

RODRIGO OTÁVIO SCHNEIDER RIBEIRO

**ANÁLISE COMPARATIVA ESTRUTURAL E DAS PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DAS
TOXINAS DERMONECRÓTICAS RECOMBINANTES LiRecDT1, LiRecDT2 e LiRecDT3
DO VENENO DA ARANHA-MARROM (*Loxosceles intermedia*)**

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

Orientador: Prof. Dr. Silvio Sanches Veiga

Co-orientador: Prof. Dr. Waldemiro Gremski

CURITIBA

2007

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fisiologia
Setor de Ciências Biológicas
Universidade Federal do Paraná
Instituto de Biologia Molecular 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


Dr. Silvio Sanches Veiga

Orientador e presidente da Banca (Depto. Biologia Celular – UFPR)


Dr.ª Juliana de Moura

(Depto. Patologia Básica – UFPR)


Dr. Edvaldo da Silva Trindade

(Depto. Biologia Celular - UFPR)

Como Suplentes:

Dr. Oldemir Carlos Mangili

(Depto. Fisiologia - UFPR)

Dr.ª Célia Regina Cavichiolo Franco

(Depto. de Biologia Celular da UFPR)

após argüir o(a) mestrando(a) **Rodrigo Otávio Schneider Ribeiro** em relação ao seu trabalho de dissertação intitulada: "Análise comparativa estrutural e das propriedades biológicas das toxinas dermonecróticas recombinantes LiRecDT1, LiRecDT2 e LiRecDT3 do veneno da aranha-marrom (*Loxosceles intermedia*)", é de parecer favorável à **APROVAÇÃO** do(a) acadêmico(a), habilitando-o(a) ao título de **Mestre** em Biologia Celular e Molecular, área de concentração em **Biologia Celular e Molecular**.

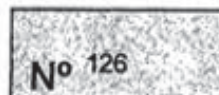
A obtenção do título de Mestre está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas nas Normas Internas deste curso de pós-graduação.

Curitiba, 12 de março de 2007


Ricardo Fernandez Perez
Coordenador do Curso



CERTIFICADO



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

TÍTULO: "BIODIVERSIDADE, TOXINAS E APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS".

AUTORES: SILVIO SANCHES VEIGA – Coordenador

WALDEMIRO GREMSKI, OLDEMIR CARLOS MANGILI E

CÉLIA REGINA C. FRANCO – Colaboradores

DEPARTAMENTO: BIOLOGIA CELULAR

Curitiba, 10 de junho de 2005.

Prof. SILVIO MARQUES ZANATA
Secretário

Profa. ANETE CURTE PERRAZ
Presidente

À minha mãe pelo amor e dedicação sem limites, pelo apoio em todos os momentos difíceis e pelas alegrias que ficarão para sempre na memória.

AGRADECIMENTOS

Ao meu “mestre” Professor Silvio Sanches Veiga pela oportunidade única de crescimento profissional e pessoal, e por permitir que eu faça parte deste laboratório, que é um lugar muito especial. Admiro muito sua inteligência, competência e os longos anos dedicados à pesquisa.

Tenho muito agradecer ao Professor Waldemiro Gremski, que é um referencial profissional e pessoal, sem o qual eu não faria parte deste grupo de pesquisa.

Agradeço ao professor Silvio Marques Zanata pela amizade e pelos assuntos científicos que conversávamos rapidamente pelos corredores do Departamento. Obrigado pelo incentivo! Agradeço aos nossos “vizinhos” de laboratório Adriana, Katya, Bia, Ciro, Valquíria e Luiz, sempre muito solícitos e educados.

Ao professor Edvaldo da Silva Trindade pelos papos científicos e descontraídos, sempre muito interessantes.

À professora Célia Regina Cavichiolo Franco pelo bom humor e alegria de sempre!

Ao professor Oldemir Carlos Mangili pelos conhecimentos científicos e disponibilidade.

À Juliana de Moura pela boa vontade, paciência e pela ajuda preciosa no experimento de hemólise. Obrigado de coração!

Ao corpo docente, coordenação e secretaria do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular pela disponibilidade e auxílio prestados, especialmente à Marlene Bonifácio de Camargo.

Aos colegas do Laboratório de Matriz Extracelular e Biotecnologia de Venenos que se tornaram amigos preciosos. Agradeço à Olga, uma amiga especial, inteligente e única pela delicadeza e doçura com que sempre me ensinou, pela paciência infinita e pela ajuda preciosa nos experimentos, sem a qual eu não conseguiria alcançar meus objetivos.

Agradeço ao meu companheiro de todas as “empreitadas”, ou melhor dizendo, de todos os experimentos, aí vai o meu muiiiiiiiiiiiiiito obrigado pela ajuda inestimável do Youssef, pelo companheirismo e dedicação.

Agradeço em especial à Kátia pela ajuda com o ensaio de hemólise, à Márcia (a nossa professora particular 24h e pela ajuda com o ELISA) e à Luiza pela ajuda com o ensaio de edema. Agradeço à todas vocês pela boa vontade, paciência (muita paciência), pelo carinho e disponibilidade total em todos os momentos em que eu precisei de ajuda, além do exemplo de competência. Obrigado pelos ensinamentos!

Ao Rafael pelos ensinamentos de Biologia Molecular e pela ajuda de grande valia nestes dois anos.

A todos os membros do LME, Josiana (pelo ouvido sempre disponível!), Danielle, Jenifer, Reginaldo, Valéria, Luciellen, Sandra e Dilza pelo convívio, dedicação e amizade.

Aos colegas de turma pelos bons momentos que passamos juntos e que lembrarei sempre!

Agradeço a todos os meus familiares que de alguma forma contribuíram para essa conquista, em especial à minha mãe, que é a pessoa mais importante na minha vida. Obrigado pelo carinho, cuidado e apoio de sempre.

As colegas do Laboratório de Imunogenética, Taiana, Moramay (Tia Zê), Ivy, Cláudia, Gisele, Helena, Karina, Cristina, Ana Luísa e Renata pelo incentivo e apoio constante!

Ao longo desses dois anos aprendi a importância de se trabalhar em equipe e de quão preciosa é a ajuda que nossos amigos têm a nos oferecer! Esse é o caminho pelo qual alcançamos o sucesso e a realização pessoal e profissional! Muito Obrigado!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!

*“Pintou estrelas no muro e teve o céu ao
alcance das mãos.”*

Helena Kolody

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	01
1.1 Gênero <i>Loxosceles</i>	01
1.2 Ocorrência e distribuição geográfica do gênero <i>Loxosceles</i>	02
1.3 Acidentes provocados pela picada de <i>Loxosceles</i>	03
1.4 Características do envenenamento por <i>Loxosceles</i>	04
1.5 Características dos Venenos <i>Loxoscélicos</i>	09
1.6 Produção de soro anti-aracnídeo.....	13
2. OBJETIVOS	16
3. MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1 MATERIAIS	17
3.1.1 Reagentes.....	17
3.2 MÉTODOS	17
3.2.1 Animais.....	17
3.3 Cepas de <i>E. coli</i> e vetores de expressão.....	18
3.3.1 Transformação de células competentes.....	18
3.3.2 Plaqueamento em ágar LB das bactérias transformadas	18

3.3.3 Expressão heteróloga das toxinas recombinantes LiRecDT1, LiRecDT2 e LiRecDT3 em sistema procariótico.....	18
3.3.4 Purificação das proteínas recombinantes LiRecDT1, LiRecDT2 e LiRecDT3 em resina Ni-NTA agarose.....	19
3.4 Cultivo celular.....	19
3.4.1 Ensaio de citotoxicidade celular pelo método de captura do vermelho neutro	19
3.5 Extração de veneno loxoscélico por eletrochoque.....	20
3.6 Dosagem de proteínas pelo Método de Bradford (azul de Coomassie).....	20
3.6.1 Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida na presença de SDS.....	20
3.6.2 Coloração de géis de poliacrilamida.....	20
3.6.3 Reações de <i>immunoblotting</i>	20
3.6.4 Reações de ELISA (<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>).....	21
3.6.5 Ensaio de mortalidade em camundongos induzida por LiRecDT1, LiRecDT2, LiRecDT3 e veneno total de <i>L. intermedia</i>	21
3.6.6 Ensaio de atividade edematogênica de LiRecDT1, LiRecDT2, LiRecDT3 e veneno total de <i>L. intermedia</i>	22
3.6.7 Ensaio de atividade hemolítica de LiRecDT1, LiRecDT2, LiRecDT3 e veneno total de <i>L. intermedia</i>	22
3.6.8 Experimento de dicroísmo circular (DC) das toxinas LiRecDT1, LiRecDT2 e LiRecDT3.....	22
3.7 Análise Estatística.....	23

4. RESULTADOS	24
4.1 Análise comparativa dos efeitos das toxinas dermonecróticas recombinantes LiRecDT1, LiRecDT2 e liRecDT3 sobre a viabilidade celular e morfologia em linhagem MDCK.....	24
4.2 Atividade hemolítica das toxinas dermonecróticas de <i>L. intermedia</i>	26
4.3 Ensaio de atividade edematogênica das toxinas dermonecróticas recombinantes.....	27
4.4 Ensaio de letalidade em camundongos induzida por toxinas dermonecróticas recombinantes de <i>L. intermedia</i>	28
4.5 Ensaio de reatividade imunológica cruzada das toxinas dermonecróticas recombinantes.....	29
4.6 Avaliação do dicroísmo circular das toxinas dermonecróticas recombinantes LiRecDT1, LiRecDT2 e LiRecDT3.....	31
5. DISCUSSÃO	33
6. CONCLUSÃO	39
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

LISTA DE SIGLAS

IPTG	- isopropil-3-D-tiogalactopiranosídeo
LB	- meio de cultivo Luria Broth
BCiP/NBT	- bromo cloro indofenil fosfato/nitro blue tetrazolium
PAGE-SDS	- eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
BSA	- albumina de soro bovino
SFB	- soro fetal bovino
IRA	- insuficiência renal aguda
DC	- dicroísmo circular
AMP	- ampicilina
CAM	- cloranfenicol
kDa	- quilodalton
mA	- miliamperes
mg	- miligramas
µg	- micrograma
µL	- microlitro
mL	- mililitro
mM	- milimolar

RESUMO

Algumas espécies de aracnídeos consistem em um problema de saúde pública, sendo o envenenamento por essas espécies de grande importância médica em todo o mundo. O gênero *Loxosceles*, cujos representantes são conhecidos como aranha-marrom provocam envenenamento caracterizado por lesão dermonecrótica e distúrbios sistêmicos. Levantamentos epidemiológicos realizados relataram um aumento significativo e crescente no número de casos de loxoscelismo em Curitiba e região metropolitana, a partir do ano de 1989. Loxoscelismo é o termo utilizado para descrever lesões e reações em consequência do envenenamento por aranhas do gênero *Loxosceles* sendo o desenvolvimento do quadro clínico e potencial de toxicidade variável em função de inúmeros fatores. Análises estruturais e ultra-estruturais da pele de coelhos permitiram a observação da ação do veneno em células endoteliais revelando instabilidade, vasodilatação, degeneração da parede dos vasos sanguíneos e vacuolização do citoplasma das células endoteliais. A presença de uma molécula de 30kDa em extratos renais de camundongos tratados com veneno total também denota o envolvimento das toxinas dermonecróticas na atividade tóxica renal produzida pelo envenenamento por *L. intermedia*. O presente trabalho teve como objetivo contribuir para o entendimento dos mecanismos biológicos e análise estrutural das toxinas dermonecróticas presentes no veneno de *Loxosceles*. Os resultados provenientes do ensaio de ELISA corroboraram com os dados de *immunoblotting* e demonstraram reatividade cruzada entre as toxinas dermonecróticas recombinantes LiRecDT1, LiRecDT2 e LiRecDT3. No ensaio de mortalidade em camundongos, apenas as toxinas LiRecDT1 e LiRecDT2 provocaram a morte dos animais no período de 24 horas. A indução da formação de edema foi demonstrada através da inoculação de LiRecDT1 e LiRecDT2, provocando efeito edematogênico intenso. A avaliação da citotoxicidade *in vitro* No ensaio de citotoxicidade houve redução da viabilidade celular para o tratamento com LiRecDT1 e LiRecDT2. No ensaio de morfologia com células de epitélio renal tratadas com LiRecDT1 e LiRecDT2 mostraram vacuolização citoplasmática e disfunção no espalhamento das. Os resultados obtidos através de dicróismo circular revelaram para LiRecDT3 um aumento significativo no conteúdo de α -hélice e decréscimo no conteúdo de folha- β em comparação com os valores referentes à LiRecDT1 e LiRecDT2. A atividade hemolítica de LiRecDT1 e LiRecDT2 foi de 33%. Os resultados apresentados evidenciam as diferenças estruturais entre LiRecDT1, LiRecDT2 e LiRecDT3, e consequentemente nas atividades biológicas observadas para estas toxinas, envolvidas no envenenamento por *Loxosceles*.

ABSTRACT

Some species of arachnids consist on a public health problem, being the envenomation by these species of great medical importance in whole world. *Loxosceles* genus whose animals are known as brown spider cause envenomation characterized as dermonecrotic lesions and systemic manifestations. Epidemiological surveys accomplished have mentioned a significant increase in the number of cases of loxoscelism in Curitiba and neighbourhood since 1989. Loxoscelism is the term used to describe lesions and reactions due to envenomation by spiders of *Loxosceles* genus, being the progress of clinical state and potencial of toxicity variable in regard to several factors. Structural and ultra-structural analysis of rabbit skin allow the observation of the toxic effect upon endothelial cells displaying blood vessel instability, vasodilatation, degeneration of the blood vessel wall and endothelial cell vacuolisation. The presence of a 30kDa molecule on renal lysates of mouse treated with crude venom was an indicative of dermonecrotic toxin involvement in renal injuries caused by *L. intermedia* envenomation. The aim of this study was to contribute for the knowledge of biological mechanisms and the structural analysis of dermonecrotic toxins of brown spider venom. ELISA assays results corroborated with the *immunoblotting* data and showed cross-reactivity among recombinant dermonecrotic toxins LiRecDT1, LiRecDT2 and LiRecDT3. On the mortality assay, only LiRecDT1 and LiRecDT2 induced the death of the animals after 24 hours. Induction of edema was displayed through LiRecDT1 and LiRecDT2 administration, causing intense edematogenic effect. *In vitro* cytotoxicity evaluation demonstrated reduction of cell viability for LiRecDT1 and LiRecDT2 treatment. Experiments on morphology using renal epithelial cells exposed to LiRecDT1 and LiRecDT2 showed cytoplasmic vacuoles and impaired spreading from culture substratum. Results of circular dichroism demonstrated for LiRecDT3 a significative increase of α -helix content and a decrease of β -sheet content in comparison with LiRecDT1 and LiRecDT2. The hemolytic activity of LiRecDT1 and LiRecDT2 was 33%. The present results evidence structural differences among LiRecDT1, LiRecDT2 and LiRecDT3 and consequently different biological activities observed for these toxins, involved in *Loxosceles* spider envenomation.

1. INTRODUÇÃO

Algumas espécies de aracnídeos consistem em um problema de saúde pública, sendo o envenenamento por estas de grande importância médica em todo o mundo. A hipersensibilidade a Hymenoptera (abelhas, vespas e formigas) e o envenenamento por centopéias, lagartas, besouros, e miriápodes contabilizam grande parte dos casos relacionados à invertebrados (ISBISTER & GRAY, 2002). Entretanto os acidentes provocados por aranhas são responsáveis por maior morbidez e mortalidade em relação a outros artrópodes. Entre as espécies de aranhas dois gêneros apresentam destaque tendo grande importância médica pela gravidade dos acidentes provocados. O gênero *Loxosceles* (família Sicariidae), cujos representantes são conhecidos como aranha-marrom, provoca envenenamento caracterizado por lesão dermonecrotica e distúrbios sistêmicos (FUTRELL, 1992) e o gênero *Latrodectus* (aranha viúva-negra – família Theridiidae) conhecido pelo veneno com potente ação neurotóxica (ISBISTER *et al.*, 2003).

1.1 Gênero *Loxosceles*

As aranhas do gênero *Loxosceles* pertencem ao filo Arthropoda, classe Arachnida, ordem Araneae, subordem Araneomorphae e família Sicariidae (RUPPERT & BARNES, 1996; SOERENSEN, 1996).

O gênero *Loxosceles* é caracterizado por representantes que apresentam quelíceras com orientação vertical cujo movimento é lateral bem como o movimento das presas (RASH & HODGSON, 2002). Em relação à morfologia as aranhas deste gênero apresentam corpo medindo em torno de 16 mm de comprimento e patas longas e afinadas medindo entre 8 e 30 mm de comprimento. Os machos possuem corpo menor e patas relativamente mais longas em relação às fêmeas. No cefalotórax encontra-se o aparelho inoculador de veneno composto por um par de quelíceras além de glândulas apócrinas. Em relação à estrutura da glândula de veneno, existe um epitélio secretor revestido por uma membrana basal e envolto por espessa musculatura (GAJARDO-TOBAR, 1966; JUNQUA E VACHON, 1968; FOIL *et al.*, 1979; MARTINEZ-VARGAS, 1987). Existe uma variação em relação a quantidade de veneno inoculado dependente, por exemplo, do sexo e tamanho do animal, sendo aproximadamente de 65µg a 100µg de proteínas totais (FORRESTER *et al.*, 1978; LUCAS, 1988; SAMS *et al.*, 2001; DA SILVA *et al.*, 2004).

A família Sicariidae é caracterizada pela presença de fêmeas haplóginas, ou seja sem a presença de uma placa esclerotizada sobre os orifícios genitais denominada epígino e um par de canais fertilizantes internos (GERTSCH & ENNIK, 1983). O órgão sexual dos machos é formado por estruturas simples compostas por um bulbo copulatório e um êmbolo de forma variável de acordo com a espécie.

As teias são construídas de forma a cobrir as superfícies irregularmente assemelhando-se com algodão. Estas aranhas se adaptaram às condições antrópicas ocupando residências na área urbana. São animais sedentários, apresentam hábito noturno e têm como habitat natural sítios específicos como frestas, cascas de árvore e pedras (BÜCHERL & ROSENFELD, 1954; HITE *et al.*, 1960; GAJARDO-TOBAR, 1966; LUCAS, 1988; DA SILVA *et al.*, 2004).

