

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

BRUNO CESAR ANTUNES

CARACTERIZAÇÃO DE IMUNÓGENO PARA FIM DE PRODUÇÃO DE SORO
ANTILOXOSCÉLICO UTILIZADO NO SISTEMA ÚNICO DE SAÚDE: ESTUDOS
BIOQUÍMICOS E DE ESTABILIDADE DOS VENENOS DE ARANHAS DO GÊNERO
Loxosceles

CURITIBA

2017

BRUNO CESAR ANTUNES

CARACTERIZAÇÃO DE IMUNÓGENO PARA FIM DE PRODUÇÃO DE SORO
ANTILOXOSCÉLICO UTILIZADO NO SISTEMA ÚNICO DE SAÚDE: ESTUDOS
BIOQUÍMICOS, BIOLÓGICOS E DE ESTABILIDADE DOS VENENOS DE ARANHAS
DO GÊNERO *Loxosceles*

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular, no Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof. Dra. Olga Meiri Chaim

Co-orientadores: Prof. Dra. Andrea Senff Ribeiro
Prof. Dr. Silvio Sanches Veiga

CURITIBA

2017

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas
(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1406)

Antunes, Bruno Cesar

Caracterização de imunógeno para fim de produção de soro antiloxoscélico utilizado no Sistema Único de Saúde : estudos bioquímicos e de estabilidade dos venenos de aranhas do gênero *Loxosceles*. / Bruno Cesar Antunes. – Curitiba, 2017.

92 p.: il.

Orientadora: Olga Meiri Chaim.

Coorientadores: Andrea Senff Ribeiro e Silvio Sanches Veiga.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

1. Aranhas - Veneno. 2. Antivenenos. 3. Loxosceles. I. Título. II. Chaim, Olga Meiri. III. Ribeiro, Andrea Senff, 1977-. IV. Veiga, Silvio Sanches, 1962-. V. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

CDD (22. ed.) 615.942

Programa de Pós-graduação Biologia Celular e Molecular

Departamento de Biologia Celular
Setor de Ciências Biológicas
Universidade Federal do Paraná



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:

Examinador/Afiliação

Assinatura

Profa. Dra. Olga Meiri Chaim
Orientadora e presidente da banca
Universidade Federal do Paraná

Prof. Dr. Axel Helmut Rulf Cofré
Instituto Carlos Chagas

Prof. Dr. João Carlos Minozzo
Pontifícia Universidade Católica do
Paraná

Suplente:

Prof. Dr. Rubens Bertazzoli Filho
Universidade Federal do Paraná

Após arguir o mestrando **Bruno Cesar Antunes**, em relação ao seu trabalho intitulado: "Caracterização de imunógeno para fim de produção de soro antiloxoscélico utilizado no sistema único de saúde: estudos bioquímicos e de estabilidade dos venenos de aranhas do gênero *Loxosceles*", são de parecer favorável à apresentação do acadêmico, habilitando-o ao título de MESTRE em Biologia Celular e Molecular.

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

Prof.ª Dr.ª Andrea Seniff Ribeiro
Coord. do Programa de Pós-Graduação
Em Biologia Celular e Molecular
Matr./UFPR 200261

Curitiba, 01 de Fevereiro de 2017

Dedico este trabalho ao meu avô José Francisco de Araújo.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por todo amor, incentivo e por terem me dado possibilidades que poucos neste país têm.

À Máisa, por ser minha melhor irmã.

À Vanessa, pelo amor, companheirismo, compreensão e ajuda. Com certeza não teria conseguido sem você ao meu lado.

À minha Orientadora, Prof^a. Dr^a. Olga Meiri Chaim por ter acreditado na utilidade e aplicabilidade deste trabalho desde o início, por sempre ter se mostrado presente independente da distância e, sobretudo, pela amizade e confiança construídas.

Aos meus Co-orientadores, Prof^a. Dr^a. Andrea Senff-Ribeiro e Prof. Dr. Silvio Sanches Veiga por terem aberto as portas do Laboratório de Matriz Extracelular e Biotecnologia de Venenos – LME, em conjunto com a minha Orientadora, e por todo apoio recebido e sugestões construtivas ao longo destes dois anos.

Aos Drs. João Carlos Minozzo, Rubens L. F. Gusso e Sérgio Túlio Stinghen pelo incentivo, pela compreensão nas minhas ausências e por entenderem a importância e estimularem a formação técnico-científica dos servidores do CPPI.

Ao Adriano Morgon, por toda a ajuda dada, pelas horas de conversas (fossem elas científicas ou não), e pela confiança de que tudo sempre dá certo no final (isso se a gente trabalhar, certo?).

Ao Thiago L. de Mari, por ter sido meu primeiro “tutor” no laboratório e pela paciência.

Ao Gabriel Meissner, também pela ajuda nos géis, pelo companheirismo e pelo compêndio de conteúdo não-científico compartilhado.

À Vanessa Heidemann, à Elidiana e à Antonielle pela parceria, auxílio e risadas.

Ao Gabriel Leão, por mostrar que uma nova abordagem acadêmica também pode ser possível, pelas conversas (normal e legal, só a gente, mesmo) e pelos litros de café.

Ao Ximbas, Padre, Schuh, Seu Nilson e Mazilda, por razões óbvias.

Aos demais colegas de LME (Daniele, Fernando, Sorocaba, Hanna, Dilza, Larissa, Piá) pela convivência diária.

Aos demais Professores e Servidores do Departamento de Biologia Celular.

E, finalmente, a todos os animais que doam seu sangue e suas vidas em benefício da saúde humana. Que futuramente, esta realidade fique apenas como parte da História.

“A única felicidade da vida está na consciência de ter realizado algo útil em benefício da comunidade.”

Vital Brazil (1865-1950)

RESUMO

As picadas de aranhas-marrons, como são popularmente conhecidos os aracnídeos do gênero *Loxosceles*, são um agravo de Saúde Pública não apenas no Brasil, mas também em outros países de todo o mundo. Embora se utilizem várias classes medicamentosas na abordagem terapêutica do acidentado, o único tratamento específico capaz de neutralizar a ação do veneno é o Soro Antiloxoscélico, produzido por apenas um laboratório no Brasil: o Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos – CPPI. O soro, distribuído no Sistema Único de Saúde – SUS é produzido a partir do processamento industrial-farmacêutico do plasma de equinos imunizados com os venenos das aranhas *L. gaucho*, *L. intermedia* e *L. laeta*, as três espécies de maior importância médica no país. Para a imunização dos cavalos, o CPPI produz soluções de veneno das três espécies citadas. Durante seu processo de produção, torna-se imprescindível um controle de qualidade eficiente com a comparação dos lotes fabricados com um padrão de referência, a fim de atestar que os antígenos possuem componentes idênticos àqueles encontrados nos animais causadores de acidentes e que são imunogênicos, com capacidade de estimular o sistema imune de equinos para a produção de anticorpos específicos frente às toxinas dos venenos. Em vista disso, foram realizados ensaios visando à caracterização dos perfis proteicos, enzimáticos, imunoquímicos e estabilidade dos venenos das três espécies de *Loxosceles* utilizadas na produção do soro antiveneno durante nove meses, para sua posterior aplicação na rotina dos Controles de Qualidade da produção de venenos. Foi possível observar diferenças entre os perfis eletroforéticos dos venenos das aranhas do gênero *Loxosceles*, bem como se notou a diminuição de intensidade de algumas bandas proteicas com o passar do tempo. A atividade proteásica averiguada através de zimograma em gelatina foi constatada em todos os venenos durante os nove meses de testes, com a seguinte ordem crescente de ação proteolítica: *L. gaucho* < *L. intermedia* < *L. Laeta*. A mesma ordem de degradação de gelatina também foi observada em ensaio para determinação quantitativa da atividade metaloproteásica, realizado em seguida à produção (Tempo 0) dos venenos obtidos em 2016. As atividades hialuronidásica e fosfolipásica também se mostraram presentes em todas as espécies até nove meses pós-produção. Entretanto, a ação das fosfolipases pareceu diminuir a partir do terceiro mês de observação quando comparado como Tempo 0, porém tal dado não pode ser considerado como fator de exclusão dos venenos a serem empregados na imunização de equinos, uma vez que esta família de toxinas ainda se mostrou presente. Todos os venenos mostraram-se imunogênicos até três meses depois de produzidos em análises realizadas por Western-blotting com diferentes soros, incluindo o Soro Antiloxoscélico. Desta maneira, é possível afirmar que os antígenos produzidos e utilizados pelo CPPI dentro do processo produtivo do Soro Antiloxoscélico mantêm conservadas as principais características bioquímicas e imunoquímicas dos venenos loxoscélicos, sendo adequados para utilização dentro do tempo analisado na imunização de animais, bem como as técnicas padronizadas apresentadas podem ser empregadas em controles de qualidade da produção dos venenos.

Palavras-chave: *Loxosceles*, CPPI, Soro Antiloxoscélico.

ABSTRACT

Bites of arachnids of the *Loxosceles* genus- popularly known as “brown spiders”- are considered to be a public health problem in Brazil. Although, many drug classes are used therapeutically, the only specific neutralizing treatment to the actions of the venom is the Antiloxosceles Serum, which is exclusively produced in Brazil by the Immunobiological Production and Research Center (CPPI). The serum, which is distributed into the Public Health System, is roused from the industrial plasma processing of the equines injected with the venoms of *L. gaucho*, *L. intermedia* e *L. laeta*, the three most important species of brown spiders in Brazil. For horse immunizations, CPPI produces the venom solutions of the three spider species. During the venom processing an efficient quality control aiming to maintain the properties of the venom batches is critical. In this way, a venom profile as reference pattern is indispensable for comparison purposes. It is necessary to certify venom antigens possess identical features to those on the accident-causing animals, such as immunogenicity, in order to further raise specific antibodies against venom toxins. Herein, samples of venom were essayed during nine months seeking to establish the protein, enzyme, immunochemical and stability profiles of *Loxosceles* venoms from the three species used by CPPI in the production of the antivenom and the later application of these techniques on the routine of the quality control of the immunogens. It was observed differences among the eletrophoretic a profile of the venoms from the spiders of the *Loxosceles* genus, as well as it was noticed the loss of intensity of some protein bands as the samples were older. The proteolytic activity verified by zymogram with gelatin was evidenced in all venoms during the nine months of tests with the following crescent order of proteolytic action: *L. gaucho* < *L. intermedia* < *L. laeta*. The same gelatin degradation order was also observed on the essay of metalloprotease activity carried out right after the production of the venoms from 2016 (Time 0). The hyaluronidase and phospholipase activities were present in all venoms until nine months after their production. However, the phospholipasse activity reduced from the third month of production. This result must not be considered as an exclusion factor of the venoms to be used on the immunization of horses, once this toxin family is still present in the samples. All the venoms were recognized by Western-blotting analysis by different sera including the Antiloxosceles Serum after three months of their production. Furthermore, it was demonstrated that the venoms produced by CPPI and used in the production of the Antiloxosceles Serum maintain the main biochemical and immunochemical properties of the *Loxosceles* venoms. They showed to be adequate for utilization on immunizations within the time studied (nine months). The techniques here presented can also be applied on the venom production for quality controls purposes,

Key-words: *Loxosceles*, CPPI, Antiloxoscelic Serum.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 ARANHAS DO GÊNERO <i>Loxosceles</i> sp.....	11
1.2 LOXOSCELISMO	13
1.3 O VENENO LOXOSCÉLICO.....	15
1.4 TERAPÊUTICA	16
1.5 O SORO.....	17
2 JUSTIFICATIVA	21
3 OBJETIVO	23
4 MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1 COLETA, TRIAGEM E MANUTENÇÃO DE ARANHAS DO GÊNERO <i>Loxosceles</i> (CONFORME PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO DO CPPI 9.01.01, 2013)24	
4.2 EXTRAÇÃO DE VENENO DE ARANHAS DO GÊNERO <i>Loxosceles</i> (CONFORME PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO DO CPPI 9.01.02, 2012)	25
4.3 PREPARO DAS SOLUÇÕES DE VENENO LOXOSCÉLICO (CONFORME PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO DO CPPI 9.01.03, 2012)	27
4.4 DOSAGEM DE PROTEÍNAS.....	28
4.5 ELETROFORESE DE PROTEÍNAS (SDS-PAGE).....	28
4.6 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS ANTI- <i>L. gaucho</i> , ANTI- <i>L. intermedia</i> E ANTI- <i>L. laeta</i>	29
4.6.1 Imunizações de coelhos	29
4.6.2 Imunizações de equinos	30
4.6.3 Soros antiveneno (produto final).....	30
4.7 WESTERN BLOTTING.....	30
4.8 ZIMOGRAMA	31
4.9 ENSAIO DE ATIVIDADE FOSFOLIPÁSICA.....	31
4.10 ENSAIO DE TURBIDIMETRIA	32
4.11 ENSAIO QUANTITATIVO DE ATIVIDADE GELATINOLÍTICA.....	33
5 RESULTADOS	34
5.1 PERFIS PROTEICOS DOS VENENOS	34

5.3 ZIMOGRAMA	53
5.4 ATIVIDADE FOSFOLIPÁSICA	58
5.5 ENSAIO DE TURBIDIMETRIA	61
5.6 ENSAIO QUANTITATIVO DE ATIVIDADE GELATINOLÍTICA	64
6 DISCUSSÃO.....	66
7 CONCLUSÕES.....	79
REFERÊNCIAS.....	81

1 INTRODUÇÃO

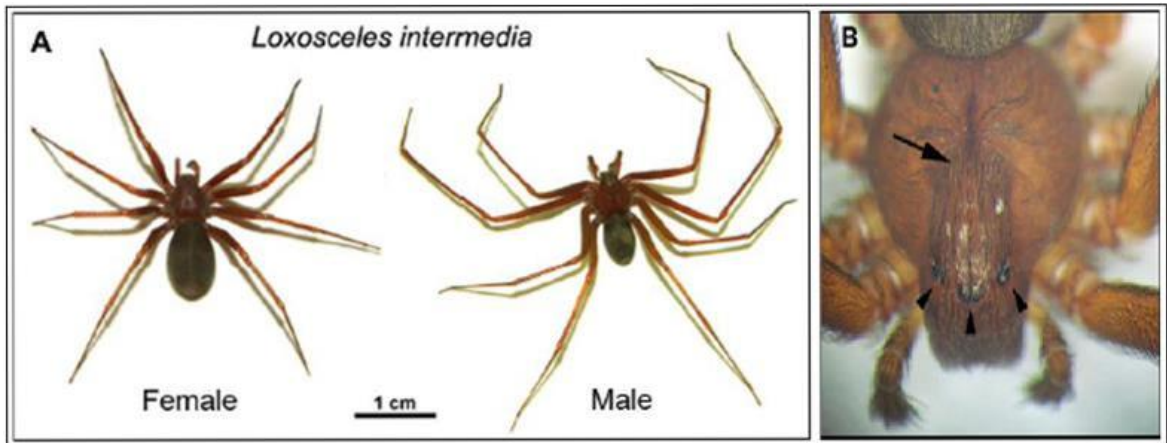
1.1 ARANHAS DO GÊNERO *Loxosceles* sp.

Atualmente, são reconhecidas cerca de 44.000 espécies de aranhas no mundo. Destas, apenas uma parte é considerada de relevância médica, com membros dos gêneros *Latrodectus* e *Loxosceles* contendo venenos que podem causar maiores danos a humanos, em caso de picadas (ELDRIDGE e EDMAN, 2004).

As aranhas do gênero *Loxosceles*, ou “aranhas-marrons”, como são popularmente conhecidas (CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2016) estão amplamente distribuídas pelo mundo, com mais de 100 espécies descritas, sendo encontradas na África, Europa, Oceania, partes da Ásia, América do Norte, América Central e, principalmente, América do Sul (DA SILVA *et al.*, 2004; BINFORD *et al.*, 2008; PLATNICK, 2014; BUCH *et al.*, 2015). Somente nesta última região, são representadas por mais de 30 espécies (LUCAS, 2009).

Pertencem à família Sicariidae (Araneomorphae) e são animais pequenos, com cerca de 1 cm de corpo, podendo chegar a até 5 cm de comprimento total. Possuem uma coloração amarronzada e dispõem de seis olhos dispostos aos pares organizados no formato da letra U. Há dimorfismo sexual neste gênero. (DA SILVA *et al.*, 2004; CHAIM *et al.*, 2011) (FIGURA 1). A diferenciação entre as espécies pode se dar pela análise morfológica dos seus aparelhos copuladores (VETTER, 2008)

FIGURA 1- DIMORFISMO SEXUAL (A) E CEFALOTORAX (B) DE *Loxosceles intermedia*.



FONTE: adaptado de CHAIM *et al.*, 2011.

Estes aracnídeos possuem hábitos noturnos, fazem teias irregulares e podem ser encontrados em fendas de barrancos, sob cascas de árvores, troncos, folhas caídas, raízes e cavernas, e devido à sua alta capacidade adaptativa também são encontradas nas proximidades e dentro de residências, onde se abrigam atrás de quadros, móveis, sótãos, porões e entulhos de telha e madeira (SEFFF-RIBEIRO *et al.*, 2008; CHATZAKI *et al.*, 2012). Não são agressivas, picando apenas quando espremidas ao corpo (LUCATO JR., 2011).

No Brasil, encontram-se registradas desde 1891, com a primeira espécie nativa (*L. similis*) descrita em 1898 por Moenkhaus (MOENKHAUS, 1898), porém somente em 1954 foram identificadas como causadoras de acidentes, especialmente nas regiões Sul e Sudeste, onde predominam as espécies *L. gaucho*, *L. intermedia* e *L. laeta* (BUCH *et al.*, 2015). Estas três espécies, juntamente com a *L. reclusa* da América do Norte, a *L. deserta* dos Estados Unidos e México e a *L. rufescens*, são consideradas as *Loxosceles* mais importantes do ponto de vista médico (EICKSTEDT, 1994; SEZERINO *et al.*, 1998; MÁLAQUE *et al.*, 2002; PAULI *et al.*, 2009).

As espécies encontradas no Brasil, além das quatro já citadas são as seguintes: *L. adelaida*, *L. hirsuta*, *L. anomala*, *L. immodesta*, *L. puortoi* e *L. amazonica* (SILVEIRA, 2009).

1.2 LOXOSCELISMO

O loxoscelismo (termo utilizado para descrever as manifestações clínicas ocorridas em um acidente com o gênero *Loxosceles*) é a forma mais grave de araneísmo necrótico em vários países (ANDERSEN, 2011; GUIMARÃES, 2013). Acidentes têm sido relatados na Europa, Ásia, África, Oceania e América (VUITIKA *et al.*, 2016).

Na América do Sul, há notificações de envenenamentos em outros países além do Brasil, como Peru e Chile (MÁLAQUE *et al.*, 2002; GUIMARÃES *et al.*, 2013). Neste último país, Machiavello, já em 1937, atribuiu alguns casos à *L. laeta* (MACHIABELLO, 1937).

O envenenamento em humanos possui duas variantes: cutâneo e sistêmico. O envenenamento cutâneo é identificado pela formação de lesão dermonecrotica e espalhamento gravitacional, e corresponde a aproximadamente 83% dos casos. Tal quadro pode resultar em grande perda tecidual na região da picada e formação de úlcera crônica que pode levar alguns meses até sua completa regressão (CORRÊA *et al.*, 2016). Já o envenenamento sistêmico, também conhecido por cutâneo-visceral, apresenta quadro clínico que pode evoluir para exantema generalizado, coagulação intravascular disseminada, hemólise intravascular, insuficiência renal aguda e, em alguns raros casos, óbito (PALUDO *et al.*, 2006; CHAIM *et al.*, 2011; CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2011; MALAQUE *et al.*, 2011; ISBISTER e FAN, 2011; CHATZAKI *et al.*, 2012; BEDNASKI *et al.*, 2015, BUCH *et al.*, 2015).

Estudos motivados pela elevada infestação e pelo aumento no número de casos, têm sugerido que a distribuição do gênero se tornou heterogênea e disseminada por áreas urbanas (DA SILVA *et al.*, 2004; HOGAN *et al.*, 2004; TAMBOURGI *et al.*, 2010; RAMADA, 2012).

As picadas por aranhas-marrons são a maior causa de acidentes por animais peçonhentos no Estado do Paraná, conforme dados de 2015 do Sistema Nacional de Notificações de Agravos do Ministério da Saúde. (SISTEMA NACIONAL DE NOTIFICAÇÕES DE AGRAVOS – MINISTÉRIO DA SAÚDE – BRASIL, 2016). Em 2015 foram notificados 2.635 casos de envenenamento loxoscélico no Paraná. Tal número

corresponde a 55,50% dos acidentes causados por aranhas-marrons no País. Em vista disso, os acidentes são considerados um importante problema de saúde pública (GREMSKI *et al.*, 2014), principalmente nas Regiões Sul e Sudeste (TABELAS 1 E 2).

TABELA 1 – NOTIFICAÇÕES REGISTRADAS NO BRASIL NO ANO DE 2015 SEGUNDO TIPO DE ARANHA

<i>Tipo Aranha</i>	<i>2015</i>
<i>Phoneutria spp.</i>	3.338
<i>Loxosceles spp.</i>	4.747
<i>Latrodectus spp.</i>	80
Outra espécie	5.771
TOTAL	13.936

FONTE: Adaptado de Ministério da Saúde/SVS – Sistema de Informação de Agravos de Notificação – Sinan Net – Disponível em: tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinannet/cnv/animaisbr.def.

TABELA 2 – NOTIFICAÇÕES REGISTRADAS NOS ESTADOS DAS REGIÕES SUDESTE E SUL DO BRASIL NO ANO DE 2015 SEGUNDO TIPO DE ARANHA

<i>Tipo Aranha</i>	<i>Minas Gerais</i>	<i>Espírito Santo</i>	<i>Rio de Janeiro</i>	<i>São Paulo</i>	<i>Paraná</i>	<i>Santa Catarina</i>	<i>Rio Grande do Sul</i>	<i>Total</i>
<i>Phoneutria spp.</i>	464	36	25	53	1.120	696	404	3.198
<i>Loxosceles spp.</i>	190	16	14	197	2.635	1.118	385	4.555
<i>Latrodectus spp.</i>	14	1	4	7	6	20	5	57
Outra espécie	992	28	24	559	1.805	1.353	667	5.428

FONTE: Adaptado de Ministério da Saúde/SVS – Sistema de Informação de Agravos de Notificação – Sinan Net – Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinannet/cnv/animaisbr.def>.

Estudos têm demonstrado que os acidentes ocorrem predominantemente em adultos durante os meses mais quentes do ano e geralmente acontecem em ambiente intradomiciliar em situações rotineiras, onde a aranha é comprimida ao corpo, como ao vestir-se, ao dormir ou ao enxugar-se. Conseqüentemente, a região do tronco e porções proximais dos membros são as áreas do corpo mais comumente acometidas. Apenas 12,3% dos acidentados procuram atendimento médico nas primeiras 12 horas após a picada (RIBEIRO, 1993; SEZERINO, 1998; MALAQUE, 2002; MALAQUE, 2011).

1.3 O VENENO LOXOSCÉLICO

O veneno loxoscélico ainda é alvo de muitos estudos para a determinação exata de seus componentes, porém, sabe-se que é uma mistura complexa de proteínas de ação tóxica ou enzimática de baixo peso molecular, sais inorgânicos e pequenos peptídeos (FUTRELL, 1992; PATEL *et al.*, 1994; FEITOSA *et al.*, 1998; VEIGA *et al.*, 2000; DA SILVEIRA *et al.*, 2002; DA SILVA *et al.*, 2004; DE CASTRO *et al.*, 2004; BARBARO *et al.*, 2005; MACHADO *et al.*, 2005; KALAPOTHAKIS *et al.*, 2007; GREMSKI *et al.*, 2010, GREMSKI *et al.*, 2014), e é o principal responsável pela dermonecrose no local da picada.

Estudos de identificação e caracterização das toxinas presentes no veneno de *Loxosceles* revelaram a presença de toxinas dermonecróticas da família das fosfolipases-D (30-35 kDa), metaloproteases (20-35 kDa), hialuronidasas (41-43 kDa), serino-proteases (85-95 kDa), além de lipases, fosfatase alcalina e 5'-fosfohidrolase ribonucleotídica (FUTRELL, 1992; FEITOSA *et al.*, 1998; DA SILVA *et al.*, 2004; DA SILVEIRA *et al.*, 2007; BEDNASKI *et al.*, 2015, DANTAS *et al.*, 2016).

Dentre estes componentes, é sabido que algumas moléculas possuem papel fundamental, como é o caso da fosfolipase D, toxina melhor caracterizada do veneno (BUCH *et al.*, 2015), que interage com a membrana celular e hidrolisa lipídios, o que desencadeia reações culminando na lesão dermonecrótica e demais complicações sistêmicas (DE ANDRADE *et al.*, 2005; CHAIM *et al.*, 2006; DA SILVEIRA *et al.*, 2006; DA SILVEIRA *et al.*, 2007b; APPEL *et al.*, 2008); a hialuronidase, que é considerada como um dos fatores responsáveis pelo espalhamento gravitacional das lesões e edema (FERRER *et al.*, 2013), e as metaloproteases do tipo astacina, que degradam gelatina, fibronectina, fibrinogênio e entactina (FEITOSA *et al.*, 1998; VEIGA *et al.*, 2000, 2001a, b; DA SILVEIRA *et al.*, 2007b, MORGON *et al.*, 2016) e que podem estar envolvidas nos distúrbios hemorrágicos observados em alguns acidentes, agindo como fatores de espalhamento sistêmico e no espalhamento gravitacional da dermonecrose, agindo com a hialuronidase (FUTRELL, 1992; DA SILVEIRA *et al.*, 2002; DA SILVA *et al.*, 2004; DA SILVEIRA *et al.*, 2007b; TREVISAN-SILVA *et al.*, 2010). Toxinas inseticidas, que são peptídeos similares às notinas (moléculas que formam o nó inibidor

de cisteína, chamadas ICKs) são as toxinas mais abundantes no transcriptoma de *L. intermedia* (DE CASTRO *et al.*, 2004; GREMSKI *et al.*, 2010). Proteínas da família das TCTP também foram identificadas na glândula de veneno de *L. intermedia*. Esta proteína está relacionada com os efeitos histaminérgicos do veneno (GREMSKI *et al.*, 2010; CHAIM *et al.*, 2011; SADE *et al.*, 2012).

Embora estudos tenham demonstrado que os componentes do veneno ajam sinergicamente, os mecanismos que resultam nos efeitos nocivos característicos das toxinas, como por exemplo, das metaloproteases, ainda estão sob investigação (DA SILVA *et al.*, 2004; APPEL *et al.*, 2005; GREMSKI *et al.*, 2014; BUCH *et al.*, 2015).

Ainda que o mecanismo de ação do veneno no organismo humano não esteja completamente esclarecido, sabemos que está envolvido um processo multifatorial, o qual abrange ação direta das toxinas sobre os tecidos e resposta do organismo frente a essa ação. A ação inicial do veneno sobre as células, componentes da membrana celular, da membrana basal e matriz extracelular resulta na lesão dermonecrotica. A ativação de componentes endógenos, como o sistema complemento, migração de polimorfonucleares, agregação plaquetária, liberação de citocinas e quimiocinas e participação de enzimas hidrolíticas é resultado da interação entre o veneno e os tecidos do organismo. Os componentes ativados contribuem para o aumento da lesão. Já a insuficiência renal seria decorrente da ação nefrotóxica e hemolítica do veneno (BARBARO e CARDOSO, 2009).

1.4 TERAPÊUTICA

O tempo médio decorrido entre o acidente e a procura por assistência médica varia entre 12 a 48 horas, uma vez que a picada é pouco dolorosa e a lesão instala-se de maneira lenta e progressiva. Assim, o diagnóstico em casos de acidentes é, fundamentalmente, clínico-epidemiológico, já que poucos pacientes trazem o agente causador e procuram assistência médica quando o quadro já está instalado. A falta de treinamento dos profissionais da área da saúde no que diz respeito ao reconhecimento dos casos de acidentes com animais peçonhentos também contribui para um retardo no diagnóstico. Para que a hipótese de loxoscelismo seja inteiramente descartada,

recomenda-se que pacientes oligo ou assintomáticos permaneçam em internamento durante um período mínimo de 36 horas (BARBARO e CARDOSO, 2009).

