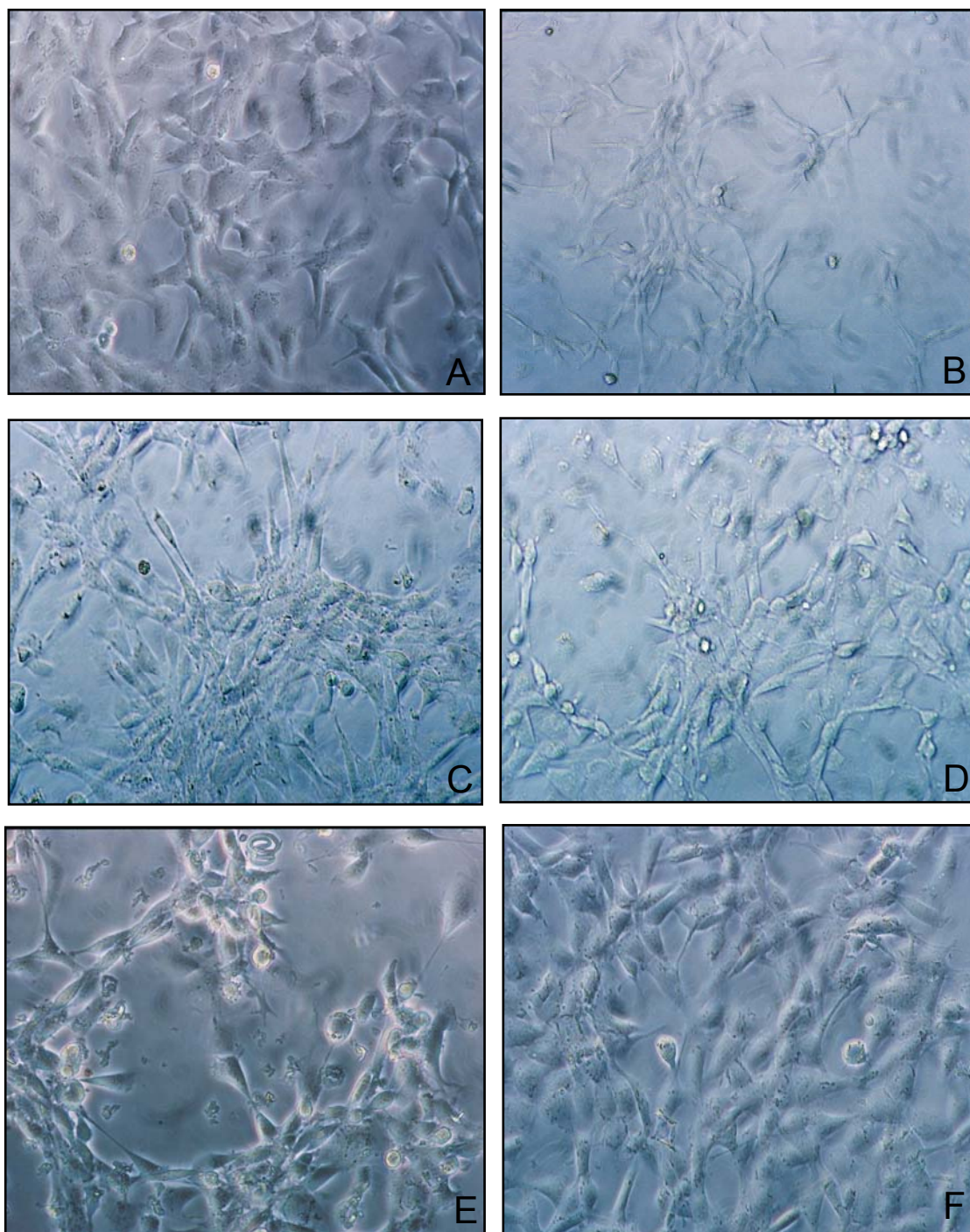


Figura 20: Inibição por anticorpos que reconhecem LiRecMP1 da atividade desadesiva de células RI causada pelo veneno de *L. intermedia*. Análise por microscopia invertida. (A) Células mantidas nas condições de cultivo na ausência de tratamento com veneno. Aumento de 200X **(B)** Células mantidas nas condições de cultivo tratadas com 5µg/mL de veneno. Aumento de 100X. **(C e E)** Células tratadas com 5µg/mL de veneno previamente incubados com 40 e 80µg de anticorpos pré-ímmunes. Aumento de 200X. **(D e F)** Células tratadas com 5µg/mL de veneno previamente incubados com 40 e 80µg de anticorpos que reconhecem metaloprotease. Aumento de 200X.

