

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:  
FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

**Caracterizações farmacológicas e bioquímicas  
de peçonhas de aranhas dos gêneros  
*Lasiodora* e *Loxosceles***

Carolina Campolina Rebello Horta

Belo Horizonte  
2012

Carolina Campolina Rebello Horta

**Caracterizações farmacológicas e bioquímicas  
de peçonhas de aranhas dos gêneros  
*Lasiodora e Loxosceles***

Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor.

**Orientador:** Prof. Dr. Evanguedes Kalapothakis

Belo Horizonte  
Universidade Federal de Minas Gerais  
Instituto de Ciências Biológicas  
2012

Dedico este trabalho aos meus pais,  
Martinho e Maria Carolina

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador Evanguedes Kalapothakis, pela oportunidade de fazer parte de sua equipe, pela confiança em mim e em meu trabalho e pelos valiosos ensinamentos durante dez anos de convivência que determinaram a minha formação.

À professora Virgínia Soares Lemos, pela colaboração e agradável recepção de sempre em seu laboratório.

Ao professor e irmão querido Martinho Campolina Rebello Horta, pela oportunidade de finalmente trabalharmos juntos e pelo apoio imprescindível nas análises histológicas.

Aos professores que auxiliaram nas cromatografias, Carlos Salas Bravo e Eliane Candiani Arantes. Aos professores colaboradores Carlos Chávez-Olórtegui, Luciana Moro, Luiz Renato de França e Rodrigo Lopes Ferreira.

Ao professor Dušan Uhrín, pelo gentil acolhimento em seu laboratório.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia, aos atuais coordenadores professores Adelina Martha dos Reis e Christopher Kushmerick, aos ex-coordenadores Frederic Jean Georges Frezard e Maria José Campagnole-Santos e às secretárias Cinthya e Nilda, pelo apoio.

Às agências de fomento Capes e CNPq, pelo recurso financeiro.

Aos professores membros da banca de qualificação, Christopher Kushmerick, Carlos Salas Bravo e Jorge Luiz Pesquero, pelo auxílio nas discussões.

Aos professores membros da banca examinadora, Olga Meiri Chaim, Ieso de Miranda Castro, Maria Elena de Lima Perez Garcia e Christopher Kushmerick, pela atenção.

À Dra. Kátia Cristina Barbaro Nogueira, do Instituto Butantan, pela gentileza e disponibilidade para leitura do trabalho.

Aos queridos colegas do Laboratório de Biotecnologia e Marcadores Moleculares (LBMM): Ana Paula, Anderson, Antônia, Bárbara, Bárbara Bruna, Camila, Daniel, Érika, Flávia, Isabella, Marcelle, Susanne e Tatiana, pelo apoio, amizade, convivência sempre agradável e trabalho em equipe.

À Bárbara Bruna, meu braço direito, por toda ajuda, dedicação e amizade valiosas e fundamentais.

Aos colegas que fizeram parte do LBMM, que já seguiram seus caminhos e deixaram saudades: Ana Luiza, Andréa, Arthur, Cibele, Egiancarla, Érika, Fabíola, Flávia, Gabriel, Higgor, Lorryne, Lucilânia, Maria, Simone, Valéria, William. À Alessandra e à Thais, pelos ensinamentos.

À equipe dos Laboratórios de Fisiologia e Farmacologia Cardiovascular: em especial Betinha, Grazielle, José Felipe, Josiane, Rodrigo e Prof. Luciano, pela ajuda e coleguismo. Ao Bruno Rezende, pela amizade e apoio de sempre.

Aos colegas do Laboratório de Imunoquímica de Proteínas, em especial Camila, Clara, Gabriela, Ricardo, Stephanie, Thais e Profa. Liza.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Celular, Guilherme, Mariana, Paulo e Samyra.

À equipe do Laboratório de Patologia Bucal da PUC-Minas, Andrea, Camila e Maria Reni.

Aos colegas dos Laboratórios de Biologia Molecular de Produtos Naturais e de Substâncias Antitumorais, especialmente Ana Cândida, Dalton, Fábio, Fernanda, Kátia, Luciana e Marco Túlio.

À Vanessa Gregório, da Química Orgânica, pelo auxílio com os espectros.

À minha querida irmã Juliana, pela revisão do trabalho.

Aos profissionais dos Departamentos de Biologia Geral, Fisiologia e Biofísica e de Farmacologia, pelo suporte técnico e pela convivência. À Dona Nailda, que proporciona um prazeroso espaço de convívio na Biologia Geral.

Aos meus pais Martinho e Naná, com quem compartilho minhas conquistas. À minha querida sobrinha Daniela e aos meus irmãos Martinho, Vanessa e Juliana, pelo amor que nos une. Aos meus cunhados Flávia e Filipe, pelo carinho e amizade. À Maria, pelo cuidado e atenção.

À psicanalista Maria Cristina Martins Moura, pela escuta cuidadosa e pela atenção e delicadeza em nossas conversas, que tanto me ajudaram durante esses anos.

Aos amigos e colegas do curso de Farmácia e da Pós-graduação. Aos queridos amigos Andréa, Bruno, Chico, Denise, Didi, Fabiano, Júlia, Luciana, Marcinha, Mário, Marrege, Mônica de Souza, Mônica Rahme, Mundim, Paula e Virgínia, pela força.

Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro das seguintes instituições:

- ❖ Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), com destaque ao Edital Toxinologia 63/2010;
- ❖ Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), com destaque ao Edital MCT/CNPq 14/2009 - Universal;
- ❖ Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

“Não têm real interesse por uma ciência aqueles que começam a se entusiasmar por ela somente depois que nela fazem descobertas.”

Friedrich Nietzsche



## RESUMO

As peçonhas de aranhas são constituídas de uma mistura complexa de substâncias. As pesquisas com peçonhas de aranhas investigam os mecanismos do envenenamento, novas estratégias terapêuticas e o imenso potencial farmacológico dos componentes das peçonhas. No presente trabalho, serão apresentados estudos realizados com as peçonhas de duas aranhas distintas: *Loxosceles similis*, pertencente à subordem Araneomorphae, e *Lasiadora* sp., pertencente à subordem Mygalomorphae. O trabalho é dividido em dois capítulos, para melhor entendimento.

### CAPÍTULO 1

As aranhas do gênero *Loxosceles* podem provocar envenenamentos graves em humanos, descritos como loxoscelismo. O loxoscelismo cutâneo caracteriza-se por dermonecrose, que pode levar semanas para cicatrizar. O loxoscelismo sistêmico é uma complicação mais rara que pode levar a vítima a óbito por falência renal aguda. Recentemente, descobriu-se que a espécie *L. similis*, até então pouco estudada, é amplamente encontrada em ambientes antrópicos, principalmente no estado de Minas Gerais. As primeiras caracterizações dessa peçonha mostraram que possui efeitos biológicos similares às peçonhas de aranhas *Loxosceles* de importância médica no Brasil. O objetivo geral do primeiro capítulo deste trabalho foi caracterizar o soro específico anti-*L. similis* e avaliar a participação do LPA nos efeitos da peçonha de *L. similis* e de uma proteína dermonecrótica de *L. intermedia* (reLiD1). Análises histológicas de pele de coelho após 2, 4 e 8 horas da injeção intradérmica de peçonha de *L. similis* (3 µg) mostraram denso infiltrado inflamatório, edema, degeneração e necrose musculares, dissociação de fibras colágenas e reticulares. A pré-incubação da peçonha com o soro anti-*L. similis* reduziu de forma significativa todos esses efeitos. O principal componente tóxico da peçonha de *Loxosceles* possui atividade de fosfolipase D (PLD) e atua sobre vários alvos lipídicos. Há um interesse atual em investigar o papel do ácido lisofosfatídico (LPA) no loxoscelismo. O LPA é um dos produtos da ação enzimática de PLD, e sabe-se que o LPA induz agregação plaquetária, hiperpermeabilidade endotelial e respostas pró-inflamatórias. Os tratamentos de fibroblastos humanos HFF-1 com peçonha de *L. similis* ou reLiD1 (10 µg/mL, ambas pré-incubadas com o precursor de LPA lisofosfatidilcolina) promovem liberação das citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias IL-6, IL-8, CXCL1 e CXCL2 após 12 horas, bem como morte celular por apoptose após 48 horas de incubação. O co-tratamento das células com Ki16425 (15 µM), que é um antagonista de receptores para LPA (LPA<sub>1</sub>/LPA<sub>3</sub>), reduziu significativamente a produção de mediadores inflamatórios, porém não alterou os efeitos apoptóticos da peçonha e da reLiD1. Em células endoteliais humanas HUVEC, o Ki16425 também não reduziu a apoptose causada pela peçonha e pela reLiD1 após 48 horas de incubação. Com isso, o presente trabalho mostrou, pela primeira vez, que o LPA formado por ação enzimática de PLD da peçonha de *L. similis* e da reLiD1 exerce papel na liberação de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias em fibroblastos humanos. No entanto, pelo menos *in vitro* e nas condições experimentais aplicadas, os receptores para LPA não participam da morte celular promovida por esses agentes em HFF-1 e HUVEC.

## CAPÍTULO 2

As aranhas do gênero *Lasiadora* são amplamente distribuídas no Brasil, onde são conhecidas vulgarmente como caranguejeiras. A peçonha de *Lasiadora* sp. é pouco tóxica a humanos. Os acidentes causam apenas dor, edema e eritema no local da picada. No entanto, essa peçonha pode ser fonte de ferramentas farmacológicas importantes. Nosso grupo de pesquisa descreveu previamente os efeitos cardiovasculares da peçonha de *Lasiadora* sp. Em ratos, a peçonha promove hipotensão e bradicardia agudas, diminuição da frequência cardíaca em coração isolado, vasodilatação dependente de óxido nítrico (NO) e ativação da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) em anéis de aorta. O objetivo geral do segundo capítulo deste trabalho foi isolar e caracterizar um ou mais componentes vasodilatadores a partir da peçonha bruta da aranha *Lasiadora* sp. Utilizando-se técnicas de fracionamento da peçonha em combinação com ensaios biológicos em aorta de rato, uma fração vasoativa foi isolada. Ensaios de espectrometria de massas e ressonância magnética nuclear identificaram dois compostos na fração: adenosina difosfato (ADP, 88%) e adenosina monofosfato (AMP, 12%). Sabe-se que o ADP, assim como a peçonha bruta, causa hipotensão, vasodilatação dependente de NO e ativação de eNOS. Constatamos que a peçonha de *Lasiadora* sp. contém ADP em quantidade suficiente para causar relaxamento em anéis de aorta de rato. Os efeitos vasodilatadores da peçonha total e do ADP foram inibidos significativamente por suramina, que é antagonista de receptores purinérgicos P2. Os resultados do presente trabalho indicam que o ADP é um importante componente vasodilatador da peçonha da aranha *Lasiadora* sp.

## ABSTRACT

Spider venoms are complex mixtures of substances. Research into spider venoms investigates the mechanisms underlying envenomation, new therapeutic strategies and the huge pharmacological potential of the venom components. The present work studied the venoms of two distinct spiders: the Araneomorphae spider *Loxosceles similis* and the Mygalomorphae spider *Lasiadora* sp. In order to provide a better understanding of the study, this manuscript is divided into two chapters.

### CHAPTER 1

Members of the spider genus *Loxosceles* can cause severe envenomation in humans, described as loxoscelism. Cutaneous loxoscelism is characterized by dermonecrosis which can require weeks to heal. Systemic loxoscelism is a rare complication marked by acute renal failure that leads to death in a few cases. Recently, the poorly studied *L. similis* species has been found in anthropic environments, mainly in the State of Minas Gerais. The first characterizations of the venom from this species showed that its main biological effects had a similar intensity to other medically important *Loxosceles* species. The aim of the first chapter of the present work was to characterize the specific anti-*L. similis*-venom serum and to evaluate the participation of LPA in the effects of both *L. similis* venom and *L. intermedia* dermonecrotic protein (recLiD1). Histological analysis of rabbit skin 2, 4 and 8 hours after intradermal injection of *L. similis* venom (3 µg) showed a dense inflammatory infiltrate, edema, muscle degeneration and necrosis, dissociation of collagen and reticular fibers. Pre-incubation of the venom with anti-*L. similis*-venom serum significantly decreased all of these effects. The main toxic component of *Loxosceles* spider venom presents phospholipase D (PLD) activity towards many lipid targets. There is current interest in investigating the role of lysophosphatidic acid (LPA) in loxoscelism. LPA is one of the products of PLD enzymatic action and it is described to induce platelet aggregation, endothelial hyperpermeability and pro-inflammatory responses. Treatment of HFF-1 human fibroblast cells with *L. similis* venom or recLiD1 (10 µg/mL, both pre-incubated with lysophosphatidylcholine, a precursor for LPA formation) provokes the release of pro-inflammatory cytokines and chemokines IL-6, IL-8, CXCL1, CXCL2 after 12 hours, as well as cell death by apoptosis after 48 hours of incubation. The concomitant treatment of the cells with Ki16425 (15 µM), an antagonist of LPA receptors (LPA<sub>1</sub>/LPA<sub>3</sub>), significantly decreased the production of inflammatory mediators; however, it did not reduce the apoptotic effects of venom and recLiD1. On HUVEC human endothelial cells, Ki16425 did not reduce apoptosis caused by venom and recLiD1 after 48 hours of incubation either. Thus the present work has showed for the first time that LPA formed by PLD-dependent enzymatic activity of *L. similis* venom and recLiD1 has an important role in the release of pro-inflammatory cytokines and chemokines from human fibroblasts. Nevertheless, LPA receptors do not participate in HFF-1 and HUVEC cell death caused by these agents, at least *in vitro* and under our experimental conditions.

## CHAPTER 2

Members of the spider genus *Lasiadora* are widely distributed in Brazil, where they are commonly known as *caranguejeiras*. *Lasiadora* sp. spider venom is slightly toxic to humans. The bite of this spider causes local pain, edema and erythema. However, *Lasiadora* venom may be a source of important pharmacological tools. Our research group has previously described the cardiovascular effects of *Lasiadora* sp. venom. In rats, this venom produces acute hypotension and bradycardia, decreased heart rate in the isolated heart, nitric oxide (NO)-dependent vasodilation and activation of endothelial nitric oxide synthase enzyme (eNOS) in aortic rings. The aim of the second chapter of the present work was to isolate and characterize one or more vasodilator components from *Lasiadora* sp. crude venom. We isolated one vasoactive fraction using fractionation techniques combined with biological assays in rat aorta. Mass spectrometry and nuclear magnetic resonance assays identified that the fraction is a mixture of two compounds: adenosine diphosphate (ADP, 88%) and adenosine monophosphate (AMP, 12%). It is known that ADP, as well as the crude venom, causes hypotension, NO-dependent vasodilation and eNOS activation. We determined that *Lasiadora* sp. venom contains enough amount of ADP to cause relaxation in rat aortic rings. The vasodilator effects of ADP and *Lasiadora* crude venom were significantly inhibited by suramin, which is a P2-purinergic receptors antagonist. The results of the present work indicate that ADP is an important vasodilator component of *Lasiadora* sp. spider venom.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: A aranha <i>Loxosceles</i> .....	8
Figura 2: Distribuição geográfica dos gêneros <i>Loxosceles</i> e <i>Sicarius</i> , ambos da família Sicariidae .....	9
Figura 3: Progressão do loxoscelismo cutâneo.....	12
Figura 4: Mecanismos de ação propostos para a peçonha de aranha <i>Loxosceles</i> e respectivos componentes.....	30
Figura 5: Reatividade do soro anti- <i>L.similis</i> contra as peçonhas de <i>L. similis</i> , <i>L. intermedia</i> , <i>L. gaucho</i> e <i>L. laeta</i> . .....	51
Figura 6: Análise em microscopia de luz de cortes de pele de coelho corados com Tricrômio de Masson (aumento de 200X).....	52
Figura 7: Análise em microscopia de luz de cortes de pele de coelho corados com Hematoxilina-Eosina (aumento de 400X). .....	53
Figura 8: Contagem de células inflamatórias por campo em lâminas de cortes de pele de coelho 2, 4 e 8 horas após administração intradérmica de 3 µg da peçonha de <i>L. similis</i> (L.s.) pré-incubada com soro pré-imune ou com soro anti- <i>L. similis</i> .....	54
Figura 9: Análise em microscopia de luz de cortes de pele de coelho corados com Tricrômio de Masson (aumento de 400X).....	55
Figura 10: Análise em microscopia de luz de cortes de pele de coelho corados com Reticulina (aumento de 400X). .....	56
Figura 11: Eletroforese em gel de poliacrilamida a 12,5%. .....	57
Figura 12: Perfil cromatográfico do sobrenadante da lise bacteriana em coluna semi-preparativa C4. ....	58
Figura 13: Perfil cromatográfico da recLiD1 em coluna analítica C18.....	59
Figura 14: Análise de recLiD1 em gel de poliacrilamida e espectrometria de massas.....	60
Figura 15: Atividade dermonecrótica em coelho. ....	61
Figura 16: Viabilidade celular com indicador Alamar Blue. ....	62
Figura 17: Determinação da atividade de fosfolipase D da peçonha de <i>L. similis</i> (L.s.) e da recLiD1 (5 e 10 µg/mL) utilizando-se o kit Amplex® Red Phospholipase D Assay (Life Technologies Corporation, USA). .....	63

Figura 18: Dosagens em pg/mL das citocinas/quimiocinas IL-6 (A), IL-8 (B), CXCL1 (C) e CXCL2 (D) após incubação de células HFF-1 por 12 horas com peçonha de <i>L. similis</i> (L.s. 10 µg/mL) ou recLiD1 (10 µg/mL), ambas pré-incubadas com lisofosfatidilcolina (LPC 10 µM, com 5 mg/mL de albumina livre de ácidos graxos) por 1 hora a 37°C, com ou sem Ki16425 15 µM. ....	65
Figura 19: Morte celular de HFF-1 por apoptose e necrose.....	67
Figura 20: Morte celular de HUVEC por apoptose e necrose. ....	69
Figura 21: A aranha <i>Lasiadora</i> sp. ....	92
Figura 22: Esquema representativo da liberação de fatores relaxantes das células endoteliais e respectivos efeitos em células musculares lisas.....	100
Figura 23: Esquema de filtração seriada da peçonha bruta da aranha <i>Lasiadora</i> sp. ....	106
Figura 24: (A) Conexão do anel de aorta às hastes metálicas e o acoplamento dessas a transdutores isométricos. (B) Sistema de banho de órgãos utilizado para experimentos de reatividade vascular no Laboratório de Fisiologia Cardiovascular do ICB. ....	112
Figura 25: Esquema representativo da curva de relaxamento concentração-resposta cumulativa induzida pela peçonha da aranha <i>Lasiadora</i> sp. em vasos pré-contraídos com fenilefrina (Fen). ....	112
Figura 26: Eletroforese em gel de poliacrilamida a 12,5%. ....	115
Figura 27: Perfil cromatográfico do filtrado do Vivaspin de corte 3 kDa em coluna analítica C18SP.....	116
Figura 28: Efeito relaxante induzido pelo filtrado do Vivaspin de corte 3 kDa (A) e pela fração 2 proveniente de cromatografia em coluna C18SP (B), em diferentes concentrações (1UC a 127UC), em anéis de aorta de rato contendo endotélio funcional. ....	117
Figura 29: Espectro no ultravioleta (200 a 400 nm) da fração 2 proveniente de cromatografia em coluna C18SP.....	117
Figura 30: Perfil cromatográfico da fração 2 em coluna semi-preparativa C18SP.....	118
Figura 31: Espectro de massas ESI-MS, no modo positivo, da fração vasodilatadora, revelando picos de 428, 855 e 1281,8 m/z. ....	119
Figura 32A: Espectro de fragmentação MS/MS do pico de 428 m/z.....	120
Figura 32B: Espectro de fragmentação MS/MS do pico de 855 m/z.....	121

Figura 32C: Espectro de fragmentação MS/MS do pico de 1281,8 m/z.....	122
Figura 33: Estrutura molecular de adenosina trifosfato (ATP), com destaque para a numeração dos átomos, que foi utilizada nos ensaios.....	123
Figura 34: Estruturas moleculares de adenosina monofosfato (AMP) e adenosina difosfato (ADP). Fonte: Qian <i>et al.</i> , 2004. ....	127
Figura 35: Perfil cromatográfico de ADP (A) e AMP (B) em coluna analítica C18.....	128
Figura 36: Perfil cromatográfico da peçonha de <i>Lasiadora</i> sp. em coluna analítica C18 .....	129
Figura 37: Efeito relaxante induzido por (A) peçonha de <i>Lasiadora</i> sp. (0,06 a 64 µg/mL) e (B) ADP (0,001 a 316 µM) em anéis de aorta de rato com endotélio funcional, na presença e na ausência de suramina (100 µM). ....	130
Figura 38: Efeito relaxante induzido pela fração 2 (4 µM) da peçonha da aranha <i>Lasiadora</i> sp. em anéis de aorta de rato, contendo endotélio funcional, na presença e na ausência de suramina 100 µM.....	131

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação taxonômica de aranhas <i>Loxosceles</i> . .....	7
Tabela 2: Atividades enzimáticas de peçonhas de aranhas <i>Loxosceles</i> . .....	19
Tabela 3: Classificação taxonômica de aranhas <i>Lasiadora</i> .....	91
Tabela 4: Intensidades de picos de correlação obtidos no espectro 2D NOESY para ADP. ....	124
Tabela 5: Deslocamentos químicos no espectro RMN de $^1\text{H}$ ( $\delta/\text{ppm}$ ) para os componentes da amostra em diferentes condições de pH. ....	124
Tabela 6: Deslocamentos químicos no espectro RMN de $^{13}\text{C}$ ( $\delta/\text{ppm}$ ) para os componentes da amostra, em diferentes condições de pH, bem como valores descritos na literatura para ADP e AMP. ....	125
Tabela 7: Deslocamentos químicos no espectro RMN de $^{31}\text{P}$ ( $\delta/\text{ppm}$ ) para os componentes da amostra, em diferentes condições de pH. ....	126
Tabela 8: Valores de $\text{EC}_{50}$ e $\text{E}_{\text{máx}}$ para peçonha de <i>Lasiadora</i> sp. e ADP, na presença e na ausência de suramina (100 $\mu\text{M}$ ). .....	130



## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

7-AAD	7-aminoactinomicina D
ACN	Acetonitrila
ADP	Adenosina difosfato
AMP	Adenosina monofosfato
AMPc	Adenosina monofosfato cíclica
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albumina de soro bovino
C4	Clorobutilsilano
C18	Octadecilsilano
C1P	Ceramida 1-fosfato
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
CXCL	Quimiocina C-X-C [ <i>Chemokine (C-X-C motif) ligand</i> ]
$\delta$	Deslocamento químico
Da	Dalton
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
EC <sub>50</sub>	Concentração que produz 50% do efeito máximo da droga
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
E <sub>max</sub>	Efeito máximo da droga
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
EPM	Erro padrão da média
ESI	Fonte de ionização de eletrospray ( <i>Electrospray ionization source</i> )
EST	Etiquetas de sequência expressa ( <i>Expressed Sequence Tags</i> )
GMPc	Guanosina monofosfato cíclica
HE	Hematoxilina-Eosina

HFF-1	<i>Human foreskin fibroblast</i>
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
HUVEC	<i>Human umbilical vein endothelial cell</i>
i.d.	Intradérmica
IL	Interleucina
IPTG	Isopropiltio- $\beta$ -D-galactosida
KDa	KiloDalton
L-NAME	N <sup>G</sup> -nitro-L-arginina metil ester
LPA	Ácido lisofosfatídico
LPC	Lisofosfatidilcolina
MS	Espectrometria de massas
m/z	Relação massa carga
NO	Óxido nítrico
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PBS	Tampão salina fosfato
PLD	Fosfolipase D
PS	Fosfatidilserina
RANTES	<i>Regulated and normal T cell expressed and secreted</i>
recLiD1	<i>Recombinant L. intermedia Dermonecrotic protein 1</i>
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SDS	Dodecil sulfato de sódio
Ser	Serina
SFB	Soro fetal bovino
SMaseD	Esfingomielinase D
TFA	Ácido trifluoroacético
Thr	Treonina

## SUMÁRIO

1. APRESENTAÇÃO .....	2
<b>CAPÍTULO 1</b>	
1. INTRODUÇÃO .....	7
1.1. Aranhas do gênero <i>Loxosceles</i> .....	7
1.2. O Loxoscelismo.....	10
1.2.1. Diagnóstico e tratamento do loxoscelismo.....	13
1.2.2. Antivenenos .....	14
1.3. Peçonhas de aranhas do gênero <i>Loxosceles</i> .....	17
1.3.1. Componentes principais da peçonha.....	17
1.3.2. Esfingomielinase D: aspectos bioquímicos .....	23
1.3.3. Efeitos fisiopatológicos da peçonha e mecanismos moleculares ....	25
1.4. A peçonha da aranha <i>Loxosceles similis</i> .....	31
2. JUSTIFICATIVA .....	34
3. OBJETIVOS .....	34
3.1. Objetivo geral .....	34
3.2. Objetivos específicos .....	34
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	36
4.1. Drogas utilizadas.....	36
4.2. Animais .....	37
4.3. Obtenção da peçonha bruta da aranha <i>L. similis</i> .....	37
4.4. Quantificação de proteínas .....	37
4.5. Caracterização do soro anti- <i>L. similis</i> .....	38
4.5.1. Avaliação de reatividade cruzada imunológica .....	38
4.5.2. Neutralização <i>in vivo</i> : Análises histológicas.....	38
4.6. Caracterização da peçonha de <i>L. similis</i> : participação do LPA nas ações da peçonha de <i>L. similis</i> e da recLiD1 .....	39

4.6.1. Expressão, purificação e caracterização da recLiD1 .....	39
4.6.1.1. Sequenciamento de DNA para confirmação do clone .....	39
4.6.1.2. Transformação do plasmídeo pET11a-LiD1 em <i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) eletrocompetentes .....	40
4.6.1.3. Expressão da LiD1 em <i>E. coli</i> BL21 (DE3) e lise bacteriana .....	41
4.6.1.4. Purificação da recLiD1 .....	41
4.6.1.5. Resolução eletroforética em gel SDS-PAGE .....	42
4.6.1.6. Espectrometria de massas .....	43
4.6.1.7. Atividade dermonecrótica .....	44
4.6.2. Células e cultivo .....	44
4.6.3. Avaliação de viabilidade celular utilizando Alamar Blue® .....	45
4.6.4. Determinação de atividade de fosfolipase D .....	46
4.6.5. Liberação de citocinas e quimiocinas .....	46
4.6.6. Avaliação de morte celular: apoptose e necrose .....	47
4.6.7. Análise estatística .....	49
5. RESULTADOS .....	51
5.1. Caracterização do soro anti- <i>L. similis</i> .....	51
5.1.1. Avaliação de reatividade cruzada imunológica .....	51
5.1.2. Neutralização <i>in vivo</i> : Análises histológicas .....	51
5.2. Caracterização da peçonha de <i>L. similis</i> : participação do LPA nas ações da peçonha de <i>L. similis</i> e da recLiD1 .....	57
5.2.1. Expressão, purificação e caracterização da recLiD1 .....	57
5.2.2. Avaliação de viabilidade celular utilizando Alamar Blue® .....	61
5.2.3. Determinação de atividade de fosfolipase D .....	63
5.2.4. Liberação de citocinas e quimiocinas .....	63
5.2.5. Avaliação de morte celular: apoptose e necrose .....	66
6. DISCUSSÃO .....	71
7. CONCLUSÃO .....	88

## CAPÍTULO 2

1. INTRODUÇÃO .....	91
1.1. Aranhas do gênero <i>Lasiodora</i> .....	91
1.2. Peçonhas de aranhas do gênero <i>Lasiodora</i> .....	93
1.2.1. Efeitos cardiovasculares da peçonha da aranha <i>Lasiodora</i> sp. ....	96
1.3. Participação do endotélio no controle do tônus vascular .....	97
2. JUSTIFICATIVA .....	102
3. OBJETIVOS .....	102
3.1. Objetivo geral .....	102
3.2. Objetivos específicos .....	102
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	104
4.1. Drogas utilizadas.....	104
4.2. Animais .....	104
4.3. Obtenção da peçonha bruta da aranha <i>Lasiodora</i> sp. ....	104
4.4. Quantificação de proteínas .....	105
4.5. Fracionamento da peçonha bruta da aranha <i>Lasiodora</i> sp. e caracterização das frações obtidas.....	105
4.5.1. Filtração por massa molecular .....	105
4.5.2. Resolução eletroforética em gel SDS-PAGE .....	106
4.5.3. Método de coloração pela prata.....	107
4.5.4. Cromatografia de fase reversa e caracterizações das frações .....	107
4.6. Avaliação estrutural do componente isolado.....	108
4.6.1. Espectrometria de massas .....	108
4.6.2. Ressonância magnética nuclear (RMN) .....	109
4.7. Determinação do conteúdo de ADP e AMP na peçonha .....	110
4.8. Procedimentos experimentais em vaso isolado .....	111
4.8.1. Preparação e montagem dos anéis de aorta de rato .....	111

4.8.2. Avaliação de reatividade vascular em anéis de aorta de rato.....	112
4.9. Análise estatística .....	113
5. RESULTADOS .....	115
5.1. Fracionamento da peçonha bruta da aranha <i>Lasiodora</i> sp. e caracterização das frações obtidas.....	115
5.2. Avaliação estrutural do componente isolado.....	118
5.2.1. Espectrometria de massas .....	118
5.2.2. Ressonância magnética nuclear .....	123
5.3. Determinação do conteúdo de ADP e AMP na peçonha .....	127
5.4. Avaliação de reatividade vascular em anéis de aorta de rato .....	129
6. DISCUSSÃO .....	133
7. CONCLUSÃO.....	142
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	144
8.1. Apresentação e Capítulo 1.....	144
8.2. Capítulo 2.....	178
9. ANEXOS .....	192
9.1. Espectros de RMN.....	192
9.2. Artigo publicado .....	192
9.3. Artigo aceito para publicação .....	192

# **Apresentação**

## 1. APRESENTAÇÃO

A classe dos aracnídeos (Arachnida), pertencente ao filo dos artrópodes, apresenta duas ordens de interesse médico, que são a das aranhas (Araneae) e a dos escorpiões (Scorpionidae) (Campolina *et al.*, 2001). As aranhas compõem um grupo primitivo, sendo que o fóssil mais antigo conhecido data de 300 milhões de anos, do período Carbonífero (Rash & Hodgson, 2002). A diversidade biológica e ecológica é imensa: 43244 espécies de aranhas são agrupadas em 3879 gêneros e 111 famílias (Platnick, 2012).

As aranhas têm o corpo dividido em cefalotórax e abdômen e possuem aparelho inoculador de peçonha, chamado de quelícera, na porção anterior do cefalotórax. Os corpos são formados por artículos móveis e exoesqueleto de quitina. A grande maioria das aranhas possui duas glândulas de peçonha (Bücherl, 1972; Lucas, 1988).

Aranhas da subordem Mygalomorphae (Orthognatha), conhecidas como “caranguejeiras”, possuem as quelíceras orientadas paralelamente em relação ao eixo longitudinal do corpo e articulam os ferrões verticalmente (de cima para baixo). Se, ao contrário, a articulação for transversal e a aranha picar horizontalmente (de fora para dentro), trata-se de uma “aranha verdadeira” da subordem Araneomorphae (Labidognatha) (Bücherl, 1972). Muitas espécies não são agressivas e são inofensivas a humanos. As aranhas que podem provocar envenenamentos graves em humanos e até morte pertencem à subordem Araneomorphae, incluindo a armadeira (gênero *Phoneutria*), a viúva negra (gênero *Latrodectus*) e a aranha marrom (gênero *Loxosceles*) (Lucas, 1988; Escoubas *et al.*, 2000; Corzo & Escoubas, 2003).