1.2 Ocorrência e distribuição geográfica do gênero *Loxosceles*

A distribuição das espécies do gênero *Loxosceles* ocorre em regiões temperadas, tropicais e subtropicais ocupando uma grande variedade de microhabitats naturais e domiciliares, prevalecendo no continente americano nos países da América do Norte, América Central e América do Sul. Registros de espécies do gênero *Loxosceles* foram feitos também na Europa, Ásia e África (FUTRELL, 1992; WHITE *et al.*, 1995; ESCALANTE-GALINDO *et al.*, 1999; YOUNG e PINCUS, 2001; NICHOLSON e GRAUDINS, 2002).

No Brasil, o gênero *Loxosceles* ocorre em uma extensa faixa iniciando no estado do Rio de Janeiro, passando pelos estados do Paraná, Santa Catarina e se estendendo até o Rio grande do Sul. Nas regiões Sul e Sudeste também está presente a espécie *L. laeta*. Nos estados de São Paulo e Rio Grande do Sul também ocorre *L. gaucho*. A espécie *L. adelaide* é encontrada no Rio de Janeiro. A ocorrência de *L. similis* se dá nos estados da Paraíba, São Paulo e Minas Gerais. *L. amazonica* pode ser encontrada nos estados do Amazonas e Ceará. *L. hirsuta* está presente na região sul do país (BÜCHERL, 1960; TORRES & CARLOTTO, 1982).

Na cidade de Curitiba e região metropolitana a espécie que predomina é *L. intermedia*. Entretanto podem ser encontradas as espécies *L. laeta* e *L. gaucho* em populações menores (SESA/Centro de Saúde Ambiental, 2004). A espécie *L. intermedia* caracteriza-se por apresentar coloração marrom escuro e abdômen oval com tonalidade cinza (fig. 1). Na espécie *L. laeta* observa-se uma mancha escura no cefalotórax (FISCHER, 1994).



Figura 1. *Loxosceles intermedia*. Representantes da espécie *L. intermedia*, caracterizados pela coloração marrom escuro e abdômen oval com tonalidade cinza.

1.3 Acidentes provocados pela picada de *Loxosceles*

Os registros iniciais de acidentes envolvendo *Loxosceles* no Brasil foram feitos no ano de 1954 por BÜCHERL & ROSENFELD e, posteriormente, estudos na produção de anti-soro foram realizados por FURLANETTO (1961).

Levantamentos epidemiológicos realizados relataram um aumento significativo e crescente no número de casos de loxoscelismo no estado do Paraná, principalmente na cidade de Curitiba e região metropolitana, a partir do ano de 1989. Dos casos de acidentes com *Loxosceles* no estado do Paraná, 92,61% ocorreram na cidade de Curitiba e região metropolitana. Os acidentes ocorrem principalmente em indivíduos entre 20 e 39 anos sendo mais freqüentes na região dos membros inferiores, membros superiores, seguido dos pés, tronco e cabeça. Além disso, o maior número de acidentes ocorre nas estações mais quentes do ano (SCHENONE & LETONJA, 1975; MANFREDINI *et al.*, 1993; Mistério da Saúde do Brasil, 2004; MARQUES-DA-SILVA & FISCHER, 2005). A grande disponibilidade de substratos pouco perturbados em ambientes peridomiciliares e intradomiciliares constituem-se em um abrigo favorável para a ocupação da zona urbana por aranhas do gênero *Loxosceles*. Estas aranhas são classificadas como oicofílicas sinantrópicas devido a adaptação a ambientes residenciais nos quais encontram boas condições para seu desenvolvimento, suportando temperaturas que variam de 8 à 43°C (FISCHER, 1994). Podem sobreviver

por períodos superiores a 200 dias sem alimento e ambos os sexos são venenosos (GERSTCH & ENNIK, 1983; FUTRELL, 1992). Diferente de outros artrópodos e ofídios, as aranhas do gênero *Loxosceles* não apresentam comportamento agressivo sendo os acidentes provocados por compressão da aranha sobre a pele (SUAREZ *et al.*, 1971; LUCAS, 1988; FUTRELL, 1992).

1.4 Características do envenenamento por *Loxosceles*

Loxoscelismo é o termo utilizado para descrever lesões cutâneas e reações em consequência do envenenamento por aranhas do gênero *Loxosceles*, (MARTINEZ-VARGAS, 1987; RIBEIRO *et al.*, 1993) sendo o desenvolvimento do quadro clínico e potencial de toxicidade variável em função de inúmeros fatores. A concentração de veneno inoculado contribui para a severidade do envenenamento, sendo esta superior nas fêmeas além de ser dependente da espécie e do estágio de desenvolvimento ontogenético (ANDRADE *et al.*, 1999; Ministério da saúde do Brasil, 1998; OLIVEIRA *et al.*, 1999; SEZERINO *et al.*, 1998; BARRETO *et al.*, 1985). Fatores relacionados ao indivíduo como idade, fenótipo e o tempo até o atendimento médico também contribuem para a gravidade do quadro de envenenamento (GAJARDO-TOBAR, 1966; SCHENONE *et al.*, 1989; BARBARO *et al.*, 1994). O estudo da atividade biológica do veneno das três espécies principais presentes na região sul, mostrou que o veneno de *L. intermedia* é o mais letal (DL₅₀ 0,48 mg/kg), seguido pela espécie *L. gaucho* (DL₅₀ 0,74 mg/kg) e o de *L. laeta* como sendo o de menor toxicidade (DL₅₀ 1,45 mg/kg) (BARBARO *et al.*, 1996).

O envenenamento por *Loxosceles* divide-se em quadro clínico cutâneo ou dermonecrótico (REES *et al.*, 1984) e quadro cutâneo-visceral ou sistêmico (BINFORD & CONNOR, 1976). O quadro cutâneo é caracterizado inicialmente por dor e queimação no local da picada dentro de minutos a horas após o acidente e corresponde a 84 – 97% dos casos (BARBARO *et al.*, 1992). As primeiras descrições de lesão cutânea referente ao envenenamento por *Loxosceles* foram feitas por CAVENESS (1872). No ano de 1957, com os estudos de ATKINS e colaboradores foi estabelecida a ação tóxica do veneno a partir de lesões necróticas produzidas pela picada de *Loxosceles reclusa*, mostrando características clínicas diferenciadas em relação aos acidentes causados por outras espécies de aranhas.

O quadro clínico cutâneo (fig. 2) evolui com dor intensa, prurido e a formação de uma região edemaciada associada a eritema e em seguida para uma lesão extensa circundada por um halo vermelho e zonas pálidas denominada placa marmórea.

A



B



Figura 2. Aspecto macroscópico da lesão dermonecrotica. (A) Lesão dermonecrotica localizada no abdômem. A ocorrência de espalhamento gravitacional está indicado por (♣) na figura. (B) Presença de lesão dermonecrotica situada na perna direita.

Acúmulo de leucócitos polimorfonucleares em torno de 5 dias após a picada, formação de abscesso e necrose foram relatados (SMITH & MICKS, 1970; OSPEDAL *et al.*, 2002). O estudo histológico das lesões locais em coelhos e cobaias pelo veneno de *L. laeta*, revelou intensas alterações vasculares precoces como vasoconstrição inicial das arteríolas e vasodilatação acentuada posteriormente. Comprometimento da parede dos vasos sanguíneos associado a fenômenos degenerativos e trombóticos também foram observados (PIZZI *et al.*, 1957). A formação de edema e

extravasamento de células sangüíneas, como eritrócitos, durante as primeiras horas após a picada também são característicos. A lesão dermonecrótica, dentro de 2 à 6 semanas, pode ainda evoluir para a formação de uma úlcera necrótica ou mancha gangrenosa podendo ser difícil sua cicatrização (GAJARDO-TOBAR, 1966; SCHELONE & LETONJA, 1975; BARBARO *et al.*, 1994; ZANETTI *et al.*, 2002). Lesões como piodermite gangrenosa (REES *et al.*, 1988) podem surgir em consequência do ferimento crônico decorrente de vasculite mediada por leucócitos (OSPEDAL *et al.*, 2002), além de infecção secundária por microorganismos como *Clostridium perfringens*, atuando de modo sinérgico agravando ainda mais as lesões dermonecróticas (MONTEIRO *et al.*, 2002).

O quadro clínico cutâneo-visceral ou sistêmico ocorre com menor freqüência (3-16%) nos casos de envenenamento por *Loxosceles* (SCHENONE & LETONJA, 1975; MARTINEZ-VARGAS, 1987; SCHENONE *et al.*, 1989; BARBARO *et al.*, 1992; COUTINHO, 1996). Nas primeiras 24 horas após a picada podem surgir sintomas do quadro cutâneo-visceral que incluem astenia, febre, emese, cefaléia, alterações sensoriais, insônia e coma. Manifestações de maior gravidade incluem alterações no quadro hematológico caracterizadas por anemia hemolítica, agregação plaquetária e, conseqüentemente, trombocitopenia além de coagulação intravascular disseminada. O veneno também induz neutropenia e baixa contagem de neutrófilos em medula óssea de coelhos. Este achado possivelmente pode ser acarretado pelo influxo destas células inflamatórias para o local da inoculação do veneno. Por outro lado esses efeitos induzidos pelo veneno na medula óssea e no sangue periférico são transitórios, sendo que as celularidades retornam aos valores normais após o período de 10 dias (DENNY *et al.*, 1964; FORRESTER *et al.*, 1978; BASCUR *et al.*, 1982; RESS *et al.*, 1988; DA SILVA *et al.*, 2003). Icterícia, redução do hematócrito e aumento da bilirrubina indireta (SCHENONE & SUAREZ, 1978; REES *et al.*, 1988; FUTRELL, 1992; COUTINHO, 1996) também foram observados em decorrência das alterações hematológicas, incluindo manifestações sistêmicas envolvendo pulmões, fígado e rins (PIZZI *et al.*, 1957; LUNG & MALLORY, 2000). Manifestações sistêmicas envolvendo alterações renais podem acarretar Insuficiência Renal Aguda (IRA) (hemoglobínúria e hematúria) e até mesmo obstrução do lúmen tubular (IRA oligúrica ou não oligúrica) (WASSERMAN & ANDERSON, 1984; SCHENONE *et al.*, 1989; FUTRELL, 1992; SEZERINO, 1998; LUNG & MALLORY, 2000). Sintomas como febre, náuseas, vômito e convulsões têm sido reportados, sugerindo atuação do veneno no sistema nervoso central (FUTRELL, 1992).

Análises estruturais e ultraestruturais da pele de coelhos permitiram a observação da ação do veneno em células endoteliais de vasos sanguíneos revelando instabilidade dos vasos, oclusão de vênulas e artérias, vasodilatação, degeneração da parede de vasos sanguíneos e vacuolização do citoplasma das células endoteliais. A ação tóxica do veneno na redução da adesão de células endoteliais de coelho (RAEC) em cultivo também foi relatada (VEIGA *et al.*, 2001a; SMITH *et al.*, 1970; FUTREL, 1992; OSPEDAL *et al.*, 2002). Embora sejam necessários maiores estudos em relação ao mecanismo de atuação das toxinas dermonecroticas, dados mostram que estas têm ação na superfície de células endoteliais, produzindo ácido lisofosfatídico (LPA) a partir de lisofosfatidilcolina. O LPA é um potente mediador lipídico e a sua interação com receptores na membrana das células endoteliais pode dar início ao processo de ativação da resposta inflamatória (VAN MEETEREN *et al.*, 2004; LEE e LYNCH, 2005). A ativação da resposta inflamatória dá-se pelo aumento da expressão de E-selectina, secreção de interleucina-8 (IL-8) e fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) (PATEL *et al.*, 1994; DA SILVA *et al.*, 2004). Outros mediadores como fator de crescimento de endotélio vascular (VEGF), o qual pode atuar na vasodilatação, edema e eritema observados após o envenenamento e proteína-1 quimiotática de monócitos, são também produzidos em células em cultura após estímulo pelo veneno (DESAI *et al.*, 1999; GOMEZ *et al.*, 1999), bem como fator de necrose tumoral (TNF- α) (MÁLAQUE *et al.*, 1999).

A participação de leucócitos polimorfonucleares (PMNs) na geração de uma reação inflamatória, contribuindo para a formação da lesão dermonecrotica, foi sugerida através de estudos onde a depleção de leucócitos polimorfonucleares promoveu a redução da lesão dermonecrotica. Dessa forma a destruição tecidual observada na dermonecrose possivelmente está associada com uma reação inflamatória intensa em virtude da infiltração em massa de leucócitos polimorfonucleares na derme (ELSTON *et al.*, 2000; OSPEDAL *et al.*, 2002; DA SILVA *et al.*, 2004) embora a ativação *in vitro* de PMNs na presença de veneno seja ausente (SMITH & MICKS, 1970). A ausência de ativação de PMNs *in vitro* sugere um mecanismo indireto de ativação envolvendo possivelmente células endoteliais por meio da ação das toxinas dermonecroticas (fosfolipases D). Este papel foi atribuído às células endoteliais devido às alterações ultraestruturais observadas após o envenenamento. Dados obtidos por microscopia de luz demonstram a adesão de neutrófilos à parede do vaso capilar, o que sugere que a ativação do endotélio é um componente essencial da reação inflamatória com subsequente recrutamento de

neutrófilos ativados que fazem a migração através do endotélio. Estes dados sugerem que o veneno atua como um agonista de células endoteliais e que estas células endoteliais ativadas em seguida ativam PMNs através da produção de interleucina-8. Esta resposta inflamatória desregulada pode computar para a destruição tissular associada com o envenenamento por *Loxosceles* (PATEL *et al.*, 1994; TAMBOURGI *et al.*, 2005).

Autópsias de pacientes que foram a óbito por loxoscelismo sistêmico, mostraram alterações degenerativas nos parênquimas de vários órgãos. Também foram observados edema, congestão, hemorragia e erosões da mucosa digestiva e também lesões tubulares renais. Em 62% dos casos de loxoscelismo sistêmico há um comprometimento renal ocorrendo Insuficiência Renal Aguda (IRA) e, conseqüentemente, necrose tubular (PIZZI *et al.*, 1957; SCHENONE *et al.*, 1989). O efeito hemolítico contribui para a injúria renal sugerindo que a presença de hemoglobina livre precipitada ao longo do néfron pode retardar o fluxo do fluido tubular e produzir uma resposta patológica representada pela redução da filtração glomerular desencadeando a IRA (COUTINHO, 1996). As membranas basais desempenham diversas funções vitais em tecidos embrionários e adultos em condições normais e patológicas. A membrana basal glomerular atua como uma barreira seletiva regulando a filtração tanto em carga quanto em tamanho das moléculas do plasma que passam para o espaço urinário, sendo os sítios aniônicos regularmente distribuídos na membrana basal sendo representados por proteoglicanos e glicosaminoglicanos, principalmente proteoglicano de heparam sulfato e ácido hialurônico. Estudos mostraram que a remoção enzimática do proteoglicano de heparam sulfato e não do ácido hialurônico pode produzir alterações de permeabilidade na membrana basal glomerular (KANVAR & FAQUHAR, 1979). Assim a ausência de proteoglicanos ou um bloqueio de suas funções influencia o processo de filtração renal levando à proteinúria. É possível também a ocorrência de uma desorganização eletrostática da membrana glomerular prejudicando o processo de filtração, levando à excreção de proteínas plasmáticas que exibem carga negativa no plasma. Devem ser considerados em processos patológicos outros componentes da membrana basal como laminina, colágeno do tipo IV, entactina e fibronectina haja visto que estas macromoléculas desempenham função estrutural e participam de processos fisiológicos (DE BARROS SILVA *et al.*, 1992).

LUCIANO e colaboradores (2004) demonstraram a atividade nefrotóxica do veneno de *L. intermedia* em nível de estruturas glomerulares e tubulares em

camundongos. Análises por microscopia de luz revelaram, em relação aos túbulos, hialinização dos túbulos distais e proximais, vacuolização de células epiteliais dos túbulos, edema intersticial e depósito de material eosinofílico. Dados de microscopia eletrônica de transmissão revelaram alterações incluindo desordens da membrana basal, citotoxicidade de células endoteliais e epitélio glomerular. A presença de uma molécula na região de 30kDa em extratos renais de camundongos tratados com veneno, através do ensaio de *immunoblotting* utilizando anticorpos que reconhecem as toxinas do veneno, também denota a atividade tóxica renal produzida pelo envenenamento por *L. intermedia* (CHAIM *et al.*, 2006)

Biópsias renais de camundongos tratados com a toxina dermonecrótica recombinante (*LiRecDT1 – Loxosceles intermedia Recombinant Dermonecrotic Toxin*) demonstraram alterações histológicas semelhantes ao efeito nefrotóxico do veneno total, incluindo edema glomerular e necrose tubular (CHAIM *et al.*, 2006). Hialinização dos túbulos, deposição de material proteináceo no lúmen além de vacúolos e lise em células epiteliais tubulares reforçam o efeito citotóxico direto sobre o tecido renal. Por outro lado a resposta inflamatória marcada por acúmulo, infiltração ou marginalização leucocitária foi encontrada somente em biópsias de pele, sendo ausente no processo de injúria renal (OSPEDAL *et al.*, 2002; DA SILVA *et al.*, 2004; CHAIM *et al.*, 2006). Alterações da função renal como alcalinização da urina, hematúria, azotemia e a associação com as alterações histopatológicas, evidenciam o efeito nefrotóxico causado pela toxina dermonecrótica recombinante.

Imunofluorescência utilizando anticorpos que reconhecem a toxina dermonecrótica recombinante LiRecDT1, revelou deposição e ligação desta toxina em estruturas renais. Células epiteliais MDCK em cultura tratadas com LiRecDT1 demonstraram ligação direta da toxina na superfície celular sob análise de microscopia confocal, além de alterações morfológicas incluindo vacúolos citoplasmáticos, adesão defectiva ao substrato e adesão célula-célula além de alteração da viabilidade celular. A associação dos fatos demonstra a capacidade da toxina recombinante em promover a nefrocitotoxicidade causada pelo veneno total, contribuindo para a injúria renal associada com o envenenamento por *L. intermedia* (CHAIM *et al.*, 2006).

