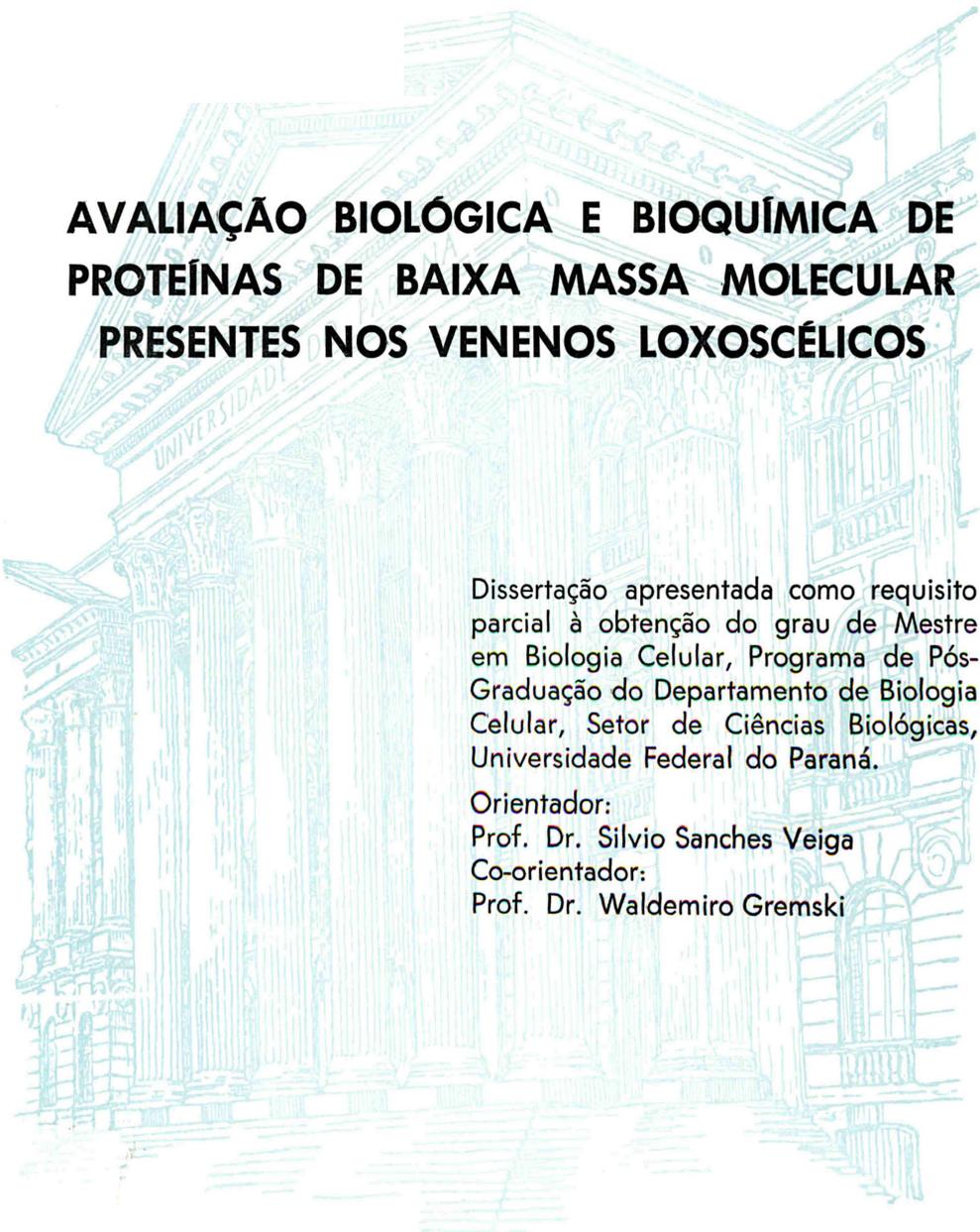


MARCIA HELENA APPEL



**AVALIAÇÃO BIOLÓGICA E BIOQUÍMICA DE
PROTEÍNAS DE BAIXA MASSA MOLECULAR
PRESENTES NOS VENENOS LOXOSCÉLICOS**

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

Orientador:

Prof. Dr. Silvio Sanches Veiga

Co-orientador:

Prof. Dr. Waldemiro Gremski

CURITIBA

2002

MARCIA HELENA APPEL

**AVALIAÇÃO BIOLÓGICA E BIOQUÍMICA DE
PROTEÍNAS DE BAIXA MASSA MOLECULAR
PRESENTES NOS VENENOS LOXOSCÉLICOS**

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

Orientador:

Prof. Dr. Silvio Sanches Veiga

Co-orientador:

Prof. Dr. Waldemiro Gremski

CURITIBA

2002

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

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

PARECER

A Comissão Examinadora de Dissertação de Mestrado "AVALIAÇÃO BIOLÓGICA E BIOQUÍMICA DE PROTEÍNAS DE BAIXA MASSA MOLECULAR PRESENTES NOS VENENOS LOXOSCÉLICOS", de autoria da Pós-Graduanda Marcia Helena Appel, e composta pelos Professores: Dr. Sílvio Sanches Veiga; (como Orientador e Presidente); Dra. Carolina Arruda de Oliveira Freire (UFPR) e Dra. Maria Aparecida B Frasso Vital (UFPR). Atribui individualmente as seguintes notas: Dr. Sílvio Sanches Veiga, nota 10,0 (DEZ); Dra. Carolina Arruda de Oliveira Freire, nota 10 (DEZ) e Dra. Maria Aparecida B Frasso Vital, nota 100 (DEZ). De acordo com o Regimento interno do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, a candidata foi: APROVADA com a nota 10,0 (DEZ), para a devida publicação o trabalho deve sofrer as modificações sugeridas.

Em Curitiba, 14 de Março de 2002.


Dr. Sílvio Sanches Veiga


Dra. Carolina Arruda de Oliveira Freire


Dra. Maria Aparecida B Frasso Vital

AGRADECIMENTOS

A todas as pessoas que compartilharam deste momento único em minha vida, expresso a minha admiração, respeito e gratidão, em especial:

Ao Prof. Dr. Silvio Sanches Veiga, do Departamento de Biologia Celular da UFPR, que me proporcionou inestimável aprendizado técnico e científico como orientador, além de lições de vida, respeito e amizade.

Ao Prof. Dr. Waldemiro Gremski, Pró-Reitor de Pesquisa e Pós-Graduação da UFPR e meu co-orientador, pelo exemplo de dedicação à pesquisa e à docência.

À Prof^a. Dr^a. Maria Aparecida B. Frazão Vital por sua atenção e indispensável colaboração na realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Oldemir Carlos Mangili, Diretor do Setor de Ciências Biológicas, pelo seu apoio no desenvolvimento do trabalho e por sua pioneira preocupação com a pesquisa sobre loxoscelismo no Estado do Paraná.

Ao prof. Dr. José Fillus Neto, do Departamento de Patologia Médica do Setor de Ciências da Saúde da UFPR, pela preciosa contribuição na interpretação dos achados histopatológicos descritos neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Marcelo Iacomini e ao doutorando César Tischer, do Departamento de Bioquímica do Setor de Ciências Biológicas, pela colaboração para realização da Espectrometria de Massa.

Ao Biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR e seus funcionários pelo fornecimento e manutenção dos animais utilizados neste trabalho.

Ao LIPAPE- Laboratório Interdisciplinar de Pesquisa em Animais Peçonhentos, do Setor de Ciências Biológicas da UFPR, pelo auxílio prestado na coleta de aranhas, bem como na extração do veneno.

Aos Professores do Curso de Pós-Graduação do Departamento de Biologia Celular, pelos ensinamentos que contribuíram para meu crescimento intelectual.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação do Departamento de Biologia Celular pelo empenho na melhoria deste curso.

À Secretária do Curso de Pós-Graduação do Departamento Biologia Celular, Marlene B. de Camargo pela incansável disposição.

Aos amigos do Laboratório de Matriz Extracelular e Biotecnologia de Venenos: Ana Isabel, Olga, Juliana, Andrea, Luiza, Kátia, Melissa, Rafael, Carlos e Zé por dividirem comigo o bem precioso do conhecimento, por compartilharem o pouco tempo disponível e acima de tudo por somarem o melhor deles a mim permitindo-me através deles ser um ser humano melhor.

Aos amigos do Curso de Pós-Graduação do Departamento de Biologia Celular da UFPR pela agradável convivência durante estes anos, em especial as amigas Gisleine e Darcy que gostaria de continuar compartilhando ainda muitos anos de minha vida.

À CAPES, à Fundação Araucária e Funpar pelo apoio financeiro.

Aos meus familiares e amigos pela compreensão nas horas de ausência, pelo apoio nas horas de cansaço e pelo estímulo nos momentos de indecisão.

Finalmente, a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, meu muito obrigado e espero que de alguma forma possa retribuir toda atenção e respeito.

*Agradeço a oportunidade de trilhar este caminho;
Aos amigos encontrados ao longo dele;
Aos que caminharam comigo desde o começo;
Aos que não me deixaram desistir;
Aos que me deram a luz e a quem eu dei;
Aos que não me negaram o saber e tão pouco ensinei;
OBRIGADA.*

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS	viii
LISTA DE FIGURAS, GRÁFICOS E TABELAS	x
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiv
1 INTRODUÇÃO	01
1.1 Aranhas	01
1.2 Quelíceras e Glândulas Produtoras de Veneno	05
1.3 Composição do Veneno de Aranhas	06
1.4 Características dos Componentes de Baixa Massa Molecular dos Venenos de Aranhas	08
1.5 Gênero <i>Loxosceles</i>	10
1.6 Distribuição geográfica das aranhas do gênero <i>Loxosceles</i>	11
1.7 Loxoscelismo ou Acidente Loxoscélico	12
1.8 Loxoscelismo no Estado do Paraná	20
1.9 Características do Veneno Loxoscélico	22
2 OBJETIVOS	32
3 MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1. Animais	33
3.2 Reagentes	33
3.3 Extração de veneno loxoscélico por eletrochoque	34
3.4 Extração do veneno loxoscélico diretamente pela extração da glândula produtora de veneno	34
3.5 Dosagem de proteínas pelo Método de Bradford (azul de Coomassie)	35
3.6 Coleta de sangue de camungongos	35
3.7 Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida na presença de SDS	36

3.8 Experimentos de zimograma com diferentes substratos protéicos	36
3.9 Coloração de géis de poliacrilamida	36
3.10 Coloração com Ácido Periódico - Reativo de Schiff (P.A.S.)	37
3.11 Cromatografia de gel filtração	38
3.12 Reações de imunoblotting	39
3.13 Estudo dos primeiros sinais de dermonecrose “in vivo” em coelhos	39
3.14 Métodos histológicos para microscopia de luz	40
3.15 Coloração com Hematoxilina e Eosina	41
3.16 Análise imunohistoquímica	41
3.17 Ensaio para verificação de atividade farmacológica	42
3.17.1 Testes Neurocomportamentais – Avaliação da Atividade Geral	42
3.17.2 Testes Neurocomportamentais – Avaliação da Atividade Geral com Administração Prévia de Bloqueador de Canais Cálcio	43
3. 18 Espectrometria de massa	44
4 RESULTADOS	45
4.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE	46
4.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE-TRICINA	47
4.3 Zimograma	48
4.4 Pesquisa sobre a presença de glicosilação	49
4.4.1 Coloração por PAS	49
4.4.2 Blotting-lectínico	49
4.5 Cromatografia por gel filtração	52
4.6 Características macroscópicas da pele de coelho injetado com veneno total e soluções representativas do pico I, pico II, pico III e pico IV	57
4.7 Características normais macroscópicas e histológicas da pele de coelho	58

4.8 Alterações histológicas induzidas em pele de coelhos pelo veneno de <i>L. intermedia</i> 4 horas após o tratamento	58
4.9 Ensaios farmacológicos - Avaliação da Atividade Geral (veneno total)	66
4.10 Ensaios farmacológicos – Avaliação da Atividade Geral (Picos III e IV da Cromatografia de Gel Filtração)	67
4.11 Testes Neurocomportamentais – Avaliação da Atividade Geral com Administração Prévia de Bloqueador de Canais Cálcio	69
4. 12 Espectrometria de massa	72
5 DISCUSSÃO	75
6 CONCLUSÃO	84
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85

LISTA DE SIGLAS

BCiP/NBT	Substratos cromógenos da fosfatase alcalina, utilizados em reação de imunoblotting.
BSA	Albumina de soro bovino
°C	Graus Celsius.
CA	Campo Aberto
CaCl ₂	Cloreto de cálcio.
DNA	Ácido desoxirribonucléico.
EHS	Tumor e sarcoma de Engelbreth Holm Swan.
kDa	Quilodáltons (unidade de massa molecular equivalente a mil dáltons)
IP	Intraperitoneal
LD ₅₀	Dose letal média
mA	Miliamperes.
MC	Massa corporal
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
µg	Micrograma
µl	Microlitro
µm	Micrômetro
mM	Milimolar
NaCl	Cloreto de sódio
ng	Nanograma
nm	Nanômetro.
NT	Nitrocelulose.
PAGE-SDS	Eletroforese em gel de poliacrilamida com sódio dodecil sulfato, ou dodecil sulfato de sódio

PBS	Salina tamponada com fosfatos
PMN	Polimorfonucleares
pH	Potencial hidrogeniônico
p/v	Proporção peso/volume.
q.s.p.	Quantidade suficiente para
SDS	Sódio dodecil sulfato
SNC	Sistema nervoso central
TBS	Tampão Tris-ácido clorídrico ou cloridrato de Tris
WB	Western-blotting ou imunoblotting

LISTA DE FIGURAS, GRÁFICOS E TABELAS

FIGURA 1.a Perfil protéico do veneno de <i>L. intermedia</i> em SDS-PAGE	46
FIGURA 1.b Perfil protéico do veneno eletroestimulado e extrato de glândula de <i>L. intermedia</i> em SDS-PAGE-TRICINA	47
FIGURA 2 Zimograma	48
FIGURA 3.a Blotting-lectínico do veneno eletroestimulado	50
FIGURA 3.b Blotting-lectínico do extrato de glândula	51
FIGURA 4 Perfil eletroforético dos quatro picos de eluição da cromatografia (Sephadex G-100) em SDS-PAGE	55
FIGURA 5 Perfil eletroforético dos picos III e IV de eluição da cromatografia (Sephadex G-100) em SDS-PAGE-TRICINA	56
FIGURA 6 Aspecto macroscópico da pele de coelho 0h e 4h após injeção de veneno total e frações eluídas da cromatografia (Sephadex G100)	57
FIGURA 7 Aspectos macroscópico e histológico da pele normal de coelho	61
FIGURA 8 A-G Aspectos macroscópico e histológico da pele de coelho 4h após a injeção subcutânea de veneno de <i>L. intermedia</i>	63
FIGURA 8 H-M Aspectos macroscópico e histológico da pele de coelho 4h após a injeção subcutânea de veneno de <i>L. intermedia</i>	65
GRÁFICO 1 Cromatograma de eluição de veneno total de <i>L. intermedia</i> em Sephadex G-100 com tampão TBS	53
GRÁFICO 2 Cromatograma de eluição de veneno total de <i>L. intermedia</i> em Sephadex G-100 com salina	54
GRÁFICO 3 Perfil espectrométrico dos componentes do Pico IV	73
GRÁFICO 4 Perfil espectrométrico dos componentes da salina	74
TABELA 1 Efeitos da administração do veneno total na atividade geral de camundongos em campo aberto	66

TABELA 2 Efeitos da administração das moléculas do pico III na atividade geral de camundongos em campo aberto	68
TABELA 3 Efeitos da administração das moléculas do pico IV na atividade geral de camundongos em campo aberto	68
TABELA 4 Reforço de bloqueador de canal de cálcio e tempo de morte dos camundongos	69
TABELA 5 Efeitos da administração prévia de bloqueador de canal de cálcio (5mg/kg) seguida da administração de veneno total na atividade geral de camundongos em campo aberto	70
TABELA 6 Efeitos da administração prévia de bloqueador de canal de cálcio (10mg/kg) seguida da administração de veneno total na atividade geral de camundongos em campo aberto	71

RESUMO

As aranhas e os homens têm compartilhado os mesmos habitats desde que os seres humanos existem. Elas ocuparam um espaço especial nos mitos e cultura popular, devido aos seus hábitos enigmáticos, seu aspecto físico, seu comportamento predatório e sua aparente potencial letalidade. Contudo, embora sua diversidade biológica e ecológica seja imensa (40.000 espécies descritas e provavelmente mais de 100.000 ainda não descritas), apenas poucas espécies representam um problema médico real. As espécies mais perigosas são: *Lactrodectus* (viúva negra), *Loxosceles* (aranha marrom) e *Phoneutra* (aranha da banana) as quais são responsáveis por casos de envenenamentos severos. Como dado, apenas três gêneros, *Atrax*, *Lactrodectus* e *Loxosceles*, são reconhecidos como responsáveis por morte em humanos.

Devido a potencial capacidade de injúria para humanos e sua particular ocorrência em Curitiba e Região Metropolitana com um problema endêmico, nós tentamos neste trabalho caracterizar bioquimicamente as proteínas de baixa massa molecular no veneno de *Loxosceles intermedia* e tentamos associa-las a atividades descritas no loxoscelismo.

Podemos considerar que 40% do veneno da aranha marrom é composto por proteínas de baixa massa molecular (<15kDa). Pudemos separar estas moléculas dos outros componentes do veneno por cromatografia de baixa pressão. Estes compostos foram classificados em dois grupos diferentes. O primeiro foi caracterizado como peptídeos com massa molecular entre 15-3kDa, sem glicosilação e sem atividade enzimática (denominado pico III). O segundo grupo pode ser caracterizado como substâncias com massas moleculares menores que 1kDa, e ensaios de espectrometria de massa sugeriram que estas moléculas sejam oligopeptídeos (pico IV).

A fim de descrever alguma atividade biológica destas duas classes de moléculas, realizamos ensaios histológicos e farmacológicos. Os ensaios histológicos realizados na pele de coelho demonstraram atividade hemorrágica das proteínas de baixa massa molecular (15-3kDa) e nenhuma atividade dos oligopeptídeos (<1kDa). Os ensaios da atividade geral em campo aberto foram realizados para buscar alguma atividade farmacológica do veneno total e das moléculas de baixa massa. Este teste foi realizado em camundongos usando veneno eletroestimulado (0,5mg/kg and 0,75mg/kg) e amostras representativas do pico III (0,26mg/kg) e do pico IV. Os dados colhidos mostraram que nos cinco parâmetros testados, o veneno alterou quatro. Os componentes do pico III não alteraram nenhum e as substâncias do pico IV alteraram três deles. Todas estas alterações foram no Sistema Nervoso Central causando depressão.

Os resultados obtidos neste trabalho são compatíveis com os relatos clínicos dos acidentes loxoscélicos em humanos. E com eles estamos tentando dar informações adicionais para o entendimento, diagnóstico e tratamento no acidente com a aranha marrom. Além do mais os venenos de aranhas podem ser úteis no desenvolvimento de ferramentas biológicas.

ABSTRACT

Spiders and humans have been sharing habitats for as long as humans have existed. They have long held a special place in popular myths and folklore, due to their secretive habits, physical aspect, predatory behavior, and their perceived potential lethality. Nevertheless, although their biological and ecological diversity is immense (c.a. 40.000 described species and probably more than 100.000 not yet described), very few species represent a true medical problem. The most dangerous species are: *Lactrodectus* (black widows), *Loxosceles* (brown spider) and *Phoneutra* (banana spider) which are responsible for many severe envenomation cases. To date, only the three genera *Atrax*, *Lactrodectus* and *Loxosceles* are recognized as responsible for human death.

Due to *Loxosceles* potential harmfulness to humans and its particular occurrence in Curitiba and Metropolitan Region as an endemic problem, we tried in this work to characterize biochemically the low mass proteins on *Loxosceles intermedia* venom and tried to associate them to biological activities described on loxoscelism.

We can considered that 40% of brown spider venom is composed by low mass proteins (<15kDa). We were able to separate them from the other components of venom by low-pressure chromatography. These compounds were classified on two different groups. The first one was characterized as peptides with molecular mass between 15-3kDa, without glycosilation and with no enzymatic activity (named peak III). The second group could be characterized as substances with molecular mass under 1kDa, and mass spectrometric assays suggested that these molecules are oligopeptides.

In order to describe some biological activity of these two classes of molecules, we performed histological and pharmacological assays. Histological assays

performed on rabbit skin showed some haemorrhagic activity of low mass proteins (15-3kDa) and no activity of oligopeptides (<1kDa). General activity assays on open field was performed to look for some pharmacological activity of crude venom or low mass molecules. We performed this assay on mice using electrostimulated venom (0,5mg/kg and 0,75mg/kg), a pool of peak III (0,26mg/kg) and a pool of peak IV. Data showed that on five parameters tested venom altered four, peak III did not altered anyone and peak IV substances have changed three of them. All these alteration were on Central Nervous System causing depression.

The data obtained in this work are compatible with clinical reports on loxoscelism accidents on human. And with them we are trying to give some additional information for understanding, diagnosis and treatment of brown spider accident. Furthermore spider venoms can be useful for development of biotechnological tools.

1 INTRODUÇÃO

Em função do quadro epidemiológico relacionado a envenenamentos por aranha marrom (gênero *Loxosceles*) que acometem principalmente a Região Sul do Brasil e em especial o Estado do Paraná torna-se de grande importância o desenvolvimento de conhecimento científico sobre o veneno deste animal, bem como o aprendizado técnico-científico que forneça soluções para esta endemia. E ainda tal conhecimento pode ser fundamental se direcionado para o desenvolvimento biotecnológico de ferramentas biológicas e/ou medicamentos tendo como origem estas toxinas e/ou produtos oriundos dos venenos deste gênero de aracnídeo.

1.1 Aranhas

As aranhas e os seres humanos têm compartilhado os mesmos habitats desde que os homens existem sobre a Terra. Devido a esta convivência as aranhas evocaram inúmeras e variadas respostas das pessoas, incluindo fascinação, preocupação, e como os aracnóforos podem atestar, terror debilitante. Elas asseguraram um lugar na mitologia de muitas culturas ao redor do mundo, bem como na cultura popular atual o que se pode comprovar por canções de roda e filmes de terror.

As aranhas são um grupo antigo, com o fóssil mais velho já encontrado datando de 300 milhões de anos atrás no Período Carbonífero. Excluindo-se os insetos, as aranhas são os mais bem sucedidos invertebrados terrestres com mais de 40.000 espécies tendo sido descritas por todo o globo terrestre (PLATNICK, 1993), sendo que provavelmente existam mais de 100.000 espécies ainda não descritas (ESCOUBAS *et al.*, 2000).

São animais que dentro da classificação taxonômica pertencem ao grupo dos artrópodes terrestres, classe dos aracnídeos, a qual é a segunda no número de

espécies, sendo que as aranhas compõem seu maior subgrupo (RUPPERT E BARNES, 1996).

Do ponto de vista morfológico, possuem o corpo dividido em dois segmentos, o cefalotórax (união entre cabeça e tórax) e o abdômen; quatro pares de patas; apresentam quelíceras e pedipalpos e podem possuir até oito olhos (RUPPERT E BARNES, 1996).

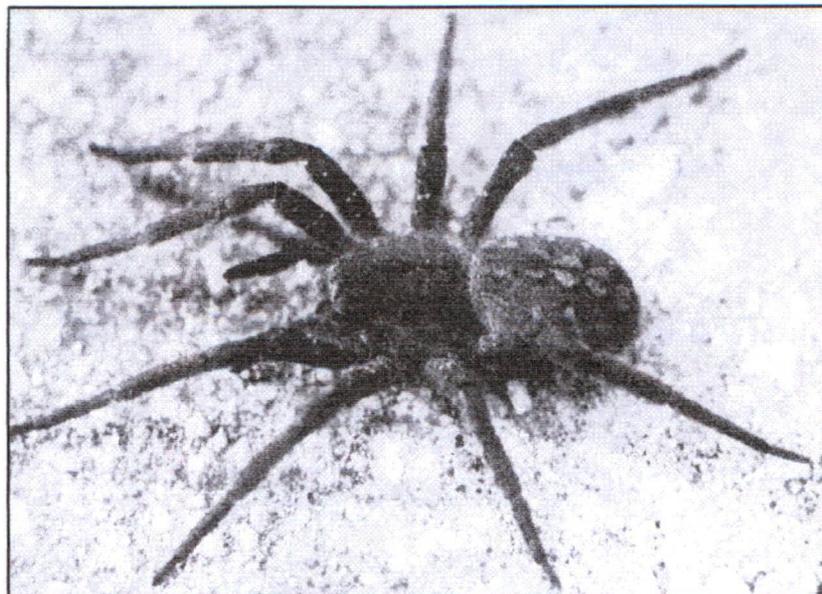
Há dois grupos principais de aranhas: o Orthognatha ou migalomorfa (aranha primitiva ou aranha "trapdoor") cuja quelícera se projeta à frente partindo do cefalotórax enquanto as presas posicionam-se para baixo e existe também o grupo Labdognatha ou araneomorfa, no qual os representantes possuem as quelíceras posicionadas verticalmente e que conjuntamente com as presas se movem lateralmente como pinças (RASH E HODGSON, 2002). Dentro deste grupo insere-se a aranha marrom.

Distribuem-se em praticamente todos os habitats e podem estabelecer-se numa grande variedade de ambientes naturais e domésticos. Por serem carnívoras alimentam-se de insetos e têm papel importante no equilíbrio ecológico (BARBARO *et al.*, 1995; RUPPERT E BARNES, 1996; SOERENSEN, 1996). A maioria das aranhas se alimenta predominantemente de insetos e outros artrópodes, contudo existem algumas espécies maiores que podem capturar e comer sapos, lagartos, cobras, pequenos pássaros e roedores. A presa é emboscada e agarrada com as presas (aranha caçadora) ou capturada numa armadilha (aranhas construtoras de teias). Qualquer que seja o método de captura o ultimato de morte da caça é a injeção do veneno. Uma vez a presa controlada, todas as aranhas começam a digestão extracorporeamente, regurgitando o suco digestivo sobre ou dentro da vítima, sugando em seguida o alimento liquefeito com auxílio de seu estômago que tem grande capacidade de sucção (RUPPERT E BARNES, 1996).