Esses animais são importantes na natureza e contribuem para a manutenção do equilíbrio ecológico. As aranhas são consideradas relevantes predadores de insetos (Lucas, 1988). Por isso, a finalidade primária da peçonha é paralisar ou matar as presas. Possivelmente, a peçonha também serve como mecanismo de autodefesa contra os predadores. A peçonha constitui um fator fundamental na evolução bem sucedida das aranhas (Rash & Hodgson, 2002; Vassilevski *et al.*, 2009).



As peçonhas de aranhas são misturas complexas. As interações entre as diversas classes químicas presentes nas peçonhas e o papel destas no processo de envenenamento ainda não foram bem definidos. As peçonhas contêm proteínas, componentes de baixa massa molecular, polipeptídeos e acilpoliaminas. Além disso, estão presentes íons, sais, ácidos livres, glicose, aminoácidos, aminas biogênicas e neurotransmissores (Welsh & Batty, 1963; Jackson & Parks, 1989; Odell *et al.*, 1991; Escoubas *et al.*, 2000; Vassilevski *et al.*, 2009).

As três principais classes de componentes são: moléculas orgânicas de baixa massa molecular (massa molecular < 1000 Da), polipeptídeos (massa molecular de 3000 a 10000 Da) e proteínas de alta massa molecular (massa molecular > 10000 Da). A grande maioria das toxinas de aranhas identificadas até o momento consiste em polipeptídeos com massa molecular variando aproximadamente entre 3000 e 8000 Da. Em combinação com poliaminas, que são compostos de baixa massa molecular, os peptídeos representam o principal arsenal tóxico das aranhas. A atividade das toxinas pode ser específica para alguns grupos zoológicos, como vertebrados, insetos e crustáceos (Escoubas *et al.*, 2000; Sollod *et al.*, 2005).

Os alvos principais dos polipeptídeos são os canais iônicos (Kushmerick *et al.*, 1999; De Lima *et al.*, 2002; Corzo & Escoubas, 2003; Belebony *et al.*, 2004). Apesar de a maioria das proteínas e dos peptídeos isolados de peçonhas das aranhas consistir em neurotoxinas, vários peptídeos com novas atividades não-neurotóxicas vêm sendo descobertos (Rash & Hodgson, 2002).

Os componentes das peçonhas animais são produto de um processo evolutivo de milhões de anos. Dessa forma, essas toxinas podem ser utilizadas como ferramentas de investigação dos mecanismos fisiológicos em que atuam e podem servir como instrumento para pesquisa e desenvolvimento de drogas (Rates *et al.*, 2011). Algumas toxinas isoladas de peçonhas já foram aprovadas pelo FDA (*Food and Drug Administration*) como terapêuticas, enquanto outras encontram-se em estágios variados de experimentação clínica como drogas potenciais para inúmeras indicações, incluindo dor e doenças neurológicas e cardiovasculares (Lewis & Garcia, 2003; Bogin, 2005).

No presente trabalho, serão apresentados estudos realizados com as peçonhas de duas aranhas distintas: *Loxosceles similis*, pertencente à subordem Araneomorphae, e *Lasiadora* sp., pertencente à subordem Mygalomorphae.

O trabalho é dividido em dois capítulos, para melhor entendimento, pois serão apresentados estudos distintos. O primeiro, com a peçonha da aranha *Loxosceles similis*, que pode provocar envenenamentos graves em humanos. O objetivo é voltado às caracterizações de soro específico anti-*L. similis* e dos mecanismos de ação da peçonha. Destaca-se que o gênero *Loxosceles* é bem conhecido, porém a espécie *L. similis* é pouco estudada e bastante comum no estado de Minas Gerais. O segundo, com a peçonha da aranha *Lasiadora* sp., inofensiva a seres humanos. Trabalhou-se com fracionamento e isolamento de componente vasodilatador, acompanhado de ensaios biológicos.

# Capítulo 1

Caracterizações da peçonha da aranha  
*Loxosceles similis* e capacidade de neutralização  
do antiveneno específico

# Introdução

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Aranhas do gênero *Loxosceles*

As aranhas do gênero *Loxosceles* pertencem à família Sicariidae, subordem Araneomorphae. Atualmente, há 101 espécies de *Loxosceles* descritas, sendo que mais de 80 são encontradas nas Américas (Platnick, 2012).

São popularmente conhecidas como aranhas marrons, por possuírem essa coloração em tons variados, ou como aranhas-violino, por terem no cefalotórax uma mancha com o formato desse instrumento. Medem, em média, de 2 a 3 cm de perna a perna e têm três pares de olhos (Figura 1) (Futrell, 1992; Hogan *et al.*, 2004).

A tabela abaixo mostra a classificação taxonômica das aranhas do gênero *Loxosceles*:

**Tabela 1:** Classificação taxonômica de aranhas *Loxosceles*.

CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA	
<b>Super reino</b>	Eukaryota
<b>Reino</b>	Metazoa
<b>Filo</b>	Arthropoda
<b>Subfilo</b>	Chelicerata
<b>Classe</b>	Arachnida
<b>Ordem</b>	Araneae
<b>Subordem</b>	Araneomorphae (Labidognatha)
<b>Família</b>	Sicariidae
<b>Gênero</b>	<i>Loxosceles</i> (Heineken & Lowe, 1832)



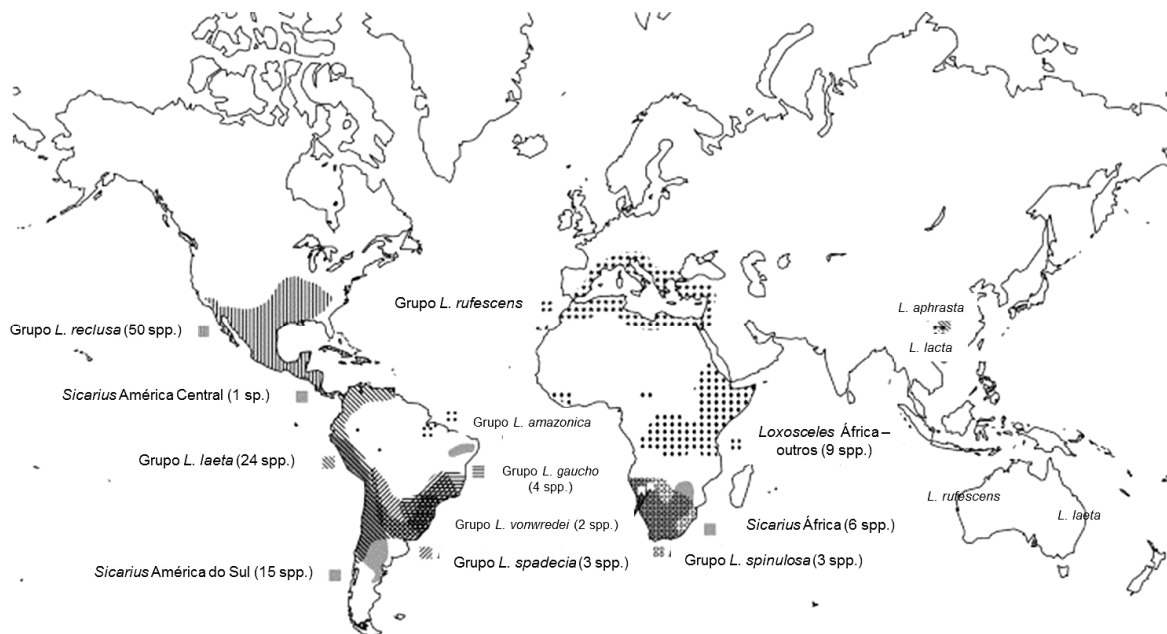
**Figura 1:** A aranha *Loxosceles*. À esquerda, aranha *Loxosceles similis* coletada na Gruta da Lapinha, Lagoa Santa, Minas Gerais (Foto: Anderson do Carmo, arquivo pessoal). À direita, vista anterior da aranha *Loxosceles reclusa*, com destaque à configuração de seis olhos dispostos em três díades (Fonte: Vetter & Visscher, 1998).

As aranhas *Loxosceles* são animais sedentários, não agressivos e com hábitos noturnos. Alimentam-se de pequenos insetos e podem viver de 3 a 7 anos. Sobrevivem muitos dias e até meses com privação de água e alimento. Ocupam uma grande variedade de habitats em ambientes naturais e domésticos. Muitas aranhas vivem embaixo de pedras, troncos ou buracos de árvores, no interior de cavernas, em locais escuros, áridos ou com moderada umidade, onde constroem teias irregulares. As construções humanas também proporcionam habitats favoráveis para essas aranhas, em áreas internas ou externas, como celeiros, viveiros, garagens e galpões de entulhos. No interior de residências, encontram-se embaixo de móveis, quadros e objetos diversos, em quinas de cômodos, em frestas no chão ou na parede e dentro de armários e gavetas (Gertsch, 1967; Galiano & Hall, 1973; Futrell, 1992).

As aranhas marrons estão distribuídas em regiões temperadas e tropicais, principalmente na África e nas Américas, mas também são encontradas na Europa, na Ásia e na Oceania (Gertsch, 1967). Na Austrália, encontra-se a espécie cosmopolita *L. rufescens* (Dufour, 1820) e também *L. laeta* (Nicolet, 1849). Na América do Norte, *L. reclusa* (Gertsch & Mulaik, 1940) e *L. deserta* (Gertsch, 1973) são espécies responsáveis pela maior parte dos

acidentes registrados (Vetter & Bush, 2002; Hogan *et al.*, 2004). No Chile e Peru, destacam-se as espécies *L. gaucho* (Gertsch, 1967) e *L. laeta* (Nicolet, 1849). No Brasil, *L. gaucho* (Gertsch, 1967), *L. laeta* (Nicolet, 1849) e *L. intermedia* (Mello-Leitão, 1934) são os principais agentes etiológicos de acidentes, mas há também *L. adelaida* (Gertsch, 1967), *L. amazonica* (Gertsch, 1967), *L. anomala* (Mello-Leitão, 1917), *L. chapadensis* (Bertani, Fukushima & Nagahama, 2010), *L. hirsuta* (Mello-Leitão, 1931), *L. immodesta* (Mello-Leitão, 1917), *L. puortoi* (Martins, Knysak & Bertani, 2002) e *L. similis* (Moenkhaus, 1898) (Platnick, 2012).

A figura 2 mostra o mapa de distribuição geográfica de aranhas do gênero *Loxosceles* e do gênero-irmão *Sicarius*.



**Figura 2:** Distribuição geográfica dos gêneros *Loxosceles* e *Sicarius*, ambos da família Sicariidae. Os grupos definidos de espécies de *Loxosceles* estão indicados, com o número de espécies entre parênteses. Destaca-se que a espécie *L. intermedia* pertence ao grupo *spadecia* e a espécie *L. similis* faz parte do grupo *gaucho*. Adaptado de Binford *et al.* (2008).

No estado de Minas Gerais, há registro na literatura das espécies *L. similis*, *L. laeta* e *L. anomala* (Gertsch, 1967; Álvares *et al.*, 2004; Machado *et al.*, 2005a). Machado *et al.* (2005a) relataram a presença dessas três espécies na cidade de Belo Horizonte, sendo o primeiro registro confirmado de *L. similis* em residências. Até então, sabia-se que tal espécie é amplamente distribuída

no interior de Minas Gerais e comumente encontrada em grutas nas redondezas de Belo Horizonte (Ferreira *et al.*, 2000, 2005). Andrade *et al.* (2001) capturaram espécimes de *L. similis* na Serra da Bodoquena, Município de Bonito, Estado do Mato Grosso do Sul, nas grutas Pitangueiras e do Lago Azul.

Dessa forma, após registros da presença da aranha *L. similis* em ambientes antrópicos, a caracterização da respectiva peçonha torna-se necessária.

## 1.2. O Loxoscelismo

Os acidentes causados por aranhas do gênero *Loxosceles* provocam sinais clínicos e sintomas característicos denominados loxoscelismo.

Dados preliminares do Ministério da Saúde (2012) mostram que, em 2011, houve 26285 casos de acidentes por aranhas registrados no Brasil. A incidência de acidentes por 100mil habitantes foi de 4,6 na região Norte, 2,0 no Nordeste, 7,5 no Sudeste, 65,2 no Sul e 3,3 no Centro-Oeste do país. O número de óbitos foi de 4 no Nordeste, 2 no Sudeste, 5 no Sul e 4 no Centro-Oeste. Os gêneros de importância médica em saúde pública são *Loxosceles*, *Phoneutria* e *Latrodectus*, sendo que o primeiro é o maior causador de acidentes no Brasil, com cerca de 50% dos casos em que há identificação da aranha, segundo o Ministério da Saúde.

Na região Sudeste, Minas Gerais é o estado que notifica o maior número de acidentes por aranhas. No Brasil, os estados do Paraná e de Santa Catarina registram o maior número de casos de acidentes por aranhas *Loxosceles* (Marques-da-Silva & Fischer, 2005; Ministério da Saúde, 2012). O loxoscelismo é particularmente predominante na região metropolitana de Curitiba, no Paraná, com cerca de 2000 a 3000 casos por ano (Málaque *et al.*, 2002).

As aranhas-marrons não são animais agressivos, picam apenas quando comprimidos contra o corpo. Por isso, os acidentes domésticos ocorrem comumente quando essas aranhas estão presentes em roupas e calçados vestidos pela vítima, ou quando a pessoa está dormindo. Na cidade de Curitiba, Paraná, dos 1,5 casos de loxoscelismo por 1000 habitantes registrados entre os anos de 1993 e 2006, 20,1% das picadas ocorreram na



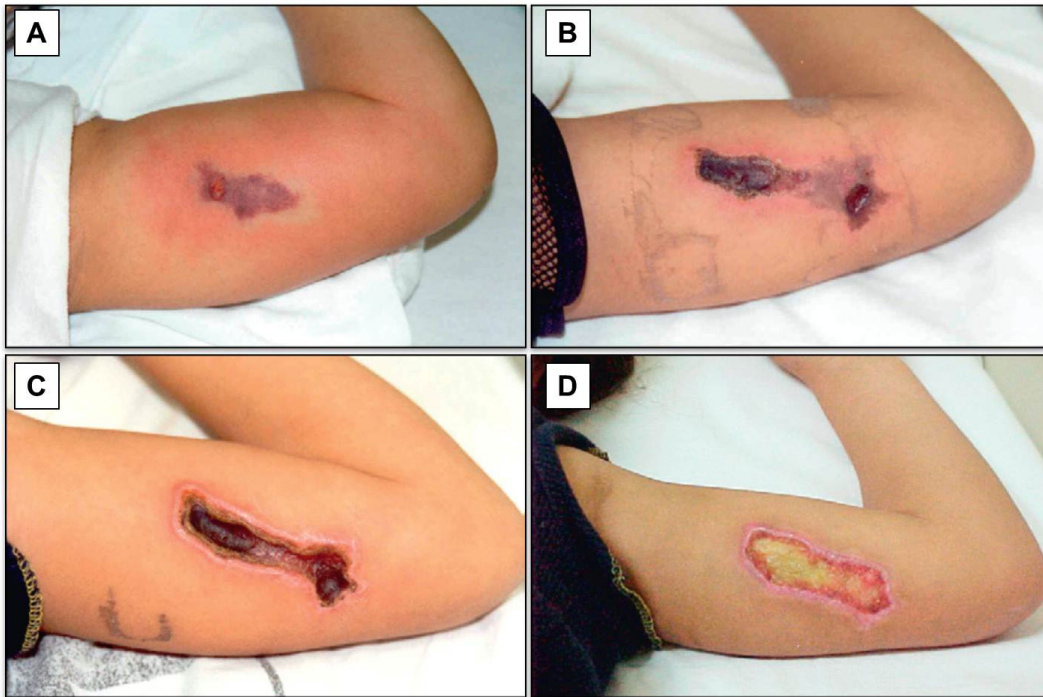
coxa, 15,7% no tronco, 12% no braço e 18,4% na perna da vítima. Outra característica dos acidentes é a sazonalidade, sendo a frequência maior nos meses mais quentes (Sezerino *et al.*, 1998; Málaque *et al.*, 2002; Dyachenko & Rozenman, 2006; Secretaria Municipal de Saúde de Curitiba, 2006; Diaz & Leblanc, 2007).

Como a picada de aranha *Loxosceles* é a princípio indolor, os primeiros sinais e sintomas manifestam-se após algumas horas. Assim, a vítima do acidente, na maioria dos casos, não captura ou identifica o agente causador. Dessa forma, o diagnóstico preciso do loxoscelismo é dificultado, sendo super ou subnotificado, e é confundido com infecções cutâneas bacterianas ou virais, dermatites, vasculites ou úlcera diabética (Isbister & Vetter, 2005; Vetter & Isbister, 2008).

O primeiro sintoma após o acidente, a dor aguda, de grau variado, pode ocorrer dentro de 2 a 8 horas, progredindo para uma sensação de queimadura. Em até 24 horas, o local da picada fica cercado por eritema e edema. Em casos de severidades moderada e grave, as lesões progridem para necrose em 48 a 72 horas. Os sinais iniciais de necrose são hiperestesia, formação de bolhas de conteúdo hemorrágico, endureção e cianose, culminando em formação de úlcera vermelho-azulada, dolorosa e coberta por escara, circundada por halo de isquemia e vasoconstrição. O espalhamento gravitacional ocorre dependendo da região onde a peçonha foi inoculada e aumenta a área de necrose. A escara pode sair, deixando uma úlcera que regride em 6 a 8 semanas, porém alguns casos necessitam de enxerto. Artralgia e febre acompanham, esporadicamente, tais sintomas. O loxoscelismo cutâneo (Figura 3), acima descrito, ocorre em cerca de 80% dos casos (Futrell, 1992; Vetter & Isbister, 2008; Andersen *et al.*, 2011; Málaque *et al.*, 2011).

Ocasionalmente, o quadro clínico progride em 24 a 48 horas para diarreia, vômito, febre, cefaleia, coagulopatias, hemólise, petéquias, trombocitopenia e urticária, caracterizando uma complicação mais rara, denominada loxoscelismo sistêmico ou cutâneo-visceral, que independe da severidade da lesão cutânea. Os sintomas característicos são hemólise intravascular, coagulação intravascular e falência renal aguda, que é a principal causa de óbito. O percentual de mortes pode chegar a 1,5% dos casos ou

mais, sendo que as crianças e os idosos são mais susceptíveis (Schenone *et al.*, 1989, 2001; Sezerino *et al.*, 1998; Hogan *et al.*, 2004).



**Figura 3:** Progressão do loxoscelismo cutâneo. Ulceração e necrose nos dias 1 (A), 9 (B), 16 (C) e 25 (D). (Adaptado de: Isbister & Fan, 2011).

A extensão dos efeitos biológicos causados por acidentes loxoscélicos tem múltiplas variáveis, dependendo tanto do agente causador e respectivas diferenças inter e intraespecíficas (sexo e idade da aranha), quanto da vítima (espécie, idade, presença de comorbidades, variabilidade genética, local da picada) (Barreto *et al.*, 1985; Sezerino *et al.*, 1998; de Oliveira *et al.*, 1999; Gonçalves de Andrade *et al.*, 1999; Dyachenko & Rozenman, 2006; Pauli *et al.*, 2006). O loxoscelismo sistêmico tem maior incidência em áreas onde a espécie *L. laeta* é predominante, como Peru (27,2%), Chile (15,7%) e Santa Catarina, Brasil (13,1%) (Schenone *et al.*, 1989; Sezerino *et al.*, 1998; Abdulkader *et al.*, 2008).

Sabe-se que os principais sintomas do loxoscelismo são causados por uma família de proteínas presente na peçonha, com massa molecular de 32 a 35 kDa evidenciada em SDS-PAGE (Barbaro *et al.*, 1994), cujas características serão descritas posteriormente.

### 1.2.1. Diagnóstico e tratamento do loxoscelismo

Como exposto anteriormente, a picada indolor da aranha marrom dificulta o diagnóstico e o tratamento do loxoscelismo. O diagnóstico conclusivo é dado com a identificação da aranha, o que não ocorre comumente. Além disso, o atraso de 24 a 48 horas para que o paciente procure atendimento médico pode aumentar a lesão e complicar o tratamento.

Para o diagnóstico, sem a identificação do agente causador, são avaliados os sinais e sintomas clínicos, associados com dados epidemiológicos da localidade do acidente (Málaque *et al.*, 2002; Vetter, 2009). Alternativamente, Barrett *et al.* (1993) padronizaram um método de diagnóstico de envenenamento por *L. reclusa* utilizando-se ensaio de inibição de hemaglutinação passiva. Foi analisado exsudato de lesão cutânea de cobaias, com 90% de sensibilidade em até 3 dias após o acidente. Chávez-Olórtegui *et al.* (1998) desenvolveram ensaio imunoenzimático (ELISA) para detectar antígenos da peçonha de *L. intermedia* presentes em amostras de soro de pacientes que sofreram picada dessa aranha e amostras de soro de camundongos inoculados com peçonha. Miller *et al.* (2000) padronizaram um imunoenensaio para constatar a presença de peçonha de *L. deserta* em biópsia de pele humana lesionada, bem como em pelos extraídos do local da lesão. Krywko & Gomez (2002) também utilizaram a técnica de ELISA para constatar a presença de peçonha de *Loxosceles* em cabelos, aspirados de feridas, e em biópsia de pele de coelho. Novamente por ELISA, McGlasson *et al.* (2009) detectaram a presença de peçonha de *L. reclusa* em cotonete passado sobre a superfície de pele de coelhos inoculados, por até duas semanas após o envenenamento. No entanto, apesar do potencial para aplicação clínica, até o momento nenhum método imunológico é disponibilizado comercialmente para o diagnóstico de loxoscelismo.

Sobre o tratamento, não há um consenso acerca do melhor esquema e há poucos estudos clínicos que comparam a eficácia das diversas intervenções indicadas (Pauli *et al.*, 2006; Manríquez & Silva, 2009; Isbister & Fan, 2011). A figura 4 do item 1.3.3 mostra alguns esquemas de tratamento relacionados aos mecanismos de ação propostos para a peçonha.

Em casos de loxoscelismo cutâneo de graus leve e moderado, o tratamento é sintomático, com uso de anti-inflamatórios e anti-histamínicos. Antibióticos são indicados para prevenir infecção secundária, que também pode ser causada por bactérias presentes na peçonha e nas presas das aranhas. Além disso, repouso e aplicação de compressas frias no local da lesão são recomendados. Há indicação de uso de dapsona, colchicina e corticoides para casos mais graves de dermonecrose, a fim de reduzir a inflamação local. Deve-se considerar com cautela os efeitos adversos da dapsona, como hepatite, leucopenia, metemoglobinemia, anemia hemolítica, dentre outros. O desbridamento cirúrgico é realizado em casos de lesões necróticas graves. Outras terapias, porém com resultados conflitantes e não muito indicadas, são oxigenoterapia hiperbárica, nitroglicerina tópica e eletrochoque. O antiveneno é recomendado para pacientes com formas moderadas e graves de lesão cutânea e com complicações sistêmicas. Para a forma cutâneo-visceral, indica-se também hidratação vigorosa, reposição de fluidos em casos de hemólise e coagulopatia, bem como manejo da insuficiência renal aguda em casos mais severos (Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde, 2001; Málaque *et al.*, 2002; Monteiro *et al.*, 2002; da Silva *et al.*, 2004; Abdulkader *et al.*, 2008; Manríquez & Silva, 2009; Andersen *et al.*, 2011).

### 1.2.2. Antivenenos

Antivenenos são preparações de anticorpos produzidos a partir do plasma de animais, como cavalos e ovelhas, após aplicação de peçonhas. São misturas de anticorpos policlonais que reagem contra diferentes antígenos presentes nas peçonhas. A partir dessa mistura, podem ser purificados IgG total, fragmentos de imunoglobulina F(ab')<sub>2</sub> ou fragmentos de imunoglobulina Fab. Há antivenenos monovalentes, que resultam de imunização com um tipo de peçonha, e polivalentes, resultantes de imunização com várias peçonhas ou de mistura de antivenenos monovalentes (Chippaux & Goyffon, 1998; Gutiérrez *et al.*, 2003).

O primeiro antiveneno distribuído comercialmente foi contra a peçonha de serpente *Naja naja* (*Indian cobra*), no século XIX, por Léon Calmette. Desde

então, cientistas passaram a desenvolver antivenenos específicos em vários países (Chippaux & Goyffon, 1998). Brasil, Peru e México dispõem de antivenenos para *Loxosceles* comercializados. Exceto no Peru, onde são purificados de IgG total, os antivenenos para *Loxosceles* são fragmentos de imunoglobulina F(ab')<sub>2</sub> derivados de cavalo. No Brasil, o soro anti-loxoscélico foi desenvolvido por Vellard em 1954, e é produzido desde o início da década de 60. Atualmente, são comercializados os soros anti-loxoscélico e anti-aracnídico. O primeiro, produzido pelo Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos do estado do Paraná (CPPI), é derivado de plasmas de equinos hiperimunizados com peçonhas de aranhas *L. laeta*, *L. gaucho* e *L. intermedia*. O segundo, produzido pelo Instituto Butantan de São Paulo, deriva de plasmas de equinos hiperimunizados com peçonhas de aranhas *L. gaucho* e *Phoneutria nigriventer* e dos escorpiões *Tityus serrulatus* e *Tityus bahiensis* (Furlanetto, 1961; Hogan *et al.*, 2004; Pauli *et al.*, 2006).

A proposta do uso de antiveneno é neutralizar o maior número possível de antígenos circulantes nas vítimas de acidente por animais peçonhentos. No Brasil, o Ministério da Saúde indica a soroterapia associada ao uso de corticoides (prednisona) em casos de loxoscelismo sistêmico e cutâneo de graus moderado e grave (Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde, 2001). Acredita-se que os soros anti-loxoscélico e anti-aracnídico reduzem a extensão da lesão cutânea e previnem as manifestações sistêmicas, desde que sejam administrados dentro de 72 horas após a picada.

Há controvérsias a respeito do uso da soroterapia e dados conflitantes sobre o benefício em ensaios clínicos (Schenone *et al.*, 1989, 2001; Sezerino *et al.*, 1998). No entanto, no Brasil, o antiveneno é rotineiramente utilizado na clínica, principalmente em áreas onde há numerosos registros de acidentes com *Loxosceles*.

Em animais, o coelho é o modelo experimental mais utilizado de dermonecrose e alguns estudos avaliaram a eficácia de antivenenos diversos em neutralizar os efeitos nocivos da peçonha (Braz *et al.*, 1999; Gomez *et al.*, 2001; Barbaro *et al.*, 2005). Gomez *et al.* (1999b) purificaram fragmentos de imunoglobulina Fab a partir de soro de coelhos imunizados com peçonha de *L. deserta*. Esse antiveneno purificado foi capaz de reduzir de forma significativa

as lesões cutâneas e a atividade de mieloperoxidase, por até 4 horas após a inoculação, em coelhos inoculados com a peçonha.

Estudos comprovam reatividade antigênica cruzada entre componentes de peçonhas de diferentes espécies de aranhas *Loxosceles* (Barbaro *et al.*, 2005; de Oliveira *et al.*, 2005). Dentre esses trabalhos, o de Barbaro *et al.* (1994) testou soros espécie-específicos contra as peçonhas de *L. gaucho*, *L. laeta* e *L. intermedia*. Após separação dos componentes de cada peçonha em SDS-PAGE, foi observado que as proteínas com massa molecular de 33 a 35 kDa mostraram maior reatividade cruzada com os soros utilizados.

No entanto, a reatividade cruzada não é observada quando os antivenenos são compostos por anticorpos monoclonais, sugerindo que há diferenças nos epítomos presentes nas toxinas dermonecróticas e letais das peçonhas de diferentes espécies de aranhas *Loxosceles*. Guilherme *et al.* (2001) produziram anticorpos monoclonais (mAbs) contra um componente dermonecrótico de 35 kDa da peçonha da aranha *L. gaucho*. Um desses anticorpos, MoALg1, neutralizou a ação dermonecrótica da peçonha de *L. gaucho* de forma significativa, reduzindo em até 45% as áreas de edema e eritema de coelhos em 48 horas. MoALg1 também retardou a ação letal dessa peçonha em camundongos de 48 para 96 horas. Não houve reatividade cruzada com peçonhas de *L. laeta* e *L. intermedia*. Da mesma forma, Alvarenga *et al.* (2003) produziram 13 mAbs contra peçonha de *L. intermedia*, sendo que um mostrou alta potência de neutralização e especificidade, sem reações cruzadas.

Além da investigação sobre a eficácia de anticorpos monoclonais, alguns trabalhos estudam a produção de anticorpos contra as proteínas dermonecróticas, de massa molecular de 32 a 35 kDa, com o objetivo de aprimorar a soroterapia atualmente utilizada. Sabe-se da imunogenicidade e do potencial de tais proteínas para produção de anticorpos (Barbaro *et al.*, 1994; Mota & Barbaro, 1995; Guilherme *et al.*, 2001; Alvarenga *et al.*, 2003). Desse modo, grupos de pesquisa produziram anticorpos contra diferentes proteínas dermonecróticas recombinantes (Fernandes-Pedrosa *et al.*, 2002; Kalapothakis *et al.*, 2002; Araújo *et al.*, 2003; Felicori *et al.*, 2006; Olvera *et al.*, 2006; de Almeida *et al.*, 2008). A produção de anticorpos que reagem contra análogos

sintéticos de epítopos de toxinas dermonecróticas também vem sendo estudada (Felicori *et al.*, 2009; Dias-Lopes *et al.*, 2010b; De Moura *et al.*, 2011).

Dentro do propósito de caracterizar a peçonha de *L. similis*, ainda pouco estudada, nosso grupo de pesquisa produziu soro específico contra tal peçonha. No presente trabalho, foram avaliados reatividade cruzada imunológica e potencial de neutralização desse soro.

### **1.3. Peçonhas de aranhas do gênero *Loxosceles***

#### **1.3.1. Componentes principais da peçonha**

A peçonha de uma aranha *Loxosceles* serve como auxiliar na alimentação, paralisando insetos, e também como mecanismo de defesa. O volume total de peçonha injetada durante a picada é de cerca de 4  $\mu$ L, com variação de 30 a 100  $\mu$ g de proteínas, dependendo da espécie (Forrester *et al.*, 1978; Sams *et al.*, 2001). Aranhas *Loxosceles* fêmeas produzem maior quantidade de peçonha do que aranhas machos. Isso pode estar relacionado ao maior tamanho e ao maior peso da fêmea. Quanto à potência, já foi demonstrado que a peçonha de fêmea promove reação dermonecrótica mais severa em coelhos (De Oliveira *et al.*, 1999).

As peçonhas de aranhas *Loxosceles* são uma mistura complexa de substâncias, com toxinas de massa molecular variando de 5 a 850 kDa, sendo que as moléculas de 5 a 40 kDa são predominantes (Veiga *et al.*, 2000b). Análises dos transcriptomas das glândulas de peçonha de *L. laeta* e de *L. intermedia* mostraram que 30,9 e 43,5% dos transcritos, respectivamente, são toxinas (Fernandes-Pedrosa *et al.*, 2008; Gremski *et al.*, 2010).