1.5 Características dos Venenos *Loxoscélicos*

O estudo da composição do veneno de ofídios das famílias Crotalidae e Viperidae demonstrou semelhanças em relação ao veneno de *Loxosceles*, sendo abundante a presença de enzimas proteolíticas em ambos, o que sugere a participação

destas no efeito tóxico do veneno (MARTINEZ-VARGAS, 1987; DA SILVEIRA *et al.*, 2002).

Os venenos de ofídios são compostos essencialmente protéicos os quais apresentam efeitos nocivos principalmente ligados à hemostasia. A ação hemostática do veneno consiste na degradação de moléculas da matriz extracelular solúveis no plasma como a fibronectina e fibrinogênio (WILLIAMS *et al.*, 1983). Esta degradação segundo alguns estudos, é responsável pelos distúrbios hematológicos apresentados nos acidentes com ofídios (ARAGON-ORTIZ & GUBENSEK, 1987; HITE, 1960; BODE *et al.*, 1993, GUTIERREZ *et al.*, 1995), principalmente quando envolve enzimas do tipo metaloproteases. Em relação às famílias de metaloproteases presentes no veneno de ofídios destaca-se a família das reprotinas. Estas moléculas são endopeptidases que clivam praticamente todas as moléculas que compõem a matriz extracelular. Podem atuar sobre a regulação de processos fisiológicos como a organização das moléculas da matriz extracelular além da participação na reestruturação tecidual em doenças invasivas como o câncer ou doenças degenerativas. A secreção destas metaloproteases ocorre sob forma latente sendo a ativação mediada pela quebra proteolítica nos domínios pró-peptídicos especificamente sobre pontas de cisteínas, e para que ocorra esse processo íons de metais divalentes são requeridos.

O veneno de *Loxosceles* é composto basicamente por enzimas e moléculas biologicamente ativas produzidas por glândulas situadas no cefalotórax da aranha. Em relação aos constituintes protéicos do veneno predominam proteínas de baixa massa molecular entre 5 e 40 kDa. Moléculas biologicamente ativas como sais inorgânicos, aminoácidos livres, ácidos nucléicos, monoaminas e poliaminas neurotóxicas também estão presentes. As proteínas do veneno de *L. intermedia* exibem N-glicosilação, com estruturas do tipo alta-manose, estruturas do tipo complexas e fucosiladas, e em menor grau são proteínas O-glicosiladas (GAJARDO-TOBAR, 1966, NORMENT *et al.*, 1979; MARTINEZ-VARGAS, 1987; VEIGA *et al.*, 1999; VEIGA *et al.*, 2000a; DA SILVEIRA *et al.*, 2002; DA SILVA *et al.*, 2004; MACHADO *et al.*, 2005).

Estudos de identificação e caracterização das toxinas presentes no veneno de *Loxosceles* revelaram a presença de toxinas dermonecroticas (fosfolipases D), que são os componentes mais estudados e caracterizados, hialuronidases, serino-proteases, fosfatase alcalina e 5'-fosfohidrolase ribonucleotídica (FUTRELL, 1992; FEITOSA *et al.*, 1998; VEIGA *et al.*, 2000a; DA SILVA *et al.*, 2004).

Análises em SDS-PAGE dos venenos de diferentes espécies como *L. gaucho*, *L. intermedia* e *L. laeta* revelaram composição protéica similar, com a presença de três

frações principais (A, B e C). A atividade de dermonecrose do veneno está restrita apenas à fração A, que apresenta bandas nas regiões entre 30 e 35 kDa. Em *L. gaucho* foi isolada uma fração de 30 kDa na qual foram identificadas duas isoformas denominadas *Loxnecrogin A* (31,4 kDa) e *Loxnecrogin B* (31,6 kDa) com atividade dermonecrótica, entretanto não tão intensa em relação a atividade produzida pelo veneno total (BARBARO *et al.*, 1994 e 1996).

Foram purificadas duas isoformas de uma toxina da fração de 35 kDa do veneno de *L. intermedia*, denominadas P1 e P2 as quais apresentam atividade esfingomielinásica (TAMBOURGI *et al.*, 1995). Os efeitos *in vivo* induzidos pelas isoformas P1 e P2 são equivalentes ao veneno total promovendo necrose e hemólise dependente de complemento.

De todos os componentes presentes no veneno de *L. reclusa*, as toxinas dermonecróticas, que são fosfolipases D (descritas inicialmente como esfingomielinases D), são as mais pesquisadas (RAMOS-CERRILLO *et al.*, 2004; BARBARO *et al.*, 2005; ANDRADE *et al.*, 2005). Estas podem induzir as manifestações cutâneas do envenenamento, hemólise de eritrócitos e também agregação plaquetária (FUTRELL, 1992; KURPIEWSKI *et al.*, 1981; TAMBOURGI *et al.*, 1998; KALAPOTHAKIS *et al.*, 2002; PEDROSA *et al.*, 2002; CUNHA *et al.*, 2003; FELICOLI, L. F. *et al.*, 2006).

Metaloproteases de baixa massa molecular foram identificadas no veneno de *L. intermedia*, denominadas Loxolisina A (20-28k Da) e Loxolisina B (32-35 kDa). A atividade dessas metaloproteases está possivelmente relacionada à distúrbios hemostáticos decorrentes da atividade fibronectinolítica e fibrinogenolítica (Loxolisina A), e gelatinolítica (Loxolisina B), tais como hemorragia da derme, injúria de vasos sangüíneos, interferência na adesão plaquetária e também dificuldade na cicatrização das lesões cutâneas (FEITOSA *et al.*, 1998; VEIGA *et al.*, 2001a; VEIGA *et al.*, 2001b; DA SILVEIRA *et al.*, 2002; ZANETTI, *et al.*, 2002). Estudos têm descrito a presença de metaloproteases em organismos como bactérias, invertebrados e mamíferos, sendo sua função atribuída, entre outras, à digestão, processamento de peptídeos biologicamente ativos, morfogênese e eclosão de ovos (DUMERMUTH *et al.*, 1991; BOND e BEYNON, 1995; MÖHRLLEN *et al.*, 2003).

O estudo do perfil oligossacarídico das toxinas do veneno de *L. intermedia* mostraram que a agregação plaquetária e a atividade fibrinogenolítica do veneno são independentes dos resíduos de açúcares, sendo as atividades gelatinolíticas e de dermonecrose dependentes de açúcares (VEIGA *et al.*, 1999). Atividade gelatinolítica

presente no veneno de *L. intermedia* também foi identificada por ação de serino-proteases de 85 e 95 kDa, além de sua participação em menor escala na degradação de caseína (VEIGA *et al.*, 2000b)

A presença de uma hialuronidase com atividade na degradação de ácido hialurônico e resíduos de proteoglicano de condroitim sulfato ainda se encontra sob investigação. A mobilidade eletroforética está entre 33 kDa e 63 kDa, e sua provável contribuição consiste na extensão das lesões dermonecróticas por espalhamento gravitacional (WRIGHT *et al.*, 1973; FUTRELL, 1992; YOUNG & PINCUS, 2001; DA SILVA *et al.*, 2004; DA SILVEIRA *et al.*, 2007).

Além das enzimas mencionadas existem outras moléculas biologicamente ativas presentes no veneno de *L. intermedia* com atividade proteolítica sobre entactina, membranas basais e o esqueleto protéico do proteoglicado de heparan sulfato de células endoteliais (FUTRELL, 1992; VEIGA *et al.*, 2000a; VEIGA *et al.*, 2001b). Estes dados sugerem que o veneno apresenta efeito nocivo sobre o endotélio dos vasos sangüíneos *in vivo* e também *in vitro* devido a redução na adesão ao substrato de células mantidas em cultivo, como mencionado anteriormente (VEIGA *et al.*, 2001a).

O componente amilóide P do soro pode estar envolvido com a ativação plaquetária, podendo ser responsável pelos efeitos de trombose vascular, isquemia tecidual e perda de pele no local da picada, consequentemente participando no efeito dermonecrótico provocado pelo veneno (GATES & REES, 1990). Os fenômenos de trombocitopenia, coagulação intravascular e o quadro hemorrágico são fenômenos dependentes de moléculas da matriz extracelular como a fibronectina plasmática e fibrinogênio devido a atividade proteolítica do veneno possivelmente atuar sobre esses substratos (WILLIAMS *et al.*, 1983, DA SILVA *et al.*, 2004). O sistema complemento do plasma também parece participar nas atividades deletérias do veneno, especialmente nos eritrócitos, causando uma hemólise dependente de complemento (FUTRELL, 1992). O efeito tóxico do veneno se deve à atividade em conjunto dos diferentes constituintes, ou seja um efeito tóxico sinérgico (GEREN *et al.*, 1976).

O estudo da composição protéica do veneno de *L. gaucho* realizado por BARBARO *et al.* (1995) revelou constituintes como esfingomielinase D responsáveis pelo evento de dermonecrose e óbito em experimentos utilizando animais.

A atividade hemolítica do veneno de *L. laeta* foi estudada por BRAVO e colaboradores (1993), que constataram efeito hemolítico direto do veneno em eritrócitos, dependente de cálcio e complemento, mas independente da participação de anticorpos. TAMBOURGI *et al.* (2000) propuseram a indução da ação de

metaloproteases endógenas levando à clivagem de glicoforinas, conseqüentemente tornando os eritrócitos susceptíveis à lise por complemento. O veneno de *L. reclusa* mostrou-se capaz de inibir a quimiotaxia de neutrófilos sem, no entanto, comprometer a atividade fagocítica. Alterações nos mecanismos de coagulação também foram observadas, como a redução do complemento sérico, aumento do tempo da atividade parcial da tromboplastina e protrombina e redução dos fatores de coagulação XII, XI, IX e VIII em 44% (BABCOCK, 1981). No veneno de *L. reclusa* não foi constatado atividade de colagenase, acetilcolinesterase e dipeptidase.

1.6 Produção de soro anti-aracnídeo

Anti-soros têm sido desenvolvidos para tratar o envenenamento por aracnídeos de grande interesse médico (HEARD *et al.*, 1999; NICHOLSON *et al.*, 2002) incluindo a aranha viúva-negra (*Latrodectus spp.*), aranha-marrom (*Loxosceles spp.*) e a aranha armadeira (*Phoneutria spp.*). A literatura tem descrito diversos relatos da produção de anti-soros específicos produzidos contra *Latrodectus mactans*, *Latrodectus hasselti*, *Latrodectus indistinctus* e *Latrodectus geometricus*. Por outro lado a utilização de anti-soros é variável em decorrência de diferentes condutas clínicas médicas adotadas principalmente pela ocorrência de reações de hipersensibilidade e da eficácia variável dos anti-soros (ISBISTER *et al.*, 2003). *Latrodectus sp.* apresenta uma ampla distribuição havendo mais de 40 espécies distribuídas pelo mundo. Sua picada pode causar uma condição clínica denominada latrodecismo, caracterizada por uma dor severa e persistente associada a efeitos neurotóxicos, embora algumas picadas causem efeitos menores (WHITE *et al.*, 1995; ISBISTER *et al.*, 2002).

Trabalhos recentes relataram a utilização de fragmentos Fab anti-veneno de *Loxosceles* administrados por via intradérmica para o tratamento das manifestações relacionadas ao quadro cutâneo caracterizado por dermonecrose. Os resultados mostraram que a administração de anti-soro dentro de 4 horas após a inoculação do veneno promoveu a atenuação das lesões dermonecróticas (WHITE *et al.*, 1995). Esta constatação pode auxiliar na explicação dos resultados pouco eficazes obtidos com a terapia utilizando anti-soro no Brasil, pois os pacientes são comumente diagnosticados mais de 24 horas após o acidente (SEZERINO *et al.*, 1998). Possivelmente esta demora se deve à falta de dor nas primeiras horas da picada. Anticorpos monoclonais capazes de neutralizar o efeito dermonecrótico e as atividades letais da toxina dermonecrótica de 35kDa de *L. gaucho* foram produzidos por GUILHERME *et al.* (2001). Foi demonstrada a reatividade cruzada do veneno de duas espécies de

importância médica de *Loxosceles* na América do Norte, o que possibilita o desenvolvimento de um único anti-veneno para diferentes espécies de *Loxosceles* (GOMEZ *et al.*, 2001 e 2002). Soro anti-*Loxosceles* utilizando veneno de *L. intermedia*, *L. laeta* e *L. gaucho* foi produzido pelo Centro de Produção de produtos Imunobiológicos (CPPI - Curitiba, Paraná) sendo este capaz de neutralizar alguns dos efeitos nocivos do veneno.

A clonagem de uma toxina com atividade dermonecrótica e de hemólise dependente de complemento foi realizada por PEDROSA *et al.* (2002), obtida de uma biblioteca de cDNA da glândula de veneno de *L. laeta*. Três insertos que codificam para proteínas com uma alta similaridade com a sequência N-terminal de esfingomielinase D de *L. intermedia* foram obtidos. A toxina recombinante foi expressa como proteína de fusão de aproximadamente 32kDa com um tag de 6X His no sítio N-terminal. A proteína recombinante de *L. laeta* exibe propriedades biológicas similares ao veneno total ou de esfingomielinases purificadas, entretanto apresenta habilidade reduzida de ligação na superfície de eritrócitos.

Cinco isoformas da toxina dermonecrótica (fosfolipases D) do veneno de *L. intermedia* foram clonadas e expressas a partir da construção de uma biblioteca de cDNA. Através do sequenciamento de clones aleatórios obtidos da biblioteca de cDNA, cinco isoformas de fosfolipases D foram obtidas (LiRecDT1-5 - *Loxosceles intermedia Recombinant Dermonecrotic Toxin*) (CHAIM *et al.*, 2006; DA SILVEIRA *et al.*, 2006 e 2007). Através do alinhamento das sequências aminoacídicas entre as toxinas dermonecróticas recombinantes LiRecDT1, LiRecDT2 e LiRecDT3, foi observada similaridade estrutural entre estas toxinas embora suas atividades biológicas sejam diferentes. Esta análise por bioinformática demonstrou que os resíduos de aminoácidos envolvidos na catálise ou na coordenação do íon metálico importantes para a atividade esfingomielinásica estão conservados entre LiRecDT1, LiRecDT2 e LiRecDT3. Entretanto existem inúmeras substituições não-conservativas em LiRecDT3 próximas aos aminoácidos envolvidos com a atividade catalítica (fig. 3), as quais poderiam modificar características físico-químicas da proteína e conseqüentemente interferir nas suas atividades biológicas, descritas posteriormente neste trabalho (DA SILVEIRA *et al.*, 2006).

Atividade inseticida também foi encontrada em um grupo de toxinas (*Acylopolymine-like toxins*) presentes no veneno de *L. intermedia* e que são atribuídas à paralisia das presas, mediada pelo bloqueio da transmissão neuromuscular. Este grupo de toxinas foi avaliado contra *Spodoptera frugiperda* (Lepdoptera: Noctuidade),

2 OBJETIVOS

Objetivos gerais

Comparação das atividades biológicas e das características estruturais moleculares das toxinas dermonecróticas recombinantes LiRecDT1, LiRecDT2 e LiRecDT3 que compõem o veneno da aranha-marrom (*Loxosceles intermedia*).

Objetivos específicos

- Avaliar as propriedades biológicas das toxinas dermonecróticas recombinantes LiRecDT1, LiRecDT2 e LiRecDT3 presentes no veneno de *L. intermedia*.
- Analisar a homologia estrutural entre as toxinas dermonecróticas recombinantes LiRecDT1, LiRecDT2 e LiRecDT3.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

3.1.1 Reagentes

Os sais utilizados e o corante Vermelho Neutro foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha). A triptona e extrato de levedura utilizados foram provenientes da HiMedia (Mumbai, Índia). A ampicilina foi adquirida da USB (Cleveland, OH, EUA) e o IPTG adquirido da Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA). O soro fetal bovino foi adquirido da Cultilab (Campinas, Brasil) e os meios de cultura DMEM e HAM-F12 foram adquiridos da Gibco BRL (Bethesda, EUA). A Albumina de Soro Bovino (BSA), o ágar-ágar, o anticorpo secundário policlonal anti-IgG de camundongo e anti-IgG de coelho além dos marcadores de massa molecular para SDS-PAGE e o corante Azul de Coomassie foram adquiridos da Sigma (St. Louis, MO, USA). As membranas de nitrocelulose foram obtidas da Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, EUA). As placas de ELISA (96 poços - Polysorp® e Maxysorp®) foram compradas da Nalge Nunc International Corporation (Naperville, IL, EUA). Os substratos cromógenos OPD (o-fenilenodiamina) e BCIP/NBT são provenientes da Gibco BRL (Bethesda, EUA) e o peróxido de hidrogênio proveniente da Merck (Darmstadt, Alemanha).

Os experimentos envolvendo animais foram realizados de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care).

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Animais

Foram utilizados indivíduos adultos de *Loxosceles intermedia* coletados na cidade de Curitiba e região metropolitana e de exemplares fornecidos pelo LIPAPE (Laboratório Interdisciplinar de Pesquisa em Animais Peçonhentos) da UFPR.

Camundongos suíços e coelhos neozelandeses foram utilizados para os ensaios *in vivo* e para a obtenção de soro hiperimune ao veneno de *Loxosceles intermedia*. Estes animais ficaram acomodados em condições de temperatura constante ($21 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e luminosidade controlada (12 horas de claridade e 12 horas de escuridão). Todos os animais foram fornecidos pelo Biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR.

3.3 Cepas de *E. coli* e vetores de expressão

Para a clonagem e expressão das toxinas dermonecróticas foram utilizadas as seguintes cepas de *Escherichia coli*: DH5 α e BL21(DE3)pLysS (One Shot). O vetor de expressão utilizado foi pET-14b (CHAIM *et al.*, 2006, da SILVEIRA *et al.*, 2006 e 2007).

3.3.1 Transformação de células competentes

A transformação das bactérias cálcio-competentes foi realizada pela adição de 1 μ L da construção em plasmídeo pET-14b à 100 μ L de suspensão de BL21(DE3)pLysS quimicamente competentes. As soluções foram incubadas por 30 minutos em gelo e submetidas a um choque térmico imediato de 42 °C por 45 segundos e novamente mantidas em gelo por mais 2 minutos. Em seguida foram adicionados 900 μ L de meio líquido SOC. As suspensões de bactérias foram transferidas para tubos de aeração e incubadas à 37 °C sob agitação (300 rpm) por 60 minutos (CHAIM *et al.*, 2006, da SILVEIRA *et al.*, 2006 e 2007).