6. DISCUSSÃO

Aranhas do gênero *Loxosceles* têm sido responsáveis por um grande número de acidentes no Estado do Paraná, causando um conjunto de sintomas e sinais clínicos denominado loxocelismo (FUTRELL, 1992; da SILVA *et al.*, 2004). No loxoscelismo são comuns dois quadros clínicos o cutâneo ou dermonecrótico que se caracteriza por uma lesão dermonecrótica no local da picada com espalhamento gravitacional e o cutâneo-visceral ou sistêmico (FUTRELL, 1992; da SILVA *et al.*, 2004) com efeitos severos tais como: coagulação intravascular disseminada, hemólise intravascular, degeneração da parede dos vasos sangüíneos e falência renal, responsáveis, muitas vezes pela morte das vítimas (ZANETTI *et al.*, 2002; da SILVA *et al.*, 2003). OSPEDAL *et al* (2002) demonstraram que em coelhos injetados intradermicamente com veneno de *L. intermedia*, estavam presentes após 4 horas de tratamento, alterações como: hemorragia, degeneração da parede dos vasos, extravasamento de plasma, trombose, acumulação de neutrófilos ao redor dos vasos com intensa diapedese na derme e edema muscular subcutâneo.

Devido aos acidentes causados por esses aracnídeos e suas conseqüências clínicas, vários são os estudos que buscam investigar o modo de ação do veneno das aranhas do gênero *Loxosceles*. Visando uma melhor compreensão sobre as alterações das paredes dos vasos, visto que são bastante comuns no loxoscelismo, utilizamos nesse estudo células da linhagem RI, células musculares lisas de aorta de coelho (subendoteliais). Através de microscopia óptica convencional e a microscopia eletrônica de varredura, mostramos a ocorrência de alterações morfológicas nas células RI e desadesão das células do substrato de cultura, com conseqüente formação de agregados quando estas foram tratadas com veneno de *L. intermedia* (Figuras 3, 4, 5 e 6). Além das alterações morfológicas, alterações na organização dos filamentos de actina também ocorreram (Figura 9) e foram visualizadas através de microscopia confocal. PALUDO *et al* (2006) demonstraram também por microscopia eletrônica de varredura e microscopia confocal que os efeitos das toxinas nativas do veneno em células CLPs (endoteliais de aorta de coelho) incluem alterações morfológicas,

perda de adesividade das células ao substrato de cultura e desestabilização dos filamentos de actina do citoesqueleto.

PALUDO *et al.*, 2006; CREPLIVE, 2004, demonstraram através de microscopia confocal que em diferentes modelos celulares, tais como CLPs (endoteliais de aorta de coelho) e MCF-7 (tumor de mama), o veneno fica localizado sobre a superfície celular. Nesse trabalho também utilizamos técnicas de imunofluorescência e microscopia confocal, e verificamos dados semelhantes aos mostrados por PALUDO *et al.*, 2006 e CREPLIVE, 2004; que mostram que o veneno se liga na superfície de células RI (Figura 7), como previamente demonstrado para outras células. CHAIM (2005) sugere que as alterações morfológicas e do citoesqueleto não são apenas alterações na matriz extracelular, mas também da superfície celular.

Baseado na idéia de que o veneno seja responsável por causar efeitos nocivos em células da pele e de alguns órgãos, como por exemplo, nas células renais, CREPLIVE, 2004 estudou os efeitos das toxinas nativas do veneno sobre a proliferação e viabilidade celular utilizando o método de exclusão Azul de Trypan e MTT, respectivamente, em diferentes linhagens celulares e verificou que o veneno teve pequena atividade sobre a viabilidade das células tumorais, com exceção da linhagem HeLa (adenocarcinoma de útero). Baseado na mesma idéia, e com objetivo de estreitar as investigações sobre os danos nas paredes vasculares nós analisamos as taxas de viabilidade e proliferação de células RI. Os resultados demonstraram claramente que as células expostas a diferentes concentrações de veneno tiveram a sua viabilidade alterada após 48 horas quando comparadas com o grupo controle (Tabela 1, Figura 11). O mesmo ensaio demonstrou que células RI tratadas por 24 horas com veneno não tiveram mudanças, sugerindo que alterações na viabilidade celular são dependentes do tempo de exposição das células ao veneno. Realizamos também ensaios de proliferação com MTT e eles também sugerem que as células RI sofreram depois de expostas a um tempo prolongado de exposição ao veneno, pois os efeitos mais significativos ocorreram após 72 horas de tratamento, mesmo em diferentes concentrações (Tabela 2, Figura 12).

Estudos mais recentes citados por APPEL *et al.*, (2005) evidenciaram que as toxinas dos venenos das aranhas do gênero *Loxosceles* são um grupo de

proteínas com grande número de diferentes atividades, e que cada toxina encontrada no veneno das aranhas do gênero *Loxosceles* pode servir como modelos moleculares para elaboração de drogas. Entre as toxinas presentes no veneno das aranhas do gênero *Loxosceles* foram encontradas no veneno de *L. reclusa* uma esfingomielinase de 32kDa que em animais de laboratório pode produzir lesões necróticas (FUTRELL, 1992). Em *L. laeta*, *L. gaucho* e *L. intermedia* foram encontradas proteínas com perfil eletroforético similar, em SDS-PAGE . Nas três espécies de aranhas as proteínas responsáveis pela atividade dermonecrotica são de 30-35kDa (BÁRBARO *et al.*, 1994b; MOTA e BÁRBARO, 1995).