Barbaro *et al.* (2005) mostraram que as peçonhas de *L. gaucho*, *L. laeta*, *L. intermedia*, *L. reclusa* e *L. deserta* possuem, em geral, características tóxicas e enzimáticas semelhantes. Trabalhos iniciais de investigação sobre componentes presentes nas peçonhas de aranhas *Loxosceles* já mostraram similaridades biológica, imunoquímica e bioquímica entre peçonhas de diferentes espécies. Fracionamentos das peçonhas de *L. gaucho*, *L. laeta* e *L. intermedia* por gel filtração mostraram padrão de separação semelhante. Três frações foram identificadas e denominadas A, B e C, com componentes de massas moleculares aproximadas de 35, 15 kDa e pequenos peptídeos,

respectivamente. Apenas a fração A de cada peçonha induziu dermonecrose em coelho e morte em camundongo. Análises por SDS-PAGE apontaram presença de componente principal, contido na fração A, com massa de 32 kDa para *L. laeta* e massa de 35 kDa para *L. intermedia* e *L. gaucho*. Tais componentes mostraram-se imunogênicos em imunoblotting. O mapeamento peptídico dessas moléculas principais sugeriu similaridade maior entre as proteínas de *L. intermedia* e *L. laeta*. Análises das sequências de cada proteína em banco de dados apontaram alto grau de similaridade com uma toxina de *L. reclusa* (Barbaro *et al.*, 1992, 1994, 1996b; Mota & Barbaro, 1995). Corroborando esses resultados, análise do transcriptoma da glândula de peçonha de *L. intermedia* mostrou relação evolutiva próxima entre *L. intermedia* e *L. laeta* (Gremski *et al.*, 2010).

Como a principal função de uma peçonha de aranha é paralisar as presas, que são principalmente insetos, não é de se estranhar que a maior parte das toxinas expressas na glândula de peçonha de *L. intermedia* é de peptídeos com atividade inseticida. A análise do transcriptoma mostrou transcritos similares às toxinas descritas pelo grupo de De Castro (Gremski *et al.*, 2010). De Castro *et al.* (2004) isolaram três toxinas da peçonha de *L. intermedia*, denominadas LiTx1 (7,4 kDa), LiTx2 (7,9 kDa) e LiTx3 (5,6 kDa), que são tóxicas para larvas de *Spodoptera frugiperda*. Análises de bioinformática mostraram que LiTx3 pode agir hipoteticamente em canais para Na<sup>+</sup>, porém os dados para as outras duas proteínas são inconclusivos. Em 2006, outra toxina, ainda não caracterizada, foi identificada e nomeada LiTx4 (*GenBank* número DQ388598.1). As sequências de LiTx4 e LiTx2 possuem alta similaridade, portanto tais toxinas podem ter funções e estruturas semelhantes (Gremski *et al.*, 2010).

Enzimas também são compostos importantes e comuns no aparato venenoso de diversos animais, como abelhas, serpentes e aranhas (Rash & Hodgson, 2002). Diferentes enzimas já foram identificadas como constituintes das peçonhas de aranhas *Loxosceles*, como mostra a tabela 2, incluindo fosfatases alcalinas, hialuronidases, hidrolases, lipases e proteases.



**Tabela 2:** Atividades enzimáticas de peçonhas de aranhas *Loxosceles*. Modificado de: Rash & Hodgson (2002); Da Silva *et al.* (2004).

<b>Atividade enzimática</b>	<b>Aranha</b>	<b>Referências Bibliográficas</b>
<b>Hialuronidase</b>	<i>L. rufescens</i> <i>L. laeta</i> <i>L. reclusa</i>  <i>L. deserta</i> <i>L. intermedia</i> <i>L. gaucho</i>	Wright <i>et al.</i> , 1973; Geren <i>et al.</i> , 1976 Schenone & Suarez, 1978; Barbaro <i>et al.</i> , 2005 Geren <i>et al.</i> , 1976; Young & Pincus, 2001; Barbaro <i>et al.</i> , 2005 Barbaro <i>et al.</i> , 2005 Barbaro <i>et al.</i> , 2005; Da Silveira <i>et al.</i> , 2007c Barbaro <i>et al.</i> , 2005
<b>Fosfatase alcalina</b>	<i>L. reclusa</i>	Heitz & Norment, 1974; Geren <i>et al.</i> , 1976; Norment <i>et al.</i> , 1979
<b>Esterase</b>	<i>L. reclusa</i>	Wright <i>et al.</i> , 1973; Norment <i>et al.</i> , 1979
<b>Lipase</b>	<i>L. reclusa</i>	Norment <i>et al.</i> , 1979
<b>Hidrolase</b>	<i>L. reclusa</i>	Geren <i>et al.</i> , 1976; Norment <i>et al.</i> , 1979
<b>ATPase</b>	<i>L. reclusa</i> <i>L. laeta</i>	Geren <i>et al.</i> , 1976 Schenone & Suarez, 1978
<b>5` ribonucleotídeo fosfohidrolase</b>	<i>L. reclusa</i>	Geren <i>et al.</i> , 1976
<b>Esfingomielinase D/Fosfolipase D</b>	<i>L. intermedia</i>  <i>L. gaucho</i>  <i>L. laeta</i>  <i>L. similis</i>	Tambourgi <i>et al.</i> , 1998a; Kalapothakis <i>et al.</i> , 2002, 2007; Araújo <i>et al.</i> , 2003; Barbaro <i>et al.</i> , 2005; Chaim <i>et al.</i> , 2006, 2011; Da Silveira <i>et al.</i> , 2006, 2007a; Felicori <i>et al.</i> , 2006; Appel <i>et al.</i> , 2008; Gremski <i>et al.</i> , 2010; De Giuseppe <i>et al.</i> , 2011; Gomes <i>et al.</i> , 2011 Cunha <i>et al.</i> , 2003; Barbaro <i>et al.</i> , 2005; Machado <i>et al.</i> , 2005b; Gomes <i>et al.</i> , 2011 Fernandes-Pedrosa <i>et al.</i> , 2002, 2008; Barbaro <i>et al.</i> , 2005; De Santi-Ferrara <i>et al.</i> , 2009; Catalán <i>et al.</i> , 2011; Gomes <i>et al.</i> , 2011 Gomes <i>et al.</i> , 2011; Chatzaki <i>et al.</i> , 2012

	<i>L. reclusa</i>  <i>L. deserta</i> <i>L. rufescens</i> <i>L. boneti</i> <i>L. arizonica</i> <i>L. adelaida</i>	Forrester <i>et al.</i> , 1978; Kurpiewski <i>et al.</i> , 1981; Rekow <i>et al.</i> , 1983; Rees <i>et al.</i> , 1988; Futrell, 1992; Merchant <i>et al.</i> , 1998; Ramos-Cerillo <i>et</i> <i>al.</i> , 2004; Barbaro <i>et al.</i> , 2005 Barbaro <i>et al.</i> , 2005 Young & Pincus, 2001 Ramos-Cerillo <i>et al.</i> , 2004 Binford <i>et al.</i> , 2005; Zobel-Thropp <i>et al.</i> , 2010 Pretel <i>et al.</i> , 2005
<b>Proteases</b>	<i>L. rufescens</i> <i>L. reclusa</i>  <i>L. deserta</i> <i>L. intermedia</i>  <i>L. gaucho</i>  <i>L. laeta</i>	Young & Pincus, 2001 Eskafi & Norment, 1976; Jong <i>et al.</i> , 1979; Barbaro <i>et al.</i> , 2005 Barbaro <i>et al.</i> , 2005 Barbaro <i>et al.</i> , 1996a, 2005; De Souza <i>et al.</i> , 1998; Feitosa <i>et al.</i> , 1998; Veiga <i>et al.</i> , 1999, 2000a,b; Da Silveira <i>et al.</i> , 2002, 2007b; Zanetti <i>et al.</i> , 2002; Gremski <i>et al.</i> , 2010; Trevisan-Silva <i>et al.</i> , 2010 Barbaro <i>et al.</i> , 1996a, 2005; Barretto <i>et al.</i> , 2003; Trevisan-Silva <i>et al.</i> , 2010 Barbaro <i>et al.</i> , 1996a, 2005; da Silveira <i>et al.</i> , 2002; Fernandes-Pedrosa <i>et al.</i> , 2008; Trevisan- Silva <i>et al.</i> , 2010

Hialuronidasas são comumente encontradas em peçonhas de diversas aranhas. O substrato de ação dessa enzima é o ácido hialurônico, um mucopolissacarídeo que é constituinte principal da matriz extracelular. Dessa forma, acredita-se que a hialuronidase presente em peçonhas animais facilita a dispersão de outros componentes tóxicos por meio da hidrólise de tecido conectivo (Kreil, 1995; Rash & Hodgson, 2002; Girish & Kemparaju, 2007; Girish *et al.*, 2009).

A presença de proteases em peçonhas é controversa e alguns autores defendem que ocorra devido à contaminação por fluidos digestivos no processo de extração, principalmente se a extração ocorrer por eletroestimulação (Rash & Hodgson, 2002). No entanto, os trabalhos em que Fernandes-Pedrosa *et al.*

(2008) e Gremski *et al.* (2010) encontraram serino e metaloproteases nos transcritos das glândulas de peçonha de *L. laeta* e de *L. intermedia*, respectivamente, reforçam a hipótese de que as peçonhas de aranhas marrons realmente possuem tal atividade enzimática. As metaloproteases são um grupo de endopeptidases que clivam a maioria das moléculas da matriz extracelular, como fibronectina, laminina e colágeno, remodelando a estrutura dessas moléculas. Atuam também em moléculas plasmáticas, como fibrinogênio. As metaloproteases de matriz são compostas por gelatinases, colagenases, estromelinas e outras metaloproteases (Kleiner & Stetler-Stevenson, 1993). Duas metaloproteases denominadas Loxolisina A (20 a 28 kDa) e Loxolisina B (32 a 35 kDa) foram descritas para a peçonha de *L. intermedia*. A primeira cliva fibronectina e fibrinogênio e a última é gelatinolítica (Feitosa *et al.*, 1998).

Assim como as metaloproteases, as serinoproteases também são enzimas de amplo espectro de ação para moléculas plasmáticas e de matriz extracelular. Fazem parte desse grupo trombina, plasmina, uroquinase e ativador de plasminogênio tecidual (Tang, 2001; Quattrocchi *et al.*, 2002). Sequências similares a inibidores de serino/cisteinoproteases foram encontradas nos estudos dos transcriptomas das glândulas de peçonha de *L. intermedia* e de *L. laeta* (Fernandes-Pedrosa *et al.*, 2008; Gremski *et al.*, 2010). A possível ação desses inibidores é de proteger as toxinas proteicas contra as proteases provenientes da própria peçonha (Zupunski *et al.*, 2003).

Um grupo de proteínas de aproximadamente 35 kDa com atividade esfingomielinásica é descrito como o principal arsenal tóxico da peçonha de aranha marrom. O componente chave de peçonhas de aranhas *Loxosceles* é a esfingomielinase D (32 a 35 kDa), já caracterizada bioquímica e biologicamente. Atribui-se à esfingomielinase D (SMaseD) a maior parte dos efeitos tóxicos do loxoscelismo, como dermonecrose, hemólise, agregação plaquetária e morte em camundongos (Forrester *et al.*, 1978; Tambourgi *et al.*, 1995; 1998a). Zobel-Thropp *et al.* (2012) detectaram, pela primeira vez, atividade inseticida nessa enzima. Aproximadamente 16 e 20% das toxinas expressas nas glândulas de peçonha de *L. laeta* e de *L. intermedia*, respectivamente, pertencem a esse grupo de enzimas (Fernandes-Pedrosa *et al.*, 2008; Gremski *et al.*, 2010).

A ideia da existência de uma família de proteínas dermonecróticas surgiu da caracterização bioquímica de uma fração de *L. reclusa* na qual quatro toxinas foram descritas (Futrell, 1992) e outros trabalhos corroboraram essa hipótese. Tambourgi *et al.* (1998a) purificaram a fração dermonecrótica de 35 kDa da peçonha de *L. intermedia* e obtiveram três proteínas homólogas, denominadas P1, P2 e P3, sendo que as duas primeiras são ativas. Cunha *et al.* (2003) purificaram toxinas dermonecróticas de *L. gaucho* e as caracterizaram por espectrometria de massas. Duas isoformas com atividade necrótica foram isoladas e denominadas Loxnecrogina A (31,4 kDa) e Loxnecrogina B (31,6 kDa). Anos depois, esse mesmo grupo identificou 11 isoformas de toxinas (31 a 33 kDa) similares às Loxnecroginas por análise proteômica de peçonha de *L. gaucho* (Machado *et al.*, 2005b). Ramos-Cerillo *et al.* (2004) purificaram três isoformas de SMaseD da peçonha de *L. boneti*, do México, e duas isoformas da peçonha de *L. reclusa*, dos Estados Unidos.

Reforçando a questão da existência de mecanismos mutacionais nas glândulas de peçonhas, Kalapothakis *et al.* (2007) isolaram sequências de cDNA que codificam proteínas dermonecróticas da peçonha da aranha *L. intermedia*. Análises das sequências de aminoácidos dos clones dessas toxinas revelaram pelo menos seis grupos de proteínas expressas na glândula de peçonha. Esse trabalho identificou isoformas diversas de toxinas dermonecróticas, que foram denominadas proteínas Loxtox.

Com a utilização de técnicas de biologia molecular, diferentes toxinas dermonecróticas recombinantes foram descritas. Catalán *et al.* (2011) clonaram e expressaram duas toxinas imunogênicas de *L. laeta*, LIPLD1 e LIPLD2, sendo que a primeira possui atividades esfingomielinásica e hemolítica e a segunda é inativa. Kalapothakis *et al.* (2002) clonaram e expressaram a proteína LiD1 (*L. intermedia dermonecrotic protein 1*). A sequência de aminoácidos deduzida a partir do cDNA mostrou uma proteína madura de aproximadamente 31 kDa, com cerca de 37 kDa quando fusionada com  $\beta$ -galactosidase, e pI de 7,37. A proteína recLiD1 é altamente imunogênica e possui atividades dermonecrótica, de agregação plaquetária e esfingomielinásica (Araújo *et al.*, 2003; Felicori *et al.*, 2006). A sequência parcial da toxina nativa de *L. gaucho* Loxnecrogina A descrita por Cunha *et al.* (2003) mostrou similaridade com a recLiD1.

Outras toxinas recombinantes foram caracterizadas a partir da biblioteca de cDNA da glândula de peçonha de *L. intermedia*. Chaim *et al.* (2006) clonaram e expressaram a proteína LiRecDT1, que é nefrotóxica. Segundo Kalapothakis *et al.* (2007), a LiRecDT1 possui alta similaridade com a recLiD1, por isso ambas pertencem ao mesmo grupo de Loxtox. Da Silveira *et al.* (2006) clonaram e expressaram as toxinas LiRecDT2 (33,8 kDa) e LiRecDT3 (34 kDa). Ensaio biológico mostrou que LiRecDT1 e LiRecDT2 possuem atividade esfingomielinásica forte e causam lesão necrótica macroscopicamente visível, enquanto LiRecDT3 promove apenas edema e eritema cutâneos. Em 2007, o mesmo grupo clonou e expressou outras duas toxinas de *L. intermedia*, LiRecDT4 (34 kDa) e LiRecDT5 (37 kDa), que são dermonecroticas, causam resposta inflamatória em derme de coelho, agregação plaquetária e aumento de permeabilidade vascular (Da Silveira *et al.*, 2007a).

Sade *et al.* (2012) clonaram, expressaram e purificaram, a partir da biblioteca de cDNA da glândula de peçonha de *L. intermedia*, uma proteína da superfamília TCTP (*Translationally Controlled Tumor Protein*). Essa toxina, denominada LiRecTCTP, causa edema e aumento da permeabilidade vascular.

Até o momento, não há um conhecimento completo dos componentes presentes nas glândulas de peçonhas de aranhas do gênero *Loxosceles*. Por exemplo, 25% dos transcritos da glândula de peçonha de *L. laeta* e 47% dos transcritos da glândula de peçonha de *L. intermedia* possuem função desconhecida (Fernandes-Pedrosa *et al.*, 2008; Gremski *et al.*, 2010), o que aponta um vasto campo a ser explorado.

### **1.3.2. Esfingomielinase D: aspectos bioquímicos**

Como visto anteriormente, as principais ações de peçonhas de aranhas *Loxosceles* são atribuídas às proteínas Loxtox, com atividade enzimática de SMaseD. Raramente encontrada no reino animal, enzima similar à de peçonha de aranha marrom é produzida como exotoxina por algumas bactérias patogênicas, como *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Corynebacterium ulcerans* e *Arcanobacterium hemolyticum*. A SMaseD de *C. pseudotuberculosis*, que possui 30% de similaridade de sequência com a enzima de *Loxosceles*, causa linfadenite em animais, é patogênica a humanos

e mostra efeitos fisiopatológicos semelhantes aos do loxoscelismo em modelos animais (Songer, 1997; Van Meeteren *et al.*, 2004).

A enzima SMaseD é um tipo específico de fosfolipase D, com ação dependente de  $Mg^{2+}$ , que converte a esfingomielina, um fosfolípido abundante na membrana plasmática, em ceramida 1-fosfato (C1P, N-acil-esfingosina 1-fosfato). C1P é um componente da bicamada lipídica, porém não está claro se é uma molécula de sinalização celular. Ao contrário da ceramida, C1P parece não perturbar a estrutura da membrana plasmática, fato também controverso. Além disso, sabe-se que células de mamíferos tratadas com SMaseD não convertem C1P em ceramida (Murakami *et al.*, 2005; Van Meeteren *et al.*, 2007; Stock *et al.*, 2012).

Dessa forma, há questionamentos com relação à atividade biológica da SMaseD de *Loxosceles* e de bactéria, sobre como é capaz de causar os efeitos fisiopatológicos já conhecidos. Assim, a especificidade de substratos dessa enzima foi estudada por alguns grupos. Van Meeteren *et al.* (2004) mostraram que SMaseD recombinantes de *L. laeta* e de *C. pseudotuberculosis* possuem atividade intrínseca de lisofosfolipase D sob lisofosfatidilcolina (LPC) ligada à albumina, gerando ácido lisofosfatídico (LPA) e colina. Lee & Lynch (2005) observaram que a SMaseD recombinante de *L. reclusa* hidrolisa, além de LPC e esfingomielina, os lisofosfolídeos LPI (18:1-1-oleoil-lisofosfatidilinositol), LPS (18:1-1-oleoil-lisofosfatidilserina), LPG (18:1-1-oleoil-lisofosfatidilglicerol), LBPA (18:1 ácido 1-oleoil-lisobisfosfatídico), liso-fator ativador plaquetário ( $C_{16:0}$ ) e ácido fosfatídico cíclico.

Tais resultados sugerem que o termo SMaseD é limitado para descrever esse grupo de toxinas dermonecroticas, devido ao amplo espectro de ação enzimática dessas toxinas. A partir do trabalho de Lee & Lynch (2005), foi sugerida a substituição pelo nome fosfolipase D (PLD), que é mais abrangente.

Ademais, vem sendo investigada no loxoscelismo a participação do LPA, gerado por hidrólise de LPC a partir da ação de PLD de componentes da peçonha. Sabe-se que o LPA induz agregação plaquetária, hiperpermeabilidade endotelial e respostas pró-inflamatórias (Moolenaar, 1999; Moolenaar *et al.*, 2004).

### 1.3.3. Efeitos fisiopatológicos da peçonha e mecanismos moleculares

Os mecanismos pelos quais as peçonhas de aranhas *Loxosceles* provocam efeitos locais e sistêmicos são complexos, ainda não totalmente elucidados e causados por sinergismo de ação entre toxinas diversas.

Alterações histopatológicas no local da picada incluem edema, vasodilatação, espessamento do endotélio vascular, degeneração da parede vascular, coagulação intravascular, hemorragia e infiltração de leucócitos (Futrell, 1992).

A atividade enzimática da peçonha é importante em vários aspectos. A hialuronidase facilita a dispersão de componentes tóxicos e causa o espalhamento gravitacional característico do loxoscelismo. As proteases, que agem em diferentes substratos e degradam fibrinogênio, fibronectina, entactina e proteoglicanos de heparam-sulfato, rompem as estruturas de membrana basal e de matriz extracelular. Como nas peçonhas de serpentes, tais proteases podem estar envolvidas em hemorragia local, espalhamento gravitacional da lesão cutânea, bem como nas complicações sistêmicas, como coagulação intravascular disseminada e falência renal (Feitosa *et al.*, 1998; Veiga *et al.*, 1999, 2000a,b, 2001a,b; Zanetti *et al.*, 2002).

Proteínas da família Loxtox de enzimas PLD, antes conhecidas como SMaseD, interagem com a membrana celular, desregulando o sistema de complemento e promovendo ativação de plaquetas e de leucócitos polimorfonucleares (Rees *et al.*, 1988; Futrell, 1992; Kalapothakis *et al.*, 2007).

Sabe-se que tanto a peçonha quanto a respectiva fração dermonecrótica interagem com a superfície de eritrócitos e lisam essas células (Rees *et al.*, 1984; Barretto *et al.*, 2003, 2007). Tambourgi *et al.* (1998a) mostraram que as toxinas P1 e P2, provenientes de uma fração de 35 kDa da peçonha de *L. intermedia*, possuem atividade esfingomielinásica e promovem dermonecrose e hemólise dependente de complemento. Foi sugerido que a atividade esfingomielinásica de tais toxinas causa ativação de uma metaloprotease endógena ligada à membrana de eritrócitos, resultando na clivagem de glicoforinas de superfície, tornando essas células susceptíveis à lise mediada pela via alternativa do complemento (Tambourgi *et al.*, 2000). Em outro trabalho do mesmo grupo, mostrou-se que a toxina P1 deixa os eritrócitos

susceptíveis à hemólise por ativação das duas vias do complemento, clássica e alternativa. Houve modificação da assimetria da membrana dos eritrócitos com exposição de fosfatidilserina (PS) na superfície celular, o que pode causar ativação da via clássica do complemento (Tambourgi *et al.*, 2002). Posteriormente, Tambourgi *et al.* (2007) observaram ativação do complemento por ligação direta de C1q, o primeiro componente da via clássica, à superfície de eritrócitos humanos tratados com a toxina P1.

Chaves-Moreira *et al.* (2011) mostraram que uma família de enzimas PLD recombinantes da glândula de peçonha de *L. intermedia* induziu lise em eritrócitos humanos por via dependente do metabolismo de fosfolípidos de membrana. Os produtos bioativos gerados da hidrólise de esfingomielina e LPC aumentam o influxo de cálcio nas células por canais para cálcio do tipo L. Os autores mostraram que há uma correlação entre o efeito hemolítico e a atividade de PLD. Os mecanismos exatos de hemólise causada pela peçonha ainda precisam ser elucidados.

Fração da peçonha com atividade esfingomielinásica promove agregação plaquetária dependente de componentes presentes no plasma sanguíneo (Kurpiewski *et al.*, 1981; Rees *et al.*, 1988). Essa ação, junto à ativação do sistema de coagulação sanguínea e à lesão vascular, contribui para a deposição de fibrina e formação de trombos observadas nas análises histopatológicas (Tavares *et al.*, 2004). O envenenamento promove coagulação intravascular em pele, pulmão e rins (Futrell, 1992). Em células endoteliais tratadas com a peçonha de *L. intermedia* e respectiva SMaseD, a ativação de metaloproteases endógenas participa da redução da expressão de trombosmodulina e de receptor para proteína C, que são importantes na via anticoagulante fisiológica (Van den Berg *et al.*, 2007).

Trabalhos mais antigos já implicavam o recrutamento de leucócitos e a injúria aos vasos sanguíneos como as bases patológicas para a lesão cutânea (Smith & Micks, 1970; Patel *et al.*, 1994). Sunderkötter *et al.* (2001) mostraram que a depleção por irradiação gama de polimorfonucleares em camundongos inibiu o dano vascular induzido pela administração de peçonha de *Loxosceles*. Nesse modelo, a depleção do complemento por fator de veneno de cobra (CoVF) atrasou, mas não inibiu os efeitos da peçonha. Já Tambourgi *et al.*



(2005) demonstraram que C5a e o complexo de ataque à membrana (MAC) possuem um papel fundamental no recrutamento de neutrófilos em modelo de dermonecrose em coelho provocada por peçonha de *L. intermedia* e SMaseD. Os autores sugerem que a destruição de colágeno e de fibras musculares pode iniciar a ativação da via clássica do complemento, resultando em formação de C5a e geração de MAC. Além disso, células necróticas e apoptóticas também podem contribuir para a ativação dessa cascata. Paradoxalmente, como um possível mecanismo de proteção contra o excesso de C5a, a peçonha de *L. intermedia* cliva o receptor celular para C5a via ativação de metaloproteases endógenas, deixando-o parcialmente responsivo ao agonista (Van den Berg *et al.*, 2012).

Mesmo com a depleção do complemento, Tambourgi *et al.* (2005) ainda observaram evidências histológicas de dano a fibras colágenas e células musculares. Os autores, então, detectaram que a ativação de metaloproteases endógenas está implicada também no mecanismo de dermonecrose. Análise de extratos de pele de coelhos inoculados com peçonha mostrou aumento da expressão da gelatinase endógena MMP-9, que tem papel no recrutamento de neutrófilos, linfócitos e eosinófilos, além de participar do processo de formação de lesões e úlceras.

Em queratinócitos humanos, Paixão-Cavalcante *et al.* (2006) mostraram que a SMaseD de *Loxosceles* induz apoptose associada ao aumento de expressão de MMP-2 e de MMP-9. A tetraciclina, um inibidor de metaloproteases, reduziu a expressão de MMP-2 e preveniu a indução de MMP-9 em amostras de pele de coelho. No mesmo estudo, o tratamento com tetraciclina tópica em coelhos inoculados com peçonha de *L. intermedia* ou com SMaseD reduziu a progressão da lesão necrótica (Paixão-Cavalcante *et al.*, 2007).

Quanto à lesão vascular, considera-se que ocorre não apenas por degradação de matriz extracelular e infiltração de leucócitos, mas também por uma atividade direta e primária da peçonha de aranha *Loxosceles* em células endoteliais (Nowatzki *et al.*, 2010). Análises de biópsias de pele de coelhos tratados com peçonha de *L. intermedia* mostraram degeneração da membrana de células endoteliais vasculares, além de formação de vacúolos no espaço

subendotelial (Zanetti *et al.*, 2002). Estudos mostram ação citotóxica direta sobre células endoteliais, com alterações morfológicas após ligação da peçonha de *L. intermedia* à superfície da célula e à matriz extracelular (Veiga *et al.*, 2001b; Paludo *et al.*, 2006). Em ratos, a peçonha de *L. intermedia* promoveu aumento de permeabilidade vascular, além de dilatação de aorta isolada dependente de endotélio. O mecanismo envolve degranulação de mastócitos, com liberação de histamina e serotonina (Rattmann *et al.*, 2008). Paludo *et al.* (2009) observaram que antagonistas de receptores para histamina e serotonina inibiram edema e aumento de permeabilidade vascular promovidos pela peçonha de *L. intermedia* e pela LiReDT1. A toxina LirecTCTP de *L. intermedia*, caracterizada por Sade *et al.* (2012) como causadora de edema e de aumento de permeabilidade vascular, é homóloga a uma família de proteínas que são fatores de liberação de histamina no ambiente extracelular. Dessa forma, além da ação direta sobre a estrutura celular, o efeito da peçonha também envolve mediadores.

A reação inflamatória do loxoscelismo tem envolvimento de importantes mediadores, que possuem papel fundamental na quimiotaxia e ativação de neutrófilos. Trabalhos com a utilização de diversos modelos experimentais e tipos celulares mostraram que a peçonha de *Loxosceles* induz a liberação e/ou aumenta a expressão gênica de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, como IL-6, IL-8, MCP-1, CXCL1, CXCL2, KC, TNF- $\alpha$  e GM-CSF, e também mediadores lipídicos como PGE<sub>2</sub>, fatores de crescimento como VEGF e outras moléculas como o óxido nítrico (Patel *et al.*, 1994; Tambourgi *et al.*, 1998b; Desai *et al.*, 1999, 2000; Gomez *et al.*, 1999a; Málaque *et al.*, 1999; Dragulev *et al.*, 2007; Barbaro *et al.*, 2010).

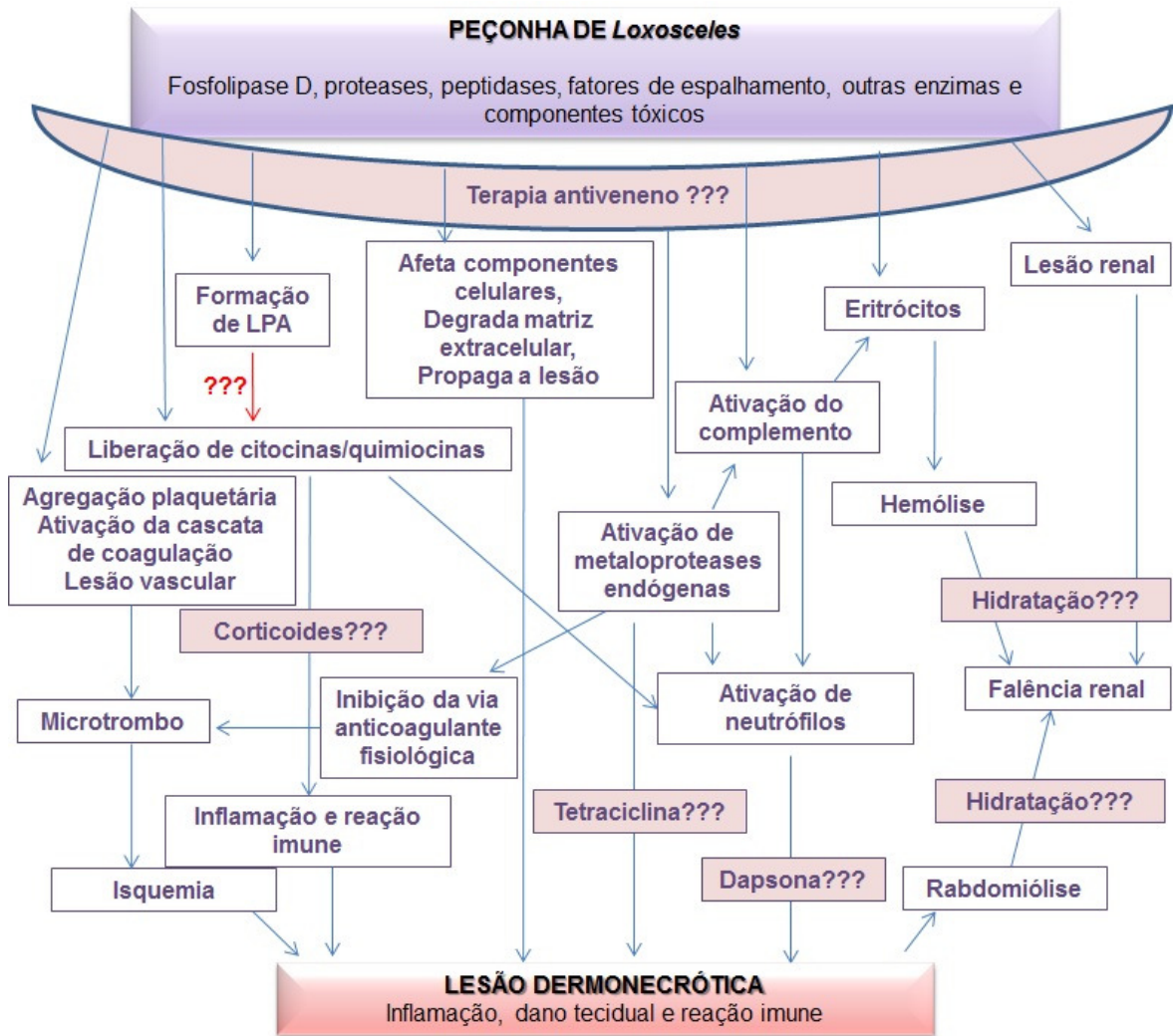
Dragulev *et al.* (2007) mostraram que a SMaseD/PLD recombinante de *L. reclusa* regula positivamente a expressão gênica de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias em fibroblastos humanos. Na discussão do trabalho, os autores atribuíram os efeitos observados à C1P, formada pela hidrólise de esfingomiélinina presente na membrana plasmática. Tal hipótese foi refutada por Van Meeteren *et al.* (2007), que supõem que, ao invés de C1P, o LPA bioativo, produto da hidrólise de LPC mediada por PLD, provavelmente é o causador dessa resposta inflamatória observada pelo grupo de Dragulev. Com base

nessa intrigante discussão, o presente trabalho investiga a participação do LPA na liberação de mediadores inflamatórios e na morte celular promovida pela peçonha de *L. similis* em fibroblastos humanos.