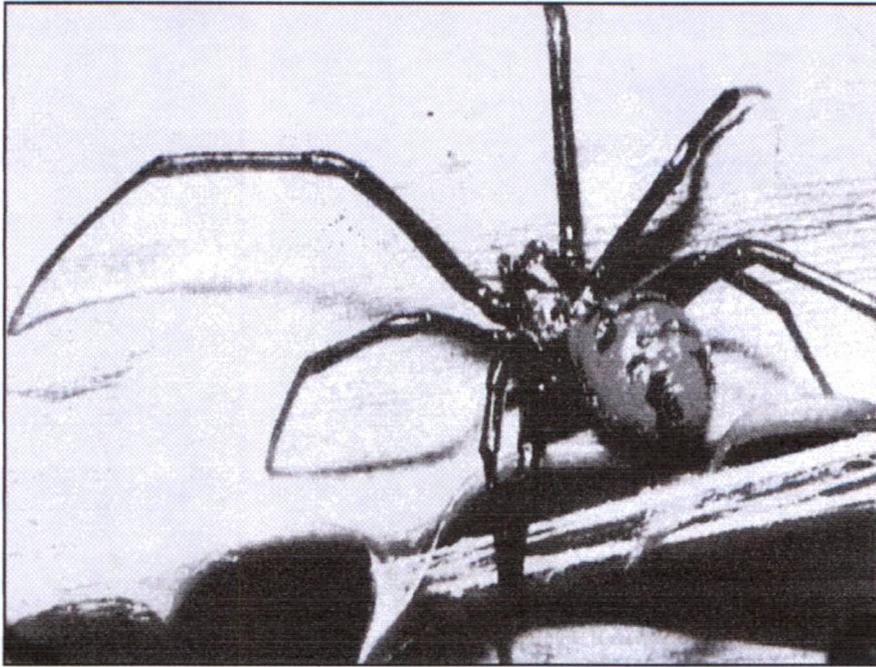
Apesar do grande número de espécies já descritas este número representa apenas uma parte do número real, sendo que apenas 100 das espécies descritas

parecem ter alguma periculosidade ao homem (BARBARO *et al.*, 1995; RUPPERT E BARNES, 1996). Dados mais recentes já citam 40.000 espécies de aranhas devidamente classificadas, mas com o veneno de apenas algumas dezenas delas bem estudados (GRISHIN, 1999).

As espécies mais perigosas de aranhas são encontradas no grupo das Labidognathas (araneomorfas): *Latrodectos* (viúva negra – Theridiidae), *Loxosceles* (aranha violino ou aranha marrom – Loxoscelidae), *Phoneutra* (aranha banana – Ctenidae), as quais são responsáveis por muitos casos de envenenamentos graves e registros de óbito. Muitas outras famílias são consideradas perigosas, Segestriidae, Agelenidae, Salticidae, Gnaphosidae, Thomisidae, Heteropodidae, Clubionidae e Lycosidae, embora a maioria das notificações de envenenamentos não seja adequadamente documentada. Notificações relacionadas com acidentes envolvendo estas espécies devem ser cuidadosamente consideradas a luz do polimorfismo natural da síndrome causada por este tipo de envenenamento e a incerteza da identificação taxonômica. Como dado, apenas três gêneros, *Atrax*, *Lactrodectus* e *Loxosceles* são apontados como responsáveis por acidentes culminando em óbito em humanos (ESCOUBAS *et al.*, 2000).



ARMADEIRA



VIÚVA NEGRA



FÊMEA

MACHO

ARANHA MARROM

1.2 Quelíceras e Glândulas Produtoras de Veneno

Segundo alguns autores, o veneno é produzido por glândulas apócrinas, situadas no cefalotórax, que se comunicam com o exterior através de dois ductos que desembocam no aparelho inoculador, constituído por um par de quelíceras (GAJARDO-TOBAR, 1966; MARTNEZ-VARGAS, 1987). As quelíceras situam-se na parte anterior do cefalotórax e possuem papel comparável às mandíbulas dos insetos, porém de origem diferente. São constituídas por dois segmentos, um basal, largo e robusto e um terminal, em forma de ferrão ou garra. São soldadas na base e medem aproximadamente 0,3 mm de comprimento e seus ferrões fortemente recurvos não ultrapassam três décimos de milímetro (BRAZIL E VELLARD, 1925; BÜCHERL, 1972).

Todas as espécies do continente americano que podem causar acidentes humanos que necessitam de tratamento médico especializado pertencem a subclasse Araneomorphae (BRAZIL E VELLARD, 1925; SOERENSEN, 1996).

Nas aranhas migalomorfas, as glândulas são livres, sem aderência aos órgãos vizinhos e nas araneomorfas, elas se encontram rodeadas por massas musculares, partindo do tórax até às patas anteriores. O canal excretor abre-se um pouco antes da extremidade do ferrão das quelíceras, por um pequeno orifício de forma variável (BRAZIL E VELLARD, 1925). A musculatura das aranhas forma feixes estriados, sendo bem desenvolvida no cefalotórax. Grande parte dos músculos das araneomorfas serve para movimentar as extremidades das quelíceras e as duas glândulas de veneno (BÜCHERL, 1972).

Alguns autores descrevem uma faixa bem definida entre as fibras musculares (compostas por fibras estriadas em diversas espécies) e a superfície do epitélio secretor. Esta faixa foi denominada membrana basal ou de suporte (BORDAS, 1905) e é composta por uma membrana basal de tecido conectivo (REESE, 1944) e uma membrana peritonal (BARTH, 1962). Segundo REESE (1944) a membrana basal é

sempre distinta, pois varia consideravelmente de espessura antes e após a secreção.

As células epiteliais são excretoras, com núcleo perto da base e a membrana basal é de tecido conectivo, seguida de uma musculatura geralmente composta de fibras circulares envolventes e longitudinais, pelas quais penetra o nervo glandular. O corpo glandular tem sempre o aspecto de um saco. O lúmen central da glândula serve como reservatório das substâncias venenosas elaboradas. Para a completa eliminação do veneno no ato da picada, existem no cefalotórax e no artícolo basal das quelíceras, dois feixes musculares que puxam para frente o fundo do saco glandular, ao mesmo tempo em que os feixes circulares o comprimem (BÜCHERL, 1972).

Para as aranhas do gênero *Loxosceles*, a organização das glândulas de veneno segue a arquitetura geral das glândulas de veneno das aranhas em geral, onde o epitélio secretor é revestido por uma membrana basal e rodeado por uma espessa musculatura (JUNQUA E VACHON, 1968; BÜCHERL, 1972; FOIL *et al.*, 1979). Um exame mais apurado das glândulas de veneno da *L. intermedia* mostra que elas têm duas camadas de fibras musculares estriadas, uma externa e uma interna que toca na estrutura mais interior que separa a região muscular da região epitelial das glândulas de veneno. Este epitélio é simples glandular secretor, com células mononucleadas com os núcleos alinhados periféricamente próximo ao tecido que separa as células epiteliais das musculares. O citoplasma das células epiteliais é arranjado lado a lado, contendo projeções para o lúmen das glândulas o que sugere hiperatividade. O lúmen das glândulas é rico em vesículas secretoras contendo veneno (DOS SANTOS *et al.*, 2000).

1.3 Composição do Veneno de Aranhas

Ao levarmos em consideração que as aranhas são seres mais complexos em relação aos seus ancestrais e a pouca capacidade destes terem mínimas chances

de sobreviver se os analisarmos morfologicamente, é possível que o uso de veneno tenha sido desenvolvido primitivamente (BETTINI E BRIGNOLI, 1978).

O primeiro propósito do veneno das aranhas é paralisar ou matar a presa, mas ele também pode ter papel na pré-digestão da suposta refeição. Pode ser que os venenos ainda tenham função defensiva contra predadores. Na verdade já foi sugerido que as aranhas não injetariam veneno durante a subjugação da caça, mas apenas em manobras defensivas (MINTON, 1974). Qualquer que seja a função integral dos venenos eles foram mais eficazes do que o uso da teia (BETTINI E BRIGNOLI, 1978).

Em geral os venenos de aranhas, especialmente os de tarântulas (Araneae: Theraphosidae, *Licosa ssp*), são líquidos claros incolores facilmente solúveis em água (BÜCHERL, 1971; NORMENT E FOIL, 1979; MINTON, 1974), têm pH que vai do neutro ao alcalino. A variante está dentro do grupo dos migalomorfos: *Atrax robustus*, *Dugesiella henzi* e *Euripelma californicum*; todas elas têm venenos com pH entre 4 – 5,5 (SCHANBACHER *et al.*, 1973; SAVEL-NEIMANN, 1989). O veneno das aranhas verdadeiras (araneomorfas) é reportadamente estável por anos se secado a vácuo, já o veneno das migalomorfos é mais higroscópico e liquefaz-se se deixado em contato com o ar, mas se mantém estável por alguns meses se deixado em dessecador a vácuo (BÜCHERL, 1971).

A evolução equipou os animais peçonhentos com um arsenal complexo de neurotoxinas que agem contra receptores celulares com requintes de sensibilidade e seletividade. Os venenos de aranhas são multiplamente compostos, de pobre entendimento sobre sua constituição, compreendendo toxinas compostas por proteínas de alta massa molecular, de baixa massa molecular e toxinas polipeptídicas, estas últimas são altamente reticuladas por pontes dissulfeto. Em particular, as interações entre as várias classes químicas presentes nos venenos e seus respectivos papéis no processo de envenenamento não foram bem definidos. Os componentes de venenos de aranhas podem ser divididos em três grupos

majoritários segundo suas características bioquímicas: moléculas orgânicas de baixa massa molecular (menos de 1.000 Da), polipeptídeos (3.000 a 10.000 Da) e proteínas de alta massa molecular (mais de 10.000 Da) (ESCOUBAS *et al.*, 2000).

As proteínas de venenos de aracnídeos incluem proteínas de alta massa molecular e oligopeptídeos com ações neurotóxicas ou enzimáticas variadas. Contudo, com exceção de venenos altamente necróticos como o de *Loxosceles*, nos quais as enzimas já foram bem caracterizadas, a presença de enzimas em venenos de aranhas deve ser vista com cautela. Proteases, hialuronidases, esfingomielinases, fosfolipases e isomerases foram descritas em venenos destes animais (SCHANBACHER *et al.*, 1973). Porém, em muitos dos casos deve-se suspeitar de contaminação do veneno por saliva ou egesto digestivo, em particular quando o veneno é colhido por eletrochoque. No gênero *Loxosceles* a presença destas proteases foi detectada no extrato de glândula de *L. intermedia* descartando-se a contaminação por egesto digestivo, que poderia estar presente na coleta por eletrochoque (DA SILVEIRA *et al.*, 2002). Este achado comprova a existência de tais moléculas ativas biologicamente nos compartimentos glandulares desta espécie. Muitas toxinas de alta massa molecular já foram descritas em veneno de aranhas, como por exemplo, o gênero *Latrodectus* (viúva negra). A alta neurotoxicidade deste veneno, tanto para invertebrados quanto para vertebrados, é creditada à presença de uma família de proteínas com massa molecular que gira em torno de 110kDa, chamadas latrotoxinas (HOLTZ E HABENER, 1998)

1.4 Características dos Componentes de Baixa Massa Molecular dos Venenos de Aranhas

GRISHIN (1999) divide quimicamente as moléculas de baixa massa molecular de venenos de aranhas em dois grupos maiores: as toxinas poliamínicas e as polipeptídicas. As toxina polipeptídicas são subdivididas por suas características funcionais e moleculares em dois grupos majoritários. O primeiro grupo compreende

peptídeos relativamente pequenos, os quais podem interagir com canais iônicos das membranas excitáveis. O segundo cobre neurotoxinas polipeptídicas de mais alta massa molecular que se limitam a agir sobre componentes de receptores da membrana pré-sináptica intensificando a secreção dos neuromediadores.

Como constituintes orgânicos e inorgânicos estes venenos contêm íons e sais (Ca^{2+} , Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Cl^-), ácidos livres (cítrico, láctico, diidrofenilacético), glicose, aminoácidos livres, aminas biogênicas (espermicina, espermidina, putrescina, cadaverina) e neurotransmissores (glutamato, aspartato, GABA, histamina, dopamina, serotonina, epinefrina, epinina) (WELSH E BATTY, 1963; CHAN *et al.*, 1975). O papel destes constituintes é desconhecido embora possam potencializar a ação de neurotoxinas em alguns casos. Podem também representar produtos de degradação de outros componentes do veneno, como resultado do processo de seleção. Outra classe química, as acetilpoliaminas, foi caracterizada pela primeira vez em venenos de aranhas (ARAMAKI *et al.*, 1986; TOKI *et al.*, 1990). Apesar de algumas poliaminas poderem ser tóxicas para vertebrados, por administração intracraniana direta, as mesmas parecem ter essencialmente atividade inseticida e são responsáveis pela rápida paralisia observada durante a predação. Esta paralisia é mediada por bloqueio rápido e reversível da junção neuromuscular do inseto, onde o glutamato é o principal neurotransmissor. ESCOUBAS *et al.* (1997) mostraram a presença destes compostos no veneno de tarântulas da América do Sul.

Quando se trata da presença de polipeptídeos nas toxinas de aranhas, a vasta maioria apresenta massa molecular entre 3.000 Da e 8.000 Da, altamente reticulados por várias pontes dissulfeto (ESCOUBAS *et al.*, 2000). O alto número de resíduos de cisteínas é o responsável pela formação de pontes dissulfeto intramoleculares. O número destas pontes nestas toxinas varia de 6 a 14. Como regra geral, as toxinas contendo o mesmo número de pontes apresentam homologia estrutural, mas diferem nas suas características funcionais. Muitas neurotoxinas de aranhas afetam a função de diferentes canais de cálcio, servindo como perfeitas

ferramentas de pesquisa em experimentos eletrofisiológicos e/ou bioquímicos. Bem menos toxinas são conhecidas com atividade sobre canais de sódio e potássio (GRISHIN, 1999).

Em combinação com as poliaminas, os peptídeos parecem representar o principal arsenal tóxico das aranhas. Até os dias de hoje, mais de 60 toxinas peptídicas já foram descritas. Parecendo, essencialmente, agirem sobre vários canais iônicos de membrana. Eles podem bloquear a liberação dos neurotransmissores por afetarem a exocitose das vesículas pré-sinápticas e induzirem modificações anormais da transmissão sináptica resultando em paralisia flácida. Alguns peptídeos podem também provocar paralisia excitatória resultante da atividade paroxística induzida pela polarização excessiva. A atividade das toxinas pode também ser específica para alguns grupos zoológicos, por exemplo, podem ter ação sobre insetos e não ter ação nenhuma sobre os mamíferos (ESCOUBAS *et al.*, 2000).

1.5 Gênero *Loxosceles*

As aranhas do gênero *Loxosceles* pertencem à família Loxoscelidae, subordem Labidognatha, ordem Araneida, classe Arachnida e filo Arthropoda (RUPPERT E BARNES, 1996; SOERENSEN, 1996).

As aranhas deste gênero recebem também a denominação popular de aranhas marrons por seu colorido uniforme que varia de marrom claro até o marrom escuro. Variações nesta coloração podem ajudar a identificação de algumas espécies como a *Loxosceles gaucho* que apresenta mancha clara ou *Loxosceles laeta* mancha escura no cefalotórax. São aranhas de pequeno porte. Possuem comprimento corporal variando de 8 a 15 mm e suas patas medem de 8 a 30 mm. Os machos diferenciam-se das fêmeas por terem corpo menor e pernas relativamente mais longas do que as fêmeas. Possuem seis olhos brancos brilhantes

reunidos sobre o cefalotórax, em três grupos de dois, em semicírculo. O cefalotórax é baixo, não ultrapassando em altura o abdômen (BÜCHERL, 1972).

Têm hábitos noturnos, são sedentárias e não agressivas. Preferindo a escuridão algumas vivem sob pedras troncos de árvores, restos vegetais, telhas e tijolos empilhados. Com hábitos intradomiciliares podem ser encontradas atrás de quadros e móveis, no meio de roupas, livros, caixas de papelão e outros objetos. Constróem teias irregulares semelhantes a algodão esfiapado. São carnívoras alimentando-se de pequenos insetos. Reproduzem - se com facilidade, mesmo em ambientes desfavoráveis (BÜCHERL E ROSENFELD, 1954; HITE *et al.*, 1960; GAJARDO- TOBAR, 1966; SCHENONE E LETONJA, 1975; LUCAS, 1988; FUTRELL, 1992). Distribuindo-se cosmopolitamente podem estar presentes em ambientes com temperaturas entre 8 e 43°C. Os acidentes com aranhas marrons ocorrem principalmente durante as estações mais quentes do ano, primavera e verão (SCHENONE E LETONJA, 1975). Ambos os sexos são venenosos e podem sobreviver até 276 dias sem alimento (GERSTCH E ENNIK, 1983; FUTRELL, 1992).

Ao contrário de outros animais peçonhentos, como ofídios, escorpiões e outros quelicerados, a aranha marrom não é agressiva. A maior parte dos acidentes loxoscélicos (nome dado ao acidente provocado pela picada da aranha marrom) é devido à compressão do animal, inadvertidamente, contra a pele no ato de vestir-se, calçar-se, enxugar-se ou durante o sono (SUAREZ *et al.*, 1971; LUCAS, 1988; FUTRELL, 1992).

1.6 Distribuição geográfica das aranhas do gênero *Loxosceles*

As aranhas do gênero *Loxosceles* da família Loxoscelidae estão distribuídas na América do Sul, América Central, América do Norte, Europa (especialmente na área do Mediterrâneo) e África. Existe um grande número de espécies, incluindo mais de 17 na África, duas na Europa e mais de 50 nas Américas do Norte e do Sul.

Nos Estados Unidos, apenas, há pelo menos 13 espécies catalogadas (FUTRELL, 1992).

GERTSCH e ENNIK (1983) fizeram uma revisão das espécies do gênero *Loxosceles*, que ocorrem no Continente Americano citando 18 espécies para a América do Norte, América Central e Antilhas e 30 para a América do Sul. No Brasil ocorrem sete espécies heterogeneamente distribuídas que são: *Loxosceles gaucho* encontrada em São Paulo e Rio Grande do Sul; *Loxosceles similis* encontrada na Paraíba, São Paulo e Minas Gerais; *Loxosceles adelaide* encontrada no Rio de Janeiro; *Loxosceles hirsuta* encontrada no Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná; *Loxosceles intermedia* encontrada do Rio Grande do Sul ao Rio de Janeiro; *Loxosceles amazonica* encontrada no Amazonas e Ceará e *Loxosceles laeta* encontrada nas regiões Sul e Leste.

No Sul e Sudeste do país as espécies *L. gaucho*, *L. laeta* e *L. intermedia* são as predominantes.

1.7 Loxoscelismo ou Acidente Loxoscélico

Loxoscelismo é a denominação do quadro clínico provocado em indivíduos picados por aranhas do gênero *Loxosceles*.

Os acidentes loxoscélicos no Brasil começaram a ser reconhecidos em 1954, por BÜCHERL e ROSENFELD. Posteriormente, outros trabalhos como os de FURLANETTO (1961) e FURLANETTO *et al.* (1962) contribuíram para caracterização do gênero e produção de soro antiveneno específico.

No Brasil a freqüência de acidentes causados por picada de aranha marrom é de 36,6% ou 17.785 casos notificados entre 1990 e 1993 (segundo dados do Ministério da Saúde), torna o loxoscelismo o mais importante dos casos de envenenamento envolvendo aranhas.

Os acidentes se relacionam aos hábitos adotados pela aranha marrom, por isso tendem a ocorrer com maior freqüência em pessoas do sexo feminino, e os

locais mais atingidos são as regiões proximais dos membros inferiores e superiores e no tronco, o que caracteriza o acidente como doméstico e ocasionado principalmente pelo ato de defesa da aranha ao ser comprimida contra o corpo do indivíduo, durante o sono ou mesmo no momento de vestir-se (RIBEIRO *et al.*, 1993).

O quadro clínico provocado por acidentes envolvendo as aranhas do gênero *Loxosceles* pode ser de dois tipos: o quadro cutâneo ou dermonecrótico (84 - 97% dos casos) e o quadro cutâneo-visceral ou sistêmico (3-16% dos casos) (BARBARO *et al.*, 1992). O desenvolvimento de um quadro ou outro, ou de ambos e a gravidade do acidente vai depender de alguns fatores relacionados com a espécie da aranha (Ministério da Saúde, 1998), sexo do animal (OLIVEIRA *et al.*, 1999), seu estágio de desenvolvimento (ANDRADE *et al.*, 1999), quantidade de veneno inoculada, assim como a idade (SEZERINO *et al.*, 1998) e características genéticas do indivíduo acidentado (BARRETO *et al.*, 1985), bem como o estado nutricional, local da picada, susceptibilidade ao veneno e o tempo em que este indivíduo leva para procurar um tratamento adequado (GAJARDO-TOBAR, 1966; SCHENONE *et al.*, 1989; BARBARO *et al.*, 1994).

O quadro cutâneo caracteriza-se por dermonecrose no local da inoculação do veneno (REES *et al.*, 1984). A picada inicial, por ser pouco dolorosa, geralmente passa despercebida pelo paciente, após 2 a 8 horas, a dor pode variar de moderada a severa e é descrita como dor local do tipo “queimação” ou ardência. Pode ser acompanhada por prurido, edema, eritema, sensação de mal-estar geral e podendo em alguns casos ocorrer febre. Em seguida, pode surgir uma lesão de 1 a 30 cm de diâmetro, circundada por halo vermelho e uma zona pálida, denominada placa marmórea (RODRIGUES *et al.*, 1986; FUTRELL, 1992). Após 3 a 5 dias do acidente pode ocorrer acúmulo de leucócitos polimorfonucleares, necrose e formação de abscesso (SMITH E MICKS, 1970; FUTRELL, 1992). Em alguns casos a lesão cutânea necrótica evolui em 2 a 6 semanas, com formação de uma escara

de difícil cicatrização e pode dar origem a seqüelas deformantes de importância (PIZZI *et al.* 1957). O ferimento crônico produzido pela picada da aranha marrom apresenta vasculite mediada por leucócitos, que pode produzir lesões como piodema gangrenosa (REES *et al.*, 1985). Esta lesão pode ter como agente sinérgico, acentuando sua gravidade, a presença de microorganismos provenientes das quelíceras, que no momento da picada são injetados concomitantemente com o veneno. Um agente importante de infecção secundária à picada é o *Clostridium perfringens*, bacilo gram positivo anaeróbio (MONTEIRO *et al.*, 2002).

Nos casos em que ocorre formação de úlcera necrótica ou mancha gangrenosa de difícil cicatrização e a cura não se completa em menos de um mês, no local, como seqüela, permanece cicatriz que pode ser desfigurante ou pode até mesmo causar prejuízo funcional (lesões mais extensas e profundas com perda significativa de massa muscular). Nesses casos, uma cirurgia reparadora pode, às vezes, solucionar tais problemas (FUTRELL, 1992). Em 5% dos casos, principalmente na face, ocorre uma forma edematosa que não é necrótica, sendo caracterizada por extenso processo flogístico (BARBARO *et al.*, 1992b).

QUADRO DERMONECRÓTICO



ASPECTO INICIAL DA LESÃO



ASPECTO AVANÇADO

Por razões óbvias, não foram executadas biópsias consecutivas do desenvolvimento do loxoscelismo cutâneo em humanos. Porém, as mudanças histopatológicas informadas incluem edema e espessamento do endotélio dos vasos sanguíneos, presença de células inflamatórias, vasodilatação, coagulação intravascular, degeneração da parede dos vasos sanguíneos, hemorragia dérmica e até mesmo subcutânea (SMITH E MICKS, 1970; FUTRELL, 1992).

Em estudos realizados em coelhos, com veneno de *L. laeta* e *L. reclusa*, as amostras histopatológicas mostraram após 3 horas, o acúmulo de leucócitos polimorfonucleares ao redor de vênulas e eritrócitos extravasculares sugerindo perda da integridade vascular. Nas arteríolas, foi verificado somente edema de células endoteliais. Após 6 horas, havia edema da derme e epiderme, infiltração de leucócitos polimorfonucleares nas paredes das vênulas, vasodilatação, coagulação intravascular, hemorragia volumosa subcutânea, e até mesmo no músculo, necrose, vacuolização das paredes das arteríolas e destruição da integridade das mesmas. Após 48 horas, o infiltrado de leucócitos polimorfonucleares continua crescendo (SMITH E MICKS, 1970; FUTRELL, 1992). O estudo histopatológico detalhado da dermonecrose induzida por veneno de *L. intermedia* em coelhos mostra aparecimento de injúria tecidual a partir de 4 horas após a injeção do veneno chegando a um pico máximo de dano tecidual, inclusive com lise de tecidos mais profundos que a derme (mionecrose e necrose coagulativa) em 5 dias, com aparecimento de tecido conjuntivo de reparo (OSPEDAL *et al.*, 2002), além de lesão de vasos sanguíneos com aparecimento de bolhas no endotélio, fibrinogénólise e trombose (VEIGA, *et al.*, 2001a; VEIGA, *et al.*, 2001b; ZAENTTI *et al.*, 2002).

O loxoscelismo cutâneo-visceral ou sistêmico ocorre com menor frequência (3 – 16% dos casos) e é observado apenas nos casos mais graves. As primeiras manifestações aparecem após 24 horas e os sintomas incluem, além da reação local, astenia, febre, episódios eméticos, alterações sensoriais, cefaléia, insônia e nos casos mais graves ocorrem convulsões e coma. Pode também ocorrer prurido

generalizado e petéquias (MARTINEZ-VARGAS, 1987; SCHENONE *et al.*, 1989; FUTRELL, 1992; BRAVO *et al.*, 1993).

Nos casos de gravidade ainda maior, as alterações no quadro hematológico incluem anemia hemolítica, agregação plaquetária causando trombocitopenia (BASCUR *et al.*, 1982) e coagulação intravascular disseminada (DENNY *et al.*, 1964) as quais podem determinar diminuição do hematócrito, aumento da bilirrubina indireta e icterícia (SCHENONE E SUAREZ, 1978; REES *et al.*, 1988; SILVA *et al.*, 1988; FUTRELL, 1992). Outras conseqüências decorrentes do envenenamento incluem alterações vasculares nos pulmões, fígado e rins (PIZZI *et al.*, 1957; LUNG E MALLORY, 2000).

Uma das alterações funcionais mais graves, sendo a principal causa de morte nestes acidentes (Ministério da Saúde, 1998) é a insuficiência renal aguda (IRA), a qual caracteriza-se por hemoglobinúria e hematúria, e em casos extremos pode levar a obstrução da luz tubular (IRA oligúrica ou não oligúrica) (WASSERMAN E ANDERSON, 1984; SCHENONE *et al.*, 1989; FUTRELL, 1992; SESERINO, 1998; LUNG E MALLORY, 2000).

Esta síndrome não tem ligação alguma com sexo e idade do paciente, estação do ano e seriedade da lesão cutânea. Não tem relação entre o tamanho e o tipo da lesão cutânea e o grau do comprometimento visceral. A reação sistêmica não é necessariamente proporcional à reação local e vice-versa, uma vez que os sintomas sistêmicos podem desenvolver-se antes de alguma reação local poder ser notada. A evolução dos sintomas está relacionada à quantidade de veneno inoculada, localização da picada e a condição imunológica do paciente (MORÁN *et al.*, 1981; CICARELLI *et al.*, 1983/84; HEREDIA *et al.*, 1989).

A compreensão molecular do loxoscelismo ainda é bastante incompleta. O mecanismo pelo qual os venenos loxoscélicos causam a dermonecrose está sob investigação. PIZZI *et al.* (1957) fizeram o primeiro estudo sistemático e detalhado das lesões histológicas produzidas experimentalmente pelo veneno de *Loxosceles*

laeta. O estudo das lesões locais, em cobaias e coelhos, demonstrou a existência precoce de intensas alterações vasculares, caracterizadas essencialmente por vasoconstrição inicial das arteríolas e posteriormente, por vasodilatação acentuada. A parede dos vasos da área afetada foi intensamente comprometida, apresentando fenômenos degenerativos e trombóticos. Nas primeiras horas relataram a formação de um intenso edema com extravasamento das células sanguíneas, inclusive eritrócitos. O estudo histológico da lesão local demonstrou alterações parecidas com as descritas no fenômeno de Arthus. Segundo os autores a necrose se explicaria pelas marcantes alterações vasculares, provocadas por um fenômeno semelhante aos anafilactóides de caráter local.