3.3.2 Plaqueamento em ágar LB das bactérias transformadas

As bactérias recuperadas após a transformação foram plaqueadas em meio LB ágar (triptona 10 g/L, extrato de levedura 5 g/L, cloreto de sódio 10 g/L, agar-ágar 15 g/L) suplementado com ampicilina e cloranfenicol (100 μ g/mL). O plaqueamento foi realizado com 100 μ L da cultura de bactérias. A placa com a suspensão bacteriana foi friccionada com alça de Gauss (estéril) até completa absorção (secagem) do líquido. A placa foi incubada a 37°C por 16 h (em incubadora tipo BOD 411 D, Nova Ética, Campinas, Brasil) e posteriormente armazenada a 4°C (CHAIM *et al.*, 2006, da SILVEIRA *et al.*, 2006 e 2007).

3.3.3 Expressão heteróloga das toxinas recombinantes LiRecDT1, LiRecDT2 e LiRecDT3 em sistema procariótico

As colônias transformadas foram previamente expandidas em 10 mL de meio líquido LB contendo ampicilina (100 μ g/mL) e cloranfenicol (34 μ g/mL) e posteriormente utilizadas para inocular volumes maiores de meio LB (1000 mL). Estas culturas, em larga escala, foram mantidas a 37°C com aeração constante, até D.O.₅₅₀=0,5. A indução da expressão das toxinas foi realizada pela adição de IPTG 0.05 mM e as culturas foram incubadas por um período de 3h $\frac{1}{2}$ à 30°C (CHAIM *et al.*, 2006, da SILVEIRA *et al.*, 2006 e 2007).

3.3.4 Purificação das proteínas recombinantes LiRecDT1, LiRecDT2 e LiRecDT3 em resina Ni-NTA agarose

Após a indução da expressão das toxinas recombinantes, as células foram sedimentadas por centrifugação e rompidas por ultra-som em tampão de extração (fosfato de sódio 20 mM, pH8,0; NaCl 500 mM; imidazol 10 mM). Após centrifugação adicional, o sobrenadante foi aplicado em uma coluna de Ni-NTA agarose para a purificação das proteínas recombinantes contendo a cauda de histidina. A coluna foi lavada exaustivamente em tampão de lavagem (fosfato de sódio 20 mM, pH8,0; NaCl 500 mM; imidazol 20 mM) e eluída em tampão de eluição (fosfato de sódio 20 mM, pH8,0; NaCl 500 mM; imidazol 250 mM). As frações obtidas foram analisadas por SDS-PAGE 12,5%, reunidas e dialisadas contra PBS 1x. As toxinas recombinantes purificadas foram dosadas pelo método de Bradford e mantidas a -80°C até o momento do uso (CHAIM *et al.*, 2006, da SILVEIRA *et al.*, 2006 e 2007).

3.4 Cultivo celular

A linhagem celular utilizada nos experimentos foi MDCK (Madin-Darby Canine Kidney). As células foram mantidas em cultura utilizando meio de cultivo DMEM/F12 (1:1) suplementados com 10% de soro fetal bovino (SFB), penicilina (10,000 IU/mL) e mantidas à temperatura de 37°C em estufa (SANYO, modelo MCO-1SAC) contendo 5% de CO₂. As alíquotas de células para estoque foram mantidas em meio DMEM/F12 acrescido de SFB a 50% e DMSO a 10% (Riedel), congeladas primeiramente à -80°C e mantidas em nitrogênio líquido (FRESHNEY, 1992).

3.4.1 Ensaio de citotoxicidade celular pelo método de captura do vermelho neutro

As células foram cultivadas em placas de 96 poços (aproximadamente 1000 células por poço) pelo período de 24 horas em meio de cultivo DMEM/F12 suplementado com SFB. O meio de cultivo com SFB foi removido e em seguida foi adicionado meio sem SFB contendo as toxinas recombinantes diluídas nas concentrações de 10 e 50 µg/mL em hexaplicata. Os poços referentes ao controle foram mantidos nas mesmas condições que os poços submetidos ao tratamento havendo substituição das toxinas recombinantes por PBS (pH 7,2).

Após os períodos de 24 e 48 horas de tratamento, o meio de cultivo foi removido e os poços lavados com PBS. Adicionou-se às células a solução do corante Vermelho Neutro (50 µg/mL) diluída em meio de cultivo suplementado com 10% de SFB. Após 3h de incubação à 37°C o corante foi removido e as células lavadas 2 vezes com solução

de formol-cálcio (200 μ L) e o corante eluído das células com ácido acético-etanol por 15 min. Em seguida a leitura da absorbância foi realizada em comprimento de onda de 540 nm em leitor ELISA (Bio-Rad, Madison, EUA).

3.5 Extração de veneno loxoscélico por eletrochoque

O veneno de *Loxosceles intermedia* foi obtido de aranhas adultas em condições apropriadas e submetidas à eletrochoque de 15 volts no cefalotórax como descrito por FEITOSA *et al.*, 1998. Após a coleta, o veneno foi diluído em PBS e mantido à temperatura de – 80 °C até o momento do uso.

3.6 Dosagem de proteínas pelo Método de Bradford (azul de Coomassie)

A dosagem da concentração de proteínas presentes no veneno total e nas toxinas recombinantes foi realizada através do método de Azul de Coomassie como descrito por BRADFORD (1976). A leitura da absorbância foi feita em comprimento de onda de 610 nm em leitor ELISA (Bio-Rad, Madison, EUA).

3.6.1 Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida na presença de SDS

As eletroforeses foram realizadas em géis de poliacrilamida (SDS-PAGE) com concentração de 12,5% em condições redutoras como descrito (LAEMMLI *et al.*, 1970). Para o ensaio de *western-blotting*, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose pelo período de 16 horas à 4°C em 25V, como descrito por TOWBIN *et al.* (1979).

3.6.2 Coloração de géis de poliacrilamida

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

3.6.3 Reações de *immunoblotting*

As membranas de nitrocelulose contendo o material para análise foram previamente bloqueadas utilizando tampão PBS/Molico (low fat milk) 5% (p/v), pelo período de uma hora e incubadas por duas horas à temperatura ambiente sob agitação

constante com anticorpo policlonal (10 µg/mL - IgG α-veneno total) diluído em PBS/Molico 5%. Em seguida foram feitas 10 lavagens com tampão PBS/molico e posteriormente foi adicionado anticorpo secundário por 1 hora (1:1000 - anti-IgG de coelho), conjugado à fosfatase alcalina e a reação revelada utilizando os cromógenos BCIP/NBT, conforme descrito por HARLOW & LANE (1988).

3.6.4 Reações de ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*)

A placa foi sensibilizada com 10 µg/mL das toxinas dermonecróticas recombinantes LiRecDT1, LiRecDT2, LiRecDT3 e com o veneno total de *L. intermedia* (100 µL) pelo período de 2 horas em “câmara úmida”. Em seguida os poços foram lavados com PBS 1X e bloqueados utilizando PBS 1X contendo 0,1% de BSA (200 µL) por 2 horas. Posteriormente foi adicionado anticorpo primário que reconhece o veneno total de *L. intermedia* (100 µL - 0,1µg/mL, 0,25µg/mL, 0,5µg/mL e 1µg/mL) por 2 horas em temperatura ambiente. Em seguida a placa foi lavada 5 vezes utilizando PBS-tween 0,01% (200 µL) e então foi adicionado o anticorpo secundário conjugado com peroxidase (100 µL - 1:10000 - anti-IgG de coelho) pelo período de 1 hora. Após a lavagem com PBS-tween 0,01%, foi realizada uma lavagem utilizando tampão citrato-peroxidase (200 µl - fosfato monossódico 50mM; ácido cítrico 24mM; pH 5,2). A reação colorimétrica foi revelada utilizando OPD e a leitura da absorbância em 490 nm (HARLOW & LANE, 1988).

3.6.5 Ensaio de mortalidade em camundongos induzida por LiRecDT1, LiRecDT2, LiRecDT3 e veneno total de *L. intermedia*

A mortalidade em camundongos induzida pelo veneno de *L. intermedia* é atribuída à fração dermonecrótica do veneno (FUTRELL, 1992; da SILVA *et al.*, 2004; BARBARO *et al.*, 1996).

Para demonstrar a atividade das toxinas no efeito de mortalidade, camundongos suíços (grupos de 5 animais) receberam por via intra-peritoneal 50 µg e 100 µg (para cada 30 g de peso corporal) de veneno total e toxinas recombinantes LiRecDT1, LiRecDT2 e LiRecDT3. Como controle negativo do experimento foi inoculada uma metaloprotease (toxina recombinante de *L. intermedia* que não possui atividade dermonecrótica). A mortalidade dos camundongos foi avaliada nos períodos de 24 horas e 48 horas, em intervalos de 1 hora.

3.6.6 Ensaio de atividade edematogênica de LiRecDT1, LiRecDT2, LiRecDT3 e veneno total de *L. intermedia*

Grupos de 5 camundongos foram inoculados por via subcutânea na pata direita com 5 µg de LiRecDT1, LiRecDT2, LiRecDT3 e veneno total de *L. intermedia* (diluídos em PBS 1X estéril). O grupo controle recebeu apenas PBS 1X. A formação de edema foi estimada através da medição do aumento da espessura da pata utilizando paquímetro, em diferentes intervalos de tempo (10min, 20min, 30min, 1h, 2h, 4h, 6h, 8h, 12h e 24h) (LOMONTE *et al.*, 1993).

3.6.7 Ensaio de atividade hemolítica de LiRecDT1, LiRecDT2, LiRecDT3 e veneno total de *L. intermedia*

Eritrócitos humanos ORh⁺ (5x10⁸ células por mL) diluídos em TEA-G (0,025M de trietanolamina, 5x10⁻⁴ M de MgSO₄, 1,5x10⁻⁴ M de CaCl₂, 0,05% de gelatina, pH 7,4) foram adicionados a 200 µL de LiRecDT1, LiRecDT2, LiRecDT3 e veneno total de *L. intermedia* na concentração de 8 µg/mL em tampão TEA-G. Após a incubação pelo período de 1h à 37°C, os eritrócitos foram lavados utilizando tampão TEA-G e em seguida resuspendidos em 400µl de TEA-G e posteriormente incubados com 100 µL de soro humano (ORh⁺) pelo tempo de 1h à 37°C. A leitura da absorbância das amostras foi feita em 541 nm em leitor ELISA (Bio-Rad, Madison, EUA). Como controle negativo para a reação foi utilizado veneno total de *Phoneutria sp.*

3.6.8 Experimento de dicroísmo circular (DC) das toxinas LiRecDT1, LiRecDT2 e LiRecDT3

Para realizar a medição do espectro de dicroísmo circular, as toxinas dermonecróticas recombinantes LiRecDT1, LiRecDT2 e LiRecDT3 foram dialisadas à 4°C contra tampão contendo 10 mM de fosfato de sódio, pH 7,4. O espectro foi coletado em espectropolarímetro Jasco J-810 (Jasco Corp., Tóquio, Japão) utilizando cubeta de 1 mm de espessura. Cada espectro (intervalo de 0,5 nm) consistiu na média de 8 medições realizadas na taxa de 50 nm/min utilizando tempo de resposta de 8 segundos e largura da banda de 1 nm. A temperatura foi mantida constante (25°C). As estruturas secundárias das toxinas dermonecróticas recombinantes foram estimadas utilizando o software Dichroprot 2000 1.0.4 através do método Self Selcon 3 (DELEAGE & GEOURJON, 1993).

3.7 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando análise de variância (ANOVA) sendo as médias comparadas utilizando o teste T de Student, através do software GraphPad InStat (versão 3.0 / Windows 2000). Os valores \pm erro padrão da média (EPM) foram utilizados (*P \leq 0,05, **P \leq 0,01, ***P \leq 0,001).

4 RESULTADOS

4.1 Análise comparativa dos efeitos das toxinas dermonecróticas recombinantes LiRecDT1, LiRecDT2 e LiRecDT3 sobre a viabilidade celular e morfologia em linhagem MDCK

Em relação ao ensaio de morfologia, o tratamento com as toxinas LiRecDT1 e LiRecDT2 induziu a formação de vacúolos no citoplasma, alteração do espalhamento celular e perda da adesão célula-célula e também em relação ao substrato (fig. 4). Não foram observados os efeitos de alteração da morfologia nas células MDCK em relação ao tratamento com a toxina dermonecrótica recombinante LiRecDT3. A morfologia das células MDCK tratadas com LiRecDT3 mostrou-se semelhante à morfologia das células dos poços controle (fig. 4). O efeito citotóxico e de alteração da morfologia celular vêm confirmar os dados histopatológicos recentemente publicados que demonstram injúria renal por ação de LiRecDT1, além de reforçar a idéia de similaridade entre as toxinas dermonecróticas recombinantes LiRecDT1 e LiRecDT2 (da SILVA *et al.*, 2004, CHAIM *et al.*, 2005, da SILVEIRA *et al.*, 2006 e 2007).

Com o intuito de corroborar os dados que demonstram o efeito citotóxico direto em células renais provocado pelo veneno total e pela toxina LiRecDT1, células epiteliais de rim (MDCK) foram incubadas com as toxinas dermonecróticas LiRecDT1, LiRecDT2 e LiRecDT3 nas concentrações de 10 µg/mL e 50 µg/mL, e avaliadas no período de 24 horas e 48 horas após a incubação. Como mostrado na figura 5, o experimento de viabilidade celular indicou alterações significativas na viabilidade das células tratadas com o veneno total, LiRecDT1 e LiRecDT2 em relação ao controle negativo. Em contrapartida não houve redução da viabilidade celular das células tratadas com a toxina LiRecDT3.

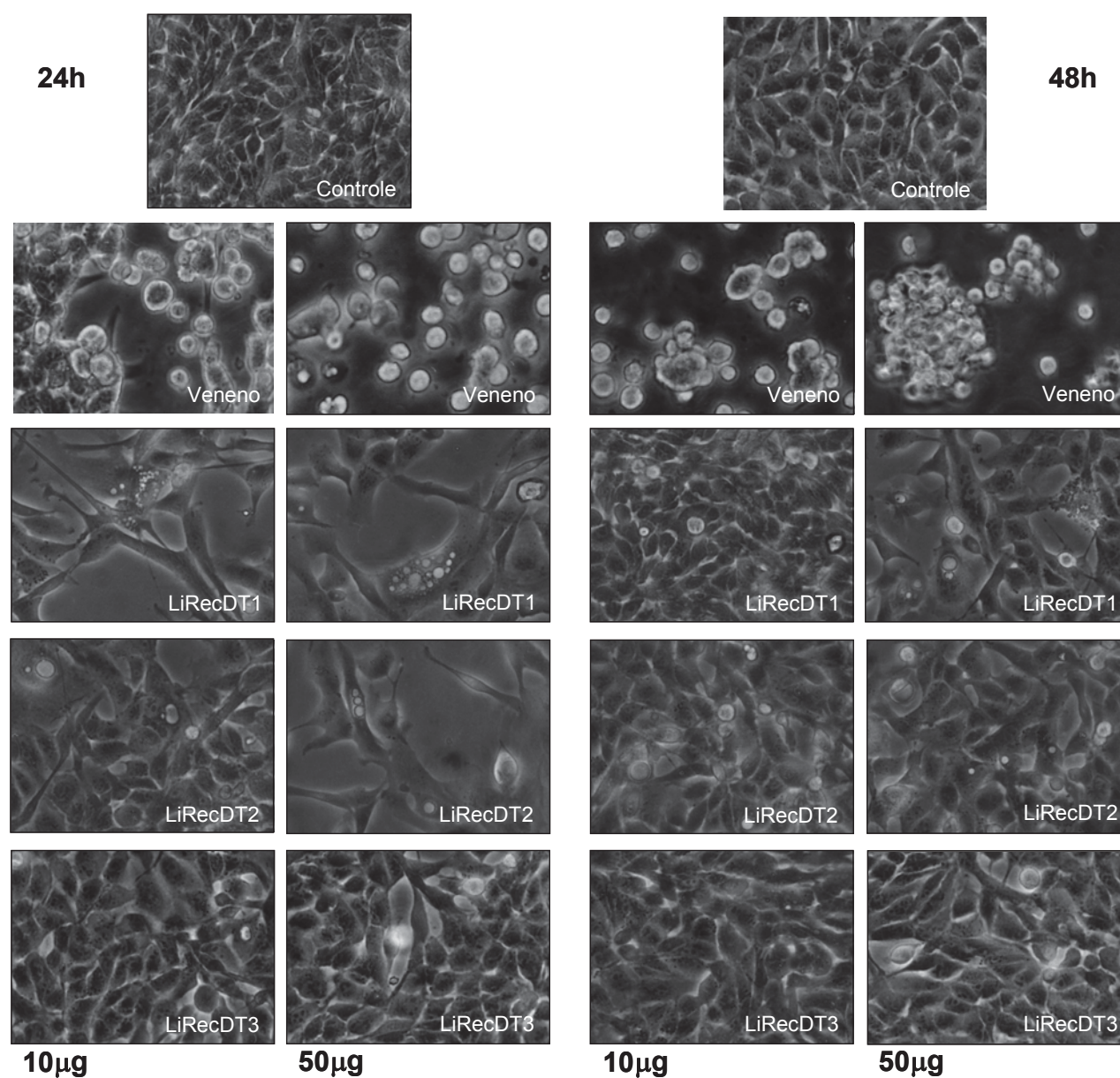


Figura 4. Efeito de LiRecDT1, LiRecDT2, LiRecDT3 e veneno total na morfologia de células epiteliais tubulares (MDCK). Células MDCK expostas às toxinas dermonecróticas recombinantes e ao veneno total foram observadas em microscópio invertido nos períodos de 24h e 48h após o tratamento. As toxinas dermonecróticas recombinantes LiRecDT1, LiRecDT2 e o veneno total induziram vacuolização do citoplasma, formação de bolhas, alteração do espalhamento celular e a perda da adesão célula-célula e ao substrato. O tratamento com LiRecDT3 não provocou alteração da morfologia das células MDCK. Magnificação: 200X.