Embora ainda não haja um consenso nos protocolos terapêuticos em casos de acidentes (RAMADA, 2012), podem-se citar algumas classes medicamentosas mais comumente utilizadas, como a dapsona, medicamento empregado na terapia contra a hanseníase, por se acreditar que limite a migração e infiltração de neutrófilos no local da picada (SWANSON e VETTER, 2005; PAULI, 2009), anti-inflamatórios corticosteroides (DA SILVA *et al.*, 2004; HOGAN *et al.*, 2004;), antibióticos, que atuam impedindo infecções secundárias e/ou quelando e inibindo moléculas de veneno (MONTEIRO *et al.*, 2002; PAIXÃO-CAVALCANTE *et al.*, 2007) e o soro antiveneno, único tratamento específico disponível capaz de neutralizar a ação do veneno (HOGAN *et al.*, 2004; PAULI *et al.*, 2006).

1.5 O SORO

A utilização da soroterapia como método de tratamento de pacientes nos casos de acidentes com animais peçonhentos data das últimas décadas do século XIX, e a produção de soros ainda é baseada nos preceitos e metodologias descritos por Vital Brazil (BRAZIL, 1903; BRAZIL, 1905).

O tratamento específico e efetivo contra toxinas provenientes de venenos animais consiste na administração parenteral, por equipe médica treinada, de antissoros derivados de plasma sanguíneo de animais (LAUSTSEN *et. al*, 2016).

Os soros antiveneno utilizados no Brasil são produzidos por quatro laboratórios oficiais: Instituto Butantan, de São Paulo, Fundação Ezequiel Dias, de Minas Gerais, Instituto Vital Brazil, do Rio de Janeiro, e Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos - CPPI, do Paraná. Porém, o soro antiloxoscélico trivalente (contendo anticorpos específicos frente às três espécies de maior importância médica no Brasil – *L. gaucho*, *L. intermedia* e *L. laeta*) (FIGUEIREDO *et al.*, 2014) disponível no Sistema Único de Saúde – SUS é produzido apenas pelo CPPI, uma unidade da Secretaria de Estado da Saúde do Paraná (FIGURA 2).

FIGURA 2 – SORO ANTILOXOSCÉLICO PRODUZIDO PELO CPPI



FONTE: SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE – SESA-PR

O CPPI está estrategicamente localizado em Piraquara, Paraná, Região Metropolitana de Curitiba, levando em consideração que a maioria dos casos de acidentes loxoscélicos acontece nas regiões Sudeste e Sul do Brasil, especialmente na cidade de Curitiba, (PARANÁ, 2015).

O soro antiloxoscélico, ou SaLox, distribuído nacionalmente é uma solução injetável de fração F(ab')₂ de imunoglobulinas específicas purificadas, a ser administrada por via intravenosa, conferindo imunidade passiva, e é produzido a partir do processamento industrial-farmacêutico do plasma sanguíneo de equinos devidamente imunizados com os antígenos (venenos) das aranhas-marrons *L. gaucho*, *L. intermedia* e *L. laeta*. Cada mililitro do soro contém imunoglobulinas suficientes para neutralizar 15 Doses Mínimas Necrosantes (DMN) de veneno de *L. intermedia* (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2010). O termo “Dose Mínima Necrosante” refere-se à menor massa de veneno capaz de formar uma lesão de 1 cm² na porção interna da orelha de coelhos. Pauli (2009) realizou um trabalho

demonstrando a eficácia da utilização do Soro Antiloxoscélico Trivalente produzido pelo CPPI na neutralização e diminuição da ação do veneno loxoscélico sobre coelhos, fazendo com que houvesse diminuição da área necrótica e menor tempo para recuperação e cicatrização das regiões afetadas. Além disso, neste estudo, a lesão dermonecrotica mostrou-se 90% menor se comparada com a dos animais controle, quando o antiveneno foi aplicado até 6 horas pós-envenenamento e 30% menor quando administrado até 48 horas após a inoculação de veneno loxoscélico (MALAQUE *et al.*, 2015).

De acordo com dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação – SINAN, do Ministério da Saúde, no ano de 2014 foram notificados 7.448 casos de acidentes loxoscélicos no Brasil, sendo que destes, 4.321 ocorreram no Estado do Paraná.

Face estes dados epidemiológicos, para o ano de 2015 a demanda de produção e entrega do soro ao Programa Nacional de Imunizações – PNI do Ministério da Saúde foi de 30.500 frascos-ampola (STINGHEN, 2015). Tal número é a representação da importância e necessidade deste imunobiológico no contexto da Saúde Pública brasileira, especialmente para os Estados da Região Sul, para onde 88% da produção do antiveneno foram destinados nos anos de 2012 e 2013, segundo dados do CPPI (PAES, 2015).

Partindo-se da premissa de que os venenos podem variar entre espécies de um mesmo gênero ou, até mesmo, apresentar variações ainda que mínimas entre indivíduos de uma mesma espécie, de acordo com a distribuição geográfica do animal (SAMPAIO *et al.*, 2016), ou relacionado à outros fatores, como idade, sexo ou época do ano em que foi capturado, torna-se essencial que a escolha dos venenos a serem utilizados nas imunizações visando a produção do soro, seja feita de forma criteriosa, devendo incluir antígenos de animais de diferentes idades, ambos os sexos e coletados em diferentes áreas, se possível nas regiões onde o soro será utilizado (CARDOSO, 2009). As variáveis relacionadas ao veneno das aranhas associadas ao grau de susceptibilidade dos indivíduos acidentados (idade, estado de saúde geral, alergias etc) também podem ser determinantes no grau de gravidade do acidente loxoscélico (DE OLIVEIRA-LIMA *et al.*, 2016).

Estudos de caracterização dos venenos de outros animais peçonhentos causadores de acidentes no Brasil e no mundo vêm sendo realizados nas últimas décadas, bem como a relação entre seus principais componentes tóxicos e a produção de soros antiveneno específicos (CHATZAKI *et al.*, 2012; ISBISTER *et al.*, 2010; QUEIROZ *et al.*, 2008; LIRA *et al.*, 2007; ZAMUNÉR *et al.*, 2004; CAMEY *et al.*, 2002; MUNIZ *et al.*, 2000 SEIFERT *et al.*, 1997; FERREIRA *et al.*, 1992). Porém, nota-se uma carência de informações a respeito da estabilidade destes antígenos após terem sido produzidos.

Sendo assim, para que os soros utilizados no tratamento de pessoas acidentadas sejam produzidos com excelência, garantindo sua eficácia e segurança ao paciente, é essencial e obrigatório que sejam cumpridas exigências legais estabelecidas pelos órgãos reguladores e que a matéria-prima, no caso, os venenos ou imunógenos, sejam caracterizados, quanto à sua composição, propriedades e estabilidade durante seu período de estocagem, visando um padrão de qualidade para o fim que se propõem: o estímulo a uma resposta imune adequada nos equinos, com a produção de anticorpos em quantidade e qualidade necessários para compor o produto final - o soro antiloxoscélico.

2 JUSTIFICATIVA

Embora os perfis dos venenos de aranhas do gênero *Loxosceles* venham sendo descritos ao longo dos anos, não existem registros de estudos de caracterização, comparação e de estabilidade durante o período de armazenamento entre os venenos extraídos, utilizados e mantidos pela indústria farmacêutica para produção de soros antiveneno empregados na soroterapia humana. Além disso, a amostragem de animais para extração de venenos nos artigos apresentados é significativamente inferior àquela utilizada na produção do soro comercial aplicado em ambiente hospitalar, que gira em torno de 10.000 a 12.000 indivíduos por espécie por lote de solução. Tais números, somados ao fato de que os animais são coletados em diferentes regiões dos Estados do Paraná e Santa Catarina, diluem variações individuais por sexo, idade, tamanho e proveniência, fazendo com que uma análise com o objetivo de caracterização, comparação e futuro referenciamento dos venenos tenha uma maior credibilidade estatística.

Além disso, observa-se na literatura, que os diferentes trabalhos já realizados por outros pesquisadores abordam, em geral, aspectos pontuais ou muito específicos de uma determinada característica do veneno, como por exemplo, a ação fosfolipásica ou hialuronidásica. São poucos aqueles que analisam o veneno de uma forma mais abrangente, levando em consideração e analisando as atividades das diversas classes de moléculas presentes na sua composição.

Um ponto relevante na análise das soluções de venenos preparados pelo CPPI diz respeito ao seu método de preparo (detalhado na Seção 4 Material e Métodos), que compreende a dessecação à vácuo do veneno *in natura* extraído das aranhas, seguido de solubilização em solução salina 0,85% na concentração desejada e posterior filtração.

Os lotes de soluções de venenos produzidos são armazenados em freezer a $-25\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$ e são utilizados em imunizações de equinos, bem como em ensaios de controles de qualidade, durante um período aproximado de nove a doze meses, até que novos lotes de soluções sejam preparados.

A elaboração de um perfil detalhado dos venenos assim como a sua estabilidade também seria de grande utilidade para as etapas de Controle de Qualidade (Biológico e Físico-Químico) do processo produtivo, servindo como parâmetros na realização de ensaios que atestem a qualidade destes imunógenos. Atualmente, os controles de qualidade das soluções de veneno loxoscélico produzidos no CPPI restringem-se à dosagem de proteínas totais e à potência (capacidade de causar dermonecrose em coelhos), o que pode ser considerado insuficiente para determinar se um lote de solução de veneno contém todos os componentes capazes de estimular de maneira adequada o sistema imune dos equinos a produzir anticorpos em quantidade e qualidade suficientes, a fim de compor o soro antiveneno distribuído ao SUS. Assim, detecta-se uma escassez de informações a respeito dos antígenos utilizados no processo de produção do Soro Antiloxoscélico. Desta forma, torna-se necessário que ensaios padronizados e aplicáveis à rotina de produção dos venenos, como os apresentados nesta dissertação, sejam utilizados pelo laboratório produtor, visando obter um controle de qualidade mais abrangente, trazendo mais informações sobre os imunógenos utilizados.

Além disso, os perfis dos venenos também poderão ser utilizados como referências para produção de soros em que se utilizem o veneno de qualquer uma das três espécies estudadas ou em pesquisas afins.

Por fim, a análise da estabilidade das soluções de veneno, representa uma otimização do processo produtivo, no sentido de planejamento das produções de venenos e soro, e atesta que dentro daquele período os antígenos estão em quantidade e qualidade suficientes para provocar uma reação imunogênica no organismo do equino inoculado com a produção de anticorpos específicos, tornando-se, conseqüentemente, uma matéria-prima adequada e eficaz para a produção de soros hiperimunes.

3 OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar os venenos obtidos das aranhas-marrons (gênero *Loxosceles*) no Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos – CPPI do Paraná quanto as suas composições bioquímicas, perfil imunoquímico e estabilidade para fins de produção do Soro Antiloxoscélico distribuído às Unidades do Sistema Único de Saúde – SUS.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estabelecer perfil proteico, enzimático e imunoquímico dos venenos das aranhas das espécies *Loxosceles intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta* mantidas e utilizadas pelo Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos – CPPI para a produção do Soro Antiloxoscélico distribuído à Rede Pública de Saúde, bem como possíveis alterações referentes à estabilidade e armazenamento;
- Comparar os perfis dos venenos das espécies citadas;
- Sugerir que os perfis dos venenos estudados, bem como os ensaios padronizados, sejam utilizados nos testes dos Controles de Qualidade Biológico e Físico-Químico do CPPI.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os ensaios foram realizados a cada três meses em um período total de nove meses para venenos produzidos em 2015 e no momento da produção para os extraídos e preparados em 2016.

Os lotes de venenos utilizados para a realização dos ensaios executados foram cedidos pelo CPPI e são os seguintes:

- Para *L. gaucho*: SVLg 111/15 (analisado até nove meses pós-produção) e SVLg 114/16 (analisado no Tempo 0, ou seja, em seguida à produção);

- Para *L. intermedia*: SVLi 110/15 (analisado até nove meses pós-produção) e SVLi 113/16 (analisado no Tempo 0);

- Para *L. laeta*: SVLI 112/15 (analisado até nove meses pós-produção) e SVLI 115/16 (analisado no Tempo 0).

Os números após o símbolo “/” indicam o ano de produção dos lotes.

As aranhas cujos venenos foram analisados, bem como os equinos e coelhos que forneceram soro polivalente para a realização dos experimentos são mantidos pelo CPPI e são utilizados dentro do processo produtivo do Soro Antiloxoscélico, imunobiológico registrado no Ministério da Saúde sob o nº 1.1731.0001.001-3.

4.1 COLETA, TRIAGEM E MANUTENÇÃO DE ARANHAS DO GÊNERO *Loxosceles* (conforme Procedimento Operacional Padrão do CPPI 9.01.01, 2013)

Os animais utilizados neste trabalho são coletados e mantidos pelo CPPI, na Seção de Produção de Venenos – Aracnidário (SPV-A), conforme orientações contidas em Procedimento Operacional específico.

A coleta de exemplares para a extração de veneno loxoscélico é realizada por pessoal treinado, em diferentes regiões dos Estados do Paraná e Santa Catarina.

As aranhas coletadas são acondicionadas em recipientes adequados (FIGURA 3) e ao chegarem à SPV-A, passam por quarentena e por triagem, sendo identificadas

conforme características morfológicas de cada espécie, e mantidas em sala climatizada ($23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$).

FIGURA 3 – ARANHAS DO GÊNERO *Loxosceles* ACONDICIONADAS EM RECIPIENTES INDIVIDUAIS AGUARDANDO EXTRAÇÃO DE VENENO



FONTE: SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE – SESA-PR

A hidratação é proporcionada a partir de algodões umedecidos colocados nos potes das aranhas e a alimentação é feita periodicamente com larvas de tenébrios (*Tenebrio molitor*) e baratas também criados e mantidos pelo CPPI.

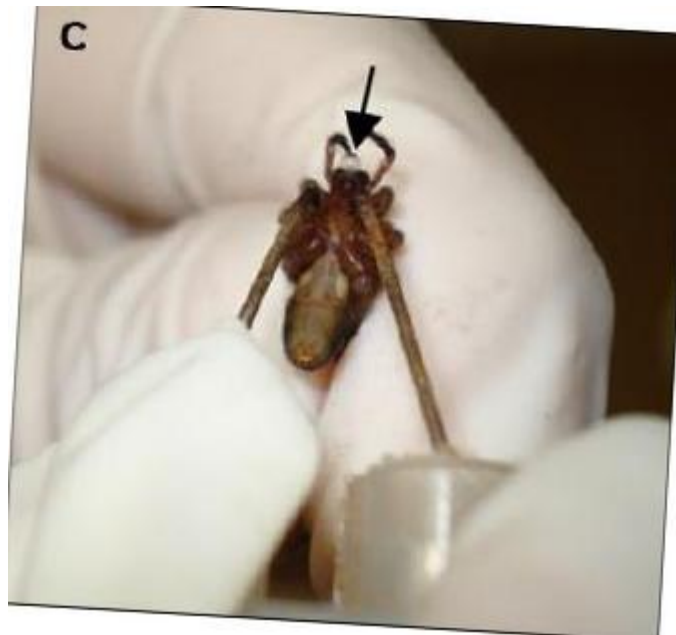
4.2 EXTRAÇÃO DE VENENO DE ARANHAS DO GÊNERO *Loxosceles* (conforme Procedimento Operacional Padrão do CPPI 9.01.02, 2012)

A extração de veneno das aranhas também ocorre no CPPI e é realizada conforme Procedimento Operacional específico.

Devidamente paramentado, o manipulador apreende o espécime com o auxílio de uma pinça anatômica e o contém entre o dedo indicador e polegar, de modo que os membros do animal fiquem presos entre os dedos do operador, e a região ventral do seu corpo fique voltada para cima.

Na região exposta, entre o primeiro e o segundo pares de patas, aplica-se um eletrochoque, até que se verifique a afloração de uma ou duas gotículas de veneno nas quelíceras (FIGURA 4). Este é coletado com uma micropipeta, por capilaridade, e é depositado em um frasco ampola previamente pesado, acondicionado em gelo.

FIGURA 4 – EXTRAÇÃO DE VENENO DE ARANHA DO GÊNERO *Loxosceles*



Seta indica gotícula de veneno sendo expelida
FONTE: adaptado de CHAIM *et al.* (2011)

Após a coleta, o recipiente contendo o veneno extraído é colocado em um dessecador a vácuo. Seguindo a dessecação, o frasco contendo o antígeno é pesado e a diferença entre este valor e aquele do frasco vazio corresponde à quantidade de veneno obtida. Os frascos são então devidamente identificados e lacrados. A fim de proteger da luz, são envoltos em papel alumínio também identificado.

Após a pesagem, os frascos-ampolas com venenos loxoscélicos são armazenados em freezer ($-25 \pm 5^{\circ}\text{C}$), até que se inicie o preparo das soluções antigênicas.

É importante ressaltar que os venenos de cada espécie são individualizados em seu próprio frasco, separados por lote.

Finalizada a extração, as aranhas retornam aos frascos de armazenamento na sala de manutenção do plantel.

Uma nova coleta de veneno pode ser realizada após 30 dias.

4.3 PREPARO DAS SOLUÇÕES DE VENENO LOXOSCÉLICO (conforme Procedimento Operacional Padrão do CPPI 9.01.03, 2012)

As soluções de veneno a serem estudadas foram preparadas no CPPI, de acordo com Procedimento Operacional específico, e são as mesmas utilizadas nas imunizações dos equinos visando à produção de soro hiperimune.

Seu preparo consiste na dissolução do veneno dessecado/cristalizado em solução salina estéril 0,85% na proporção/concentração desejada. Após a dissolução, a solução é filtrada em filtro $0,8\mu$, alíquotada, lacrada e identificada, seguindo para a quarentena, enquanto os laudos de Controle de Qualidade Biológico, que determinará a potência do veneno, e do Controle de Qualidade Físico-químico, que quantificará seu teor de proteínas totais, são elaborados após a realização de testes apropriados. Caso os resultados das análises se encontrem dentro dos limites de aceitação para cada teste, o lote é liberado para utilização na imunização de equinos.

Para a composição dos lotes de solução de veneno, o número mínimo de aranhas por espécie, cujo veneno deve ser extraído, é de 500, porém, o CPPI trabalha, em média, com 1.500 a 3.000 aranhas por espécie por lote. Isto assegura que as características gerais de composição dos venenos serão mantidas.

4.4 DOSAGEM DE PROTEÍNAS

A dosagem de proteínas foi realizada pelo método de Azul de Coomassie, adaptado para leitura em leitor de placas de 96 poços (Meridian ELX 800). O método baseia-se na diferença de coloração em que o Azul de Coomassie pode se encontrar, de acordo com a concentração proteica da solução. Ao ligar-se a proteínas, o reativo passa da coloração vermelha para azul. A curva padrão foi construída com diferentes quantidades (0,25µg – 2,00µg) de Soro de Albumina Bovina (BSA) e as amostras foram diluídas para entrarem na região de linearidade da curva. O volume total de cada ponto da curva e das amostras foi de 20µL. O reativo para dosagem de proteínas Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad) foi diluído adicionando uma parte do reativo em quatro partes de água. Foram adicionados 200µL do reativo diluído em cada ponto da curva e nas amostras, e em seguida foi determinada a absorbância em 595nm. Os pontos da curva foram lidos em duplicatas e as amostras em triplicatas, sendo que o coeficiente de determinação aceitável da curva de BSA foi $R^2 > 0,99$. Protocolo adaptado de Bradford (1976)

4.5 ELETROFORESE DE PROTEÍNAS (SDS-PAGE)

A análise do perfil protéico foi realizado por eletroforese em gel gradiente desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE gradiente 10% a 20%) em condições redutoras. O perfil protéico resultante foi visualizado pela coloração azul brilhante de Coomassie e impregnação de prata (WRAY *et al.*, 1981; BEDNASKI, 2013).

Para a execução da técnica foram utilizadas mistura de solução de acrilamida (acrilamida 5 M e bis-acrilamida 52 mM), tampão “lower” (Tris 1,5 M; SDS 0,4% (p/v); pH 8,8), água destilada, os catalisadores APS e TEMED e 5% de β-mercaptoetanol, a fim de propiciar condições redutoras (LAEMMLI, 1970). Para proporcionar uma corrida mais homogênea, foi adicionado aos géis um gel de empacotamento na parte superior, contendo 4% de poliacrilamida e os catalisadores (BEDNASKI, 2013).

As eletroforeses foram realizadas com os venenos de cada uma das três espécies de aranhas do gênero *Loxosceles* estudadas.

A fim de complementar a caracterização dos perfis eletroforéticos, a intensidade das bandas de 34 kDa de *L. gaucho* e *L. intermedia* e 32 kDa de *L. laeta* (concentração de 25 µg) foram mensuradas com o auxílio do programa Quantity One 1-D Analysis Software da Bio-Rad.

4.6 ANTICORPOS POLICLONAIS ANTI-*L. gaucho*, ANTI-*L. intermedia*, ANTI-*L. laeta* E SOROS ANTILOXOSCÉLICO E ANTIARACNÍDICO.

Os soros policlonais para a realização dos ensaios de Western Blotting obtidos a partir do sangue de coelhos foram produzidos pelo Laboratório de Matriz extracelular e Biotecnologia de Venenos – LME, do Departamento de Biologia Celular da UFPR.

O Soro Antiaracnídico – que contém anticorpos específicos frente aos venenos de *L. gaucho*, *Phoneutria nigriventer* (aranha-armadeira) e *Tityus serrulatus* (escorpião amarelo) - utilizado nos testes foi produzido pelo Instituto Butantan (Lote 1306121). Já o Soro Antiloxoscélico – contendo anticorpos específicos frente aos veneno de *L. gaucho*, *L. intermedia* e *L. laeta* - foi fabricado e cedido pelo CPPI (Lote S01/14).

4.6.1 Imunizações de coelhos

As imunizações foram realizadas em seis coelhos adultos conforme protocolo de HARLOW e LANE (1988) a fim de obtenção de soros policlonais anti-*L. gaucho*; anti-*L. intermedia* e anti-*L. laeta*.

As inoculações em coelhos foram realizadas com 100 µg de cada veneno (dois coelhos por espécie). Os antígenos foram suspensos em solução salina fisiológica, conforme preparação dos venenos realizada pelo CPPI, já citado anteriormente, e divididos em três alíquotas de 33,33µL (concentração da solução de 1µg/µL) aplicados em 3 pontos diferentes: dois intramusculares e um intradérmico.

A primeira dose do antígeno foi aplicada com Adjuvante Completo de Freund e os reforços, aplicados em média a cada 21 dias, foram feitos com Adjuvante Incompleto de Freund (até a terceira aplicação) e Hidróxido de Alumínio a 4% na

quarta aplicação. Um soro pré-imune foi obtido antes da primeira imunização através da colheita de aproximadamente 10 mL de sangue via veia auricular, sendo o procedimento realizado após a anestesia dos coelhos com cloridrato de ketamina (80mg/Kg) e xilazina (9mg/Kg). O sangue foi dispensado em tubo de vidro, mantido a 37°C por 2h para retração do coágulo e posterior separação do soro por centrifugação (10 min. a 3000rpm).

Após as imunizações, o soro hiperimune foi obtido seguindo os mesmos procedimentos da colheita realizada para o soro pré-imune.

4.6.2 Soros antiveneno (Produto final)

Os soros processados, distribuídos e utilizados no Sistema Único de Saúde – SUS no tratamento de acidentados em casos de envenenamentos (Soro Antiaracnídico contendo anticorpos frente aos venenos de *L. gaucho*, *Tityus serrulatus* e *Phoneutria nigriventer*, e Soro Antiloxoscélico, que contém anticorpos frente aos venenos de *L. gaucho*, *L. intermedia* e *L. laeta*) foram gentilmente cedidos pela Secretaria de Estado da Saúde – SESA-PR e CPPI para utilização neste trabalho.

4.7 WESTERN BLOTTING

Ensaio de Western Blotting foram realizados com cada veneno a fim de mostrar diferenças imunogênicas entre as espécies estudadas.

Após a corrida eletroforética em gel gradiente de poliacrilamida (10-20%) citada anteriormente, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose por 30 minutos a 25 Volts. Em seguida, as membranas foram bloqueadas com caseína 3% diluída em PBS (p/v). Os anticorpos primários anti-*L. gaucho* (1:8000), anti-*L. laeta* (1:8000), anti-*L. intermedia* (1:8000) e Soros Antiaracnídico (1:500) e Antiloxoscélico (1:500) foram diluídos na mesma solução de bloqueio e foram incubados por 2 horas em temperatura ambiente, sob constante agitação. Após a incubação com os anticorpos primários, as membranas foram lavadas com o tampão na ausência de

anticorpos e incubadas com anticorpos secundários IgG anti-IgG de coelhos conjugados com fosfatase alcalina (Sigma) ou IgG anti-IgG de cavalos conjugados com peroxidase (Sigma) por uma hora em temperatura ambiente. Após lavagens, as membranas que receberam anticorpos provenientes de coelhos foram reveladas com o substrato BCIP e o cromógeno NBT (Promega) em tampão ótimo para atividade de fosfatase alcalina (Tris-HCl 100 mM pH 9,5; NaCl 100 mM e MgCl 5 mM) (MEISSNER, 2012); já as membranas que foram incubadas com anticorpo proveniente de cavalos (Soros Antiaracnídico e Antiloxoscélico) foram reveladas com o substrato para quimioluminescência SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (Thermo-Scientific) e as bandas de interesse visualizadas com o auxílio do equipamento Amershan Imager 600 (GE Healthcare) (TOWBIN et al. 1979; HARLOW e LANE, 1988).

4.8 ZIMOGRAMA

Os Zimogramas foram realizados utilizando SDS-PAGE 12,5%, contendo 3mg de gelatina/mL de gel. As amostras em estudo (20 µg de veneno de *L. intermedia*, *L. laeta* e *L. gaucho*) foram diluídas em tampão de amostra não redutor e submetidas à eletroforese a 4°C. Os géis foram lavados duas vezes de vinte minutos cada, em 2,5% de Triton X-100 e incubados à 37°C por 16h em tampão ótimo para atividade enzimática (Tris 50mM pH=7,4; NaCl 200mM; CaCl₂ 0,5mM; MgCl₂ 0,5mM; ZnCl₂ 0,5mM).

Após o tempo de incubação, os géis foram corados pelo corante Azul Brilhante de Coomassie e descorados com trocas sucessivas de metanol 50% (v/v). As bandas claras lisadas do substrato contra um fundo de coloração azul indicam a presença da degradação enzimática (proteases) (TREVISAN-SILVA, 2009).

4.9 ENSAIO DE ATIVIDADE FOSFOLIPÁSICA

A atividade fosfolipásica foi mensurada utilizando o kit Amplex Red (Molecular Probes, Eugene, EUA). Neste ensaio, a atividade fosfolipásica é monitorada usando 10-acetil-3,7-dihidroxi-fenoxazine (reagente Amplex Red), um reagente fluorogênico sensível para H₂O₂. Primeiramente, a fosfolipase-D hidrolisa a esfingomielina à

ceramida-1-fosfato e colina. A colina, por sua vez, é oxidada pela enzima colina oxidase à betaina e H_2O_2 . Finalmente, a H_2O_2 , na presença da peroxidase reage com o Amplex Red estequiometricamente (1:1), gerando um produto altamente fluorescente, o Resorufin (APPEL *et al.*, 2008; CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2011).

Para mensurar a atividade fosfolipásica dos venenos de cada espécie, estes foram incubados com o Reagente Amplex Red, na concentração de $10\mu g$ em triplicata, à $37^\circ C$ por 60 minutos. Como controle negativo foi utilizado apenas o Reagente Amplex Red sem qualquer veneno, também em triplicata à $37^\circ C$ por 60 minutos.