Por outro lado, PIZZI *et al.* (1957) salientaram ainda, que a intensidade das lesões locais esteve, em geral, em relação inversa com a severidade das lesões de outros órgãos (rim, pulmão, S.N.C., etc.) e com a gravidade do envenenamento. Com isso, inferiram que as importantes alterações vasculares locais, assim como a grande intensidade do edema, poderiam ser fatores que impediriam uma rápida ação sistêmica do veneno. Células inflamatórias (especialmente polimorfonucleares) acumuladas no local do envenenamento parecem exercer alguma atividade nesta função (PATEL *et al.*, 1994). Estudos conduzidos com a depleção de leucócitos PMN, anterior a injeção do veneno de *Loxosceles reclusa*, resultam em inibição completa da hemorragia e redução marcante de edema e necrose sugerindo que estes leucócitos são críticos no desenvolvimento da lesão pelo veneno (SMITH E MICKS *et al.*, 1970).

De acordo com SMITH E MICKS (1970), a infiltração leucocitária precoce dos vasos sanguíneos no local da picada, implicando em injúria de vasos sanguíneos, foi considerada como patologia base para a perda da pele. Em estudos histopatológicos por MACHADO *et al.* (1978/79) foram encontradas lesões degenerativas e necróticas características comprometendo glândulas sudoríparas. Estudos experimentais histológicos realizados por vários autores relatam edema difuso com

extravasamento de leucócitos e eritrócitos de intensidade variável, necrose de extensão variável da epiderme, acompanhada de vacuolizações das células da camada basal. Os vasos sangüíneos de pequeno porte apresentam necrose, arterite e trombose. Alterações locais dos vasos sangüíneos variaram desde simples ectasia a fenômenos degenerativos de suas paredes. Por vezes houve o predomínio de lesões hemorrágicas e degenerativas do tecido conjuntivo, adiposo e muscular (PIZZI *et al.*, 1957; GAJARDO-TOBAR, 1966; MACHADO *et al.*, 1978/79; MARTINO *et al.*, 1981).

O quadro dermonecrótico avançado que é a manifestação mais característica do loxoscelismo, com morte celular e destruição dos constituintes intercelulares (matriz extracelular) na região lesionada, representa potencialmente a presença de atividade proteolítica de enzimas do veneno, sendo até o presente momento demonstrada a existência de metaloproteases, hialuronidase, esfingomielinase e serino-proteases (FORRESTER *et al.*, 1978; KURPIEWISKI *et al.*, 1981; REKOW *et al.*, 1983; FEITOSA *et al.*, 1998; VEIGA *et al.*, 1999; VEIGA *et al.*, 2000a).

Efeitos de ativação plaquetária induzidos pela toxina da aranha marrom na microcirculação podem ser responsáveis pela trombose vascular, isquemia tecidual e perda da pele na picada clínica (SMITH E MICKS, 1970). Além disso, componentes plasmáticos também parecem ser requeridos para efeitos nocivos do veneno (REES *et al.*, 1988). O componente amilóide P presente no plasma parece participar na ativação da agregação plaquetária provocada pelo veneno (GATES E REES, 1990). A ativação da via alternativa do sistema complemento também parece participar dos efeitos nocivos do veneno (TAMBOURGI *et al.*, 1995; TAMBOURGI *et al.*, 2000). Por outro lado, tanto as atividades dermonecróticas como as hemorrágicas podem estar diretamente associadas a enzimas proteolíticas presentes no veneno, as quais têm a capacidade de degradar fibronectina, fibrinogênio, entactina e heparan sulfato proteoglicano de células endoteliais

(FEITOSA *et al.*, 1998; VEIGA *et al.*, 1999; VEIGA *et al.*, 2000a; VEIGA *et al.*, 2000b; VEIGA *et al.*, 2001a; VEIGA *et al.*, 2001b).

O tratamento do loxoscelismo ainda é de grande preocupação, já que não se estabeleceu um protocolo medicamentoso eficiente. O uso de esteróides sistêmicos não se mostrou eficaz na diminuição da infiltração leucocitária polimorfonuclear ou do tamanho da lesão em experimentos controlados em animais. Com exceção do envenenamento sistêmico, eles provavelmente não têm função terapêutica. Além do mais, a injeção dos mesmos, intralesionalmente, pode aumentar o edema e a pressão no local de inoculação contribuindo para a necrose tecidual (FUTRELL, 1992). Com base em dados anteriores, pode-se dizer que a possibilidade de uso do soro antiveneno é de pouca função terapêutica, sendo que os indivíduos picados, em geral, só procuram tratamento médico 24 horas após o acidente loxoscélico. É sabido que o veneno loxoscélico pode ficar retido no local da picada por um período de tempo, particularmente em região de tecido gorduroso. Então, se o antiveneno tem um papel, poderia ser não de prevenção do aparecimento da lesão, mas na remoção do veneno residual e favorecendo a cicatrização periférica a picada. O aquecimento do local da inoculação do veneno não pode ser imediatamente creditado à própria ação do veneno ou infecção secundária. Então em Abril de 1986, KING E REES recomendaram um regimento a ser seguido para tratamento de picadas severas de aracnídeos e correlacionados; a primeira medida terapêutica é a administração de eritromicina ou cefalosporina. Estes autores ainda recomendaram (1) dapsona (se excluída deficiência em G6PD); (2) antibióticos; (3) gelo e elevação do local; (4) evitar atividade exagerada; (5) evitar calor e cirurgia imediata e (6) aspirina. Além de exames laboratoriais adicionais para se tentar identificar qualquer sinal de complicações sistêmicas (FUTRELL, 1992). Pode ser útil a administração de antibióticos do grupo da penicilina G, para se evitar instalação de microorganismos associados à lesão, como por exemplo, *Clostridium perfringens* (MONTEIRO *et al.*, 2002).

1.8 Loxoscelismo no Estado do Paraná

O loxoscelismo tornou-se um problema de grande interesse para a área médica e de saúde pública no Estado do Paraná, pois os índices de acidentes vêm aumentando de forma alarmante. Outro fator preocupante é a elevada infestação domiciliar da aranha da espécie *Loxosceles intermedia*.

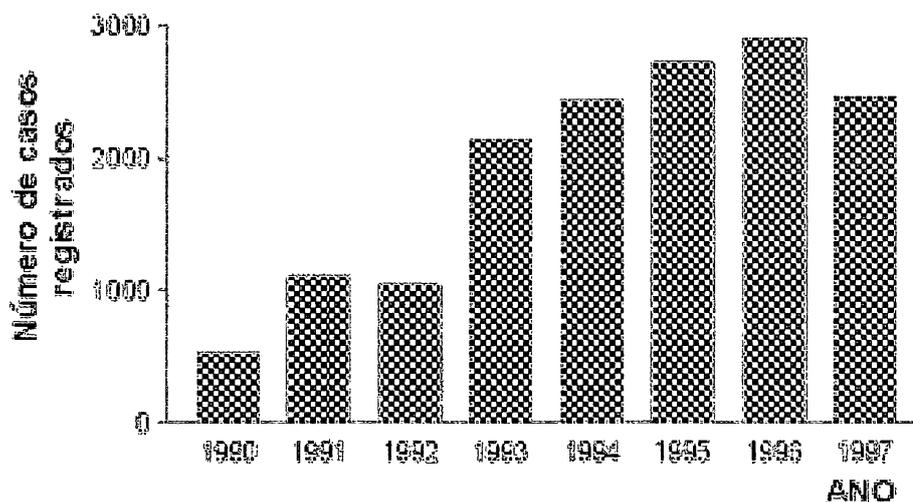
No Brasil, o Estado do Paraná tem sido o que mais notifica esses acidentes. Eles correspondem a mais de 50% daqueles provocados por aracnídeos notificados no Ministério da Saúde do Brasil.

No Paraná o loxoscelismo, comparado com outros acidentes toxicológicos provocados por animais peçonhentos, ocupa o primeiro lugar com 58,1% dos casos (dados fornecidos pelo Centro de Epidemiologia do Paraná), e em particular, a cidade de Curitiba e Região Metropolitana são consideradas, pelas autoridades sanitárias, como áreas endêmicas para este tipo de ocorrência. Números como os registrados entre 1988 e 1989 de 595 casos (que corresponderam a 62,2% das notificações de acidentes causados por *Loxosceles spp*) e de 923 casos entre 1989 e 1990 (perfazendo 77,4% dos acidentes registrados em todo território nacional), com incidência maior nos períodos mais quentes do ano, justificam esta classificação. O registro de casos apenas em Curitiba no ano de 1994, 2428 acidentes com 3 pacientes indo a óbito (Secretaria de Estado da Saúde) torna de extrema importância qualquer avanço no sentido de adquirir conhecimento tanto para prevenir, diagnosticar e tratar os acidentes, quanto para compreender e caracterizar os mecanismos de ação deste veneno visando sua aplicabilidade biotecnológica.

Segundo dados obtidos através da Secretaria de Saúde do Estado do Paraná, em 1990 foram diagnosticados 526 casos e no ano seguinte houve um aumento, chegando a 1.111 casos. Já em 1992, o número de casos diminuiu, com 1.057 casos, porém em 1993 o número de casos voltou a subir, sendo registrados 2.148 casos. Em 1994 foram diagnosticados 2.428 casos e em 1995 foram 2.722 casos. Já

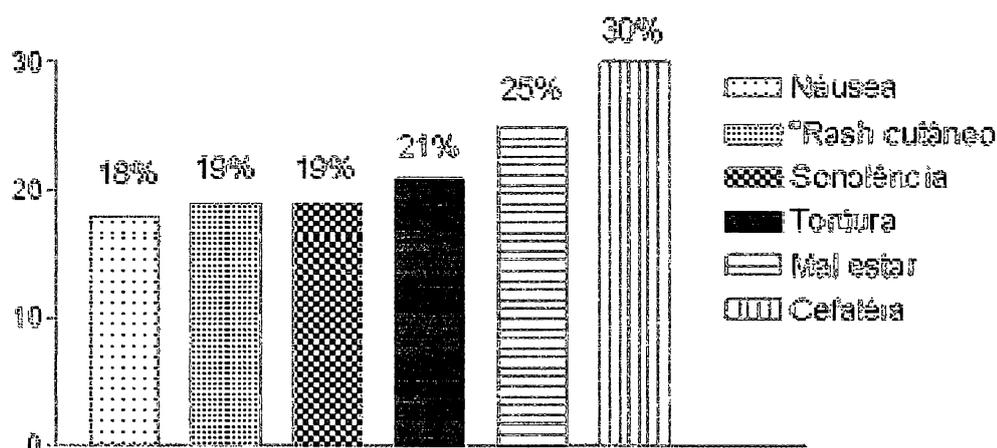
em 1996 o número de casos ficou em 2.898 e em 1997 foram aproximadamente 2.456 casos (comunicação pessoal da Secretaria de Estado da Saúde do Paraná).

Número de acidentes toxoscélicos registrados no Estado do Paraná



Dados colhidos junto ao SESA/ Centro de Saúde Ambiental do Estado do Paraná mostram que nos casos de loxoscelismo registrados entre 1995 e 1999 as alterações sistêmicas mais freqüentes foram tontura, sonolência, sede, "rash" cutâneo, náusea, mal estar e cefaléia.

Alterações sistêmicas mais freqüentes



1.9 Características do Veneno Loxoscélico

O veneno loxoscélico é essencialmente protéico, com ação enzimática ou tóxica e pode ser comparado a alguns venenos de cobras, onde os estudos demonstraram a presença abundante de enzimas em sua composição (MARTINEZ-VARGAS, 1987). Entre estas enzimas foram descritas uma esfingomielinase de 32-35 kDa envolvida aparentemente na agregação plaquetária (KURPIEWSKI *et al.*, 1981) e outras moléculas de 33, 34 e 35 kDa associadas com atividades nocivas do veneno (GEREN *et al.*, 1976; BARBARO *et al.*, 1992b; TAMBOURGI *et al.*, 1995; FEITOSA *et al.*, 1998; VEIGA *et al.*, 1999). A presença de hialuronidases pode ser potencializadora de outros componentes do veneno, no sentido de facilitar a penetração destes em vários compartimentos celulares e tecidos, porém a função exata da maioria das enzimas existentes ainda necessita de elucidação. O veneno contém ainda outros fatores hemorrágicos, uma metaloprotease de 20-28 kDa (loxolisina A) com efeitos sobre a fibronectina e o fibrinogênio e uma metaloprotease gelatinolítica de 32-35 kDa (loxolisina B) provavelmente associada com a atividade dermonecrótica do veneno (FEITOSA *et al.*, 1998).

Quanto à natureza bioquímica do veneno, a glicosilação de suas proteínas é uma das mais importantes modificações pós-traducionais. Ela precede ou atua na incorporação destas proteínas nos vários compartimentos citoplasmáticos e organelas, assim como na sua ativação funcional ou secreção. Também determina muitas das propriedades funcionais e estruturais, conferindo-lhes funções biológicas essenciais e direcionando sua movimentação transcelular (DAMJANOV, 1987).

As glicoproteínas são classificadas de acordo com o tipo de ligação açúcar-proteína que possuem, podendo, no entanto, conter mais de um tipo de ligação. As glicoproteínas nucleares e citoplasmáticas contêm um ou mais resíduos de N-acetilglicosamina que são O-ligados a resíduos específicos de serina ou treonina (O-GlcNAc). O O-GlcNAc é altamente dinâmico fisiologicamente, ligado a diferentes proteínas e abundante em todos os eucariontes. As glicoproteínas N-ligadas contêm

oligossacarídeos complexos unidos ao grupo amina da asparagina, via ligação glicosamina (DAMJANOV, 1987).

Os carboidratos desempenham muitas funções estruturais nas glicoproteínas, estabilizando a conformação das proteínas, aumentando a solubilidade na água, protegendo contra a degradação proteolítica, servindo como sinal para secreção em alguns instantes desempenhando um papel importante em atividades biológicas dependentes da interação ligante - receptor (KORNFELD E KORNFELD, 1985; ELBEIN *et al.*, 1991; HART, 1992; VEIGA *et al.*, 1995).

Pouco se sabe sobre a glicobiologia de enzimas nos venenos. Algumas metaloproteases de cobras contêm o sítio consenso de glicosilação para açúcares N-ligados. Isto foi descrito em uma proteína não hemorrágica H2-proteinase do veneno de *Trimmeresurus flavorides* (TAKEYA *et al.*, 1989); em uma proteína hemorrágica de alta massa molecular HR1B do mesmo veneno (TAKEYA *et al.*, 1990); em LHFII, uma protease isolada do veneno de *Lachesis muta muta* (SANCHEZ *et al.*, 1991); na Jararnagina, uma protease hemorrágica de alta massa molecular do veneno de *Bothrops jararaca* (PAINE *et al.*, 1992); em uma protease hemorrágica (HR2a) de baixa massa molecular do veneno de *Trimmeresurus flavorides* (MIYATA *et al.*, 1989); na atrolisina A (Ht-a), uma protease hemorrágica isolada do veneno de *Crotalus atrox* (HITE *et al.*, 1994) e em rhodostomina, uma protease isolada do veneno de *Calloscelasma rhodostoma* (AU *et al.*, 1991). Até o presente momento, somente em HR1B foram detectadas duas cadeias de açúcares na posição Asn⁷³ e Asn¹⁸¹ (TAKEYA *et al.*, 1990) e na atrolisina A (HT-a) que tem resíduos de açúcar como fucose, glicosamina, galactose, manose e ácido siálico nas posições Asn⁵¹⁷ e Asn⁵³³ (HITE *et al.*, 1994; FOX E BJARNASON, 1995). Apesar de glicosiladas, as funções e estruturas dos glicoconjugados destas metaloproteases de veneno são atualmente desconhecidas. Relacionando outras proteases de venenos de cobras, podemos mencionar a proteína ativadora do Fator-X do veneno de víbora Russell (RVV-X), uma glicoproteína com 6 oligossacarídeos N-ligados, com

açúcares do tipo alta-manose, e estruturas complexas bi-tri e tetra-antenas necessárias para a manutenção das atividades biológicas nesta enzima (GOWDA *et al.*, 1994; GOWDA *et al.*, 1996). A batroxobina, uma serino-protease do veneno de *Bothrops moojeni*, é heterogeneamente glicosilada com açúcares do tipo complexo bi-antenário e estruturas do tipo híbridas, mas com funções desconhecidas (LOCHNIT E GEYER, 1995). A enzima coagulante, bilineobina do veneno de *Agkistrodon bilineatus* que contém 6 sítios de glicosilação N-ligados, com resíduos de N-acetilglicosamina, fucose, galactose, manose e ácido N-acetilneuramínico. Estes açúcares de alguma maneira regulam a atividade da bilineobina, visto que esta enzima deglicosilada produz mais rapidamente fibrinopeptídeo A, que a bilineobina glicosilada (NIKAI *et al.*, 1995).

Sobre os venenos de aranhas, a despeito de algumas similaridades com venenos de cobras, nada é conhecido sobre a química dos açúcares ou a glicobiologia das proteínas presentes. No entanto, o veneno da *L. intermedia* foi estudado por VEIGA *et al.* (1999), que inicialmente avaliaram a existência e determinaram o tipo e a importância da glicosilação. Eles demonstraram que o perfil oligossacarídico das proteínas do veneno da aranha marrom é particularmente rico em proteínas com resíduos de alta-manose N-ligados (positivo para lectinas GNA e Con-A), mostram a existência de três proteínas nas regiões de 98, 28 e 20kDa N-acetilglicosamina N-ligada (positivo para PSA e WGA) e duas proteínas de 28 e 20kDa com motes de fucose N-ligados (positivo para lectina AAA). Ainda, estes estudos mostraram que não havia complexos de açúcar Asn-ligados tais como resíduos β 1-4 galactosil, ramificações de polilactosamina ou resíduos terminais com ácido siálico, mas contém uma proteína de 67kDa com resíduos de Gal β (1-3)GalNac Ser/Thr-ligados (positivo para lectinas ACA e PNA). Também não foi detectada a presença de resíduos de glicosaminoglicanos como os oligossacarídeos heparam sulfato, dermatam sulfato e condroitim sulfato em veneno tratado com proteinase-K. Estudando o perfil oligossacarídico do veneno de *Loxosceles intermedia* e

associando-o às funções desempenhadas por esta toxina determinou-se também que a capacidade de agregação plaquetária e atividades fibrinogenolítica do veneno são independentes dos resíduos de açúcares presentes nas moléculas. No entanto, as atividades gelatinolítica e dermonecrótica são açúcar-dependentes (VEIGA *et al.*, 1999).

Sabe-se que a ação tóxica do veneno de aranhas é o efeito combinado (efeitos tóxicos sinérgicos) de todos os componentes presentes nele (GEREN *et al.*, 1976). A toxicidade do veneno em camundongos foi atribuída a toxinas polipeptídicas de massa molecular de 34 kDa (GEREN *et al.*, 1976; ARRUZ E MARTÍNEZ-VARGAZ, 1986). As toxinas responsáveis pelas atividades letais e neurotóxicas podem ser as mesmas ou podem ser dois polipeptídeos diferentes (FOIL *et al.*, 1979). BABCOCK *et al.* (1981) comparando a atividade de dois extratos glandulares de veneno de *Loxosceles reclusa*, preparados com tampão ácido (pH 4,0) e com tampão básico (pH 8,0) observaram que as duas toxinas encontradas eram letais para camundongos, promoviam lesões em coelhos, tinham fraca atividade de lise em eritrócitos e ativavam a coagulação induzida por cálcio. Purificando o componente sistêmico, as atividades letais, dermonecrótica, hemolítica e procoagulante continuaram coelundo em picos simples; mas a eletroforese em sistema descontínuo evidenciou três bandas: uma banda inativa na concentração ensaiada, enquanto que as outras duas bandas eram letais, dermonecróticas e hemolíticas. Quando a toxina foi tratada com ditioneitol, que promove clivagem das pontes dissulfeto, as atividades letais, hemolíticas, dermonecróticas e procoagulantes da toxina purificada foram destruídas.

BARBARO *et al.* (1996) estudaram a atividade biológica das três espécies de aranhas do gênero *Loxosceles* encontradas no sul do Brasil e reconheceram o veneno de *Loxosceles intermedia* como sendo o mais letal para camundongos (DL₅₀ 0,48 mg/kg), seguido do veneno de *Loxosceles gaucho* (DL₅₀ 0,74 mg/kg) e finalmente o veneno de *Loxosceles laeta* (DL₅₀ 1,45 mg/kg).

No veneno de *Loxosceles reclusa* foi identificada uma hemolisina termo-lábil, cálcio dependente e de massa molecular aproximada de 19 kDa que em contato com eritrócitos de carneiro fornecem como produto de degradação uma esfingomielina hidrolisada por atividade tipo esfingomielinase D, comprovando a atividade lítica direta do veneno sobre o eritrócito (FORRESTER, 1978). FUTRELL *et al.* (1979), por outro lado, sugeriram que a esfingomielinase D não tem papel primário na reação hemolítica "in vivo", visto que a reação lítica direta com eritrócitos de coelho e humano foi insignificante.

REES *et al.* (1984) usando fração de veneno parcialmente purificado (S₃) de *Loxosceles reclusa* produziram uma intensa resposta inflamatória localizada, consideraram a possibilidade de que esta fração não difunde do local da injeção, mas é adsorvida às membranas celulares "in situ". A alta afinidade de interação da fração S₃ com as membranas celulares não foi limitada às membranas de eritrócitos, mas estava presente nos vários sistemas de membranas testados. Os autores sugerem a possibilidade de que exista um receptor de membrana da classe II para fração S₃. O receptor pode ser a esfingomielina, presente em altas concentrações na parte externa da membrana do eritrócito. Existem evidências de que cátions divalentes são necessários para a ativação da esfingolisina D.

O estudo das atividades enzimáticas do veneno da glândula de *Loxosceles reclusa* mostrou que este é desprovido de atividade de colagenase, dipeptidase, acetil colinesterase, fosfodiesterase, ribonuclease A e desoxirribonuclease. As atividades encontradas foram de estearase e hialuronidase, que foi determinada como responsável pelo aspecto difuso da lesão observada no quadro clínico e experimental do envenenamento pela aranha marrom (WRIGHT *et al.*, 1973).

A determinação da seqüência amino terminal do componente dermonecrótico do veneno de *Loxosceles gaucho* (massa molecular 35 kDa), obtido pela purificação em SDS-PAGE, seguido pelo eletroblotting em membrana de PVDF, sugere um alto

grau de homologia quando comparado à seqüência amino terminal da toxina correspondente no veneno de *Loxosceles reclusa* (MOTA E BARBARO, 1995).

A trombocitopenia decorrente de uma agregação plaquetária induzida pelo veneno, bem como o quadro hemorrágico e a coagulação intravascular disseminada que surgem em alguns acidentados, representam fenômenos dependentes de moléculas da matriz extracelular, tais como a fibronectina plasmática e o fibrinogênio (WILLIAMS *et al.*, 1983; RUOSLAHIT, 1988; VEIGA *et al.*, 1996) e mais uma vez tais transtornos podem ser atribuídos à enzimas presentes no veneno com atividades proteolíticas sobre estes substratos (FEITOSA *et al.*, 1998) como bem demonstrado nos quadros hemorrágicos produzidos nos acidentes por ofídios (BARAMOVA *et al.*, 1989; HITE *et al.*, 1992).

A insuficiência renal aguda, com hemoglobinúria e proteinúria decorrentes dos acidentes com aranha marrom, representa uma ação potencial de constituintes presentes no veneno (até o momento desconhecidos) sobre o tecido renal e parte da matriz extracelular deste órgão (com ênfase especial sobre a membrana basal glomerular que atua na fisiologia renal como uma barreira seletiva, determinando uma ação filtrante entre o sangue e a formação da urina). Estas podem ser estruturas alvos nos acidentes loxoscélicos.

A matriz extracelular que estruturalmente está dividida em membrana basal, matriz conectiva e matriz sangüínea caracteriza-se por ser uma estrutura complexa formada por proteínas secretadas e glicoconjugados que interagindo tridimensionalmente originam uma rede molecular (YURCHENCO E SMITH, 1990). A matriz extracelular interagindo funcionalmente com moléculas receptoras na superfície celular participa como suporte e na orientação nos processo biológicos onde existe adesão e locomoção celulares, coordenando importantes fenômenos fisiológicos no funcionamento dos tecidos (ALBELDA E CLAYTON, 1990; MEREDITH *et al.*, 1993; VEIGA *et al.*, 1997). As membranas basais em especial funcionam como filtro biomolecular separando vários tecidos especializados,

muscular, epitelial, endotelial e nervoso dos respectivos tecidos conectivos (MARTIN E TIMPL, 1987). Embora bastante disseminadas no organismo, as membranas basais têm características moleculares bastante conservadas, sendo constituídas por quatro moléculas principais que são a laminina, colágeno tipo IV, entactina e heparan sulfato proteoglicano (YURCHENCO E O'REAR, 1994; TIMPL, 1996). As membranas basais representam uma classe especial de matriz extracelular, achada em quase todas as espécies de animais multicelulares. Desempenham diversas funções como suporte e compartimentalização de tecidos, diferenciação e migração celular e a filtração seletiva nos glomérulos renais. São produzidas por grande número de células sendo as principais as epiteliais, endoteliais, musculares, nervosas e adipócitos. São formadas por duas lâminas bastante amorfas: a lâmina lúcida (ou rara) e a lâmina densa, que juntas variam em tamanho entre 30 a 300 nm, dependendo da localização de tecido (TIMPL *et al.*, 1987; YURCHENCO E SCHITTNY, 1990).

A laminina é o principal componente não colagênico presente somente em membranas basais. É a primeira proteína de matriz extracelular a ser sintetizada durante a embriogênese e exibe uma variedade de atividades biológicas como promoção da adesão das células metastizantes, crescimento neuronal e diferenciação de vários tipos celulares, como células endoteliais, nervosas e epiteliais. Foi isolada pela primeira vez do tumor de camundongo EHS (Engelbreth-Holm Swarm). Possui aproximadamente 900 kDa e é formada por três cadeias polipeptídicas, denominadas: cadeia α_1 com massa molecular de aproximadamente 440 kDa, e outras duas cadeias, uma β_1 e outra a cadeia γ_1 com massa molecular aproximada de 220 kDa cada uma, organizadas na forma de cruz assimétrica ligadas entre si por pontes dissulfeto (TIMPL *et al.*, 1987; BECK *et al.*, 1990; YURCHENCO E SCHITTNY, 1990). Possui vários domínios, ligando as células, além de também interagir com outras moléculas da matriz extracelular como o colágeno tipo IV, o heparan sulfato proteoglicano e a entactina (nidogênio)

(YURCHENCO E SCHITTNY, 1990). Sabe-se hoje que existem diferentes isoformas da molécula de laminina, que variam estrutural e molecularmente em vários tecidos (TRIGVASSON, 1993).

Entactina e nidogênio são diferentes nomes dados a uma mesma macromolécula. Esta macromolécula possui aproximadamente 150 kDa e formato de um haltere, com uma haste central de 27 kDa e em cada extremidade um domínio globular de 38 a 85 kDa. É uma outra glicoproteína presente nas membranas basais, altamente susceptível a proteólise e que possui atividade ligante entre a célula e os vários constituintes da matriz extracelular como a laminina, colágeno tipo IV e heparan sulfato proteoglicano (YURCHENCO E SCHITTNY, 1990).