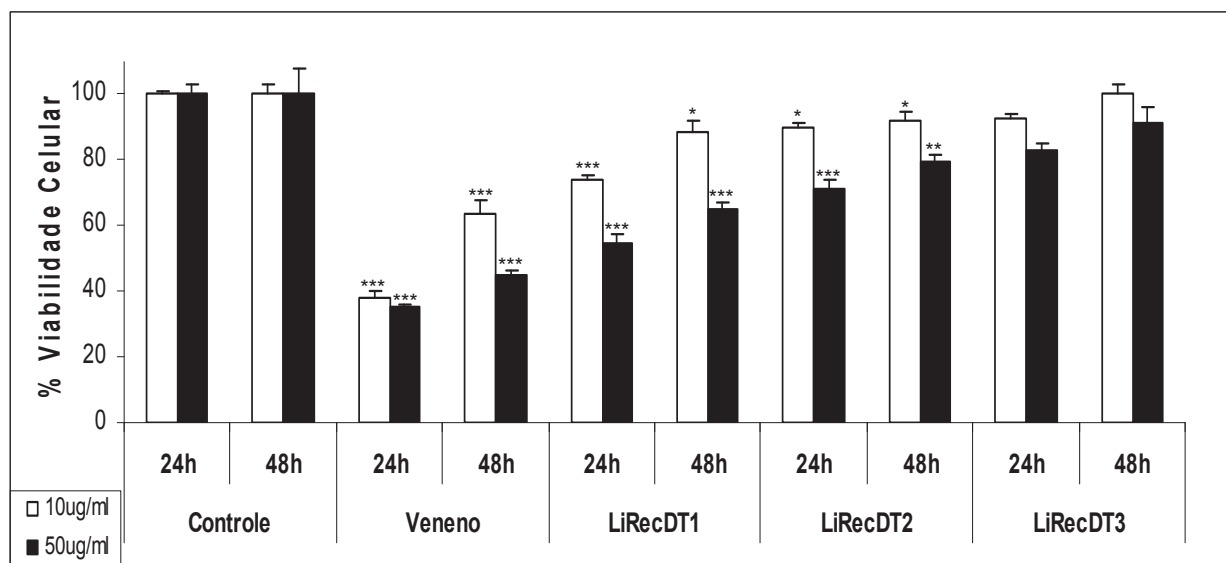


Figura 5. Ensaio de citotoxicidade pelo método do vermelho neutro. O efeito citotóxico das toxinas dermonecróticas LiRecDT1, LiRecDT2 e LiRecDT3 foi determinado após 24h e 48h nas concentrações de 10 µg/mL e 50 µg/mL. O experimento foi realizado em hexaplicata e os valores dados pela média ± SEM. A significância é definida como * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$).

4.2 Atividade hemolítica das toxinas dermonecróticas de *L. intermedia*

Com o objetivo de avaliar a atividade hemolítica dependente de complemento das toxinas dermonecróticas recombinantes LiRecDT1, LiRecDT2, LiRecDT3 e do veneno de *L. intermedia*, foi realizado um ensaio de hemólise. Eritrócitos humanos foram incubados com 10 µg/ml de toxina dermonecrótica recombinante (ou veneno total) pelo período de 1h à 37°C e posteriormente incubados com soro (1h à 37°C). Os resultados dos experimentos mostraram que houve hemólise de 100% para o veneno total de *Loxosceles intermedia*, em comparação com o controle negativo (veneno total de *Phoneutria sp.*), e em relação às toxinas recombinantes LiRecDT1 e LiRecDT2 o efeito hemolítico foi similar exibindo 33%. Em contrapartida, a toxina LiRecDT3 produziu apenas efeito hemolítico reduzido (5,8%). Os dados estão representados na figura 6).

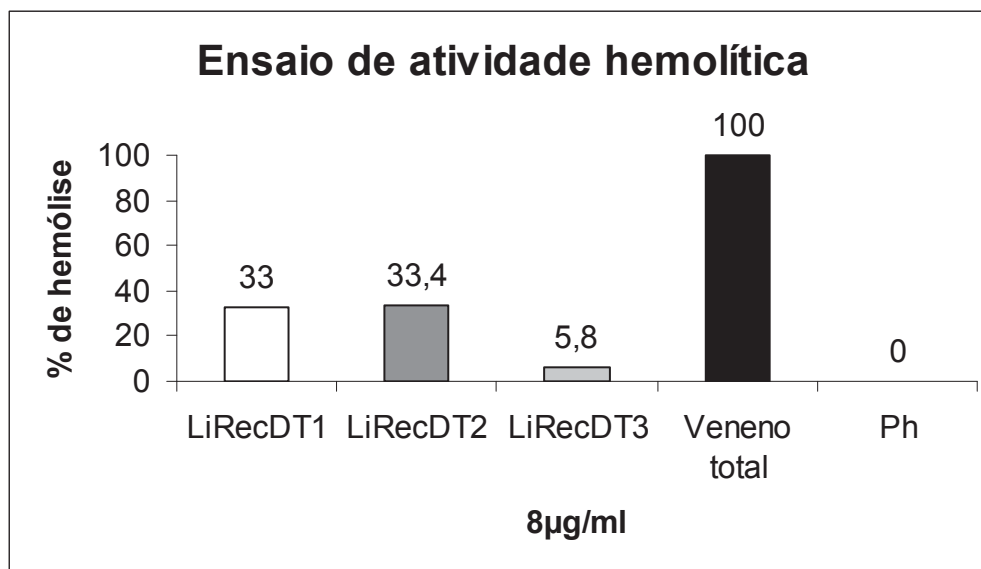


Figura 6. Ensaio de atividade hemolítica. Os resultados demonstraram efeito hemolítico de 100% para o veneno total de *Loxosceles*, em comparação com o controle negativo (Ph - veneno total de *Phoneutria sp.*). O efeito de hemólise para as toxinas recombinantes LiRecDT1 e LiRecDT2 foi de 33%. Em relação à toxina LiRecDT3 houve hemólise de 5,8%.

4.3 Ensaio de atividade edematogênica das toxinas dermonecroticas recombinantes

Alterações histopatológicas causadas pelas toxinas dermonecroticas incluindo a formação de edema na derme, a presença de um infiltrado de células inflamatórias e alterações na integridade dos vasos sanguíneos têm sido reportados na literatura (SUNDERKÖTTER *et al.*, 2001; da SILVA *et al.*, 2004; da SILVEIRA *et al.*, 2007). Para avaliar o potencial das toxinas dermonecroticas recombinantes na participação da formação de edema, a injeção intradérmica de 5 µg das toxinas dermonecroticas LiRecDT1, LiRecDT2 e LiRecDT3 e de veneno total foi administrada na pata traseira de camundongos, sendo a formação de edema acompanhada no período de 24 horas (LOMONTE *et al.*, 1993).

Aumento na espessura da pata foi observado rapidamente após a inoculação das toxinas LiRecDT1, LiRecDT2 e veneno total sendo o pico nos primeiros 20 minutos. Após 20 minutos a atividade edematogênica de LiRecDT1, LiRecDT2 e veneno total se reduz gradativamente e desaparece por completo no tempo de 24

horas. Em contraste, a inoculação de LiRecDT3 promoveu atividade edematogênica reduzida e transitória no período observado (fig. 7).

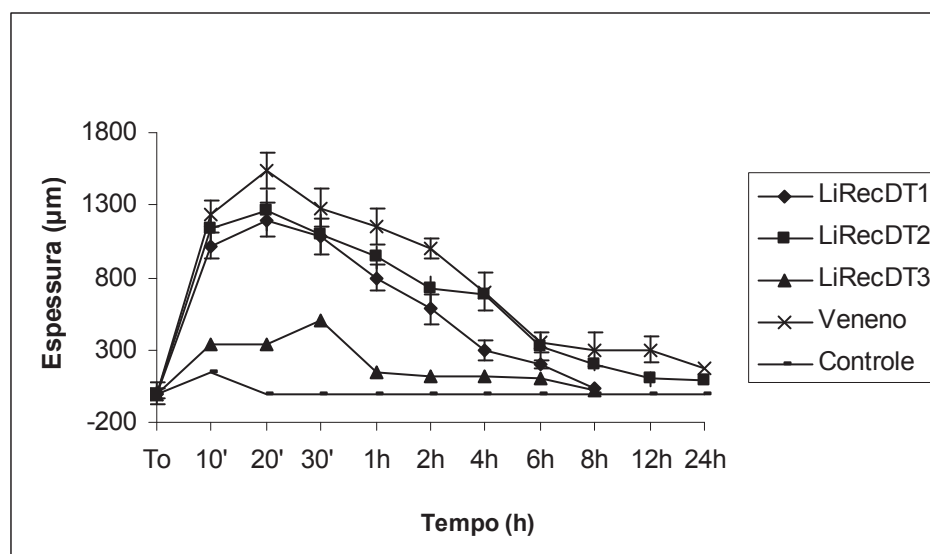


Figura 7. Ensaio de atividade edematogênica. Cada ponto da figura representa os valores dados pela média \pm SEM (n=5) no período de 24h de estudo após inoculação de 5 μ g de veneno total e de toxinas dermonecróticas. A capacidade de provocar edema foi significativa ($p < 0,05$) para as toxinas LiRecDT1, LiRecDT2 e veneno. Não foi observada diferença significativa em relação à toxina LiRecDT3 e ao controle negativo (injeção de PBS).

4.4 Ensaio de letalidade em camundongos induzida por toxinas dermonecróticas recombinantes de *L. intermedia*

O efeito de letalidade do veneno de *L. intermedia* é atribuído à sua fração dermonecrótica (FUTRELL, 1992; BARBARO *et al.*, 1996; da SILVA *et al.*, 2004). Com o objetivo de demonstrar a participação das toxinas dermonecróticas neste efeito e avaliar a funcionalidade das toxinas recombinantes, camundongos suíços foram expostos às toxinas LiRecDT1, LiRecDT2 e LiRecDT3, além do veneno total nas concentrações de 50 μ g e 100 μ g (para cada 30 g de peso corporal). A taxa de mortalidade foi determinada após o período de 24h e 48h de observação. O veneno total e as toxinas LiRecDT1, e LiRecDT2 induziram mortalidade em camundongos mesmo com a menor dose inoculada (50 μ g) no período de 24h. A inoculação da toxina LiRecDT3, bem como a inoculação de uma toxina recombinante que não possui atividade dermonecrótica (controle negativo), não provocou mortalidade nos animais (resultados demonstrados na tabela 1).

Mortalidade (%)	50µg		100µg	
	24h	48h	24h	48h
Veneno total	3/5 (60%)	5/5 (100%)	5/5 (100%)	5/5 (100%)
LiRecDT1	2/5 (40%)	3/5 (60%)	3/5 (60%)	5/5 (100%)
LiRecDT2	3/5 (60%)	3/5 (60%)	3/5 (60%)	5/5 (100%)
LiRecDT3	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)
Controle negativo	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)

Tabela 1. Efeito de mortalidade em camundongos expostos às toxinas dermonecróticas recombinantes LiRecDT1, LiRecDT2, LiRecDT3 e ao veneno total de *L. intermedia*.

4.5 Ensaios de reatividade imunológica cruzada das toxinas dermonecróticas recombinantes

Com o intuito de reforçar a similaridade entre as toxinas dermonecróticas demonstrada pelo alinhamento das sequências nucleotídicas (DA SILVEIRA *et al.*, 2006), foram realizados ensaios de reatividade cruzada através de *immunoblotting* (reconhecimento de epítomos lineares) e ensaio de ELISA de captura (reconhecimento de epítomos conformacionais) com as toxinas recombinantes LiRecDT1, LiRecDT2 e LiRecDT3. Foi utilizada IgG purificada (produzida em coelho) que reconhece o veneno total de *L. intermedia* (α -VN).

No experimento de *immunoblotting*, as toxinas foram submetidas à SDS-PAGE 12,5% sob condições redutoras (2,5 µg de proteína), transferidas para membrana de nitrocelulose e imunomarcadas com IgG anti-veneno total de *L. intermedia* (fig. 8A).

No ensaio de ELISA, as placas foram sensibilizadas com 10 µg/mL das toxinas dermonecróticas recombinantes LiRecDT1, LiRecDT2, LiRecDT3 e com o veneno de *L. intermedia*. As toxinas LiRecDT1, LiRecDT2 e LiRecDT3 foram incubadas com anticorpos policlonais que reconhecem o veneno total de *L. intermedia*, nas concentrações de 0,1 µg/mL, 0,25 µg/mL, 0,5 µg/mL e 1 µg/mL. A ordem decrescente de reatividade observada foi: LiRecDT1, LiRecDT2, veneno total e LiRecDT3 (fig. 8B).

Os resultados destes ensaios demonstraram que há reatividade cruzada entre LiRecDT1, LiRecDT2 e LiRecDT3 devido a similaridade de epítomos entre as toxinas

dermonecróticas recombinantes, através do reconhecimento pelo anti-soro produzido contra o veneno total e que este contém proteínas nativas similares às toxinas dermonecróticas.

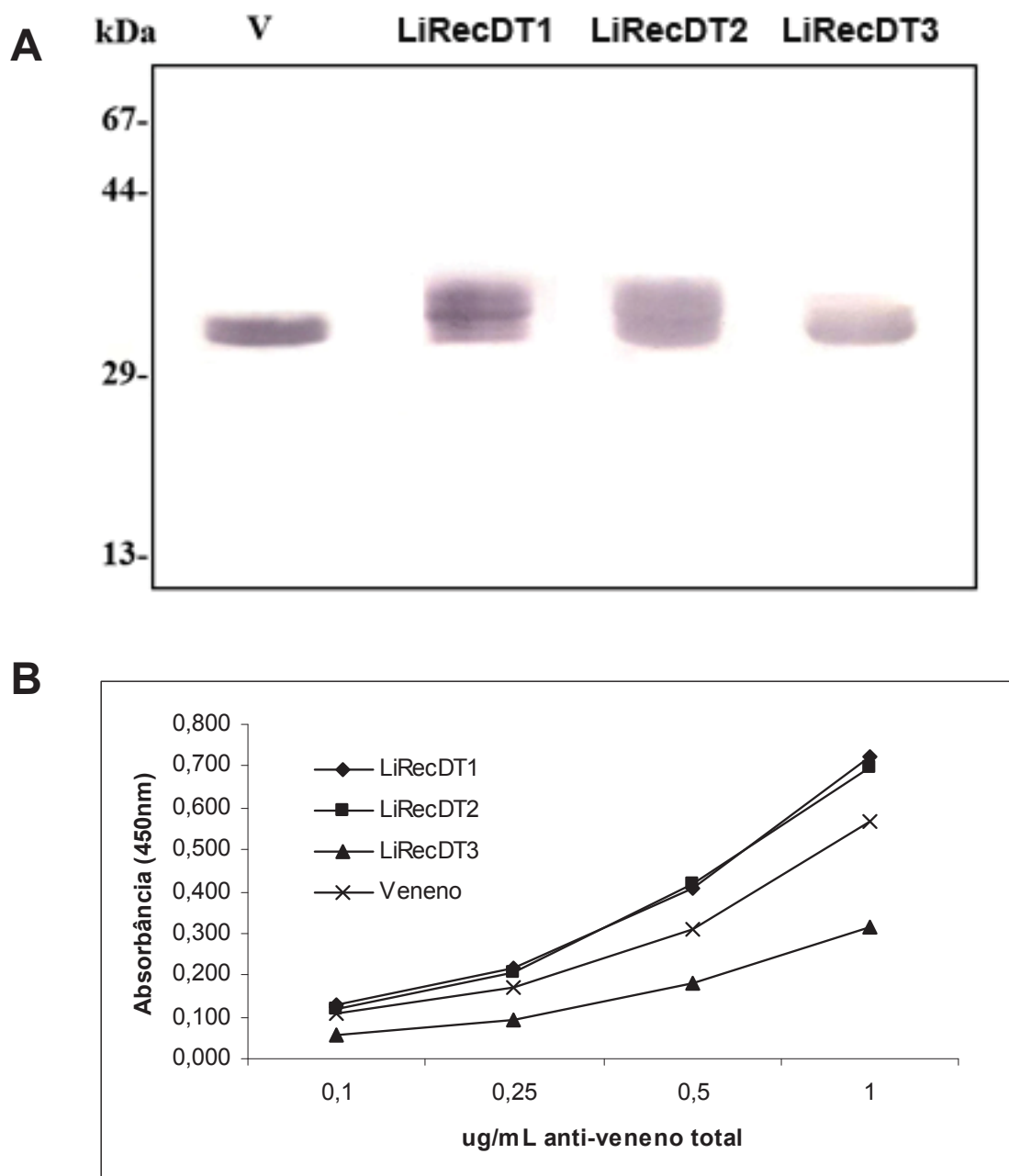


Figura 8. Ensaio de reatividade cruzada das toxinas dermonecróticas recombinantes LiRecDT1, LiRecDT2, LiRecDT3 e do veneno total de *L. intermedia*. (A) As toxinas dermonecróticas recombinantes LiRecDT1, LiRecDT2, LiRecDT3 e o veneno total na concentração de 2,5 μ g foram separados por SDS-PAGE (12,5%) sob condições redutoras, transferidas para membranas de nitrocelulose as quais foram expostas a anticorpos purificados que reconhecem o veneno total. Os marcadores moleculares são mostrados na esquerda da figura. (B) Ensaio de reatividade cruzada por ELISA das toxinas dermonecróticas recombinantes e veneno total utilizando IgG de coelho purificada que reconhece o veneno total de *L. intermedia*.

4.6 Avaliação do dicroísmo circular das toxinas dermonecróticas recombinantes LiRecDT1, LiRecDT2 e LiRecDT3

Com o objetivo de analisar a similaridade estrutural e a conformação correta das toxinas dermonecróticas recombinantes, foi realizado o espectro de dicroísmo circular (DC) de LiRecDT1, LiRecDT2 e LiRecDT3. O Espectro de DC foi coletado na região de 190-260 nm. A análise de deconvolução foi obtida utilizando o software Dichroprot 2000 1.0.4. As toxinas dermonecróticas LiRecDT1 e LiRecDT2 (que apresentam atividades biológicas) mostraram similaridade nos espectros obtidos (fig. 9). Na tabela 2 estão demonstradas as diferentes frações dos elementos de estrutura secundária para as toxinas dermonecróticas recombinantes LiRecDT1, LiRecDT2 e LiRecDT3. A análise de deconvolução da toxina recombinante LiRecDT3 mostrou um aumento significativo na fração de α -hélice (27,5%), enquanto o conteúdo de folha- β (16,3%) mostrou uma diminuição em comparação com as isoformas ativas LiRecDT1 (α -hélice: 22,3%; β -sheet: 21,5%) e LiRecDT2 (α -hélice: 24,8%; folha- β : 19,4%), sugerindo que provavelmente esta toxina tenha uma conformação molecular diferente de LiRecDT1 e LiRecDT2. A comprovação será realizada por cristalografia e difração de raios X.