Proteases de venenos de animais também têm sido descritas como causadoras de efeitos nocivos, tais como: hemorragia, necrose e edema (FOX e BJARNASON, 1995). A presença de atividade proteolítica no veneno de aranhas do gênero *Loxosceles* foi primeiramente demonstrada no veneno de *L. reclusa* e *L. intermedia* (ESKAFI e NORMENT, 1976; JONG *et al.*, 1979; VEIGA *et al.*, 2000a). O efeito inibitório por quelantes de metais divalentes tais como EDTA e 1,10-fenantrolina indicam a presença de metaloproteases no veneno (FEITOSA *et al.*, 1998; VEIGA *et al.*, 2000b; ZANETTI *et al.*, 2002). Da SILVEIRA *et al.* (2002) verificaram a presença de proteases no extrato da glândula de veneno de *L. intermedia*, descartando a contaminação por egesto digestivo, que poderia estar presente na coleta por eletrochoque.

A presença de proteases (metaloproteases) no veneno de *L. intermedia*, *L. gaucho*, *L. deserta*, *L. laeta* e *L. rufescens* evidenciam que esta é uma molécula conservada e destacam uma importância biológica para estas toxinas (FEITOSA *et al.*, 1998; YOUNG e PINCUS, 2001; ZANETTI *et al.*, 2002; da SILVEIRA *et al.*, 2002; BARBARO *et al.*, 2005).

Entre as metaloproteases, as peptidases dependentes de zinco da família das astacinas, atuam como enzimas digestivas e foram descritas primeiramente em lagostas *Astacus astacus* (TITANI *et al.*, 1987; DUMERMUTH *et al.*, 1991). Metaloproteases da família das astacinas foram detectadas em diferentes espécies tais como humanos, camundongos, ratos, anfíbios, peixes, ouriços do mar, insetos, moluscos e até mesmo bactérias (BOUND e BEYON, 1995; STÖCKER *et al.*, 1995), reforçando sua importância biológica. A família das astacinas abrange

proteínas extracelulares e de limites celulares com funções digestivas e de processamento de peptídeos e estão envolvidas na ativação de fatores de crescimento, degradação de polipeptídeos e moléculas extracelulares (DUMERMUTH *et al.*, 1991; BOUND e BEYNON, 1995). Os membros das famílias das astacinas são caracterizados por seqüências consenso HExxHxxGxxHE que é um domínio de ligação de zinco e uma dobra de metionina MHY, os quais são os elementos chave para a família (DUMERMUTH *et al.*, 1991; BOUND e BEYNON, 1995; MOHERLEN *et al.*, 2004). Outras toxinas com atividades líticas como hialuronidases, serino-proteases também foram identificadas no gênero *Loxosceles* (da SILVA *et al.*, 2004; APPEL *et al.*, 2005).

Depois de verificar os efeitos causados pelas toxinas nativas do veneno de *L. intermedia*, e seguindo as idéias propostas por APPEL *et al* (2005) o objetivo deste trabalho passou a ser a verificação dos efeitos citotóxicos de algumas das toxinas encontradas no veneno. Desta forma começamos a estudar os efeitos de uma toxina dermonecrótica (esfingomielinase) e de uma toxina com atividade proteolítica (metaloprotease semelhante a astacina).

Ensaio utilizando a proteína dermonecrótica recombinante (LiRecDT1; CHAIM *et al.*, 2006) com funções biológicas comprovadas por experimentos “in vivo” realizados no laboratório, mostraram que esta toxina foi incapaz de provocar danos visíveis através de microscopia óptica em células RI, como alterações morfológicas ou vacuolizações citoplasmáticas (Figuras 13, 14 e 15). CHAIM *et al.*, 2006 utilizando esta mesma toxina “in vivo” e “in vitro” sobre o modelo renal reproduziu os efeitos nocivos causados pelo veneno. CHAIM *et al.*, 2006 mostrou que células MDCK (células tubulares renais) tratadas com a referida toxina apresentaram vacuolização citoplasmática e espalhamento celular, “in vivo” ocorreram injúria renal semelhante ao que ocorreu com o veneno bruto de *L. intermedia*.