O colágeno tipo IV é um dos componentes principais das membranas basais, totalizando de 20 a 70 % da sua massa total. É presumivelmente a única proteína colagênica encontrada nestas matrizes. O monômero consiste em uma longa tripla hélice com 400 nm, que é composto por dois tipos de cadeias α : duas cadeias α_1 (IV) e uma cadeia α_2 (IV) enroladas em hélice. Pode ainda formar uma rede tridimensional estável na membrana basal através de três tipos de interações. Na primeira, pares de glóbulos de COOH-terminais unem-se através de pontes dissulfeto para formar dímeros lineares. Na outra interação, quatro NH₂-terminais ligam-se a outros para formar um domínio (7S) superenrolado e na última, os dímeros de colágeno tipo IV interagem em associações laterais, resultando em rede trama poligonal de geometria irregular (YURCHENCO E SCHITTNY, 1990).

Os proteoglicanos heparam sulfato são uma classe de macromoléculas caracterizada pela presença de um núcleo protéico ligado covalentemente a cadeias de heparan sulfato. Sua presença na membrana basal foi demonstrada pela primeira vez no glomérulo renal. Os proteoglicanos conferem às membranas basais a sua propriedade de semipermeabilidade (restrição de filtração de proteínas) e filtração

seletiva devido às suas cadeias polianiónicas (TIMPL *et al.*, 1987; YURCHENCO E SCHITTNY, 1990).

A ação de constituintes moleculares encontrados no veneno da aranha marrom sobre membranas basais poderia explicar os efeitos nocivos presentes no loxoscelismo, com ênfase nos processos hemorrágicos (membrana basal subendotelial venosa) e na insuficiência renal aguda (membrana basal glomerular).

Tentando dar suporte científico a esta hipótese, FEITOSA *et al.* (1998) identificaram e caracterizaram duas metaloproteases de invertebrados ligantes de gelatina, uma delas com atividade fibronectinolítica e fibrinogenolítica parcial (proporção fibrinogênio/veneno – 100:1) provavelmente envolvidas nos distúrbios hemostáticos desencadeados pelo veneno de *Loxosceles intermedia*.

Resultados obtidos por microscopia eletrônica e imunohistoquímica mostram uma destruição perceptível da membrana basal. Aparentemente o veneno de *Loxosceles intermedia* não tem atividade sobre laminina ou colágeno tipo IV. No entanto, o veneno degrada o núcleo protéico de heparan sulfato proteoglicano e hidrolisa entactina, molécula que age como ponte de organização da membrana basal, pois liga laminina, colágeno tipo IV e heparan sulfato proteoglicano (VEIGA *et al.*, 2000b).

Problemas de hemostasia sistêmica causada pelo envenenamento por aranhas do gênero *Loxosceles* são pouco entendidos, apesar de ser uma das causas de óbito em acidentados. Venenos de aranha marrom provocam coagulação intravascular disseminada, causando oclusão da parede de vasos de animais de laboratório e humanos expostos ao veneno (REES *et al.*, 1984; FUTRELL, 1992). Os venenos podem causar prolongamento do tempo de tromboplastina parcial e no tempo de protrombina (REES, 1988). O veneno da aranha marrom induz alterações nos vasos sangüíneos com ocorrência de bolhas subendoteliais, vacúolos e degeneração de paredes de vasos sangüíneos em coelho como modelo

experimental (VEIGA *et al.*, 2001a). Uma molécula protéica de 30kDa com ação fibrinogenolítica foi identificada no veneno de *L. intermedia* (ZANETTI *et al.*, 2002)

2 OBJETIVOS

Em função da absoluta falta de conhecimento científico sobre as proteínas de baixa massa molecular encontradas nos venenos loxoscélicos, nos propusemos a:

- 1- Detectar e caracterizar bioquimicamente proteínas de baixa massa molecular no veneno de *Loxosceles intermedia*.
- 2- Realizar análise histopatológica do quadro dermonecrótico experimental desenvolvido em coelhos, buscando parâmetros celulares no loxoscelismo dermonecrótico
- 3- Realizar ensaios farmacológicos na tentativa de detectar atividades biológicas ou neurotóxicas destas moléculas.
- 4- Através de procedimentos cromatográficos tentar purificar algumas destas proteínas e peptídeos de baixa massa molecular nos venenos loxoscélicos.

Parte do trabalho foi realizado em conjunto com o Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de São Paulo UNIFESP-EPM.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados indivíduos adultos de *Loxosceles intermedia* coletados na cidade de Curitiba e região metropolitana ou criados no LIPAPE (Laboratório Interdisciplinar de Pesquisa em Animais Peçonhentos) da UFPR.

Camundongos machos albinos suíços pesando aproximadamente 20g foram usados para os ensaios farmacológicos. 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).

Coelhos adultos neozelandeses pesando 3-4kg. Todos os animais foram fornecidos pelo Biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR.

3.2 Reagentes

A gelatina foi adquirida através da Gibco, BRL, Bethesda, EUA. O kit comercial contendo lectinas digoxigenadas para detecção de glicoproteínas foi adquirido através da Boehringer-Mannheim Biochemica (Mannheim, Alemanha). As membranas de nitrocelulose foram adquiridas da Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA. As cromatografias de gel filtração foram processadas através de Sephadex G-100 adquirida da Pharmacia, Uppsala, Suécia. O medicamento verapamil (Dilacorón[®]) é fabricado pela Indústria de Medicamentos Knoll do Brasil (São Paulo, Brasil) e foi adquirido em farmácia comercial na forma injetável (5mg/ampola de 2ml). A membrana de diálise com limite de exclusão de 1kDa foi adquirida da Sigma, St Louis, EUA, bem como o anticorpo policlonal que reconhece IgG de camundongo marcado com fosfatase alcalina, o anticorpo policlonal de cabra que reconhece IgG de coelho marcado com peroxidase, o corante eosina, a diaminobenzidina e a albumina de soro bovino. O anestésico usado nos coelhos foi o sódio pentobarbital da Abbot, São Paulo, Brasil. Da Merck, Darmstadt, Alemanha

foi adquirida a água oxigenada analítica, o corante hematoxilina e o Entellan para montagem de lâmina histológica.

Os marcadores de massas moleculares usados foram: ovoalbumina (44 kDa), anidrase carbônica (29 kDa), β lactoglobulina (20 kDa), lisozima (15 kDa), inibidor de tripsina (5,6 kDa) e insulina (3,0 kDa) adquiridos da Gibco, Nova York, EUA. Além de citocromo C (12 kDa) adquirido da Sigma para caracterização da região de baixa massa molecular. Para caracterizar regiões de mais amplas massas moleculares foram usados marcadores que variam entre 205 kDa e 29 kDa (Sigma).

3.3 Extração de veneno loxoscélico por eletrochoque

O veneno de *Loxosceles intermedia* foi obtido de aranhas adultas em condições apropriadas e submetidas a eletrochoque de 15 volts no cefalotórax como descrito por FEITOSA *et al.* (1998). Após a coleta, os venenos foram liofilizados e mantidos à temperatura de $-85\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento do uso.

3.4 Extração do veneno loxoscélico diretamente pela extração da glândula produtora de veneno

As glândulas produtoras de veneno foram extraídas de animais adultos previamente mantidos em jejum de 5 dias, os quais foram anestesiados com clorofórmio, tendo seus abdomens removidos para evitar contaminação gástrica (suco gástrico) e então com o auxílio de microscópio estereoscópio, em aumento de 25 vezes, o cefalotórax foi removido e as glândulas (duas por animal) foram coletadas e mantidas em tubo de ensaio imerso em gelo picado. Após a coleta as glândulas foram lavadas em PBS gelado por 5 vezes, em seguida foram centrifugadas. A extração do veneno foi feita com PBS e um homogeneizador de tecido por maceração. O extrato contendo o veneno foi separado dos restos celulares por centrifugação por 5 minutos à 13.000 rpm. Depois de preparados os

extratos foram congelados à -20°C até o momento do uso (DA SILVEIRA *et al.*, 2002)

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

A dosagem da concentração de proteínas presente nos venenos das aranhas marrons ou outros substratos protéicos foram feitas através do método de Azul de Coomassie como descrito por BRADFORD (1976). A dosagem de peptídeos nas amostras vindas da cromatografia de gel filtração foi realizada utilizando-se o mesmo método, porém com a alteração do aparelho de leitura do espectrofotômetro para o leitor de ELISA (Meridian ELX 800) em placa de 96 "wells" (microensaio), adaptação que aumenta a sensibilidade do método.

3.6 Coleta de sangue de camundongos

Os camundongos a serem submetidos à coleta de sangue foram colocados em copo de Becker de 1 litro e expostos à luz infravermelha através de lâmpada acoplada na boca deste recipiente por 1 minuto e meio, para que houvesse vasodilatação no animal incluindo as veias da cauda. Rapidamente (para que não resfriassem) foram colocados em aparato imobilizador que expõe apenas a cauda e em seguida foi feito um corte, razoavelmente profundo, na metade proximal da cauda do camundongo e coletaram-se (em tubo de eppendorf) aproximadamente 10 a 15 gotas de sangue que fluíram profusamente através do corte. O sangue coletado foi submetido à temperatura de 37°C em BM para melhor retração do coágulo e em seguida a retração foi separado o soro. Para obtenção de plasma, o sangue (10 a 15 gotas) foi adicionado ao tubo de coleta contendo $5\mu\text{l}$ de EDTA ou citrato de sódio. Os tubos com sangue foram centrifugados e em seguida foi coletado o sobrenadante (soro ou plasma).

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

Eletroforeses foram realizadas em géis de poliacrilamida SDS-PAGE com concentração de 15%, 20% ou gradiente contínuo de 3-20% em condições redutoras e não redutoras como descrito (LAEMMLI *et al.*, 1970). Também foram realizadas eletroforeses em géis de poliacrilamida SDS-PAGE-TRICINA próprias para separação de proteínas com variação de massa de 1 a 100 kDa (SCHÄGGER AND VON JAGOW, 1987). Para western- blotting e lectin- blotting, as proteínas foram transferidas para as membranas de nitrocelulose durante a noite, como descrito por TOWBIN *et al.*, 1979.

3.8 Experimentos de zimograma com diferentes substratos protéicos

O zimograma foi feito usando SDS-PAGE-TRICINA 16,5% com glicerol, contendo 2mg/ml de gelatina ou outros substratos protéicos. Amostras em estudo e os controles, diluídas em tampão Laemmli, em condições não redutoras, foram submetidas a eletroforese (80 V) à 4° C. Após a migração, os géis foram lavados 2 vezes em Triton X-100 2,5% por 20 minutos cada e em seguida incubados durante a noite à 37°C em 50 mM de tampão Tris-HCl, pH 7.3, contendo 200 mM de NaCl, 5 mM de CaCl₂ e 5 mM de MgCl₂. Os géis foram corados pelo azul de Coomassie. As zonas claras, (demonstrando a ausência do substrato íntegro) contra um fundo de coloração azul (presença do substrato íntegro) indicam a atividade de degradação enzimática (FEITOSA *et al.*, 1998).

3.9 Coloração de géis de poliacrilamida

Os géis de poliacrilamida foram corados pelo Azul brilhante de Coomassie, com solução corante composta de Azul brilhante de Coomassie 0,02% (p/v), dissolvido em metanol 50% (v/v), ácido acético 10% (v/v) e água deionizada qsp 100% (v/v). Os géis foram mantidos nesta solução corante por vinte minutos à temperatura ambiente, sob agitação constante e descorados nas mesmas

condições da coloração, com sucessivas trocas de solução descorante (metanol 50% (v/v), ácido acético 10% (v/v), água qsp 100%(v/v)) (FAIRBANKS *et al.*, 1971).

Alternativamente os géis foram corados pelos métodos de impregnação de prata monocromática e policromática. Para coloração dos géis por prata monocromática, estes foram colocados em solução de metanol 50%(v/v) para fixação das proteínas na malha do gel de acrilamida por 24h. Em seguida, o gel foi colocado em solução que continha 0,9g de nitrato de prata, 21ml de NaOH 0,38%(p/v), 1,5 ml de NH₄OH P.A. e 77,7ml de água deionizada por 20 minutos sob agitação. Logo após, os géis foram lavados com água deionizada e revelados com solução contendo formaldeído 0,125ml, ácido cítrico 1%(p/v) 1,25ml e água num volume final de 250 ml, que reduziu a prata ao estado metálico. A reação foi parada colocando-se o gel em solução de metanol 50%(v/v) (WRAY, *et al.*, 1981). A coloração de prata policromática teve como fixador de proteínas a solução de ácido acético 5%(v/v), etanol 50%(v/v) e água deionizada 45%(v/v), onde o gel oriundo da eletroforese foi colocado por pelo menos 16 horas, ou em três trocas de 1 hora cada. Logo depois o gel foi colocado em solução de nitrato de prata 0,19%(p/v) por mais uma hora, foi enxaguado rapidamente 3 vezes com água deionizada, a prata impregnada no gel foi reduzida por ação de hidróxido de sódio 0,75M acrescido de 1,5 ml de formaldeído imediatamente antes do uso por 8 a 10 minutos. Como solução reveladora usou-se bicarbonato de sódio 0,0705%(p/v) em três banhos de 45 a 60 minutos. Nesta coloração o gel pode ficar guardado na solução fixadora por algum tempo ou em água deionizada ou metanol 50%(v/v) (SAMMONS *et al.*, 1981).

3.10 Coloração com Ácido Periódico - Reativo de Schiff (P.A.S.)

Os géis provenientes de eletroforeses também foram corados por este método com os mesmos objetivos (rastreamento de presença de açúcares), como segue: os géis foram fixados por solução contendo 7% de metanol (P.A.), 14% de ácido acético glacial em água deionizada em dois banhos de 30 minutos

consecutivos e sob agitação. Seguiu-se a oxidação dos oligossacarídeos por uma solução de ácido periódico 1% em ácido acético 3% por 1 hora sempre sob agitação e a lavagem dos géis em água deionizada (5 vezes de 10 minutos cada). O excesso de ácido periódico foi retirado com solução de metabissulfito de sódio a 0,5% em ácido clorídrico 0,1 M. Os géis foram corados na seqüência, com o reativo de Schiff, de preferência no escuro, a 4° C por 16 horas, e foram descorados com água deionizada e mantidos em ácido acético 3 a 7,5 %.

3.11 Cromatografia de gel filtração

Para esta cromatografia de baixa pressão utilizaram-se sistemas da Pharmacia e da Bio Rad e resinas para gel filtração tipo Sephadex (Sephadex G-100). Para separação protéica através de cromatografia de gel filtração postula-se que durante a passagem de um soluto através de uma coluna cromatográfica seu movimento depende do volume que flui de fase móvel e do movimento Browniano das moléculas do soluto, o qual proporciona sua difusão para dentro e para fora da fase estacionária. A separação na gel filtração depende das diferentes capacidades dos vários tipos de amostras moleculares de entrarem nos poros presentes na fase estacionária. Moléculas muito grandes que não entram nunca na fase estacionária movem-se mais rapidamente através da coluna cromatográfica. Moléculas menores, as quais conseguem entrar nos poros do gel, movem-se mais vagorosamente através da coluna, pois gastam parte de seu tempo na fase estacionária. As moléculas, portanto eluem em ordem decrescente de massa molecular.

Em coluna de 150cm de comprimento e 2,5 de diâmetro, preenchida com Sephadex G-100 (Pharmacia), foi aplicado um volume de aproximadamente 3ml contendo 11mg de veneno de *L. intermedia* coletado por eletroestimulação e filtrado com filtro 0,22µm. Para controlar a eluição da amostra foram usados bomba peristáltica (0,34ml/min), coletador de frações (3ml /tubo) e detector com leitura para faixa de 280nm (Econo System, Bio Rad, Hercules, EUA). As amostras foram

concentradas para volume adequado para cada experimento (Eppendorf Concentrator 5301, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha).

3.12 Reações de imunoblotting

Para a análise de proteínas isoladas do veneno foram realizados ensaios de imunoblotting. Para tanto as proteínas foram transferidas para as membranas de nitrocelulose durante a noite, como descrito por TOWBIN *et al.* (1979). Todos os materiais a serem avaliados foram obtidos, purificados e separados de acordo com metodologia adequada.

As fitas de NT, contendo o material para análise, foram previamente bloqueadas com tampão PBS/Molico (ou PBS/ leite desnatado) 5% (p/v), por 1 hora, e incubadas por 2 horas à temperatura ambiente e sob agitação constante com soro policlonal adequado diluído em PBS/ Molico 5% (p/v) em diluição apropriada, lavado 5 vezes com o mesmo tampão, mas sem o soro, sendo posteriormente, a reação revelada com conjugado anti- animal do soro policlonal-fosfatase alcalina e os cromógenos BCiP/NBT, conforme descrito na metodologia de WB (CHAMMAS, *et al.*, 1991).

Dentro dos experimentos que utilizam técnicas de “blotting” realizamos também o ensaio de blotting lectínico que tem algumas variantes da técnica descrita acima. A variante principal do método é a ligação por afinidade açúcar – lectina (que funciona como se fosse um anticorpo primário) cuja sensibilidade e especificidade é muito próxima da que se obtém na ligação antígeno-anticorpo. As lectinas que foram utilizadas estavam ligadas a digoxigenina. A revelação da reação é feita com anticorpo que reconhece digoxigenina marcado com fosfatase alcalina e BCiP/NBT.

3.13 Estudo dos primeiros sinais de dermonecrose “in vivo” em coelhos

Para avaliação da dermonecrose foram injetados 40µg de veneno (que correspondem aproximadamente ao que é injetado pela aranha numa picada, assim

tentando reproduzir o acidente natural) num volume final de 100 μ l de PBS pela via intradérmica em áreas depiladas do dorso-lateral de coelhos neozelandeses, que tiveram a pele depilada um dia antes do início do ensaio para que se pudessem observar alterações da pele devido ao manuseio e depilação, que poderiam alterar os resultados. Os animais que foram usados no experimento, três por intervalo de tempo, pesavam 3-4kg. O tempo de verificação da dermonecrose foi de 4 horas, sendo usados animais controles (0 hora) injetados com 100 μ l de PBS (LOPES-FERREIRA, 2001). Depois da exposição ao veneno os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (Abbot), sacrificados e as amostras foram coletadas para processamento histológico.

Para avaliação da atividade dos picos separados na gel filtração "in vivo" usou-se como modelo experimental o coelho, que foi preparado como descrito acima. Vinte e quatro horas após a depilação foram injetados no dorso lateral do animal, via intradérmica, cinco pontos, cada um com soluções diferentes como segue da esquerda para direita: 1º ponto – veneno total, 2º ponto – pico I, 3º ponto – pico II, 4º ponto – pico III e 5º ponto pico IV, injetando-se o equivalente a 40 μ g de proteínas em 100 μ l de solução salina por ponto. O ensaio teve como parâmetro de tempo a observação em tempo 0 horas e 4horas.

3.14 Métodos histológicos para microscopia de luz

Os tecidos foram processados para histologia como descrito por DRURY E WALLINGTON, (1980). As peças foram fixadas em fixador Metacan por 3 horas. Em seguida foram submetidas a 3 banhos consecutivos de 30 minutos cada em álcool etílico absoluto, em seguida ficaram por 16 horas em álcool etílico absoluto + xilol (1+1), seguiram-se 2 banhos de 15 minutos e 1 de 5 minutos em xilol. As peças seguiram para impregnação em parafina fundida à 60°C com posterior solidificação em freezer para emblocagem (1 hora). Os cortes histológicos foram feitos com micrótomo (4 μ m), seguidos de montagem em lâmina, retirada da parafina com xilol

(2 trocas de 10 minutos) e etanol absoluto (3 trocas de 10 minutos), lavagem rápida em água. Os cortes foram corados com hematoxilina-eosina e analisados por microscopia de luz em microscópio Olympus BX-40, Japão.

3.15 Coloração com Hematoxilina e Eosina

Após a desparafinização e hidratação, os cortes foram corados com Hematoxilina de Harris por 50 segundos, lavados em água corrente por 10 minutos, 2 vezes com água destilada e corados com eosina, durante um minuto. Após a coloração, foram lavados com água destilada, desidratados em série crescente de etanol (70 a 100%, por 5 minutos cada etapa), diafanizados com xilol (2 vezes de 5 minutos cada etapa) e montados com Entellan.

3.16 Análise imunohistoquímica

As peças foram fixadas em formalina neutra e os cortes foram montados em lâminas de vidro, desparafinadas em xilol por 16 horas e reidratados em série de soluções álcool – água e finalmente em água. As seções foram lavadas com PBS, incubadas em H₂O₂ (3%) (Merck) à temperatura ambiente por 15 minutos para inibir a peroxidase endógena e em seguida foram lavadas novamente com PBS; e foram bloqueados os sítios inespecíficos com albumina de soro bovino (Sigma) em PBS à temperatura ambiente por 30 minutos em câmara úmida. Após o bloqueio, os cortes foram lavados com PBS e foram incubados por 2 horas à 37°C com anticorpo primário policlonal antifibrinogênio diluído 1:500 (v/v) (produzido em nosso laboratório usando fibrinogênio purificado e coelhos como descrito por HALLOW E LANE, 1988). O excesso de anticorpo foi retirado com PBS e o material foi incubado com anticorpo de cabra que reconhece IgG coelho conjugado com peroxidase diluído 1:100(v/v). Para dar seqüência à reação os cortes foram lavados com PBS e para visualização da imunoreação foi usado diaminobenzina (Sigma). Para finalizar os cortes foram lavados em PBS e água, desidratados com série crescente de

etanol, foram diafanizados em xilol e montado em Entellan (Merck). Como controle negativo da reação foram paralelamente ensaiados cortes incubados com soro pré-imune diluído em PBS sob as mesmas condições experimentais descrito para o soro hiper-imune.

3.17 Ensaios para verificação de atividade farmacológica

Foram realizados ensaios buscando atividade farmacológica tanto do veneno total quanto de frações purificadas do veneno.

3.17.1 Testes Neurocomportamentais – Avaliação da Atividade Geral

Para realização da primeira fase (avaliação inicial), foi injetado veneno total de *Loxosceles intermedia* intraperitonealmente em camundongos. Os camundongos foram arranjados em três grupos: um grupo controle (injetado com PBS) e dois grupos tratados injetados com veneno total. Os grupos tratados foram divididos em animais injetados com 0,5 mg de veneno/kg MC e outro injetados com 0,75 mg de veneno/kg MC.

O ensaio consistiu em avaliar os camundongos uma hora após da injeção em um campo aberto por cinco minutos. O campo aberto consiste em uma arena circular de madeira com 50 cm de diâmetro e 32,5 cm de altura, pintada de branco e dividida em três círculos, os quais são divididos por retas perpendiculares em dezenove partes aproximadamente iguais. Na parte superior da caixa de madeira há uma cortina para que os animais não possam visualizar o observador, e ainda apresenta duas lâmpadas de 40 watts para iluminação do campo de observação. Este aparelho foi construído conforme aquele proposto por BROADHURST (1960). Os animais foram colocados individualmente no centro do campo aberto uma hora após a injeção da respectiva solução atribuída a cada indivíduo. Os parâmetros considerados foram frequência de locomoção (unidades de locomoção, penetrar em uma divisão com as quatro patas), levantar (número de vezes que o animal apóia -

se somente nas patas traseiras, com o tronco perpendicular ao chão da arena), fezes (número de bolotas fecais), tempo parado ou duração da imobilidade (tempo que o animal fica sem nenhuma atividade motora, permanecendo estático no que diz respeito à cabeça, tronco, patas durante a observação de cinco minutos) e tempo de “grooming” ou duração de limpeza (tempo que o animal passa fazendo limpeza da pelagem, genitália e focinho). Utilizaram-se três cronômetros para controle do tempo total, tempo parado e tempo de “grooming”.

A arena foi higienizada com solução alcoólica a 5% a cada troca de animal para nova observação.

Os dados foram avaliados estatisticamente pelos métodos ANOVA (One-way Analysis of Variance) seguido do Teste de Comparações Múltiplas de Tukey-Kramer, para análises dos resultados de cada animal em relação ao seu grupo e os demais.

3.17.2 Testes Neurocomportamentais – Avaliação da Atividade Geral com Administração Prévia de Bloqueador de Canais de Cálcio

Estes testes foram realizados da mesma maneira descrita no item 3.17.1 com a introdução da administração de bloqueador de canal de cálcio (medicamento verapamil - apresentação injetável).

A administração do bloqueador foi realizada 30 minutos antes da injeção do veneno (dose 1mg/kg MC do camundongo) ambos administrados intraperitonealmente (IP). As doses do verapamil utilizadas foram 5 e 10 mg/kg (ABDOLLAHI *et al.*, 1998; FUTURO-NETO *et al.*, 1999) para testes com injeção posterior de veneno e também 15 e 20 mg/kg sem injeção posterior de veneno. Todos os animais testados foram mantidos em condições controladas de temperatura e luminosidade (temperatura variando de 20-22°C e períodos de 12 horas de luz e 12 de escuridão). Neste ensaio também foi controlado tempo de morte em minutos contados a partir da injeção do veneno.

3. 18 Espectrometria de massa

A espectrometria de massa foi realizada em colaboração com o Departamento de Bioquímica do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. O aparelho utilizado foi o ES/-MS-Eletrospray Ionization –Mass Spectroscopy Micromass Quattro L.C. (E.U.A.).

4 RESULTADOS

4.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE

Neste tipo de eletroforese obteve-se uma separação parcial das proteínas do veneno de *Loxosceles intermedia*, ficando prejudicada a visualização de bandas isoladas na região de baixa massa molecular, mas sendo possível avaliar as proporções de cada faixa de massa molecular. No caso, pode-se estabelecer que aproximadamente 40% dos constituintes do veneno total são moléculas de baixa massa, menos de 15kDa (Figura 1.a).

4.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE-TRICINA

A eletroforese em gel de poliacrilamida PAGE-SDS-TRICINA mostrou que os peptídeos constituem aproximadamente 40 % da massa total das proteínas existentes no veneno de *Loxosceles intermedia*, aparecendo no gel 6 bandas na faixa de 15 a 3 kDa, quando corado por prata monocromática (Figura 1.b).

4.3 Zimograma

Foi realizado então, um zimograma usando como substrato protéico a gelatina (colágeno desnaturado) com concentração de 2,0 mg/ml de gel, onde não se identificou atividade proteolítica alguma do veneno na zona de massa molecular correspondente às proteínas de baixa massa molecular e peptídeos (região correspondente a massas moleculares menores que 15kDa) (Figura 2).

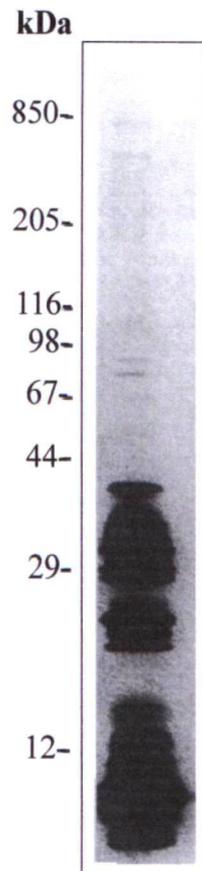


Figura 1. a Perfil protéico de veneno total de *Loxosceles intermedia* em gel de poliacrilamida SDS-PAGE gradiente contínuo 3 – 20% (p/v) sob condições não redutoras e corados pelo método da prata monocromática. Os marcadores são mostrados à esquerda da figura.