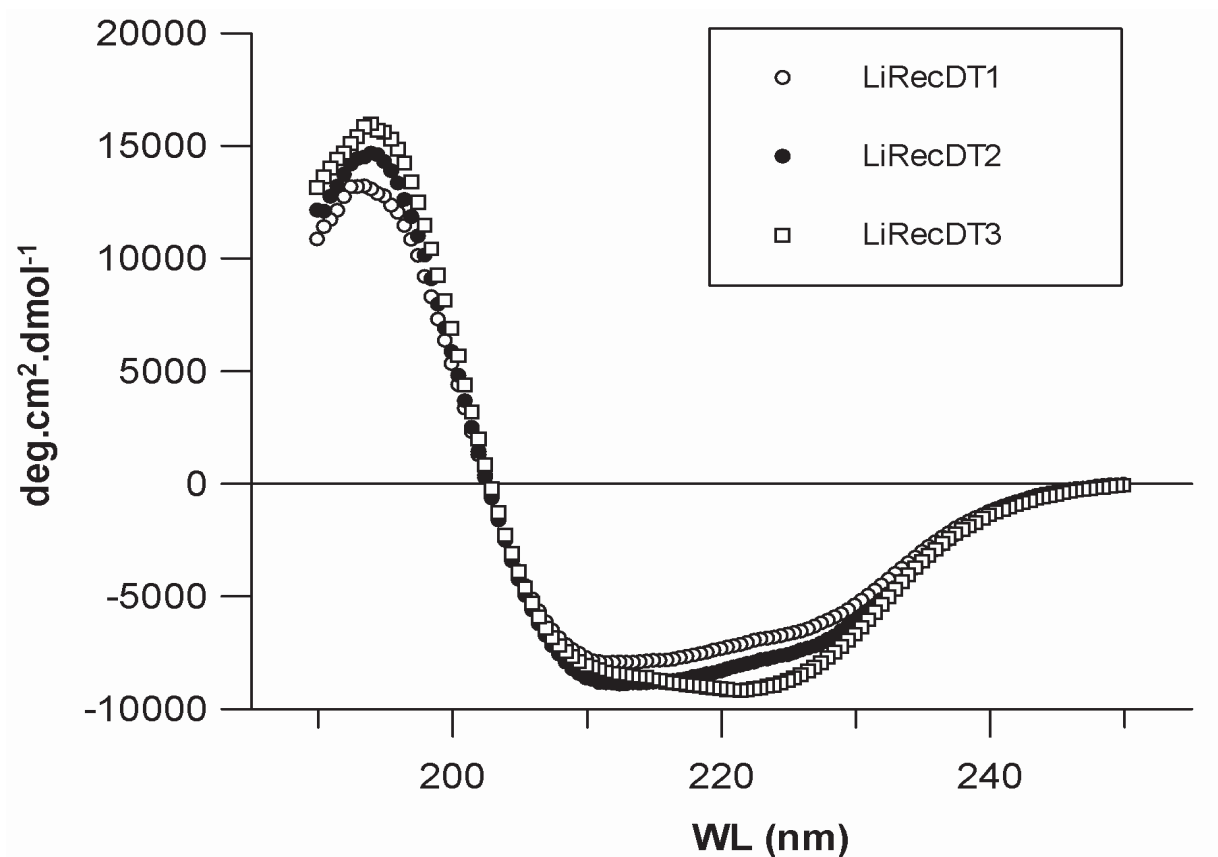


Figura 9. Espectro de dicroísmo circular das toxinas dermonecroticas recombinantes LiRecDT1, LiRecDT2 e LiRecDT3. O espectro foi obtido utilizando as toxinas em tampão contendo 10 mM de fosfato de sódio, pH 7,4, à 25°C. A estimativa da estrutura secundária foi realizada utilizando o software Dichroprot 2000 1.0.4.

PROTEÍNA RECOMBINANTE	α-hélice (%)	folha-β (%)	β-turn (%)	Outras (%)
<i>LiRecDT1</i>	22,3	21,5	12,9	39,5
<i>LiRecDT2</i>	24,8	19,4	12,9	40,2
<i>LiRecDT3</i>	27,5	16,3	13,8	39,8

Tabela 2. Conteúdos de estrutura secundária das toxinas dermonecroticas recombinantes LiRecDT1, LiRecDT2 e LiRecDT3 determinadas pelo dicroísmo circular.

5. DISCUSSÃO

Publicações recentes têm dado suporte à idéia de que as toxinas dermonecróticas presentes no veneno de *L. intermedia* são componentes de uma família de toxinas produzidas por espécies do gênero *Loxosceles*. Através de análises imunológicas foi encontrada reatividade cruzada entre as toxinas dermonecróticas de diferentes espécies de *Loxosceles* como *L. intermedia*, *L. laeta* e *L. gaucho* (BARBARO *et al.*, 1996), além de homologia entre as toxinas dermonecróticas de *L. reclusa* e *L. deserta* (GOMEZ *et al.*, 2001). Resultados provenientes de análise proteômica deram suporte a esta afirmação por demonstrar a presença de 11 isoformas de toxina dermonecrótica no veneno de *L. gaucho* (MACHADO *et al.*, 2005).

Foram encontradas no veneno de *L. intermedia* cinco fosfolipases D (LiRecDT1-5) pertencentes à família de toxinas dermonecróticas identificadas com base na predição da sequência aminoacídica através do cDNA, demonstrado por DA SILVEIRA *et al* (2007). A sequência primária destas toxinas mostra uma seqüência-sinal seguida da sequência da proteína madura. Além da análise comparativa por bioinformática entre as cinco isoformas de fosfolipases D, a similaridade estrutural entre as toxinas LiRecDT1, LiRecDT2 e LiRecDT3 foi confirmada por ensaios imunológicos. No experimento de *immunoblotting* foi observada reatividade cruzada entre as três isoformas (fig. 8) ao se utilizar anticorpos que reconhecem o veneno total de *L. intermedia*. Este dado sugere que há conservação antigênica entre as toxinas dermonecróticas recombinantes e que estas proteínas são similares às toxinas nativas presentes no veneno de *L. intermedia*. Os dados provenientes do ensaio de ELISA (fig. 8B) corroboram com os dados de *immunoblotting* e demonstram reatividade cruzada entre as toxinas recombinantes superior à reatividade do veneno total, sendo esta maior para LiRecDT1, LiRecDT2 e em seguida LiRecDT3, sugerindo que os epítomos presentes nessas toxinas são fortes determinantes antigênicos, além de inferir a existência de sub-famílias de toxinas dermonecróticas intra-espécie como proposto anteriormente por DA SILVEIRA *et al* (2006). Na figura 8 ficou evidenciado que LiRecDT3 possui menor reatividade cruzada do que LiRecDT1 e LiRecDT2. Esta diferença é provavelmente decorrente da estrutura conformacional e da presença de diferentes epítomos nesta toxina. Por outro lado a habilidade de LiRecDT3 em deflagrar intensa resposta inflamatória, entretanto sem provocar lesão dermonecrótica pode ser devido a mecanismos ainda não conhecidos envolvidos em tais atividades (DA SILVEIRA *et al.*, 2006). A atividade reduzida de LiRecDT3 com relação à atividade

fosfolipásica e distúrbios vasculares torna esta toxina efetiva na indução de resposta inflamatória, entretanto o número de células inflamatórias recrutadas não é suficiente para causar dermonecrose, dessa forma induzindo apenas eritema no local da inoculação (DA SILVEIRA *et al.*, 2007). Embora não tenha sido demonstrado correlação direta entre a atividade esfingomielinásica e dermonecrose, é possível a existência de correlação destas atividades. Esta hipótese é sustentada pelo fato das esfingomielinases serem capazes de gerar ácido lisofosfatídico, que entre outras atividades, promove a indução de resposta inflamatória e agregação plaquetária (FUTRELL, 1992; da SILVA *et al.*, 2004; LEE & LYNCH, 2005).

Embora sejam diferentes as atividades biológicas de LiRecDT1 e LiRecDT2 em relação à LiRecDT3, os resíduos de aminoácidos envolvidos na catálise ou na coordenação do íon metálico importantes para a atividade esfingomielinásica estão conservados nessas toxinas (DA SILVEIRA *et al.*, 2006). Uma suposta explicação para as diferenças de atividade descritas poderia residir na alta similaridade entre LiRecDT2 e LiRecDT1 (89%) e na similaridade reduzida entre LiRecDT3 e LiRecDT1 (apenas 45%), decorrente de substituições de aminoácidos. Existem inúmeras substituições não-conservativas em LiRecDT3 próximas aos aminoácidos envolvidos com a atividade catalítica. Essas substituições poderiam modificar características físico-químicas do sítio catalítico e da proteína como um todo (DA SILVEIRA *et al.*, 2006). A análise de uma toxina dermonecrótica de *L. laeta* através de cristalografia, permitiu a MURAKAMI *et al.* (2006) a proposição de uma classificação das toxinas dermonecróticas de *Loxosceles* (em relação à atividade enzimática, baseado em dados bioquímicos e estruturais anteriormente obtidos de isoformas de *L. boneti* (RAMOS-CERRILLO *et al.*, 2004). Dessa forma as esfingomielinases de *Loxosceles* poderiam ser classificadas em classe I e classe II. As toxinas pertencentes à classe I apresentam apenas 1 ligação dissulfeto intracadeia e um "loop" hidrofóbico estendido. E as moléculas de classe II, contendo uma ligação dissulfeto adicional, a qual poderia unir um "loop" variável mais curto ao "loop" catalítico. De acordo com esta classificação ainda haveria uma subdivisão da classe II de fosfolipases em IIa, compreendendo moléculas capazes de hidrolisar esfingomielina e IIb como não capazes de promover hidrólise.

A atividade catalítica das toxinas da classe IIb seria menor possivelmente pelas substituições nas posições 95 (Gly → Asn) e 134 (Pro → Glu) destas moléculas, o que modificaria o ambiente físico-químico nas proximidades do sítio ativo. Com base nesta classificação as 3 isoformas de toxina dermonecrótica de *L. intermedia* analisadas, pertenceriam à classe II por apresentarem 4 resíduos de cisteína que poderiam estar

envolvidos com a formação de 2 ligações dissulfeto. As toxinas LiRecDT1 e LiRecDT2 pertenceriam ao tipo IIa e LiRecDT3 ao tipo IIb (devido a reduzida atividade enzimática e biológica além da presença de substituições Gly por Asn na posição 122, e na substituição de Pro por Glu na posição 161). Embora não seja possível inserir as isoformas LiRecDT4 e LiRecDT5 nesta classificação, a atividade intermediária de LiRecDT4 (que apresenta apenas a substituição de Gly122 → Asn) e a atividade residual da LiRecDT5, a qual apresenta apenas a substituição de Gly122 por Lys pode de certa forma explicar essas diferenças de atividade.

Dados estimativos referentes à estrutura secundária das toxinas dermonecróticas recombinantes, obtidos através do experimento de dicroísmo circular, estão representados na tabela 2 e reforçam as diferenças estruturais entre LiRecDT1 e LiRecDT2, comparadas com LiRecDT3. O conteúdo dos elementos de estrutura secundária α -hélice e folha- β se mostraram similares entre as toxinas recombinantes LiRecDT1 (α -hélice: 22,3%; folha- β : 21,5%) e LiRecDT2 (α -hélice: 24,8%; folha- β : 19,4%). O espectro de dicroísmo circular de LiRecDT3 mostrou-se diferente dos espectros das toxinas dermonecróticas recombinantes LiRecDT1 e LiRecDT2 (fig. 9), as quais possuem atividade biológica. Houve diferenças significativas na estimativa das estruturas secundárias para LiRecDT3 em relação à LiRecDT1 e LiRecDT2. Foi observado para LiRecDT3 um aumento significativo no conteúdo de α -hélice (27,5%) e decréscimo no conteúdo de folha- β (16,3%) em comparação com os valores referentes à LiRecDT1 (α -hélice: 22,3%; folha- β : 21,5%) e LiRecDT2 (α -hélice: 24,8%; folha- β : 19,4%). Estes resultados juntamente com os dados de similaridade por análise filogenética (89% entre LiRecDT1 e LiRecDT2 e 45% entre LiRecDT1 e LiRecDT3) evidenciam a correlação entre a homologia estrutural das toxinas dermonecróticas recombinantes LiRecDT1 e LiRecDT2 comparadas com LiRecDT3, em relação ao grau de suas atividades biológicas.

Evidências de funcionalidade e similaridade das moléculas LiRecDT1, LiRecDT2 e LiRecDT3 recentemente publicadas na literatura consistem na atividade inflamatória desencadeada pelas toxinas, efeito dermonecrótico, atividade esfingomielinásica, indução na agregação plaquetária e de alteração da permeabilidade vascular (da SILVA *et al.*, 2004; CHAIM *et al.*, 2006; DA SILVEIRA *et al.*, 2007). Estudos histológicos de amostras de pele coletadas após inoculação das toxinas dermonecróticas LiRecDT1 e LiRecDT2 também apontam para sua funcionalidade, sendo a histopatologia similar em comparação com a aplicação do veneno total, ocorrendo edema, exsudação proteinácea e recrutamento de células inflamatórias além

de inchaço, eritema, isquemia e necrose (FUTRELL, 1992; VEIGA *et al.*, 2001; OSPEDAL *et al.*, 2002; ZANETTI *et al.*, 2002).

Ao reportar dados da indução de agregação plaquetária provocada pelo veneno de *L. intermedia* por da SILVA *et al.* (2004) e que está atribuída à fração dermonecrótica presente neste, um ensaio de agregação plaquetária *in vitro* foi realizado. A utilização das toxinas LiRecDT1 e LiRecDT2 demonstraram atividade de agregação plaquetária semelhante a do veneno total, sendo reduzida a atividade obtida com LiRecDT3 em comparação com as demais toxinas (DA SILVEIRA *et al.*, 2007). No ensaio de mortalidade em camundongos apenas as toxinas LiRecDT1 e LiRecDT2 provocaram a morte dos animais no período de 24 horas (Tabela 1). Os animais expostos às toxinas LiRecDT1 e LiRecDT2 apresentaram letargia, tremor e postura de estiramento do corpo (o que sugere desconforto físico). A toxina LiRecDT3 que apresenta apenas 45% de identidade estrutural com a toxina LiRecDT1 (a qual apresenta intensa atividade biológica e que reproduz de modo similar os efeitos provocados pelo veneno total), não induziu mortalidade e nem alteração do comportamento nos animais. Em contrapartida, a similaridade de LiRecDT2 em relação à LiRecDT1 é de 89%, justificando o efeito de letalidade em camundongos. Este experimento em conjunto com os resultados provenientes da agregação plaquetária reforça as diferenças na atividade biológica das toxinas recombinantes e corrobora com os dados de homologia publicados (DA SILVEIRA *et al.*, 2006).

O mecanismo envolvido na atividade hemolítica do veneno de *L. intermedia* é um evento indireto e que depende da via alternativa do sistema complemento. Este efeito é provocado pelas toxinas dermonecróticas presentes no veneno, através de sua atividade de fosfolipase D. Os resultados obtidos no ensaio hemolítico (fig. 6) mostraram atividade de hemólise para o veneno total de *L. intermedia* (100%) e de 33% para as toxinas LiRecDT1 e LiRecDT2 (FUTRELL, 1992; TAMBOURGI *et al.*, 1995; DA SILVA *et al.*, 2004). O efeito hemolítico semelhante entre LiRecDT1 e LiRecDT2 corrobora com os demais ensaios realizados, reafirmando a similaridade estrutural e a conservação antigênica entre estas duas toxinas dermonecróticas em comparação com LiRecDT3, a qual apresentou reduzida atividade hemolítica (5,8%). TAMBOURGI *et al.* (2000) demonstraram o potencial hemolítico inferindo que o veneno de *L. intermedia* promove a clivagem de uma metaloprotease endógena que por sua vez atua sobre glicoforinas da superfície dos eritrócitos, facilitando a lise mediada pelo sistema complemento. Nos casos de loxoscelismo sistêmico, a ocorrência de hemólise intravascular e anemia hemolítica é decorrente desta propriedade hemolítica do veneno

(FUTRELL, 1992; WILLIAMS *et al.*, 1995; DA SILVA *et al.*, 2004; SWANSON e VETTER, 2006).

Como dito anteriormente, as substituições semi-conservativas ou não conservativas de aminoácidos que promovem desestabilização ou desorganização do sítio catalítico podem explicar as diferenças na funcionalidade das toxinas dermonecróticas. Além disso, estudos com base em análise filogenética demonstraram a similaridade da toxina LiRecDT2 com outras toxinas de *L. intermedia* com intensa atividade biológica, incluindo a toxina LiRecDT1. Por outro lado a toxina LiRecDT3 está classificada em uma sub-família diferente a qual inclui toxinas de *L. boneti* e *L. laeta*, para as quais não foram descritas atividades biológicas (DA SILVEIRA *et al.*, 2006).