Após verificar que a proteína recombinante dermonecrótica (LiRecDT1) aparentemente não causou danos na linhagem RI e, devido as células se organizarem em agregados quando submetidos a ação das toxinas do veneno bruto de *L. intermedia*, surgiu a hipótese de que a formação dos agregados foi resultado da ação proteolítica de metaloproteases presentes no veneno. Para comprovar essa hipótese utilizamos toxinas recombinantes LiRecMP1 como

antígenos e as injetamos em camundongos com a finalidade de produzir anticorpos que reconhecem esta toxina. Atualmente o emprego de anticorpos como bioferramentas no estudo de venenos tem sido amplamente difundido e utilizado tanto para realização de diagnósticos quanto para a produção de anti-soros (CLOT-FAYBESSE *et al.*, 1999; GATHUMBI *et al.*, 2001; GUILHERME *et al.*, 2001; ALVARENGA *et al.*, 2003; RAWEERITH e RATANABANANGKON, 2005). Desta forma, produzimos anticorpos com a finalidade de verificar a inibição da atividade proteolítica das metaloproteases do veneno. Para verificar a relação entre a toxina recombinante LiRecMP1 com as toxinas nativas do veneno de *L. intermedia* realizamos imunoenensaio de ELISA (Figura 16). A reação imunológica cruzada entre anticorpos que reconhecem LiRecMP1 com esta toxina e com as toxinas do veneno bruto de *L. intermedia* mostraram reação positiva nos dois casos. Realizamos também ensaios de imunoblotting (Figura 17) que confirmaram a especificidade de anticorpos que reconhecem LiRecMP1, mostrando que existe no veneno uma ou mais toxinas nativas com epitopos conservados em relação a LiRecMP1, na região de 28-30kDa. A produção e a utilização de anticorpos que reconhecem LiRecMP1 confirmaram a hipótese levantada de que uma metaloprotease presente no veneno de *L. intermedia* é o tipo de molécula capaz de formar os agregados celulares, provavelmente porque sua ação proteolítica é capaz de degradar importantes moléculas de matriz extracelular como fibronectina, cuja função está relacionada com a adesão das células ao substrato (Figura 20). FEITOSA *et al* (1998) já haviam descrito duas metaloproteases no veneno de *L. intermedia*, uma delas com (20-28 kDa) a loxolisina A, com atividade fibronectinolítica e fibrinogenolítica e outra com (32-35 kDa) a loxolisina B, com atividade gelatinolítica, comprovadas também por da SILVEIRA *et al* (2002) quando estudaram o extrato de glândulas de veneno de *L. intermedia*.

Além da inibição da atividade proteolítica do veneno de *L. intermedia* na cultura de células RI por anticorpos que reconhecem LiRecMP1, realizamos eletroforeses em SDS-PAGE para verificar a ação inibitória de anticorpos que reconhecem LiRecMP1 sobre a atividade fibronectinolítica. As amostras, contendo veneno de *L. intermedia* incubadas com anticorpos que reconhecem LiRecMP1 mostraram que a degradação da fibronectina foi inibida (Figura 18). Estes resultados sugerem fortemente que existe no veneno uma metaloprotease

semelhante a astacina, cuja ação proteolítica deve estar causando o corte da matriz extracelular adesiva, deixando as células soltas e desaderidas. Um bom substrato adesivo para células RI é a fibronectina, molécula degradada pelo veneno e que pode ser este substrato. Realizamos também outros experimentos que mostraram os efeitos do veneno de *L. intermedia* sobre a dinâmica de adesão de células RI sobre o substrato de fibronectina e evidenciamos a importância desta molécula da matriz extracelular para a adesão celular, pois o substrato de fibronectina exposto por 18 horas a ação do veneno teve a adesão de células inibida em 57,4% (Figura 10). Desta forma, nossos resultados evidenciaram que as toxinas do veneno de *L. intermedia*, aplicadas sobre um substrato de fibronectina interferem na desadesão das células ao substrato e, portanto a ação proteolítica do veneno sobre moléculas de fibronectina auxilia na formação dos agregados celulares (Figuras 3, 4 e 5).

Ainda com objetivo de observar a influência de metaloproteases sobre os vasos, realizamos experimentos que visaram avaliar o extravasamento de proteínas do plasma ocasionado pelo aumento da permeabilidade vascular induzida pelo veneno. Para alcançarmos este objetivo incubamos previamente veneno com anticorpos que reconhecem metaloproteases e depois aplicamos em camundongos previamente injetados com o corante vital Azul de Evans. Nossos resultados demonstraram que o veneno inibido por anticorpos que reconhecem LiRecMP1 teve menor espalhamento de proteínas do plasma ao redor dos vasos (Figura 19D) mostrando que as metaloproteases da família das astacinas têm grande importância no aumento da permeabilidade vascular induzida pelo veneno. Da SILVEIRA *et al* (2006) realizando experimentos de permeabilidade vascular semelhantes aos realizados aqui, mas tendo como agente indutor uma toxina recombinante dermonecrótica (LiRecDT1) verificou que esta toxina isolada comparada ao veneno total desencadeia um menor espalhamento de proteínas do plasma ao redor dos vasos quando comparado ao veneno total, o que sugere que as metaloproteases têm um importante papel no aumento da permeabilidade vascular agindo provavelmente como fatores de espalhamento de toxinas.