A atividade de PLD é fundamental para os mecanismos de inflamação, bem como de nefrotoxicidade da peçonha (Kusma *et al.*, 2008; Chaim *et al.*, 2011). A enzima PLD de *L. intermedia* acumula-se e liga-se diretamente a estruturas renais, causando injúrias como edema glomerular e necrose tubular (Chaim *et al.*, 2006). Análises histopatológicas de rins de camundongos tratados com peçonha de *L. intermedia* mostram hialinização dos túbulos distal e proximal, acúmulo de eritrócitos na cápsula de Bowman, colapso glomerular, toxicidade a células do epitélio tubular e deposição de material proteináceo no lúmen tubular (Luciano *et al.*, 2004). A ação nefrotóxica direta da peçonha de *Loxosceles*, além de causar hemólise, rabdomiólise e choque, pode levar ao grave quadro de falência renal aguda (Lucato *et al.*, 2011).

O efeito tóxico da peçonha e de enzimas dermonecróticas em outros tipos celulares também já foi descrito. Christoff *et al.* (2008) mostraram que a proteína LiRecDT1 provoca tumefação e apoptose em hepatócitos de ratos. Dias-Lopes *et al.* (2010a) detectaram antígenos de *L. intermedia* em rins, coração, pulmão e fígado após envenenamento experimental em camundongos. Nesse mesmo trabalho, os autores observaram que a proteína recLiD1 liga-se a cardiomiócitos e promove efeitos tóxicos importantes em cardiomiócitos ventriculares e em coração isolado de camundongos. Esses novos mecanismos podem ter implicação nos sinais e sintomas do loxoscelismo.

A figura 4 mostra os mecanismos de ação propostos para a peçonha de aranha *Loxosceles* e respectivos componentes, bem como as principais opções de tratamento para o loxoscelismo.



**Figura 4:** Mecanismos de ação propostos para a peçonha de aranha *Loxosceles* e respectivos componentes. O esquema também aponta as opções de tratamento, como terapia antiveneno, hidratação e usos de corticoides, tetraciclina e dapsona. Em vermelho, mecanismo hipotético a ser testado no presente trabalho. Adaptado de Hogan *et al.* (2004).

#### 1.4. A peçonha da aranha *Loxosceles similis*

Nosso grupo de pesquisa é pioneiro na caracterização da peçonha da aranha *L. similis*. A avaliação do risco à saúde humana decorrente de acidentes com essa aranha é de suma importância, já que essa espécie é sinantrópica e encontrada em Minas Gerais, bem como na região metropolitana de Belo Horizonte (Ferreira *et al.*, 2005; Machado *et al.*, 2005a).

O primeiro passo foi a comparação da peçonha de *L. similis* com as peçonhas de aranhas *Loxosceles* de importância médica no Brasil. O perfil eletroforético da peçonha de *L. similis* em SDS-PAGE mostrou proteínas com massa aproximada de 5 a 140 kDa, bem similar ao perfil da peçonha de *L. intermedia*. Eletroforese em gel bidimensional apontou predominância de componentes com massa de 28 a 112 kDa, com valor de pI entre 4,0 e 7,0. Porém, pontos com pI variável e massa de 3 a 200 kDa também foram visualizados. Em caracterizações imunológicas, a peçonha mostrou reatividade cruzada com soros produzidos contra as peçonhas de *L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta*, bem como contra o soro anti-loxoscélico comercial (Silvestre *et al.*, 2005).

O mesmo trabalho mostrou que as atividades dermonecrótica e hemolítica da peçonha de *L. similis* são semelhantes às de *L. intermedia*. A dose letal DL<sub>50</sub> em camundongos foi de 0,32 mg/kg, indicando que a peçonha de *L. similis* é mais tóxica a camundongos do que as peçonhas de *L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta*, segundo estudo de Barbaro & Mota (1995). Foi detectada a presença da bactéria *Clostridium septicum* nas presas da aranha *L. similis*. Por fim, os autores clonaram uma toxina denominada LsD1 (*L. similis* dermonecrotic protein 1), que possui alta similaridade com a LiD1 de *L. intermedia* (Silvestre *et al.*, 2005).

Gomes *et al.* (2011) padronizaram um ensaio de determinação de atividade de SMaseD utilizando lipossomas e observaram que a peçonha de *L. similis* possui atividade esfingomielinásica concentração-dependente menor que a da peçonha de *L. intermedia*, com perfil similar ao das peçonhas de *L. gaucho* e *L. laeta*.

Pereira *et al.* (2012) utilizaram a peçonha de *L. similis* para padronizar um novo método de investigação de mecanismos celulares e moleculares

associados à lesão cutânea. O modelo de implante de esponja em camundongos foi capaz de detectar os efeitos causados pela peçonha, como infiltração de neutrófilos, edema, hiperemia, hemorragia, liberação de TNF- $\alpha$  e VEGF.

Chatzaki *et al.* (2012) produziram em coelhos o soro específico anti-*L. similis*, que neutraliza a atividade esfingomielinásica da peçonha *in vitro*. Ensaios de neutralização *in vivo* em coelhos mostraram que a peçonha de aranha *L. similis* fêmea, quando comparada à de macho, é mais potente para induzir lesão cutânea, além de proteger mais os animais quando utilizada na imunização. Esses resultados corroboram dados obtidos em outros trabalhos, que apontam variações intraespecíficas de toxicidade de peçonhas ligadas ao sexo do animal (De Oliveira *et al.*, 1999; Gonçalves de Andrade *et al.*, 1999).

Dando continuidade a esse último estudo, o presente trabalho caracteriza a capacidade de neutralização do soro anti-*L. similis* sobre os efeitos dermonecróticos da peçonha. Além disso, este trabalho investiga a participação do ácido lisofosfatídico na fisiopatologia do loxoscelismo.

# **Justificativa e Objetivos**

## 2. JUSTIFICATIVA

Como a aranha *L. similis* não era comumente encontrada em ambiente antrópico, não era estudada quanto ao risco à saúde humana. No entanto, atenção do meio científico tem sido voltada a essa espécie após registros da presença dessa aranha em grutas turísticas e em residências, conferindo risco potencial à atividade de turismo e à população em regiões metropolitanas como a de Belo Horizonte.

Dessa forma, a caracterização dessa peçonha e do soro produzido especificamente contra ela se faz necessária. Além disso, como a peçonha de *L. similis* possui perfil similar ao de peçonhas de outras aranhas do gênero, nosso grupo de pesquisa vem utilizando-a como ferramenta de investigação do mecanismo de ação de peçonhas de aranhas marrons, ainda não totalmente elucidado.

## 3. OBJETIVOS

### 3.1. Objetivo geral

Caracterizar a reatividade do soro específico anti-*L. similis* e avaliar a participação do LPA nos efeitos da peçonha de *L. similis* e de uma proteína dermonecrótica.

### 3.2. Objetivos específicos

- Avaliar a reatividade cruzada do soro anti-*L. similis* contra peçonhas de aranhas de importância médica no Brasil;
- Avaliar a capacidade do soro anti-*L. similis* em neutralizar os efeitos da peçonha de *L. similis* quando injetada em pele de coelho;
- Expressar e purificar a toxina LiD1 ativa para ser utilizada nos experimentos com a peçonha de *L. similis*;
- Avaliar a participação do LPA na liberação de mediadores inflamatórios induzida pela peçonha de *L. similis* e pela recLiD1;
- Avaliar a participação do LPA na morte celular induzida pela peçonha de *L. similis* e pela recLiD1.



# **Material e Métodos**

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Drogas utilizadas

As peçonhas de aranhas *Loxosceles* foram diluídas em tampão salina fosfato 1X concentrado (PBS, Life Technologies Corporation, USA) ou em meio de cultivo celular apropriado, nas concentrações desejadas para os experimentos.

As peçonhas de *L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta* utilizadas no ensaio de reatividade cruzada foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Carlos Chávez-Olórtegui, do Departamento de Bioquímica e Imunologia do ICB/UFMG.

O soro anti-*L. similis* foi produzido anteriormente em nosso laboratório pela pesquisadora Dra. Maria Chatzaki. Apesar de haver produção separada de soros contra peçonhas de aranhas macho e fêmea, no presente trabalho foi utilizada apenas a mistura desses soros.

O ácido lisofosfatídico (LPA) foi diluído em PBS 1X concentrado com 0,1% p/v de albumina de soro bovino (BSA), livre de ácidos graxos, na concentração estoque de 0,3 mM. LPA e BSA foram adquiridos da Sigma (Sigma-Aldrich Co., USA). O antagonista de receptor para LPA Ki16425 (Cayman Chemical Company, USA) foi diluído em etanol na concentração de 10 mg/mL para estoque. 1-oleoil-lisofosfatidilcolina (LPC, Sigma-Aldrich Co., USA) foi complexada com BSA livre de ácidos graxos na concentração-estoque de 20  $\mu$ M em 10 mg/mL de BSA. O fator de necrose tumoral- $\alpha$  humano (TNF- $\alpha$ , Sigma-Aldrich Co., USA) foi diluído em água ultrapura (Phoneutria Biotecnologia e Serviços LTDA, Brasil) na concentração-estoque de 10 ng/ $\mu$ L. Estaurosporina foi diluída em dimetilsulfóxido (DMSO), ambos da Sigma (Sigma-Aldrich Co., USA), na concentração-estoque de 1 mM. Todos os estoques foram aliquotados e mantidos a -20°C. Posteriormente, foram diluídos em PBS 1X concentrado (Life Technologies Corporation, USA) ou em meio de cultivo celular apropriado, nas concentrações desejadas para os ensaios.

## 4.2. Animais

Aranhas *L. similis* foram coletadas em uma casa de campo em área do município de Sabará e em lotes vagos no município de Marliéria, Minas Gerais. Também houve coleta na Gruta da Lapinha (coordenadas geográficas 43°57'W, 19°33'S), localizada no Parque Estadual Sumidouro, município de Lagoa Santa, Minas Gerais. Para coleta de aranhas *L. similis*, nosso grupo possui licenças do Ministério do Meio Ambiente e do Instituto Estadual de Florestas (IEF/MG). As aranhas foram identificadas segundo método descrito por Gertsch (1967). Espécimes de *L. similis* foram depositados na coleção do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG com os números UFMG 12170, 12171 e 12172.

Foram utilizados coelhos adultos fêmeas da raça Nova Zelândia, com peso médio de 2,0 kg, provenientes da Fazenda da Faculdade de Medicina Veterinária da UFMG. Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Bioquímica e Imunologia do ICB/UFMG, em ciclos de claro-escuro, com livre acesso a água e ração.

Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG, protocolos 276/2008 e 58/2012.

## 4.3. Obtenção da peçonha bruta da aranha *L. similis*

Para obtenção da peçonha, foi realizada remoção cirúrgica da glândula da aranha. As glândulas de diversas aranhas foram maceradas em água ultra pura grau biologia molecular (Phoneutria Biotecnologia e Serviços LTDA, Brasil) e centrifugadas. O sobrenadante limpo foi coletado e estocado a -20°C para uso posterior.

## 4.4. Quantificação de proteínas

A quantificação de proteínas da peçonha bruta e da recLiD1 foi realizada segundo método descrito por Bradford (1976), utilizando-se albumina de soro bovino (BSA, fração 5) como padrão de proteínas.

## 4.5. Caracterização do soro anti-*L. similis*

### 4.5.1. Avaliação de reatividade cruzada imunológica

A placa de ELISA (Becton, Dickinson and Company, USA) foi sensibilizada com 5 µg/mL de antígenos (peçonhas de *L. similis*, *L. intermedia*, *L. gaucho*, *L. laeta*), diluídos em tampão carbonato (15 mM de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 35 mM de NaHCO<sub>3</sub>, pH 9,6) com volume final de 100 µL por poço, e incubada durante 16 horas a 4°C. A placa foi lavada quatro vezes com solução de lavagem para ELISA (0,15 M de NaCl e 0,05% de Tween 20). Em seguida, a placa foi bloqueada com 100 µL de solução de bloqueio (2% de caseína em PBS) e incubada a 37°C por 1 hora. Após quatro lavagens com solução de lavagem, a placa foi incubada a 37°C por 1 hora com soro anti-*L. similis* e com soro controle pré-imune, ambos diluídos (1:100, 1:800, 1:3200, 1:6400) em tampão de incubação (0,2% de caseína em PBS e 0,05% de Tween 20). A placa foi lavada seis vezes com solução de lavagem e incubada a 37°C por 1 hora com conjugado anti-IgG de coelho ligado à peroxidase (1:10000 em tampão de incubação). A placa foi novamente lavada seis vezes e em seguida foram adicionados 100 µL por poço de solução de substrato [10 mL de tampão citrato (50 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 24 mM de ácido cítrico, pH da solução 5,0), 2 mg de orto-fenilenodiamina (OPD), 2 µL de peróxido de hidrogênio]. A placa foi mantida ao abrigo de luz por 20 minutos e a reação em cada poço foi interrompida com 20 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> diluído a 1:20. Os valores de absorbância foram determinados a 492 nm em leitor de ELISA (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA). Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

### 4.5.2. Neutralização *in vivo*: Análises histológicas

Coelhos receberam no dorso previamente depilado injeções via intradérmica (i.d.) de peçonha da aranha *L. similis* (3 µg) previamente incubada por 1 hora a 37°C com 0,1 mL de soro anti-*L. similis* ou com o mesmo volume de soro controle pré-imune. Como controle negativo, foi injetado via i.d. 0,1 mL de PBS. Os animais foram sacrificados 2, 4 e 8 horas após as injeções. Amostras de pele na área da injeção foram coletadas para posterior análise histológica.

As amostras de derme de coelho foram fixadas em formol tamponado a 10% pH 7,4 e processadas de acordo com procedimentos de rotina para inclusão em parafina. Posteriormente, foi realizada microtomia e cortes de 4  $\mu\text{M}$  de espessura foram estendidos em lâminas de vidro para histologia. As colorações utilizadas foram Hematoxilina-Eosina (HE), Tricrômio de Masson e Reticulina, as duas últimas de acordo com instruções do fabricante (Easypath Special Stain Kit, Brasil). As amostras de tecido fixado foram avaliadas em microscópio de luz Olympus BX51 (Olympus America Inc., USA) no Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da PUC-Minas, orientado pelo Prof. Dr. Martinho Campolina Rebello Horta. Análises qualitativas avaliaram a presença de necrose, edema, hiperemia, hemorragia e trombose.

O infiltrado inflamatório presente na derme foi avaliado quantitativamente por imagens obtidas por microscopia de luz. Primeiro, o melhor número de campos foi previamente determinado após a contagem de células inflamatórias em 50 campos aleatórios, com cálculo de desvio padrão, de acordo com Moro *et al.* (2003). Assim, o número total de células inflamatórias por campo foi determinado por contagem em 30 campos por lâmina. A morfometria foi realizada utilizando-se o software Image-Pro Plus 5.0 (Media Cybernetics, MD, USA), no Laboratório de Apoptose do Departamento de Patologia do ICB/UFMG, orientado pela Profa. Dra. Luciana Moro.

#### **4.6. Caracterização da peçonha de *L. similis*: participação do LPA nas ações da peçonha de *L. similis* e da recLiD1**

##### **4.6.1. Expressão, purificação e caracterização da recLiD1**

A construção recLiD1 em pET11a segundo Felicori *et al.* (2006) já estava disponível em nosso laboratório, mantida em estoque a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

##### **4.6.1.1. Sequenciamento de DNA para confirmação do clone**

Para a reação de sequenciamento, utilizou-se 200 ng de plasmídeo, 0,5  $\mu\text{L}$  de BigDye Terminator v3.1 Cycle (Applied Biosystems, Life Technologies Corporation, USA), 1,6 pmol de um iniciador, 1,5  $\mu\text{L}$  de tampão de sequenciamento BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems, Life Technologies Corporation, USA) e água suficiente para 10  $\mu\text{L}$ . Essa reação foi

submetida ao termociclador Veriti (Applied Biosystems, Life Technologies Corporation, USA), no qual foi utilizado o programa padronizado para o sequenciador 3130 Genetic Analyser (Applied Biosystems, Life Technologies Corporation, USA): 96°C por 2 minutos, 44 ciclos a 96°C por 30 segundos (rampa 1°C/seg), 50°C por 15 segundos (rampa 1°C/seg) e 60°C por 4 minutos, mantendo depois a 4°C.

Após a termociclagem, as reações foram precipitadas utilizando-se 1 µL de EDTA 125 mM, 1 µL de acetato de sódio 3 M e 25 µL de etanol absoluto. A solução foi agitada e mantida à temperatura ambiente por 20 minutos. Em seguida, a reação foi centrifugada a 3300 x g por 25 minutos a 25°C. O sobrenadante foi retirado cuidadosamente e o precipitado foi lavado com 35 µL de etanol 70% e novamente centrifugado a 2000 x g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi seco à temperatura ambiente, posteriormente ressuspendido em 15 µL de formamida de Hi-Di e aplicado no sequenciador automático de DNA ABI 3130 (Applied Biosystems, Life Technologies Corporation, USA).

#### **4.6.1.2. Transformação do plasmídeo pET11a-LiD1 em *Escherichia coli* BL21 (DE3) eletrocompetentes**

O vetor pET11a contendo a sequência da LiD1 foi transformado em *E. coli* linhagem BL21 (DE3) (Phoneutria Biotecnologia e Serviços LTDA, Brasil) por eletroporação. Bactérias eletrocompetentes, mantidas em estoque a -80°C, foram descongeladas em banho de gelo por 10 minutos. Em seguida, 200 ng do plasmídeo foram incubados com 100 µL de bactérias eletrocompetentes *E. coli* BL21 por 2 minutos no gelo, transferidos para uma cubeta de eletroporação estéril e submetidos a um pulso eletromagnético de 1800mV no eletroporador de pulso Electroporator 2510 (Eppendorf, Alemanha). Após o pulso, foi adicionado às bactérias 1 mL de solução SOC (Phoneutria Biotecnologia e Serviços LTDA, Brasil) (20 mM de MgSO<sub>4</sub>, 20 mM de glicose) e, após a homogeneização, incubou-se a solução a 37°C por 1 hora. A cultura bacteriana foi novamente homogeneizada e 100 µL dessa suspensão foram espalhados em uma placa de Petri com meio LB-Ágar (10 g de NaCl, 10 g de bactotripton, 5 g de extrato de levedura, 20 g de ágar, água destilada q.s.p. 1 L, pH 7,5)

contendo 100 µg/mL de ampicilina. As placas foram incubadas a 37°C por 16 horas.

#### **4.6.1.3. Expressão da LiD1 em *E. coli* BL21 (DE3) e lise bacteriana**

Foi realizado um pré-inóculo a partir de uma colônia individualizada coletada na placa de Petri. Essa colônia foi inoculada em 10 mL de meio 2xYT (5 g de NaCl, 10 g de peptona, 5 g de extrato de levedura, água destilada q.s.p. 1 L, pH 7,5) contendo 100 µg/mL de ampicilina e incubada sob agitação de 200 rpm por 16 horas a 37°C. Em seguida, 10 mL do pré-inóculo foram adicionados a 1 L de meio 2xYT com 100 µg/mL de ampicilina e esse meio foi então mantido sob agitação de 200 rpm a 37°C até que se atingisse a densidade óptica de cerca de 0,5 a 600 nm (Biotech Photometer, UK). No momento em que a cultura atingiu essa densidade celular, foi feita a indução da expressão da proteína recombinante por meio de adição de IPTG na concentração final de 0,6 mM. Como controle, foi coletada uma alíquota da cultura antes da indução por IPTG. Nesse momento, a cultura passou a ser incubada a 25°C por 16 horas para aumentar a solubilidade da proteína recombinante.

Após incubação, as bactérias foram centrifugadas a 7000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 40 mL de tampão de lise (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl). A suspensão foi congelada em gelo seco e em seguida descongelada e o extrato foi sonificado por 30 segundos à amplitude de 40%. Esse procedimento foi repetido por mais quatro vezes para a completa lise bacteriana. Em seguida, foi realizada uma centrifugação a 10000 x g por 30 minutos a 4°C para obtenção das fases solúvel e insolúvel. O sobrenadante solúvel foi recolhido e congelado a -80°C até as fases de purificação.

#### **4.6.1.4. Purificação da recLiD1**

Antes do fracionamento, o conteúdo do sobrenadante foi dividido em microtubos e centrifugado duas vezes a 10000 x g por 30 minutos, a 4°C, para eliminação mais aprimorada de impurezas da lise bacteriana. Depois, o líquido foi filtrado em filtro de seringa com poro de 0,45 µm (EMD Millipore, MA, USA).

Para o fracionamento da proteína LiD1 recombinante, utilizou-se cromatografia líquida de fase reversa em sistema HPLC modelo Shimadzu Prominence (Shimadzu Co., Japan), em duas etapas. Primeiro, o sobrenadante (10 mg) foi diluído em 1 mL de ácido trifluoracético (TFA, Sigma-Aldrich Co., USA) 0,1% em água pura e filtrada e aplicado na coluna semi-preparativa C4 (Grace Vydac, Inc., USA, dimensões 300 Å, 12 µm, 10 x 250 mm), previamente equilibrada com o mesmo solvente. A fase móvel consistiu em TFA 0,1% em acetonitrila grau HPLC previamente filtrada (ACN, Merck, Germany). O gradiente utilizado foi de 0 a 100% de ACN (v/v) no intervalo de tempo entre 40 e 180 minutos. O fluxo foi de 5 mL por minuto. As amostras foram monitoradas em absorvâncias de 214 e 280 nm. As frações obtidas foram concentradas por liofilização e aplicadas em gel de poliacrilamida SDS-PAGE. Dessa forma, a fração contendo reLiD1 foi identificada.

Em uma segunda etapa, a fração que continha reLiD1 (1 mg) foi diluída em 1 mL de ácido trifluoracético (TFA) 0,1% em água e aplicada na coluna analítica C18 modelo Shim-pack VP-ODS (Shimadzu Co., Japan, dimensões 120 Å, 5 µm, 4,6 x 150 mm), previamente equilibrada com o mesmo solvente. A fase móvel consistiu em TFA 0,1% em acetonitrila (ACN). O gradiente utilizado foi de 33 a 45% de ACN (v/v) em 40 minutos. O fluxo foi de 1 mL por minuto. As amostras foram monitoradas em absorvância de 214 nm. As frações obtidas foram concentradas por liofilização e aplicadas em gel de poliacrilamida SDS-PAGE.

Finalmente, a atividade dermonecrótica da reLiD1 foi avaliada em coelho e a massa molecular e o grau de pureza da proteína foram determinados por espectrometria de massas. A toxina foi estocada a -20°C para uso posterior.

Antes dos ensaios, foi acrescentado 5 mM de MgCl<sub>2</sub> à solução de reLiD1, a fim de incrementar a atividade enzimática.

#### **4.6.1.5. Resolução eletroforética em gel SDS-PAGE**

Foi utilizado o sistema de gel desnaturante SDS-PAGE (Laemmli, 1970), preparado em placas de vidro com dimensões 10,0 x 8,0 x 0,2 cm com espaçadores de 1 mm. O gel de separação era constituído de 12,5% (v/v) de



uma solução de: acrilamida/bisacrilamida 29:1 (p/p); Tris-HCl 0,4 M pH 8,8; SDS 0,1% (p/v); 50 mM de persulfato de amônia (PSA) e 0,05% (v/v) de TEMED. O gel de concentração era constituído de 4% (v/v) de uma solução de: acrilamida/bisacrilamida 29:1 (p/p); Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8; SDS 0,1% (p/v); PSA 50 mM e TEMED 0,025% (v/v). As amostras (10 µg) foram misturadas ao tampão de amostra desnaturante para SDS-PAGE 2X concentrado (100 mM de Tris-HCl pH 6,8; 4% de SDS; 0,2% de Azul de Bromofenol; 10% de β-mercaptoetanol; 20% de Glicerol), fervidas durante 5 minutos e aplicadas às canaletas do gel.

A eletroforese foi desenvolvida verticalmente com o tampão de eletroforese SDS-PAGE (0,3% Tris-HCl; 1,2% de glicina e 0,1% de SDS) a 120 V, 30 mA, durante aproximadamente 2 horas, até que o tampão da amostra atingisse o final do gel. Após a eletroforese, os géis foram revelados com a solução corante de Comassie Blue (0,25% de Comassie Blue, 45% de metanol, 9% ácido acético glacial) por 20 minutos (a 25°C) e lavados em solução descorante (45% metanol e 9% ácido acético glacial) até o desaparecimento da coloração de fundo.

#### **4.6.1.6. Espectrometria de massas**

A análise de espectrometria de massas foi realizada no Departamento de Bioquímica e Imunologia do ICB/UFMG. A amostra (1 µL) foi gotejada em uma placa de amostras (MTP AnchorChip 600/384) e misturada com o mesmo volume de uma solução de matriz ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico, na concentração de 10 mg/mL em acetonitrila 50%/ácido trifluoroacético 0,3%. Foi utilizado um espectrômetro de massas MALDI-TOF/TOF (Autoflex III Smartbeam, Bruker Daltonics, Germany), controlado pelo programa FlexControl 3.0 (Bruker Daltonics, Germany). O aparelho foi calibrado com padrão externo e o espectro foi obtido em modo positivo/linear (Bruker Daltonics, Germany). Os dados foram analisados no programa FlexAnalysis 3.0 (Bruker Daltonics, Germany).

#### 4.6.1.7. Atividade dermonecrótica

A fim de verificar se a proteína recombinante LiD1 estava ativa durante os processos de expressão e purificação, a capacidade de promover dermonecrose em coelho foi avaliada de forma qualitativa. Para isso, 20 µg de amostra foram diluídos em 0,1 mL de PBS 1X concentrado e injetados via i.d. no dorso de coelhos, em local previamente depilado. Os animais foram observados por 24 horas.

As amostras injetadas nos coelhos foram: controle negativo de cultura bacteriana *E. coli* BL21 com inserto e sem indução por IPTG, sobrenadante da lise bacteriana e, por fim, proteína recombinante purificada.

#### 4.6.2. Células e cultivo

Fibroblatos humanos (HFF-1, *human foreskin fibroblast*) foram adquiridos do banco de células do Rio de Janeiro (Associação Técnico Científica Paul Ehrlich, UFRJ, Brasil), catálogo número BCRJ0275. As HFF-1 foram mantidas em garrafas de cultura de 75 cm<sup>2</sup>, em meio DMEM High Glucose (LGC Biotecnologia, Brasil) suplementado com 15% v/v de soro fetal bovino (SFB), 100 U/mL penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, todos da Gibco (Life Technologies Corporation, USA).

Células endoteliais humanas (HUVEC, *human umbilical vein endothelial cells*) foram adquiridas da Gibco (Life Technologies Corporation, USA), catálogo número C-003-5C. As HUVECs foram mantidas em garrafas de cultura de 75 cm<sup>2</sup>, em meio M200PRF, com suplemento LSGS (2% v/v de soro fetal bovino, 1 µg/mL de hidrocortisona, 10 ng/mL de fator de crescimento epidérmico humano, 3 ng/mL de fator de crescimento de fibroblasto, 10 µg/mL de heparina), 100 U/mL penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, todos da Gibco (Life Technologies Corporation, USA).

As células foram mantidas em estufa úmida (Heal Force Bio-Meditech Holdings Limited, China) contendo 5% de CO<sub>2</sub>, a 37°C. As culturas foram observadas diariamente em microscópio óptico e repicadas utilizando-se tripsina-EDTA (Life Technologies Corporation, USA) sempre que atingiram 80% de confluência.

#### 4.6.3. Avaliação de viabilidade celular utilizando Alamar Blue®

O ensaio fluorimétrico/colorimétrico de Alamar Blue (Life Technologies Corporation, USA) utiliza um indicador de crescimento baseado na detecção de atividade metabólica. O sistema incorpora um indicador de oxidação-redução (REDOX) que fluoresce e muda de cor em resposta à redução química do meio de crescimento a partir do metabolismo celular. Dessa forma, a atividade metabólica inata das células testadas promove redução química do Alamar Blue. O crescimento continuado mantém o ambiente reduzido (indicador REDOX fluorescente, vermelho), enquanto a inibição do crescimento mantém o ambiente oxidado (indicador REDOX não fluorescente, azul) (Lancaster & Fields, 1996).

As células HUVEC e HFF-1 foram coletadas dos frascos de cultura utilizando-se tripsina-EDTA (Life Technologies Corporation, USA), que foi posteriormente inativada com DMEM + 10% SFB. A suspensão de células foi centrifugada a 180 x g por 7 minutos e suspensa em meio de cultura apropriado. Após a contagem em câmara de Neubauer, as células foram inoculadas em meio de cultura na densidade de  $10^4$  células/poço em placas de 96 poços e mantidas em estufa úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>, a 37°C, por 24 horas.

As células receberam tratamento com peçonha de *L. similis* ou com recLiD1 nas concentrações de 10, 20 e 50 µg/mL por intervalos de tempo de 12, 24 e 48 horas. Como controle positivo de viabilidade celular, foram utilizadas células sem tratamento. Já as células tratadas com o detergente Triton X-100 serviram como controle de morte celular. Os ensaios foram realizados em triplicata. Após o tempo de tratamento, foi acrescentado em cada poço 10% v/v do reagente Alamar Blue. A placa de cultura foi novamente incubada em estufa úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>, a 37°C, por 4 horas.

Após o tempo de incubação com o Alamar Blue, a placa foi levada a um leitor automático de microplacas (BioTek Instruments, Inc., USA) para leituras de absorbâncias a 570 e 600 nm.

Para calcular a diferença percentual de redução do meio entre células tratadas e controle não tratado (% de sobrevivência de células), foi realizado o seguinte cálculo, de acordo com instruções do fabricante:

$$\frac{(\epsilon_{OX})_{\lambda 2} A_{\lambda 1} - (\epsilon_{OX})_{\lambda 1} A_{\lambda 2} \text{ do teste}}{(\epsilon_{OX})_{\lambda 2} A^{\circ}_{\lambda 1} - (\epsilon_{OX})_{\lambda 1} A^{\circ}_{\lambda 2} \text{ do controle não tratado}} \times 100\%$$

Sendo que:

A = absorvância do poço teste

A° = absorvância do poço de controle positivo de viabilidade (não tratado)

$\lambda 1 = 570\text{nm}$

$\lambda 2 = 600\text{nm}$

$\epsilon_{OX}$  = coeficiente de extinção molar do Alamar Blue na forma oxidada

$\epsilon_{RED}$  = coeficiente de extinção molar do Alamar Blue na forma reduzida

570 nm:  $\epsilon_{RED}$  155,677;  $\epsilon_{OX}$  80,586

600 nm:  $\epsilon_{RED}$  14,652;  $\epsilon_{OX}$  117,216

#### 4.6.4. Determinação de atividade de fosfolipase D

A atividade de fosfolipase D da peçonha de *L. similis* e da recLiD1 (5 e 10  $\mu\text{g/mL}$ ) foi determinada utilizando-se o *Amplex<sup>®</sup> Red Phospholipase D Assay Kit* (Life Technologies Corporation, USA). A hidrólise da fosfatidilcolina (lecitina) em colina e ácido fosfatídico foi detectada indiretamente. A oxidação da colina tem como produto  $\text{H}_2\text{O}_2$ , que gera um produto fluorescente, a resofurina, em contato com os reagentes do kit. Como controle positivo, foi utilizado 10  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Os reagentes do kit sem fosfatidilcolina foram usados como controle negativo. As amostras foram analisadas em triplicata e a fluorescência (excitação 560 nm, emissão 590 nm) foi medida em leitor de placas Cary Eclipse (Varian, Agilent Technologies, USA).