A fluorescência foi mensurada em um fluorímetro (Tecan Infinite M200, Männedorf, Switzerland) utilizando comprimento de onda de excitação em 540nm e emissão em 570 nm.

A razão entre os valores de unidades arbitrárias de fluorescência de cada veneno pelos valores dos controles negativos foi verificada em cada tempo analisado, a fim de determinar alterações da atividade fosfolipásica ao longo do período de armazenamento.

A análise estatística foi realizada pelo programa Graphpad Prism 6, utilizando-se o método One-way ANOVA.

4.10 ENSAIO DE TURBIDIMETRIA

A atividade hialuronidásica também foi testada, e para isto, lançou-se mão do ensaio de turbidimetria. O ensaio descrito por Poh e colaboradores (1992) e adaptado por FERRER *et al.* (2013) foi realizado. $50\mu g$ de ácido hialurônico (HA) foram incubados na proporção 1:1 com as soluções de venenos estudadas a $37^\circ C$ por 16 horas. Como controle negativo foi utilizado o ácido hialurônico em NaCl 0,9% sob as mesmas condições. Após o tempo de incubação o HA não degradado (volume final de reação de 0,5 mL) foi precipitado com 1 mL de cetavlon 2,5% (brometo de N-cetil-N,N,N-trimetil amônio) em NaOH 2%. A absorbância de cada reação foi obtida em espectrofotômetro com o comprimento de onda de 400 nm. A absorbância do NaCl 0,9% com o cetavlon (branco) foi descontada dos valores obtidos. O ensaio foi

realizado em triplicatas e a análise estatística foi conduzida pelo programa Graphpad Prism 6 utilizando-se o método One-way ANOVA.

4.11 ENSAIO QUANTITATIVO DE ATIVIDADE GELATINOLÍTICA

A atividade gelatinolítica foi mensurada através da utilização do Kit de Ensaio EnzCheck® Gelatinase/Colagenase (Invitrogen). Os venenos de *L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta* (2 µg) foram incubados com 5 µg de gelatina de pele suína conjugada com fluoresceína em um volume total de reação de 100 µL (tampão de reação: 0,005 M de Tris-HCl pH 7,6, 0,15 M de NaCl, 5 mM de CaCl₂ e 0,2 mM de azida de sódio). A inibição da atividade metaloproteásica foi avaliada a partir de uma pré-incubação das amostras de veneno (2 µg) com 10 mM de 1,10-fenantrolina e 10 mM de EDTA por 30 minutos a temperatura ambiente. Controles negativos (ausência de amostras de venenos) com e sem 1,10-fenantrolina e EDTA são utilizados para corrigir a fluorescência em cada tempo medido. Todas as amostras foram examinadas em triplicata e foram incubadas em atmosfera úmida, a 37°C, protegidas da luz. A fluorescência foi medida no tempo 0, e após 15 min., 30 min., 1, 2, 4, 6 e 24 horas de incubação no fluorímetro Tecan Infinite® M200 (Tecan, Mannedorf, Suíça) utilizando ondas de excitação de 480 nm e detecção de emissão a 530 nm (TREVISAN-SILVA *et al.*, 2013).

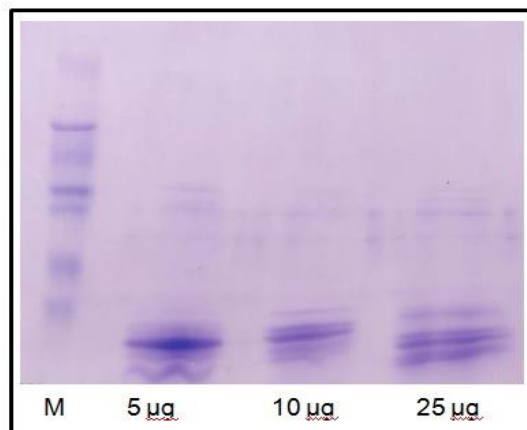
5 RESULTADOS

Os resultados obtidos representam a avaliação das características dos imunógenos durante nove meses de armazenamento a contar da data de produção dos lotes SVLg 111/15 (solução de veneno de *L. gaucho*), SVLi 110/15 (solução de veneno de *L. intermedia*) e SVLI 112/15 (solução de veneno de *L. laeta*) com ensaios realizados a cada três meses, e lotes SVLg 114/16 (solução de veneno de *L. gaucho*), SVLi 113/16 (solução de veneno de *L. intermedia*) e SVLI 115/16 (solução de veneno de *L. laeta*) com análises subsequentes à produção. Todas as soluções de venenos foram produzidas no CPPI, conforme procedimento contido na Seção 4 Material e Métodos desta dissertação.

5.1 PERFIS PROTEICOS DOS VENENOS

A fim de se obter um modelo ótimo para visualização dos perfis eletroforéticos, vários padrões de corrida de géis foram testados. Inicialmente, optou-se por um gel gradiente de 3%-20%, porém as bandas mostraram-se muito comprimidas no final do gel, não permitindo uma caracterização clara dos venenos estudados com boa separação de bandas, conforme se pode perceber na figura 5.

FIGURA 5 – PERFIL ELETROFORÉTICO DE SOLUÇÃO DE VENENO DE *L. gaucho* EM GEL GRADIENTE 3%-20% CORADO COM AZUL DE COOMASSIE.

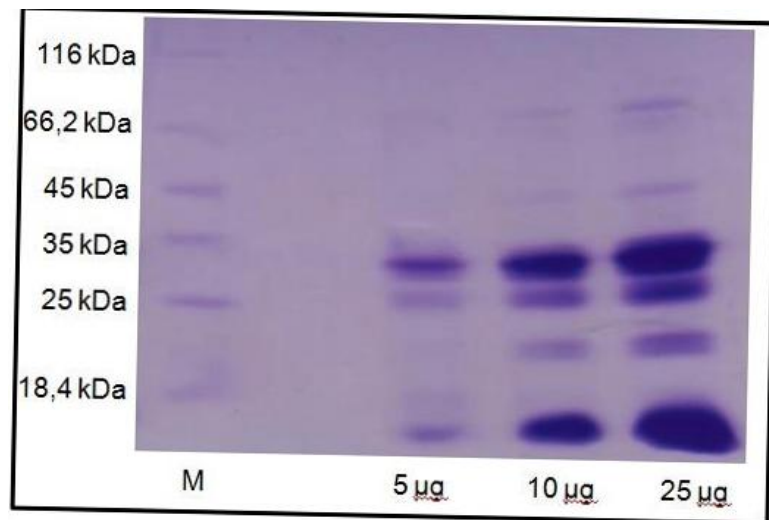


(M) corresponde ao marcador; 5 µg, 10 µg e 25 µg correspondem às massas de veneno utilizadas na corrida do gel.

FONTE: O AUTOR (2015)

Em vista disso, optou-se pela realização de gel gradiente 5%-20%, o qual também não obteve resultados satisfatórios, embora seu perfil tenha melhorado se comparado com o gel 3%-20% (FIGURA 6). Contudo, as bandas ainda não se mostraram bem espaçadas.

FIGURA 6 – PERFIL ELETROFORÉTICO DE SOLUÇÃO DE VENENO DE *L. gaucho* EM GEL GRADIENTE 5%-20% CORADO COM AZUL DE COOMASSIE.



(M) corresponde ao marcador. 5 µg, 10 µg e 25 µg correspondem às massas de veneno utilizadas na corrida do gel.

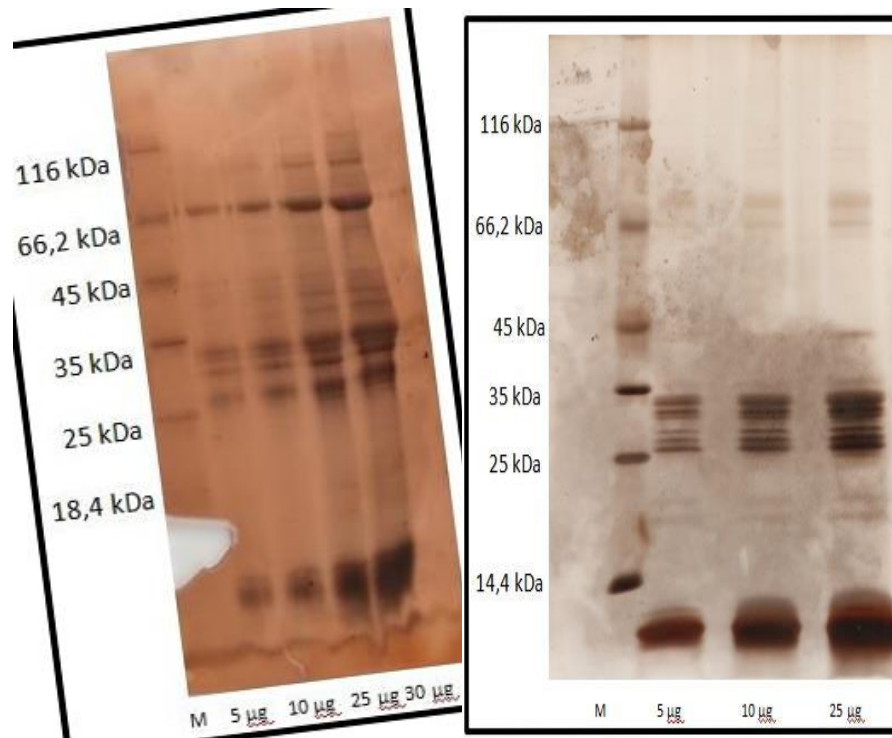
FONTE: O AUTOR (2015)

O padrão definitivo, com boa resolução e boa distribuição entre as bandas no gel, se deu com a utilização de gradiente a 10%-20%. Desta maneira, é possível observar de maneira mais clara, pelo menos quatro bandas distintas na faixa entre 30 kDa e 35 kDa em todas as espécies estudadas. Cabe ressaltar que o método de coloração por Azul de Coomassie foi escolhido, pois se consegue obter um bom contraste entre o *background* dos géis e as bandas, evidenciando as principais regiões dos perfis eletroforéticos das aranhas do gênero *Loxosceles*.

A coloração pelo método de prata monocromática também exigiu padronização. Ainda assim, devido a impregnação desigual de prata, percebe-se a presença de muitas manchas que dificultam a visualização e que podem ser confundidas com eventuais bandas protéicas. Desta maneira, o método não se mostrou satisfatório como única

ferramenta de estudo e os géis foram corados por esta metodologia até as análises de seis meses pós-produção dos venenos

FIGURA 7 – PERFIL ELETROFORÉTICO DE SOLUÇÃO DE VENENO DE *L. laeta* (ESQUERDA) E *L. intermedia* (DIREITA) EM GEL GRADIENTE 10%-20% CORADO PELO MÉTODO DE PRATA MONOCROMÁTICA.



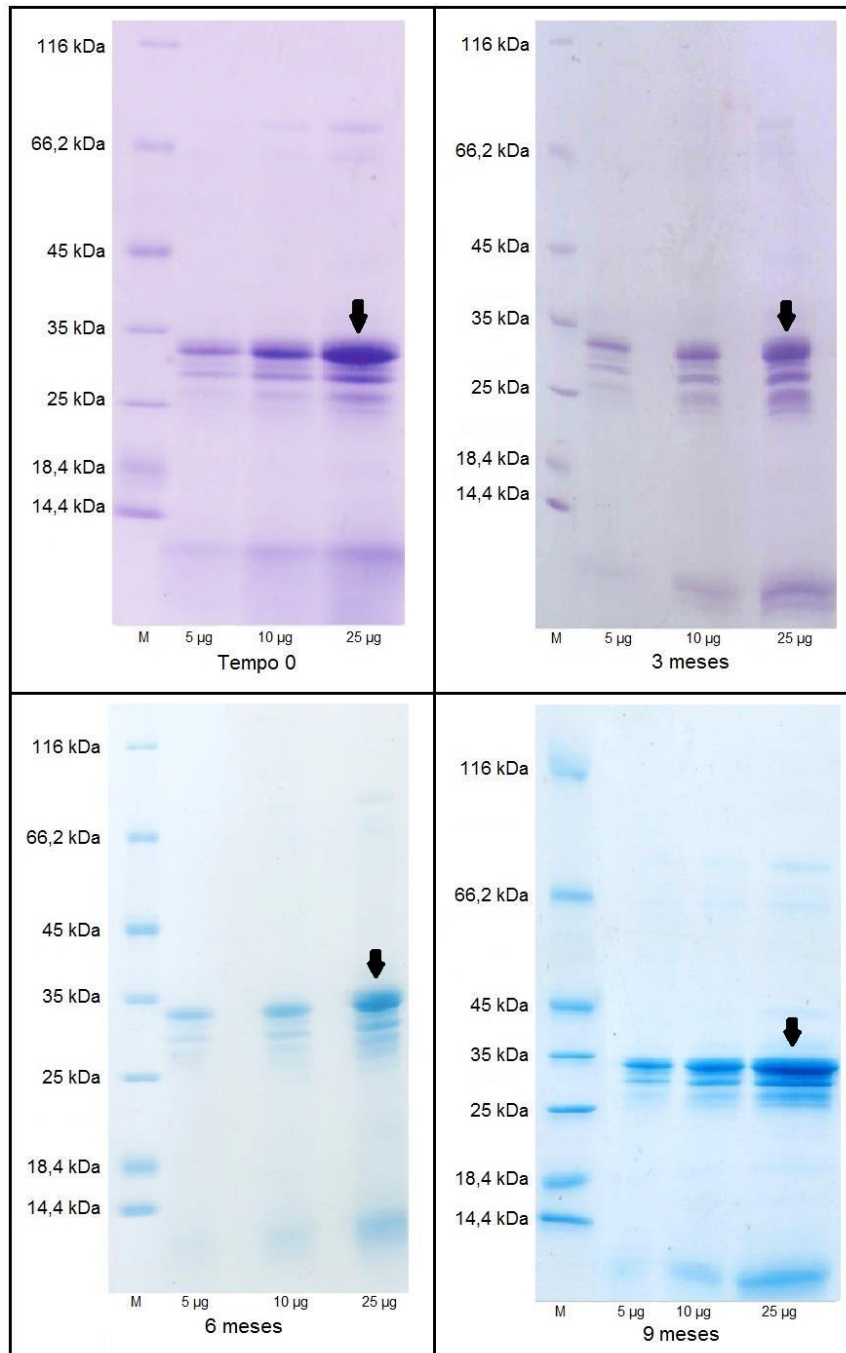
(M) corresponde ao marcador. 5 µg, 10 µg, 25 µg e 30 µg correspondem às massas de veneno utilizadas na corrida do gel. Observam-se manchas por toda a extensão do gel, que podem prejudicar a visualização de bandas.

FONTE: O AUTOR (2015)

Os perfis eletroforéticos do veneno de *L. gaucho* (SVLg 111/15) produzido pelo CPPI e corados com Azul de Coomassie referentes ao tempo 0, ou seja, logo após a sua produção pelo CPPI, 3 meses, 6 meses e 9 meses pós-produção demonstraram uma forte presença de bandas entre 25 kDa e 35 kDa. Bandas entre 5 kDa e 10 kDa também puderam ser observadas em todos os tempos analisados. Proteínas próximas à banda de 66, 2 kDa também foram notadas, especialmente quando se utilizou uma maior massa na corrida (25 µg) (FIGURA 8). Todas estas observações também podem ser notadas no veneno produzido em 2016 (FIGURA 9). Além disso, nota-se que as bandas próximas a 25 kDa e os peptídeos de baixa massa (entre 5 kDa e 10 kDa)

aparentemente diminuíram a intensidade ao passar do tempo na análise do veneno produzido em 2015 (FIGURA 8).

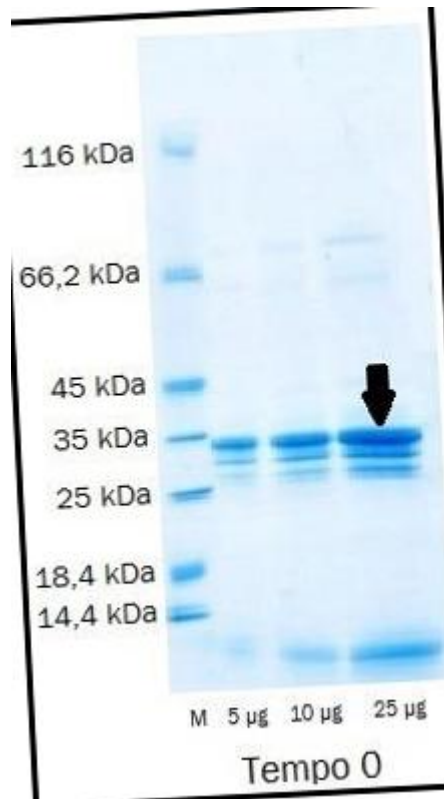
FIGURA 8 - PERFIS ELETROFORÉTICOS DA SOLUÇÃO DE VENENO DE *L. gaucho* 111/15 (SVLg 111/15) EM GEL GRADIENTE 10%-20% REFERENTES AOS TEMPOS 0, 3 MESES, 6 MESES E 9 MESES PÓS-PRODUÇÃO CORADOS COM AZUL DE COOMASSIE.



(M) corresponde ao marcador. 5 µg, 10 µg e 25 µg correspondem às massas utilizadas nas corridas. Em todos os tempos analisados observa-se a presença de bandas nas faixas entre 5 kDa e 10 kDa, entre 25 kDa e 35 kDa, e próximas à 66,2 kDa. Setas indicam bandas de 34 kDa.

FONTE: O AUTOR (2016).

FIGURA 9 - PERFIL ELETROFORÉTICO DA SOLUÇÃO DE VENENO DE *L. gaucho* 114/16 (SVLg 114/16) EM GEL GRADIENTE 10%-20% REFERENTE AO TEMPOS 0 CORADO COM AZUL DE COOMASSIE.

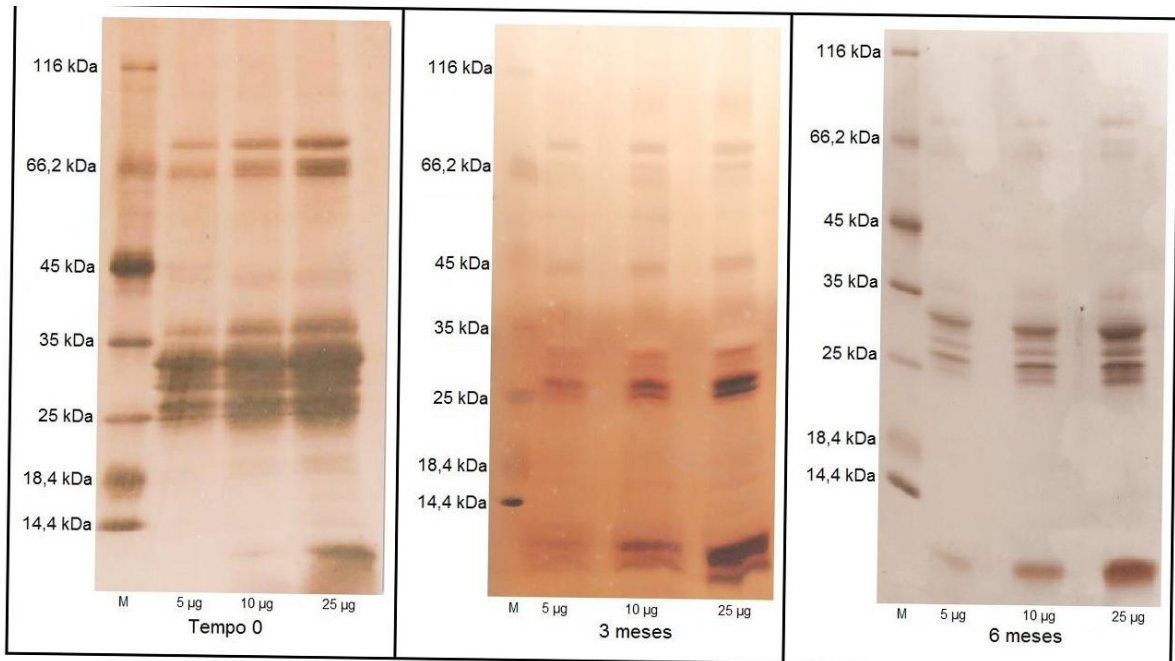


(M) corresponde ao marcador. 5 µg, 10 µg e 25 µg correspondem às massas utilizadas na corrida. Observa-se a presença de bandas nas faixas entre 5 kDa e 10 kDa, entre 25 kDa e 35 kDa, e próximas à 66,2 kDa. Seta indica banda de 34 kDa.

FONTE: O AUTOR (2016).

Nos géis de *L. gaucho* corados pelo método de Prata Monocromática, as mesmas características encontradas nos géis corados pelo Azul de Coomassie foram observadas, com uma prevalência de proteínas entre 25 kDa e 35 kDa. Peptídeos de baixa massa entre 5 kDa e 10 kDa e proteínas com massa por volta de 66,2 kDa também foram notados em todos os tempos analisados. A presença de bandas próximas a 45 kDa e 50 kDa foi possível de ser observada por este método de coloração principalmente nos tempos 0 e 3 meses. Bandas de baixa intensidade na faixa de 20 kDa também foram identificadas no gel referente ao Tempo 0 (FIGURA 10).

FIGURA 10 - PERFIS ELETROFORÉTICOS DA SOLUÇÃO DE VENENO DE *L. gaucho* 111/15 (SVLg 111/15) EM GEL GRADIENTE 10%-20% REFERENTES AOS TEMPOS 0, 3 MESES E 6 MESES PÓS-PRODUÇÃO CORADOS PELO MÉTODO DE PRATA MONOCROMÁTICA.



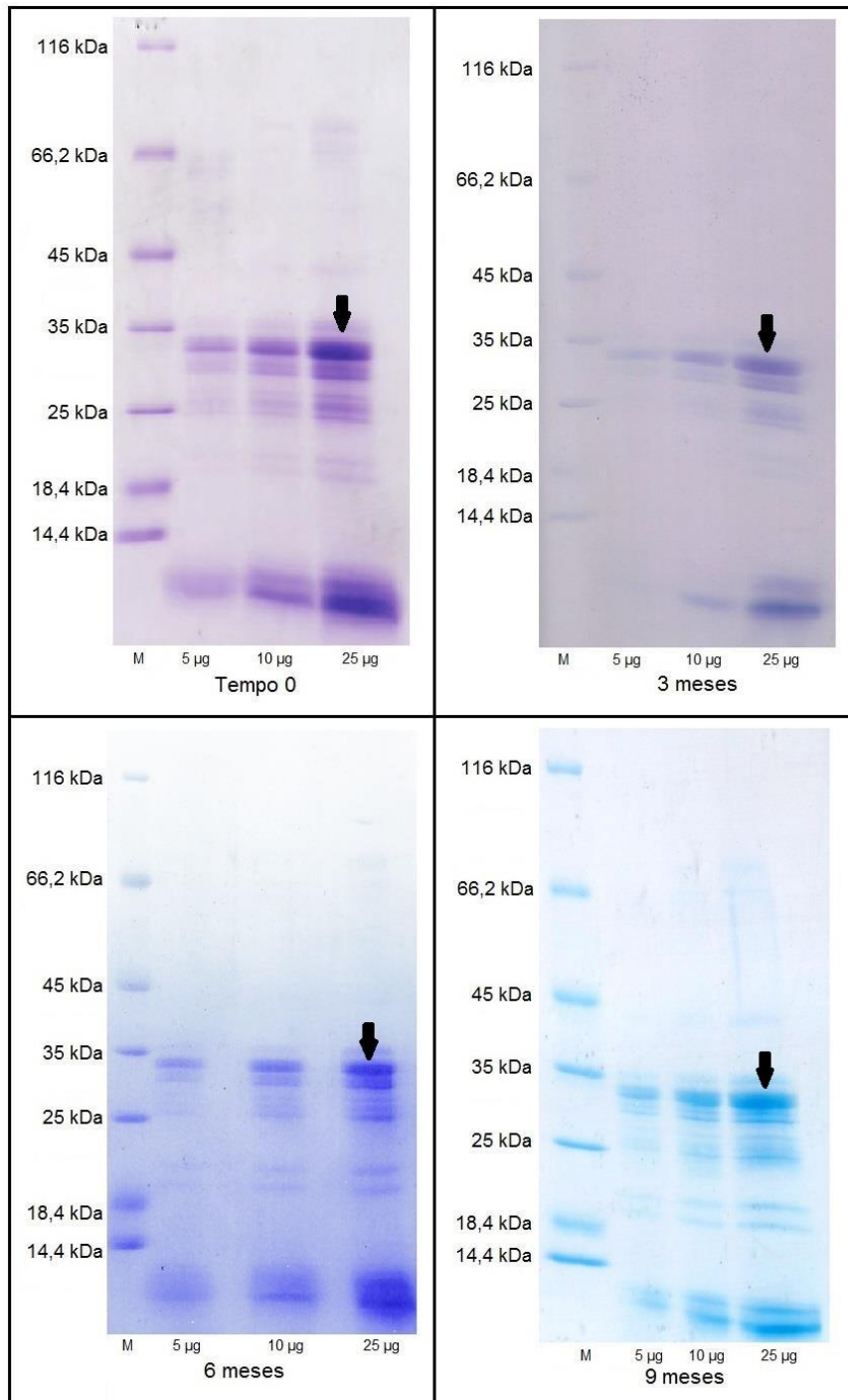
(M) corresponde ao marcador. 5 µg, 10 µg e 25 µg correspondem às massas utilizadas nas corridas. Em todos os tempos analisados observa-se a presença de bandas nas faixas entre 5 kDa e 10 kDa, entre 25 kDa e 35 kDa, e próximas à 66, 2 kDa. Através deste método de coloração também foi possível notar a presença de bandas um pouco abaixo de 45 kDa e por volta de 50 kDa, especialmente nos tempos 0 e 3 meses, além de faixas de baixa intensidade próximas a 20 kDa no Tempo 0.

FONTE: O AUTOR (2016).

Os perfis eletroforéticos do veneno de *L. intermedia* (SVLi 110/15) produzidos pelo CPPI possuem um padrão próximo ao anteriormente descrito para *L. gaucho*. Em todos os tempos analisados corados com Coomassie foi possível observar uma maior concentração de bandas no intervalo de 25 kDa a 35 kDa, bem como a presença de proteínas por volta de 66, 2 kDa. Esta pode ser notada com mais facilidade no Tempo 0 e em menor intensidade no Tempo 6 meses, especialmente na massa de 25 µg. Peptídeos de baixa massa (entre 5 kDa e 10 kDa) foram identificados em todos os tempos analisados e massas utilizadas para as corridas. Além destas, notou-se também a presença de bandas na altura de 20 kDa em todas as análises, principalmente nas massas de 10 µg e 25 µg (FIGURA 11). Todas estas observações também podem ser notadas no veneno produzido em 2016 (FIGURA 12). Bandas entre 19 kDa e 20 kDa

aparentaram se tornar mais evidentes ao longo do tempo no veneno produzido em 2015. Diferentemente, bandas de peptídeos de baixa massa (entre 5 kDa e 10 kDa) tornaram-se menos nítidas neste veneno conforme o tempo pós-produção aumentou. Além disso, bandas próximas à região de 66.2 kDa tornaram-se consideravelmente menos perceptíveis nos tempos 3 meses, 6 meses e 9 meses no veneno de *L. intermedia* de 2015 (FIGURA 11).

FIGURA 11 - PERFIS ELETROFORÉTICOS DA SOLUÇÃO DE VENENO DE *L. intermedia* 110/15 (SVLi 110/15) EM GEL GRADIENTE 10%-20% REFERENTES AOS TEMPOS 0, 3 MESES, 6 MESES E 9 MESES PÓS-PRODUÇÃO CORADOS COM AZUL DE COOMASSIE.