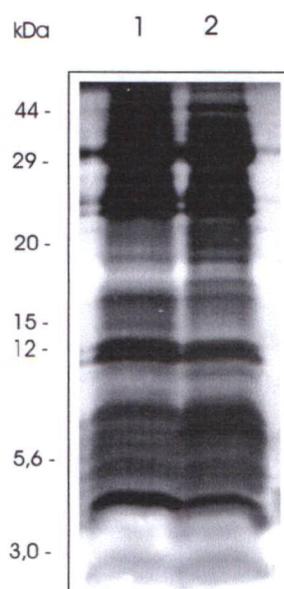


Figura 1.b Perfil protéico de extrato de glândula (1) e veneno total eletroestimulado (2) de *Loxosceles intermedia* em gel de poliacrilamida SDS-PAGE-TRICINA (16,5% p/v com glicerol). Coloração pelo método da prata monocromática. Marcadores de massa molecular estão à esquerda da figura.

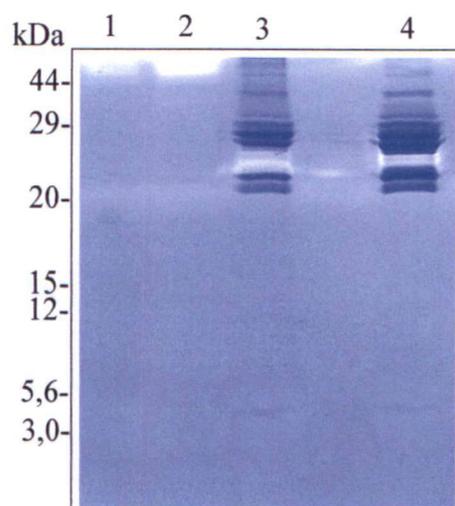


Figura 2 Zimograma em gel de poliacrilamida SDS-PAGE-TRICINA (16,5% com glicerol) com gelatina 2mg/ml de gel. (1) e (2) frações peptídicas separadas através de gel filtração (Sephadex G-100). (3) Veneno total de *Loxosceles intermedia* obtido através de extrato de glândula. (4) Veneno total de *Loxosceles intermedia* obtido através de eletrochoque. Marcadores de massa molecular estão representados à esquerda da figura.

4.4 Pesquisa sobre a presença de glicosilação

4.4.1 Coloração por PAS

O gel proveniente de corrida eletroforética foi submetido à coloração de PAS e resultou em resposta negativa quanto à presença de grupamentos glicosilados nas proteínas de baixa massa molecular e peptídeos (dado não mostrado).

4.4.2 Blotting-lectínico

O veneno total de *Loxosceles intermedia* foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE-TRICINA, transferido para uma membrana de nitrocelulose e processado em seguida para testar, por afinidade lectínica, a presença de grupos glicosilados. Foi testada a presença de grupos manose (Lectina GNA), manose e glicose (Lectina Con-A), ácido siálico (Lectina MAA), N-acetil glicosamina (Lectina WGA), fucose (Lectina AAA), polilactosaminas (galactose ligada a N-acetil glicosamina) (Lectina PHA-L) e galactose terminal O-ligada (Lectina PNA).

Deste ensaio obteve-se resultado negativo para presença destes grupamentos açúcares testados, na região correspondente às proteínas de baixa massa e peptídeos do veneno total. O veneno total usado neste ensaio tem duas origens: colhido por eletrochoque e obtido por extração da glândula de veneno, e foram testados separadamente, em ambos o perfil eletroforético e de glicosilação manteve-se semelhante (Figuras 3.a e 3.b).

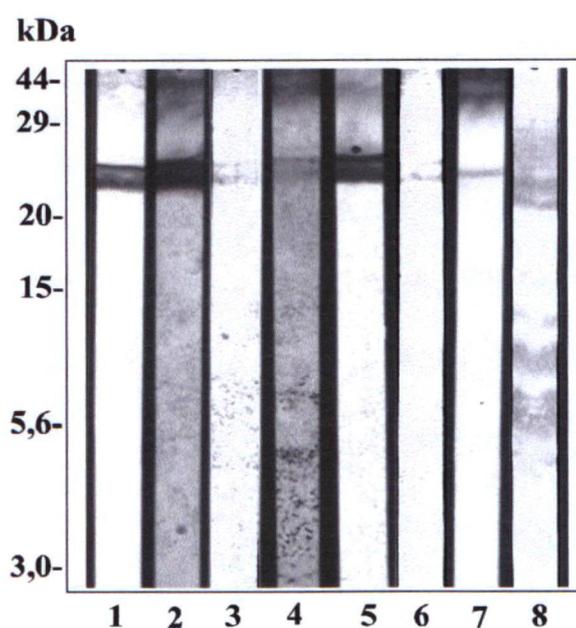


Figura 3. a Blotting-lectínico realizado a partir de gel poliacrilamida SDS-PAGE 20% (p/v) com veneno total de *Loxosceles intermedia* obtido por eletrochoque. (1) Reação com lectina GNA. (2) Reação com lectina Con-A. (3) Reação com lectina MAA. (4) reação com lectina WGA. (5) Reação com lectina AAA. (6) Reação com lectina PHA-L. (7) Reação com lectina PNA. (8) Reação com corante Ponceau S. Marcadores de massa molecular estão representados à esquerda da figura.

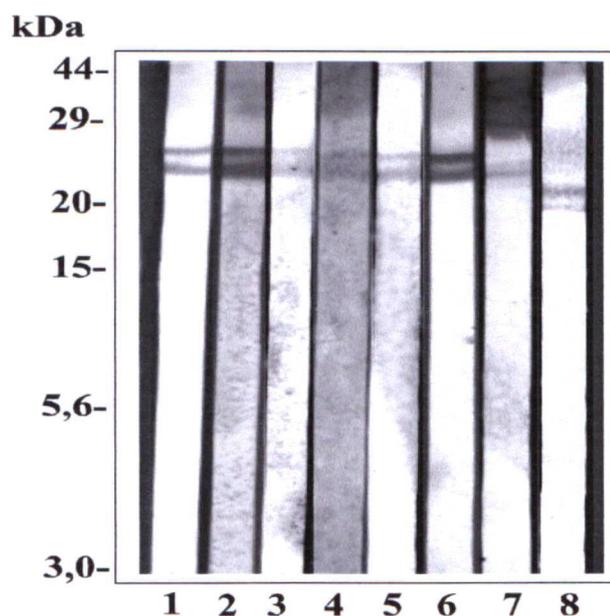


Figura 3. b Blotting-lectínico realizado a partir de gel de poliacrilamida SDS-PAGE 20% (p/v) com veneno total de *Loxosceles intermedia* na forma de extrato de glândula. (1) Reação com lectina GNA. (2) Reação com lectina Con-A. (3) Reação com lectina MAA. (4) Reação com lectina WGA. (5) Reação com lectina PHA-L. (6) Reação com lectina AAA. (7) Reação com lectina PNA. (8) Reação com corante Ponceau S. Marcadores de massa molecular estão representados à esquerda da figura.

4.5 Cromatografia por gel filtração

Realizaram-se duas cromatografias de gel filtração através de resina cromatográfica G-100 medium. Na primeira foram aplicados 9mg de veneno total obtido por eletrochoque, correspondendo a um volume total de 4,5 ml, em uma coluna cromatográfica medindo 155cm de comprimento e 2,5cm de diâmetro, preenchida com Sephadex G-100. Obteve-se um perfil cromatográfico construído a partir de leituras espectrofotométricas na região do ultravioleta (280nm) contra volume eluído da coluna mostrando um cromatograma com quatro picos de grande absorção de ondas (região de maior concentração de proteínas) (Gráfico 1). Seguiu-se uma segunda cromatografia de gel filtração em Sephadex G-100 medium, aplicando-se 11 mg de veneno total, correspondendo a um volume de 5 ml, na mesma coluna já descrita. Obtiveram-se frações do veneno parcialmente purificadas, gerando um cromatograma com quatro picos de densidade ótica significativas (leituras na faixa do U.V. 280 nm) (Gráfico 2).

O perfil protéico de cada um dos picos, obtidos nestas cromatografias de baixa pressão, foi caracterizado através de eletroforese SDS-PAGE e PAGE-SDS-TRICINA (Figuras 4 e 5). No terceiro pico pode-se caracterizar a presença de proteínas e peptídeos com massa molecular entre 15 e 3 kDa usando-se técnica de eletroforese SDS-PAGE-TRICINA. No quarto pico encontramos moléculas com massas moleculares menores que 1 kDa e de natureza bioquímica ainda obscura, já que as frações deste pico tiveram alta absorção espectrofotométrica na faixa de 280 nm (U.V), mas não apresentaram perfil protéico em gel de eletroforese SDS-PAGE, nem foi possível dosagem protéica pelo método de Bradford (azul de Coomassie).

As frações correspondentes ao terceiro e quarto picos são as de principal interesse para este trabalho, já que nos propusemos a trabalhar com proteínas de baixa massa molecular e peptídeos. Somente estas frações foram utilizadas para ensaios farmacológicos em Campo Aberto.

**Cromatograma de Gel Filtração em Sephadex G-100 Medium
(eluído com TBS) do veneno total de *Loxosceles intermedia***

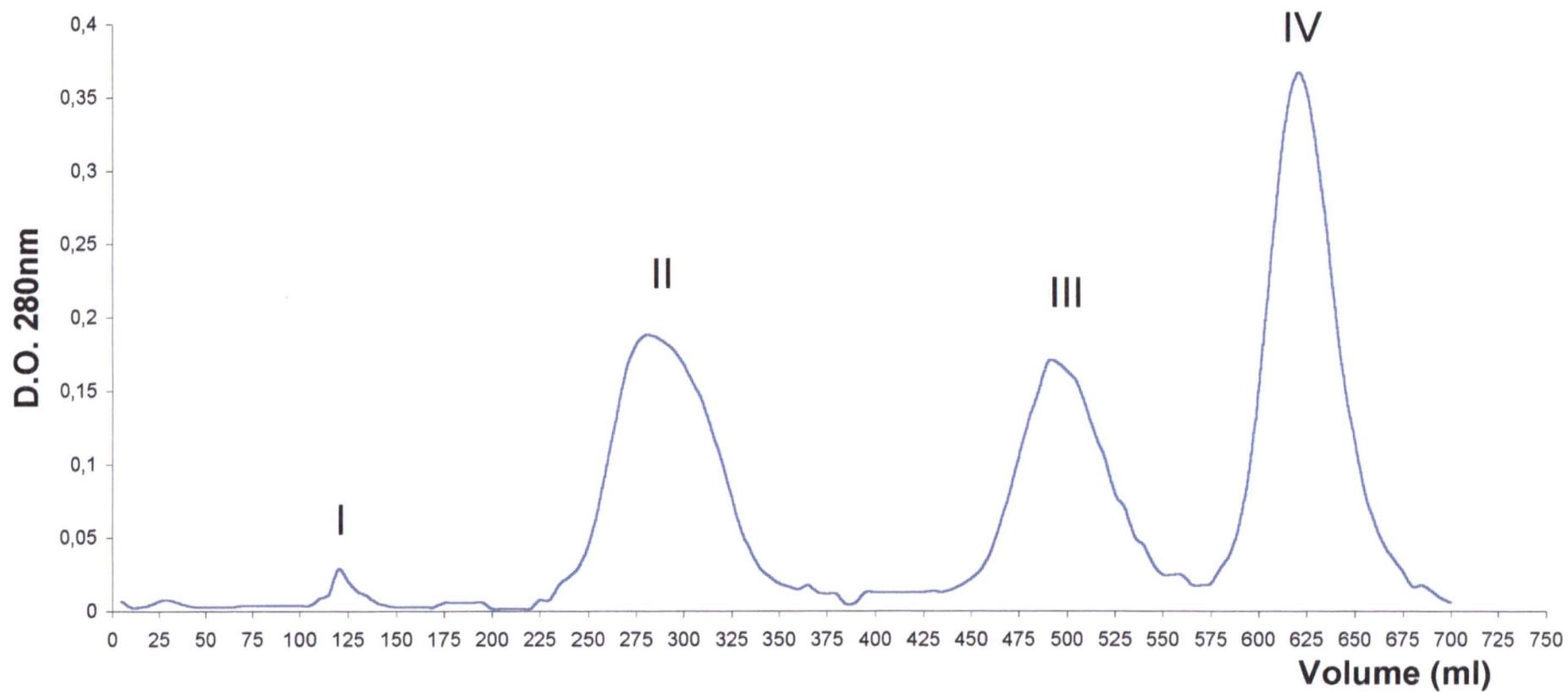


GRÁFICO1

**Cromatograma de Gel Filtração em Sephadex G-100 Medium
(eluído com Salina) do veneno total de *Loxosceles intermedia***

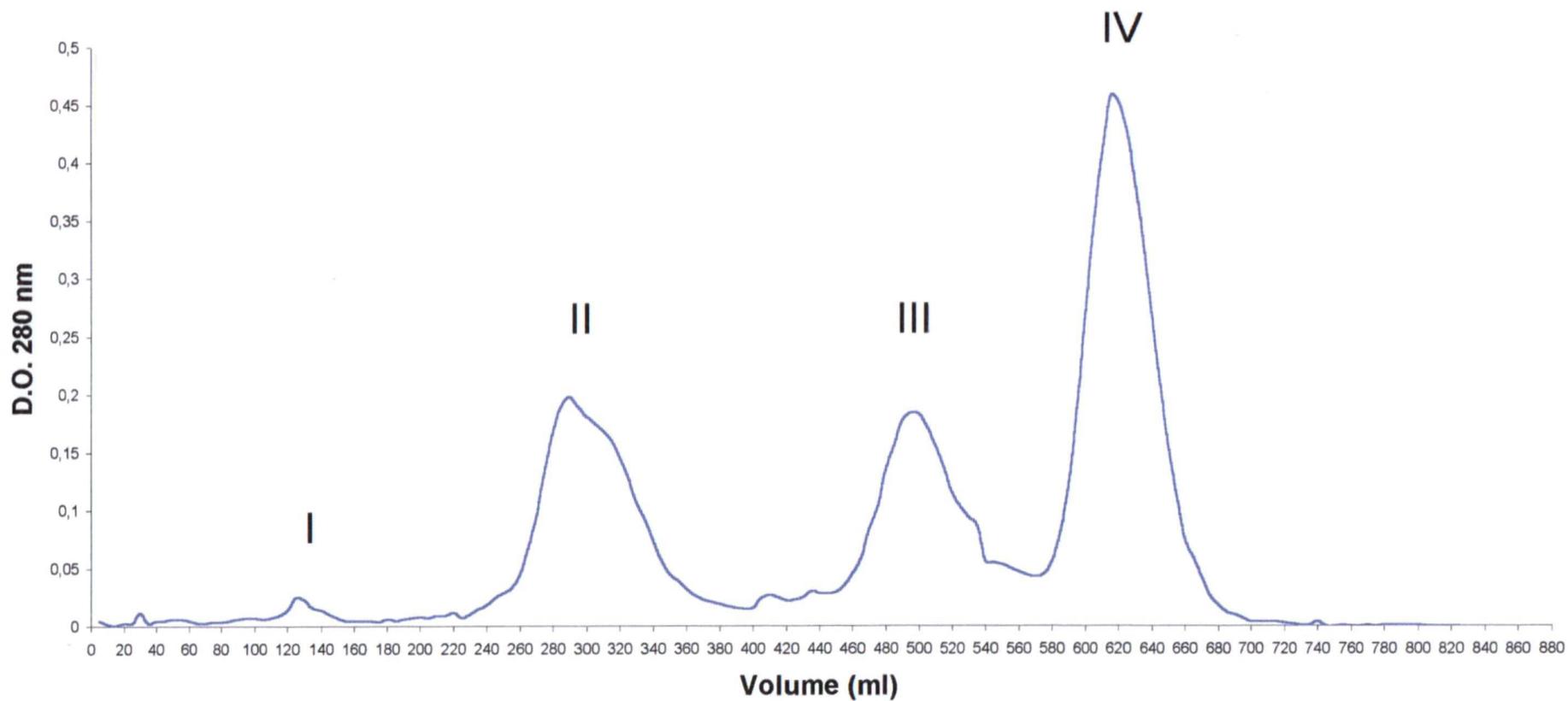


GRÁFICO 2

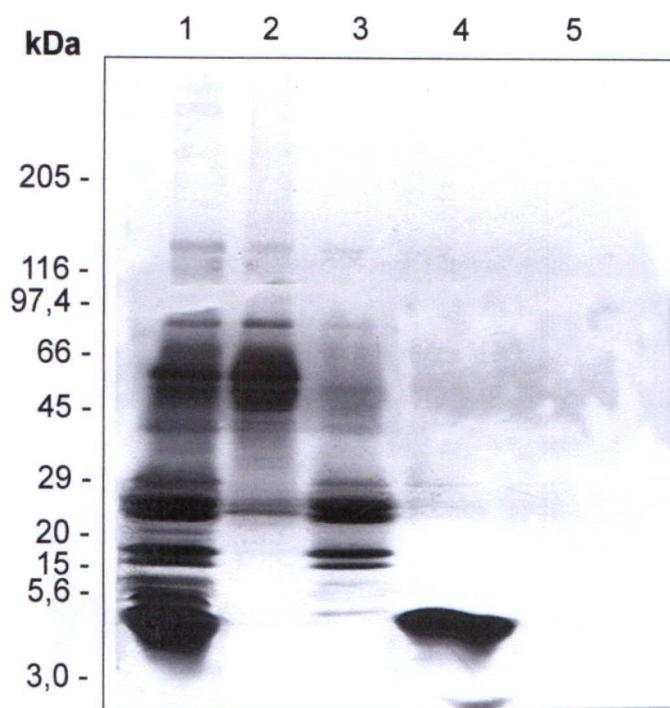


Figura 4. Gel SDS-PAGE gradiente 3-20% coloração prata monocromática. Linha (1) perfil protéico de veneno total de *Loxosceles intermedia*, (2), (3), (4) e (5) perfil protéico de eluato de cromatografia em coluna de gel filtração (2,5x150cm) Sephadex G-100 correspondendo respectivamente ao primeiro pico de eluição, segundo pico, terceiro pico e quarto pico conforme cromatograma do gráfico 2. Indicadores de massa molecular protéica à esquerda da figura.

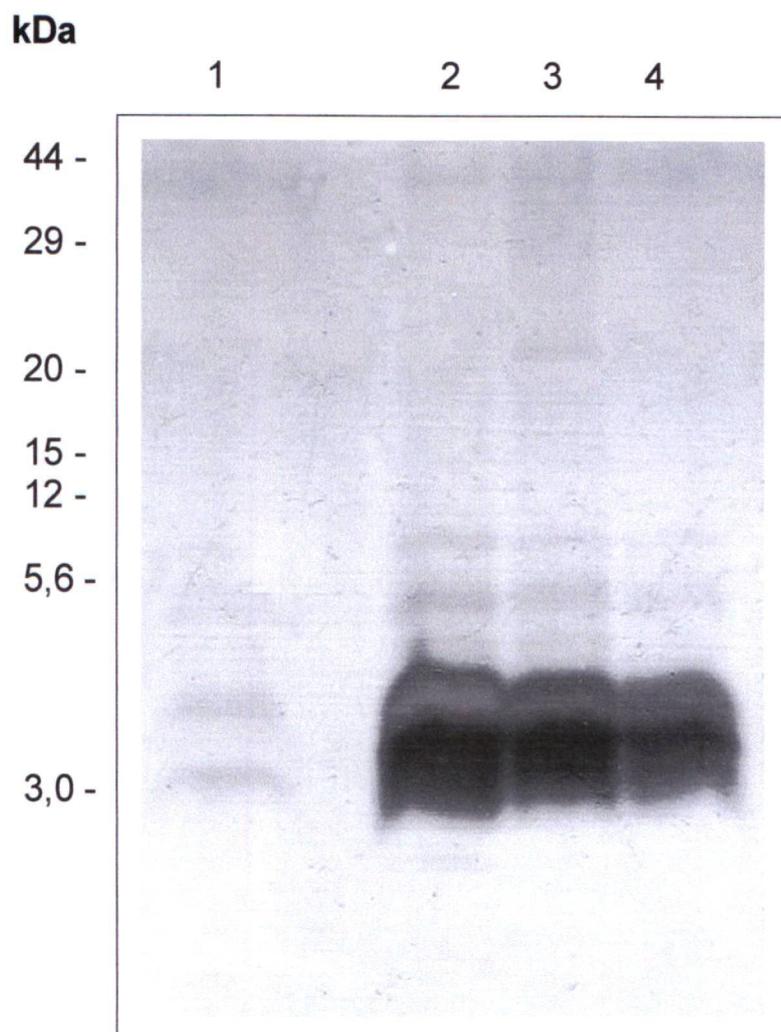


Figura 5 Gel TRICINA-SDS-PAGE 16,5%, coloração prata monocromática. Linha (1) perfil de eluição do quarto pico; (2, 3, 4) perfil de eluição do terceiro pico. Todos os picos de eluição são provenientes de cromatografia em Sephadex G-100 medium. A numeração dos picos foi determinada conforme perfil de eluição demonstrado no Gráfico 2. Marcadores de massa molecular estão representados à esquerda da figura.

4.6 Características macroscópicas da pele de coelho injetada com veneno total e soluções representativas do pico I, pico II, pico III e pico IV

Pudemos observar neste experimento no ponto VT e ponto II o aparecimento de sinais de dermonecrose em 4 horas, enquanto os pontos I e IV não demonstram sinais de reação dérmica e o ponto III apresenta sinais de hemorragia também com quatro horas de experimentação (Figura 6).

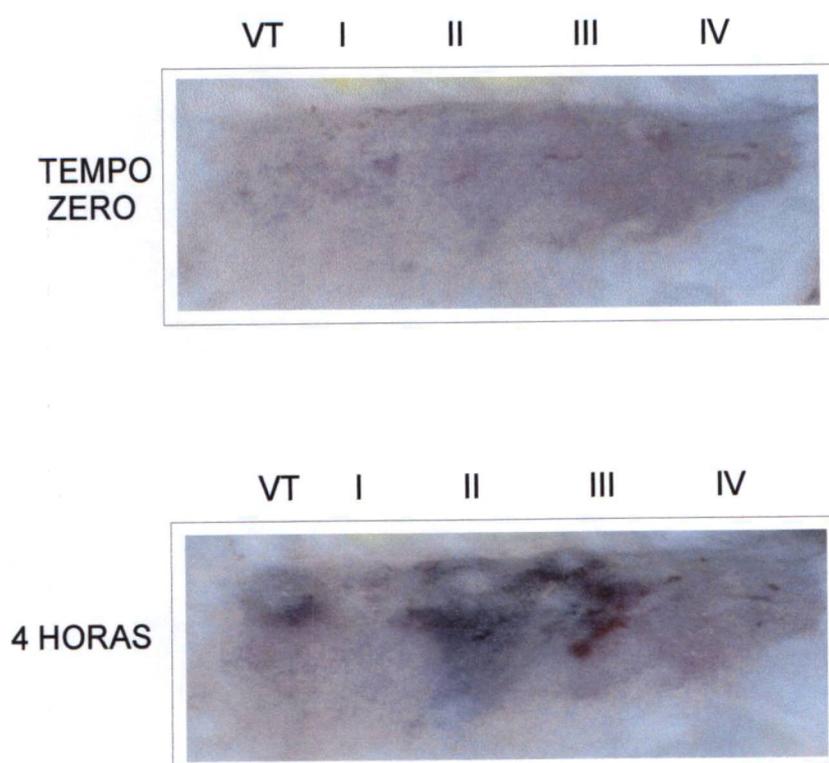


Figura 6 Aspecto macroscópico da pele de coelho após a aplicação de veneno total (VT) e picos I, II, III e IV provenientes da cromatografia Sephadex G-100. Avaliação nos tempos 0 hora e 4 horas.

4.7 Características normais macroscópicas e histológicas da pele de coelho

O objetivo deste experimento onde os resultados seguem abaixo foi o de estabelecer qual o tempo inicial de aparecimento e descrever o desenvolvimento das lesões cutâneas causadas por envenenamento agudo pelo veneno de *L. intermedia*, tentando estabelecer alguma ligação com o tempo de surgimento de sinais e sintomas sistêmicos. Todos os animais testados reproduziram reações semelhantes para cada tempo testado. Foram usados três coelhos por tempo ensaiado mais três coelhos controles.

Como controle a Figura 7 mostra o aspecto normal da pele de coelho. A Figura 7A mostra macroscopicamente a aparência da pele depilada de coelho. Na Figura 7B podemos observar detalhes histológicos da epiderme e da derme. O epitélio escamoso estratificado, o *stratum corneum* com células queratinizadas e fibras de colágeno estão bem visíveis. A Figura 7C mostra feixes de colágeno do tecido conectivo e detalhes das estruturas anexas aos pêlos. A Figura 7D ilustra detalhes da derme e do *corium* normais localizados abaixo da epiderme, onde se pode observar uma camada de tecido conjuntivo denso rico em fibras de colágeno arranjadas em bandas entrelaçadas ao acaso com vários tamanhos. Vasos sanguíneos normais responsáveis pelo suprimento de sangue para a derme também podem ser vistos (7D). Figura 7E apresenta o aspecto normal do tecido muscular esquelético localizado abaixo da derme.