#### 4.6.5. Liberação de citocinas e quimiocinas

As células HFF-1 foram coletadas dos frascos de cultura utilizando-se tripsina-EDTA (Life Technologies Corporation, USA), que foi posteriormente inativada com DMEM + 10% SFB. A suspensão de células foi centrifugada a 180 x g por 7 minutos e suspensa em meio de cultura apropriado. Após a contagem em câmara de Neubauer, as células foram inoculadas em meio de cultura na densidade de  $2 \times 10^5$  células/poço em placas de 24 poços e mantidas em estufa úmida contendo 5% de  $\text{CO}_2$ , a 37 °C, por 24 horas.

No dia seguinte, as células HFF-1 foram cuidadosamente lavadas três vezes com PBS e meio de cultura sem SFB e mantidas em estufa por mais 4 horas. O meio de cultura foi novamente trocado, sem SFB, e os tratamentos em triplicata foram iniciados. O antagonista de receptor para LPA (LPA<sub>1</sub> e LPA<sub>3</sub>) Ki16425 foi acrescentado na concentração de 15 µM aos poços que deveriam receber tal droga e a placa foi incubada em estufa por 30 minutos. Após esse tempo, foram acrescentados aos devidos poços: peçonha de *L. similis* 10 µg/mL, recLiD1 10 µg/mL, ambas pré-incubadas por 1 hora a 37°C com lisofosfatidilcolina (LPC 10 µM, com albumina livre de ácidos graxos a 5 mg/mL), LPA 15 µM e TNF-α 10 ng/mL. Poços com células não tratadas foram mantidos como controle negativo. O tratamento apenas com LPC 10 µM também foi utilizado como controle.

Após os tratamentos, a placa foi mantida em estufa úmida, contendo 5% de CO<sub>2</sub>, a 37°C. Depois de 12 horas de incubação, o meio de cultura de cada poço foi retirado, transferido para microtubo e estocado a -80°C até a dosagem de citocinas e quimiocinas.

Nesses ensaios, foram dosadas citocinas e quimiocinas humanas, utilizando-se kits de ELISA específicos para IL-6, IL-8, IL-1β, RANTES (todos da Life Technologies Corporation, USA), CXCL1 (Abnova Corporation, Taiwan) e CXCL2 (Immuno-Biological Laboratories Co., Japan). Os meios de cultura das células estimuladas foram acrescentados em placas de ELISA previamente tratadas com anticorpos específicos para citocinas e quimiocinas humanas e os ensaios foram conduzidos de acordo com instruções dos fabricantes.

#### **4.6.6. Avaliação de morte celular: apoptose e necrose**

Uma característica marcante de apoptose é a modificação da morfologia celular. A fosfatidilserina (PS) é um fosfolípido de membrana carregado negativamente, normalmente presente na face interna da membrana de células viáveis. Devido a modificações na membrana celular, a translocação do PS para a superfície externa é um evento precoce de apoptose que serve como sinal para ataque por células fagocitárias. A anexina V é uma proteína que possui alta afinidade por membranas contendo PS. Dessa forma, é uma boa ferramenta para avaliação quantitativa de células em estágios precoces e

intermediários de apoptose (Martin *et al.*, 1995; Vermes *et al.*, 1995; Casciola-Rosen *et al.*, 1996).

Na necrose, ou morte celular por supressão metabólica e lise, ocorre tumefação de toda a célula e das respectivas organelas. É um processo causado por permeabilização precoce da membrana celular. Por isso, a necrose é facilmente detectada *in vitro* por um marcador que se liga ao DNA da célula, como o 7-aminoactinomicina D (7-AAD). Assim, células viáveis e em estágios precoces e intermediários de apoptose, ainda metabolicamente ativas, não permitem a entrada do 7-AAD. Já células em estágio tardio de apoptose, que perdem a integridade da membrana celular, são duplamente marcadas por anexina V e 7-AAD (Majno & Joris, 1995).

Para esse ensaio, as células HUVEC e HFF-1 foram coletadas dos frascos de cultura utilizando-se tripsina-EDTA (Life Technologies Corporation, USA), que foi posteriormente inativada com DMEM + 10% SFB. A suspensão de células foi centrifugada a 180 x g por 7 minutos e suspensa em meio de cultura apropriado. Após a contagem em câmara de Neubauer, as células foram inoculadas em meio de cultura na densidade de  $10^5$  células/poço em placas de 24 poços e mantidas em estufa úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>, a 37°C, por 24 horas.

No dia seguinte, o meio de cultura foi trocado e os tratamentos em triplicata foram iniciados. O antagonista de receptor para LPA (LPA<sub>1</sub> e LPA<sub>3</sub>) Ki16425 foi acrescentado na concentração de 15 µM aos poços que deveriam receber tal droga e a placa foi incubada em estufa por 30 minutos. Após esse tempo, foram acrescentados aos devidos poços: LPA 15 µM, peçonha de *L. similis* 10 µg/mL e reclID1 10 µg/mL, as duas últimas pré-incubadas por 1 hora a 37°C com lisofosfatidilcolina (LPC 10 µM, com albumina livre de ácidos graxos a 5 mg/mL). Poços com células não tratadas foram mantidos como controle negativo. O tratamento apenas com LPC 10 µM também foi utilizado como controle.

A placa foi mantida em estufa úmida, contendo 5% de CO<sub>2</sub>, a 37°C por 48 horas. Estaurosporina 2 µM em tratamento de 4 horas foi utilizada como controle positivo de apoptose.

Após o tempo de incubação, as células foram coletadas por tripsinização e centrifugadas por 5 minutos a 400 x g. Após lavagem com PBS 1X concentrado, as células foram suspensas em 500 µL de tampão de ligação (Enzo Life Sciences Inc., USA). Como controle positivo de necrose, células em suspensão não tratadas foram incubadas com 10% de metanol grau HPLC (Merck, Germany) por 30 minutos no gelo. Foram acrescentados às células suspensas em tampão de ligação 5 µL de 7-AAD e 5 µL de anexina V-Cy3 (Enzo Life Sciences Inc., USA). Aos controles de necrose e apoptose foram adicionados apenas o devido marcador. Seguiu-se incubação por 15 minutos, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. As amostras foram imediatamente submetidas à análise por citometria de fluxo (FACScan, Becton Dickinson and Company, USA), utilizando-se o canal FL2 para detecção de anexina V-Cy3 e o canal FL3 para detecção de 7-AAD. Primeiro, os parâmetros de leitura foram compensados com os controles positivos e negativos. Depois, as marcações das amostras tratadas foram lidas. O programa FlowJo (Tree Star Inc., USA) foi utilizado para análise dos dados e determinação da porcentagem de células marcadas com anexina V-Cy3, 7-AAD ou duplo-marcadas.

#### **4.6.7. Análise estatística**

Todos os parâmetros avaliados foram representados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM).

O teste ANOVA Two-way, seguido do teste de Bonferroni, foi utilizado para a comparação entre as médias de valores distintos de um grupo e as médias de valores de um segundo grupo. Valores de  $P < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos. Os cálculos e análises estatísticas foram realizados utilizando-se o programa Graph Pad Prism 4.0 (GraphPad Software, USA).

# Resultados



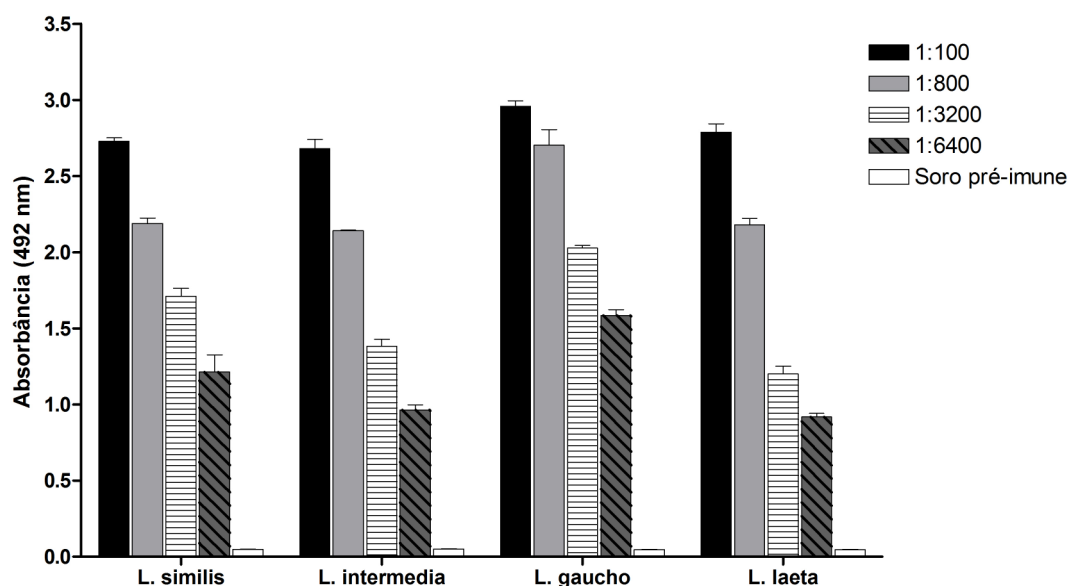
## 5. RESULTADOS

### 5.1. Caracterização do soro anti-*L. similis*

#### 5.1.1. Avaliação de reatividade cruzada imunológica

O soro produzido especificamente contra a peçonha da aranha *L. similis* mostrou forte reatividade cruzada contra as peçonhas de outras espécies de aranhas *Loxosceles* de importância médica no Brasil.

A figura 5 mostra a titulação do soro anti-*L. similis* (1:100, 1:800, 1:3200, 1:6400) em placas de ELISA sensibilizadas com as peçonhas de *L. similis*, *L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta*.

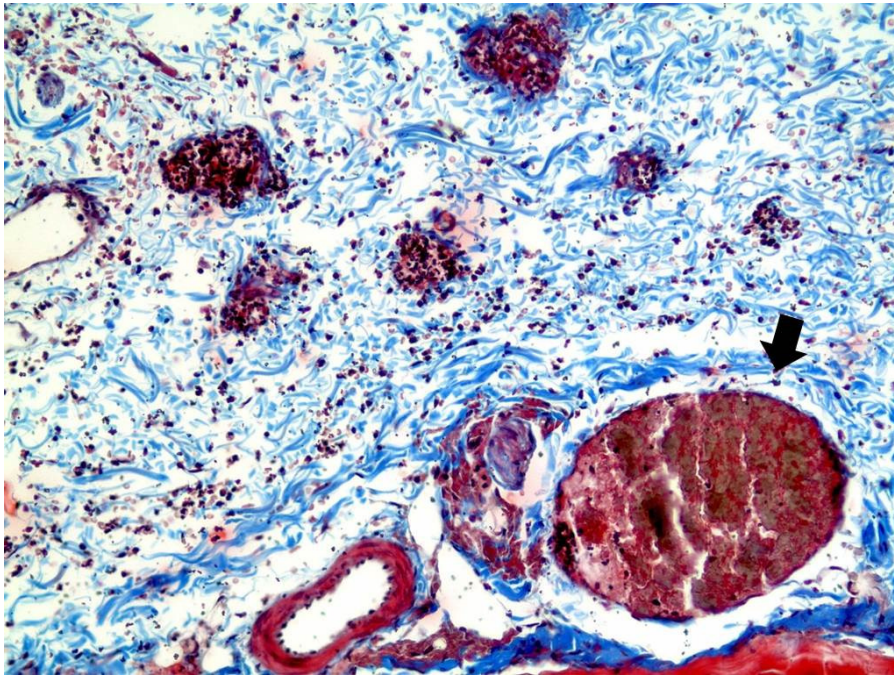


**Figura 5:** Reatividade do soro anti-*L. similis* contra as peçonhas de *L. similis*, *L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta*. O soro pré-imune de coelho foi utilizado como controle negativo. A placa de ELISA foi sensibilizada com peçonhas de *L. similis*, *L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta* (5 µg/mL). O gráfico mostra os valores de absorbância a 492 nm obtidos da titulação do soro anti-*L. similis* nas diluições 1:100, 1:800, 1:3200 e 1:6400. Os valores representam média ± EPM de três ensaios.

#### 5.1.2. Neutralização *in vivo*: Análises histológicas

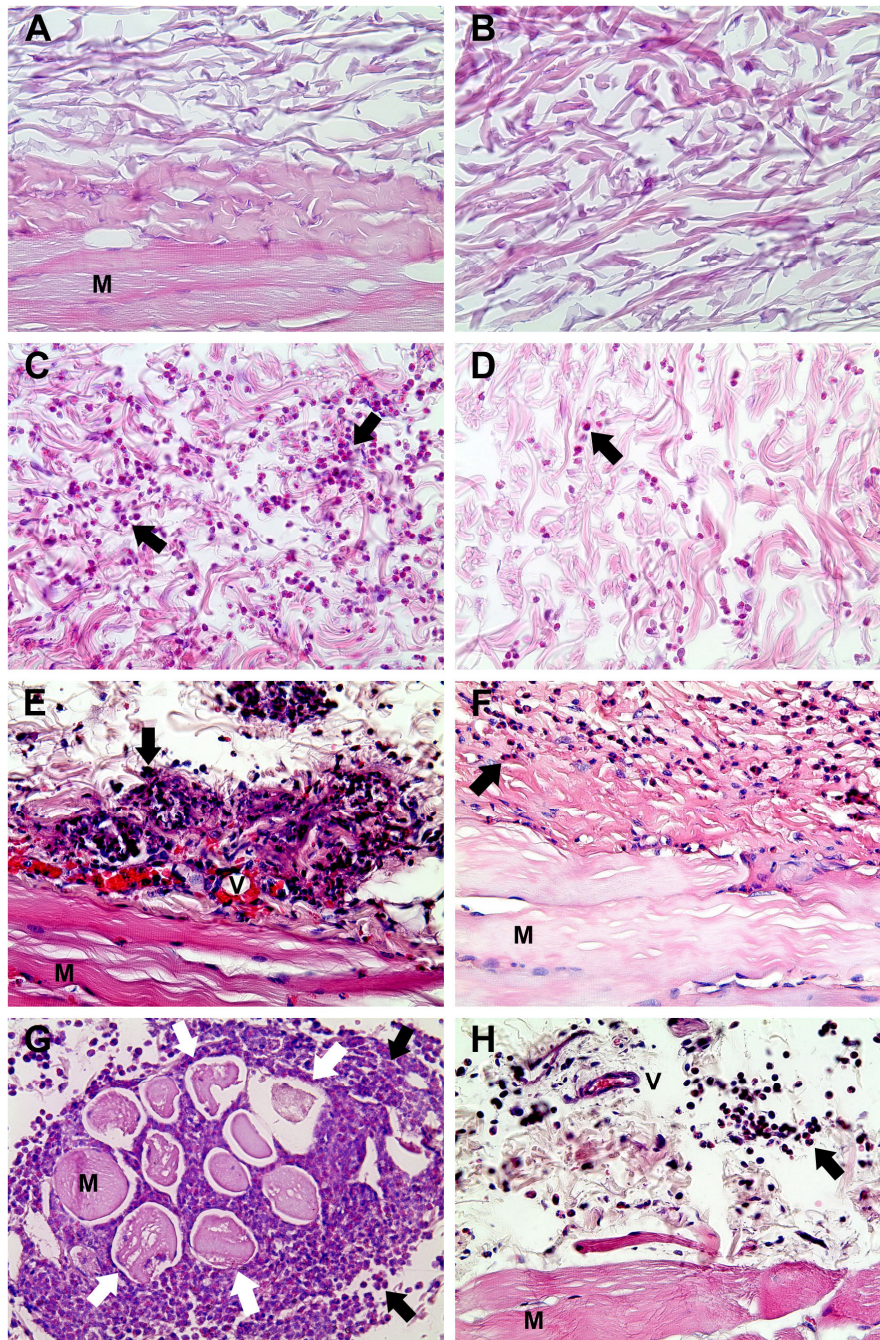
Análises histológicas de pele de coelho após injeção i.d. da peçonha de *L. similis* (3 µg), previamente incubada com soro pré-imune, mostraram denso infiltrado inflamatório na derme, com numerosos neutrófilos e alguns

eosinófilos. A peçonha também induziu edema, hiperemia, hemorragia e trombose (Figura 6).

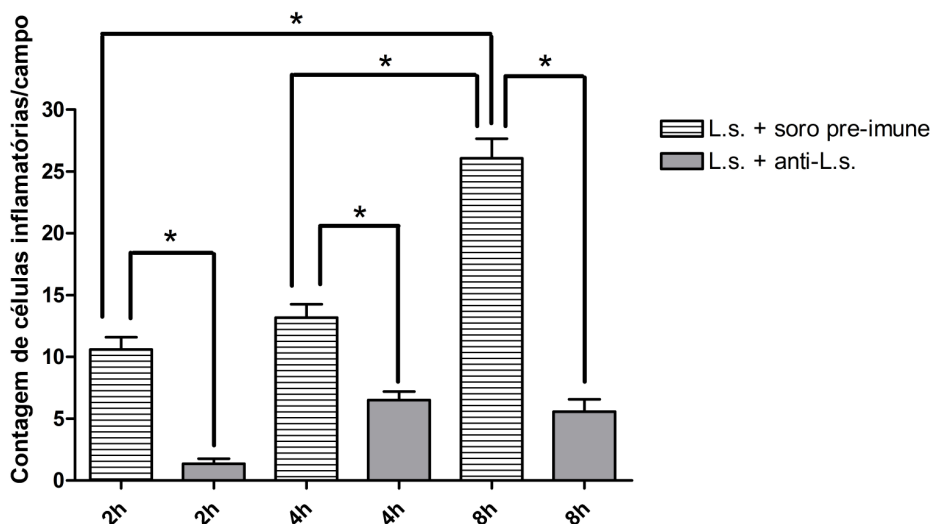


**Figura 6:** Análise em microscopia de luz de cortes de pele de coelho corados com Tricrômio de Masson (aumento de 200X). Visão geral de reação inflamatória da derme observada 4 horas após injeção intradérmica de 3 µg da peçonha de *L. similis* previamente incubada com soro pré-imune. A seta preta aponta para vaso sanguíneo hiperemiado.

O acúmulo de células inflamatórias já foi observado no primeiro intervalo de tempo analisado, 2 horas após a administração da peçonha, e continuou após 4 e 8 horas (Figura 7C, E, G). A contagem dessas células em campos aleatórios aponta que o infiltrado inflamatório foi significativamente maior 8 horas após a injeção de peçonha quando comparado aos tempos de 2 e 4 horas. Não houve diferença estatística na quantidade de células entre 2 e 4 horas (Figura 8).



**Figura 7:** Análise em microscopia de luz de cortes de pele de coelho corados com Hematoxilina-Eosina (aumento de 400X). A administração de PBS foi realizada como controle (A, B). As setas pretas apontam denso infiltrado inflamatório 2, 4 e 8 horas após injeção intradérmica de 3  $\mu$ g da peçonha de *L. similis* com soro pré-imune (C, E, G, respectivamente). A peçonha causou degeneração e necrose musculares (setas brancas) dentro de 8 horas (G). A pré-incubação da peçonha com soro anti-*L. similis* reduziu de forma significativa o infiltrado inflamatório após 2, 4 e 8 horas (D, F, H, respectivamente), por comparação aos mesmos períodos de ação da peçonha com soro pré-imune. Adicionalmente, o soro específico preveniu degeneração e necrose musculares (H). Notas: M = músculo; V = vaso.

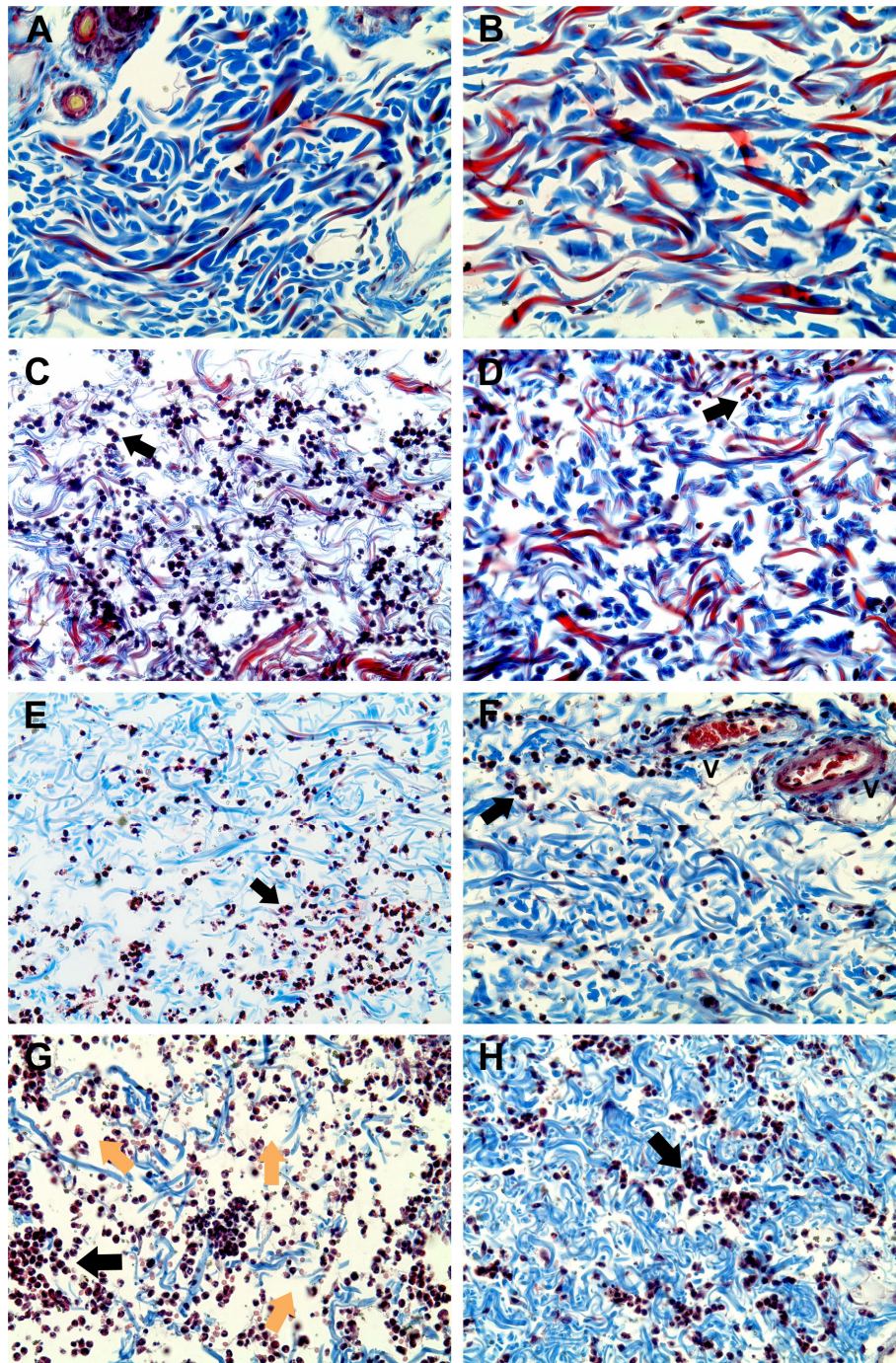


**Figura 8:** Contagem de células inflamatórias por campo em lâminas de cortes de pele de coelho 2, 4 e 8 horas após administração intradérmica de 3 µg da peçonha de *L. similis* (L.s.) pré-incubada com soro pré-imune ou com soro anti-*L. similis*. Os valores representam a média ± EPM da contagem em 30 campos. \* $P < 0,05$  (ANOVA *Two-way* seguido de Bonferroni).

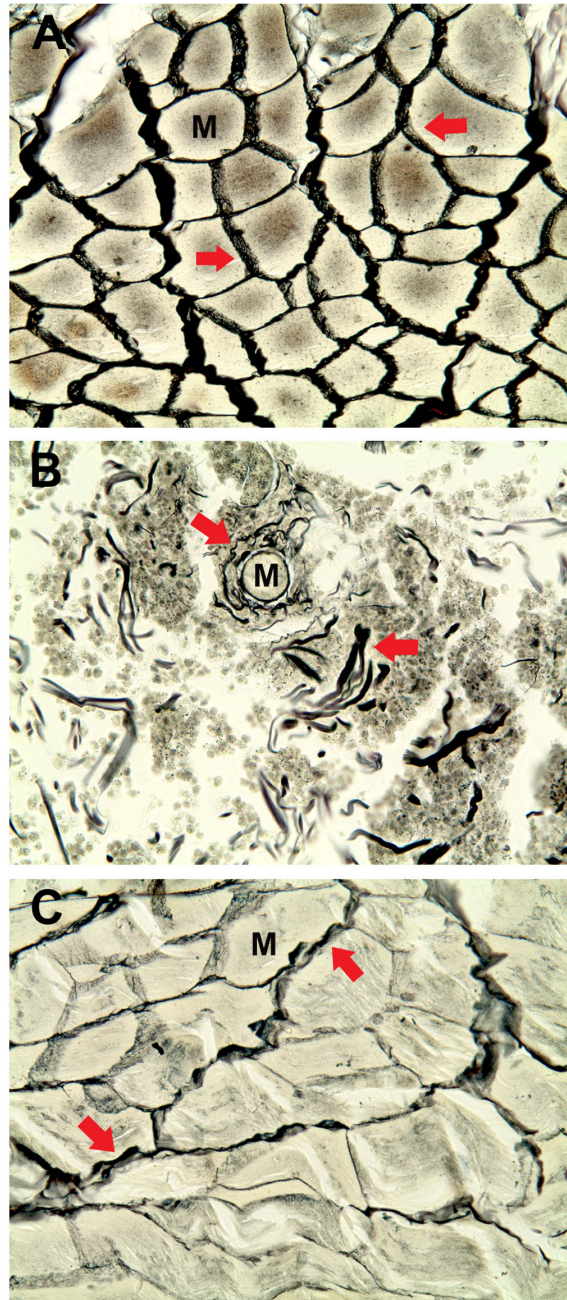
A coloração com Tricrômio de Masson evidenciou a dissociação de fibras colágenas na derme provocada pela peçonha de *L. similis*. Tal efeito é observado predominantemente 8 horas após a administração da peçonha incubada anteriormente com soro pré-imune (Figura 9C, E, G).

A peçonha de *L. similis* promoveu degeneração e necrose musculares em folículos pilosos e no tecido subcutâneo 8 horas após a administração (Figura 7G). A coloração de reticulina evidenciou como ação da peçonha o rompimento das fibras reticulares, que servem como uma rede de suporte às células musculares e às células da derme (Figura 10B).

A pré-incubação com o soro anti-*L. similis* neutralizou consideravelmente os efeitos da peçonha em pele de coelho. Comparando-se os efeitos da peçonha com soro controle pré-imune *versus* soro específico, as figuras 7, 8 e 9 mostram que o soro anti-*L. similis* reduziu de forma significativa o infiltrado inflamatório em todos os tempos de tratamento. Ademais, o soro específico contra a peçonha preveniu degeneração e necrose musculares (Figura 7H) e a extensão do edema na derme (Figura 9H). Por fim, a figura 10C destaca que as fibras reticulares foram preservadas quando a peçonha foi inoculada com o soro específico.



**Figura 9:** Análise em microscopia de luz de cortes de pele de coelho corados com Tricrômio de Masson (aumento de 400X). A administração de PBS foi realizada como controle (A, B). Além do denso infiltrado inflamatório (setas pretas), a dissociação de fibras colágenas na derme ocorreu 2, 4 e 8 horas após injeção intradérmica de 3  $\mu$ g da peçonha de *L. similis* com soro pré-imune (C, E, G, respectivamente). As setas alaranjadas evidenciam o edema marcante observado em 8 horas (G). A pré-incubação da peçonha com soro anti-*L. similis* reduziu de forma significativa o infiltrado inflamatório e o edema após 2, 4 e 8 horas (D, F, H, respectivamente), por comparação aos mesmos períodos de ação da peçonha com soro pré-imune. Notas: fibras colágenas estão coradas em azul; V = vaso.



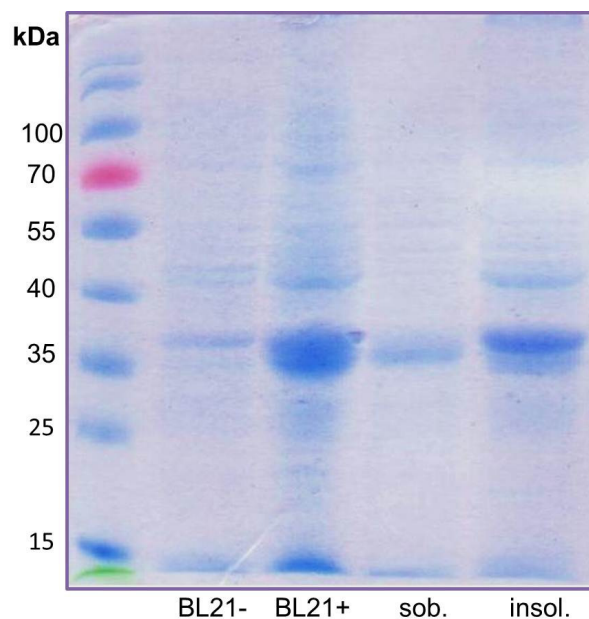
**Figura 10:** Análise em microscopia de luz de cortes de pele de coelho corados com Reticulina (aumento de 400X). A administração de PBS foi realizada como controle (A). As setas vermelhas apontam para as fibras reticulares, circundando o músculo subcutâneo, cuja ruptura pode ser observada 8 horas após injeção intradérmica de 3  $\mu$ g da peçonha de *L. similis* com soro pré-imune (B). A pré-incubação da peçonha com soro anti-*L. similis* preservou as fibras reticulares após 8 horas (C). Notas: fibras reticulares estão coradas em preto; M = músculo.

## 5.2. Caracterização da peçonha de *L. similis*: participação do LPA nas ações da peçonha de *L. similis* e da recLiD1

### 5.2.1. Expressão, purificação e caracterização da recLiD1

Após o sequenciamento do clone contendo a LiD1, foi realizado um consenso das sequências, utilizando-se iniciadores diretos e reversos. A sequência consenso foi analisada no banco de dados Blast e apresentou 100% de similaridade e identidade ( $E\ value = 0$ ) com a sequência de LiD1 depositada.