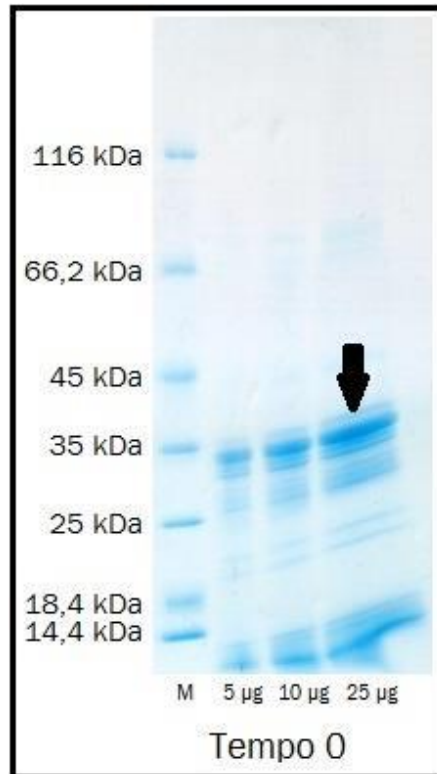


(M) corresponde ao marcador. 5 µg, 10 µg e 25 µg correspondem às massas utilizadas nas corridas. Em todos os tempos analisados observa-se a presença de bandas nas faixas entre 5 kDa e 10 kDa, entre 25 kDa e 35 kDa, e próximas à 66, 2 kDa. Através deste método de coloração também foi possível notar a presença de bandas um pouco abaixo de 45 kDa no Tempo 0, além de faixas de baixa intensidade

próximas a 20 kDa em todos os tempos estudados, principalmente na massa de 25 µg. Setas indicam bandas de 34 kDa.

FONTE: O AUTOR (2016)

FIGURA 12 - PERFIL ELETROFORÉTICO DA SOLUÇÃO DE VENENO DE *L. intermedia* 113/16 (SVLi 113/16) EM GEL GRADIENTE 10%-20% REFERENTE AO TEMPO 0 CORADO COM AZUL DE COOMASSIE.



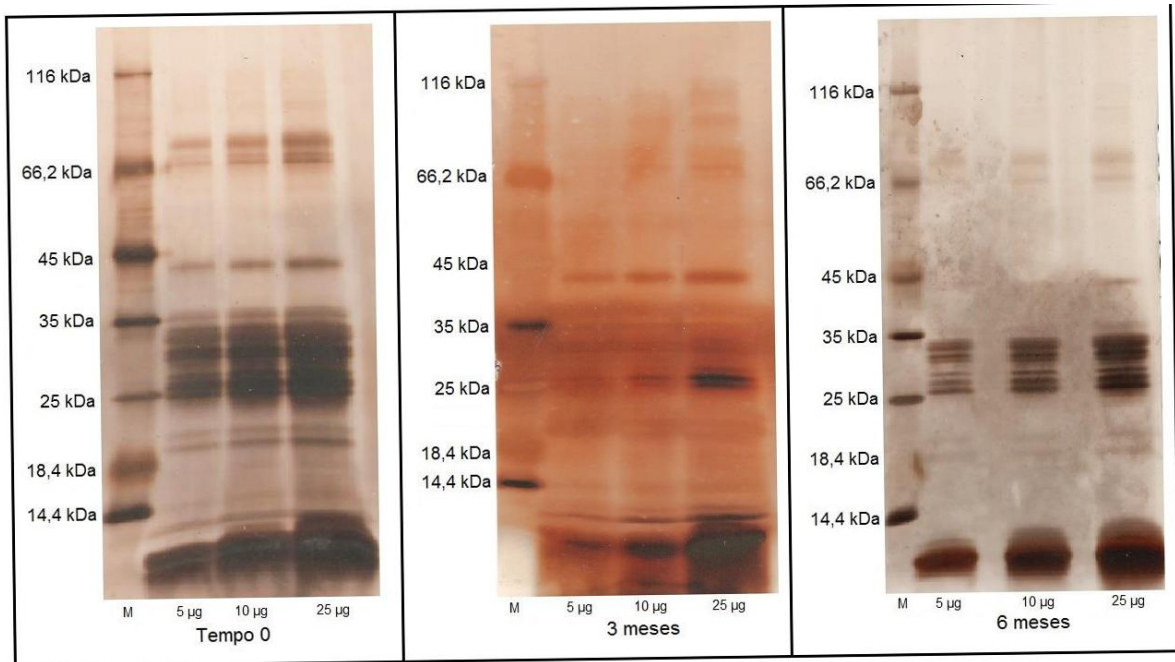
(M) corresponde ao marcador. 5 µg, 10 µg e 25 µg correspondem às massas utilizadas na corrida. Observa-se a presença de bandas nas faixas entre 5 kDa e 10 kDa, entre 25 kDa e 35 kDa, e próximas à 66, 2 kDa. Seta indica banda de 34 kDa.

FONTE: O AUTOR (2016).

Os perfis para *L. intermedia* obtidos pelo método de coloração monocromática por prata seguem o padrão já demonstrado, com maior concentração de proteínas no intervalo de 25 kDa a 35 kDa. Igualmente, observam-se peptídeos de baixa massa (entre 5 kDa e 10 kDa) em todos os tempos, bem como por volta de 66, 2 kDa.

Assim como ocorreu nos perfis de *L. gauchoi*, neste caso também foi possível notar a presença de proteínas próximas à faixa de 45 kDa com este método de coloração. Além destas, bandas de baixa intensidade na altura de 20 kDa foram identificadas em todos os tempos (FIGURA 13).

FIGURA 13 - PERFIS ELETROFORÉTICOS DA SOLUÇÃO DE VENENO DE *L. intermedia* 110/15 (SVLI 110/15) EM GEL GRADIENTE 10%-20% REFERENTES AOS TEMPOS 0, 3 MESES E 6 MESES PÓS-PRODUÇÃO CORADOS PELO MÉTODO DE PRATA MONOCROMÁTICA.

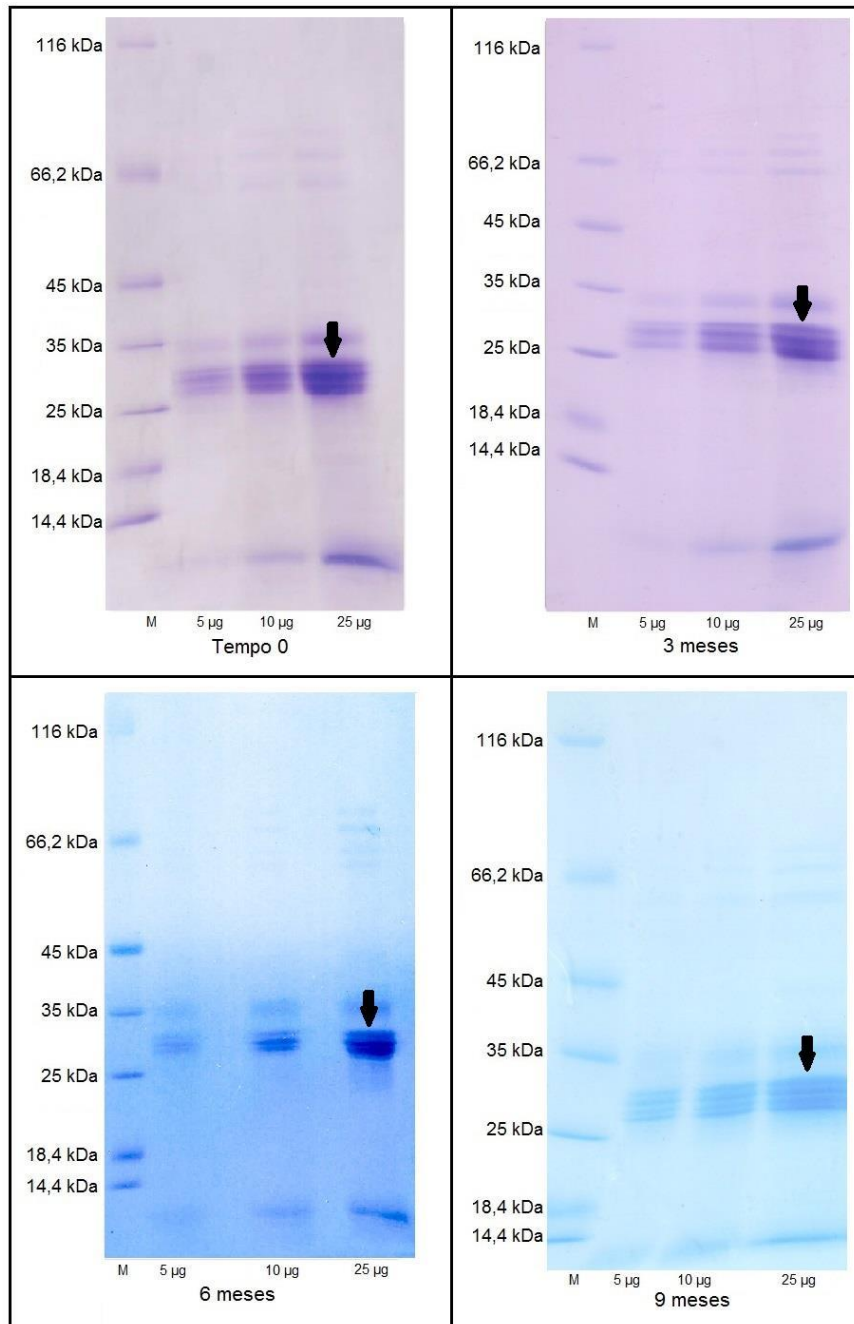


(M) corresponde ao marcador. 5 µg, 10 µg e 25 µg correspondem às massas utilizadas nas corridas. Em todos os tempos analisados observa-se a presença de bandas nas faixas entre 5 kDa e 10 kDa, entre 25 kDa e 35 kDa, um pouco abaixo de 45 kDa e próximas à 66, 2 kDa. Através deste método de coloração também foi possível notar a presença de bandas de menor intensidade próximas a 20 kDa em todos os tempos estudados.

FONTE: O AUTOR (2016)

Já os perfis de *L. laeta* produzidos pelo CPPI (SVLI 112/15) também apresentam em todos os tempos bandas entre 25 kDa a 35 kDa, com uma predominância entre 28 kDa e 32 kDa, aproximadamente. Demais características já citadas para as outras espécies, tais como bandas na altura de 66, 2 kDa (principalmente nas linhas de 10 µg e 25 µg) e peptídeos de baixa massa (entre 5 kDa e 10 kDa) foram, da mesma maneira, observadas em todos os tempos analisados (FIGURA 14). Todas estas observações também podem ser notadas no veneno produzido em 2016 (FIGURA 15). No veneno produzido em 2015 nota-se que a banda de 34 kDa torna-se menos nítida conforme o tempo pós-produção aumenta. O mesmo acontece com as bandas de peptídeos de baixa massa (entre 5 kDa e 10 kDa), que aparentam perder a intensidade (FIGURA 14).

FIGURA 14 - PERFIS ELETROFORÉTICOS DA SOLUÇÃO DE VENENO DE *L. laeta* 112/15 (SVLI 112/15) EM GEL GRADIENTE 10%-20% REFERENTES AOS TEMPOS 0, 3 MESES, 6 MESES E 9 MESES PÓS-PRODUÇÃO CORADOS COM AZUL DE COOMASSIE.

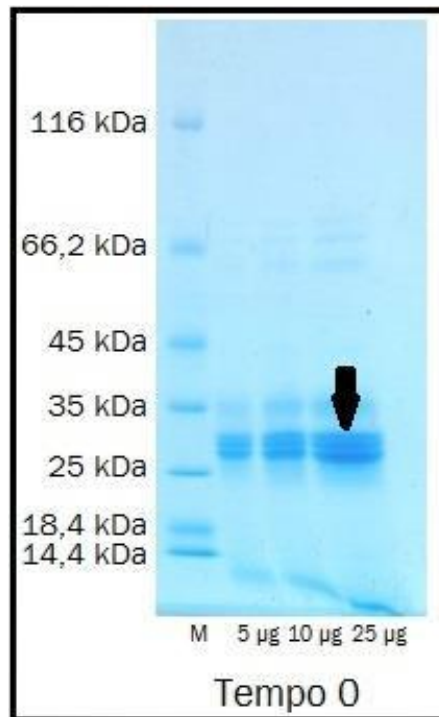


(M) corresponde ao marcador. 5 µg, 10 µg e 25 µg correspondem às massas utilizadas nas corridas.

Todas as características citadas para as outras espécies, tais como bandas entre 25 kDa e 35 kDa, peptídeos de baixa massa entre 5 kDa e 10 kDa e bandas próximas à região de 66, 2 kDa puderam ser observadas em todos os tempos analisados. Setas indicam bandas de 32 kDa.

FONTE: O AUTOR (2016)

FIGURA 15 - PERFIL ELETROFORÉTICO DA SOLUÇÃO DE VENENO DE *L. laeta* 115/16 (SVLI 115/16) EM GEL GRADIENTE 10%-20% REFERENTE AO TEMPO 0 CORADO COM AZUL DE COOMASSIE.

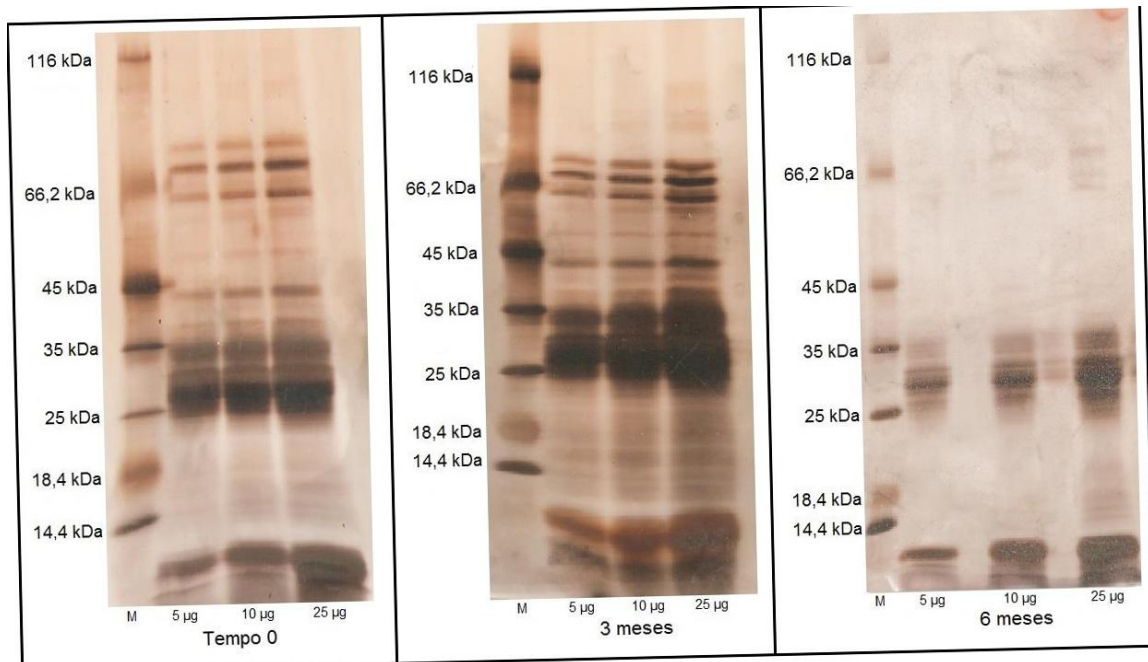


(M) corresponde ao marcador. 5 µg, 10 µg e 25 µg correspondem às massas utilizadas nas corridas. Todas as características citadas para as outras espécies, tais como bandas entre 25 kDa e 35 kDa, peptídeos de baixa massa entre 5 kDa e 10 kDa e bandas próximas à região de 66, 2 kDa puderam ser observadas em todos os tempos analisados. Seta indica banda de 32 kDa.

FONTE: O AUTOR (2016).

Os perfis do veneno de *L. laeta* obtidos a partir da coloração pelo Método de Prata Monocromática apresentaram igualmente as principais características descritas até o momento para a espécie. Cabe destaque para a área próxima a 66, 2 kDa, onde houve uma maior separação de bandas. No perfil referente a seis meses pós-produção, as bandas de 45 kDa e 66,2 kDa ficaram pouco nítidas, não havendo prejuízo às outras proteínas do gel (FIGURA 16).

FIGURA 16 - PERFIS ELETROFORÉTICOS DA SOLUÇÃO DE VENENO DE *L. laeta* 112/15 (SVLL 112/15) EM GEL GRADIENTE 10%-20% REFERENTES AOS TEMPOS 0, 3 MESES E 6 MESES PÓS-PRODUÇÃO CORADOS PELO MÉTODO DA PRATA MONOCROMÁTICA.



(M) corresponde ao marcador. 5 µg, 10 µg e 25 µg correspondem às massas utilizadas nas corridas. Notam-se bandas entre 25 kDa e 35 kDa, 5 kDa e 10 kDa, além de faixas um pouco abaixo de 45 kDa e no mínimo três áreas de marcação protéica na região de 66, 2 kDa. Estas duas últimas estão mais evidentes nos géis referentes ao Tempo 0 e 3 meses.

FONTE: O AUTOR (2016)

Visando o enriquecimento da caracterização dos perfis eletroforéticos dos venenos das três espécies de aranhas-marons produzidos pelo CPPI, a intensidade média das bandas de 34 kDa de *L. gaucho* e *L. intermedia* e 32 kDa de *L. laeta* (concentração de 25 µg) foi mensurada com o auxílio do programa Quantity One 1-D Analysis Software da Bio-Rad.

Ao longo dos nove meses de análise dos venenos de 2015, a intensidade média das bandas citadas permaneceu entre 84, 134 e 94, 838 D.O. por pixel (TABELA 3).

TABELA 3 – INTENSIDADE MÉDIA (DENSIDADE ÓPTICA X PIXEL) DAS BANDAS DE 34 kDa DOS VENENOS DE *L. gaucho* E *L. intermedia* E DE 32 kDa DE *L. laeta* (INDICADAS NAS FIGURAS 8, 11 E 14, RESPECTIVAMENTE) PRODUZIDOS EM 2015 PELO CPPI NOS TEMPOS 0, 3 MESES, 6 MESES E 9 MESES PÓS-PRODUÇÃO.

	<u>Tempo 0</u>	<u>3 Meses</u>	<u>6 Meses</u>	<u>9 Meses</u>	<u>MÉDIA</u>
<i>L. gaucho</i> (111/15)	84.494	117.462	97.701	79.698	94.838
<i>L. intermedia</i> (110/15)	73.907	79.783	74.427	108.421	84.134
<i>L. laeta</i> (112/15)	81.620	90.691	88.967	93.289	88.641

FONTE: O AUTOR (2016).

Os valores de intensidade média das bandas obtidos no Tempo 0 dos venenos produzidos pelo CPPI em 2016, mostrou-se muito próximo àqueles do Tempo 0 de 2015 (TABELA 4).

TABELA 4 – INTENSIDADE MÉDIA (DENSIDADE ÓPTICA X PIXEL) DAS BANDAS DE 34 kDa DOS VENENOS DE *L. gaucho* E *L. intermedia* E DE 32 kDa DE *L. laeta* (INDICADAS NAS FIGURAS 9, 12 E 15 RESPECTIVAMENTE) PRODUZIDOS EM 2016 PELO CPPI NO TEMPO 0.

	<u>Tempo 0</u>
<i>L. gaucho</i> (114/16)	80.370
<i>L. intermedia</i> (113/16)	78.195
<i>L. laeta</i> (115/16)	87.860

FONTE: O AUTOR (2016).

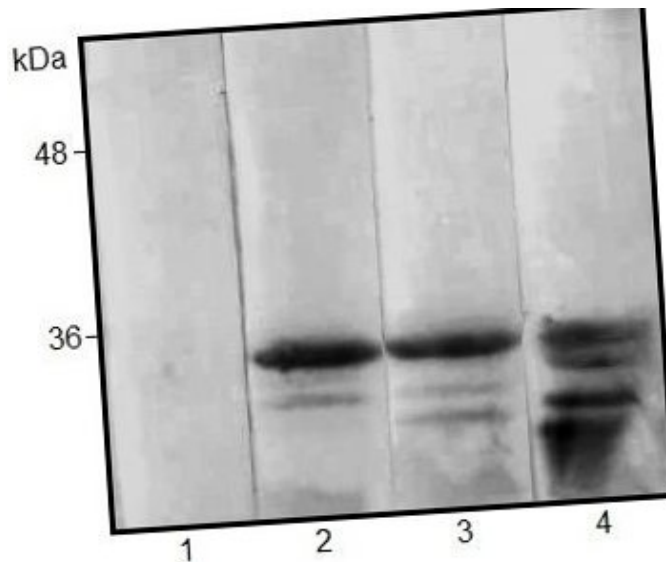
5.2 WESTERN BLOTTING

Os lotes de venenos das três espécies de aranhas-marrons produzidos pelo CPPI em 2016 foram analisados durante três meses em ensaios de Western Blotting frente à diferentes anticorpos.

Todos os venenos foram reconhecidos pelos anticorpos provenientes de coelhos no Tempo 0 (em seguida à produção). Soros pré-himunes não reagiram em nenhum dos ensaios (FIGURAS 17,18 E 19).

O veneno de *L. gaucho* mostrou um padrão de bandas reconhecidas muito similar quando foram utilizados os soros específicos para *L. gaucho* e *L. intermedia*, entre 31 kDa e 35 kDa. Em contrapartida, o soro para *L. laeta* reconheceu bandas do veneno de *L. gaucho* entre 30 kDa e 35 kDa com uma intensidade significativamente maior quando se comparado aos soros das duas espécies anteriormente citadas (FIGURA 17).

FIGURA 17 – ATIVIDADE IMUNOGÊNICA DE VENENO DE *L.gaucho* PRODUZIDO EM 2016 PELO CPPI FRENTE A ANTICORPOS PROVENIENTES DE COELHOS ATRAVÉS DE WESTERN-BLOTTING NO TEMPO 0 (EM SEGUIDA À PRODUÇÃO).



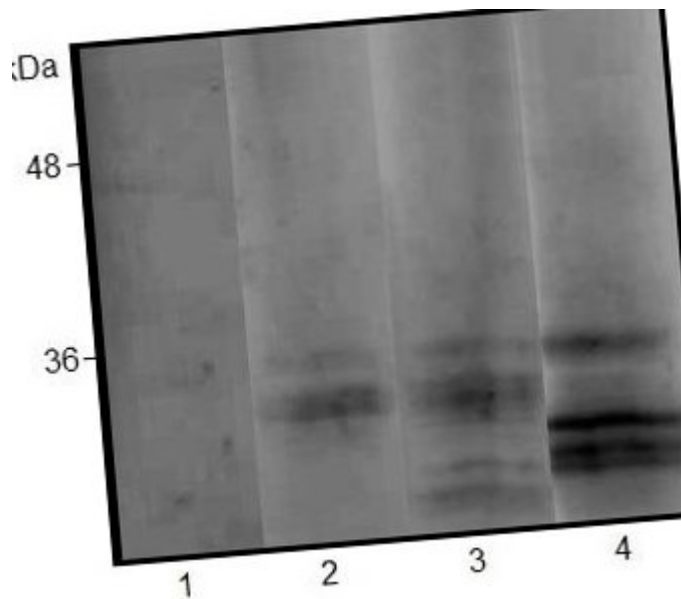
Linha 1 indica reação negativa na presença de soro pré-imune. Linhas 2, 3 e 4 mostram reações obtidas com a utilização de soros hiperimunes contra *L. gaucho*, *L. intermedia* e *L. laeta*, respectivamente. A concentração de veneno aplicada em gel gradiente de eletroforese 10% a 20% (SDS-PAGE) sob condições redutoras foi de 10 µg. Após a corrida, as proteínas foram transferidas à uma membrana de nitrocelulose e expostas aos soros diluídos em uma proporção de 1:8000.

FONTE: O AUTOR (2016).

Na análise imunogênica do Tempo 0 (em seguida à produção) do veneno de *L. intermedia* produzido em 2016 pelo CPPI, nota-se que quando se utilizou soro específico para *L. gaucho* houve um reconhecimento de bandas entre 33 kDa e 35 kDa. Quando da utilização de soro específico para *L. intermedia*, percebeu-se um aumento

na quantidade de bandas reconhecidas (entre 29 kDa e 35 kDa). Apesar das diferenças no número de bandas reveladas pelos dois soros, a intensidade das faixas aparenta ser similar em ambos os casos. O soro frente ao veneno de *L. laeta* reconheceu bandas do perfil de *L. intermedia* entre 30 kDa e 35 kDa com uma intensidade maior se comparado aos outros dois soros utilizados (FIGURA 18).

FIGURA 18 – ATIVIDADE IMUNOGÊNICA DE VENENO DE *L.intermedia* PRODUZIDO EM 2016 PELO CPPI FRENTE A ANTICORPOS PROVENIENTES DE COELHOS ATRAVÉS DE WESTERN-BLOTTING NO TEMPO 0 (EM SEGUIDA À PRODUÇÃO).

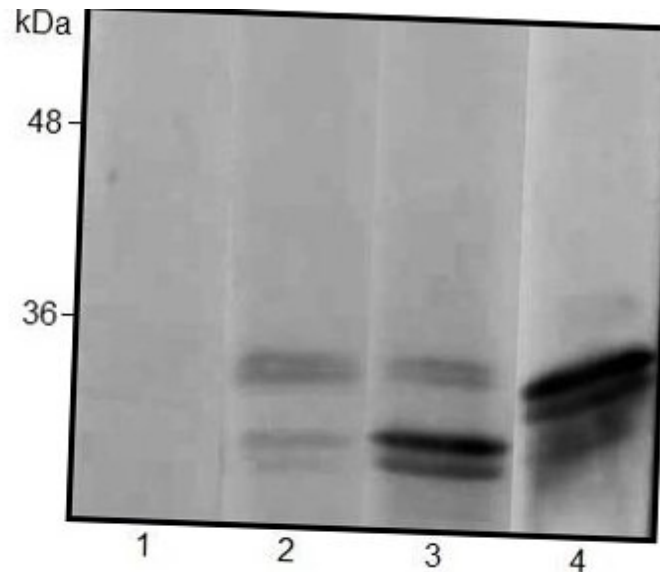


Linha 1 indica reação negativa na presença de soro pré-imune. Linhas 2, 3 e 4 mostram reações obtidas com a utilização de soros hiperimunes contra *L. gaucho*, *L. intermedia* e *L. laeta*, respectivamente. A concentração de veneno aplicada em gel gradiente de eletroforese 10% a 20% (SDS-PAGE) sob condições redutoras foi de 10 µg. Após a corrida, as proteínas foram transferidas à uma membrana de nitrocelulose e expostas aos soros diluídos em uma proporção de 1:8000.

FONTE: O AUTOR (2016)

O veneno de *L. laeta* produzido em 2016 pelo CPPI foi igualmente testado no Tempo 0 frente aos três soros específicos produzidos por coelhos. Nota-se que os soros frente aos venenos de *L. gaucho* e *L. intermedia* reconheceram um padrão similar de bandas entre 31 kDa e 35 kDa, porém o segundo revelou com maior intensidade as faixas entre 31 kDa e 32 kDa. O soro de específico contra o veneno de *L. laeta* foi capaz de identificar bandas entre 32 kDa e 35 kDa com mais intensidade se comparado aos soros anteriores (FIGURA 19).

FIGURA 19 – ATIVIDADE IMUNOGÊNICA DE VENENO DE *L. laeta* PRODUZIDO EM 2016 PELO CPPI FRENTE A ANTICORPOS PROVENIENTES DE COELHOS ATRAVÉS DE WESTERN-BLOTTING NO TEMPO 0 (EM SEGUIDA À PRODUÇÃO).