4.8 Alterações histológicas induzidas em pele de coelhos pelo veneno de *L. intermedia* 4 horas após o tratamento

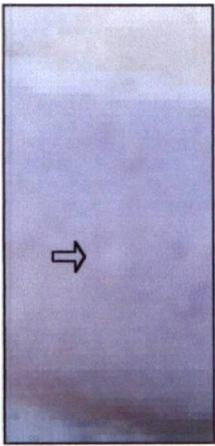
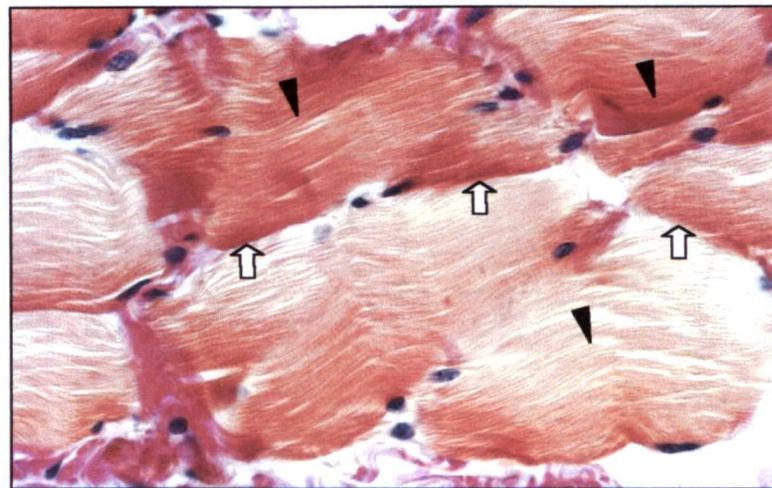
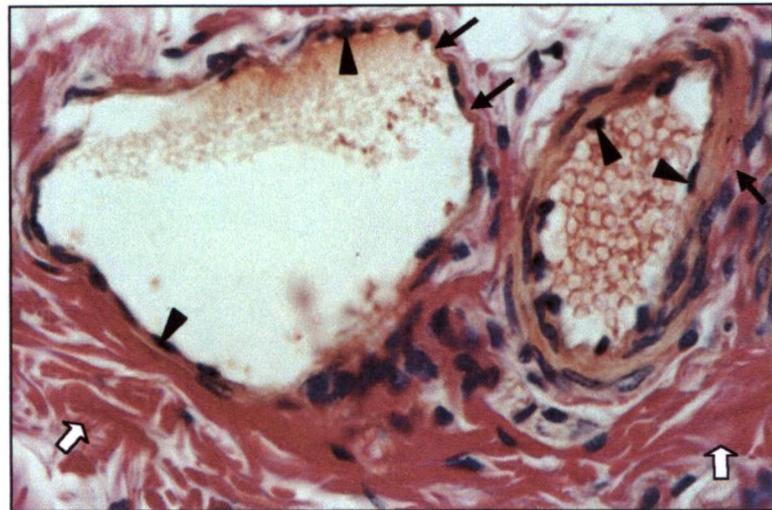
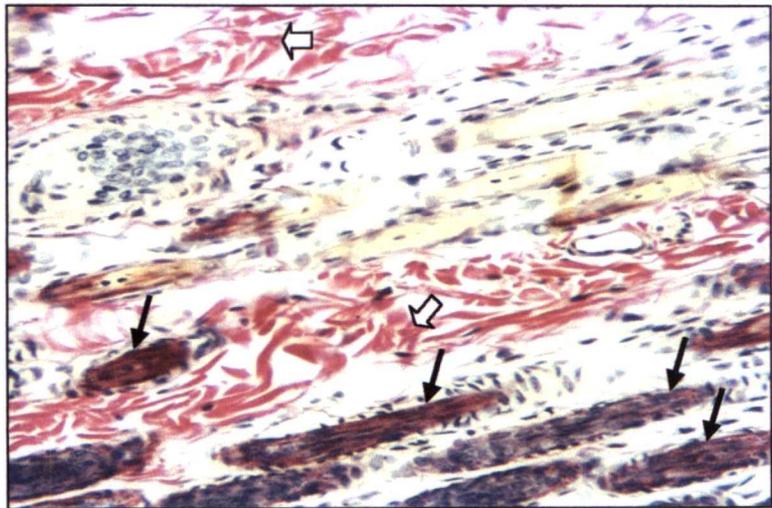
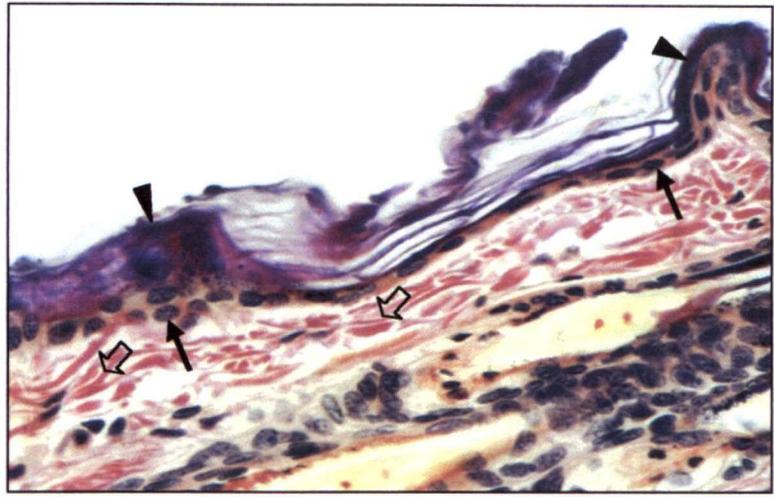
O sinal inicial de injúria aparece entre 1 a 4 horas após a injeção do veneno de *L. intermedia* colhido por eletroestimulação. Como mostrado macroscopicamente (Figura 8A), inchaço e hemorragia (caracterizado como um ponto) desenvolveram-se no local da injeção. Histologicamente, com 4 horas após a exposição ao veneno a epiderme estava preservada, mostrando o epitélio escamoso estratificado e o

stratum corneum com células queratinizadas (8B). Contudo ocorre edema abaixo da derme, como mostrado pela marcada desorganização do tecido conectivo frouxo (8B). Neste estágio os folículos pilosos estão preservados. Uma biópsia coletada neste tempo mostra uma intensa coleção de células inflamatórias dentro e nas imediações dos vasos da derme, caracterizando massiva diapedese com infiltração no tecido conjuntivo e até tecidos mais profundos. As células inflamatórias são basicamente representadas por neutrófilos (8D, 8E e 8F). O tecido conectivo denso dentro da derme apresenta desorganização das fibras de colágeno com infiltração multifocal por células inflamatórias (8H) e uma rede proteinácea formada entre feixes de colágenos (8I). Reação imunohistoquímica usando anticorpo que reconhece fibrinogênio confirmou que a substância proteinácea era fibrina (8J), indicando um aumento de permeabilidade vascular com exsudação e edema intersticial. Foram também detectados depósitos de rede de fibrina intravascular e trombose de vasos da derme, degeneração das paredes dos vasos, infiltração e agregação de células inflamatórias envolvidas num mecanismo leucócito-dependente de extravasamento vascular com função de transmigração massiva através do endotélio (diapedese) (Figuras 8K, 8L). Neste estágio a musculatura esquelética que forma uma interface ao redor das fibras do colágeno a partir da hipoderme começa a ser infiltrada por células inflamatórias e apresenta edema (8M).

FIGURA 7

Figura 7 Aspectos normais da pele de coelho

(A) Visão macroscópica (fotografada) da área normal da pele depilada de coelho (seta aberta). (B) Aparência em corte histológico da epiderme e arredores da derme (cabeças de flecha fechadas) mostrando a presença de *stratum corneum* e células queratinizadas; as setas fechadas mostram células epiteliais e as setas abertas mostram feixes de colágeno do tecido conjuntivo frouxo (400X). (C) Detalhes da derme (setas fechadas) aponta folículos pilosos; setas brancas demonstram feixes de colágeno do tecido conjuntivo denso (400X). (D) Aparência de vasos sanguíneos normais (cabeças de setas fechadas) mostrando células da *tunica íntima*; setas fechadas apontam parede de vaso sanguíneo (400X). (E) Aspectos do músculo esquelético subcutâneo (setas brancas) mostram a interface das fibras musculares; cabeças de flechas fechadas apontam para miofibrilas de aparência normal (400X).

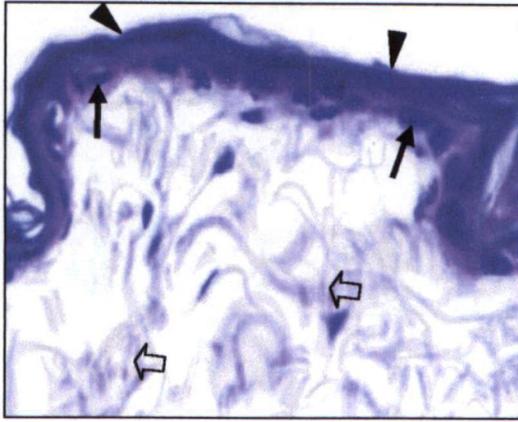


A

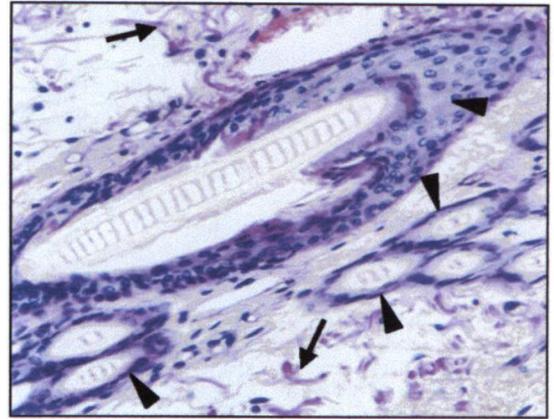
FIGURA 8
A – G

Figura 8 Mudanças histológicas da pele de coelho 4 horas após exposição ao veneno de *L. intermedia*

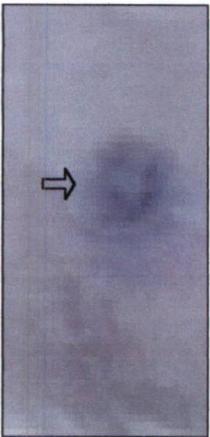
(A) Aparência macroscópica da área depilada de pele de coelho após a injeção (seta aberta) mostra os arredores do ponto hemorrágico no local da injeção. Cortes histológicos da área injetada: (B) Células epiteliais preservadas (setas fechadas) e células queratinizadas (cabeças de flecha fechadas) da epiderme, mas desorganização das fibras de colágeno do tecido conjuntivo frouxo (setas abertas) está presente, indicando a ocorrência de edema (400X). (C) Os folículos pilosos estão preservados (cabeças de flecha fechadas), mas pode-se observar edema, que é caracterizado pela desorganização dos feixes de colágenos na derme (setas fechadas), (200X). (D) Massiva acumulação de células inflamatórias dentro dos vasos na derme (setas fechadas), (100X). (E) Detalhes dos vasos sanguíneos mostrando o acúmulo de leucócitos inflamatórios dentro (seta branca) e em volta (setas fechadas) do vaso, (630X). (F) Uma massiva diapedese de células inflamatórias no tecido conjuntivo da derme (setas brancas) pode ser visto; a seta fechada mostra o interior do vaso sanguíneo (400X). (G) Detalhes do infiltrado inflamatório mostram neutrófilos (setas fechadas) como as células envolvidas (1000X).



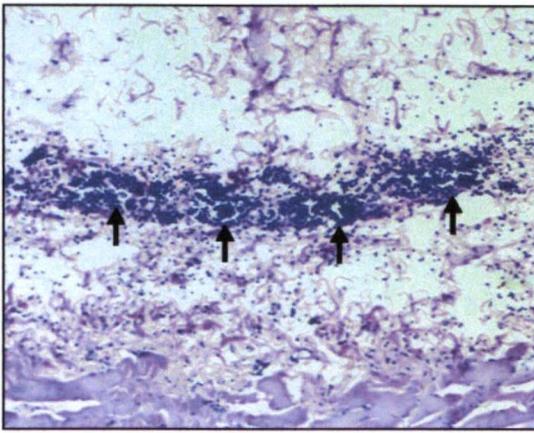
B



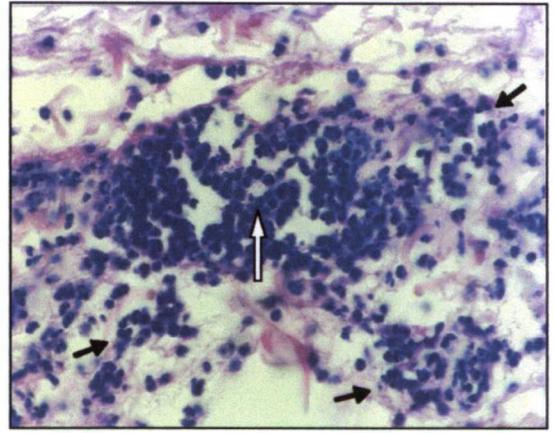
C



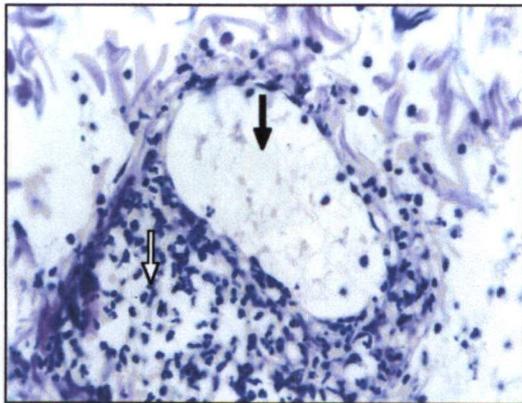
A



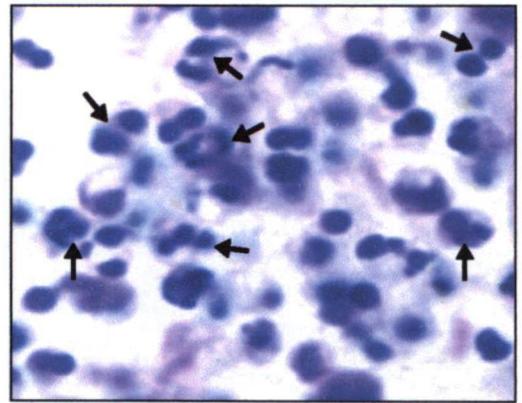
D



E



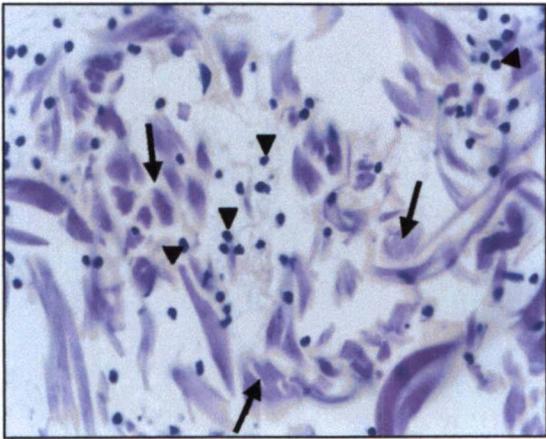
F



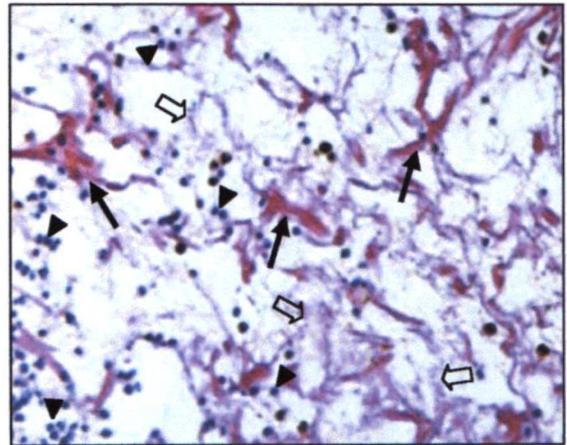
G

FIGURA 8
H – M

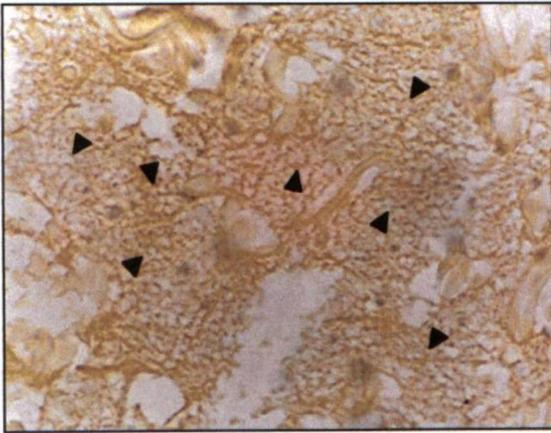
(H) Detalhes da derme mostrando coleções de leucócitos infiltrados no tecido conectivo (cabeças de flecha fechadas) e uma profusa desorganização das fibras de colágeno (setas fechadas) (400X). (I) Detalhes do tecido conectivo denso mostrando desorganização das fibras de colágeno (setas fechadas), uma coleção de células inflamatórias (cabeças de flecha fechadas) e uma rede proteinácea difusa entre as fibras colágenas (setas abertas), (200X). (J) Reação imunohistoquímica positiva usando anticorpo antifibrinogênio confirmando a natureza da rede proteinácea na derme como sendo fibrina e evidenciando a exsudação de plasma (cabeças de flecha fechadas), (430X). (K) Detalhes dos vasos mostrando rede intravascular de fibrina com leucócitos aderidos (setas fechadas), (630X). (L) Um vaso congestionado com coágulo (cabeças de flecha fechadas), coleção de leucócitos aderidos no trombo (seta branca) e leucócitos infiltrando nas redondezas do tecido conectivo (setas fechadas), (200X). (M) Desorganização das fibras do tecido muscular esquelético (setas fechadas) suportando a presença de edema muscular e infiltração inflamatória (cabeças de flecha fechadas), (200X).



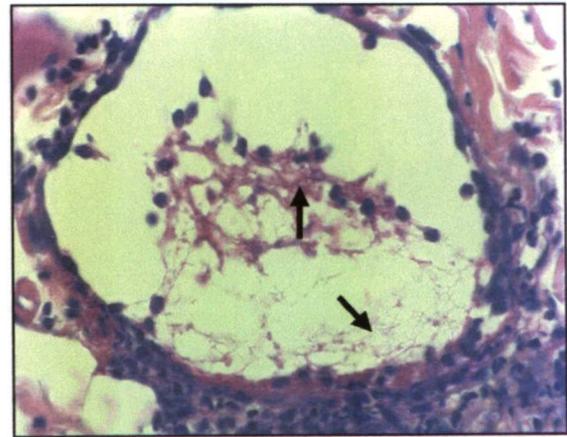
H



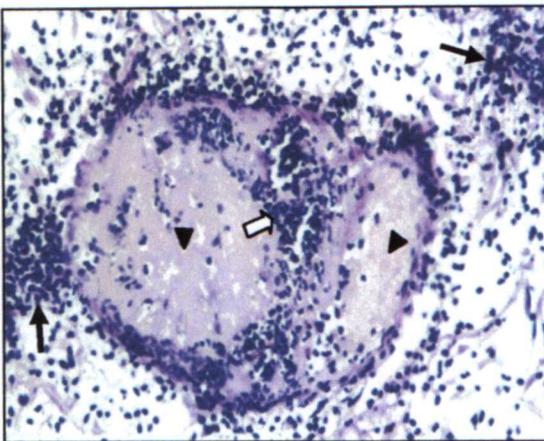
I



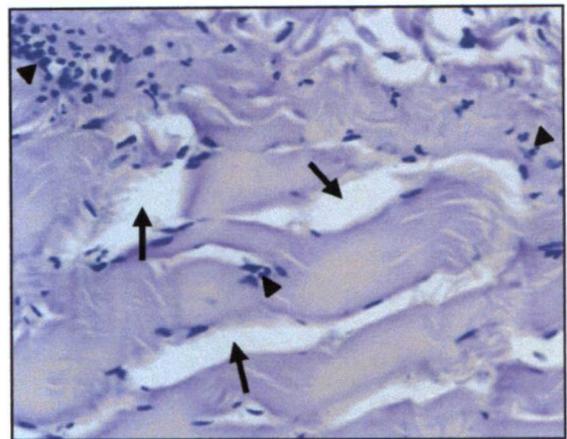
J



K



L



M

4.9 Ensaios farmacológicos - Avaliação da Atividade Geral (veneno total)

O ensaio farmacológico realizado foi teste de Campo Aberto e foram avaliados os critérios locomoção, levantar, "grooming" (tempo de limpeza realizado pelo animal no corpo durante o experimento em segundos), fezes e tempo parado (duração da imobilidade em segundos), já citados na metodologia. Testaram-se quarenta e cinco camundongos albinos suíços machos com massa corporal entre 20 a 30 g divididos em grupos de cinco animais (9 grupos). Cada ensaio utilizava 3 grupos de camundongos e foi realizado três vezes (dias diferentes, porém no mesmo período do dia, pela manhã). Cuidados foram tomados para que não se introduzissem variáveis tais como barulho, odores diferentes, em cada dia de teste. A cada dia testava-se um grupo injetado com PBS, um injetado com veneno total 0,5 mg/kg de MC do camundongo e um injetado veneno total dose 0,75 mg/kg de MC do camundongo. A via de injeção era a intraperitoneal. Os animais foram avaliados por cinco minutos, uma hora após a injeção exatamente.

Dentro das metodologias estatísticas propostas para análise dos dados acima obtivemos os seguintes resultados:

Tabela 1. Efeitos da administração do veneno total 0,5 e 0,75mg/kg na atividade geral de camundongos em campo aberto.

PARÂMETROS	CONTROLE PBS (n=15)	VENENO TOTAL 0,5mg/kg (n=15)	VENENO TOTAL 0,75mg/kg (n=15)
LOCOMOÇÃO	142,2±47,8	71,9±57,4*	85,8±78,0*
LEVANTAR	49,2±14,2	21,8±22,5*	17,1±14,2*
PARADO (s)	3,9±8,9	91,1±74,8*	91,0±69,9*
FEZES	4,3±2,2	0,8±0,9*	0,7±1,3*

Dados representam a média ± desvio padrão. Anova seguida do teste de Tukey. *p< 0,05 em comparação tratado com o grupo controle.

O dado “grooming” não teve avaliação estatística que se mostrasse significativa, por isso foi omitido nas tabelas acima.

4.10 Ensaio farmacológico - Avaliação da Atividade Geral (Picos III E IV da Cromatografia de Gel Filtração)

Para ensaios neurocomportamentais foram usadas frações concentradas dos picos III e IV que representam graficamente a eluição dos constituintes do veneno total de *L. intermedia* em cromatografia de baixa pressão em coluna cromatográfica já descritas na metodologia e mostrados no Gráfico 2 e Figuras 5 e 6.

Pela dificuldade de dosagem da concentração e caracterização das moléculas do pico IV, usamos padronizações volumétricas com base nas leituras de densidade ótica na faixa comprimento de onda de 280 nm. Para as frações correspondentes ao pico IV injetamos em cada camundongo do experimento 3ml da solução obtida a partir da cromatografia de gel filtração concentrado para um volume final de 250µl. Sendo que o controle salina, que foi o solvente carreador utilizado na segunda cromatografia gel filtração, foi concentrado na mesma proporção do tratamento (3ml concentrado até volume final de 250µl). Na segunda cromatografia realizada para o veneno total utilizou-se como solução carreadora solução salina 0,9% (NaCl 0,9% em água deionizada) que é totalmente atóxica para os organismos. Na primeira a utilização de TBS inviabilizou os ensaios de neurotoxicidade, pois mostrou-se extremamente tóxico aos animais principalmente quando injetado concentrado.

As moléculas existentes no terceiro pico de eluição (pool das frações) foram concentradas e dialisadas (membrana com exclusão de 1kDa) contra solução salina 0,9% e dosadas por microensaio usando azul de Coomassie como descrito na metodologia. Em cada animal foi injetado 0,26 mg/kg MC da solução obtida e dosada depois da diálise.

Tabela 2. Efeitos da administração de solução representativa das moléculas que eluam da cromatografia Sephadex G-100 no pico III na atividade geral de camundongos em um campo aberto.

PARÂMETRO	CONTROLE SALINA	PICO III
	NaCl 0,9% (n=5)	0,26mg/kg (n=10)
LOCOMOÇÃO	136,0±40,0	133,0±42,0
LEVANTAR	46,2±22,5	38,2±14,0
PARADO (s)	0,2±0,4	2,3±3,6
FEZES	3,2±1,3	2,8±2,3
GROOMING	2,4±5,3	6,5±6,6

Dados representam a média ± desvio padrão. Anova seguida do teste de Tukey.

Tabela 3. Efeitos da administração de solução representativa das moléculas que eluam da cromatografia Sephadex G-100 no pico IV na atividade geral de camundongos em um campo aberto.

PARÂMETRO	CONTROLE SALINA	PICO IV
	250µl (n=10)	250µl (n=20)
LOCOMOÇÃO	171,9±35,2	109,5±49,3*
LEVANTAR	47,9±15,2	26,6±21,8*
PARADO (S)	0,1±0,3	26,7±38,9*
FEZES	2,4±2,3	1,4±2,1
GROOMING	7,2±4,4	14,1±15,2

Dados representam a média ± desvio padrão. Anova seguida do teste de Tukey. *p< 0,05 em comparação grupo tratado com o grupo controle.

4.11 Testes Neurocomportamentais – Avaliação da Atividade Geral com Administração Prévia de Bloqueador de Canais Cálcio – Verapamil

Os ensaios com bloqueador de canais de cálcio foram realizados testando-se duas doses diferentes de bloqueador que foram seguidas de injeção de veneno total (dose 1mg/kg MC/camundongo) 30 minutos após a administração do medicamento.

Além de experimentos com reforço de bloqueador 3 horas após injeção do veneno nos quais foram somente testados o uso do bloqueador (sem injeção posterior de veneno) e sem teste em CA. apenas para se determinar qual a dose máxima que se poderia usar de bloqueador sem que houvesse alteração comportamental dos indivíduos (exemplo: convulsão).

No caso do experimento usando somente o bloqueador foram injetadas doses de 5, 10, 15 e 20mg/kg MC por camundongo sem que houvesse alterações significativas dos indivíduos (não convulsionaram e não morreram).

O ensaio com reforço, isto é, repetição da administração de bloqueador (mesma dose da 1ª dose 10mg/kg MC) 3 horas após a injeção do veneno teve como resultado a morte acelerada de todos os animais do grupo, mostrando que a repetição da administração de bloqueador foi prejudicial aos mesmos.

Tabela 4. Tempo em minutos contados desde o instante de injeção do reforço de bloqueador de canais de cálcio até a morte dos camundongos.

CAMUNDONGO	TEMPO ATÉ A MORTE APÓS REFORÇO
ANIMAL 1	37 MINUTOS
ANIMAL 2	117 MINUTOS
ANIMAL 3	5 MINUTOS
ANIMAL 4	21 MINUTOS
ANIMAL 5	8 MINUTOS

Dados absolutos de tempo de sobrevivência dos camundongos após injeção de reforço de bloqueador de canal de cálcio (verapamil 10mg/kg MC).

Nos testes com bloqueador foram usados duas doses diferentes de 5 e 10mg/kg por camundongo e administração de 1mg/kgMC de veneno total de *L. intermedia* após 30 minutos, onde tivemos como parâmetros o controle salina (grupo de animais injetados com salina 0,9% que foi o diluente de todas as outras soluções - SAL), controle verapamil (grupo injetado com verapamil 10mg/kg MC - VER), controle veneno (grupo injetado apenas veneno total na dose de 1mg/kg MC sem administração alguma de bloqueador - VEN). Além dos parâmetros usuais ensaiados em CA, analisou-se também o tempo de morte dos camundongos. O tempo de morte foi considerado o tempo em minutos que o animal levou para morrer a partir da injeção do veneno. O dado tempo de morte também foi colhido, porém não se mostrou reprodutivo.

Tabela 5. Efeitos da administração prévia de verapamil (5mg/kg MC) seguida da administração do veneno total na atividade geral de camundongos em campo aberto.

1° Experimento

PARÂMETRO	CONTROLE SALINA 0,9% (n=5)	CONTROLE VERAPAMIL 5mg/kg (n=5)	VERAPAMIL+VENENO 5mg/kg+1mg/kg (n=5)
LOCOMOÇÃO	166,6±53,8	213,4±26,9	85,0±77,4 [#]
LEVANTAR	46,8±20,2	54,4±4,7	20,8±34,2
PARADO (s)	8,6±14,3	0,0±0,0	95,2±77,6 ^{*#}
FEZES	3,8±2,7	4,0±3,0	0,6±0,5
GROOMING	10,4±12,8	2,8±4,3	6,6±6,8

Dados representam a média ± desvio padrão. Anova seguida do teste de Tukey. *p< 0,05 em comparação tratado com o grupo controle salina. # p< 0,05 em comparação do grupo tratado com controle verapamil.

Tabela 6. Efeitos da administração prévia de verapamil (10mg/kg MC) seguida da administração do veneno total na atividade geral de camundongos em campo aberto.