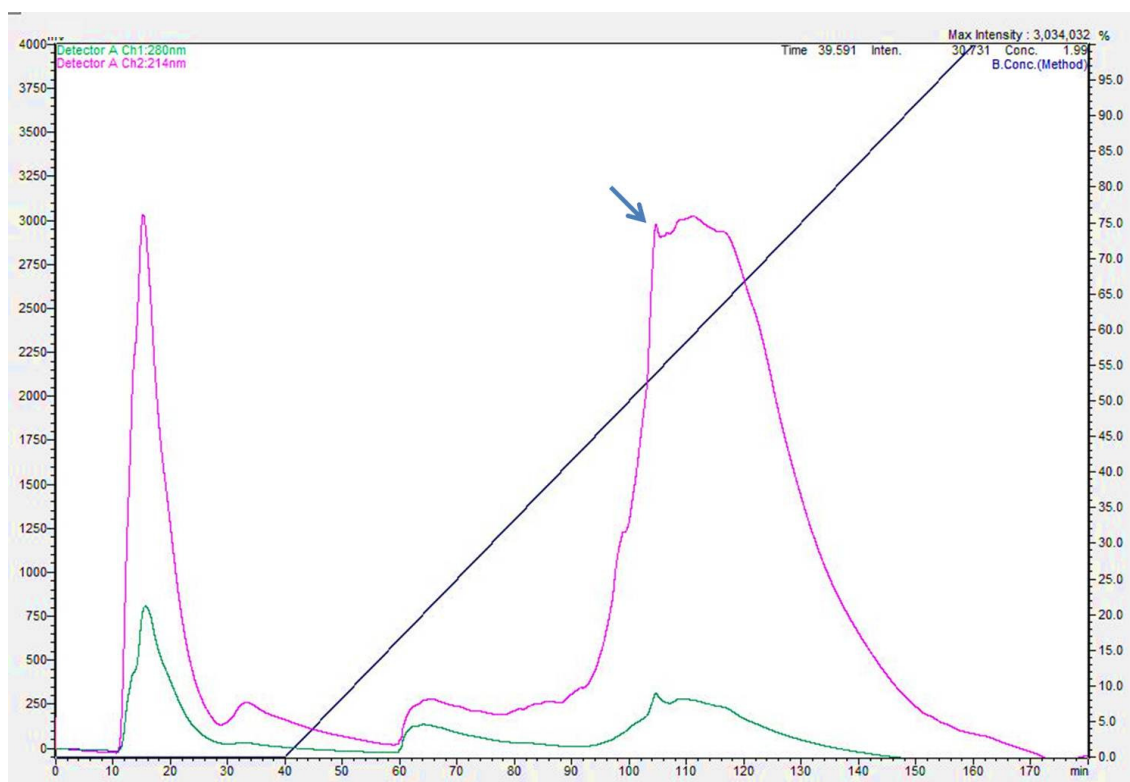
O gel de eletroforese da figura 11 mostra a proteína recombinante LiD1 após expressão e lise bacteriana. A maior quantidade de proteína, visualizada na banda de aproximadamente 35 kDa, encontrava-se no precipitado, na forma de corpos de inclusão. Contudo, o sobrenadante solúvel continha quantidade de proteína recombinante suficiente para purificação. Dessa forma, o sobrenadante foi escolhido para utilização nas etapas seguintes devido à maior facilidade de manipulação.



**Figura 11:** Eletroforese em gel de poliacrilamida a 12,5%. A primeira canaleta é o padrão de massa molecular pré-corado (Thermo Fischer Scientific, Inc., USA). A segunda e a terceira canaletas mostram, respectivamente, cultura de bactéria *E. coli* BL21 (DE3) com inserto sem indução da expressão (BL21-) e após 16 horas de indução por IPTG (BL21+). A quarta e a quinta canaletas contêm, respectivamente, a fração solúvel (sob.) e a fração insolúvel (insol.) de recLiD1 obtidas após a lise bacteriana. As amostras foram aplicadas na quantidade de 10 µg.

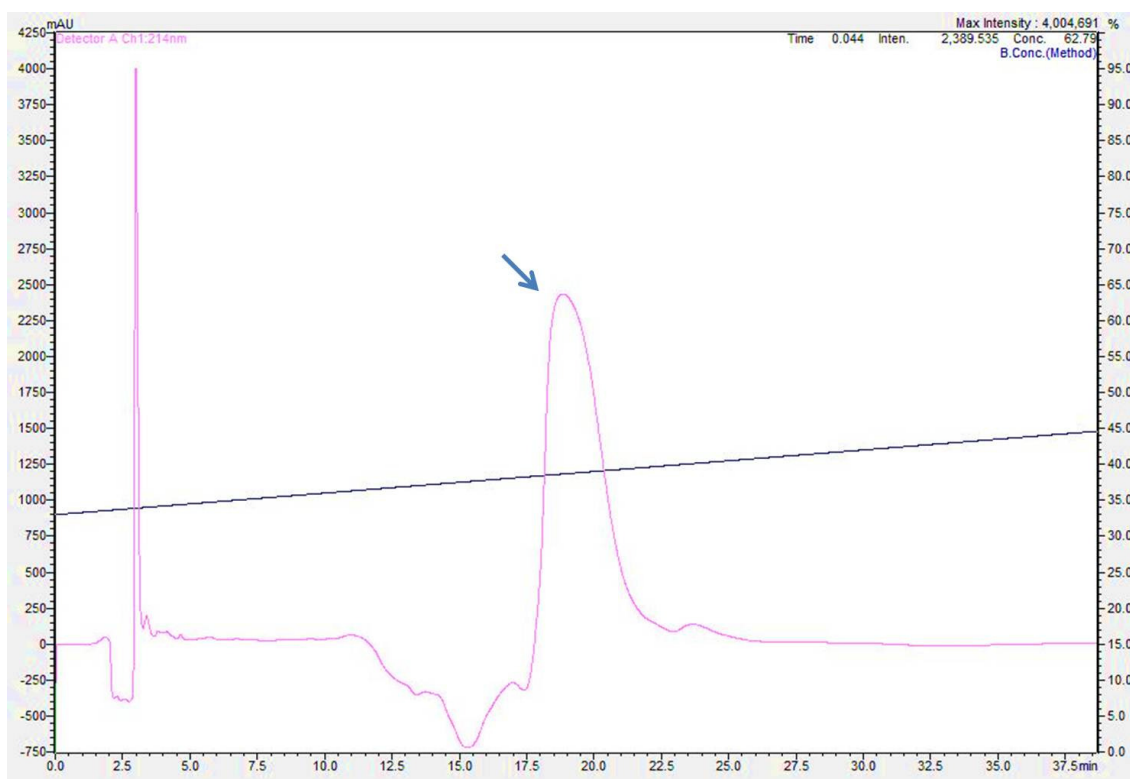
Assim, a fração solúvel presente no sobrenadante após lise bacteriana foi submetida à cromatografia de fase reversa em coluna semi-preparativa C4, a fim de separar a proteína do extrato bacteriano. A figura 12 mostra o perfil cromatográfico do sobrenadante.

A fração da primeira etapa de cromatografia, na qual foi identificada a recLiD1 em gel de poliacrilamida SDS-PAGE, foi submetida a nova etapa de fracionamento. A figura 13 mostra o perfil cromatográfico da recLiD1 em coluna analítica C18.



**Figura 12:** Perfil cromatográfico do sobrenadante da lise bacteriana em coluna semi-preparativa C4. O sobrenadante (10 mg) foi diluído em 1 mL de ácido trifluoracético (TFA) 0,1% em água e aplicado na coluna previamente equilibrada com o mesmo solvente. A fase móvel consistiu em TFA 0,1% em acetonitrila (ACN). O gradiente utilizado foi de 0 a 100% de ACN (v/v) no intervalo de tempo entre 40 e 180 minutos. O fluxo foi de 5 mL por minuto. As amostras foram monitoradas em absorvâncias de 214 nm (linha rosa) e 280 nm (linha verde). A seta azul destaca a fração que contém a recLiD1.

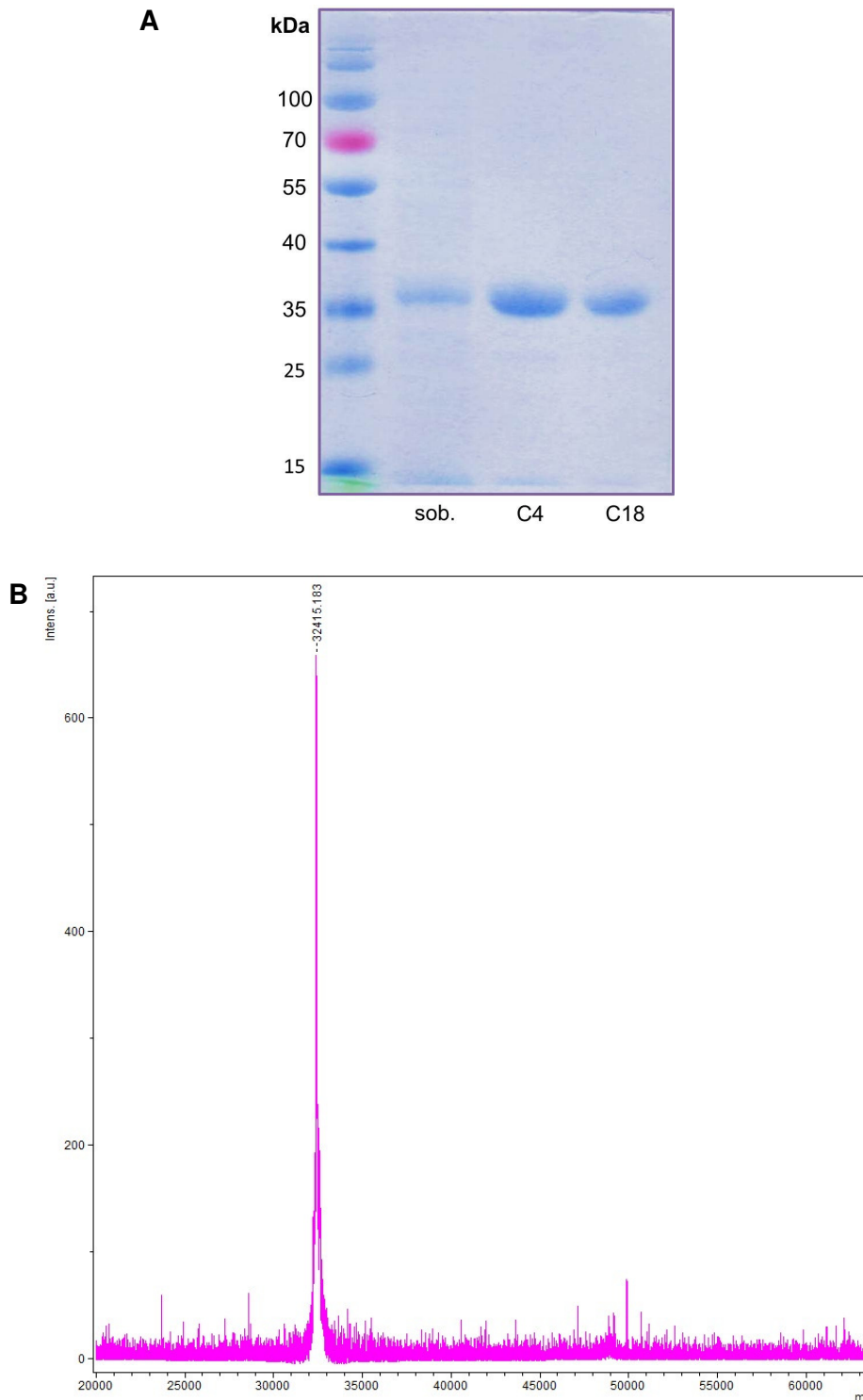




**Figura 13:** Perfil cromatográfico da recLiD1 em coluna analítica C18. A fração contendo a recLiD1 (1 mg) foi diluída em 1 mL de ácido trifluoracético (TFA) 0,1% em água e aplicada na coluna previamente equilibrada com o mesmo solvente. A fase móvel consistiu em TFA 0,1% em acetonitrila (ACN). O gradiente utilizado foi de 33 a 45% de ACN (v/v) em 40 minutos. O fluxo foi de 1 mL por minuto. As amostras foram monitoradas em absorbância de 214 nm (linha rosa). A seta azul destaca a fração que contém a recLiD1 (A).

A figura 14A apresenta o perfil de separação em gel de poliacrilamida SDS-PAGE do sobrenadante da lise bacteriana e das frações obtidas nas duas etapas de fracionamento. Para confirmar a purificação da recLiD1, analisamos tal proteína por espectrometria de massas. O espectro revela um componente de alto grau de pureza, com massa molecular aproximada de 32,4 kDa (Figura 14B).

A dosagem pelo método de Bradford da recLiD1 purificada em coluna C18 mostrou um rendimento aproximado de 8,5 mg de recLiD1 por litro de cultura expressa.



**Figura 14:** Análise de recLiD1 em gel de poliacrilamida e espectrometria de massas. (A) Eletroforese em gel de poliacrilamida a 12,5%. A primeira canaleta mostra o padrão de massa molecular pré-corado (Thermo Fischer Scientific, Inc., USA). Nas canaletas seguintes, foram aplicados 10  $\mu$ g de sobrenadante da lise bacteriana (sob.), fração obtida de cromatografia em coluna C4 e fração obtida na segunda etapa de cromatografia em coluna C18. (B) Espectro de massas da recLiD1, revelando uma proteína com massa aproximada de 32,4 kDa.

Finalmente, a atividade dermonecrótica da recLiD1 foi avaliada em coelho. As fotos da figura 15 mostram os efeitos, após injeção intradérmica em pele de coelho, da recLiD1 purificada (C), bem como do controle negativo (A) e do sobrenadante da lise bacteriana contendo a recLiD1 (B). Por meio desse ensaio, verificou-se que a proteína recLiD1 expressa e purificada estava ativa quanto ao efeito necrótico em pele de coelho.

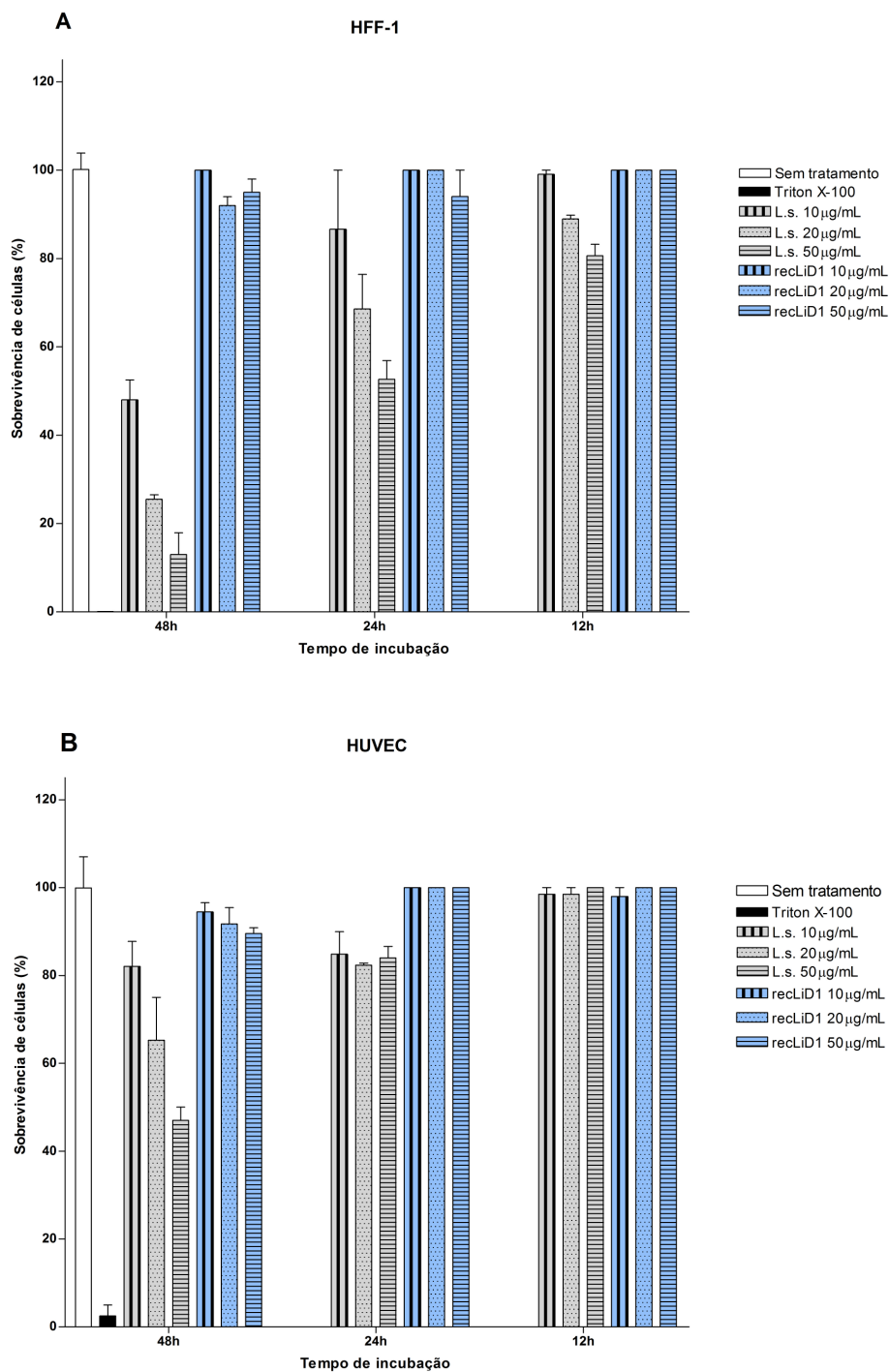


**Figura 15:** Atividade dermonecrótica em coelho. Para avaliar a atividade dermonecrótica durante os processos de expressão e purificação da recLiD1, 20  $\mu\text{g}$  de controle de bactéria *E. coli* BL21 com inserto e sem indução por IPTG (A), sobrenadante da lise bacteriana contendo recLiD1 (B) e recLiD1 purificada (C) foram diluídos em 0,1 mL de PBS 1X e injetados via i.d. no dorso de coelhos, em local previamente depilado. Os animais foram observados por 24 horas.

### 5.2.2. Avaliação de viabilidade celular utilizando Alamar Blue®

Os efeitos da peçonha bruta de *L. similis* e da proteína recLiD1 sobre a viabilidade celular de HFF-1 e HUVEC, nas concentrações de 10, 20 e 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , foram determinados após incubação por 12, 24 e 48 horas. Os gráficos da figura 16 representam a porcentagem de sobrevivência de células diante de cada tratamento.

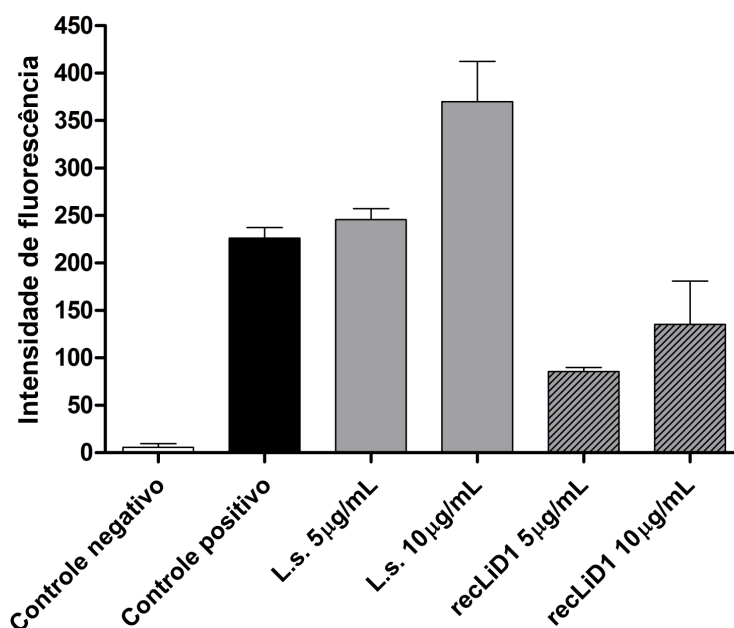
Pelo método utilizado, observou-se que a ação da peçonha nas células foi mais acentuada do que a ação da recLiD1. Os efeitos nocivos à viabilidade celular foram crescentes com a concentração utilizada e com o tempo de incubação das células tratadas.



**Figura 16:** Viabilidade celular com indicador Alamar Blue. Porcentagem de sobrevivência de células HFF-1 (A) e HUVEC (B) após tratamento com peçonha de *L. similis* (L.s.) ou recLiD1 (ambas a 10, 20 e 50 µg/mL) por 12, 24 ou 48 horas. Células não tratadas representam o controle positivo de viabilidade celular. Células tratadas com o detergente Triton X-100 são o controle negativo para viabilidade. Os valores representam a média  $\pm$  EPM de três experimentos.

### 5.2.3. Determinação de atividade de fosfolipase D

A fim de verificar a ação de fosfolipase D da peçonha bruta de *L. similis* e da recLiD1, ambas foram incubadas com fosfatidilcolina, nas concentrações de 5 e 10  $\mu\text{g/mL}$ . A figura 17 apresenta a intensidade de fluorescência da reação de detecção indireta da hidrólise de fosfatidilcolina. Atividades de fosfolipase D foram observadas tanto para peçonha bruta quanto para recLiD1, sendo que a primeira foi mais intensa.



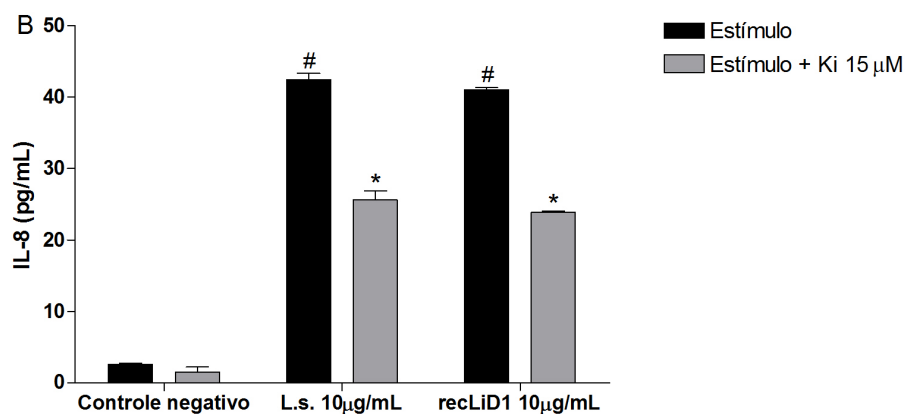
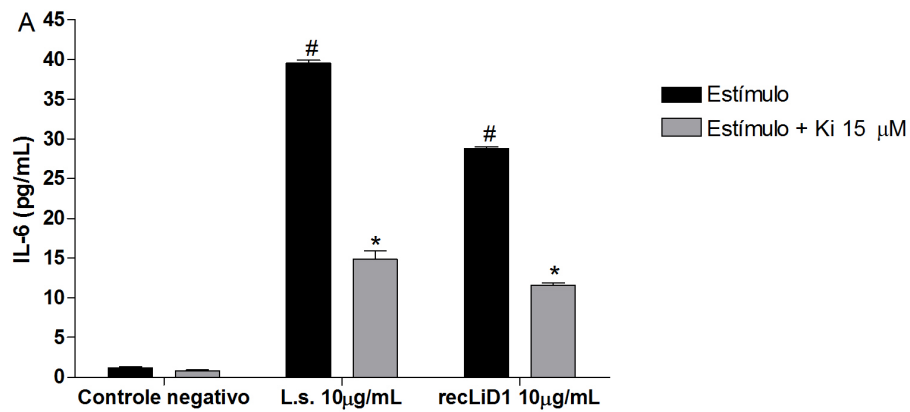
**Figura 17:** Determinação da atividade de fosfolipase D da peçonha de *L. similis* (L.s.) e da recLiD1 (5 e 10  $\mu\text{g/mL}$ ) utilizando-se o kit Amplex® Red Phospholipase D Assay (Life Technologies Corporation, USA). A hidrólise da fosfatidilcolina (lecitina) em colina e ácido fosfátídico foi detectada indiretamente por geração de  $\text{H}_2\text{O}_2$  proveniente da oxidação da colina. Como controle positivo, foi utilizado 10  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Os reagentes do kit sem fosfatidilcolina foram usados como controle negativo. A intensidade de fluorescência foi determinada (excitação 560 nm, emissão 590 nm). Os valores representam a média  $\pm$  EPM de três experimentos.

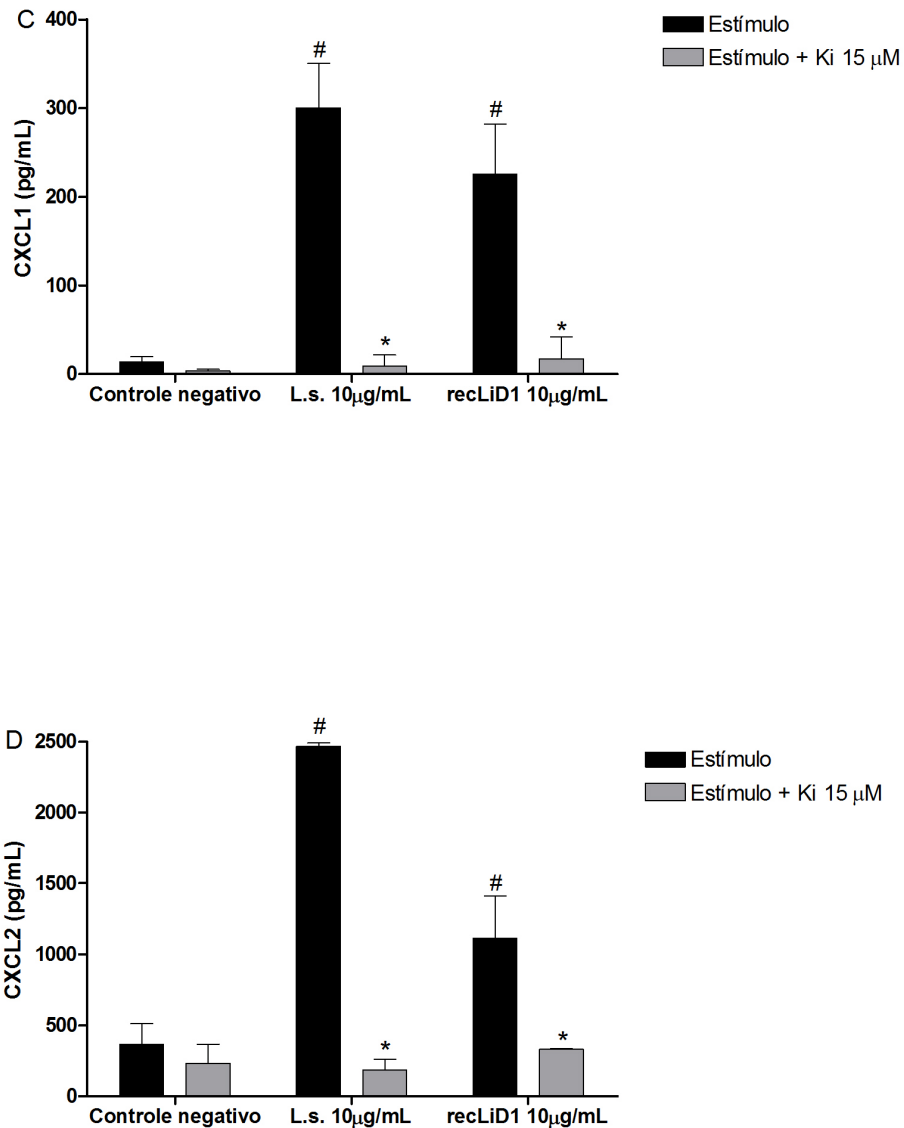
### 5.2.4. Liberação de citocinas e quimiocinas

Em células HFF-1, os tratamentos de 12 horas com peçonha de *L. similis* e com recLiD1 a 10  $\mu\text{g/mL}$  promoveram liberação significativa das citocinas e quimiocinas IL-6, IL-8, CXCL-1 e CXCL-2, em comparação com as células não tratadas (Figura 18). No entanto, a peçonha e a recLiD1 não

induziram aumento dos níveis de IL-1 $\beta$  e RANTES no meio. O valor médio de leitura para LPC apenas foi descontado nas leituras de peçonha e de recLiD1. O controle TNF- $\alpha$  10 ng/mL promoveu intensa liberação das citocinas e quimiocinas dosadas (dados não mostrados).

O co-tratamento das células com 15  $\mu$ M de Ki16425, antagonista de receptor para LPA (LPA<sub>1</sub> e LPA<sub>3</sub>), inibiu significativamente a liberação de IL-6, IL-8, CXCL1 e CXCL2 induzida pela peçonha de *L. similis* e pela recLiD1 (Figura 18). Os mesmos resultados foram obtidos com o controle LPA 15  $\mu$ M, sendo que o Ki16425 inibiu o efeito do LPA (dados não mostrados).





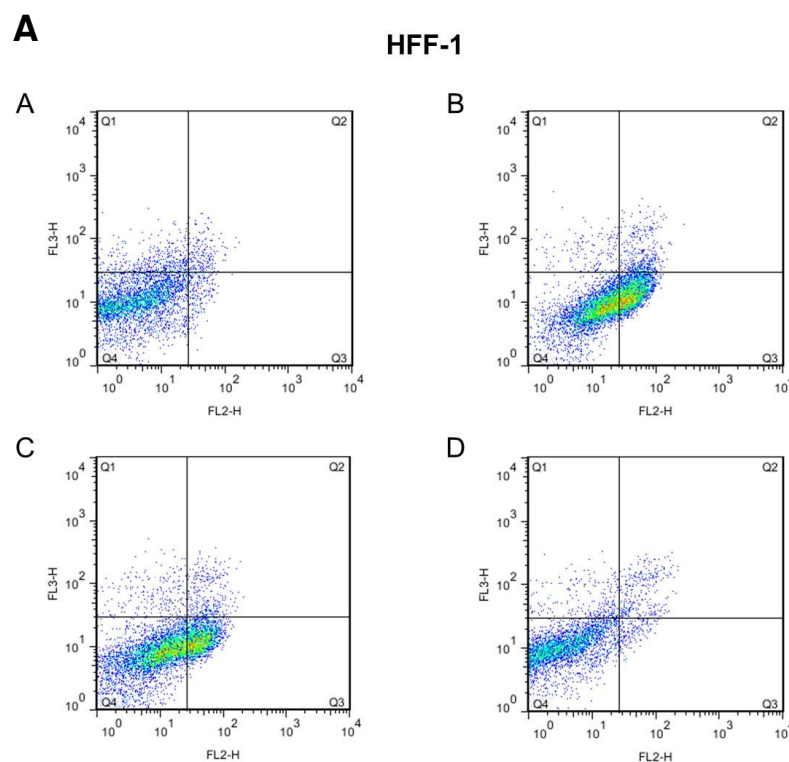
**Figura 18:** Dosagens em pg/mL das citocinas/quimiocinas IL-6 (A), IL-8 (B), CXCL1 (C) e CXCL2 (D) após incubação de células HFF-1 por 12 horas com peçonha de *L. similis* (L.s. 10 µg/mL) ou recLiD1 (10 µg/mL), ambas pré-incubadas com lisofosfatidilcolina (LPC 10 µM, com 5 mg/mL de albumina livre de ácidos graxos) por 1 hora a 37°C, com ou sem Ki16425 15 µM. Células não tratadas foram utilizadas como controle negativo. As dosagens foram realizadas usando kits de ELISA específicos para citocinas e quimiocinas humanas. Os valores representam a média ± EPM de três experimentos. <sup>#</sup>P<0,05 comparado ao grupo controle; <sup>\*</sup>P<0,05 comparado ao grupo estímulo com L.s. e recLiD1 (ANOVA *Two-way* seguido de Bonferroni).