Alterações histopatológicas consistindo no recrutamento de células inflamatórias, alterações na integridade dos vasos sanguíneos e a formação de edema na derme têm sido reportados na literatura (SUNDERKÖTTER *et al.*, 2001; da SILVA *et al.*, 2004; DA SILVEIRA *et al.*, 2007). A alteração da integridade vascular induzida por LiRecDT1 e LiRecDT2 foi demonstrada em camundongos por DA SILVEIRA *et al.* (2006), sendo intensa a alteração provocada por estas toxinas, com efeito semelhante ao do veneno total. Confirmando estes dados de alteração de permeabilidade vascular, a indução da formação de edema foi demonstrada através da inoculação de LiRecDT1 e LiRecDT2 em camundongos, promovendo efeito edematogênico significativo demonstrado na figura 7. LiRecDT3, que é a isoforma que apresenta atividades biológicas reduzidas, não provocou edema nos animais testados. Estes dados também fornecem subsídios para a teoria de que a ocorrência de dermonecrose não está relacionada ao aumento da permeabilidade vascular, pois camundongos apresentam alteração de permeabilidade mas não desenvolvem dermonecrose. O mecanismo de atuação do veneno de *Loxosceles* permanece sob investigação, sendo a resposta inflamatória essencial na lesão dermonecrótica. As toxinas dermonecróticas induzem uma ativação indireta desregulada de neutrófilos por meio de células endoteliais (SMITH & MICKS, 1970; FUTRELL, 1992; PATEL *et al.*, 1994; da SILVA *et al.*, 2004). O suposto mecanismo de atuação das toxinas dermonecróticas no aumento da permeabilidade vascular seria pela indução de resposta inflamatória e infiltração de leucócitos na derme (SUNDERKÖTTER, *et al.*, 2001; da SILVA *et al.*, 2004). Além disso o efeito direto das toxinas dermonecróticas na ativação e citotoxicidade sobre o endotélio poderia provocar distúrbios na parede de vasos sanguíneos gerando aumento da permeabilidade vascular (PATEL *et al.*, 1994; VEIGA *et al.*, 2001; PALUDO *et al.*, 2006).

CHAIM *et al.* (2006) demonstraram alterações na morfologia e o efeito nefrotóxico *in vitro* em células epiteliais de rim (MDCK) quando tratadas com LiRecDT1. Os efeitos de vacuolização citoplasmática, disfunção no espalhamento das células e redução da viabilidade celular característicos do tratamento com LiRecDT1, também foram observados em células tratadas com LiRecDT2 o que reafirma a atividade biológica semelhante entre estas duas toxinas. O tratamento de células MDCK com LiRecDT3 não provocou os efeitos anteriormente citados (fig. 4). No ensaio de citotoxicidade pelo método de captação por endocitose de corante (Vermelho Neutro), foi observada redução da viabilidade celular com o tratamento utilizando LiRecDT1 e LiRecDT2 no período de 24h (fig. 5). Estes efeitos observados podem ser atribuídos à alteração de permeabilidade celular pela ação das toxinas recombinantes (WILLINGER *et al.*, 1995; PETIT *et al.*, 2003). A toxina LiRecDT3 não provocou alteração da morfologia e tampouco a redução da viabilidade celular, reforçando os dados de homologia que classificam LiRecDT3 como sendo parte de uma sub-família de toxinas dermonecróticas com atividade biológica residual.

6 Conclusão

Os resultados do ensaio de morfologia com células de epitélio renal (MDCK) tratadas com LiRecDT2 promoveram vacuolização citoplasmática, disfunção no espalhamento das células e perda da adesão célula-célula e ao substrato, característicos do tratamento com LiRecDT1, o que reforça os dados de homologia e a atividade biológica diferencial entre LiRecDT1, LiRecDT2 e LiRecDT3.

No ensaio de citotoxicidade em células MDCK houve redução de viabilidade celular com o tratamento utilizando LiRecDT1 e LiRecDT2. O tratamento com LiRecDT3 não provocou redução da viabilidade celular.

Com relação à atividade de hemólise do veneno de *L. intermedia*, os resultados obtidos demonstraram atividade hemolítica para o veneno total de *L. intermedia* (100%) e de 33% para as toxinas LiRecDT1 e LiRecDT2. A hemólise induzida por LiRecDT3 foi apenas residual (5,8%). O efeito hemolítico semelhante entre LiRecDT1 e LiRecDT2 corrobora com os demais ensaios realizados, reafirmando a similaridade estrutural e a conservação antigênica entre estas duas toxinas dermonecróticas.

Confirmando os dados de alteração de permeabilidade vascular (da SILVEIRA *et al.*, 2006), a indução da formação de edema foi demonstrada através da inoculação de LiRecDT1 e LiRecDT2 em camundongos, provocando efeito edematogênico intenso. LiRecDT3, que é a isoforma com menor atividade biológica, não provocou edema em camundongos. Estes dados também fornecem subsídios para a teoria de que a ocorrência de dermonecrose não está relacionada ao aumento da permeabilidade vascular, pois camundongos apresentam alteração de permeabilidade mas não desenvolvem dermonecrose.

No ensaio de mortalidade em camundongos apenas as toxinas LiRecDT1 e LiRecDT2 provocaram a morte dos animais no período de 24 horas. A toxina LiRecDT3 que apresenta pouca identidade estrutural com a toxina LiRecDT1 não induziu mortalidade e nem alteração do comportamento nos animais como letargia, tremor e postura de estiramento do corpo. Este experimento reforça a diferença na atividade biológica das toxinas dermonecróticas recombinantes e corrobora com os dados de homologia anteriormente publicados.

Os resultados provenientes do ensaio de ELISA corroboram com os dados de *immunoblotting* e demonstram reatividade cruzada entre as toxinas recombinantes superior a reatividade do veneno total, sugerindo que os epítomos presentes nessas toxinas são fortes determinantes antigênicos, além de apontar para a existência de

sub-famílias de toxinas dermonecróticas. LiRecDT3 possui menor reatividade cruzada do que LiRecDT1 e LiRecDT2, sendo esta diferença decorrente provavelmente da estrutura conformacional e da presença de diferentes epítomos nestas toxinas.

Os resultados obtidos com o experimento de dicroísmo circular reforçam as diferenças estruturais entre LiRecDT1 e LiRecDT2, comparadas com LiRecDT3. Foi observado para LiRecDT3 um aumento significativo no conteúdo de α -hélice (27,5%) e decréscimo no conteúdo de folha- β (16,3%) em comparação com os valores referentes à LiRecDT1 (α -hélice: 22,3%; folha- β : 21,5%) e LiRecDT2 (α -hélice: 24,8%; folha- β : 19,4%). Estes resultados juntamente com os dados da análise filogenética evidenciam a correlação estrutural das toxinas dermonecróticas recombinantes LiRecDT1 e LiRecDT2 comparadas com LiRecDT3.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANDRADE, R.M.G.; OLIVEIRA, K.C.; GIUSTI, A.L.; SILVA, W.D.; TAMBOURGI, D.V. Ontogenetic development of *L. intermedia* spider venom. **Toxicon**. 37: 627-632, 1999.
2. ANDRADE, S.A.; PEDROSA, M.F.F.; ANDRADE R.M.G.; OLIVA, M.L.V.; VAN DEN BERG, C.W.; TAMBOURGI, D.V. Conformational changes of *L.* venom sphingomyelinases monitored by circular dichroism. **Biochem. Biophys. Res. Commun**. 327: 117-123, 2005.
3. ARAGON-ORTIZ, F. And GUBENSEK, F. Characterization of a metalloproteinase from *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. **Toxicon**. Oxford: 25, p.759-766, 1987.
4. ATKINS, J.A.; WINGO, C.W.; SODERMAN, W. A. Probable cause of necrotic spider bite in the Midwest. **Science**. Washington: 126, p.73, 1957.
5. BABCOCK, J.L.; CIVELLO,DJ; GEREN, CR. Purification and characterization of a toxin from brown recluse spider (*L. reclusa*) venom gland extracts. **Toxicon**. 19: 677-689, 1981.
6. BARBARO, K.C.; CARDOSO, J.L.C.; EICKSTEDT, V.R.D.; MOTA, I. Dermonecrotic and lethal components of *L. gaucho* spider venom. **Toxicon**. 30:331-338, 1992.
7. BARBARO, K.C.; EICKSTEDT, V.R.D.; MOTA, I. Adjuvant effect of *L. gaucho* (South American brown spider) venom. **Toxicon**.32: 687-693,1994.
8. BARBARO, K.C.; JARED, C.; MOTA, I. Aranhas venenosas no Brasil. **Ciência Hoje**, Rio de Janeiro. 19.114: 48-52, 1995.
9. BARBARO, KC; FERREIRA, ML; CARDOSO, DF; EICKSTEDT, VRD; MOTA,I. Identification and neutralization of biological activities in the venoms of *L.* spiders. **Braz. J. Med. Biol. Res**. 29:1491-1497, 1996.
10. BARBARO K.C.; KNYSAK I.; MARTINS R.; HOGAN C.; WINKEL K. Enzymatic characterization, antigenic cross-reactivity and neutralization of dermonecrotic activity of five *Loxosceles* spider venoms of medical importance in the Americas. **Toxicon**. 45: 489-499, 2005.
11. BARRETO, C.O.; CARDOSO, J.L.; DE CILLO, D. Viscerocutaneous form of loxoscelism and erytorcyte glucose-6-phosphate deficiency. **Ver. Inst. Med. Trop. São Paulo**. 27: 264, 1985.
12. BASCUR, L.; YEVENES, I.; BARJA, P. Effects of *L. laeta* spider venom on blood coagulation. **Toxicon**. 20: 795-796, 1982.

13. BOND, J.S.; BEYNON, R.J. The astacin family of metalloendopeptidases. **Protein Sci.** 4, 1247-1261, 1995.
14. BINFORD, C.H.; CONNOR, D.H. Pathology of Tropical and Extraordinary diseases. **Armed Forces Institute of Pathology.** 1976.
15. BINFORD, G.J., CORDES, M.H.J., WELLS, M.A. Sphingomyelinase D from venoms of *Loxosceles* spiders: evolutionary insights from cDNA sequences and gene structure. **Toxicon.** 45, 547-60, 2005.
16. BODE, W.; GOMIS-RUTH, F. X.; STOCKLER, W. Astacins, serralysins snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHGXXGXXH and met-turn) and topologies and should be group into a common family, the “metzinccins”. **FEBS Lett.** 331, 134-140, 1993.
17. BRADFORD, M.M.A. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of Protein-Dye-Bonding. **Anal. Biochem.** 72:248-254, 1976.
18. BRAVO, L. M.; PURATIC, S.O.; BEHN, T.C.; FARDELLA, B.C.; CONTREPA, F.A. Estudio de la hemólisis inducida por veneno de *L. laeta*. Experiência in vitro. **Rev. Med. Chile**, Santiago, v.121, p.16-20,1993.
19. BÜCHERL, W.; ROSENFELD, G. Aranhas do gênero *L.* e loxoscelismo na América do Sul. **Mem. Inst. Butantan.** 30: 167-186, 1954.
20. BÜCHERL, W. Aranhas do gênero *L.* e “loxoscelismo” na América do Sul. **Mem. Inst. Butantan**, São Paulo, 30, 167-186, 1960.
21. CASTRO, C. S.; SILVESTRE, F. G.; ARAÚJO, S. C.; YAZBECKA, G. M.; MANGILI, O. C.; CRUZD, I. OLORTEGUI, C. C.; KALAPOTHAKIS, E. Identification and molecular cloning of insecticidal toxins from the venom of the brown spider *L. intermedia*. **Toxicon.** 44. 273–280, 2004.
22. CAVENESS, W. Insect bite complicated by fever. **J. Med. Surg.**, Nashville, v.10, p. 133, 1872.
23. CHAIM, O.M.; SADE, Y.B.; DA SILVEIRA R.B.; TOMA, L.; KALAPOTHAKIS, E.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C.; MANGILI, O.C.; GREMSKI, W.; DIETRICH, C.P.; NADER, H.B.; VEIGA, S.S. Brown spider dermonecrotic toxin directly induces nephrotoxicity. **Toxicol. Apl. Pharmacol.** 211, 64-77, 2006.
24. COUTINHO, N.L.R. Avaliação funcional e histopatológica das alterações renais induzidas pelo veneno da “aranha marrom”, *L. intermedia* (Mello-Leitão, 1934). **Dissertação de Mestrado em Morfologia, Biologia Celular.** Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1996.

25. CUNHA, R.B.; BARBARO, K.C.; MURAMATSU, D.; PORTARO, F.C.; FONTES, W.; DE SOUSA, M.V. Purification and characterization of lox necrogin, a dermonecrotic toxin from *L. gaucho* brown spider venom. **J. Protein Chem.** 22: 135-146, 2003.
26. DA SILVA, P.H.; DA SILVEIRA, R.B.; APPEL, M.H.; MANGILI, O.C.; GREMSKI, W.; VEIGA, S.S. Brown spiders and loxoscelism. **Toxicon.** 44: 693-709, 2004.
27. DA SILVEIRA, R.B.; FILHO, J.F.S.; MANGILI, O.C.; VEIGA, S.S.; GREMSKI, W.; NADER, H.B., DIETRICH, C.P. Identification of proteases in the extract of venom glands from brown spiders. **Toxicon.** 40: 815-822, 2002.
28. 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., VEIGA, S.S. (2006). Molecular cloning and functional characterization of two isoforms of dermonecrotic toxin from *Loxosceles intermedia* (Brown spider) venom gland. **Biochimie** 88: 1241-1253, 2006.
29. 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.; GREMSKI, W Two novel dermonecrotic toxins from brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom: from cloning to functional characterization. **Biochimie.** In Press, 2007.
30. DE BARROS, M.L.; VARANDA, W.A.; LACHAT, J.J.; ALVES-DA-SILVA, C.G.; COIMBRA, T. M. Glomerular permeability to macromolecules in gentamicin-treated rats. **Rev. Med. Inst. Mexicano seguro social**, v.22, n.6, p.403-406, 1992.
31. DELEAGE, G.; GEOURJON, C. An interactive graphic program for calculating the secondary structure content of proteins from dichroism pectrum. **Comput. Appl. Biosci.** 2, 197-199, 1993.
32. DENNY, W.F.; DILLAHA, C.J.; MORGAN, P.N. Hemotoxic effect of *L. reclusa* venom: in vivo and in vitro studies. **J. Lab.Clin. Med.** 64:291, 1964.
33. DESAI, A.; MILLER, M.J.; GOMEZ, H.F.; WARREN, J.S. (1999). *Loxosceles deserta* spider venom induces NF- κ B-dependent chemokine production by endothelial cells. **Clin. Toxicol.** 37, 447-456, 1999.
34. DUMERMUTH, E.; STERCHI, E.E.; JIANG, W.P.; WOLZ, R.L.; BOND, J.S.; FLANNERY, A.V.; BEYNON, R.J. The astacin family of metalloendopeptidases. **J. Biol. Chem.** 266, 21381-21385, 1991.
35. ELSTON, D.M.; EGGERS, J.S.; SCHMIDT, W.E.; STORROW, A.B.; DOE, R.H.; MCGLASSON, D.; FISCHER, J.R. Histological findings after brown recluse spider envenomation. **Am. J.Dermatopathol.** 22, 242-246, 2000.

36. ESCALANTE-GALINDO, P.; MONTOYA-CABRERA, M.A.; TERROBA-LARIOS, V.M., NAVAJUARÉZ, A.R.; ESCALANTE-FLORES, I. Local dermonecrotic loxoscelism in children bitten by the spider *Loxosceles reclusa* (the violin spider). **Gac. Med. Mex.** 135:423–426, 1999.
37. FEITOSA, L.; GREMSKI, W.; VEIGA, S.S.; ELIAS, M.C.Q.B.; GRANER, E.; MANGILI, O.C.; BRENTANI, R.R. Detection and characterization of metalloproteinases with gelatinolytic, fibronectinolytic and fibrinogenolytic activities in brown spider (*L. intermedia*) venom. **Toxicon.** v.36, p. 1039-1051, 1998.
38. FELICORI, L.; ARAUJO, S.C.; MACHADO DE ÁVILA, R.A.; SANCHEZ, E.F.; GRANIER, C.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C.; KALAPOTHAKIS, E. Functional characterization and epitope analysis of a recombinant dermonecrotic protein from *Loxosceles intermedia* spider. **Toxicon.** 509-519, 2006.
39. FISCHER, M.L. Levantamento das espécies de *L. Heinecken* and *Lowe*, 1832 no município de Curitiba, Paraná, Brasil. **Estudos de Biologia.** 3, 63-88, 1994.
40. FOIL, L.D.; COONS, L.B.; NORMENT, B.R. Ultrastructure of the venom gland of the brown recluse spider, *Loxosceles reclusa* Gertsch and Mulaik (Araneae:Loxoscelidae). **Int. J. Insect. Morphol. & Embryol.** 8:325-334, 1979.
41. FORRESTER, L.J.; BARRET, J.T.; CAMPBELL, B.L. Red blood cell lysis induced by the venom of the brown recluse spider. The role of sphingomyelinase D. **Arch. Biochem. Biophys.** 187:335-365, 1978.
42. FRESHNEY RI. **Culture of animal cells: a manual of basic techniques.** 4. ed. Wiley-Liss Inc, 1994, USA.
43. FURLANETTO, R. S. Estudos sobre a preparação do soro anti-loxoscélico (Tese de livre docência). Faculdade de farmácia e odontologia da USP. São Paulo, 1961.
44. FUTRELL, JM. Loxoscelism. **Am. J. Med. Sci.** 304:261-267, 1992.
45. GAJARDO-TOBAR, R. R. Mi experiência sobre loxoscelismo. **Mem. Inst. Butantan.**, v.33, n.3, p.689-698, 1966.
46. GATES, C.A.; REES, R.S. Serum amyloid P component: its role in platelet activation stimulated by sphingomyelinase D purified from the venom of brown recluse spider (*L. reclusa*). **Toxicon.** 28:1303-1315, 1990.
47. GEREN, C.R.; CHAN, T.K.; HOWELL, D.E.; ODELL, G.V. Isolation and characterization of toxins from brown recluse spider venom (*L. reclusa*). **Arch.s Biochem. Biophys.** 174:90-99, 1976.