Os resultados desse trabalho nos permitem sugerir que a ação proteolítica do veneno de *L. intermedia* na formação dos agregados e no aumento da

permeabilidade vascular se deva a ação de metaloproteases da família das astacinas, provavelmente Loxolisina A (descrita por FEITOSA *et al.*, 1998), pois sua ação proteolítica atua sobre moléculas de fibronectina e também porque a proteína recombinante da qual é obtido o anticorpo tem um número da massa molecular em torno de 29 kDa. (verificada por imublotting – Figura 17).

7. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nesse trabalho sobre a ação das toxinas nativas do veneno de *L. intermedia* bem como de toxinas recombinantes nos permitem as seguintes conclusões:

- 1) O veneno de *L. intermedia* é capaz de causar alterações morfológicas em células RI e desadesão das células do substrato com a formação de agregados celulares.
- 2) Células RI têm a viabilidade e a proliferação diminuídas quando expostas ao veneno de *L. intermedia* por um tempo prolongado.
- 3) As toxinas do veneno de *L. intermedia* podem causar desestabilização dos filamentos de actina em células RI causando uma reorganização do citoesqueleto.
- 4) Células RI tratadas com veneno de *L. intermedia* estão sujeitas a ação de metaloproteases. Alterações morfológicas e desadesão das células do substrato provavelmente sejam devido a degradação das moléculas de fibronectina por metaloproteases da família das astacinas, presentes no veneno.

- 5) O aumento da permeabilidade vascular provocado pelo veneno de *L. intermedia* pode estar relacionado com as metaloproteases, visto que podem estar atuando como espalhadoras de toxinas;

- 6) A produção e a utilização de anticorpos que reconhecem LiRecMP1 permitiram a detecção desta toxina no veneno bruto, assim como possibilitaram a inibição desta toxina no veneno, sendo desta forma, possível a conclusão de que as metaloproteases são responsáveis por muitos dos danos causados pelo veneno de *L. intermedia* na matriz extracelular de células RI e no aumento da permeabilidade nos vasos sanguíneos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

APPEL, M. H.; DA SILVEIRA, R. B.; GREMSKI, W.; VEIGA, S.S.; Insight into brown spider and loxocelism. **Invertebrate Survival Journal**.; 2:152-158, 2005.

BARBARO, K.C.; EICKSTEDT, V.R.D.;MOTA, I.; Adjuvant effect of *Loxosceles gaucho* (South American brown spider) venom. **Toxicon**. 32: 687-693, 1994a.

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

BARBARO, K.C.; JARED, C.; MOTA, I.; Aranhas venenosas no Brasil. **Ciência Hoje**. 19: 48-52, 1995.

BARBARO, KC; FERREIRA, ML; CARDOSO, DF; EICKSTEDT, VRD; MOTA,I.; Identification and neutralization of biological activities in the venoms of *Loxosceles* spiders. **Braz. J. Med. Biol. Res**. 29:1491-1497, 1996.

BARBARO, K.C., KNYSAK,I., MARTINS, R., HOGAN, C., WINKEL, K.; Enzymatic characterization, antigenic cross-reactivity and neutralization of dermonecrotic activity of five *Loxosceles* spider venoms of medical importance in the Americas. **Toxicon**. 45: 489-499, 2005.

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

BINFORD, G. J. ; CORDES, M. H. J. ; WELLS, M. A.; Sphingomyelinase D from venoms of *Loxosceles* spiders: evolutionary insights from cDNA sequences and gene structure. **Toxicon**. 45:547-560, 2005.

BOND, J. S., BEYNON, R. J., The astacin family of metalloendopeptidases. *Protein Sci.* 4, 1247-1261, 1995.

BORKKAN, J., GROSS, E., LUBIN, Y., ORYAN, I., An outbreak of venomous spider bites in a citrus grove. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 52: 228-230, 1995.

BRADFORD, M. A. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of Protein-Dye-Binding. **Anal. Biochem.**; 72:248-254, 1976.

BÜCHERL, W. As aranhas. In **Invertebrados**. 1^a ed., Edart, São Paulo, 1972.

BUONASSISI, V.; VENTER, J.C. Hormone and neurotransmitter receptors in an established vascular endothelial cell line. **Proc Natl Acad Sci., USA.** 73: 1612-1616, 1976.

CHAIM, O.M. Estudo da atividade citotóxica da proteína dermonecrótica do veneno de aranha marrom (*Loxosceles intermedia*) com ênfase no efeito nefrotóxico. **Dissertação de mestrado em Biologia Celular e Molecular.** Universidade Federal do Paraná, 2005.