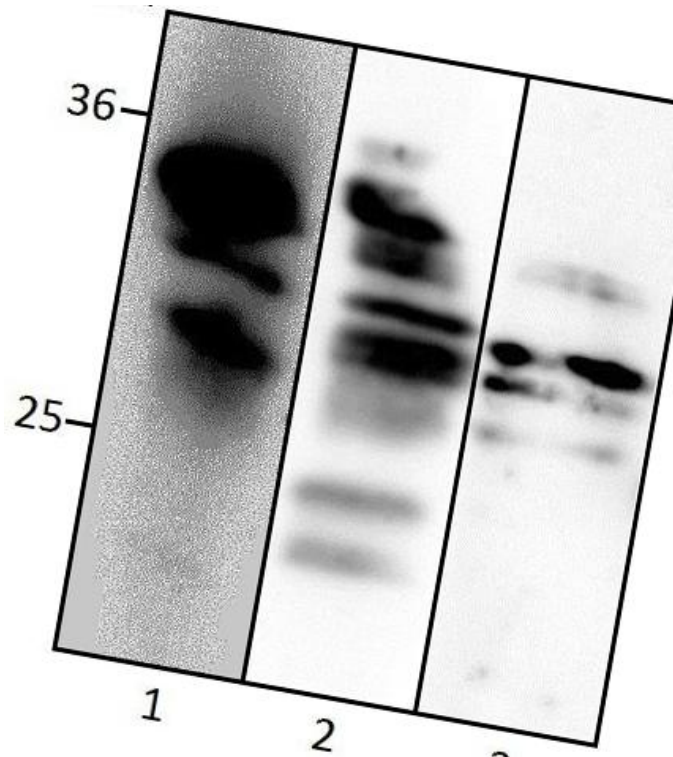


Linha 1 indica reação negativa na presença de soro pré-imune. Linhas 2, 3 e 4 mostram reações obtidas com a utilização de soros hiperimunes contra *L. gaucho*, *L. intermedia* e *L. laeta*, respectivamente. A concentração de veneno aplicada em gel gradiente de eletroforese 10% a 20% (SDS-PAGE) sob condições redutoras foi de 10 µg. Após a corrida, as proteínas foram transferidas à uma membrana de nitrocelulose e expostas aos soros diluídos em uma proporção de 1:8000.

FONTE: O AUTOR (2016)

Os antígenos também foram testados frente ao Soro Antiaracnídico (Lote 1306121) produzido pelo Instituto Butantan no Tempo 0 (em seguida à produção). Todos os venenos foram reconhecidos no ensaio (FIGURA 20). Observa-se que o veneno de *L. gaucho* (FIGURA 20 – LINHA 1) apresentou bandas entre 31 kDa e 35 kDa em uma intensidade visivelmente superior à dos outros venenos. Contudo, os venenos de *L. intermedia* (FIGURA 20 – LINHA 2) e *L. laeta* (FIGURA 20 – LINHA 3) revelaram mais bandas no intervalo de 22 kDa a 36 kDa e 28 kDa a 34 kDa, respectivamente.

FIGURA 20 – ATIVIDADE IMUNOGÊNICA DOS VENENOS DE *L. gaucho* (1), *L. intermedia* (2) e *L. laeta* (3) FRENTE SORO ANTIARACNÍDICO ATRAVÉS DE WESTERN-BLOTTING NO TEMPO 0 (EM SEGUIDA À PRODUÇÃO).



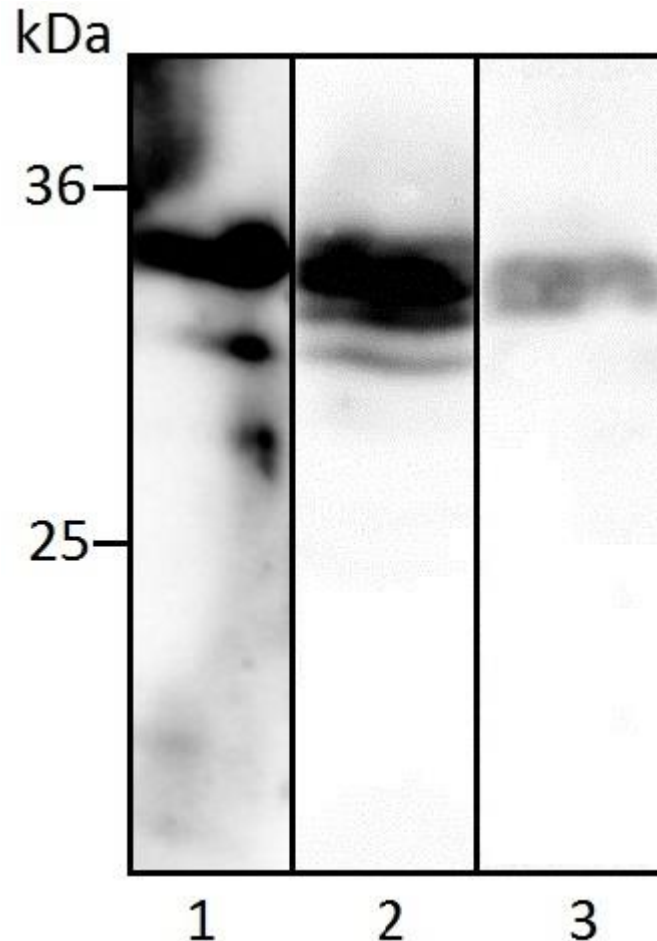
A concentração de veneno aplicada em gel gradiente de eletroforese 10% a 20% (SDS-PAGE) sob condições redutoras foi de 10 µg. Após a corrida, as proteínas foram transferidas à uma membrana de nitrocelulose e expostas ao soro diluído em uma proporção de 1:500.

FONTE: O AUTOR (2016)

Por fim, os venenos foram avaliados frente ao Soro Antiloxoscélico produzido pelo CPPI. Apenas o Tempo 3 meses foi observado. Igualmente ao visto com outros soros, todos os antígenos foram identificados (FIGURA 21).

Os venenos de *L. gaucho* (FIGURA 21 – LINHA 1) e de *L. intermedia* (FIGURA 21 – LINHA 2) apresentaram as bandas de 35 kDa com grande intensidade e outras menos logo abaixo. Diferentemente, o veneno de *L. laeta* (FIGURA 21 – LINHA 3) revelou uma banda na faixa de 35 kDa, porém com intensidade visivelmente inferior àquela vista nas outras duas espécies.

FIGURA 21 – ATIVIDADE IMUNOGÊNICA DOS VENENOS DE *L. gaucho* (1), *L. intermedia* (2) e *L. laeta* (3) FRENTE SORO ANTIARACNÍDICO ATRAVÉS DE WESTERN-BLOTTING NO TEMPO 3 MESES (EM SEGUIDA À PRODUÇÃO).



A concentração de veneno aplicada em gel gradiente de eletroforese 10% a 20% (SDS-PAGE) sob condições redutoras foi de 10 µg. Após a corrida, as proteínas foram transferidas à uma membrana de nitrocelulose e expostas ao soro diluído em uma proporção de 1:500.

FONTE: O AUTOR (2016)

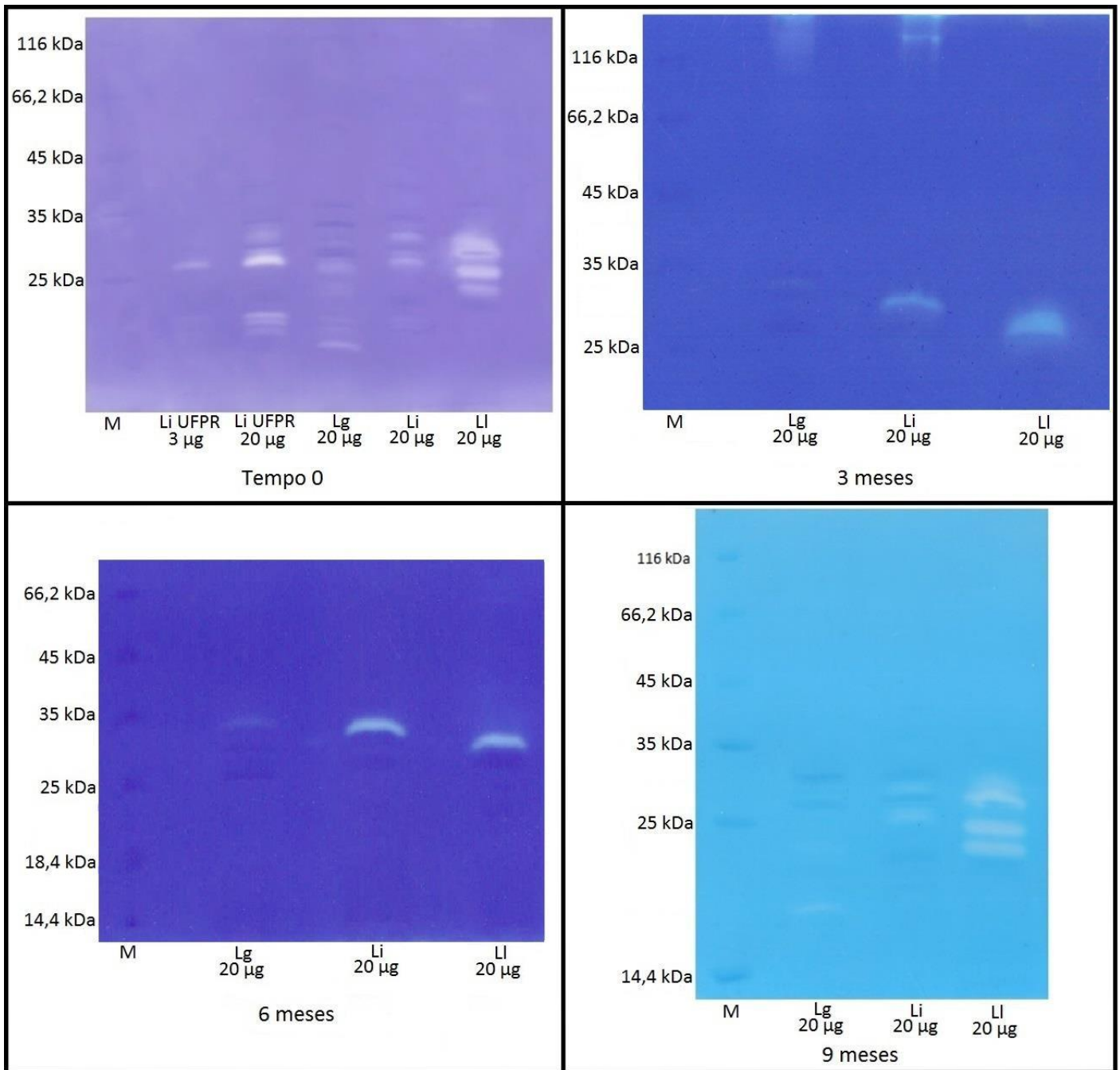
5.3 ZIMOGRAMA

O zimograma, utilizado a fim de averiguar a capacidade proteolítica dos venenos frente à gelatina, foi realizado com as três soluções de veneno produzidas em 2015 nos Tempos 0, isto é, logo após a sua produção, 3 meses, 6 meses e 9 meses depois de serem produzidas.

Em todos os tempos analisados os venenos produzidos pelo CPPI e utilizados como imunógenos no processo de fabricação do Soro Antiloxoscélico distribuído ao SUS apresentaram atividade gelatinolítica, degradando-a em pontos específicos do gel, correspondentes às enzimas que possuem este tipo de ação.

No ensaio correspondente ao Tempo 0, veneno de *L. intermedia* mantidas pelo Laboratório de Matriz Extracelular do Departamento de Biologia Celular da UFPR foi extraído no dia do ensaio e analisado no mesmo gel, a fim de comparação com os venenos produzidos pelo CPPI. A corrida foi realizada em cuba PROTEAN II xi Cell da Bio-Rad (tamanho do gel: aproximadamente 16 cm x 16 cm). Após o gel ter sido corado, conforme descrição contida na seção 4. Materiais e Métodos foi possível observar que todos os venenos, tanto os produzidos pelo CPPI, quanto aqueles de animais extraídos no dia do ensaio mantidos pela UFPR, apresentaram atividade proteolítica (FIGURA 22). De maneira geral, todas as espécies apresentaram atividade gelatinolítica nos géis entre as faixas de 18 kDa a 32 kDa, com variações entre a distribuição de bandas e intensidade de degradação. O veneno de *L. intermedia* mantidas pela UFPR e extraído no dia do ensaio apresentou uma maior intensidade de faixas de degradação entre 20 kDa e 32 kDa (coluna de 20 µg) quando comparado com o veneno da mesma espécie produzido pelo CPPI, embora a distribuição das bandas seja similar. Já *L. gaucho* aparenta ter uma menor atividade proteolítica dentro do intervalo citado. Por outro lado, *L. laeta* mostrou uma maior atividade de degradação de gelatina, quando comparada com as outras espécies, com três grandes bandas entre 23 kDa e 31 kDa, aproximadamente.

FIG. 22 – EFEITO PROTEOLÍTICO DAS TOXINAS DO VENENO EM GELATINA (TEMPO 0 – EM SEGUIDA À PRODUÇÃO, 3 MESES, 6 MESES E 9 MESES PÓS-PRODUÇÃO).



O gel referente ao tempo 0 demonstra a atividade gelatinolítica de veneno *L. intermedia* extraído de espécimes mantidos pelo LME-UFPR (*Li* LME), *L. intermedia*, *L. gauch*o e *L. laeta* provenientes do CPPI (*Li* CPPI, *Lg* CPPI e *LI* CPPI, respectivamente). Os géis correspondentes a 3, 6 e 9 meses foram avaliados apenas com venenos do CPPI. As atividades foram atestadas a partir da realização de zimograma copolimerizado com gelatina (3 mg/mL). Todos os venenos apresentaram atividade gelatinolítica. Os números ao lado da identificação dos venenos indicam a massa de proteínas utilizada na corrida. SVLg: *L. gauch*o; SVLi: *L. intermedia*; SVLI: *L. laeta*.

FONTE: O AUTOR (2016)

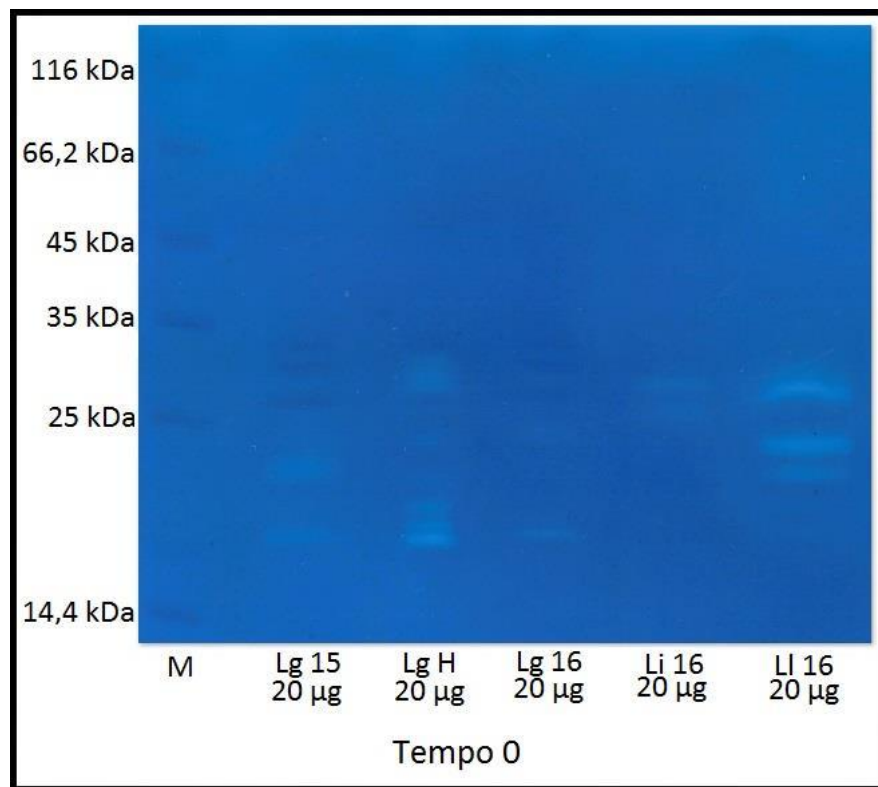
Os géis correspondentes aos tempos 3 meses e 6 meses pós-produção foram executados em cubas Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell (tamanho do gel: aproximadamente 10 cm x 7 cm). Nestes tempos, apenas os venenos produzidos pelo CPPI foram analisados. Em ambos os ensaios, ainda pôde-se observar ação gelatinolítica de todos os venenos, porém nota-se que a separação de bandas ficou comprometida em vista do tamanho dos géis. Apesar deste fato, ainda é possível identificar a diferença de atividade entre os três venenos, sendo a ordem crescente de degradação a seguinte: *L. gaucho*, *L. intermedia* e *L. laeta*. Nestes géis também é possível perceber que a banda de degradação formada por *L. laeta* encontra-se em uma faixa levemente inferior (entre 30 e 31 kDa) quando comparada às bandas das outras duas espécies, que ficam entre 32 kDa e 33 kDa, aproximadamente (FIGURA 22).

O ensaio referente a nove meses pós-produção voltou a ser realizado em cuba PROTEAN II xi Cell da Bio-Rad (tamanho do gel: aproximadamente 16 cm x 16 cm) apenas com venenos produzidos pelo CPPI. Da mesma maneira, todas as soluções continuaram a apresentar atividade gelatinolítica (FIGURA 22). Nota-se que com um gel maior, as bandas de degradação tornam-se mais espaçadas e nítidas. Além disso, é possível afirmar que as características iniciais observadas no gel referente ao Tempo 0 ainda se mostram presentes, tais como: bandas com maior intensidade em *L. laeta*, entre 23 kDa e 31 kDa, aproximadamente; uma discreta banda de degradação próxima à faixa de 18 kDa e outras bem menos evidentes entre 26 kDa a 31 kDa em *L. gaucho*; e bandas entre 26 kDa e 32 kDa para *L. intermedia*. Além disso, a escala crescente de degradação permanece a mesma: *L. gaucho*, *L. intermedia* e *L. laeta*.

O zimograma referente à análise do Tempo 0 dos venenos das três espécies de aranhas-marrons produzidos em 2016 foi igualmente realizado em cuba PROTEAN II xi Cell da Bio-Rad. Neste ensaio, além dos venenos de 2016, foram observadas as características de degradação do veneno de *L. gaucho* extraídas no dia do experimento e da solução de *L. gaucho* produzida pelo CPPI em 2015, a fim de comparação (FIGURA 23). Observa-se que tanto o veneno de *L. gaucho* produzido em 2015 pelo CPPI (Lg 15 20 µg) quanto o da mesma espécie produzido em 2016 (Lg 16 20 µg) apresentam menos bandas de degradação e com menor intensidade, quando

comparados com o veneno de *L. gaucha* extraído no dia do experimento e diluído em PBS. Nos três casos, as faixas se apresentam entre 18 kDa e 31 kDa, aproximadamente. Já os venenos de *L. intermedia* e *L. laeta* produzidos pelo CPPI em 2016 apresentaram um padrão similar àqueles demonstrados nas análises dos venenos produzidos em 2015, com bandas com maior intensidade em *L. laeta*, entre 23 kDa e 31 kDa, aproximadamente, e bandas em torno de 26 kDa a 32 kDa para *L. intermedia*.

FIG. 23 – EFEITO PROTEOLÍTICO EM GELATINA DAS TOXINAS DOS VENENOS PRODUZIDOS EM 2016 PELO CPPI NO TEMPO 0 (EM SEGUIDA À PRODUÇÃO).



O gel demonstra a atividade gelatinolítica de veneno *L. gaucha* extraído no dia do experimento e diluído em PBS (Lg H 20 µg), *L. gaucha* produzido pelo CPPI em 2015 (Lg 15 20 µg) e *L. gaucha*, *L. intermedia* e *L. laeta* provenientes do CPPI produzidos em 2016 (*Li* 16 20 µg, *Lg* 16 20 µg e *LI* 16 20 µg, respectivamente). As atividades foram atestadas a partir da realização de zimograma copolimerizado com gelatina (3 mg/mL) Todos os venenos apresentaram atividade gelatinolítica. Os números ao lado da identificação dos venenos indicam a massa de proteínas utilizada na corrida.

FONTE: O AUTOR (2016)

5.4 ATIVIDADE FOSFOLIPÁSICA

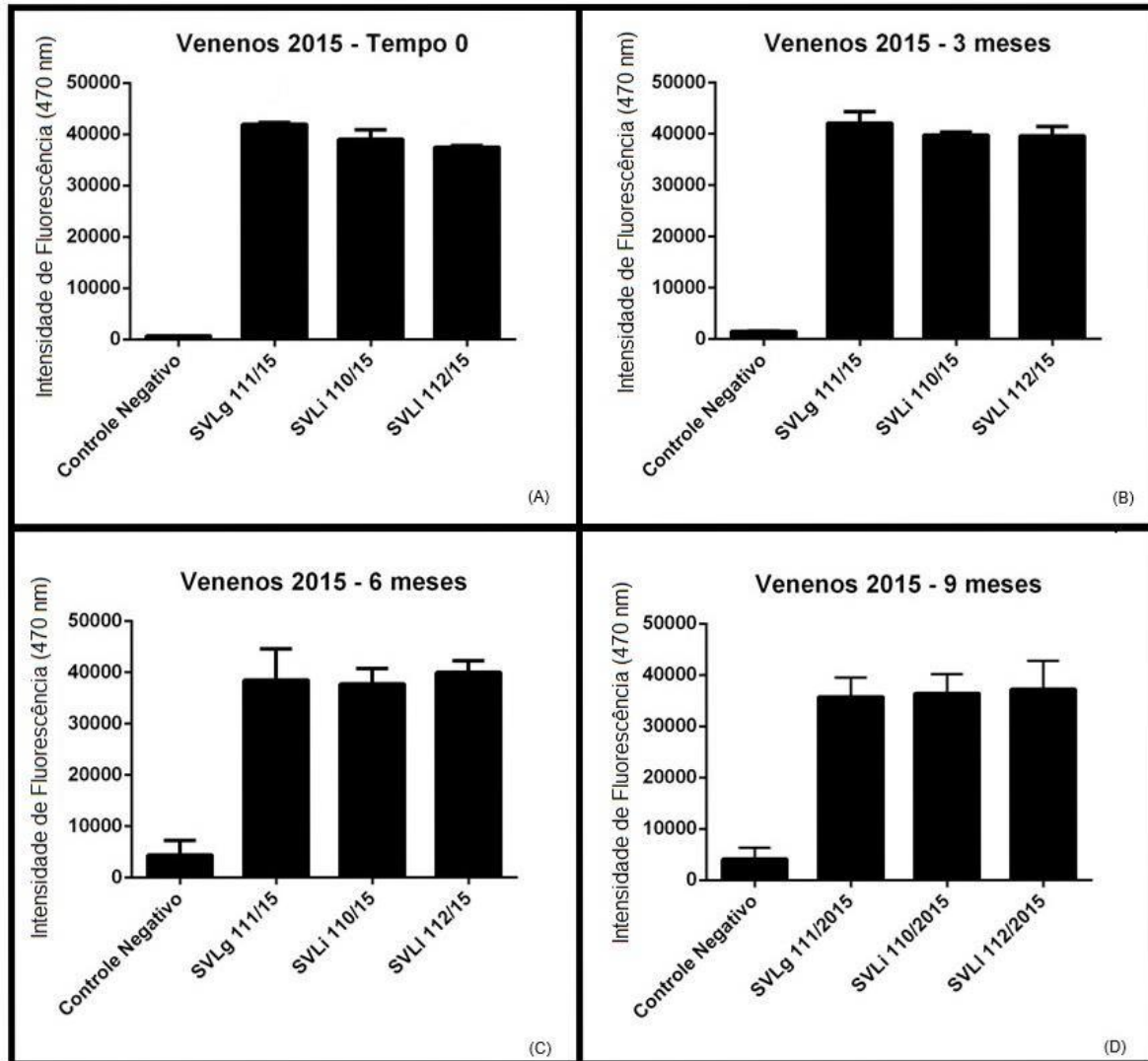
Os ensaios de atividade fosfolipásica referentes aos venenos produzidos em 2015 foram realizados no tempo 0 (em seguida à produção), 3 meses, 6 meses e 9 meses após a produção, nos três lotes de veneno das três espécies estudadas. Já os venenos produzidos em 2016 foram testados no tempo 0.

Em todos os tempos analisados todos os venenos das diferentes espécies, produzidos tanto em 2015 quanto 2016 apresentaram atividade fosfolipásica.

Todos os venenos apresentaram diferenças estatisticamente significativas em todos os tempos quando comparados com os controles negativos (GRÁFICOS 1 E 2).

Todos os ensaios foram realizados em triplicatas, em ao menos três repetições. As análises estatísticas foram conduzidas pelo método One-way ANOVA.

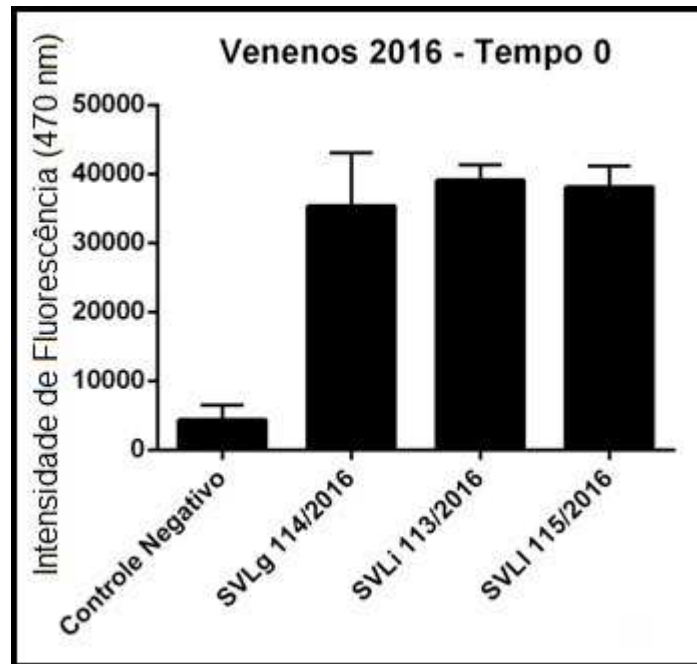
GRÁFICO 1 – COMPARAÇÃO DA ATIVIDADE FOSFOLIPÁSICA ENTRE AS SOLUÇÕES DE VENENO LOXOSCÉLICO PRODUZIDAS PELO CPPI EM 2015 NOS TEMPOS 0, ISTO É, EM SEGUIDA À SUA PRODUÇÃO, 3 MESES, 6 MESES E 9 MESES PÓS-PRODUÇÃO.



A atividade das fosfolipases-D dos venenos estudados foi avaliada utilizando o kit para detecção indireta da liberação de colina Amplex Red. Os ensaios ocorreram após incubação dos venenos com o substrato a 37 °C por uma hora. Como controle, foi utilizado PBS na ausência de qualquer toxina. A fluorescência decorrente do produto da reação foi determinada por espectrofluorimetria com excitação em 540 nm e emissão em 570 nm. O ensaio foi realizado em triplicata utilizando 10 µg de toxina. Análise estatística realizada por Ordinary One-way ANOVA. (A): Tempo 0, $p = 0,0005$ (*): diferença estatística entre amostras ; (B): 3 meses, $p = 0,0012$; (C): 6 meses, $p < 0,0001$; (D): 9 meses, $p < 0,0001$.

FONTE: O AUTOR (2016)

GRÁFICO 2 – COMPARAÇÃO DA ATIVIDADE FOSFOLIPÁSICA ENTRE AS SOLUÇÕES DE VENENO LOXOSCÉLICO PRODUZIDAS PELO CPPI EM 2016 NO TEMPO 0, ISTO É, LOGO APÓS SUA PRODUÇÃO.