48. GERTSCH, W.J.; ENNIK, F. The spider genus *L.* in North America, central America and West Indies (Aranae, Loxoscelidae). **Bull. Am. Mus. Nat. Hist.**, v.175, n.3, p.264-360, 1983.
49. GOMEZ, H. F.; MILLER, M. J.; TRACHY, J. W.; MARKS, R. M.; WARREN, J. S. Intradermal anti-L. Fab fragments attenuate dermonecrotic arachnidism. **Acad. Emerg. Med.** 1999.
50. GOMEZ, H. F.; MILLER, M. J.; WAGGENER, M. W.; LANKFORD, H. A.; WARREN, J. S. Antigenic cross-reactivity of venoms from medically important North American *L.* spider species. **Toxicon.** 39(6):817–824, 2001.
51. GOMEZ, H. F.; KRYWKO, D. M.; STOECKER, W. V. A new assay for the detection of *L.* species (brown recluse) spider venom. **Ann. Emerg. Med.** 39, 469-474, 2002.
52. GUILHERME, P.; FERNANDES, I.; BARBARO, K. C. Neutralization of dermonecrotic and lethal activities and differences among 32-35 kDa toxins of medically important *L.* spider venoms in Brazil revealed by monoclonal antibodies. **Toxicon.** 39, 1333-1342, 2001.
53. GUTIERREZ, J. M.; ROMERO, M.; DIAZ, C.; BORKOW, G.; OVADIA, M. Isolation and characterization of a metalloproteinase with weak hemorrhagic activity from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). **Toxicon**, v.33, n.1, p.19-29, 1995.
54. HARLOW & LANE D. **Antibodies – A laboratory manual.** Cold Spring Harbor Laboratory, 1988.
55. HEARD, K.; O'MALLEY, G. F.; DART, R. C. Antivenom therapy in the Americans. **Drugs.** 58(1):5–15, 1999.
56. HITE, J.M. *et al.* Biology of the brown recluse spider. **Arkansas Agri. Exp. St. Bull.**, v.711, p.26, 1960.
57. HITE, L.A.; JIA, L.G.; BJARNASSON, J.B.; FOX, J.W. cDNA sequences for four snake venom metalloproteinases: structure, classification, and their relationship to mammalian reproductive proteins. **Arch. Biochem. Biophys.** 308:182-191, 1994.
58. ISBISTER, G. K.; GRAY, M. R. A prospective study of 750 definite spider bites, with expert spider identification. **Q J Med.** 95 (11):723–731, 2002.
59. ISBISTER, G. K.; GRAUDINS, A.; WHITE, J.; WARRELL, D. Antivenom Treatment in Arachnidism. **Clinical Toxicology.** v. 41, 3, p. 291–300, 2003.
60. JUNQUA, C.; VACHON, M. Les arachnides et leurs venin. **Acad. R. Sci. d'Outre-Mer.** 17, 1-36, 1968.
61. KALAPOTHAKIS, E.; ARAUJO, S.C.; DE CASTRO, C.S.; MENDES, T.M.; GOMEZ, M.V.; MANGILI, O.C.; GUBERT, I.C.; CHAVEZ-OLORTEGUI C. Molecular cloning,

expression and immunological properties of LiD1, a protein from the dermonecrotic family of *L. intermedia* spider venom. **Toxicon**. 40: 1691-1699, 2002.

62. KANVAR, Y. S. and FAQUHAR, M. G. Presence of heparan sulphate in the glomerular basement membrane. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** v.76, n.3, p. 1203-1307, 1979.
63. KURPIEWSKI, G.; FORRESTER, L.J.; BARRETT, J.T.; CAMPBELL, B.J. Platelet aggregation and sphingomyelinase D activity of a purified toxin from the venom of *L. reclusa*. **Biochem. Biophys. Acta**. 678. 467-476, 1981.
64. LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T-4. **Nature**. 227: 680-685, 1970.
65. LEE, S.; LYNCH, K.R. (2005). Brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*) venom PHOSPHOLIPASE D (PLP) GENERATES LYSOPHOSPHATIDIC ACID (LPA). **BIOCHEM. J.** 391, 317-323, 2005.
66. LOMONTE, B., TARKOWSKY, A., HANSON, L., 1993. Host response to *Bothrops asper* snake venom: analysis of edema formation, inflammatory cells and cytokine release in a mouse model. **Inflammation**. 17: 93-105, 1993.
67. LUCAS, S. SPIDERS IN BRAZIL. **TOXICON**. 26, N.9, 759-772, 1988.
68. LUCIANO, M.N.; SILVA, P.H.; CHAIM, O.M.; SANTOS, V.P.; FRANCO, C.R.C.; SOARES, M.F.S.; ZANATA, S.M.; MANGILI, O.C.; GREMSKI, W.; VEIGA, S.S. Experimental evidence for a direct cytotoxicity of *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom on renal tissue. **J. Histochem. Cytochem.** 52, 455-467, 2004.
69. LUNG, J.M.; MALLORY, S.B. A child with spider bite and glomerulonephritis: a diagnostic challenge. **Int. J. Dermatol.** 39: 287-289, 2000.
70. MACHADO, L.F., LAUGESEN, S., BOTELHO, E.D., RICART, C.A., FONTES, W., BARBARO, K.C., ROEPSTORFF, P., SOUSA M.V. Proteome analysis of brown spider venom: identification of loxnecrogin isoforms in *Loxosceles gaucho* venom. **Proteomics**. 5, 2167-2176, 2005.
71. MÁLAQUE, C.M.S.; ORI, M.; SANTOS, S.A.; ANDRADE, D.R. Production of TNF- α by primary cultures of human keratinocytes challenged with *Loxosceles gaucho* venom. **Rev.Inst. ed. Trop. S. Paulo**. 41:1-9, 1999.
72. MARQUES-DA-SILVA, E.; FISCHER, M.L. *Loxosceles Heinecken & Lowe*, 1835 (Araneae; Sicariidae) species distribution in the State of Paraná. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 38:331-335, 2005.
73. MARTINEZ-VARGAS, A.Z. Loxoscelismo, um problema de salud en el Perú. **Bol. San. Panam.** 103, n.4, 378-386, 1987.

74. Ministério da Saúde – FUNASA. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes com animais peçonhentos. Brasília; 1998.
75. Ministério da Saúde – FUNASA. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes com animais peçonhentos. 2ªed. Brasília; 2001.
76. 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**, **40**:409-418, 2002.
77. MÖHRLÉN, F.; HUTTER, H.; ZWILLING, R. The astacin protein family in *Caenorhabditis elegans*. **Eur. J. Biochem.** 270, 4909-4920, 2003.
78. MURAKAMI, M.T., FERNANDES-PEDROSA, M.F., TAMBOURGI, D.V., ARNI, R.K. Structural basis for metal ion coordination and the catalytic mechanism of sphingomyelinases D. **J. Biol. Chem.** 8, 13658-13664, 2005.
79. MURAKAMI, M.T.; FERNANDES-PEDROSA, M.F.; DE ANDRADE, S.A.; GABDOULKHAKOV, A.; BETZEL, C.; TAMBOURGI, D.V.; ARNI, R.K. Structural insights into the catalytic mechanism of sphingomyelinases D and evolutionary relationship to glycerophosphodiester phosphodiesterases. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 342, 323-329, 2006.
80. NICHOLSON, G. M.; GRAUDINS, A. Spiders of medical importance in the Asia-Pacific: atracotoxin, latrotoxin and related spider neurotoxins. **Clin Exp Pharmacol Physiol.** 29(9):785–794, 2002.
81. NORMENT, B.R.; JONG, Y.S.; HEITZ, J.R. Separation and characterization of venom components in *Loxosceles reclusa*-III. Hydrolytic enzyme activity. **Toxicon.** 17, 539-548, 1979.
82. OLIVEIRA, K.C.; ANDRADE, R.M.G.; GIUSTI, A.L.; SILVA, W.D.; TAMBOURGI, D.V. Sexlinked variation of *Loxosceles intermedia* spider venoms. **Toxicon.** **37**:217-221, 1999.
83. OSPEDAL, K. Z., APPEL, M.H., NETO, J.N., MANGILI, O. C., VEIGA, S.S., GREMSKI, W. Histopathological findings in rabbits after experimental acute exposure to the *L. intermedia* (brown spider) venom. **Int. J. Exp. Path.** 84: 287-294, 2002.
84. PALUDO, K.S.; GREMSKI, L.H.; VEIGA, S.S.; CHAIM, O.M.; GREMSKI, W.; DE FREITAS BUCHI, D.; NADER, H.B.; DIETRICH, C.P.; FRANCO, C.R. The effect of brown spider venom on endothelial cell morphology and adhesive structures. **Toxicon.** 15;47(8):844-53, 2006.

85. PATEL, K.D.; MODUR, V.; ZIMMERMAN, G.A.; PRESCOTT, S.M.; MCINTYRE, T.M. The necrotic venom of brown recluse induces dysregulated endothelial cell-dependent neutrophil activation. Differential induction of GM-CSF, IL-8, and E-selectin expression **J. Clin. Invest.** 94, 631-642, 1994.
86. PEDROSA, M. F. F.; AZEVEDO, I. L. M. J.; ANDRADE, R. M. G.; BERG, C. W.; RAMOS, C. R. R., HO, P. L.; TAMBOURGI, D. V. Molecular cloning and expression of a functional dermonecrotic and haemolytic factor from *L. laeta* venom. **Biochem. Bioph. Res. Commun.** 298, 638-645, 2002.
87. PETIT, L. GIBERT, M.; GOURCH, A.; BENS, M.; VANDEWALLE, A.; POPOFF, M. R. *Clostridium perfringens* epsilon toxin rapidly decreases membrane barrier permeability of polarized MDCK cells. **Cell Microbiol.** 5, 155-164, 2003.
88. PIZZI, T.; ZACARIAS, J.; SCHENONE, E. H. Estudio histopatológico experimental en el envenenamiento por *L. laeta*. **Lógica.** 23-33, 1957.
89. RASH, L.D.; HODGSON, W.C. Pharmacology and biochemistry of venoms. **Toxicon.** 40: 225-254, 2002.
90. RAMOS-CERRILLO, B.; OLVERA, A.; ODELL, G.V.; ZAMUDIO, F.; PANIAGUA-SOLÍS, J.; ALAGÓN, A.; STOCK, R.P. Isoforms from the North American fiddleback spiders *L. boneti* and *L. reclusa*. **Toxicon.** 44: 507-514, 2004.
91. REES, R.S.; NANNEY, L.B.; YATES, R.A.; KING, L.E. Interaction of brown recluse spider venom on cell membranes: The inciting mechanism? **J Invest Dermatol.** 83:270-275, 1984.
92. REES, R.S.; GATES, C.; TIMONS, S.; DES-PRES, R.M.; KING, L.E. Jr. Plasma components are requieres for platelet activation by the toxin of *L. reclusa*. **Toxicon.** 26:1035-1046, 1988.
93. RIBEIRO, L.A.; EICKSDT, V.R.D.; RÚBIO, G.B.G.; KONALSAISEN, J.F.; HANDAR, Z.; ETRES, M.; CAMPOS, V.A.F.P.; JORGE, M.T. Epidemiologia do acidente por aranhas do gênero *L.* no estado do Paraná (Brasil). **Mem. Inst. Butantan.** 55: 19-26, 1993.
94. RUPPERT, E.E.; BARNES, R.D. **Zoologia dos invertebrados.** Ed. Roca, São Paulo, 6ª ed., 1996.
95. SAMS, H.H.; HEARTH, S.B.; LONG, L.L.; WILSON, D.C.; SANDERS, D.H.; KING, L.E. Nineteen documented cases of *Loxosceles reclusa* envenomation. **J. Am. Acad. Dermatol.** 44:603-608, 2001.
96. SCHENONE, H.; LETONJA, T. Notas sobre la biología y distribución geográfica de las arañas del género *L.* **Bol. Chil. Parasitol.** 30, 27-29, 1975.

97. SCHENONE, H. SUAREZ, G. Venom of scytodidae, genus *Loxosceles*. In **Betini, S. Arthropod venoms**. 48, 245-247, 1978.
98. SCHENONE, H. *et al.* Loxoscelismo en Chile. Estudios epidemiológicos, clínicos y experimentales. **Rev. Inst. Med. Trop.** 31, 6, 403-415, 1989.
99. SEZERINO, UM; ZANNIN, M; COELHO, LK. A clinical and epidemiological study of *L. spider* envenoming in Santa Catarina, Brasil. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 92:546, 1998.
100. SMITH, W.C.; MICKS, W.D. The role of polimorphonuclear leukocytes in the lesion caused bi the venom of the brown spider, *L. reclusa*. **Lab. Invest.** 22, 90-93, 1970.
101. SOERENSEN, B. **Acidentes por animais peçonhentos: reconhecimento, clínica e tratamento**. Editora Atheneu, 1996.
102. SUAREZ, G.; BIGGERMANN, U.; SCHENONE, H. Estudios bioquímicos del veneno de *L. laeta* y sus mecanismos de acción. **Bol. Chil. Parasitol.** 26, 60-62, 1971.
103. SUNDERKÖTTER, C., SEELIGER, S., SCHONLAU, F., ROTH, J., HALLMANN, R., LUGER, T.A., SORG, C., KOLDE, G. Different pathways leading to cutaneous leukocytoclastic vasculitis in mice. **Exp. Dermatol.** 10, 391-404, 2001.
104. TAMBOURGI, D. V.; PEDROSA, M. F. F.; VAN DEN BERG, C. W.; GONÇALVES-DE-ANDRADE, R. M.; FERRACINI, M.; PAIXÃO-CAVALCANTE, D. Molecular cloning, expression, function and immunoreactivities of members of a gene family of sphingomyelinases from *L. venom* glands. **Molecular Immunology.** 41, 831-840, 2004.
105. TAMBOURGI, D.V. *et al.*. Incorporation of a 35-kilodalton purified protein from *L. intermedia* spider venom transforms human erythrocytes into activators of autologous complement alternative pathway. **J. Immunol.** 155:4459-4466, 1995.
106. TAMBOURGI, D.V.; MAGNOLI, F.C.; BERG, C.W.; MORGAN, B.P.; ARAUJO, P.S.; ALVES, E.W.; SILVA, W.D.; Sphingomyelinases in the venom of the spider *L. intermedia* are responsible for both dermonecrosis and complement-dependent hemolysis. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 251: 366-373, 1998.
107. TAMBOURGI, D.V.; MORGAN, B.P.; DE ANDRADE, R.M.G.; MAGNOLI, F.C.; VAN DEN BERG, C.W. *Loxosceles intermedia* spider envenomation induces activation of an endogenous metalloproteinase, resulting in cleavage of glycophorins from the erythrocyte surface and facilitating complement-mediated lysis. **Blood.** 95, 683-691, 2000.

108. TAMBOURGI, D.V.; PAIXÃO-CAVALCANTE, D.; GONÇALVES DE ANDRADE, R.M.; FERNANDES-PEDROSA, M.deF.; MAGNOLI, F.C.; PAUL MORGAN, B.; VAN DEN BERG, C.W. *Loxosceles* sphingomyelinase induces complement-dependent dermonecrosis, neutrophil infiltration, and endogenous gelatinase expression. **J. Invest. Dermatol.** 124, 725-731, 2005.
109. TORRES, J. B. And CARLOTTO, P. R. Levantamento dos gêneros de ofídios e espécies de aracnídeos causadores de acidentes na casuística do centro de informações toxicológicas do Rio Grande do Sul. **Mem. Inst. Butantã.** 46, 207-218, 1982.
110. TOWBIN, H. *et al.* Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedures and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 76: 4350-4354, 1979.
111. VAN MEETEREN, L.A.; FREDERICKS, F.; GIEPMANS, B.N.; PEDROSA, M.F.; BILLINGTON, S.J.; JOST, B.H.; TAMBOURGI, D.V.; MOOLENAAR. Spider and bacterial sphingomyelinases D target cellular lysophosphatidic acid receptors by hydrolysing lysophosphatidylcholine. **J. Biol. Chem.** 279, 10833-10836, 2004.
112. VEIGA, S.S. *et al.* Glycosylation of β_1 integrins in B16-F10 melanoma cells as determinant of differential binding and acquisition of biological activity. **Int. J. Cancer.** 61:420-424, 1995.
113. VEIGA, S.S. *et al.* Oligosaccharide residues of *L. intermedia* (brown spider) venom proteins: dependence of glycosylation for dermonecrotic activity. **Toxicon.** 37:587-607, 1999.
114. VEIGA, S.S., FEITOSA, L., SANTOS, V.L.P., DE SOUZA, G.A., RIBEIRO, A.S., MANGILI, O.C., PORCIONATTO, M. A.; NADER, H.B., DIETRICH, C.P., BRENTANI, R.R. and GREMSKI, W. Effect of *L. intermedia* (brown spider) venom on basement membrane structures. **Histochemical Journal.** 32, 397-408, 2000a.
115. VEIGA, S.S. *et al.* Identification of high molecular weight serine- proteases in *L. intermedia* (brown spider) venom. **Toxicon.** 38:825-839, 2000b.
116. VEIGA SS, ZANETTI VC, FRANCO CRC, TRINDADE ES, PORCIONATTO MA, MANGILI OC, GREMSKI W, DIETRICH CP, NADER HB. In vivo and in vitro cytotoxicity of brown spider venom for blood vessel endothelial cells. **Thrombosis Research.** 102: 229-237, 2001a.
117. VEIGA, S.S.; ZANETTI, V.C.; BRAZ, A.; MANGILI, O.C.; GREMSKI, W. Extracellular matrix molecules as targets for brown spider venom toxins. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 34:843-850, 2001b.

118. WASSERMAN, G.S., ANDERSON, P.C. Loxoscelism and arachnidism. **J Toxicol Clin. Toxicol.** 21, 451-472, 1984.
119. WILLIAMS, W.J., BEUTLER, E., ERSLEV, A.J., LICHTMAM, M.A. **Hematology.** 3rd Edition, NY, 1983.
120. WILLINGER, C. C.; THAMAREE, S.; SCHRAMEK, H.; GSTRANTHALER, G.; PFALLER, W. In vitro nephrotoxicity of Russell's viper venom. **Kidney Int.** 47, 518-528, 1995.
121. WHITE, J.; CARDOSO, J. L.; HUI, W. F. Handbook of Clinical Toxicology of Animal Venoms and Poisons. **Boca Raton:** CRC Press. 259–330, 1995.
122. WRIGHT, R.P.; ELGERT, K.; CAMPBELL, B.J.; BARRET, J.T. (1973). Hyaluronidase and esterase activities of the venom of the poisonous brown recluse spider. **Arch. Biochem. Biophys.** 159, 415-426, 1973.
123. YOUNG, A.R.; PINCUS, S.J. Comparison of enzymatic activity from three species of necrotising arachnids in Australia: *L. rufescens*, *Badumna insignis* and *Lampona cylindrata*. **Toxicon.** 39, 391-400, 2001.
124. ZANETTI, V.C.; DA SILVEIRA, R.B.; DREYFUSS, J.L.; HAOACH, J.; MANGILI, O.C.; VEIGA, S.S.; GREMSKI, W. Morphological and biochemical evidence of blood vessel damage and fibrinogenolysis triggered by Brown spider venom. **Blood Coagulation and Fibrinolysis.** 13: 1-14, 2002.