2° Experimento

PARÂMETRO	CONTROLE SALINA 0,9% (n=10)	CONTROLE VERAPAMIL 10mg/kg (n=10)	VENENO 1mg/kg (n=10)	VERAPAMIL+ VENENO 10mg/kg+1mg/kg (n=10)
LOCOMOÇÃO	135,5±31,2	133,8±78,2	36,0±41,5 ^{*#}	51,0±56,9 ^{*#}
LEVANTAR	46,0±13,5	44,1±25,5	8,1±15,8 ^{*#}	9,7±16,4 ^{*#}
PARADO (s)	1,1±2,2	0,5±1,1	141,5±66,8 ^{*#}	97,5±67,6 ^{*#}
FEZES	3,9±2,1	2,8±2,1	0,9±1,9 [*]	0,3±0,9 ^{*#}
GROOMING	8,7±7,3	10,6±6,4	3,8±4,7	9,5±10,7

Dados representam a média ± desvio padrão. Anova seguida do teste de Tukey. *p< 0,05 em comparação tratado com o grupo controle salina. # p< 0,05 em comparação tratado com o grupo controle verapamil.

Durante estes e outros ensaios, onde se injetou veneno total de *L. intermedia* em doses muito acima da DL₅₀ determinada para estes animais (camundongos albinos suíços DL₅₀ 0,48mg/kg MC), pode-se observar que alguns animais eram refratários aos efeitos comportamentais depressores e também letais do veneno, isto é, não sofriam alterações e não morriam em consequência da injeção do veneno total da aranha marrom. A partir desta observação resolvemos colher sangue dos animais refratários e dos sensíveis (pouco antes da morte pela injeção do veneno) e testar a presença de anticorpos naturais contra constituintes do veneno total através de técnicas de WB.

Estas amostras foram colhidas e armazenadas em freezer -20°C . A coleta de sangue dos camundongos foi realizada através da cauda dos animais como descrito na metodologia. No caso dos animais sensíveis ao veneno estes foram anestesiados com éter e em seguida procedeu-se coleta de sangue por punção cardíaca com coração exposto. O sangue foi colhido imediatamente antes da morte dos animais em decorrência da injeção intraperitoneal do veneno da aranha marrom (quando estes animais davam sinais claros de que iriam a óbito imediato).

O resultado do imunoblotting do veneno total soro dos camundongos sensíveis e refratários (anticorpo primário 1:50) foi negativo não surgindo nenhuma banda visível na membrana de nitrocelulose quando revelado com anticorpo secundário que reconhece IgG de camundongo marcado com fosfatase alcalina. Figura não apresentada.

4. 12 Espectrometria de massa

A espectrometria de massa das moléculas provenientes do pico IV da cromatografia de gel filtração (Sephadex G-100) teve como resultado um perfil espectrométrico similar ao obtido para oligopeptídeos. No Gráfico 3 pode-se observar este perfil e compará-lo ao perfil obtido para a solução diluente deste pico (Gráfico 4), que é a salina (NaCl 0,9%). Dentro do perfil obtido no Gráfico 3 sugere-se que sua composição seja de oligopeptídeos com 3 a 14 aminoácidos aproximadamente.

ESPECTROMETRIA DE MASSA - AMOSTRA SALINA (NaCl 0,9%)

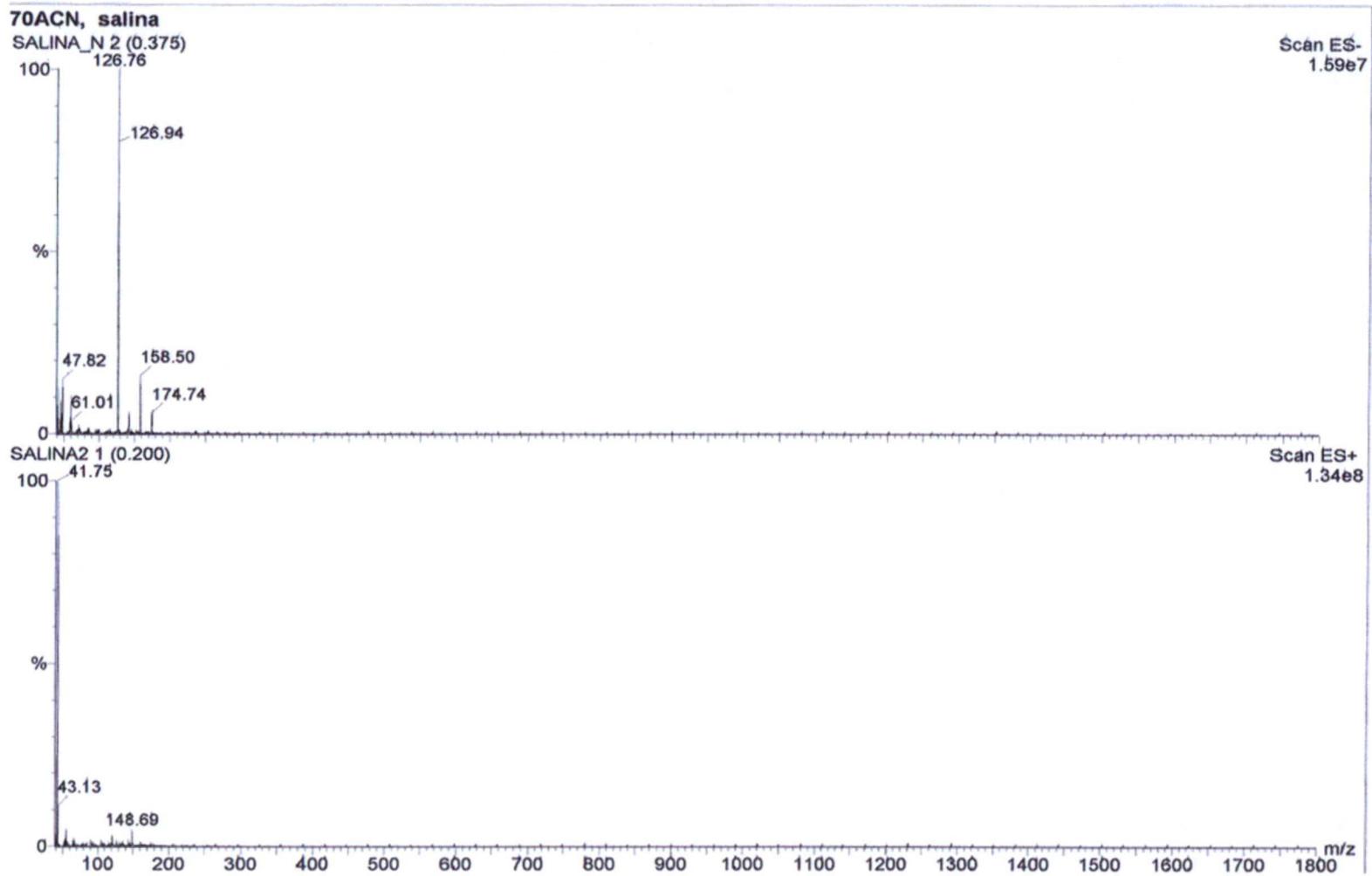


GRÁFICO 4

5 DISCUSSÃO

Para padronizarmos os ensaios com o veneno de *L. intermedia* realizamos os primeiros experimentos (SDS-PAGE, blotting lectínico e zimograma) comparando-se veneno obtido por eletroestimulação e extrato de glândula, sendo os resultados muito semelhantes, utilizamos para os demais experimentos o veneno eletroestimulado ao qual nos referimos como veneno total ou veneno bruto. A escolha se justificou pela facilidade de coleta do veneno por este método, além de não haver necessidade de sacrifício das aranhas.

O estudo dos peptídeos e proteínas de baixa massa molecular, que perfazem aproximadamente 40% do total do conteúdo protéico do veneno de *Loxosceles intermedia*, apresentou algumas variantes quanto ao modo de realização do gel de poliacrilamida SDS-PAGE. Para que houvesse uma separação adequada nesta região de baixa massa foi necessário introduzir uma modificação, que foi o uso do tampão tricina na técnica eletroforética, além da preparação do gel de poliacrilamida com três regiões: uma de empacotamento da amostra com malha mais aberta, uma região de espaçamento com malha mais fechada que proporcionou uma primeira separação protéica e uma região de separação propriamente dita a qual fazia com que as bandas migrassem de modo otimizado em relação aos géis de separação de malha mais fechada mais comumente usados. O resultado desta nova técnica pode ser visto quando comparamos o perfil de separação eletroforética obtida com gel de poliacrilamida normal e o SDS-PAGE-TRICINA, onde no primeiro (Figura 1.a) a região de baixa massa é apenas separada das demais regiões de diferentes massas protéicas, não havendo separação adequada entre as proteínas e peptídeos que compõem esta região mais inferior do gel. Na Figura 1.b, onde usamos a técnica modificada (SDS-PAGE-TRiCINA) a separação eletroforética das proteínas e peptídeos na região inferior do gel fica muito mais evidente permitindo uma avaliação mais razoável do número de bandas protéicas existentes.

Para buscarmos mais informações sobre as características bioquímicas das moléculas com migração eletroforética na região de baixa massa molecular do veneno loxoscélico, foram processadas reações com base na afinidade lectínica das moléculas glicosiladas. Há uma grande especificidade e afinidade (aproximadamente equivalente à afinidade e especificidade descrita para reação antígeno – anticorpo) das lectinas por grupamentos glicídicos específicos. Testamos as seguintes lectinas: GNA, ligante específico de resíduos de manose; Con – A, ligante específico de resíduos de manose e glicose; MMA, ligante específico de ácido siálico; WGA, ligante específico de resíduos de N-acetil glicosamina; AAA, ligante específico de fucose; PHA-L ligante de polilactosamina (galactose ligada a N-acetil glicosamina) e PNA ligante de polilactosamina (galactose terminal O-ligada). Estas lectinas são marcadas com DIG (digoxigenina) e para revelação da reação usou-se anticorpo que reconhece digoxigenina marcado com fosfatase alcalina. A reação foi processada nas fitas de nitrocelulose que receberam por eletrotransferência (“blotting”) as proteínas provenientes do gel de separação eletroforética SDS-PAGE-TRICINA. Pode-se verificar que para a região de interesse não houve aparecimento de reação positiva para nenhum dos açúcares testados, tanto para o veneno total quanto para o extrato de glândula como mostram as figuras 3.a e 3.b, descartando-se a possibilidade de serem estes peptídeos produtos de degradação das glicoproteínas com massas moleculares maiores presentes no veneno (VEIGA *et al.*, 1999).

Para testar possível atividade proteolítica das proteínas de baixa massa e peptídeos fez-se uso da técnica conhecida por zimograma ou zimografia, na qual se introduziu à malha de poliacrilamida um substrato protéico, no nosso caso usamos gelatina a 2mg/ml de gel, e procedemos a corrida eletroforética normalmente. Na seqüência o gel foi tratado com solução de Triton a 2,5% (retira o SDS e proporciona uma renaturação das moléculas) e incubado em tampão ótimo para enzimas (Tris pH 7,3; NaCl 200 mM; CaCl₂ 5mM; MgCl₂ 5mM). Em seguida a coloração de

Coomassie Blue observamos o gel ao negatoscópio e não foi evidenciada nenhuma atividade proteolítica na região de interesse (Figura 3).

Considerando – se os dados já colhidos sobre as moléculas de baixa massa no veneno loxoscélico (fração peptídica) podemos conjecturar que são moléculas com massa entre 12 e 3 kDa, não têm atividade proteolítica, não apresentam glicosilação nas moléculas.

Uma segunda classe de moléculas de baixa massa surgiu no processo de separação parcial das moléculas do veneno durante a gel filtração (Sephadex G-100). Foram observadas através da formação de um pico de alta absorção de energia na faixa de 280 nm (UV), mas não são observadas nos géis de poliacrilamida. Estas moléculas foram denominadas durante o trabalho como moléculas do quarto pico (ou do pico IV) devido à sua localização no gráfico (ver gráfico 1 e 2) que foi construído através da contraposição do volume das frações do veneno que eluíram da coluna cromatográfica e sua absorção na faixa de 280nm (UV). Durante este trabalho buscou-se caracterizar qual a natureza bioquímica destas moléculas, para tanto se realizou uma espectrometria de massa que não foi conclusiva, mas sugeriu a presença nas amostras de oligopeptídeos com 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13 aminoácidos aproximadamente (considerando-se que cada aminoácido equivale a 100Da), pois picos observados na espectrometria de massa têm valores próximos a 300,400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1300 e 1400Da tanto para o perfil ionizado positiva quanto para o ionizado negativamente. A salina, que está presente nas amostras para evitar a agregação das proteínas durante a cromatografia, pode mascarar o perfil da espectrometria de massa, pois os íons sódio e cloreto formam cadeias iônicas que mostram perfil idêntico a oligopeptídeos. Sabendo-se que oligopeptídeos podem fazer parte das amostras é necessário refazer este experimento na ausência destes íons para se confirmar o perfil já obtido (Gráficos 3 e 4). A presença de oligopeptídeos com massa menor que 1kDa, justificaria a ausência no gel de poliacrilamida SDS-PAGE-TRICINA

(resolução até 1 kDa) de qualquer sinal que comprovasse a existência de peptídeos (coloração monocromática de prata: sensibilidade na faixa de ng).

Tentando-se associar atividades biológicas aos componentes de baixa massa molecular do veneno foram desenvolvidos ensaios com modelos animais. Os ensaios realizados em coelhos buscaram alguns parâmetros que pudessem ser comparados aos relatos clínicos em humanos e em outros modelos experimentais.

No primeiro ensaio foram injetadas amostras de veneno total, do pico I, pico II, pico III e pico IV provenientes da cromatografia de gel filtração (Gráfico 2) na pele de coelho. Os resultados mostraram aparecimento de reação dermonecrótica nas amostras de veneno total e pico II, o que era de se presumir já que a literatura (BARBARO *et al.*, 1996) descreve a presença de reação dermonecrótica deste veneno e atribui esta reação a uma proteína dermonecrótica de 32-33kDa. No ponto de inoculação do pico III na pele de coelho, pode-se observar hemorragia local que não se pode atribuir devidamente a moléculas deste grupo (pico III), a separação das proteínas do veneno pode não ter sido adequada havendo superposição de moléculas do segundo pico no terceiro. O ponto de injeção do pico I e do pico IV não apresenta reação alguma visível na pele do coelho com observação em 4 horas após a inoculação.

A análise histológica realizada 4 horas após a exposição ao veneno mostrou macroscopicamente um ponto hemorrágico no local da injeção. Microscopicamente, as células da epiderme e folículos pilosos na derme estão preservados, apesar dos eventos mais recentes observados na derme, edema intersticial, exsudação de plasma indicado pelo depósito de fibrina no tecido conectivo, uma massiva acumulação de leucócitos (PMN) dentro dos vasos sanguíneos (nenhum outro tipo de leucócito foi detectado em nosso modelo) e uma evidente diapedese com infiltrado inflamatório de estruturas intersticiais e até mesmo tecido muscular. Neste tempo nós também detectamos trombose capilar e degeneração de parede de

vasos, além de edema no tecido muscular abaixo da pele. Não foi observado espalhamento gravitacional nos animais após 4 horas de injeção do veneno.

Baseados nos resultados deste trabalho, nós mostramos uma coleção prematura e massiva de leucócitos PMN dentro dos vasos e distribuídos nas vizinhanças dos tecidos e como estas células têm papel essencial nos efeitos dermonecróticos do veneno de aranha marrom (SMITH E MICKS, 1970; PATEL *et al.*, 1994), nós podemos entender porquê a maioria dos tratamentos não produz decréscimo na dermonecrose quando aplicado mais tardiamente ao acidente e a importância do diagnóstico diferencial e da visita ao médico para terapia efetiva.

Este relato de reação dermonecrótica rapidamente desenvolvida somado aos relatos clínicos dos acidentados com este veneno nos levaram a buscar atividade sobre o sistema nervoso central também em tempo bem precoce. Para os primeiros ensaios farmacológicos escolhemos o tempo de 1 hora após a injeção do veneno para avaliação dos efeitos deste veneno sobre o SNC.

Os ensaios farmacológicos realizados com veneno total injetado intraperitonalmente em camundongo mostraram que o veneno bruto apresenta ação sob o sistema nervoso central de forma depressora, tal informação pode ser verificada através dos dados obtidos no ensaio de atividade geral em campo aberto que em quatro dos cinco parâmetros analisados mostraram resultados estatísticos significativos confirmando esta ação depressora (Tabela 1).

Na seqüência dos experimentos foi testada a ação farmacológica das frações parcialmente purificadas do veneno (pico III e pico IV), tentando assim buscar qual, exatamente, a porção do veneno responsável por esta ação descrita sobre o sistema nervoso central. As doses de veneno total testadas nos ensaios estão acima da DL_{50} descrita na literatura que é de 0,48mg/kg de massa corporal (BARBARO, *et al* 1996), contudo reproduziram a contento as reações orgânicas dentro dos tempos estabelecidos para registro dos dados. Os animais que apresentaram depressão do SNC não sobreviveram ao término dos ensaios, porém aqueles que não sofreram

ação depressora do veneno tiveram comportamento em termos de sobrevivência igual aos do grupo controle (injetados com PBS ou salina), no caso do veneno total. Os animais injetados com as frações de veneno sobreviveram ao término do experimentos, inclusive os que sofreram alterações comportamentais.

Os ensaios neurocomportamentais com avaliação da atividade geral em CA com frações do pico III e pico IV provenientes da primeira cromatografia de gel filtração foram invalidados, pois a injeção de tampão TBS como controle na mesma concentração (padronização volumétrica) deste diluente presente nas frações mostrou-se extremamente tóxico, provocando alterações muito grandes nos animais, levando todos os indivíduos deste grupo controle à morte. Este motivo nos levou a substituir, numa segunda cromatografia de baixa pressão, o tampão TBS por salina 0,9%. A salina não sendo tóxica permitiu que procedêssemos aos ensaios em animais e impediu que as proteínas precipitassem durante a separação na coluna cromatográfica, o que poderia ocorrer se usássemos água durante a cromatografia.

A segunda cromatografia reproduziu com fidelidade tanto o perfil cromatográfico quanto o perfil protéico de eluição que foram monitorados por leituras no comprimento de onda de 280 nm e por géis SDS-PAGE e SDS-PAGE-TRICINA respectivamente, como mostram os gráficos 1 e 2 e as figuras 4 e 5. Das frações obtidas em cada pico fez-se um apanhado de cada tubo representativo de cada um dos picos de separação de interesse para testes neurocomportamentais.

Os resultados colhidos em campo aberto injetando-se a solução proveniente do 3° pico em camundongos albinos suíços machos (0,260mg/kg MC) estão representados na Tabela 2. Podemos observar pela análise estatística que não houve nenhuma alteração nos indivíduos tratados em relação ao grupo controle. Com tais dados podemos supor que não seja esta a fração do veneno que exerça a ação no sistema nervoso central descrita para o veneno. Não podemos porém, descartar um sinergismo destas moléculas com as demais do veneno tanto para

ação sistêmica como para ação local, já que esta fração é encontrada com abundância no veneno.

Os ensaios farmacológicos neurocomportamentais em campo aberto realizados com as moléculas do quarto pico (Tabela 3) mostram significância estatística para três (locomoção, levantar e parado) dos quatro parâmetros (locomoção, levantar, parado e fezes) significativos para o veneno total. Estes dados demonstram que esta fração é responsável, quase que totalmente, pelos efeitos depressores do SNC. Sabemos que estas moléculas são pequenas (menores que 1kDa segundo espectrometria de massa e avaliação em gel de poliacrilamida), massa molecular baixa favoreceria uma passagem pela barreira hematoencefálica, mas outros experimentos devem ser realizados para que novos dados somem-se a este e confirmem este achado.

Outro fator que merece destaque é a dosagem aplicada em cada animal teste das frações do pico IV. A relevância está em que foi feita uma padronização volumétrica e não de concentração, este fato deve-se à obscuridade da natureza bioquímica destas moléculas até então, já que nunca foram descritas em literatura por parte da separação e purificação parcial do veneno de *L. intermedia*. Provavelmente este perfil cromatográfico contendo um quarto pico foi obtido por termos utilizado uma coluna cromatográfica de grandes proporções, o que não é muito usual. A padronização volumétrica a que nos referimos é a seguinte: foi injetado em cada animal do grupo teste 3ml da solução chamada "pool" do pico IV concentrado para um volume final de 250 μ l, que foi o volume padrão injetado nos camundongos com massa corporal variando entre 20 e 30g. Como parâmetro deste tipo de ensaio foram injetados, nos animais do grupo controle, 3 ml de salina 0,9% concentrado também para volume final de 250 μ l.

O uso de bloqueador de canais de cálcio foi introduzido ao se colherem dados da literatura que mostravam ação de venenos de outras aranhas sobre estas estruturas (GRISHIN, 1999; ESCOUBAS *et al.*,2000). A escolha de verapamil se

deveu ao fato deste medicamento ser de fácil aquisição e ter ação farmacológica sobre canais de cálcio que são os mais comumente atingidos por ação de drogas (FUTURO-NETO, 1999). O verapamil usado foi o Dilacoron®, marca comercial do sal produzido pela Knoll Indústria Farmacêutica que mantém este medicamento disponível em qualquer farmácia comercial na forma injetável (caixa com 5 ampolas de 2ml; 5mg/ampola).

Para ensaios com bloqueadores de canais de cálcio buscamos dados na literatura que dessem idéia de qual a dose mais apropriada para iniciar os experimentos (FUTURO-NETO, 1999). Sendo assim começamos os testes com dose de 5mg/kg MC e em seguida testamos a dose de 10mg/kg MC sempre injetando veneno bruto (1mg/kg MC) meia hora após a injeção do bloqueador sempre por via IP. Testamos paralelamente as concentrações de 15 e 20 mg/kg MC para o verapamil sem que fosse em seguida injetado o veneno ou que os animais fossem levados para CA. Este último teste foi realizado para apenas determinar-se o quanto se poderia aumentar a dose de bloqueador sem que os animais sofressem alterações grandes como convulsão e morte. Estas alterações não ocorreram com nenhum indivíduo testado.

Os ensaios da atividade geral em campo aberto com administração de bloqueador de canais de cálcio tiveram como controles um grupo injetado com salina 0,9% (10µl/g MC), um grupo injetado com verapamil 5mg/kg MC, um grupo injetado com verapamil 10mg/kg MC e um grupo injetado com veneno total de *L. intermedia* 1mg/kg MC e tiveram como teste grupos injetados com verapamil 5mg/kg MC + veneno 1mg/kg MC 30 minutos após o bloqueador, verapamil 10mg/kg MC + veneno 1mg/kg MC 30 minutos após o bloqueador e verapamil 10mg/kg MC + veneno 1mg/kg MC 30 minutos após o bloqueador + reforço de verapamil 10mg/kg MC 3 horas após injeção do veneno. A avaliação da atividade geral em CA foi realizada para os grupos controle uma hora após a injeção da respectiva solução. Para os grupos injetados com bloqueador e 30 minutos após a primeira injeção outra injeção

com veneno, o tempo de uma hora foi contado a partir da injeção do veneno (Tabelas 5 e 6). Os grupos que receberam doses de 15 e 20mg/kg MC de bloqueador verapamil foram testados apenas para tempo de morte e alterações como convulsão, mesmos parâmetros avaliados no grupo que recebeu reforço de verapamil 3 horas após a injeção de veneno.

O controle de tempo foi introduzido, após se observar durante os ensaios que animais previamente tratados com bloqueador tinham tempo de vida prolongado em relação aos que não recebiam a droga, pelo menos em termos absolutos. Contudo, não se confirmou este dado quando submetido à análise estatística.

Todos os grupos ensaiados, tanto controles como os testes, tinham pelo menos 5 indivíduos, o que estatisticamente dentro de nossos parâmetros era amostragem suficiente e significativamente representativa de cada grupo. Quando dentro de um ensaio a variabilidade individual era muito grande o número de indivíduos no experimento era aumentado até que tivéssemos uma população suficientemente grande para que fosse possível a análise estatística. Os dados, embora forneçam resultados claros de que as moléculas presentes no pico IV da cromatografia em Sephadex G-100 têm atividades neurotóxicas, estes não nos permitem concluir que estas atividades neurotóxicas sejam em função de ação agonista ou antagonista sobre canais de cálcio, exigindo que outros protocolos experimentais sejam realizados.

6 CONCLUSÃO

Com estes resultados podemos afirmar que os componentes de baixa massa molecular do veneno de *L. intermedia* apresentam dois grupos de substâncias: um com massa molecular entre 15 e 3 kDa, sem atividade proteolítica (gelatinolítica), aparentemente não glicosilada e sem ação sobre o sistema nervoso central de camundongos. Durante este trabalho pudemos detectar outro grupo com baixa massa molecular ainda com natureza bioquímica não devidamente estabelecida, mas que podemos sugerir que sejam oligopeptídeos com massa variando de 300 a 1400 Da (3 a 14 aminoácidos), que tem ação sobre o sistema nervoso central de camundongo dentro dos parâmetros ensaiados aqui, e que pode ser responsável pela ação sistêmica central descrita em humanos acidentados com esta aranha. Esta classe de moléculas não tem ação dermonecrótica em pele de coelho (observação dentro das primeiras 4 horas após a inoculação). A ação local do veneno total e pico II (dermonecrose) em pele de coelho aparece dentro das primeiras quatro horas a partir da inoculação. Esta reação não está relacionada com as moléculas separadas no pico I e IV. A reação dérmica para as moléculas do terceiro pico não foi devidamente estabelecida. Já os sinais e sintomas sistêmicos em camundongos (depressão do SNC) estão instalados após uma hora da inoculação tanto do veneno total como do pico IV.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABDOLLAHI, M.; SARKARATTI, F.; ETEMAD, F. Interaction between calcium channel blockers and sweetening agents on morphine-induced analgesia in mice by formalin test. **Gen. Pharmac.** 1998; 31:431-435.
2. ALBELDA, S.M.; CLAYTON, A.B. Integrins and other cell adhesion molecules. **FASEB J.** 1990; 4:2668-2680.
3. ANDRADE, R.M.G.; OLIVEIRA, K.C.; GIUSTI, A.L.; SILVA, W.D.; TAMBOURGI, D.V. Ontogenetic development of *Loxosceles intermedia* spider venom. **Toxicon** 1999; 37:627-632.
4. ARAMAKI, Y; YASUHARA, T; HIGASHIJIMA, T; YOSHIOKA, M; MIWA, A; KAWAI, N; NAKAJIMA, T. Chemical characterization of spider toxin, JSTX and NSTX. **Proc. Jpn. Acad.** 1986; 62B:359-362
5. ARAUJO, L.C.L.; ARAUJO, C.E.P. **Farmacologia**. Piracicaba: Editora UNIMEP, 1994 p. 83,84.
6. ARRUZ, M. S.; MARTÍNEZ -VARGAS, A. Z. Toxicidad aguda del veneno glandular de *Loxosceles* sp en ratones albinos. **Bol. chil. Parasitol.** 1986; 41:43-51.
7. AU, LC; HUANG, YB; HUANG, TF; TEH, GW; LIN, HH; CHOO,KB. A common precursor for a putative haemorrhagic protein and rhodostomin, a platelet aggregation inhibitor of the venom of *Calloselasma rhoadostoma*: molecular cloning and sequence analysis. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 1991; 181:585-593.
8. BABCOCK, JL; CIVELLO ,DJ; GEREN, CR. Purification and characterization of a toxin from brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*) venom gland extracts. **Toxicon** 1981; 19:677-689.