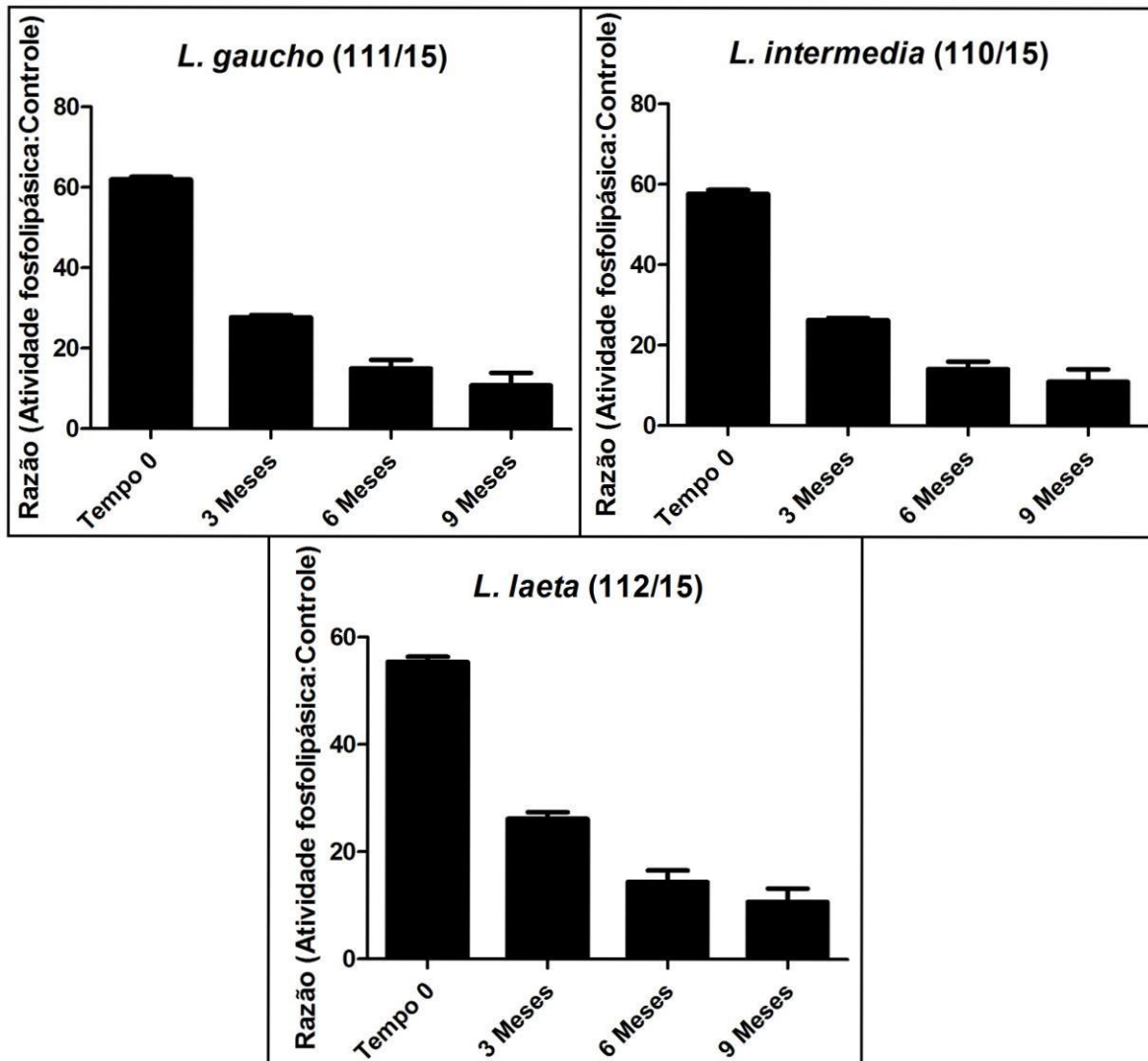


A atividade das fosfolipases-D dos venenos estudados foi avaliada utilizando o kit para detecção indireta da liberação de colina Amplex Red. Os ensaios ocorreram após incubação dos venenos com o substrato a 37 °C por uma hora. Como controle, foi utilizado PBS na ausência de qualquer toxina. A fluorescência decorrente do produto da reação foi determinada por espectrofluorimetria com excitação em 540 nm e emissão em 570 nm. O ensaio foi realizado em triplicata utilizando 10 µg de toxina. Análise estatística realizada por Ordinary One-way ANOVA. $p < 0,0001$.

FONTE: O AUTOR (2016)

Visando analisar diferenças na atividade fosfolipásica de um mesmo veneno ao longo do período de armazenamento, a razão entre as fluorescências dos venenos pela fluorescência do controle negativo em cada tempo estudado foi plotada em gráficos. Todos os venenos apresentaram diferença estatisticamente significativa nas suas atividades quando comparadas com o Tempo 0 (em seguida à produção), apresentando uma queda da atividade fosfolipásica, a partir de três meses e que se segue ao longo do tempo de armazenamento. Da mesma maneira, observou-se diferença estatística quando comparou-se o tempo 3 meses com os tempos 6 e 9 meses de todas as espécies, porém não houve diferença quando comparados apenas os tempos 6 e 9 meses. A análise estatística foi executada pelo método One-way ANOVA seguida de pós-teste de Tukey (GRÁFICO 3).

GRÁFICO 3 – COMPARAÇÃO DA ATIVIDADE FOSFOLIPÁSICA ENTRE AS SOLUÇÕES DE VENENO LOXOSCÉLICO PRODUZIDAS PELO CPPI EM 2015 NO AO LONGO DO TEMPO.



A análise foi realizada a partir da razão obtida entre a absorbância da atividade de um dado veneno em um determinado tempo pela absorbância gerada pelo controle negativo naquele mesmo tempo. Análise estatística realizada por Ordinary One-way ANOVA seguida de pós-teste de Tukey. $P < 0.0001$.

FONTE: O AUTOR (2016)

5.5 ENSAIO DE TURBIDIMETRIA

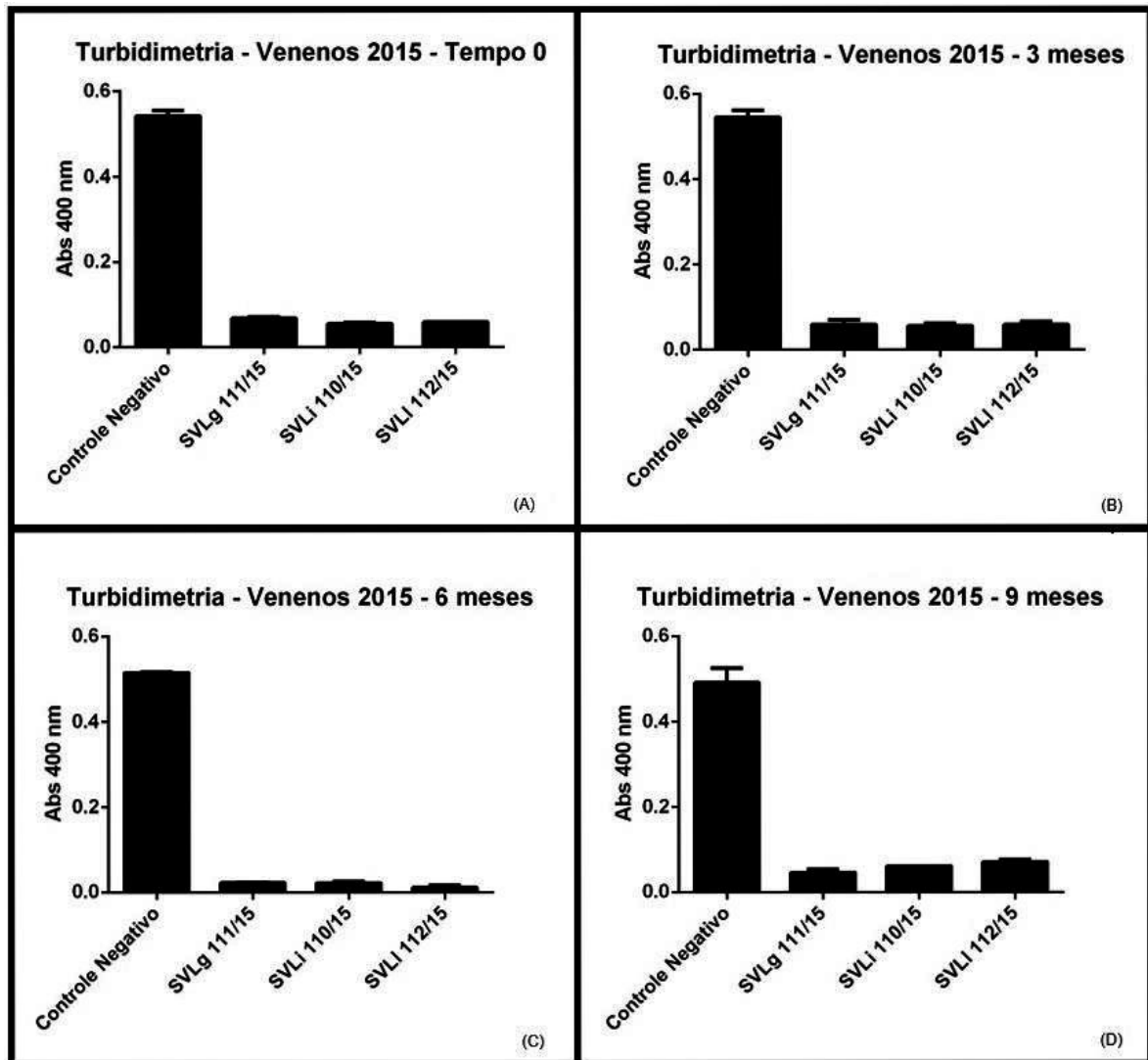
A fim de avaliar a atividade hialuronidásica dos diferentes venenos produzidos pelo CPPI, optou-se pela realização do ensaio de turbidimetria, conforme descrição

contida na seção 4. Material e Métodos. Foram analisados os tempos 0 (em seguida à produção), 3 meses, 6 meses e 9 meses após a produção dos venenos de 2015 e tempo 0 dos venenos obtidos em 2016. Todos os venenos, tanto os preparados em 2015 quanto os de 2016, apresentaram atividade hialuronidásica em todos os períodos analisados.

Foram observadas diferenças estatisticamente significativas na comparação entre os venenos com os controles negativos em todos os tempos observados (GRÁFICOS 4 E 5).

Todas as análises estatísticas foram conduzidas pelo método One-way ANOVA.

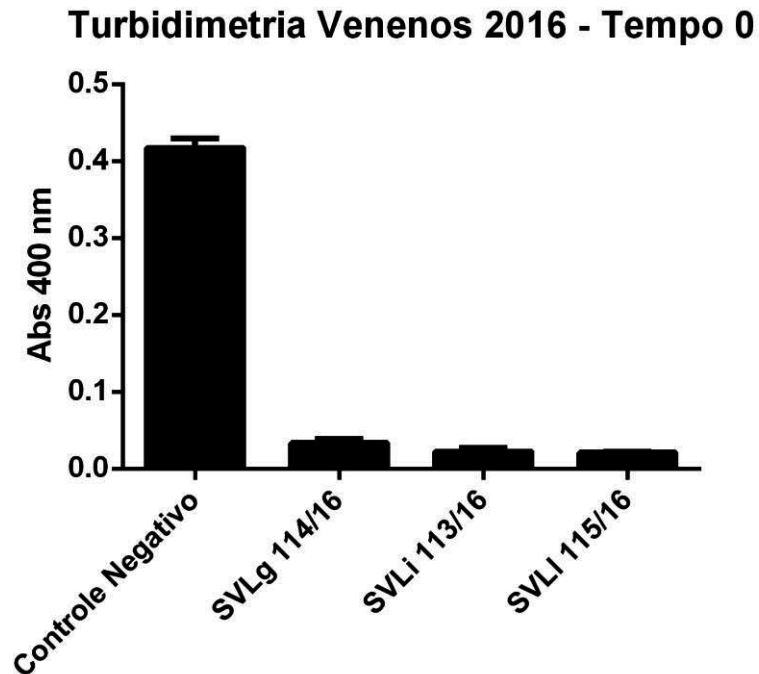
GRÁFICO 4 - ENSAIO DE TURBIDIMETRIA PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE HIALURONIDÁSICA DOS VENENOS LOXOSCÉLICOS PRODUZIDOS PELO CPPI EM 2015 (SVLg 111/15, SVLI 110/15 e SVLI 112/15) nos Tempos 0, 3 meses, 6 meses e 9 meses pós-produção.



Após incubação das soluções de venenos com ácido hialurônico durante 16 horas a 37 °C, e posterior adição de cetavlon 2,5% com NaOH 2% às soluções incubadas, a fim de sedimentação das moléculas de ácido hialurônico não degradadas as absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro a 400 nm. Todos os venenos apresentaram atividade hialuronidásica. Análise estatística realizada por Ordinary One-way ANOVA. (A) $p = 0,0003$; (B) $p < 0,0001$; (C) $p < 0,0001$ e (D) $p = 0,0021$.

FONTE: O AUTOR (2016)

GRÁFICO 5 – ENSAIO DE TURBIDIMETRIA PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE HIALURONIDÁSICA DOS VENENOS LOXOSCÉLICOS PRODUZIDOS PELO CPPI EM 2016 (SVLg 114/16, SVLi 113/16 E SVLI 115/16) NO TEMPO 0 (LOGO EM SEGUIDA À PRODUÇÃO).



Após incubação das soluções de venenos com ácido hialurônico durante 16 horas a 37 °C, e posterior adição de cetavlon 2,5% com NaOH 2% às soluções incubadas, a fim de sedimentação das moléculas de ácido hialurônico não degradadas as absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro a 400 nm. Todos os venenos apresentaram atividade hialuronidásica. Não foi possível determinar estatisticamente diferenças de atividades entre os venenos. Análise estatística realizada por Ordinary One-way ANOVA. $p < 0,0001$.

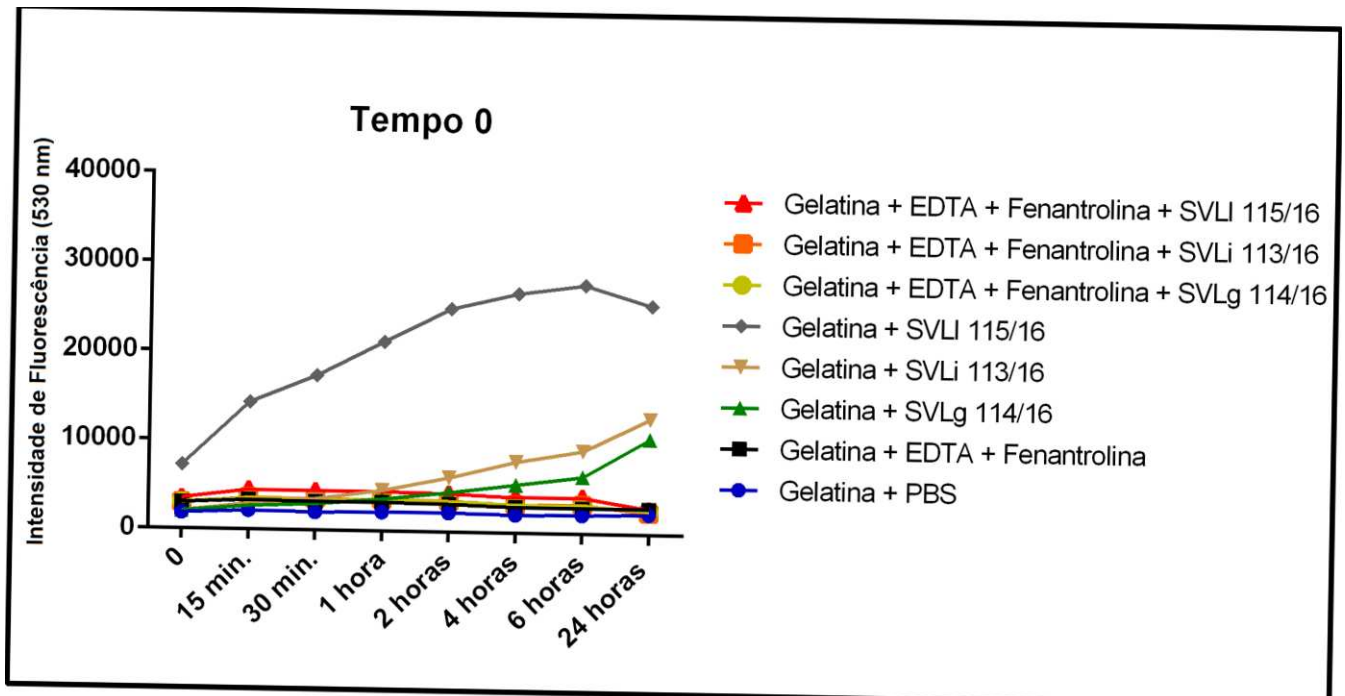
FONTE: O AUTOR (2016)

5.6 ENSAIO QUANTITATIVO DE ATIVIDADE GELATINOLÍTICA

O ensaio quantitativo de atividade gelatinolítica foi realizado com os venenos das três espécies de aranhas-marrons produzidos em 2016 e é referente ao Tempo 0 (em seguida à produção). Todos os venenos apresentaram atividade proteolítica proveniente de metaloproteases, bem como estas foram inativadas quando incubadas com EDTA e Fenantrolina, comprovando, desta forma, que enzimas desta família estão presentes nos venenos utilizados na produção do Soro Antiloxoscélico (GRÁFICO 6).

Observa-se que a atividade gelatinolítica de *L. laeta* é consideravelmente maior que a apresentada por *L. gaucho*, que apresentou a menor atividade, e *L. intermedia*.

GRÁFICO 6 – EMISSÃO DE FLUORESCÊNCIA DA PROTEÓLISE DE GELATINA PELOS VENENOS DE *LOXOSCELES* spp.



Amostras das três soluções de veneno produzidas pelo CPPI em 2016 (1 µg) foram incubadas com gelatina conjugada à fluoresceína (5 µg) na presença ou ausência de 1,10-fenantrolina e EDTA (inibidores) a 37°C durante o tempo de curso do experimento. Cada ponto medido utilizou comprimento de onda para excitação a 480 nm e detecção de emissão a 530 nm. Significância estatística $p < 0.05$
 FONTE: O AUTOR (2016)

6 DISCUSSÃO

Para a produção de um único lote de solução de veneno loxoscélico pelo CPPI são necessários de 10.000 a 12.000 aranhas de cada espécie de aranha-marrom. Cabe observar que para a composição do lote, uma mesma aranha pode ter seu veneno extraído mais de uma vez, respeitando-se o período de recuperação do animal (30 dias entre cada extração) e que o número de animais que compõe um lote de extração de Veneno Loxoscélico do CPPI está na faixa de 500 a 3.500 indivíduos. Para a produção de um lote de solução de veneno, juntam-se de dois a três lotes de extração. Tal quantitativo, aliado ao fato de que são utilizados espécimes adultos, machos e fêmeas, provenientes de várias regiões dos Estados do Paraná e de Santa Catarina, minimiza a possibilidade de expressão de características inerentes a uma determinada população ou a condições individuais, como quantidade de veneno produzido por aranha, tipo e momento de alimentação, além de fatores extrínsecos, como período do ano, que podem, eventualmente, com maior ou menor grau, exercer alguma influência na produção e composição dos venenos a serem estudados. As aranhas são capturadas em diferentes regiões, de acordo com a sua distribuição, como Orleans – SC e região (para *L. laeta*), Irati – PR e região (para *L. intermedia*) e Jacarezinho – PR e região (para *L. gaucho*).

A comparação dos perfis eletroforéticos dos três lotes de venenos estudados em gel gradiente de poliacrilamida 10-20% corados com Azul Brilhante de Coomassie e coloração monocromática de prata, referentes ao tempo 0, ou seja, logo após a sua produção pelo CPPI, 3 meses, 6 meses e 9 meses após sua produção, evidenciaram pequenas diferenças entre as espécies na sua composição proteica. Optou-se pela não realização de eletroforese bidimensional, pois ela torna-se pouco prática para a aplicação na rotina de ensaios de controle de qualidade da produção dos antígenos. Os venenos de *L. gaucho* e *L. intermedia* produzidos tanto em 2015 quanto 2016 apresentaram uma maior concentração de bandas entre 25 kDa e 35 kDa em todos os tempos analisados. Os venenos de *L. laeta* de ambos os anos também apresentam em todos os tempos bandas entre 25 kDa a 35 kDa, porém com uma predominância entre 28 kDa e 32 kDa, aproximadamente. Tais achados, vão de encontro ao que Barbaro et

al. (2005) demonstraram (faixa de 30 kDa a 35 kDa), entre outros grupo da literatura. As bandas da região de 30 kDa a 35 kDa correspondem às toxinas dermonecróticas (CHAIM *et al.*, 2006; GREMSKI *et al.*, 2014) e metaloproteases (TREVISAN-SILVA *et al.*, 2013). Bandas na região de 5-10 kDa (toxinas inseticidas) também foram identificadas em todos os venenos (MATSUBARA *et al.*, 2013) das diferentes espécies analisadas e em todos os tempos, assim como na altura entre 66,2 kDa (VEIGA *et al.*, 2000), estas especialmente quando as corridas foram realizadas com massa total de proteína de 10 µg e 25 µg. Outras bandas características dos venenos de *Loxosceles spp.* podem ser identificadas na altura de 45 kDa, sugerindo a presença e conservação de hialuronidase nas amostras estudadas (DA SILVEIRA *et al.*, 2007). Estas faixas são notadas quando se utiliza a coloração monocromática de prata e foi possível identificá-las em todos os venenos durante os seis meses de análise em que se lançou mão deste método de coloração. A impregnação por prata é o método não radioativo mais sensível para a detecção de proteínas em gel de poliacrilamida podendo revelar bandas com concentração proteica em torno de 1 ng (HARLOW & LANE, 1988). Entretanto, apesar de mais sensível, o método de coloração monocromática de prata não foi utilizado nas análises de nove meses dos venenos de 2015 e do Tempo 0 dos venenos de 2016, pois a qualidade visual dos géis não se mostrou satisfatória, muito em parte pela dificuldade de padronização no método de revelação com a impregnação desigual de prata das bandas (FIGURAS 10, 13 E 16).

A maior parte das bandas que compõem o perfil protéico dos venenos loxoscélicos ainda pode ser visualizada nas corridas em que se utilizam 25 µg de massa e corados pelo método de Azul de Coomassie. Na análise dos géis corados por esta última técnica, pôde-se observar em *L. gaucho* produzido em 2015 que as bandas próximas a 25 kDa e os peptídeos de baixa massa (entre 5 kDa e 10 kDa) aparentemente diminuíram a intensidade com o passar do tempo (FIGURA 8). Já o veneno de *L. intermedia* produzido em 2015 revelou que as bandas entre 19 kDa e 20 kDa aparentaram se tornar mais evidentes ao longo do tempo. Por outro lado, bandas entre 5 kDa e 10 kDa tornaram-se menos nítidas neste veneno conforme o tempo pós-produção aumentou. Além delas, bandas próximas à região de 66.2 kDa também

tornaram-se consideravelmente menos perceptíveis nos tempos 3 meses, 6 meses e 9 meses (FIGURA 11).

No perfil eletroforético do veneno de *L. laeta* fabricado em 2015 é possível notar que a banda de 34 kDa torna-se menos nítida conforme o tempo pós-produção aumenta. Esta mesma observação pode ser feita quando se analisam as bandas entre 5 kDa e 10 kDa, que aparentam perder a intensidade (FIGURA 14). Estas alterações nos perfis dos três venenos ao longo do tempo podem sugerir perdas por degradação nas soluções protéicas durante o período de armazenamento, de maneira similar ao constatado com as metaloproteases do tipo astacina, que são endopeptidases e podem passar por autocatálise, como observado no processo de ativação destas enzimas, no qual o pro-peptídeo é hidrolizado pelo sítio ativo das astacinas (MORGON *et al.*, 2016). Apesar deste fato, podemos considerar que não há total descaracterização do imunógeno, visto que a maior parte do seu perfil original é mantida e que suas propriedades bioquímicas e enzimáticas se mantêm presentes, como observado nos resultados dos demais ensaios.

Visando um enriquecimento dos perfis eletroforéticos dos venenos estudados, a análise da intensidade das bandas de 34 kDa de *L. gaucho* e *L. intermedia* (FIGURAS 8 E 11, respectivamente) e de 32 kDa de *L. laeta* (FIGURA 14) foi realizada com o auxílio do programa Quantity One 1-D Analysis Software da Bio-Rad. Toxinas importantes no acidente loxoscélico, como as fosfolipases-D e as metaloproteases, podem ser encontradas na faixa de bandas escolhidas. Além disso, o intervalo entre 30 kDa e 35 kDa costuma ser o mais evidente em eletroforeses de venenos de aranhas-marrons. Ao longo dos nove meses de análise dos venenos de 2015, a intensidade média das bandas citadas permaneceu entre 84.134 e 94.838 D.O. por pixel. Os venenos produzidos em 2016 foram estudados apenas no Tempo 0 e apresentaram intensidade média muito próxima àquela dos venenos produzidos em 2015 no mesmo tempo de análise.

A atividade imunogênica dos três venenos produzidos pelo CPPI também foi um dos aspectos analisados em diferentes tempos, porém tal estudo foi realizado apenas nos antígenos produzidos em 2016. Verificou-se a capacidade de reconhecimento destes imunógenos frente aos soros específicos contra cada espécie de *Loxosceles*

estudada proveniente de coelhos e frente aos Soros Antiaracnídico (Instituto Butantan – Lote 1306121) e Antiloxoscélico (CPPI – Lote S01/14).

Todos os venenos foram identificados pelos diferentes soros em todos os tempos de análise, com variações discutidas a seguir.

Quando se utilizou soro específico frente ao veneno de *L. gaucho* proveniente de coelhos no Tempo 0 (em seguida à produção) (FIGURA 17), pôde-se observar bandas entre 33 kDa e 35 kDa; já com a utilização de soro anti-*L. intermedia* houve um aparecimento de bandas entre 31 kDa e 35 kDa, enquanto o soro específico anti-*L. laeta* mostrou bandas entre 30 kDa e 35 kDa. O aparecimento de mais bandas imunorreativas e de maior intensidade no intervalo de 30 kDa a 34 kDa no veneno de *L. gaucho* quando testado com soro anti-*L. laeta* sugere-nos duas hipóteses que podem se complementar: a primeira, de que os coelhos utilizados na produção do soro em questão responderam de maneira mais eficaz frente ao desafio impelido pela inoculação dos venenos, sendo, portanto, uma condição particular dos indivíduos; a segunda, já comprovada por estudos (BARBARO *et al.*, 1996; BARBARO *et al.* 1994), é a conservação de epítomos imunogênicos entre as diferentes espécies de aranhas-marrons.

O veneno de *L. intermedia*, quando confrontado com os soros específicos (provenientes de coelhos) de cada aranha-marrom de importância médica no Brasil, no Tempo 0 (FIGURA 18), apresentou padrão de reconhecimento semelhante ao anteriormente descrito para *L. gaucho*. Quando utilizado o soro específico contra *L. intermedia*, no entanto, bandas abaixo de 30 kDa foram identificadas. Sugere-se que tal fato tenha ocorrido devido à especificidade do soro em questão. Na análise do veneno frente aos soros de *L. gaucho* e *L. laeta*, houve aparecimento de bandas entre 33 kDa e 35 kDa e 30 kDa e 35 kDa, respectivamente. Igualmente ao observado e explicado no veneno de *L. gaucho*, o veneno de *L. intermedia* apresentou bandas mais intensas quando da utilização do soro específico para *L. laeta*

Da mesma forma, o veneno de *L. laeta* foi testado no Tempo 0 frente aos soros produzidos por coelhos contra cada espécie estudada (FIGURA 19). Todos os soros reconheceram um padrão similar e bem característico, com bandas entre 30 kDa e 35 kDa. Cabe observar que quando foi utilizado soro específico contra *L. laeta* as bandas

aparentaram ter uma intensidade maior se comparado aos demais soros, . Propõe-se que esta circunstância possa ser explicada devido à especificidade do soro. Nota-se também, que as bandas de 31 kDa e 32 kDa mostraram-se bem evidentes quando o veneno de *L. laeta* foi exposto ao soro contra *L. intermedia*.