### 5.2.5. Avaliação de morte celular: apoptose e necrose

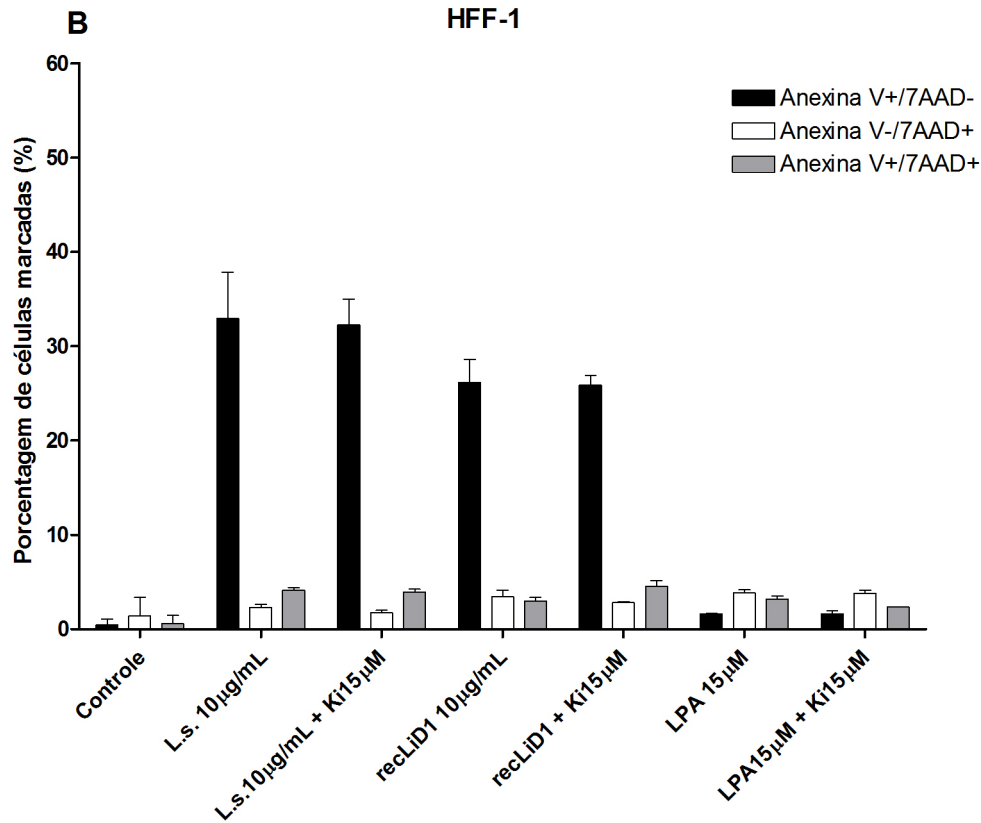
Após a incubação de HFF-1 com diferentes tratamentos, as células foram marcadas com Anexina V-Cy3 e com 7-AAD e aplicadas em citômetro de fluxo para avaliação de morte celular por apoptose e necrose.

Em tratamento de 48 horas, observou-se que a peçonha de *L. similis* e a recLiD1, ambas na concentração de 10 µg/mL, provocaram morte celular em HFF-1, principalmente por apoptose em estágio inicial, representada em marcação por Anexina V-Cy3 (Figura 19A, quadros B e C). No entanto, o LPA a 15 µM não promoveu efeito nocivo às células após incubação por 48 horas (Figura 19A, quadro D). O tratamento apenas com LPC também não foi nocivo às células (dados não mostrados).

Dessa forma, a pré-incubação das células com o antagonista de receptor para LPA (LPA<sub>1</sub> e LPA<sub>3</sub>) Ki16425 15 µM não alterou os efeitos apoptóticos promovidos tanto pela peçonha de *L. similis* como pela recLiD1 (10 µg/mL) após 48 horas de incubação (Figura 19B).

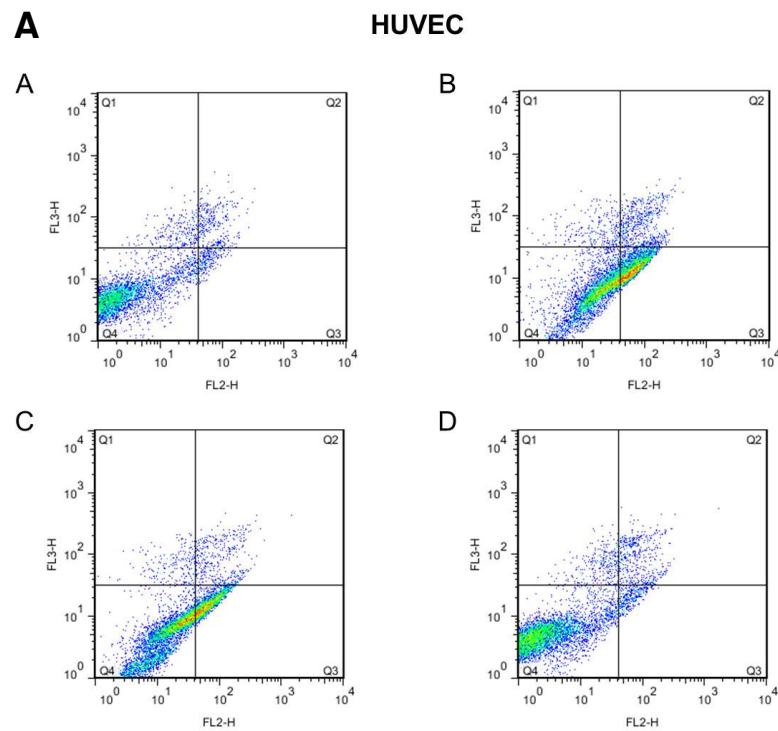


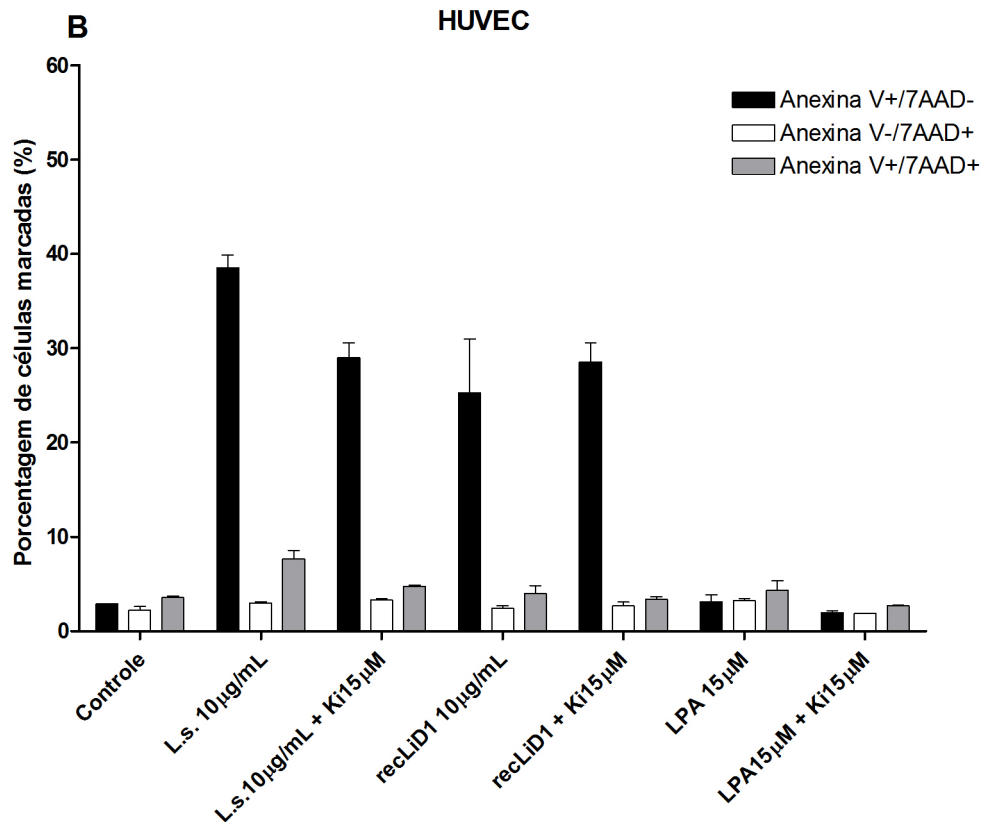




**Figura 19:** Morte celular de HFF-1 por apoptose e necrose. **(A)** Gráficos de pontos representativos de células coradas com Anexina V-Cy3 e 7-AAD. O canal FL2 (eixo horizontal) do citômetro de fluxo detecta Anexina V-Cy3 e o canal FL3 (eixo vertical) detecta 7-AAD. Assim, o quadrante Q4 representa células não marcadas, Q1 é marcação com 7-AAD, Q3 é marcação com Anexina V-Cy3 e Q2 é dupla marcação. As células HFF-1 foram incubadas por 48 horas com peçonha de *L. similis* 10 µg/mL (quadro B), recLiD1 10 µg/mL (quadro C) (ambas pré-incubadas com lisofosfatidilcolina, LPC 10 µM, com albumina livre de ácidos graxos 5 mg/mL por 1 hora a 37°C) ou LPA 15 µM (quadro D). Células não tratadas foram usadas como controle negativo (quadro A). **(B)** Porcentagem de células HFF-1 marcadas com Anexina V-Cy3 e/ou com 7-AAD após 48 horas de incubação com peçonha de *L. similis* 10 µg/mL, recLiD1 10 µg/mL, ambas pré-incubadas com lisofosfatidilcolina (LPC 10 µM, com albumina livre de ácidos graxos a 5 mg/mL) por 1 hora a 37°C, ou LPA 15 µM, com ou sem pré-incubação com Ki16425 15 µM. Os valores representam a média ± EPM de três experimentos.

Como o LPA pode ser um fator apoptótico ou de sobrevivência celular, dependendo do tipo de células (Ye *et al.*, 2002), o mesmo protocolo foi aplicado utilizando-se células endoteliais humanas. Em HUVEC, os mesmos resultados obtidos com HFF-1 foram observados (Figura 20). O antagonista de receptor para LPA (LPA<sub>1</sub> e LPA<sub>3</sub>), Ki16425 15  $\mu$ M, não alterou os efeitos apoptóticos promovidos *in vitro* tanto pela peçonha de *L. similis* como pela recLiD1 (10  $\mu$ g/mL) após 48 horas de incubação (Figura 20B).





**Figura 20:** Morte celular de HUVEC por apoptose e necrose. **(A)** Gráficos de pontos representativos de células coradas com Anexina V-Cy3 e 7-AAD. O canal FL2 (eixo horizontal) do citômetro de fluxo detecta Anexina V-Cy3 e o canal FL3 (eixo vertical) detecta 7-AAD. Assim, o quadrante Q4 representa células não marcadas, Q1 é marcação com 7-AAD, Q3 é marcação com Anexina V-Cy3 e Q2 é dupla marcação. As células HUVEC foram incubadas por 48 horas com peçonha de *L. similis* 10 µg/mL (quadro B), recLiD1 10 µg/mL (quadro C) (ambas pré-incubadas com lisofosfatidilcolina, LPC 10 µM, com albumina livre de ácidos graxos 5 mg/mL por 1 hora a 37°C) ou LPA 15 µM (quadro D). Células não tratadas foram usadas como controle negativo (quadro A). **(B)** Porcentagem de células HUVEC marcadas com Anexina V-Cy3 e/ou com 7-AAD após 48 horas de incubação com peçonha de *L. similis* 10 µg/mL, recLiD1 10 µg/mL, ambas pré-incubadas com lisofosfatidilcolina (LPC 10 µM, com albumina livre de ácidos graxos a 5 mg/mL) por 1 hora a 37°C, ou LPA 15 µM, com ou sem pré-incubação com Ki16425 15 µM. Os valores representam a média ± EPM de três experimentos.

# Discussão

## 6. DISCUSSÃO

As aranhas são animais que fascinam a humanidade há séculos, intrigando alguns e causando medo em outros. Há um mito, surgido nas últimas décadas, de que acidentes com várias espécies de aranhas provocam ulceração necrótica. Na verdade, apenas algumas espécies podem causar esse tipo de acidente, sendo que aranhas do gênero *Loxosceles* são as principais (Isbister, 2004; Isbister & Fan, 2011). Em países onde a incidência de loxoscelismo é baixa, profissionais da saúde podem super ou subnotificar os casos, atribuindo, por exemplo, a lesão dermonecrotica a outras condições clínicas (Vetter, 2009). Mesmo no Brasil, onde aranhas do gênero *Loxosceles* são endêmicas em algumas regiões, o diagnóstico de loxoscelismo é dificultado pela não identificação do animal, já que a picada é indolor, bem como pela ausência de teste para diagnóstico conclusivo (Málaque *et al.*, 2011).

O Paraná é o estado brasileiro com o maior número de casos de loxoscelismo. Na região metropolitana de Curitiba, os acidentes notificados anualmente ultrapassam o número de 2000, com surtos em alguns anos, como de 2001 a 2004, com média de 3550 acidentes e, em 2007, com 4764 registros (Ministério da Saúde, Sinan, 2012). Nessa cidade, a espécie *L. intermedia* é predominante, seguida de *L. laeta*. A espécie *L. gaucho* é também encontrada nos estados do Paraná e de São Paulo (Marques-da-Silva & Fischer, 2005; Málaque *et al.*, 2011). As três espécies citadas possuem elevada capacidade de adaptação ao ambiente intradomiciliar (Gertsch, 1967; Machado *et al.*, 2005a), estão presentes nas regiões do Brasil que registram os maiores números de acidentes e são, dessa forma, consideradas de importância médica no país. Por esse motivo, são as aranhas marrons mais estudadas nos trabalhos científicos da área.

A espécie *L. similis* é abundante em áreas naturais do Pará, Bahia, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul e São Paulo, principalmente no interior de grutas (Trajano & Gnaspini-Netto, 1990; Ferreira *et al.*, 2000, 2005; Andrade *et al.*, 2001). Em Minas Gerais, nossa equipe já coletou espécimes dessa aranha, antes conhecida por não habitar ambientes antrópicos, em casa de campo no

município de Sabará, em lotes vagos no município de Marliéria e na Gruta da Lapinha, na região arqueológica de Lagoa Santa, que recebe grande quantidade de turistas. A partir da constatação da presença dessa espécie em grutas turísticas nos arredores de Belo Horizonte, bem como em residências dessa cidade (Machado *et al.*, 2005a), nosso grupo de pesquisa vem buscando caracterizar a peçonha de *L. similis*. É necessário conhecer o perfil bioquímico e farmacológico dessa peçonha, até então pouco estudada, e avaliar se as intervenções clínicas padronizadas no Brasil são aplicáveis em casos de acidentes com essa aranha. Tais trabalhos são de suma importância para o estado de Minas Gerais e para Belo Horizonte, pois reúnem informações relevantes para os profissionais de saúde, principalmente caso haja um surto de loxoscelismo na região. Desde 2007, o número de casos de loxoscelismo registrados na região metropolitana de Belo Horizonte vem aumentando (Ministério da Saúde, Sinan, 2012).

Silvestre *et al.* (2005) mostraram que a peçonha de *L. similis* é composta por proteínas de 5 a 140 kDa, com perfil semelhante ao da peçonha de *L. intermedia* em SDS-PAGE. A peçonha de *L. similis* possui reatividade cruzada com soros específicos contra peçonhas de outras espécies do gênero. É capaz de induzir dermonecrose em coelhos, morte em camundongos e lise em eritrócitos humanos. Chatzaki *et al.* (2012) produziram em coelhos o soro específico anti-*L. similis*, que neutraliza a atividade esfingomielinásica da peçonha *in vitro* e a dermonecrose em coelhos *in vivo*. No presente trabalho, por meio de análises histológicas, avaliamos os efeitos da peçonha em pele de coelho. Além disso, investigamos a capacidade do soro anti-*L. similis* em neutralizar a lesão dermonecrótica, além da reatividade imunológica com outras peçonhas.

Nossos resultados mostraram que o soro anti-*L. similis* possui reatividade cruzada com peçonhas das aranhas *L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta* (Figura 5). Silvestre *et al.* (2005) testaram a reatividade cruzada da peçonha de *L. similis* com o soro anti-*L. intermedia* e com anticorpos IgG anti-*L. laeta* e anti-*L. gaucho* e observaram que a peçonha reagiu melhor com os anticorpos anti-*L. gaucho*. Neste trabalho, observou-se alta reatividade entre o soro anti-*L. similis* e a peçonha de *L. gaucho* (Figura 5). Isso ocorre porque as

aranhas *L. similis* e *L. gaucho* pertencem ao mesmo grupo, denominado gaucho, e podem por isso apresentar maior semelhança entre os epítomos.

A reatividade imunológica cruzada é descrita em alguns trabalhos com peçonhas de aranhas *Loxosceles*. O estudo de Gomez *et al.* (2001) utilizou fração de IgG total contra as peçonhas de *L. deserta* e *L. reclusa* e mostrou reatividade antigênica cruzada entre essas peçonhas. Em um estudo comparativo mais amplo, Barbaro *et al.* (2005) observaram forte reatividade antigênica cruzada entre as peçonhas de *L. intermedia*, *L. gaucho*, *L. laeta*, *L. deserta* e *L. reclusa* e os soros comerciais anti-loxoscélico e anti-aracnídico. Os títulos em ELISA do soro anti-aracnídico foram em geral 1 a 2 vezes menores do que os títulos do soro anti-loxoscélico, exceto para *L. laeta*, para a qual foi significativamente 8 vezes menor. Utilizando *Western Blotting*, os autores detectaram forte reconhecimento de ambos os soros a proteínas com massa abaixo de 31,8 kDa, entre 32 e 35 kDa e de 89 a 210 kDa. No trabalho de Silvestre *et al.* (2005), o soro comercial anti-loxoscélico reconheceu as peçonhas de *L. similis*, *L. gaucho*, *L. laeta* e *L. intermedia* de forma semelhante. O soro específico anti-*L. intermedia* ligou-se a proteínas com massa entre 32 e 43 kDa da peçonha de *L. similis*. Os antígenos localizados entre 32 e 35 kDa na separação por SDS-PAGE, com ação dermonecrótica, são os componentes mais imunogênicos das peçonhas de aranhas *Loxosceles* (Barbaro *et al.*, 1994).

Sabendo-se que a peçonha de *L. similis* causa lesão dermonecrótica em coelhos, decidimos aprofundar o estudo desse efeito por meio de análises histológicas. Os resultados apontaram que a injeção da peçonha de *L. similis* promoveu denso infiltrado inflamatório na derme, com numerosos neutrófilos e alguns eosinófilos. A peçonha também induziu edema, hiperemia, hemorragia e trombose (Figura 6). O acúmulo de leucócitos polimorfonucleares foi evidente desde o primeiro intervalo de tempo analisado, 2 horas, e mostrou-se mais intenso após 8 horas da administração da peçonha (Figura 8). Sabe-se que o recrutamento de leucócitos é um mecanismo chave para o desenvolvimento da lesão cutânea. A depleção de polimorfonucleares com o uso de uma dose única endovenosa de mostarda nitrogenada em coelhos inibiu infiltração de leucócitos e hemorragia agudas e retardou o desenvolvimento de edema até

que a população de neutrófilos circulantes fosse restabelecida (Smith & Micks, 1970).

Quanto maior o tempo de exposição à peçonha de *L. similis*, mais intensa foi a dissociação de fibras colágenas na derme. Além da coloração clássica de HE, foi utilizada neste trabalho a coloração de Tricrômio de Masson, recomendada para tecido conjuntivo. Com a coloração do colágeno em azul, a visualização do rompimento das fibras ficou mais evidente (Figura 9).

Após 8 horas de injeção da peçonha de *L. similis*, observou-se degeneração, necrose e acúmulo de neutrófilos na musculatura de folículos pilosos e de tecido subcutâneo (Figura 7). No presente trabalho, também foi aplicado o método de coloração de Reticulina. Esse método de impregnação com prata cora em negro as fibras reticulares, que servem como suporte às células musculares e também às células da derme. Dessa forma, pode-se visualizar notoriamente o rompimento de fibras reticulares promovido pela peçonha de *L. similis* (Figura 10).

Após envenenamento experimental de coelhos com peçonha de *L. intermedia*, análises imuno-histoquímicas em pele de coelho mostraram fibrina em meio a feixes de colágeno, indicando aumento de permeabilidade vascular com exsudação e edema no interstício (Ospedal *et al.*, 2002). A desorganização do tecido conectivo é atribuída ao edema. Adicionalmente, enzimas presentes na peçonha de *Loxosceles* agem em componentes importantes de diversos tecidos, que estão arranjados para formar estruturas conectivas e de sustentação. O loxoscelismo altera eventos fisiológicos dependentes de componentes da membrana basal e da matriz extracelular, causando, por exemplo, adesão plaquetária no espaço subendotelial, problemas hemostáticos, falência renal e lesão cutânea de difícil cicatrização (Veiga *et al.*, 2001a). Peçonhas de aranhas *Loxosceles* possuem metalo e serinoproteases que degradam fibrinogênio, fibronectina e têm ação gelatinolítica (Feitosa *et al.*, 1998; Veiga *et al.*, 1999; Zanetti *et al.*, 2002). Também hidrolisam entactina, proteoglicanos de heparam-sulfato e liberam laminina da membrana basal, porém não possuem ação direta sobre laminina e colágenos dos tipos I e IV (Veiga *et al.*, 2000b; 2001a).



Ospedal *et al.* (2002) realizaram análises histológicas de pele de coelho em diferentes tempos após injeção de peçonha de *L. intermedia*. Após 4 horas de exposição da peçonha, os autores observaram edema, desorganização de tecido conectivo, infiltração de neutrófilos no tecido conectivo, presença de numerosos neutrófilos no interior e em torno dos vasos sanguíneos e trombose. Em 12 horas, houve intenso infiltrado inflamatório, degeneração de vasos sanguíneos, edema, necrose em folículos pilosos e em músculos adjacentes, com áreas de miólise. Após 24 horas do envenenamento experimental, foram descritos denso infiltrado inflamatório, trombose, escurecimento do estrato córneo, desorganização de fibras colágenas, deposição de fibrina e de detritos de eritrócitos ao redor dos pêlos, degeneração necrótica de folículos pilosos e intensa necrose muscular subcutânea. Em 48 horas, a integridade da epiderme foi destruída, com hemorragia maciça e necrose difusa, infiltração de neutrófilos entre a derme e o tecido muscular subcutâneo, além de mionecrose difusa. Finalmente, 120 horas após a exposição, havia lesão necrótica extensiva de epiderme, tecidos conectivos, folículos pilosos e tecidos adjacentes, além de infiltrado marcante de neutrófilos, miólise e calcificação muscular.

Outros estudos já haviam descrito achados histopatológicos como acúmulo de leucócitos polimorfonucleares, trombose, degeneração e necrose vasculares após 3 horas (Futrell, 1992), 6 horas (Smith & Micks, 1970; Rees *et al.*, 1981) e 14 dias (Elston *et al.*, 2000) de envenenamento experimental com peçonha de *L. reclusa*. Pizzi *et al.* (1957) relataram edema, eritema, trombose, degeneração vascular e acúmulo de leucócitos e eritrócitos 24 horas após injeção de peçonha de *L. laeta*.

No presente trabalho, demonstramos pela primeira vez alterações histopatológicas promovidas pela peçonha de *L. similis*. Um ponto importante a ser considerado é a quantidade de peçonha administrada em nosso trabalho, qual seja, 3 µg. A maioria dos estudos trabalha com a quantidade média inoculada em uma picada, de 20 a 40 µg. Os efeitos deletérios observados mesmo com a utilização de menor dose mostram a potência de ação da peçonha de *L. similis*, bem como a sensibilidade das células e das estruturas dos tecidos a essa peçonha.

Tambourgi *et al.* (2005) mostraram alterações histopatológicas semelhantes após administração de peçonha de *L. intermedia* e da proteína recombinante P1, que possui atividade de SMaseD/PLD. Com a injeção de P1, a infiltração de neutrófilos foi mais difundida na derme e mais intensa em músculo adjacente, mas não houve diferença na contagem total de células inflamatórias na comparação entre os dois tratamentos. Como visto em diversos trabalhos, a família de proteínas dermonecroticas Loxtox está associada aos efeitos locais e sistêmicos da picada de aranhas *Loxosceles* (Kalapothakis *et al.*, 2007).

Paralelamente às análises histopatológicas em pele de coelho após aplicação da peçonha de *L. similis*, a capacidade de neutralização do soro aos efeitos dessa peçonha foi avaliada. Quando a peçonha de *L. similis* foi previamente incubada com o soro específico e então inoculada em coelhos, as alterações observadas foram mais amenas, em todos os tempos de contato.

Os resultados mostram claramente que houve diminuição de edema, de infiltrado inflamatório e de rompimento de fibras colágenas (Figuras 7, 8 e 9). O tratamento com soro preveniu degeneração e necrose musculares, além de preservar as fibras reticulares (Figuras 7 e 10). Destaca-se novamente a importância das colorações de Tricrômio de Masson e de Reticulina, que permitiram visualização nítida da capacidade do soro em neutralizar o rompimento de fibras colágenas e reticulares.

Diversos tratamentos e intervenções já foram propostos para o loxoscelismo, como cuidados locais da lesão, analgésicos, aspirina, heparina, fentolamina, vasodilatadores, dextran, nitroglicerina tópica, choque elétrico, oxigenoterapia hiperbárica, anti-histamínicos, antibióticos, corticoides, dapsona, desbridamento cirúrgico e antiveneno. No entanto, as pesquisas não foram conclusivas em determinar a melhor indicação. Algumas não são recomendadas, outras são caras, dolorosas ou potencialmente tóxicas (Hogan *et al.*, 2004; Swanson & Vetter, 2005; Pauli *et al.*, 2006; Paixão-Cavalcante *et al.*, 2007). O antiveneno é o único tratamento do loxoscelismo que é específico para neutralizar os efeitos da peçonha. A habilidade dos soros em neutralizar as ações dermonecroticas e letais das peçonhas de aranhas do gênero

*Loxosceles* já foi comprovada em diversos estudos (Rees *et al.*, 1981; Braz *et al.*, 1999; Gomez *et al.*, 1999b; Toro *et al.*, 2006).

Apesar de a soroterapia ser muito utilizada na clínica, há opiniões controversas sobre a eficácia em tratar a dermonecrose, especialmente em relação ao longo intervalo de tempo existente entre a picada e o acesso ao tratamento. Uma característica do loxoscelismo é a picada indolor da aranha, que confere desvantagem à aplicação da soroterapia com relação a acidentes com outros gêneros de aranhas, como *Latrodectus* e *Phoneutria* (Isbister *et al.*, 2003). Por isso, estudos que avaliam padrões mais realistas sobre intervalo de tempo e outras condições de tratamento são importantes. Pauli *et al.* (2009) determinaram os padrões temporais de ação do soro anti-loxoscélico quando administrado até 240 horas após a injeção de peçonha. Foi observado que o antiveneno reduziu os níveis plasmáticos de fibrinogênio, bem como a evolução de hemorragia, edema, eritema e equimose, quando aplicado de 6 a 12 horas, e reduziu o tamanho da lesão necrótica, quando aplicado até 48 horas após a inoculação de peçonha de *L. intermedia* em coelhos. Os autores consideraram que a atenuação da necrose ocorreu por neutralização direta dos efeitos da peçonha, apesar de o antiveneno não agir tão fortemente na resposta inflamatória já iniciada com o envenenamento.

No período de 1985 a 1996, em estudo clínico no Hospital Vital Brazil (São Paulo) com 359 supostas vítimas de picadas de aranhas *Loxosceles*, 66% dos pacientes receberam a soroterapia. Destes, 19% desenvolveram necrose, mesmo com o tratamento. No entanto, segundo os autores, apesar de não prevenir a dermonecrose, é errado concluir que o soro seja ineficiente em reduzir a extensão da lesão necrótica. A proporção de reações anafiláticas precoces não é alta, similar a outros antivenenos, e as manifestações são prontamente revertidas (Málaque *et al.*, 2002). É relevante considerar a importância do antiveneno em reduzir a lesão cutânea do loxoscelismo e, dessa forma, auxiliar na recuperação da vítima. Há ainda a perspectiva de aprimoramento da soroterapia atualmente utilizada, graças a diversos estudos que vem sendo realizados, como exposto na introdução deste capítulo.

Com os dados obtidos em trabalhos realizados pelo nosso grupo de pesquisa, podemos inferir que a peçonha de *L. similis* possui características

semelhantes às peçonhas de aranhas *Loxosceles* que causam o maior número de acidentes no Brasil. Dessa forma, também pode ser utilizada como ferramenta nos diversos estudos sobre peçonhas de aranhas marrons, incluindo os de investigação do mecanismo de ação de peçonhas de *Loxosceles*, ainda não totalmente elucidado.

Alguns trabalhos mostraram que a enzima SMaseD de *Loxosceles*, considerada o principal componente tóxico da peçonha, possui atividade intrínseca de lisofosfolipase D e hidrolisa outros glicerofosfolipídeos além da esfingomiéline. Os autores sugeriram, dessa forma, a substituição do nome SMaseD pelo termo fosfolipase D (PLD) (Van Meeteren *et al.*, 2004; Lee & Lynch, 2005).

Assim, vem sendo estudada a importância da atividade catalítica mais abrangente de PLD na fisiopatologia do loxoscelismo, sabendo-se que os mediadores lipídicos bioativos atuam em diversos mecanismos celulares, como os de migração, proliferação, morte, sobrevivência, inflamação, angiogênese, dentre outros (Anliker & Chun, 2004; Hannun & Obeid, 2008).

Lee & Lynch (2005) mostraram que a toxina PLD recombinante de *L. reclusa* possui ação hemolítica em eritrócitos humanos. Tal ação foi abolida quando a toxina mutante H37N, desprovida de atividade de PLD, foi utilizada. Já Chaves-Moreira *et al.* (2009) detectaram ação hemolítica direta da toxina recombinante de *L. intermedia* LiRecDT1, que não foi observada utilizando-se a proteína com mutação no domínio catalítico H12A. A mesma toxina LiRecDT1 H12A, desprovida de atividade de PLD, não possui ação nefrotóxica, ao contrário da toxina recombinante selvagem (Kusma *et al.*, 2008). Chaim *et al.* (2011) mostraram que há uma relação direta entre a atividade enzimática das toxinas dermonecróticas e os efeitos de dermonecrose e inflamação. Quando a proteína LiRecDT1 H12A foi injetada em pele de coelho, análises histopatológicas apontaram menor resposta inflamatória em comparação ao envenenamento com a proteína selvagem. A atividade de mieloperoxidase tecidual também foi significativamente menor após tratamento com a toxina mutante.

Também correlacionando atividade de PLD e inflamação, Dragulev *et al.* (2007) atribuíram à C1P, formada a partir de esfingomiéline de membrana

plasmática, o aumento na expressão dos mediadores inflamatórios IL-6, IL-8, CXCL1 e CXCL2 em fibroblastos humanos tratados com toxina de *L. reclusa*. Porém, Van Meeteren *et al.* (2007), discordando da hipótese do grupo de Dragulev, confere ao LPA, produto bioativo da hidrólise de LPC, a referida resposta inflamatória. O LPC também é um fosfolípido de membrana, mas está presente abundantemente no plasma sanguíneo, ligado à albumina (Moolenaar, 1999).

Com base nessa discussão, o presente trabalho investigou a participação do LPA na liberação de citocinas e quimiocinas em fibroblastos humanos tratados com a peçonha de *L. similis*. Paralelamente, utilizamos nos experimentos a toxina recombinante LiD1 de *L. intermedia*.