9. BARANOVA, E.N.; SHANNON, J.D.; BJARNASON, J.B.; FOX, J.W. Degradation of extracellular matrix proteins by haemorrhagic metalloproteinases. **Arch. Biochem. Bioph.** 1989; 275:63-71.
10. BARBARO, K.C.; CARDOSO, J.L.C.; EICKSTEDT, V.R.D.; MOTA, I. Dermonecrotic and lethal components of *Loxosceles gaucho* spider venom. **Toxicon** 1992; 30:331-338.
11. BARBARO, K.C.; EICKSTEDT, V.R.D.; MOTA, I. Adjuvant effect of *Loxosceles gaucho* (South American brown spider) venom. **Toxicon** 1994; 32:687-693.
12. BARBARO, K.C.; JARED, C.; MOTA, I. Aranhas venenosas no Brasil. **Ciência Hoje** 1995; 19(114):48-52.
13. BARBARO, KC; FERREIRA, ML; CARDOSO, DF; EICKSTEDT, VRD; MOTA, I. Identification and neutralization of biological activities in the venoms of *Loxosceles* spiders. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 1996; 29:1491-1497.
14. BARRETO, CO; CARDOSO, JL; DE CILLO, D. Viscerocutaneous form of loxoscelism and erythrocyte glucose-6-phosphate deficiency. **Ver. Inst. Méd. Trop. São Paulo.** 1985; 27:264.
15. BARTH, R. Estudos histológicos sobre as glândulas peçonhentas da "viúva negra", *Lactrodectus mactans*. **Mem. Inst. Osw. Cruz** 1962; 60:275.
16. BASCUR, L; YEVENES, I; BARJA, P. Effects of *Loxosceles laeta* spider venom on blood coagulation. **Toxicon** 1982; 20:795-796.
17. BECK, K.; HUNTER, I.; ENGEL, J. Structure and function of laminin: anatomy of a multidomain glycoprotein. **FASEB J.** 1990; 4:148-160.
18. BETTINI, S., BRIGNOLI, P.M. **Review of the spider families.** In: Bettini, S. (Ed.). Handbook of Experimental Pharmacology, vol. 48, 1978. Arthrop Venoms. Springer-Verlag, New York, p. 101-120.
19. BORDAS, L.M. Rechercher anatomiques, histologiques et physiologiques sur les glands venimenses on glands der cheliceres der Malnignattes. **Ann. Sci. Nat.** 1905; 9:147.

20. BRADFORD, M. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of Protein-Dye-Bonding. **Anal. Biochem.** 1976; 72:248-254.
21. BRAVO, L. M.; PURATIC, S.O.; BEHN, T.C.; FARDELLA, B.C.; CONTREPA, F.A. Estudio de la hemólisis inducida por veneno de *Loxosceles laeta*. Experiência in vitro. **Rev. Med. Chile** 1993; 121:16-20.
22. BRAZIL, V.; VELLARD, J. Estudo histológico da glândula de veneno da *Ctenodius medius*. **Mem. Inst. Butantan.** 1925; 2:24-73.
23. BROADHURST, P. Experiments in psychogenetics. In: Eisenk, E. (Ed.). Experiments in personality. 1960 Routledge and Kegan Paul, London.
24. BÜCHERL, W. Spiders. In: BÜCHERL, W., BUCKLEY, E.E. (Eds.). **Venomous animals and their venoms**. Vol. III Venomous Invertebrates. 1971. Academic Press, London, p. 197-277.
25. BÜCHERL, W. As aranhas. In **Invertebrados**. 1ª ed., Edart, São Paulo, 1972.
26. BÜCHERL, W., ROSENFELD, G. Aranhas do genero *Loxosceles* e loxoscelismo na América do Sul. **Mem. Inst. Butantan** 1954; 30:167-186,.
27. CHAMMAS, R.; VEIGA, S.S.; LINE, S.; POTOČNJAK, P.; BRENTANI, R.R. Asnlinked oligosaccharide-dependent interaction between laminin and gp 120/140. **J. Biol. Chem.** 1991; 266: 3349-3355.
28. CHAN, T.K., GEREN, C.R., HOWEL, D.E. ODELL, G.V. Adenosine triphosphate in tarantula spider venoms and its synergistic effect with the venom toxin. **Toxicon** 1975; 13:61-66.
29. CICARELLI, R. M. B. et al. Avaliação da atividade tóxica do veneno de *Loxosceles gaucho* em termos de DL_{50} e titulação do antiveneno específico em camundongos. **Mem. Inst. Butantan** 1983/84b; 47/48:45-53.
30. 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** 2002; 40: in press.

31. DAMJANOV, I. Biology and disease. Lectin cytochemistry and histochemistry. **Lab. Invest.** 1987; 57:5-20.
32. DENNY, WF; DILLAHA, CJ; MORGAN,PN. Hemotoxic effect of *Loxosceles reclusa* venom: in vivo and in vitro studies. **J. Lab.Clin. Med.** 1964; 64:291-298.
33. DOS SANTOS, V.L.; FRANCO, C.R.C.; VIGGIANO, R.L.L.; DA SILVEIRA, R.B.; CANTÃO, M.P.; MANGILI, O.C, VEIGA,S.S.; GREMSKI, W. Structural and ultrastructural description of the venom gland of *Loxosceles intermedia* (brown spider). **Toxicon** 2000; 38:265-285.
34. DRURY R.A.B; WALLINGTON E.A. Preparation and fixation of tissues, **Carleton's Histological Technique**, 5thed, 1980, England, Oxford University Press, 41-54.
35. ELBEIN, A.D. Glycosidase inhibitors: inhibitors of N-linked oligosaccharide processing. **FASEB J.** 1991; 5:3055-3063.
36. ESCOUBAS, P; CÉLÉRIER, M.L., ROMI-LEBRUN, R., NAKAJIMA T., Two novel peptide toxins from the tarantula *Lasiodora parahybana*. **Toxicon** 1997; 35:805.
37. ESCOUBAS, P; DIOCHOB, S; CORZO, G. Structure and pharmacology of spider venom neurotoxins. **Biochimie** 2000; 82:893-907
38. FAIRBANKS,G., STECK, T.L., WALLACH, D.F.H. Coomassie blue R250 used in isopropanol-acetic acid. **Biochemistry** 1971; 10(13):2606-2618.
39. FEITOSA, L.; GREMSKI, W.; VEIGA, S.S.; ELIAS, M.C.Q.B.; GRANER, E.; MANGILI, O.C.; BRENTANI, R.R. Detection and characterization of metalloproteinases with gelatinolytic, fibronectinolytic and fibrinogenolytic activities in brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. **Toxicon** 1998; 36:1039-1051.
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.** 1979; 8:325-334.

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.** 1978; 187:335-365.
42. FOX, J.W.; BJARNASON, J.B. Atrolysins: metalloproteinases from *Crotalus atrox* venom. **Methods Enzymol.** 1995; 248:368-387.
43. FURLANETTO, R. S. *Estudos sobre a preparação do sôro antiloxoscélico.* São Paulo, 1961. Tese para docência livre da Cadeira de Microbiologia, do Curso de Odontologia - Faculdade de Farmácia e Odontologia, Universidade de São Paulo.
44. FURLANETTO, R.S., BUCHERL, W., ROSA, R.R., SALIBA, F., NAVAS, J. Observação dos efeitos do veneno loxoscélico e avaliação de sua atividade. **Ciência e Cultura** 1962; 14:254 (Abstract)
45. FUTREL, JM; MORGAN, BB; MORGAN, PN: An in vitro model for studying hemolysis associated with venom from the brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*). **Toxicon** 1979; 17:355-362.
46. FUTRELL, JM. Loxoscelism. **Am. J. Med. Sci.** 1992; 304:261-267.
47. FUTURO-NETO, H.A.; COSTA, P.G.; AMORIM, S.C.; SARAIVA, F.R.; RIBEIRO, C.A.A.; PIRES, J.G.P. Evidence of sex related differences in the effects of calcium channel blockers on neuroleptic-induced catalepsy in mice. **Prog. Neuro-Psychopharmacol & Biol. Psychiat.** 1999; 23:301-316.
48. GAJARDO-TOBAR, R. R. Minha experiência sobre loxoscelismo. **Mem. Inst. Butantan.** 1966; 33:689-698.
49. 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 (*Loxosceles reclusa*). **Toxicon**, 1990; 28:1303-1315.
50. GEREN, C.R.; CHAN, T.K.; HOWELL, D.E.; ODELL, G.V. Isolation and characterization of toxins from brown recluse spider venom (*Loxosceles reclusa*). **Arch. Biochem. Biophys.** 1976; 174:90-99.

51. GERTSCH, W.J.; ENNIK, F. The spider genus *Loxosceles* in North America, central America and West Indies (Aranae, Loxoscelidae). **Bull. Am. Mus. Nat. Hist.** 1983; 175:264-360.
52. GOWDA, D.C., JACKSON, C.M., HENSLEY, P., DAVIDSON, E.A. Factor-X-activating glycoprotein of Russell's viper venom. Polypeptide composition and characterization of the carbohydrate moieties. **J. Biol. Chem.** 1994; 269:10644-10650.
53. GOWDA, D.C., JACKSON, C.M., KURZBAN, G.P., MCPHIE, P., DAVIDSON, E.A. Core sugar residues of the N-linked oligosaccharides of Russell's viper venom factor X-activator maintain functionally active polypeptide structure. **Biochemistry** 1996; 35:5833-5837.
54. GRISHIN, E. Polipeptide neurotoxins from spider venoms. **Eur. J. Biochem.** 1999; 264:276-280
55. HART, G.W. Glycosylation. **Curr. Opin. Cell. Biol.** 1992; 4:1017-1023.
56. HEREDIA, V., ARBAIZA, E., VENEGAS, J., YARLEQUÉ, A., e ZAVALETA, A. Aportes al estudio de las acciones proteolítica, procoagulante y caracterización electroforética de las proteínas de dos extractos tóxicos de veneno de *Loxosceles laeta*. **Bol. Chil. Parasitol.** 1989; 44: 8-16.
57. HITE, J.M. GLADNEY, W.J., LANCASTER, J.L., WHITCOMB, W.H. Biology of the brown recluse spider. **Ark. Agri. Exp. Sta. Bull.** 1960; 711:26.
58. HITE, L.A.; SHANNON, J.D.; BJARNASON, J.B.; FOX, J.W. Sequence of a cDNA clone encoding the zinc metalloprotease haemorrhagic toxin from *Crotalus atrox*. Evidence for a signal, zymogen and disintegrin like structures. **Biochemistry** 1992; 31:6203-6211.
59. 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.** 1994; 308:182-191.

60. HOLTZ, G.G., HABENER, J.F. Black widow α -latrotoxin: a presynaptic neurotoxin that shares structural homology with the glucagon-like peptide-1 family of insuline secretagogic hormones. **Comp.Biochem.Physiol.** 1998; 121:177-184
61. JUNQUA, C.; VACHON, M. Les arachnides et leurs venin. **Acad. R. Sci. d'Outre-Mer.**, Bruxelles, v. 17, p. 1-36, 1968.
62. KING, LE; REES, RS. Treatment of brown recluse spider bites. **J. Am. Acad. Dermatol.** 14:691-692, 1986.
63. KORNFELD, R.; KORNFELD, S. Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. **Ann. Rev. Biochem.** 1985; 54:631-664.
64. 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 *Loxosceles reclusa*. **Biochem. Biophys. Acta** 1981; 678:467-476.
65. LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. **Nature** 1970; 227:680-685.
66. LOCHNIT, G.; GEYER, R. Carbohydrate structure analysis of batroxobin a thrombin-like serine protease from *Bothrops moojeni* venom. **Eur J Biochem** 1995; 228:805-816.
67. LOPES-FERREIRA, M; NUÑEZ, J; RUCAVADO, A; FARSKY, S.H.P; LOMONTE, B; ÂNGULO, Y; DA SILVA, A.M.M; GUTIERREZ, J.M. Skeletal muscle necrosis and regeneration after injection of *Thalassophryne nattereri* (niquim) fish venom in mice. **Int. J. Exp. Path.** 2001; 82:55-64
68. LUCAS, S. Spiders in Brazil. **Toxicon** 1988; 26:759-772.
69. LUNG, J.M.; MALLORY, S.B. A child with spider bite and glomerulonephritis: a diagnostic challenge. **Int. J. Dermatol.** 2000; 39:287-289.
70. MACHADO, J.C.; CARDOSO, J.L.C.; DONOSO, N. de. Lesões Necrótico-degenerativas das glândulas sudoríparas como componente peculiar das lesões cutâneas histopatológicas observadas em casos de loxoscelismo humano acidental. **Mem. Inst. Butantan** 1978/79; 42/43:21-26.

71. MARTIN, G.R.; TIMPL, R. Laminin and other basement membrane components. **Annu. Rev. Cell. Biol.** 1987; 3:57-85.
72. MARTINEZ-VARGAS, A.Z. Loxoscelismo, um problema de salud en el Perú. **Bol. San. Panam.** 1987; 103:378-386,.
73. MATINO, O. A. *et al.* Emponzoñamiento humano provocado por venenos de origem animal. **Arch. Argent. Dermat.** , T XXXI, 1981; p. 41-47.
74. MEREDITH, J.E. Jr.; FAZELI, B.; SCHWARTZ, M.A. The extracellular matrix as a cell survival factor. **Mol. Biol. Cell.** 1993; 4:953-961.
75. MINTON, S.A. Venom diseases. **Charles C Thomas Publishing** 1974.
76. MIYATA, T., TAKEIA, H., OZEKI, Y., ARAKAWA, M., TOKUNAGA, F., IWANAGA, S., SATOH, T.O. Primary structure of hemorrhagic protein, HR2a, isolated from the venom of *Trimeresurus flavoviridis*. **J. Biochem.** 1989; 105:847-853.
77. 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** 2002; 40:409-418.
78. MORÁN, O., ZAVALETA, A., CASTRO DE LA MATA, R. Efectos hematológicos del veneno de *Loxosceles laeta* em ratones albinos. **Bol. Chile Parasit.** 1981; 36: 20-23.
79. NIKAI, T. OHARA, A., KOMORI, Y., FOX, J.W. SUGIHARA, H. Primary structure of a coagulant enzyme, bilineobin, from *Agkistrodon bilineatus* venom. **Arch. Biochem. Biophys.** 1995; 318:89-96.
80. NORMENT, B.R., FOIL, L.D. Histopathology and physiological action of venom from brown recluse spider *Loxosceles reclusa*. **Toxicon** 1979; 17(1): 131.
81. OLIVEIRA, K.C., ANDRADE, R.M.G., GIUSTI, A.L. SILVA, W.D., TAMBOURGI, D.V. Sex-linked variation of *Loxosceles intermedia* spider venoms. **Toxicon** 1999; 37:217-221

82. OSPEDAL, K.Z., APPEL, M.H., FILLUS, J., MANGILI, O.C., VEIGA.S.S., GREMSKI, W. Histopathological findings in rabbit after experimental acute exposure to the *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. 2002; *Submitted*.
83. PAINE, M.J.I. *et al.* Purification, cloning, and molecular characterization of a high molecular weight hemorrhagic metalloprotease, jararhagin, from *Bothrops jararaca* venom. **J. Biol. Chem.** 1992; 267:22869-22876.
84. PATEL, K.D., MODUR, V., ZIMMERMAN, G.A., PRESCOTT, S.M., MCINTYRE, T.M. The necrotic venom of brown recluse spider induces dysregulated endothelial cell-dependent neutrophil activation. **J. Clin. Invest.** 1994; 94: 631-642.
85. PIZZI, T.; ZACARIAS, J.; SCHENONE, E. H. Estudio histopatológico experimental en el envenenamiento por *Loxosceles laeta*. **Pathologica** 1957; 23:33.
86. PLATINICK, N.I. Advances in spider taxonomy 1988-1991. **The New York Entomological Society**, 1993, New York.
87. RASH, L.D., HODGSON, W.C. Pharmacology and biochemistry of spider venoms. **Toxicon** 2002; 40:225-254.
88. REES, RS; NANNEY, LB; YATES, RA; KING, LE. Interaction of brown recluse spider venom on cell membranes: The inciting mechanism? **J. Invest. Dermatol.** 83:270-275, 1984.
89. REES, RS; FIELDS, JP; KING, LE. Do brown recluse spider bites induce pyoderma gangrenosum? **South Med. J.** 78:283-287, 1985.
90. REES, RS; GATES, C; TIMONS, S; DES-PRES, RM; KING, LE Jr. Plasma components are required for platelet activation by the toxin of *Loxosceles reclusa*. **Toxicon** 1988; 26:1035-1046.
91. REESE, AM. The anatomy of the venom glands in the black widow spider, *Latrodectus mactans*. **Trans. Am. Micr. Soc.** 1944; 63:170.

92. REKOW, MA; CIVELLO, DJ; GEREN, CR. Enzymatic and hemolytic properties of brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*) toxin and extracts of venom apparatus, cephalothorax and abdomen. **Toxicon** 1983; 21:441-444.
93. RIBEIRO, L.A., EICKSTEDT, V.R.D., RÚBIO, G.B.G., KONALSAISEN, J.F., HANDAR, Z., ENTRES, M., CAMPOS, V.A.F.P., JORGE, M.T. Epidemiologia do acidente por aranhas do gênero *Loxosceles* no Estado do Paraná (Brasil). **Mem. Inst. Butantan** 1993; 55:19-26.
94. RODRIGUES, CJH; PARAS, ZMS; NOBREGA, MM; TORRES, JB. Acidentes com aracnídeos. **Revista HCPA** 1986; 6(2):91-96.
95. RUOSLATHI, E. Fibronectin and its receptors. **Ann. Rev. Biochem.** 1988. 57:375-413.
96. RUPPERT, E.E.; BARNES, R.D. **Zoologia dos invertebrados**. Ed. Roca, São Paulo, 6ª ed., 1996.
97. SAMMONS, D.W., ADAMS, L.D., NISHIZAWA, E.E. Ultrasensitive silver-based color staining of polypeptides in polyacrylamide gels. **Electrophoresis** 1981; 2(3):135-141.
98. SANCHEZ, E.F.; DINIZ, C.R.; RICHARDSON, M. The complete amino acid sequence of the haemorrhagic factor LHFII, a metalloproteinase isolated from the venom of the bushmaster snake (*Lachesis muta muta*). **FEBS Lett.** 1991; 282:178-182.
99. SAVEL-NEIMANN, A. Tarantula (*Eurypelma californicum*) venom, a multicomponent system. **Hoppe-seyler Biol. Chem.** 1989; 370:485-498.
100. SCHÄGGER, H.; JAGOW, G.V. Tricine-sodium dodecil-sulfate-polyacrylamide gel eletrophoresis for separation of proteins in range from 1 to 100 kDa. **Anal. Biochem.** 1987; 166:368-379.
101. SCHANBACHER, F.L., LEE, C.K., HALL, J.E., WILSON, I.B., HOWELL, D.E. ODELL, G.V. Compositon and properties of tarantula *Dugesiella hentzi* (Girard) venom. **Toxicon** 1973; 11:21-29.

102. SCHENONE, H.; LETONJA, T. Notas sobre la biología y distribución geográfica de las arañas del género *Loxosceles*. **Bol. Chil. Parasitol.** 1975; 30:27-29.
103. SCHENONE, H. SUAREZ, G. **Venom of scytodidae, genus Loxosceles**. In Betini, S. Arthropod venoms, New York, 1978; 48:245-247.
104. SCHENONE, H. *et al.* Loxoscelismo en Chile. Estudios epidemiológicos, clínicos y experimentales. **Rev. Inst. Med. Trop.** 1989; 31(6):403-415.
105. SCHWARTZ L.M., OSBORNE, B. A. **Cell Death**. San Diego: Academic Press, 1995; 46:254.
106. SEZERINO, UM; ZANNIN, M; COELHO, LK. A clinical and epidemiological study of *Loxosceles* spider envenoming in Santa Catarina, Brasil. **Trans. R. Soc. Trop. Méd. Hyg.** 1998;92:546.
107. SILVA, X.M. *et al.* Emprego da ex-sanguíneo transfusão em acidente loxoscélico humano grave. **Inst. Med. Tropical de São Paulo** 1988; 4:259-263.
108. SMITH, W.C.; MICKS, W.D. The role of polymorphonuclear leukocytes in the lesion caused by the venom of the brown spider, *Loxosceles reclusa*. **Lab. Invest.** 1970; 22:90-93.
109. SUAREZ, G.; BIGGERMANN, U.; SCHENONE, H. Estudios bioquímicos del veneno de *Loxosceles laeta* y sus mecanismos de acción. **Bol. Chil. Parasitol.**, Chiba. 1971; 26:60-62.
110. SOERENSEN, B. **Acidentes por animais peçonhentos: reconhecimento, clínica e tratamento**. Editora Atheneu, 1996.
111. TAKEYA, H., ARAKAWA, M., MIYATA, T., IWANAGA, S., OMORI-SATOH, T. Primary structure of H₂-proteinase, a non-haemorrhagic metalloproteinase, isolated from venom of the Habu snake, *Trimeresurus flavoviridis*. **J. Biochem.** 1989; 106:151-157.
112. TAKEYA, H., ODA, K., MIYATA, T., OMORI-SATOH, T., IWANAGA, S. The complete amino acid sequence of the high molecular mass hemorrhagic protein

- HR1B isolated from the venom of *Trimeresurus flavoviridis*. **J. Biol. Chem.** 1990; 265:16068-16073.
113. TAMBOURGI, D.V.; MAGNOLI, F.C.; EICKSTEDT, V.R.D.; BENEDETTI, Z.C.; PETRICEVICH, V.L.; SILVA, W.D. Incorporation of a 35-kilodalton purified protein from *Loxosceles intermedia* spider venom transforms human erythrocytes into activators of autologous complement alternative pathway. **J. Immunol.** 1995; 155:4459-4466.
114. TAMBOURGI, D.V.; MORGAN, B.P.; de ANDRADE R.M.G.; MAGNOLI, F.C.; van den GERG, C.W. *Loxosceles intermedia* spider envenomation induces activation of an endogenous metalloproteinase, resulting in cleavage of glycoporphins from the erythrocyte surface and facilitating complement-mediated lysis. **Blood** 2000; 95: 683-691.
115. TIMPL, R.; PAULSSON, M.; DZIADEK, M.; FUJIWARA, S. Basement membranes. **Meth. Enzymol.** 1987; 145:363-391.
116. TIMPL, R. Macromolecular organization of basement membranes. **Curr. Opin. Cell. Biol.** 1996; 8:618-624.
117. TOKI, T.; YASUHARA, T.; ARAMAKI, Y.; HASHIMOTO, Y.; SHUDO, K.; KAWAI, N.; NAKAJIMA, T. Molecular structures of spider toxins (JSTX-1,2,3, and 4) in the venom of *Nephila clavata* L. Koch. **Jpn. J. Sanit. Zool.** 1990; 41:9-14.
118. TOWBIN, H.; STAHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedures and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 1979; 76:4350-4354
119. TRYGVASSON, K. The laminin family. **Curr. Opin. Cell Biol.** 1993; 5:877-882.
120. VEIGA, S.S.; CHAMMAS, R.; CELLA, N.; BRENTANI, R.R. Glycosylation of β_1 integrins in B16-F10 melanoma cells as determinant of differential binding and acquisition of biological activity. **Int. J. Cancer.** 1995; 61:420-424.
121. VEIGA, S.S.; ELIAS, M.C.Q.B.; GREMSKI, W.; PORCIONATTO, M.A.; NADER, H.B.; BRENTANI, R.R. Detection of post-translational sulfation of $\alpha_5\beta_1$ integrin

- and its role in integrin-fibronectin binding. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 1996; 1235-1238.
122. VEIGA, S.S.; ELIAS, M.C.Q.B.; GREMSKI, W.; PORCIONATTO, M.A.; SILVA, R.; NADER, H.B.; BRENTANI, R.R. Post-translational modifications of $\alpha_5\beta_1$ integrin by glycosaminoglycan chains. The $\alpha_5\beta_1$ integrin is a facultative proteoglycan. **J. Biol. Chem.** 1997; 272:12529-12535.
123. VEIGA, S.S.; GREMSKI, W.; SANTOS, V.L.P.; FEITOSA, L.; MANGILI, O.C.; NADER, H.B.; DIETRICH, C.P.; BRENTANI, R.R. Oligosaccharide residues of *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom proteins: dependence of glycosylation for dermonecrotic activity. **Toxicon.** 1999; 37:587-607.
124. VEIGA, S.S.; DA SILVEIRA, R.B.; DREYFUSS, J.L.; HAOACH J.; PEREIRA, A.M.; MANGILI, O.C.; GREMSKI W. Identification of high molecular weight serine-proteases in *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. **Toxicon**, 2000a; 38:825-839.
125. VEIGA, S.S.; FEITOSA, L.; SANTOS, V.L.P.; DE SOUZA, G.A.; RIBEIRO, A.S.; MANGILI, O.C.; PORCIONATTO, M.A.; NADER, H.B.; DIETRICH, C.P.; BRENTANI, R.R. and GREMSKI, W. Effect of *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom on basement membrane structures. **Histochem. J.** 2000b; 32:397-408.
126. VEIGA, S.S.; ZANETTI, V.C.; FRANCO, C.R.C.; TRINDADE, E.S.; PORCIONATTO, M.A.; MANGILI, O.C.; GREMSKI, W.; DIETRICH, C.P.; NADER, H.B. In vivo and in vitro cytotoxicity of brown spider venom for blood vessel endothelial cells. **Thomb. Res.** 2001a; 102:229-237.
127. 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.** 2001b; 34:843-850.
128. VELLARD, J. La fonction venimeuse chez les araignées. **Mem. Inst. Butantan, Simp. Internac.** 1966; 33:35-44.

129. YURCHENCO, P.; SCHITTNY, J. Molecular architecture of basement membranes. **FASEB J.** 1990; 4:1577-1590.
130. YURCHENCO, P.D.; O'REAR, J.J. Basal lamina assembly. **Curr. Opin. Cell. Biol.** 1994; 6:674:681.
131. WASSERMAN, G.S.; ANDERSON, P.C. Loxoscelism and arachnidism. **J. Toxicol. Clin. Toxicol.** 1984; 21.p.451-472.
132. WELSH, J.H.; BATTY, C.S. 5-hydroxytryptamine content of some arthropod venoms and venom-containing parts. **Toxicon.** 1963; 1:165-173.
133. WILLIAMS, W.J.; BEUTLER, E.; ERSLEV, A.J.; LICHTMAM, M.A. **Hematology.** 3rd Edition, NY, 1983.
134. WRAY, W.; BOULIKAS, T.; WRAY, V.P.; HANCOCK, R. Silver staining of proteins on polyacrylamide gels. **Anal. Biochem.** 1981; 118;197-203.
135. WRIGHT, R.P.; ELGERT, K.; CAMPBELL, B.J.; BARRET, J.T. Hyaluronidase and esterase activities of the venom of the poisonous brown recluse spider. **Arch. Biochem. Biophysiol.** 1973; 159:415-426.
136. 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 fibrinogelysis triggered by brown spider venom. **Blood Coag. Fibrinol.** 2002; 13:1-14.