O comportamento dos venenos foi igualmente analisado três meses após sua produção frente ao Soro Antiaracnídico produzido no Instituto Butantan (FIGURA 20). Este soro apresenta anticorpos específicos contra os venenos de *L. gaucho*, *Tityus serrulatus* (escorpião amarelo) e *Phoneutria nigriventer* (aranha armadeira). Todos os venenos foram reconhecidos pelo soro em questão, especialmente na faixa de 30 kDa a 35 kDa. Em *L. intermedia* observam-se que bandas abaixo de 30 kDa (a partir de 22 kDa) também foram identificadas, além das bem evidentes vistas na faixa previamente citada. Diferentemente, as bandas evidenciadas em *L. laeta* mostraram-se pouco menos intensas que nas outras duas espécies, encontrando-se entre 28 kDa e 34 kDa. Sugere-se que a grande intensidade da banda de 35 kDa vista em *L. gaucho* seja devido à especificidade do soro em questão.

A análise de 3 meses pós-produção dos venenos também se deu com a utilização do Soro Antiloxoscélico produzido pelo CPPI, que contém anticorpos específicos frente os venenos de *L. gaucho*, *L. intermedia* e *L. laeta* (FIGURA 21). Todos os venenos continuaram a ser reconhecidos no intervalo de 30 kDa a 35 kDa, mesmo após o período de armazenamento. Os venenos de *L. gaucho* e *L. intermedia* apresentaram bandas bem evidentes na faixa de 35 kDa e outras de menor intensidade abaixo desta massa. Já o veneno de *L. laeta* revelou apenas uma banda de intensidade mais baixa na altura de 35 kDa. Supõe-se que o menor número de bandas evidenciadas pelo Soro Antiloxoscélico possa ser devido a uma possível perda/degradação de proteínas dos venenos durante os três meses de armazenamento, desta forma, expondo menos epítomos ao soro em questão. Tal fato pode ser corroborado a partir do que foi observado nos perfis eletroforéticos e de outros dados analisados nos demais experimentos discutidos nesta dissertação. Sugere-se, igualmente, que intensidades desiguais de bandas reveladas também podem existir devido à uma possível diferença na concentração de anticorpos presentes nos soros.

As evidências demonstradas pelos ensaios imunológicos de Western-blotting vão ao encontro do que já foi previamente proposto pela literatura: de que a região mais reativa e imunogênica aos antivenenos encontra-se no intervalo de 32 kDa a 35 kDa, não por acaso, área em que estão presentes as moléculas pertencentes à família das fosfolipases-D (APPEL *et al.*, 2008; DA SILVEIRA *et al.*, 2007b; BARBARO *et al.*, 2005; BARBARO *et al.*, 1996; BARBARO *et al.* 1994).

As reações de imunogenicidade cruzada também foram constatadas em todas as análises, independentemente do tempo ou espécie e corroboram com os achados de BUCH *et al.* (2015), que demonstraram uma conservação biológica entre os antígenos (venenos) das três espécies de aranhas-marrons (*L. gaucho*, *L. intermedia* e *L. laeta*) devido à semelhança de epítomos, presença de diferentes isoformas de toxinas de uma mesma família e proximidade filogenética entre as espécies. Sendo assim, podemos afirmar que há uma conservação de epítomos dentro do processo de extração e preparo dos venenos de aranhas-marrons do CPPI, o que é de fundamental importância para a imunização dos equinos, que produzirão, desta forma, anticorpos frente a estes antígenos.

Estudos demonstraram que a “toxina dermonecrótica” das aranhas do gênero *Loxosceles*, a fosfolipase-D, é capaz de degradar não apenas esfingolipídios, mas também glicerofosfolipídios, gerando ceramida-1-fosfato (C1P) ou ácido lisofosfatídico (LPA) (CHAIM *et al.*, 2011b, VUITIKA *et al.*, 2013). Estes compostos ativam diferentes vias de sinalização em diferentes células, o que, como consequência, pode levar às alterações patofisiológicas características do acidente causado pelo veneno de *Loxosceles*, como resposta inflamatória, aumento da permeabilidade vascular, agregação plaquetária, hemólise e nefrotoxicidade (CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2011; WILLE *et al.*, 2013). Atualmente, tem-se o conceito de que as fosfolipases-D, também conhecidas como toxinas dermonecróticas, formam uma família de toxinas nas aranhas-marrons, com diferentes isoformas (VUITIKA *et al.*, 2013), que no contexto do acidente agem de forma sinérgica entre moléculas da mesma família si e outros componentes do veneno, contribuindo para o espalhamento das diferentes toxinas no organismo e a gravidade dos achados clínicos (KALAPOTHAKIS *et al.*, 2007).

As isoformas das toxinas pertencentes à família das fosfolipases-D encontradas no veneno de *Loxosceles spp.* vêm sendo identificadas e estudadas por diversos grupos de pesquisa. Há na literatura, inúmeros exemplos de trabalhos realizados com tais moléculas na sua forma recombinante, como por exemplo, as provenientes de *L. intermedia* (LiRecDT1, LiRecDT2, LiRecDT3, LiRecDT4, LiRecDT5, dentre outras), *L. gaucho*, *L. reclusa* etc demonstrando que elas, por si só, podem reproduzir a maior parte dos efeitos e alterações vistos em envenenamentos experimentais ou não causados pelo veneno total (GREMSKI *et al.*, 2014).

O perfil de transcrição da glândula de veneno de *L. intermedia* obtido através da construção de uma livraria de cDNA mostrou que membros da família da fosfolipase-D representam 20,2% do total de transcritos que codificam toxinas (GREMSKI *et al.*, 2010).

Sendo assim, e levando-se em consideração que esta é uma das principais famílias de toxinas do veneno de *Loxosceles spp.*, procedeu-se à detecção de atividade fosfolipásica dos venenos produzidos pelo CPPI, conforme metodologia descrita na seção “Material e Métodos”. Foram analisados os tempos 0 (logo após a produção da solução), 3 meses, 6 meses e 9 meses pós-produção dos venenos produzidos em 2015 e tempo 0 dos venenos obtidos em 2016. Constatou-se presença de atividade fosfolipásica em todos os tempos analisados, para todos os venenos, em ambos os anos de produção. Todos os venenos apresentaram diferença estatisticamente significativa em todos os tempos analisados quando comparados com os controles negativos. estatisticamente significativas entre as atividades dos venenos dentro de um mesmo tempo estudado. A presença de atividade fosfolipásica vai de encontro ao que já foi demonstrado na literatura por BARBARO *et al.* (2005) e BINFORD e WELLS (2003), que também identificaram a ação destas enzimas em diferentes espécies de *Loxosceles*. Esta é primeira vez que se atesta a presença de atividade enzimática em um veneno nove meses após sua extração.

Dada a importância das toxinas dermonecróticas nos acidentes loxoscélicos e na produção dos soros antiveneno, as atividades de uma mesma espécie foram avaliadas em um único gráfico ao longo do tempo. Para tal, foi obtida a razão entre a fluorescência da atividade fosfolipásica de uma espécie em um dado tempo pela

fluorescência do controle negativo naquele mesmo período analisado. Os resultados destas observações são de grande relevância principalmente quando se leva em consideração que um dos métodos de controle de qualidade empregado pelo CPPI atualmente na produção dos venenos baseia-se na determinação de sua potência. Isto se dá através da quantificação da massa do veneno de cada espécie de aranha-marrom capaz de provocar uma lesão de 1cm² na porção interna da orelha de coelhos.

De acordo com os dados obtidos observou-se que há uma diferença estatisticamente significativa entre as atividades de todas as espécies quando comparam-se os tempos 3, 6 e 9 meses com o Tempo 0. Da mesma forma, na comparação entre os tempos 3 meses e 6 meses, e 3 meses e 9 meses, todas as espécies apresentaram diferenças significativas. Diferentemente, quando comparados os tempos 6 meses e 9 meses, nenhuma espécie revelou diferença estatisticamente significativa, evidenciando uma estabilidade neste período (GRÁFICO 3). Apesar da diminuição vista no GRÁFICO 3, tal fato não pode ser considerado como fator de exclusão ou não utilização dos venenos, durante o período estudado, para processos de imunização de equinos produtores de soro, uma vez que, conforme visto nas GRÁFICOS 1 e 2, as fosfolipases ainda se mostram presentes e ativas, sendo capazes, portanto, de estimular o sistema imune de cavalos para a produção de anticorpos específicos frente a estas toxinas. Contudo, em ensaios de controle de qualidade para determinação de potência dos venenos, os dados aqui levantados devem ser levados em consideração, uma vez que, teoricamente, seria necessária uma massa maior de veneno que esteja estocado com três meses ou mais pós-produção para causar um efeito dermonecrótico similar ao observado quando se utiliza um veneno recém-produzido.

A fim de avaliar o comportamento da degradação de gelatina dos três venenos de *Loxosceles* ao longo de um período de armazenamento, optou-se pela realização de zimograma contendo gelatina copolimerizada ao gel eletroforético, conforme descrito na seção “Material e Métodos”.

O zimograma referente ao Tempo 0 dos venenos de 2015 (FIGURA 22) foi realizado cuba PROTEAN II xi Cell da Bio-Rad (gel com aproximadamente 16 cm x 16 cm). Nesta análise, visando uma comparação do poder de degradação dos venenos

produzidos pelo CPPI, foi realizada também a extração de venenos de *L. intermedia* mantidas pelo Laboratório de Matriz Extracelular e Biotecnologia de Venenos - LME do Departamento de Biologia Celular da UFPR. Os venenos destas aranhas foram extraídos no dia da corrida do gel e solubilizados em PBS. As massas utilizadas foram de 3 µg e 20 µg, enquanto que para os venenos do CPPI foram utilizados 20 µg de cada veneno. Todos os venenos apresentaram atividade proteásica e degradaram gelatina, em bandas entre 18 kDa e 32 kDa. Bandas de degradação discretas foram observadas em *L. gaucho* entre 18 kDa e 31 kDa. Com relação à *L. intermedia* observou-se que o veneno extraído de animais pertencentes à UFPR no dia da corrida do gel (especialmente a linha com massa de 20 µg) apresentou um padrão de degradação similar àquele produzido pelo veneno preparado no CPPI, com bandas entre 20 kDa e 32 kDa, porém com uma maior intensidade de degradação, principalmente na região por volta de 26 kDa e 32 kDa. Especula-se que tal diferença de atividade possa se dar pelo método de processamento do veneno no CPPI após a extração, que envolve sua dessecação e posterior solubilização. A literatura apresenta padrões de degradação similares ao observado na linha correspondente a *Li* LME 3 µg (TREVISAN-SILVA *et al.*, 2010). Já o veneno de *L. laeta* produzido pelo CPPI apresentou três bandas de degradação no gel com maior área quando comparado às outras espécies, entre 23 kDa e 31 kDa.

Os zimogramas referentes aos tempos 3 meses e 6 meses pós-produção dos venenos produzidos em 2015 (FIGURA 22) foram preparados em cubas Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell (tamanho do gel: aproximadamente 10 cm x 7 cm). Acredita-se que por este fato, foram perdidos alguns detalhes do perfil eletroforético, tais como a visualização de mais bandas em uma região de massa específica. Contudo, ainda é possível perceber a preservação atividade gelatinolítica em todos os venenos em ambos os tempos, especialmente nas faixas entre 30 kDa e 33 kDa.

O ensaio referente a nove meses pós-produção dos venenos de 2015 (FIGURA 22) voltou a ser realizado em cuba PROTEAN II xi Cell da Bio-Rad (aproximadamente 16 cm x 16 cm). Os padrões de atividades dos venenos são similares àqueles vistos no Tempo 0, onde as três espécies apresentaram degradação de gelatina, entre 18 kDa e

32 kDa. Contudo, *L. gaucho* parece ter diminuído a intensidade de degradação, exceto por uma banda um pouco mais evidente na altura de 18 kDa. *L. intermedia* continuou a apresentar bandas entre 26 kDa e 32 kDa, porém as faixas próximas a 20 kDa percebidas no Tempo 0, neste caso aparentam estar bem diminuídas. Por fim, *L. laeta* manteve seu perfil inicial, com bandas entre 23 kDa e 31 kDa.

O zimograma relativo ao Tempo 0 dos venenos produzidos em 2016 (FIGURA 23) foi igualmente realizado em gel de 16 cm x 16 cm. A título de comparação também foram analisados neste mesmo ensaio o poder de degradação do veneno de *L. gaucho* extraído no dia do experimento e diluído em PBS, e aquele de *L. gaucho* produzido em 2015 pelo CPPI. Foi possível observar que tanto o veneno de *L. gaucho* produzido em 2015 pelo CPPI quanto o da mesma espécie produzido em 2016 apresentaram menos bandas de degradação e com menor intensidade, quando comparados com o veneno de *L. gaucho* extraído no dia do experimento. Nos três casos, as faixas se apresentam entre 18 kDa e 31 kDa, aproximadamente. Especula-se, assim como ocorreu na análise do Tempo 0 de 2015 com os venenos de *L. intermedia*, que tal fato possa ocorrer devido ao processo de preparo dos venenos do CPPI envolverem sua dessecação e posterior solubilização. Já os venenos de *L. intermedia* e *L. laeta* produzidos pelo CPPI em 2016 apresentaram um padrão similar àqueles demonstrados nas análises dos venenos produzidos em 2015, com bandas com maior intensidade em *L. laeta*, entre 23 kDa e 31 kDa, aproximadamente, e bandas em torno de 26 kDa a 32 kDa para *L. intermedia*.

Conforme já citado, acredita-se que um maior espaçamento entre as bandas e um maior número destas pôde ser visto nos géis referentes ao Tempo 0 e 9 meses de 2015 e Tempo 0 de 2016 devido ao fato de que nestes experimentos foram utilizados uma cuba grande, capaz de abrigar géis de aproximadamente 16 cm x 16 cm, fazendo, desta forma, com que maiores detalhes dos perfis de degradação de gelatina de cada espécie fossem notados.

Em todos os casos, independente do tamanho dos géis e do tempo analisado, foi possível notar a seguinte escala crescente de degradação: *L. gaucho* < *L. intermedia* < *L. laeta*.

Feitosa *et al.* (1998) demonstraram atividade gelatinolítica no veneno de *L. intermedia* por volta de 35 kDa, já Barbaro *et al.* (2005) identificaram proteases em diferentes espécies de aranhas do gênero *Loxosceles* principalmente abaixo da região 32 kDa-35 kDa. Tais diferenças podem ser devidas a protocolos experimentais, método de obtenção e processamento dos venenos, massa de proteína utilizada, número de animais e mobilidade eletroforética.

O espalhamento gravitacional é uma das características mais marcantes no acidente loxoscélico, sendo acompanhado de eritema, coloração violácea e escara e, geralmente, manifesta-se em questão de horas ou até alguns dias após a picada. Na análise histológica da região afetada, observam-se células inflamatórias nos vasos sanguíneos e regiões próximas, com dispersão até a derme. Além disso, nota-se degeneração das paredes dos vasos, hemorragia, edema, desorganização das fibras colágenas e necrose (FERRER *et al.*, 2013). Uma das moléculas constituinte dos venenos loxoscélicos e que possui papel fundamental no espalhamento gravitacional da lesão é a hialuronidase, expondo novos sítios de ligação nos tecidos para outras toxinas que compõem o veneno atuarem, e não apenas o sítio da picada, mas também na região próxima. A fim de averiguar a atividade hialuronidásica dos venenos produzidos pelo CPPI, ensaios para determinação desta atividade foram realizados (ensaio de turbidimetria), conforme descrito na seção Materiais e Métodos. Foram analisados os venenos produzidos pelo CPPI em 2015 das três espécies utilizadas no processo produtivo do Soro Antiloxoscélico distribuído ao SUS nos tempos 0, 3 meses, 6 meses e 9 meses pós-produção (GRÁFICO 4).

Os venenos obtidos em 2016 foram estudados no tempo 0 (GRÁFICO 5). Através da absorvância é possível concluir que todos os venenos produzidos dentro dos padrões do CPPI apresentam atividade hialuronidásica em todos os tempos analisados quando comparados com o controle negativo. Não foi possível detectar diferenças significativas entre as atividades dos três venenos dentro de cada tempo estudado. Tal resultado demonstra que as soluções de veneno produzidas pelo CPPI utilizadas para imunização de equinos dentro do processo produtivo do soro antiloxoscélico, apresentam, no momento de sua produção e até durante nove meses de armazenamento a $-25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5$, hialuronidases na sua forma ativa, preservando um

dos principais componentes do veneno total de *Loxosceles spp.* Estes achados estão de acordo com o que já foi previamente demonstrado na literatura por FERRER *et al.* (2013) e DA SILVEIRA *et al.* (2007), em trabalhos que demonstraram a presença de atividade hialuronidásica em aranhas do gênero *Loxosceles spp.*

Venenos são misturas complexas de moléculas bioativas, como fosfolipases, hialuronidases, peptídeos e proteases, que agindo de maneira aditiva ou sinérgica acabam por gerar ou servir como gatilho para os efeitos nocivos que são encontrados clinicamente (GREMSKI *et al.*, 2014). Muitos animais possuem toxinas proteolíticas que vêm sido descritas como responsáveis por vários eventos consequentes aos envenenamentos, como edema, hemorragia e necrose (LUCIANO *et al.*, 2004; VEIGA *et al.*, 2001b, FOX e BJARNASON, 1995). Dentre estas, sabe-se que metaloproteases provenientes do veneno total de *L. intermedia* podem degradar tanto a cadeia A quanto a cadeia B de fibronectina em porções menores, evento que é inibido por fenantrolina (DA SILVEIRA *et al.*, 2007c, FEITOSA *et al.*, 1998).

Levando-se em consideração que a fibronectina é uma proteína que possui várias funções, dentre elas a participação na agregação plaquetária e a manutenção da estabilidade de vasos sanguíneos, sugere-se que eventos identificados em áreas próximas à região da picada, como hemorragia local, adesão plaquetária imperfeita e dificuldades na cicatrização, estejam relacionados com a atividade proteolítica do veneno. Outro alvo de degradação das metaloproteases dos venenos das três espécies de aranhas-marrons de importância médica no Brasil é o fibrinogênio (DA SILVEIRA *et al.*, 2007c, FEITOSA *et al.*, 1998), o que também pode ter grande influência na hemorragia pós-acidente. Outros substratos degradados pela ação do veneno de *L. intermedia* são a entactina e o cordão proteico de heparan sulfato (VEIGA *et al.*, 2001b, VEIGA *et al.*, 2000b), dois componentes das membranas basais, essenciais na estabilidade de vasos sanguíneos e adesão plaquetária. Sendo assim, com as evidências apontadas na literatura, sugere-se que a proteólise causada pelos venenos de *Loxosceles spp.*, em especial pela ação das metaloproteases, estaria diretamente relacionada com alguns achados clínicos em casos de envenenamentos, como hemorragia no local da picada e aumento da permeabilidade vascular. Esta última, associada à degradação de componentes da matriz extracelular, possibilitaria o

espalhamento de outras toxinas presentes no veneno no organismo. Com a degradação de componentes da matriz extracelular, as proteases do veneno das aranhas-marrons possibilitariam o espalhamento e ação de outros componentes tóxicos no organismo (CHAIM *et al.*, 2011; TREVISAN-SILVA *et al.*, 2010).

Em vista disso, realizou-se o Ensaio Quantitativo de Atividade Gelatinolítica. A atividade dos três venenos loxoscélicos produzidos em 2016 pelo CPPI foram determinadas durante um período de 24 horas, no seu Tempo 0, isto é, logo em seguida à sua produção (GRÁFICO 6). Todos os venenos apresentaram capacidade de degradação de gelatina para o tempo analisado. *L. laeta* apresentou maior intensidade de fluorescência, o que indica maior degradação de gelatina, portanto, uma maior atividade de metaloproteases. Tais dados correspondem aos encontrados por TREVISAN-SILVA *et al.* (2013). Intensidades de fluorescência consideravelmente menores foram observadas nos venenos de *L. intermedia* e *L. gaucho*. Contudo, diferentemente do apresentado por TREVISAN-SILVA *et al.* (2013), onde os venenos destas duas espécies apresentaram valores similares, a solução de veneno de *L. intermedia* produzida pelo CPPI exibiu maior fluorescência que a de *L. gaucho*, sugerindo uma maior preservação e conseqüente maior atividade de metaloproteases dentro do processo de obtenção das soluções de veneno para a primeira espécie. Tais dados estão em consonância com os zimogramas realizados previamente, nos quais se pôde observar uma maior ação proteolítica causada pelo veneno de *L. laeta*, seguido por *L. intermedia* e *L. gaucho*.

A adição de quelantes bivalentes, como EDTA e 1,10-fenantrolina, inativou a ação gelatinolítica de todos os venenos, como já reportado em outros estudos (FEITOSA *et al.*, 1998), uma vez que sua ação se dá diretamente nas metaloproteases.

Desta maneira, comprova-se que enzimas metaloproteásicas mantêm-se presentes no veneno utilizado para a produção do Soro Antiloxoscélico, mantendo suas características originais, sendo um indicativo de que o processo de extração, preparo e armazenamento destes imunógenos se dá de maneira adequada.

7 CONCLUSÕES

- As soluções de venenos das três espécies de aranhas-marrons produzidas pelo CPPI e utilizadas como imunógenos em equinos visando a produção de Soro Antiloxoscélico para uso humano distribuído ao SUS, apresentam os perfis protéicos e atividades enzimáticas no momento da sua produção (Tempo 0) e até nove meses após, quando conservados em freezer a $-25\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$.

- Os perfis eletroforéticos em gel gradiente de poliacrilamida (10% a 20%) apresentaram pequenas diferenças entre as espécies e revelaram discretas perdas de intensidade de algumas bandas ao longo dos nove meses de análise, porém o perfil protéico de uma forma geral mostrou-se estável.

- Os venenos das três espécies de aranhas-marrons analisados mostraram-se imunogênicos e capazes de serem neutralizados do momento de sua produção e até três meses após, por soros específicos contra cada espécie de aranhas-marrons estudadas provenientes de coelhos, pelo Soro Antiaracnídico e pelo Soro Antiloxoscélico, bem como se evidenciou imunogenicidade cruzada, sugerindo a bioconservação de epítomos entre as espécies.

- A atividade proteásica evidenciada por zimograma em gelatina revelou perfis de degradação distintos entre as espécies, com a seguinte ordem crescente de ação proteolítica: *L. gaucho* < *L. intermedia* < *L. laeta*. As enzimas mostraram-se ativas durante os nove meses estudados.

- A atividade fosfolipásica mostrou-se presente em todos os tempos analisados em todas as espécies, porém constatou-se uma queda na sua ação a partir dos três meses pós-produção. Ainda assim, tal fato não é considerado determinante para a não utilização dos imunógenos no processo produtivo do Soro Antiloxoscélico.

- A ação hialuronidásica foi constatada em todos os venenos durante os nove meses de análise.

- Metaloproteases mostraram-se presentes e ativas no Tempo 0 dos venenos de 2016, com a seguinte ordem crescente de atividades: *L. gaucho* < *L. intermedia* < *L. laeta*.

- Os ensaios realizados demonstraram que o método de extração, preparo e armazenamento dos imunógenos utilizados pelo CPPI mantêm as principais características dos venenos de aranhas do gênero *Loxosceles* por até nove meses.

- Esta dissertação amplia os horizontes de possibilidades de ensaios realizáveis para o Controle de Qualidade dos venenos produzidos pelo CPPI e utilizados na produção do Soro Antiloxoscélico ou de qualquer outro laboratório que trabalhe com estes imunógenos. Todos se mostraram práticos e rápidos na sua execução e interpretação – o que é essencial para uma linha de produção – e englobam as principais características dos venenos de *Loxosceles spp.*

REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Farmacopeia Brasileira. 5ª Edição, 2010, Brasília.
- ANDERSEN, R. J.; CAMPOLI, J.; JOHAR, S. K.; SCHUMACHER, K. A.; ALLISON JR., E. J. Suspected Brown recluse envenomation: a case report and review of different treatment modalities. **The Journal of Emergency Medicine**. V. 41, n. 2, p. 31-37, 2011.
- APPEL, M. H.; BERTONI DA SILVEIRA, R.; GREMSKI, W.; VEIGA, S. S. Insights into brown spider and loxoscelism. **Invertebr. Surviv. J.** v. 2, p. 152-158, 2005.
- APPEL, M.H.; da SILVEIRA R.B.; CHAIM, O.M.; PALUDO, K.S.; SILVA, D.T.; CHAVES, D.M.; da SILVA, P.H.; MANGILI, O.C.; SENFF-RIBEIRO, A.; GREMSKI, W.; NADER, H.B.; VEIGA, S.S. Identification, cloning and functional characterization of a novel dermonecrotic toxin (phospholipase-D) from brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. **Biochemical et Biophysica Acta**. v.1780, p.167- 178, 2008.
- BARBARO, K. C.; EICKSTEDT, V. R. D.; MOTA, I. Antigenic cross-reactivity of venoms from medically important *Loxosceles (Aranae)* species in Brazil. **Toxicon**, v. 32, p. 113-120, 1994.
- BARBARO, K. C.; FERREIRA, M. L.; CARDOSO, D. F.; EICKSTEDT, V. R. D.; MOTA, I. Identification and neutralization of biological activities in the venoms of *Loxosceles* spiders. **Braz. J. Med. Biol. Res.** V. 29, p. 1491 – 1497.
- 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**, v. 45, n. 4, p. 489-499, 2005.
- BARBARO, K.C.; CARDOSO, J.L.C. Mecanismo de ação do veneno de *Loxosceles* e aspectos clínicos do loxoscelismo. In: CARDOSO, J.L.C. *et al. Animais Peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*. São Paulo: Sarvier, 2009. P. 176-190.
- BEDNASKI, A.V. Avaliação do perfil lipídico e proteico e caracterização dos hemócitos da hemolinfa de aranha-marrom (*Loxosceles intermedia*). 2013. 96 f. Dissertação (Mestrado Biologia Celular e Molecular) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.
- BEDNASKI, A.V.; TREVISAN-SILVA, D.; MATSUBARA, F. H.; BOIA-FERREIRA, M.; OLIVÉRIO, M. M.; GREMSKI, L. H.; CAVALHEIRO, R. P.; DE PAULA, D. M. B.; PAREDES-GAMERO, E. J.; TAKAHASHI, H. K.; TOLEDO, M. S.; NADER, H. B.; VEIGA, S. S.; CHAIM, O. M.; SENFF-RIBEIRO, A. Characterization of Brown spider

(*Loxosceles intermedia*) hemolymph: Cellular and biochemical analyses. **Toxicon**, p. 1-13, 2015.

BINFORD, G. J.; WELLS, M. A. The phylogenetic distribution of sphingomyelinase D activity in venoms of Haplogygne spiders. **Comp. Biochem. Physiol. B** v. 135, p. 25-33, 2003.

BINFORD, G. J., CALLAHAN, M. S., BODNER, M. R., RYNERSON, M. R., NUNEZ, P. B., ELLISON, C. E. e DUNCAN, R. P. Phylogenetic relationships of *Loxosceles* and *Sicarius* spiders are consistent with Western Gondwanan vicariance. **Mol Phylogenet Evol.** v. 49, p. 538-553, 2008.

BORN, G.V. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. **Nature**, v. 194, p. 927-9, 1962.

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

BRASIL. Ministério da Saúde, Portaria nº 174, de 11 de novembro de 1996. Brasil, 1996.

BRASIL. Ministério da Saúde, Resolução RDC nº 17, de 16 de abril de 2010. Brasil, 2010.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, RDC nº 50, de 20 de setembro de 2011. Brasil, 2011.

BRAZIL, V. Contribuição ao estudo do veneno ofídico: tratamento das mordeduras de cobras. **Rev. Med. São Paulo**, v. 13, p. 265-78, 1903.

BRAZIL, V. *Contribution à l'étude d'origine ophidiene*. Paris: A. Maloine, 1905.