CHAIM, O. M.; SADE, Y. B.; DA SILVEIRA, R. B.; KALAPOTHAKIS, L. T. E.; OLÓRTEGUI, C.; MANGILI, O. C.; GREMSKI, W.; DIETRICH, C. P.; NADER, H. B.; VEIGA, S.S.; Brown spider dermonecrotic toxin directly induces nephrotoxicity. **Toxicology and applied Pharmacology**. 211:64-77, 2006.

CLOT-FAYBESSE, O.; JUIN, M.; ROCHAT, H.; DEVAUX, C. Monoclonal antibodies against the *Androctonus australis* hector scorpion neurotoxin I: characterization and use for venom neutralization. **FEBS Letters**. 458:313-318, 1999.

COHEN, N.; SARAFIAN, D.A.; ALON, I.; GORELIK, O.; ZAIDENSTEIN, R.; SIMANTOV, R.; BLATT, A.; LITINSKY, I.; MODAI, D.; GOLIK, A. Dermonecrotic loxoscelism in the Mediterranean region. **J. Toxicol. Cut. Ocular Toxicol**. 18:75-83, 1999.

COUTINHO, N.L.R. Avaliação funcional e histopatológica das alterações renais induzidas pelo veneno da “aranha-marrom” *Loxosceles intermedia*” (Mello-Leitão, 1934). **Dissertação de Mestrado em Morfologia e Biologia Celular**. Universidade Federal do Paraná, 1996.

CREPLIVE, S.D. Atividade citotóxica do veneno de *L. intermedia* sobre diferentes linhagens tumorais humanas. **Dissertação mestrado em Biologia Celular e Molecular**. Universidade Federal do Paraná, 2004.

da SILVA, P. H.; HASHIMOTO, Y.; dos SANTOS, F. A.; MANGILI, O. C.; GREMSKI, W.; VEIGA, S.S.; Hematological cell findings in bone marrow and peripheral blood of rabbits after experimental acute exposure to *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. **Toxicon**. 42: 155-161, 2003.

da SILVA, P. H.; da SILVEIRA, R. B.; APPEL, M. H.; MANGILI, C. O.; GREMSKI, W.; VEIGA, S. S. Brown Spiders and Loxoscelim. **Toxicon**. 44:693-709, 2004.

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

da SILVEIRA, R.B.; PIAGOZZO, R. B.; CHAIM, O.M.; APPEL,M.H.; DREYFUSS, J.L.; TOMA,L.; MANGILI, O.C.; GREMSKI, W.; DIETRICH, P.C.; NADER, H. B.; VEIGA, S.S.; Molecular cloning and functional characterization of dermonecrotic toxin from *Loxosceles intermedia* (Brown spider) venom gland. **Biochimie**. 2006; 88: *in press*.

dos SANTOS, V. L. P.; FRANCO, C. R. C.; VIGGIANO, R. L. L.; DA SILVEIRA, R. B.; CANTÃO, M. P.; MANGILI, O.C; VEIGA, S.S.; GREMSKI, W. Structural and ultrastructural description of the venom gland of *Loxosceles intermedia* (brown spider).**Toxicon**. 38:265-285, 2000.

DUMERMUTH, E., STERCHI, E.E., JIANG, W., WOLZ, R., BOND, J.S., FLANNERY, A. V., BEYNON, R.J.,. The astacin family of metalloendopeptidases. **J. Biol. Chem**. 266: 21381-21385, 1991.

ENGVALL, E., RUOSLAHTIE., E.; Binding of soluble form of fibroblast surface protein, fibronectin, to collagen. **Int. J. Cancer**. 20:1-5, 1977.

ESCALANTE-GALINDO, P.; MONTOYA-CABRERA, M.A.; TERROBA-LARIOS, V.M.; NAVA-JUARÉZ, A.R.; ESCALANTE-FLORES,I. Local dermonecrotic loxoscelism in children bitten by the spider *Loxosceles reclusa* (the “violin”spider). **Gac. Med. Mex**. 135:423-426, 1999.

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

ESKAFI, F.M.; NORMENT, B.R.; Physiological action of *Loxosceles reclusae* venom on insect larvae. **Toxicon**. 14:7-12, 1976.

FAIRBANKS, G., STECK, T.L., WALLACH, D.F.H. Coomassie blue R250 used in isopropanol-acetic acid. **Biochemistry**. 10: 2606-2618, 1971.

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

FORRESTER, L.J.; BARRET, J.T.; CAMPBELL, B.L. Red blood cell lysis induced by the venom of the brown recluse spider. The role of sphingomyelinase D. **Arch. Biochem. Biophys**. 187:335-365, 1978.

FOX, J.W., BJARNASON, J.B.,. Atrollysins: metalloproteinases from *Crotalus atrox* venom. **Methods Enzymol**. 248: 368-387, 1995.

FUTRELL, JM. Loxoscelism. **Am. J. Med. Sci**. 304:261-267, 1992.

GAJARDO-TOBAR, R. R. Minha experiência sobre loxoscelismo. **Mem. Inst. Butantan**. 33:689-698, 1966.