BUCH, D.R. Toxinas loxoscélicas: estudo da conservação biológica por meio de imunoenaios. 2014. 112 f. Dissertação (Mestrado Biologia Celular e Molecular) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

BUCH, D. R.; SOUZA, F. N.; MEISSNER, G. O.; MORGON, A. M.; GREMSKI, L. H.; FERRER, V. P.; TREVISAN-SILVA, D.; MATSUBARA, F. H.; BOIA-FERREIRA, M.; SADE, Y. B.; CHAVES-MOREIRA, D.; GREMSKI, W.; VEIGA, S. S.; CHAIM, O. M.; SENFF-RIBEIRO, A. Brown spider (*Loxosceles* genus) venom toxins: Evaluation of biological conservation by immune cross-reactivity. **Toxicon**, v. 108, p. 154-166, 2015.

CAMEY, K. U.; VELARDE, D. T.; SANCHEZ, E. F. Pharmacological characterization and neutralization of the venoms used in the production of Bothropic antivenom in Brazil. **Toxicon**, v. 40, p. 501-509, 2002.

CARDOSO, D.F.; YAMAGUCHI, I.K.; DA SILVA, A.M.M. Produção de soros antitoxinas e perspectivas de modernização por técnicas de biologia molecular. In: CARDOSO, J.L.C. *et al. Animais Peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*. São Paulo: Sarvier, 2009. P. 419-431.

CENTRO DE PRODUÇÃO E PESQUISA DE IMUNOBIOLOGICOS. Procedimento Operacional Padrão 9.01.02 – Seção de Produção de Venenos – Aracnidário – Extração de veneno e manutenção de aranhas do gênero *Loxosceles*, 2012.

CENTRO DE PRODUÇÃO E PESQUISA DE IMUNOBIOLOGICOS. Procedimento Operacional Padrão 9.01.03 – Seção de Produção de Venenos – Aracnidário – Preparo da solução de veneno de aranhas do gênero *Loxosceles*, 2012.

CENTRO DE PRODUÇÃO E PESQUISA DE IMUNOBIOLOGICOS. Procedimento Operacional Padrão 9.01.01 – Seção de Produção de Venenos – Aracnidário – Coleta (captura) de aranhas do gênero *Loxosceles*, 2013.

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

CHAIM, O. M.; TREVISAN-SILVA, D.; CHAVES-MOREIRA, D.; WILLE, A. C. M.; FERRER, V. P.; MATSUBARA, F. H.; MANGILI, O. C.; DA SILVEIRA, R. B.; GREMSKI, L. H.; GREMSKI, W.; SENFF-RIBEIRO, A.; VEIGA, S. S. Brown Spider (*Loxosceles* genus) Venom Toxins: Tools for Biological Purposes. **Toxins**, v. 3, p. 309-344, 2011.

CHAIM, O. M.; DA SILVEIRA, R. B.; TREVISAN-SILVA, D.; FERRER, V. P.; SADE, Y. B.; BOIA-FERREIRA, M.; GREMSKI, L. H.; GREMSKI, W.; SENFF-RIBEIRO, A.; TAKAHASHI, H. K.; TOLEDO, M. S.; NADER, H. B.; VEIGA, S. S. Phospholipase-D activity and inflammatory response induced, by brown spider dermonecrotic toxin: Endothelial cell membrane phospholipids as targets for toxicity. **Biochim Biophys Acta**, v. 1811, p. 84-96, 2011b.

CHATZAKI, M., HORTA, C. C., ALMEIDA, M. O., PEREIRA, N. B., MENDES, T. M., DIAS-LOPES, C., GUIMARAES, G., MORO, L., CHAVEZ-OLORTEGUI, C., HORTA, M. C. e KALAPOTHAKIS, E. Cutaneous loxoscelism caused by *Loxosceles similis* venom and neutralization capacity of its specific antivenom. **Toxicon.** v. 60, p. 21-30, 2012.

CHAVES MOREIRA, D. Estudo da atividade hemolítica do veneno de *Loxosceles intermedia* (aranha marrom) e seus mecanismos moleculares. 2008. Dissertação (Mestrado Biologia Celular e Molecular) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

CHAVES MOREIRA, D.; SOUZA, F.N.; FOGAÇA, R.T.; MANGILI, O.C.; GREMSKI, W.; SENFF-RIBEIRO, A.; CHAIM, O.M.; VEIGA, S.S. The relationship between calcium and the metabolism of plasma membrane phospholipids in hemolysis induced by brown

spider venom phospholipase-D toxin. **Journal of Cellular Biochemistry**. v.112, n. 9, p. 2529-2540, 2011.

CHAVES-MOREIRA, D.; DE MORAES, F. R.; CARUSO, Í. P.; CHAIM, O. M.; SENFF-RIBEIRO, A.; ULLAH, A.; DA SILVA, L. S.; CHAHINE, J.; ARNI, R. K.; VEIGA, S. S. Potential Implications for Designing Drugs Against the Brown Spider Venom Phospholipase-D. **Journal of Cellular Biochemistry**. p. 1-13, 2016.

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

DA SILVEIRA, R.B.; DOS SANTOS FILHO, J.F.; MANGILI, O.C.; VEIGA, S.S.; GREMSKI, W.; NADER, H.B.; VON DIETRICH, C.P. Identification of proteases in the extract of venom glands from Brown spiders. **Toxicon**, v. 40, n. 6, p. 815-822, 2002.

DA SILVEIRA, R. B., PIGOZZO, R. B., CHAIM, O. M., APPEL, M. H., DREYFUSS, J. L., TOMA, L., MANGILI, O. C., GREMSKI, W., DIETRICH, C. P., NADER, H. B. e VEIGA, S. S. Molecular cloning and functional characterization of two isoforms of dermonecrotic toxin from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom gland. **Biochimie**. v. 88, p. 1241-1253, 2006.

DA SILVEIRA, R. B., CHAIM, O. M., MANGILI, O. C., GREMSKI, W., DIETRICH, C. P., NADER, H. B., VEIGA, S. S. Hyaluronidases in *Loxosceles intermedia* (Brown spider) venom are endo- β -N-acetylhexosaminidases hydrolases. **Toxicon**, 49, 758-768, 2007.

DA SILVEIRA, R. B., PIGOZZO, R. B., CHAIM, O. M., APPEL, M. H., SILVA, D. T., DREYFUSS, J. L., TOMA, L., DIETRICH, C. P., NADER, H. B., VEIGA, S. S. e GREMSKI, W. Two novel dermonecrotic toxins LiRecDT4 and LiRecDT5 from brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom: from cloning to functional characterization. **Biochimie**. v. 89, p. 289-300, 2007b.

DA SILVEIRA, R. B.; WILLE, A. C.; CHAIM, O. M.; APPEL, M. H.; SILVA, D. T.; FRANCO, C. R.; TOMA, L.; MANGILI, O. C.; GREMSKI, W.; DIETRICH, C. P.; NADER, H. B.; VEIGA, S. S. Identification, cloning, expression and functional characterization of an astacin-like metalloprotease toxin from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. **Biochem. J**. v. 406, p. 355-363, 2007c.

DANTAS, A. E.; CARMO, A. O.; HORTA, C. C. R.; LEAL, H. G.; OLIVEIRA-MENDES, B. B. R.; MARTINS, A. P. V.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C.; KALAPOTHAKIS, E. Description of Loxtox protein family and identification of a new group of Phospholipase D from *Loxosceles similis* venom gland. **Toxicon** v. 120 p. 97-106, 2016.

DE ANDRADE, S. A., PEDROSA, M. F., DE ANDRADE, R. M., OLIVA, M. L., VAN DEN BERG, C. W. e TAMBOURGI, D. V. Conformational changes of *Loxosceles* venom sphingomyelinases monitored by circular dichroism. **Biochem Biophys Res Commun**. v. 327, p. 117-123, 2005.

DE CASTRO, C.S.; SILVESTRE, F.G.; ARAUJO, S.C.; YAZBECK, G.M.; MANGILI, O.C.; CRUZ, I.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C.; KALAPOTHAKIS, E. Identification and molecular cloning of insecticidal toxins from the venom of the Brown spider *Loxosceles intermedia*. **Toxicon**, v. 44, p. 273-280, 2004.

DE OLIVEIRA-LIMA, K. C.; FARSKY, S. H. P.; LOPES, P. H.; DE ANDRADE, R. M. G.; VAN DEN BERG, C. W.; TAMBOURGI, D. V. Microcirculation abnormalities provoked by *Loxosceles* spiders' envenomation. **Toxicon**, v. 116, p. 35-42, 2016.

DIETRICH, C. P.; DIETRICH, S. M.; Electrophoretic Behavior of Acidic Mucopolysaccharides in Diamine Buffers. **Anal Biochem**, v.70, p. 645-647, 1976.

EICKSTEDT, V.R.D. Aranhas de importância médica no Brasil. In: BARRAVIEIRA, B., **Venenos animais: uma visão integrada**, Rio de Janeiro, EPUC, p. 151-172, 1994.

ELDRIDGE, B. F.; EDMAN, J. D. Medical Entomology. Springer Netherlands: Berlin, Alemanha, 2004.

FEITOSA, L.; GREMSKI, W.; VEIGA, S.S.; ELIAS, M.C.; GRANER, E.; MANGILI, O.C.; BRENTANI, R.R. Detection and characterization of metalloproteinases with gelatinolytic, fibronectinolytic and fibrinogenolytic activities in Brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. **Toxicon**, v. 36, n. 7, p. 1039-1051, 1998.

FERREIRA, M. L.; MOURA-DA-SILVA, A. M.; MOTA, I. Neutralization of different activities of venoms from nine species of *Bothrops* snakes by *Bothrops jararaca* antivenom. **Toxicon**, v. 30, n. 12, p. 1591-1602, 1992.

FERRER, V. P., DE MARI, T. L., GREMSKI, L. H., TREVISAN SILVA, D., DA SILVEIRA, R. B., GREMSKI, W., CHAIM, O. M., SENFF-RIBEIRO, A., NADER, H. B. e VEIGA, S. S. A novel hyaluronidase from brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom (Dietrich's Hyaluronidase): from cloning to functional characterization. **PLoS Negl Trop Dis**. v. 7, p. e2206, 2013.

FIGUEIREDO, L. F. M.; DIAS-LOPES, C.; ALVARENGA, L. M.; MENDES, T. M.; MACHADO-DE-ÁVILA, R. A.; McCORMACK, J.; MINOZZO, J. C.; KALAPOTHAKIS, E.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. Innovative immunization protocols using chimeric recombinant protein for the production of polyspecific loxoscelic antivenom in horses. **Toxicon**, v. 86, p. 59-67, 2014.

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

FURLANETTO, R.S. **Estudos sobre a preparação do soro antiloxoscélico**. Tese de Livre Docência, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil. 1961.

FUTRELL, J.M. Loxoscelism. **Am. J. Med. Sci.**, v. 304, n. 4, p. 261-267, 1992.

GREMSKI, L. H.; DA SILVEIRA, R. B.; CHAIM, O. M.; PROBST, C. M.; FERRER, V. P.; NOWATZKI, J.; WEINSCHUTZ, H. C.; MADEIRA, H. M.; GREMSKI, W.; NADER, H. B.; SENFF-RIBEIRO, A.; VEIGA, S. S. A novel expression profile of the *Loxosceles intermedia* venomous gland revealed by transcriptome analysis. **Mol. Biosyst.** V. 6, p. 2403-2416, 2010.

GREMSKI, L. H., TREVISAN-SILVA, D., FERRER, V. P., MATSUBARA, F. H., MEISSNER, G. O., WILLE, A. C., VUITIKA, L., DIAS-LOPES, C., ULLAH, A., DE MORAES, F. R., CHAVEZ-OLORTEGUI, C., BARBARO, K. C., MURAKAMI, M. T., ARNI, R. K., SENFF-RIBEIRO, A., CHAIM, O. M. e VEIGA, S. S. Recent advances in the understanding of brown spider venoms: From the biology of spiders to the molecular mechanisms of toxins. **Toxicon.** v. 83, p. 91-120, 2014.

GUIMARÃES, G.; DIAS-LOPES, C.; DUARTE, C.G.; FELICORI, L.; MACHADO DE AVILA, R. A.; FIGUEIREDO, L. F. M.; DE MOURA, J.; FALEIRO, B. T.; BARRO, J.; FLORES, K.; SILVA, W.; TINTAYA, B.; YARLEQUE, A.; BONILLA, C.; KALAPOTHAKIS, E.; SALAS, C. E.; CHÁVEZ-OLORTEGUI, C. Biochemical and immunological characteristics os Peruvian *Loxosceles laeta* spider venom: Neutralization of its toxic effects by anti-loxoscelic antivenoms. **Toxicon.** V. 70, p. 90-97, 2013.

HARLOW, E.; LANE, D. (1988). **Antibodies: a laboratory manual.** 1 ed. New York: Cold Spring Harbor.

HARRIS, F.; PHOENIX, D.A.; An investigation into the ability of C-terminal homologues of *Escherichia coli* low molecular mass penicillin-binding proteins, 4,5 and 6 to undergo membrane interaction. **Biochimie,** v. 79, n. 17, p. 1-174, 1997.

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

ISBISTER, G. K.; WOODS, D.; ALLEY, S.; O'LEARY, M. A.; SELDON, M.; LINCZ, L. F. Endogenous thrombin potential as a novel method for the characterization of procoagulant snake venoms and the efficacy of antivenom. **Toxicon,** v. 56, p. 75-85, 2010.

ISBISTER, G. K. e FAN, H. W. Spider bite. **Lancet.** v. 378, p. 2039-2047, 2011.

KALAPOTHAKIS, E.; CHATZAKI, M.; GONÇALVES-DORNELAS, H.; DE CASTRO, C.S.; SILVESTRE, F.G.; LABORNE, F.V.; DE MOURA, J.F.; VEIGA, S.S.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C.; GRANIER, C.; BARBARO, K.C. The Loxtox protein family in *Loxosceles intermedia* (Mello-Leitão) venom. **Toxicon,** v. 50, n. 7, p. 938-46, 2007.

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

LAUSTSEN, A. H.; SOLÀ, M.; JAPPE, E. C.; OSCOZ, S.; LAURIDSEN, L. P.; ENGMARK, M. Biotechnological Trends in Spider and Scorpion Antivenom Development. **Toxins**, 8, 226, 2016.

LIRA, M. S.; FURTADO, M. F.; MARTINS, L. M. P.; LOPES-FERREIRA, M.; SANTORO, M. L.; BARBARO, K. C. Enzymatic and immunochemical characterization of *Bothrops insularis* venom and its neutralization by polyspecific *Bothrops* antivenom. **Toxicon**, v. 49, p. 982-994, 2007.

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

LUCAS, S.M. Aranhas de interesse médico no Brasil. In: CARDOSO, J.L.C. *et al. Animais Peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*. São Paulo: Sarvier, 2009. P. 157-165.

LUCATO JR., R. V.; ABDULKADER, R. C. R. M.; BARBARO, K. C.; MENDES, G. E.; CASTRO, I.; BAPTISTA, M. A. S. F.; CURY, P. M.; MALHEIROS, D. M. C.; SCHOR, N.; YU, L.; BURDMANN, E. A. *Loxosceles gaucho* venom-induced acute kidney injury – *in vivo* and *in vitro* studies. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. V. 5, n. 5, 2011.

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

MACHADO, L.F.; LAUGESEN, S.; BOTELHO, E.D.; RICART, C.A.O.; FONTES, W.; BARBARO, K.C.; ROEPSTROFF, P.; SOUSA, M.V. Proteome analysis of Brown spider venom: identification of loxnecrogin isoforms in *Loxosceles gaucho* venom. **Proteomics**, v. 5, p. 2167-2176, 2005.

MACHIAVELLO, A. La *Loxosceles laeta*. Causa Del arachnoidismo cutaneo, a mancha gangrenosa, de Chile. **Rev. Chil. Hist. Nat.**, v. 41, p. 11, 1937.

MÁLAQUE, C.M.S.; CASTRO-VALENCIA, J.E.; CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, F.O.S.; BARBARO, K.C.; FAN, H.W. Clinical and epidemiological features of definitive and presumed Loxoscelism in São Paulo, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 44, n. 3, p. 139-143, 2002.

MALAQUE, C. M. S.; SANTORO, M. L.; CARDOSO, J. L. C.; CONDE, M. R.; NOVAES, C. T.G.; RISK, J. Y.; FRANÇA, F. O. S.; DE MEDEIROS, C. R.; FAN, H. W. Clinical Picture and laboratorial evaluation in human loxoscelism. **Toxicon**. V. 58, p.664-671, 2011.

MALAQUE, C. M. S.; CHAIM, O. M.; ENTRES, M.; BARBARO, K. C. *Loxosceles* and Loxoscelism: Biology, Venom, Envenomation and Treatment. In: **Springer Science Spider Venoms**, 2015.

MATSUBARA, F. H.; GREMSKI, L. H.; MEISSNER, G. O.; LOPES, E. S. C.; GREMSKI, W.; SENFF-RIBEIRO, A.; CHAIM, O. M.; VEIGA, S. S. A novel ICK peptide from the *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom gland: Cloning, heterologous expression and immunological cross-reactivity approaches. **Toxicon**, v. 71, p. 147-158, 2013.

MEISSNER, G.O. Clonagem e expressão de toxina pertencente à família das notinas presente no veneno de aranh-marrom (*Loxosceles intermedia*). 2012. 71 f. Dissertação (Mestrado Biologia Celular e Molecular) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

MOENKHAUS, W.J. Contribuição para o conhecimento das aranhas de São Paulo. **Rev. Mus. Paul.** 3, p. 77-112, 1898.

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

MORGON, A. M.; BELISARIO-FERRARI, M. R.; TREVISAN-SILVA, D.; MEISSNER, G. O.; VUITIKA, L.; MARIN, B.; TASHIMA, A. K.; GREMSKI, L. H.; GREMSKI, W.; SENFF-RIBEIRO, A.; VEIGA, S. S.; CHAIM, O. M. Expression and immunological cross-reactivity of LALP3, a novel astacin-like metalloprotease from brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. **Biochimie**, 128-129, p. 8-19, 2016.

MUNIZ, E. G.; MARIA, W. S.; ESTEVÃO-COSTA, M. I.; BUHRNHEIN, P.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. Neutralizing potency of horse antiothropic Brazilian antivenom against *Bothrops* snake venoms from the Amazonian rain Forest. **Toxicon**, v. 38, p. 1859-1863, 2000.

PAES, G. N. gisele.paes@sesa.pr.gov.br Distribuição do SALOX 2012-2013. Mensagem para: bruno.antunes@sesa.pr.gov.br em 07/04/2015.

PAIXÃO-CAVALCANTE, D.; VAN DEN BERG, C.W.; GONÇALVES-DE-ANDRADE, R.M.; FERNANDES-PEDROSA, M DE F.; OKAMOTO, C.K.; TAMBOURGI, D.V. Tetracycline protects against dermonecrosis induced by *Loxosceles* spider venom. **J. Invest. Dermatol.**, v. 127, n. 6, 1410-8, 2007.

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**, v. 47, p. 844-853, 2006.

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

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

PAULI, I. Avaliação do efeito terapêutico do soro antiloxoscélico em coelhos em diferentes intervalos de tempo após exposição ao veneno da aranha-marrom (*Loxosceles intermedia*). 2008. 108 f. Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

PAULI, I.; MINOZZO, J.C.; DA SILVA, P.H.; CHAIM, O.M.; VEIGA, S.S. Analysis of therapeutic benefits of antivenin at different time intervals after experimental envenomation in rabbits by venom of the Brown spider (*Loxosceles intermedia*). **Toxicon**, v.53, p.660-671, 2009.

PLATNICK, N.I. The world spider catalog, version 16. American Museum of Natural History, 2014. <http://research.amnh.org/entomology/spiders/catalog/index.html> acesso 18/03/2015.

POH, C. H.; YUEN, R.; CHUNG, M. C. M.; KHOO, H. E. Purification and partial characterization of hyaluronidase from stonefish (*Synanceja horrida*) venom. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry** v. 101, n°1-2, p 159-163, 1992.

QUEIROZ, G. P.; PESSOA, L. A.; PORTARO, F. C. V.; FURTADO, M. F. D.; TAMBOURGI, D. V. Interspecific variation in venom composition and toxicity of Brazilian snakes from *Bothrops* genus. **Toxicon**, v. 52, p. 842-851, 2008.

RAMADA, J.S. Desenvolvimento de ensaio *in vitro* para avaliar a potência neutralizante do soro antiloxoscélico de uso terapêutico. 2012. 126 f. Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

RIBEIRO, L.A.; EICKSTEDT, V.R.D.; RÚBIO, G.B.G; KONOLSAISEN, J.F.; HANDAR, Z; ENTRES, M.; DE CAMPOS, V.A.F.P.; JORGE, M.T. Epidemiologia do acidente por aranhas do gênero *Loxosceles* Heineken & Lowe no estado do Paraná (Brasil). **Mem. Inst. Butantan**, v. 55, n. 1, p. 19-26, 1993.

SADE, Y. B.; BÓIA-FERREIRA, M.; GREMSKI, L. H.; DA SILVEIRA, R. B.; GREMSKI, W.; SENFF-RIBEIRO, A.; CHAIM, O. M.; VEIGA, S. S. Molecular cloning, heterologous expression and functional characterization of a novel translationally controlled tumor protein (TCTP) family member from *Loxosceles intermedia* (Brown spider) venom. **Int. J. Biochem. Cell Biol.** V. 44, p. 140 – 177, 2012.

SAMPAIO, V. S.; GOMES, A. A.; SILVA, I. M.; SACHETT, J.; FERREIRA, L. C. L.; OLIVEIRA, S.; SABIDÒ, M.; CHALKDIS, H.; GUERRA, M. G. V. B.; SALINAS, J. L.; WEN, F. H.; LACERDA, M. V. G.; MONTEIRO, W. M. Low Health System Performance,

Indigenous Status and Antivenom Uderdosage Correlate with Spider Envenoming Severity in the Remote Brazilian Amazon. *PLoS ONE* 11(5), 2016.

SEIFERT, S. A.; BOYER, L. V.; DART, R. C.; PORTER, R. S.; SJOSTROM, L. Relationship of Venom Effects to Venom Antigen and Antivenom Serum Concentrations in a Patient With *Crotalus atrox* Envenomation Treated With a Fab Antivenom. **Annals of Emergency Medicine**. V. 30, p. 49-53. 1997.

SEFFF-RIBEIRO, A.; HENRIQUE DA SILVA, P.; CHAIM, O.M.; GREMSKI, L.H.; PALUDO, K.S.; BERTONI DA SILVEIRA, R.; GREMSKI, W.; MANGILI, O.C.; VEIGA, S.S. Biotechnological applications of Brown spider (*Loxosceles* genus) venom toxins. **Biotechnol Adv**, v. 26, n. 3, p. 210-8, 2008.

SEZERINO, U.M.; ZANNIN, M.; COELHO, L.K.; GONÇALVES JR., J.; GRANDO, M.; MATTOSINHO, S.G.; CARDOSO, J.L.C.; EICKSTEDT, V.R.D.; FRANÇA, F.O.S.; BARBARO, K.C.; FAN, H.W. A clinical and epidemiological study os *Loxosceles* spider envenoming in Santa Catarina, Brazil. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 92, n. 5, p. 546-548, 1998.

SILVEIRA, A. L. Primeiro registro sinantrópico de *Loxosceles laeta* (Nicolet, 1849) (Aranae, Sicariidae) no Município do Rio de Janeiro, Estado do Rio de Janeiro. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** V. 42 n. 6, 2009.

Sistema Nacional de Notificação de Agravos – SINAN, Ministério da Saúde, BRASIL, 2012.

STINGHEN, S. T. serviostinghen@sesa.pr.gov.br Proposta 2014-2015 - CPPI. Mensagem para: bruno.antunes@sesa.pr.gov.br em 08/04/2015.

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

TAMBOURGI, D.V.; DE ANDRADE, R.M.G.; VAN DEN BERG, W.C. Loxoscelism: From basic reasearch to the proposal of new therapies. **Toxicon**, v. 56, p. 1113-1119, 2010.

TAVARES, F.L. **Contribuição ao estudo da ação *in vitro* do veneno da aranha marrom, *Loxosceles gaucho*, sobre plaquetas humanas e de coelho. Participação das plaquetas na dermonecrose induzida experimentalmente pelo veneno loxoscélico em coelhos.** Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Departamento de Patologia. São Paulo, 2007.

TREVISAN-SILVA, D. Metaloproteases do tipo astacinas são uma família de toxinas conservadas em venenos de diferentes espécies de aranhas marrons (gênero *Loxosceles*). 2009. 77 f. Dissertação (Mestrado Biologia Celular e Molecular) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

TREVISAN-SILVA, D.; GREMSKI, L. H.; CHAIM, O. M.; DA SILVEIRA, R. B.; MEISSNER, G. O.; MANIGILI, O. C.; BARBARO, K. C.; GREMSKI, W.; VEIGA, S. S.; SENFF-RIBEIRO, A. Astacin-like metalloproteases are a gene family of toxins present in the venom of different species of the brown spider (genus *Loxosceles*). **Biochimie**, v. 92, p. 21 – 32, 2010.

TREVISAN-SILVA, D.; BEDNASKI, A. V.; GREMSKI, L. H.; CHAIM, O. M.; VEIGA, S. S.; SENFF-RIBEIRO, A. Differential metalloprotease content and activity of three *Loxosceles* spider venoms revealed using two-dimensional electrophoresis approaches. **Toxicon**, v. 76, p. 11-22, 2013.

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

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

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.** V. 34, p. 843 – 850, 2001a.

VEIGA, S. S.; ZANETTI, V. C.; FRANCO, C. R.; 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.** V. 102, p. 229 – 237, 2001b.

VETTER, R.S. Spiders of the Genus *Loxosceles* (Aranae, Sicariidae): a review of biological, medical and psychological aspects concerning envenomation. **The Journal of Arachnology**. 36, p.150-163, 2008.

VUITIKA, L. Clonagem, expressão heteróloga e caracterização biológica de uma nova isoforma de fosfolipase-D presente no veneno da aranha-marrom (*Loxosceles intermedia*) 2012. Dissertação (Mestrado Biologia Celular e Molecular) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

VUITIKA, L.; GREMSKI, L. H.; BELISÁRIO-FERRARI, M. R.; CHAVES-MOREIRA, D.; FERRER, V. P.; SENFF-RIBEIRO, A.; CHAIM, O. M.; VEIGA, S. S. Brown Spider Phospholipase-D Containing a Conservative Mutation (D233E) in the Catalytic Site: Identification and Functional Characterization. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 114, p. 2479-2492, 2013.

VUITIKA, L.; CHAVES-MOREIRA, D.; CARUSO, I.; LIMA, M. A.; MATSUBARA, F. H.; MURAKAMI, M. T., TAKAHASHI, H. K.; TOLEDO, M. S.; CORONADO, M. A.; NADER, H. B.; SENFF-RIBEIRO, A.; CHAIM, O. M.; ARNI, R. K.; VEIGA, S. S. Active site

mapping of *Loxosceles* phospholipases D: Biochemical and biological features. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1861, p. 970-979, 2016.

WILLE, A. C. M.; CHAVES-MOREIRA, D.; TREVISAN-SILVA, D.; MAGNONI, M. G.; BOIA-FERREIRA, M.; GREMSKI, L. H.; GREMSKI, W.; CHAIM, O. M.; SENFF-RIBEIRO, A.; VEIGA, S. S. Modulation of membrane phospholipids, the cytosolic calcium influx and cell proliferation following treatment of B16-F10 cells with recombinant phospholipase-D from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. **Toxicon**, v. 67, p. 17-30, 2013.

WRAY,W., BOULIKAS,T., WRAY,V.P. ; HANCOCK,R. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. **Analytical Biochemistry**. v. 118, p.197-203, 1981.

ZAMUNÉR, S. R.; DA CRUZ-HÖFLING, M. A.; CORRADO, A. P.; HYSLOP, S.; RODRIGUES-SIMIONI, L. Comparison of the neurotoxic and myotoxic effects of Brazilian *Bothrops* venoms and their neutralization by commercial antivenom. **Toxicon**, v. 44, p. 259 – 271, 2004.