GATHUMBI, J.K.; USLEBER, E.; MARTLBAUER, E. Production of ultrasensitive antibodies against aflatoxin B1. **Lett Appl. Microbiol**. 32: 349, 2001.

GASPARELLO-CLEMENTE, E., SILVEIRA, P.F.,. Fluorometric assay using naphthylamide substrates for assessing novel venom peptidase activities. **Toxicon**. 40: 1617-1626, 2002.

GERTSCH, W.J.; ENNIK, F. The spider genus *Loxosceles* in North America, Central America and West Indies (Aranae, Loxoscelidae). **Bull. Am. Mus. Nat. Hist.** 175:264-360, 1983.

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.** 39: 1333-1342, 2001.

HARLOW, E.; LANE, D. Antibodies. **A Laboratory Manual.** 1 ed . Cold Spring Harbor Laboratory: USA. 1988.

JONG, Y.S.; NORMENT, B.R.; HEITZ, J.R.; Separation and characterization of venom components in *Loxosceles reclusa*-II. Protease enzyme activity. **Toxicon.** 16:529-539, 1979.

LAEMMLI, U.K.,. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature.** 227: 680-685,1970.

LOWRIE, D.C.; Starvation longevity of *Loxosceles laeta* (Nicolet) (Araneae), **Ent. News,** 9: 130-132, 1980.

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

LUCIANO, M.N.; DA SILVA, P.H.; CHAIM, O.M.; DOS SANTOS, V. L. P.; FRANCO, C. R. C.; SOARES, M. F. S.; ZANATA, S. M.; MANGILI, O.C.; GREMSKI, W.; VEIGA, S. S. Experimental Evidence for Direct Cytotoxicity of *Loxosceles intermedia* (Brown Spider) Venon in Renal Tissue. **J. Histochem. Cytochem.** 52: 455-462, 2004.

MARTINEZ-VARGAS, A.Z. Loxoscelismo, um problema de salud en el Perú. **Bol. San. Panam.** 103:378-386, 1987.

MOHRLLEN, F., BOND, J. S., STOCKER, W.,. Other astacin homologues. In Handbook of Proteolytic Enzymes, 2edn (Barret, A. J., Rawlings, N. D., Woessler, J. F. eds), Elsevier, London, 2004.

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

MOSMANN, T; Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods.** 65: 55-63, 1983.

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

NICHOLSON, G.M. E GRAUDINS, A. Antivenenoms for the treatment of spider envenenation. **J. Toxicol. Toxins Reviews.** 22:35-59, 2003.

OSPEDAL, K. Z.; APPEL, M. H.; NETO, J. F.; MANGILI, O.C; VEIGA, S.S.; GREMSKI, W. Histopathological findings in rabbits after experimental acute exposure to the *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. **Int. J. Exp. Path.** 84:287-294, 2002.

PALUDO, K.S.; GREMSKI, L.H.; VEIGA, S.S.; CHAIM, O.M.; GREMSKI, W.; BUCHI, D.F.; NADER, H.B.; DIETRICH, C.P; FRANCO, C.R.C.; The Effect of Brown spider venom on endothelial cell morphology and adhesive structures. **Toxicon.** 44: 2006; *in press*.

PATEL, K.D., MODUR, V., ZIMMERMAN, G.A., PRESCOTT, S.M., MCINTYRE, T.M. The necrotic venom of brown recluse spider induces dysregulated endothelial cell-dependent neutrophil activation. **J. Clin. Invest.** 94: 631-642, 1994.

PIZZI, T.; ZACARIAS, J.; SCHENONE, E. H. Estudio histopatológico experimental en el envenenamiento por *Loxosceles laeta*. **Pathologica.** 23:33, 1957.

PLATINICK, N. I. Advances in spider taxonomy 1988-1991. **The New York Entomological Society.** New York, 1993.

RAWEERITH, R.; RATANABANANGKOON, K. Immunochemical and biochemical comparisons of equine monovalente and polyvalent snake antivenoms. **Toxicon.** 45:369-375, 2005.

RASH, L.D. E HODGSON, W.C. Pharmacology and biochemistry of venoms. **Toxicon.** 40:225-254, 2002.

REES, RS; NANNEY, LB; YATES, RA; KING, LE. Interaction of brown recluse spider venom on cell membranes: The inciting mechanism? **J. Invest. Dermatol.** 83:270-275, 1984.

REES, RS; GATES, C; TIMONS, S; DES-PRES, RM; KING, LE Jr. Plasma components are required for platelet activation by the toxin of *Loxosceles reclusa*. **Toxicon.** 26:1035-1046, 1988.

RODRIGUES, CJH; PARAS, ZMS; NOBREGA, MM; TORRES, JB. Acidentes com aracnídeos. **Revista HCPA.** 6: 91-96, 1986.

RUPPERT, E.E. E BARNES, R.D. **Zoologia dos invertebrados.** Ed. Roca, São Paulo, 6ª ed., 1996.

SCHENONE, H. E LETONJA, T. Notas sobre la biología y distribución geográfica de las arañas del género *Loxosceles*. **Bol. Chil. Parasitol.** 30:27-29, 1975.

SCHENONE, H; Loxoscelismo en Chile. Estudios epidemiológicos, clínicos y experimentales. **Rev. Inst. Med. Trop.** 31(6): 403-415, 1989.

SCHENONE, H. Cutaneous loxoscelism with an edematous predominance. **Bol. Chil. Parasitol.** 53:78-83, 1998.

SEZERINO, UM; ZANNIN, M; COELHO, LK. A clinical and epidemiological study of *Loxosceles* spider envenoming in Santa Catarina, Brasil. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 92:546, 1998.

SMITH, W.C. E MICKS, W.D. The role of polimorphonuclear leukocytes in the lesion caused by the venom of the brown spider, *Loxosceles reclusa*. **Lab. Invest.** 22:90-93, 1970.

SOERENSEN, B. **Acidentes por animais peçonhentos: reconhecimento, clínica e tratamento.** Editora Atheneu, 1996.

STÖCKER, W., GRAMS, F., BAUMANN, U., REINEMER, P., GOMIS-RUTH, F. X., MCKAY, D.B., BODE, W.,. The metzincins – Topological and sequential relations between the astacins, admalysis, serralysis and matrixins (collagenases) define a superfamily of zinc-peptidases. **Prot. Sci.** 4: 823-840, 1995.

SUAREZ, G.; BIGGERMANN, U.; SCHENONE, H. Estudios bioquímicos del veneno de *Loxosceles laeta* y sus mecanismos de acción. **Bol. Chil. Parasitol.**, Chiba. 26:60-62, 1971.

TAMBOURGI, D.V., MAGNOLI, F.C., EICKSTEDT, V.R.D., BENEDETTI, Z.C., PETRICEVICH, V.L., SILVA, W.D. Incorporation of a 35-kilodalton purified protein from *Loxosceles intermedia* spider venom transforms human erythrocytes into activators of autologous complement alternative pathway. **J. Immunol.** 155:4459-4466, 1995.

TITANI, K., TORFF, H.J., HORMELL, S., KUMAR, S., WALSH, K.A., RODL, J., NEURATH, H., ZWILLING, R., Amino acid sequence of a unique protease from the crayfish *Astacus fluviatilis*. **Biochemistry.** 26: 222-226, 1987.

TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedures and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 76:4350-4354, 1979.

VEIGA, S.S.; CHAMMAS, R.; CELLA, N.; BRENTANI, R.R. Glycosylation of β_1 integrins in B16-F10 melanoma cells as determinant of differential binding and acquisition of biological activity. **Int. J. Cancer.** 61:420-424, 1995.

VEIGA, S.S., GREMSKI, W., SANTOS, V.L.P., FEITOSA, L., MANGILI, O.C., NADER, H.B., DIETRICH, C.P., BRENTANI, R.R. Oligosaccharide residues of *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom proteins: dependence of glycosylation for dermonecrotic activity. **Toxicon.** 37:587-607, 1999.

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

VEIGA, S.S., FEITOSA, L., SANTOS, V.L.P., DE SOUZA, G.A., RIBEIRO, A.S., MANGILI, O.C., PORCIONATTO, M.A., NADER, H.B., DIETRICH, C.P., BRENTANI, R.R. and GREMSKI, W. Effect of *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom on basement membrane structures. **Histochem. J.** 32:397-408, 2000b.

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. *In vivo* and *In vitro* cytotoxicity of brown spider venom for blood vessel endothelial cells. **Thromb. Res.** 102:229-237, 2001a.

VEIGA, S.S.; ZANETTI, V.C.; BRAZ, A.; MANGILI, O.C.; GREMSKI, W. Extracellular matrix molecules as targets for brown spider venom toxins. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 34:843-850, 2001b.

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

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

9. ANEXO



CERTIFICADO

Nº 126

A Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituída pela PORTARIA Nº 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento da CEEA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO Nº 01/03-BL, de 09 de maio de 2003 e considerando o contido no Regimento Interno do CEEA, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no(a) Projeto de pesquisa abaixo especificado(a), estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care) ,

TÍTULO: "BIODIVERSIDADE, TOXINAS E APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS"

AUTORES: SILVIO SANCHES VEIGA – Coordenador

WALDEMIRO GREMSKI, OLDEMIR CARLOS MANGILI E

CÉLIA REGINA C FRANCO – Colaboradores

DEPARTAMENTO: BIOLOGIA CELULAR

Curitiba, 10 de junho de 2005

Prof **SILVIO MARQUES ZANATA**
Secretário

Profa **ANETE CURTE PERRAZ**
Presidente