Kalapothakis *et al.* (2002) clonaram e expressaram pela primeira vez a recLiD1 em fusão com a  $\beta$ -galactosidase, utilizando-se o vetor pBK-CMV. Essa proteína era imunogênica, porém não apresentava atividade biológica (Araújo *et al.*, 2003). Em 2006, Felicori *et al.* clonaram a recLiD1 em pET11a, que foi expressa de forma solúvel em *E. coli* BL21 e possui atividade dermonecrótica. No presente trabalho, utilizamos a construção recLiD1 em pET11a, devidamente estocada no laboratório a  $-80^{\circ}\text{C}$ , expressamos e purificamos a toxina recombinante segundo trabalho do nosso grupo de pesquisa, com algumas modificações (Felicori *et al.*, 2006). Após a lise bacteriana, a toxina encontrava-se nas frações solúvel e insolúvel (Figura 11), porém apenas a primeira foi utilizada devido à facilidade de manipulação nas etapas cromatográficas. O rendimento das etapas de expressão e purificação foi satisfatório, com 8,5 mg de proteína por litro de cultura expressa. A toxina recLiD1 purificada possui massa molecular aproximada de 32,4 kDa e atividade dermonecrótica em coelhos (Figuras 14 e 15).

Primeiramente, o presente trabalho mostrou que tanto a peçonha bruta de *L. similis* quanto a recLiD1 possuem atividade de PLD significativa (Figura 17). Trabalhos anteriores já haviam descrito atividade de SMaseD para ambas, sendo que a da recLiD1 é baixa (Gomes *et al.*, 2011; Chatzaki *et al.*, 2012; Felicori *et al.*, 2006). Em seguida, a peçonha de *L. similis* e a recLiD1 foram incubadas por 1 hora a  $37^{\circ}\text{C}$  com lisofosfatidilcolina (LPC), um precursor para a formação de LPA por meio de hidrólise mediada por PLD. Após o pré-

tratamento, fibroblastos HFF-1 foram incubados por 12 horas com peçonha e recLiD1, ambas na concentração de 10 µg/mL. Os resultados dos ensaios com Alamar Blue certificaram previamente que esse tratamento dos fibroblastos por 12 horas não causava danos à viabilidade celular (Figura 16A).

Após o tempo de incubação com peçonha de *L. similis* e recLiD1, a dosagem de citocinas e quimiocinas no meio de cultura celular revelou liberação de IL-6, IL-8, CXCL1 e CXCL2 (Figura 18). Não foram detectadas produções de IL-1β e RANTES.

Sabe-se que as peçonhas de aranhas *Loxosceles* promovem liberação de mediadores inflamatórios, que estão envolvidos no desenvolvimento da dermonecrose. Whetstone *et al.* (1997) mostraram que a injeção parenteral de anticorpo monoclonal anti-IL-8 retardou o desenvolvimento da lesão dermonecrotica em coelhos inoculados com peçonha de *Loxosceles*. Como visto anteriormente, Dragulev *et al.* (2007) observaram, em células HFF-1 tratadas com toxina de *L. reclusa* durante 5 horas, aumento na expressão dos mesmos mediadores detectados em nosso trabalho. Gomez *et al.* (1999a) trataram células HUVEC e A549 por 8 horas com peçonha de *L. deserta* e descreveram aumento na produção de IL-8 e MCP-1, no entanto não houve liberação de RANTES. A peçonha de *L. gaucho*, quando injetada em pata de camundongo, estimulou a liberação local de IL-6, MCP-1 e KC após 2 e 24 horas. No entanto, não estimulou produção de IL-1β, TNF-α, TXB<sub>2</sub> e LTB<sub>4</sub> (Barbaro *et al.*, 2010). Em relato de caso clínico, De Souza *et al.* (2008) detectaram níveis elevados de IL-6 e TNF-α em soro de paciente que sofreu picada de aranha *Loxosceles*.

Desai *et al.* (1999) mostraram que a peçonha de *L. deserta* induz aumento de expressão de IL-8 e MCP-1 em células endoteliais via mecanismos dependentes da ativação de NF-κB. O NF-κB é um fator de transcrição que regula, pelo menos em parte, a expressão de diversos mediadores pró-inflamatórios. Dragulev *et al.* (2007) também observaram aumento na expressão de NF-κB em fibroblastos tratados com SMaseD/PLD de *L. reclusa*.

Citocinas são mediadores pleiotrópicos, que possuem grande variedade de funções biológicas em vários tecidos e células. Diferentes citocinas podem exercer funções semelhantes em um mesmo tipo celular. Interleucina-6 (IL-6)

é uma citocina multifuncional produzida por vários tipos celulares, como macrófagos, células dendríticas e linfócitos B. Exerce várias funções biológicas na regulação da resposta imune, hematopoiese, inflamação e oncogene. Está envolvida na maturação de células B e na diferenciação de macrófagos. IL-6 pode induzir a expressão de metaloproteases de matriz em diversos tipos celulares, quebra das junções entre as células endoteliais e aumento da permeabilidade vascular (Kishimoto *et al.*, 1995; Kitamura *et al.*, 2004; Oz-Arslan *et al.*, 2006; Krüttgen & Rose-John, 2012). As quimiocinas são definidas como citocinas quimioatraentes, que facilitam o recrutamento de células inflamatórias para o tecido em resposta à infecção ou inflamação e auxiliam a coordenar as ações dos leucócitos durante a resposta imune. As quimiocinas C-X-C, como interleucina-8 (IL-8 ou CXCL8), CXCL1 (ou GRO- $\alpha$ ) e CXCL2 (ou GRO- $\beta$ ), são potentes quimioatraentes de neutrófilos e também ativam essas células em sítios inflamatórios. Podem ser produzidas por diversos tipos celulares, como monócitos, macrófagos e células epiteliais, endoteliais, fibroblastos e queratinócitos em resposta a um estímulo nocivo (Taub *et al.*, 1996; Grimm *et al.*, 1998; Mortier *et al.*, 2012; Nelson & Teixeira, 2012).

No presente trabalho, investigamos também a participação de receptores para LPA na resposta inflamatória mediada pela peçonha. Para isso, as células HFF-1 foram tratadas com peçonha de *L. similis* e com recLiD1 nas mesmas condições, porém na presença de Ki16425, um antagonista de receptores para LPA dos tipos LPA<sub>1</sub> e LPA<sub>3</sub>. Os resultados mostraram que o Ki16425 reduziu de forma significativa a produção de IL-6, IL-8, CXCL1 e CXCL2 mediada pela peçonha e pela toxina recombinante (Figura 18). Vale ressaltar que os mesmos resultados foram obtidos após tratamento com LPA 15  $\mu$ M. Sugerimos então que, após tratamento de fibroblastos com peçonha e recLiD1, o LPA formado por hidrólise de LPC mediada por PLD participa do processo de liberação de citocinas e quimiocinas, agindo nos receptores de membrana.

O LPA é um glicerofosfolípídeo de baixa massa molecular, que está presente em baixas concentrações em tecidos eucarióticos e no soro em concentrações maiores, na ordem de sub-micromolar. O LPA presente no soro está ligado a proteínas, especialmente albumina, e é originado principalmente

de plaquetas ativadas. A síntese de LPA bioativo ocorre por ações enzimáticas de fosfolipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) e D (PLD) sobre ácido fosfatídico (PA) e LPC, respectivamente. No início do século XX, acreditava-se que o LPA promovia ações biológicas por ruptura de membrana plasmática em efeito inespecífico do tipo detergente. Hoje se sabe que os efeitos são mediados por receptores de membrana de alta afinidade. Foram identificados seis receptores para LPA até o momento (LPA<sub>1</sub>-LPA<sub>6</sub>), todos acoplados à proteína G, que divergem em distribuição tecidual e em vias de sinalização mediadas por Rho quinase, fosfolipase C, adenilil-ciclase, Ras/MAP quinase e PI3 quinase. Cada receptor age como regulador positivo ou negativo da função celular (Moolenaar *et al.*, 2004; Choi *et al.*, 2010; Chun *et al.*, 2010; Kato *et al.*, 2012b). No presente trabalho, utilizamos o antagonista competitivo Ki16425, que possui afinidade pelos receptores LPA<sub>1</sub> e LPA<sub>3</sub> (Ohta *et al.*, 2003).

O primeiro receptor para LPA descrito, LPA<sub>1</sub>, é o mais expresso em tecidos normais e é amplamente expresso em humanos. O receptor LPA<sub>1</sub> é encontrado em fibroblastos. Inclusive, as vias mediadas por LPA<sub>1</sub>/LPA<sub>3</sub> estão envolvidas na formação de diversos tipos de fibrose devido a um estímulo excessivo à migração celular (Pradère *et al.*, 2008; Stortelers *et al.*, 2008; Choi *et al.*, 2010; Qian *et al.*, 2012; Wei *et al.*, 2012). Van Dijk *et al.* (1998) trataram fibroblastos quiescentes (Rat-1) com PLD de *Streptomyces chromofuscus* e observaram acúmulo de proteína Ras ligada ao GTP, ativação de MAP quinase, aumento da síntese de DNA e mobilização de cálcio. Esses efeitos foram mediados por ação de LPA em receptores acoplados à proteína G.

Por meio da ação nos receptores, o LPA possui papel importante em diversos mecanismos celulares, como proliferação, sobrevivência e migração celulares, mobilização de íons cálcio, reorganização do citoesqueleto, agregação plaquetária e hiperpermeabilidade endotelial (Anliker & Chun, 2004; Choi *et al.*, 2008). Dentre as inúmeras funções do LPA, está o estímulo à resposta inflamatória. Em condições inflamatórias, o LPA pode ser gerado por ação da enzima PLA<sub>2</sub> secretada de plaquetas e neutrófilos, que hidrolisa o PA exposto na superfície de microvesículas de membrana provenientes de células sanguíneas. A partir de então, o LPA age como um mediador do processo inflamatório (Fourcade *et al.*, 1995). O LPA exerce potente efeito estimulatório



sobre neutrófilos, monócitos e linfócitos (Roskopf *et al.*, 1998). Em células dendríticas, o LPA induziu a liberação de IL-6 e IL-8, por ativação de receptores acoplados à proteína G e das vias de sinalização dependentes de MAP quinase, Rho quinase e proteína quinase C (Oz-Arslan *et al.*, 2006). Em células de câncer de ovário, o LPA induziu a expressão de CXCL1, IL-6 e IL-8 (Fang *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2006). Já em fibroblastos embrionários de camundongo, o LPA regulou a expressão de genes que codificam diversos fatores parácrinos, como citocinas e quimiocinas (CXCL1, IL-6, CCL-2, CCL-7), mitógenos e fatores pró-angiogênicos (Stortelers *et al.*, 2008). Palmetshofer *et al.* (1999) observaram, após tratamento de células endoteliais com LPA, aumento na expressão de E-selectina, IL-8 e MCP-1, além de ativação de NF-κB (fator nuclear kappa B). Em linhagem de fibroblasto embrionário murino, o tratamento com LPA ativa NF-κB e a produção de IL-6 induzida por LPA é dependente da ativação desse fator (Klemm *et al.*, 2007).

Em trabalhos futuros com a peçonha, pode-se relacionar formação de LPA mediada por PLD com ativação de NF-κB em alguns tipos celulares e a consequente liberação de mediadores inflamatórios. É importante ressaltar que a toxina dermonecrótica da peçonha exerce atividade de PLD sobre inúmeros alvos lipídicos (Lee & Lynch, 2005). Assim, apesar de mostrarmos no presente trabalho a importância do LPA para a resposta inflamatória da peçonha em célula do estroma, outros mediadores também podem estar envolvidos.

Após verificarmos a participação de receptores para LPA na liberação de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias em fibroblastos humanos tratados com peçonha de *L. similis* ou recLiD1, decidimos avaliar o papel desses receptores na morte celular provocada por longo período de tratamento com esses agentes.

Para isso, utilizamos dois marcadores para apoptose e necrose, anexina V-Cy3 e 7-AAD. Após 48 horas de incubação de células HFF-1 com 10 µg/mL de peçonha de *L. similis* ou recLiD1, observamos que cerca de 30 a 40% das células estavam em estágio inicial de apoptose e uma pequena porcentagem entrou em processo de necrose (Figura 19). Esses dados não são compatíveis com os resultados do ensaio de Alamar Blue (Figura 16A), principalmente para recLiD1. Isso pode ser explicado pela diferença de metodologia. Após a

incubação com a recLiD1, ao contrário do tratamento com peçonha, não observamos o descolamento das células da superfície do frasco. Aparentemente, após visualização ao microscópio, há uma ideia de que a peçonha é mais tóxica às células. Com os marcadores, observamos que, independente do descolamento celular, a externalização da fosfatidilserina (PS) é detectada. Já o Alamar Blue constata a redução química do meio de cultura em resposta à respiração celular (Lancaster & Fields, 1996). Provavelmente, em nosso modelo experimental, a modificação no metabolismo e na respiração celulares ocorre primeiramente em resposta ao tratamento com a peçonha, quando comparado ao tratamento com recLiD1. Dessa forma, a marcação com anexina V-Cy3 e 7-AAD é um método mais sensível para identificar processos de morte celular. Sabe-se que a translocação da PS é um evento precoce de apoptose (Casciola-Rosen *et al.*, 1996).

A apoptose pode ser iniciada por uma programação interna da célula ou por ação de agentes extracelulares, como hormônios, fatores de crescimento, citocinas, agentes virais e fatores químicos e físicos. A apoptose é marcada por retraimento celular, condensação e marginação da cromatina. Há formação e desprendimento de corpos apoptóticos, que consistem em organelas celulares e/ou material nuclear circundados por membrana plasmática intacta. Os macrófagos reconhecem as células apoptóticas e respectivos fragmentos pela presença de PS na porção externa da membrana. Já a necrose é caracterizada por tumefação celular acompanhada de condensação de cromatina, resultando em lise celular com subsequente inflamação. Células apoptóticas não fagocitadas entram em processo de necrose (Majno & Joris, 1995; Van Cruchten & Van den Broeck, 2002).

A peçonha de *Loxosceles* e respectivos componentes são capazes de ligar-se a diferentes tipos celulares, como eritrócitos, células de epitélio renal, queratinócitos e células endoteliais, promovendo efeitos tóxicos (Tambourgi *et al.*, 2002; Chaim *et al.*, 2006; Paixão-Cavalcante *et al.*, 2006, 2007; Chaves-Moreira *et al.*, 2009). A exposição de PS na superfície de alguns tipos celulares promovida pela peçonha pode causar, além de hemólise, coagulação intravascular. A exposição de PS na superfície de células endoteliais e

plaquetas pode iniciar a cascata de coagulação e a agregação plaquetária (Tambourgi *et al.*, 2002).

Os mecanismos da apoptose provocada pela peçonha ainda são pouco estudados. No presente trabalho, investigamos a participação de receptores para LPA nesse processo. No entanto, o antagonista de receptores para LPA Ki16425 não foi capaz de inibir a morte celular em células HFF-1 tratadas por 48 horas com peçonha de *L. similis* ou recLiD1 (Figura 19). A ausência de inibição pelo Ki16425 já era esperada, uma vez que o tratamento controle com LPA comercial não alterou a viabilidade celular (Figura 19).

O LPA pode ser um fator apoptótico ou de sobrevivência celular, dependendo do tipo de célula. Isso ocorre porque o LPA exerce efeitos por ligação a diferentes receptores, ativando por sua vez diferentes cascatas de sinalização. Esse efeito dual pode ocorrer inclusive na mesma célula, dependendo das condições do meio (Ye *et al.*, 2002).

Dessa forma, utilizamos outro tipo celular em nossos experimentos. Escolhemos células endoteliais humanas (HUVEC), pois se sabe que a peçonha é um agonista de células endoteliais e os efeitos tóxicos ao endotélio vascular são marcantes no loxoscelismo (Veiga *et al.*, 2001b; Paludo *et al.*, 2006). Nos ensaios com HUVEC, resultados semelhantes aos obtidos com HFF-1 foram observados, ou seja, o Ki16425 não preveniu a apoptose causada após tratamento de 48 horas com peçonha de *L. similis* ou recLiD1. O LPA também não alterou a viabilidade de células HUVEC (Figura 20).

Assim, o presente trabalho mostrou, pela primeira vez, que o LPA formado por ação enzimática de PLD da peçonha de *L. similis* e da recLiD1 exerce papel na liberação de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias em fibroblastos humanos. No entanto, pelo menos *in vitro* e nas condições experimentais aplicadas, os receptores para LPA não participam da morte celular promovida por esses agentes em HFF-1 e HUVEC.

Os componentes tóxicos das peçonhas de aranhas *Loxosceles* são iniciadores de diversos processos fisiopatológicos que culminam em dermonecrose. Ao mesmo tempo em que a necrose é dependente da ativação de PMN, a peçonha não ativa essas células diretamente. Isso mostra que um evento desencadeia outra resposta, como em uma cascata. Eventos como

ativação de células endoteliais e do estroma e liberação de citocinas provocam ativação de leucócitos, com conseqüente lesão dermonecrótica (Figura 4) (Majeski *et al.*, 1977; Patel *et al.*, 1994).

A apoptose pode estar diretamente relacionada a outros processos desencadeados no loxoscelismo, como a ativação de metaloproteases. A tetraciclina, que inibe expressão e atividade de metaloproteases endógenas, foi capaz de proteger queratinócitos humanos e fibroblastos de coelhos da morte celular provocada por peçonha de *L. intermedia* e por SMaseD/PLD (Paixão-Cavalcante *et al.*, 2006, 2007). Nowatzki *et al.* (2012) mostraram que o tratamento de células endoteliais com peçonha de *L. intermedia* altera a adesão celular, promovendo redistribuição de integrinas e caderinas, seguida de descolamento das células à superfície. Os autores atribuem à anóquia o desencadeamento de apoptose das células endoteliais.

Pouco se sabe até o momento sobre os mecanismos mediadores da apoptose provocada pela peçonha de *Loxosceles* e respectivas toxinas. Por exemplo, a ativação de diversas vias de sinalização, dependentes ou não de caspases, precisa ser investigada.

O presente trabalho traz dados iniciais que indicam a importância do LPA na fisiopatologia do loxoscelismo. Seria interessante investigar o papel do LPA em outros processos relacionados ao envenenamento. Por exemplo, sabe-se que o LPA ativa metaloproteases endógenas, como MMP-2 e MMP-9, que são implicadas nos processos de hemólise e dermonecrose decorrentes do envenenamento (Park *et al.*, 2011; Kato *et al.*, 2012a). Curiosamente, o LPA participa do processo de cicatrização e reparo de feridas, estimulando a proliferação e a migração de células mesenquimais e epiteliais, causando vasoconstrição e fechamento de camadas de células endoteliais lesadas. O uso tópico de LPA repara feridas de pele. Como exposto, o LPA causa efeitos celulares complexos e, algumas vezes, paradoxais (Lee *et al.*, 2000; Balazs *et al.*, 2001; Moolenaar *et al.*, 2004; Choi *et al.*, 2010).

Nosso trabalho, então, abre caminho para futuras investigações sobre o papel do LPA no loxoscelismo e sobre novas estratégias terapêuticas elaboradas a partir das constatações apresentadas.

# Conclusão

## 7. CONCLUSÃO

Em pele de coelho, a injeção intradérmica da peçonha da aranha *L. similis* promoveu, em curto prazo, acúmulo de células inflamatórias, edema, hiperemia, hemorragia e trombose. Além disso, houve reação necrótica em músculo adjacente e ruptura de fibras colágenas e reticulares. O soro anti-*L. similis* foi capaz de neutralizar tais efeitos, prevenindo também a ruptura do tecido conectivo.

O soro produzido especificamente contra a peçonha de *L. similis* mostrou reatividade cruzada com as peçonhas de *L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta*.

A peçonha de aranha *L. similis* e a recLiD1 induzem a liberação de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias IL-6, IL-8, CXCL1 e CXCL2 em fibroblastos humanos HFF-1, após 12 horas de incubação. Essa ação é inibida de forma significativa por antagonista de receptores para LPA, o Ki16425, indicando que o LPA possui participação importante no processo inflamatório do loxoscelismo.

A peçonha de aranha *L. similis* e a recLiD1 causam morte celular por apoptose em fibroblastos HFF-1 e em células endoteliais HUVEC após 48 horas de incubação, porém o antagonista de receptores para LPA não é capaz de inibir tal efeito. Assim, não foi detectada *in vitro* uma participação direta do LPA na apoptose promovida por peçonha de *L. similis* e recLiD1 em HFF-1 e HUVEC.

## **Capítulo 2**

O ADP é um componente vasodilatador da peçonha da aranha *Lasiodora* sp.

# Introdução



## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Aranhas do gênero *Lasiadora*

As aranhas do gênero *Lasiadora* (Figura 21) pertencem à família Theraphosidae, subordem Mygalomorphae. As diferentes espécies de *Lasiadora* são dificilmente distinguidas, pois os caracteres discriminativos, como cor, tamanho, relação dos diferentes segmentos dos membros, entre outros, estão sujeitos a grandes variações individuais ou sexuais (Brazil & Vellard, 1926; Schiapelli & De Pikelin, 1967). As espécies de aranhas pertencentes à subordem Mygalomorphae são conhecidas vulgarmente no Brasil por caranguejeiras. Quase todas as aranhas dessa subordem são de tamanho superior à média, e algumas, tais como as dos gêneros *Grammostola* e *Lasiadora*, são verdadeiros gigantes entre os aracnídeos, podendo medir de 8 a 13 cm de perna a perna (Brazil & Vellard, 1926).

A tabela abaixo mostra a classificação taxonômica das aranhas do gênero *Lasiadora*:

**Tabela 3:** Classificação taxonômica de aranhas *Lasiadora*

CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA	
<b>Super reino</b>	Eukaryota
<b>Reino</b>	Metazoa
<b>Filo</b>	Arthropoda
<b>Subfilo</b>	Chelicerata
<b>Classe</b>	Arachnida
<b>Ordem</b>	Araneae
<b>Subordem</b>	Mygalomorphae (Orthognatha)
<b>Família</b>	Theraphosidae
<b>Gênero</b>	<i>Lasiadora</i> (Koch, 1851)



**Figura 21:** A aranha *Lasiodora* sp.

O termo tarântula é equivocadamente aplicado a qualquer aranha com grande número de pêlos, pois apenas os membros da família Theraphosidae são considerados tarântulas verdadeiras. De acordo com Platnick (2012), 939 espécies de aranhas agrupadas em 121 gêneros compõem essa família.

Aranhas da família Theraphosidae são distribuídas por todo o mundo. Na América do Sul, são encontradas principalmente as espécies *Lasiodora parahybana*, *Grammostola spatulata* e *Paraphysa manicata*. Apesar de mais comumente encontradas em áreas tropicais ou semi-tropicais, possuem extensa distribuição ecológica que inclui áreas úmidas ou secas, savanas, desertos, selvas e habitats com clima semi-temperado. A variedade de nichos ecológicos promove diferenças no comportamento das aranhas predadoras, o que proporciona uma grande diversidade na composição das peçonhas (Escoubas & Rash, 2004).

As aranhas *Lasiodora* vivem em locais diversos, como árvores em florestas, no meio de culturas, ocultando-se sob folhas secas de plantas e nos buracos de barrancos. São igualmente freqüentes nos ranchos de sapé, em porões ou forros de casas velhas, em lugares escuros das habitações e debaixo de leitos (Brazil & Vellard, 1926). Durante o dia, essas aranhas permanecem imóveis em esconderijos, isoladas do sol e da umidade, e à noite saem à caça (Brazil & Vellard, 1926). Assim como outras aranhas da mesma

família, alimentam-se geralmente de insetos e de pequenos vertebrados (Schvartsman, 1992).

São encontradas na Floresta Atlântica do Nordeste e em parte do Sudeste e Centro-oeste do Brasil ou em áreas abertas, seguindo a vegetação ciliar (Bertani, 2001). Nas coleções do Instituto Butantan, há material procedente dos estados Bahia, Espírito Santo, Goiás, Mato Grosso, Minas Gerais, Piauí, Rio de Janeiro e São Paulo (Lucas, 1982).

Não há registros de acidentes graves em humanos provocados por picadas de aranhas da família Theraphosidae no Brasil (Lucas *et al.*, 1994) ou em outros países (Schmidt, 1989; Isbister *et al.*, 2003). Como essas aranhas possuem pêlos urticantes no abdômen, que são liberados diante de ameaça ou perturbação, pode haver irritação de pele e mucosas no indivíduo afetado. Em alguns casos, desencadeia-se reação de hipersensibilidade com prurido, exantema e, ocasionalmente, tosse (Cooke *et al.*, 1973).

Lucas *et al.* (1994) realizaram estudo clínico e epidemiológico considerando registros de acidentes por picadas de aranhas da subordem Mygalomorphae no Hospital Vital Brazil, Instituto Butantan, em um período de 25 anos (1966 a 1991). Tais registros representaram menos de 1% dos acidentes com artrópodes. Do total de acidentes com a subordem Mygalomorphae, 53% envolvem aranhas da família Theraphosidae. Predominaram acidentes envolvendo crianças entre 1 e 7 anos de idade (25,3%) e adultos entre 21 e 35 anos de idade (20,9%), sendo mais frequentes os casos envolvendo pessoas do sexo masculino (68%). As regiões do corpo da vítima mais afetadas foram mãos e dedos (42,9%), além dos pés (31,9%). Os principais sintomas observados foram locais, caracterizados por dor apenas, dor e edema ou dor e eritema. Houve formigamento e prurido em alguns casos. Dos 91 acidentes registrados, 48 necessitaram de tratamento, que normalmente consiste em anestesia local e administração oral de analgésicos e/ou de anti-histamínicos.

## **1.2. Peçonhas de aranhas do gênero *Lasiadora***

A toxicidade de peçonhas de caranguejeiras não se correlaciona com o tamanho e o aspecto assustador dessas aranhas. As peçonhas de aranhas da

família Theraphosidae possuem forte atividade inseticida e afetam vertebrados e invertebrados com potências distintas. Isso se relaciona provavelmente com os hábitos alimentares naturais (Nicholson, 2007). Escoubas & Rash (2004) realizaram triagem de atividade inseticida contra grilos com peçonhas de 37 espécies de tarântulas. As peçonhas testadas, exceto duas, apresentaram forte atividade parálitica contra insetos. No mesmo estudo, houve triagem com 55 espécies distintas de tarântulas avaliando-se o tempo de morte de camundongos após a administração intracerebroventricular de 0,1  $\mu$ L de cada peçonha. Os resultados revelaram diferenças dramáticas de atividade. As peçonhas mais ativas causaram sintomas de neurotoxicidade seguidos de morte após 3 a 5 minutos, enquanto outras provocaram apenas sintomas leves de neurotoxicidade e a morte ocorria após um período de 2 horas ou mais.

O fracionamento da peçonha da aranha *Lasiadora* sp. foi realizado por nosso grupo, sendo utilizada cromatografia de fase reversa em sistema HPLC, com coluna preparativa C4, resultando em vinte frações. Tais frações foram reunidas em doze, denominadas F1 a F12. As frações F3 a F11 apresentaram ação tóxica para camundongos, sendo que F6 e F7 foram letais. Bioensaios preliminares também demonstraram que quatro frações (F2, F10, F11 e F12) possuem ação inseticida contra larvas de *Spodoptera frugiperda* e *Anticarsia gemmatilis*, que afetam as lavouras de milho e soja, respectivamente (De Deus, 2003). Em outro trabalho com a peçonha bruta de *Lasiadora* sp., não foi possível determinar a dose letal 50% (DL<sub>50</sub>) para camundongos, pois a aplicação da peçonha até a alta dose de 250  $\mu$ g não resultou em letalidade significativa para a continuação dos ensaios (Silvestre, 2005).

Escoubas *et al.* (1997) estudaram a peçonha da aranha *Lasiadora parahybana*, espécie encontrada no nordeste do Brasil. A injeção intracerebroventricular da peçonha em camundongos provocou aumento da atividade motora e perturbação, com paralisia e morte após 40 minutos. Em grilos, a peçonha causou paralisia rápida seguida de morte após injeção intratorácica. Foram isolados dois peptídeos neurotóxicos da peçonha, denominados Lasiotoxinas 1 e 2 (LpTx1 e LpTx2), que apresentaram homologia com toxinas previamente identificadas de outras duas espécies de

caranguejeiras, ESTX de *Eurypelma californicum* e BsTx de *Brachypelma smithii*.

Análises de espectrometria de massas revelaram que as peçonhas de aranhas da família Theraphosidae são constituídas principalmente de peptídeos de baixa massa molecular, com padrões estruturais semelhantes (Esboubas & Rash, 2004). Silvestre (2005) observou que o perfil protéico da peçonha de *Lasiadora* sp., obtido pela técnica de eletroforese bidimensional (IPG/SDS-PAGE), mostra presença de proteínas de baixa e de alta massa molecular, além de proteínas com massa molecular intermediária. O ponto isoelétrico dessas proteínas variou entre pH 4 e 9, com predominância de proteínas básicas. Ensaio revelaram que a peçonha não apresenta atividades hemolítica e esfingomielinásica, porém possui atividade proteolítica sobre dimetilcaseína, mesmo em baixas concentrações.

Outros experimentos do nosso grupo realizados com a peçonha de aranhas *Lasiadora* sp. identificaram algumas ações farmacológicas, como o bloqueio de canal para  $\text{Ca}^{2+}$  do tipo L e modulação da cinética e da dependência de voltagem de canais para  $\text{Na}^+$ . Os experimentos demonstraram que, ao ser aplicada em células GH3 na presença de tetrodotoxina (TTX), a peçonha aboliu as oscilações de  $\text{Ca}^{2+}$  e reduziu o nível basal de cálcio intracelular. Na ausência de TTX, a peçonha aboliu as oscilações de  $\text{Ca}^{2+}$  em uma fase inicial (fase 1) e logo depois provocou um aumento da concentração intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) (fase 2). Como a única diferença experimental foi a presença ou a ausência de TTX, concluiu-se que, além dos efeitos sobre os canais para  $\text{Ca}^{2+}$  do tipo L, a peçonha age sobre canais para  $\text{Na}^+$ . Observou-se também que, quando a peçonha foi administrada em altas concentrações ou aplicada na presença de nifedipina ou de  $\text{Cd}^{2+}$  (ambos bloqueadores de canais do tipo L), não ocorreu aumento da  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  na fase 2, o que sugere que esse efeito depende da disponibilidade de canais para  $\text{Na}^+$  e para  $\text{Ca}^{2+}$  do tipo L. A peçonha, então, provoca aumento da  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  na fase 2 via abertura de canais para  $\text{Na}^+$ , causando despolarização da membrana e entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  via canais para cálcio regulados por voltagem. O efeito da peçonha sobre as correntes de  $\text{Na}^+$  foi avaliado e constatou-se que não modificou a ativação da corrente, mas

causou diminuição da cinética de inativação, além de deslocar negativamente a dependência de voltagem (Kushmerick *et al.*, 2001).

Ao realizarem varredura na biblioteca de cDNA da glândula de peçonha da aranha *Lasiadora* sp., Vieira *et al.* (2004) identificaram três toxinas, denominadas LTx1, LTx2 e LTx3. Após análise de tais toxinas no banco de dados *GenBank*, os autores observaram que possuem similaridade significativa com toxinas das seguintes aranhas da família Theraphosidae: *Lasiadora parahybana*, *Eurypelma californicum*, *Brachypelma smithii* e *Selenocosmia huwena*. A toxina LTx1 é idêntica à toxina LpTx1 descrita por Escoubas *et al.* (1997).

Após clonagem e expressão da toxina LTx2, Dutra *et al.* (2008) revelaram que a toxina recombinante bloqueia canais para  $Ca^{2+}$  do tipo L em células BC3H1. Supõe-se que LTx1 e LTx3 também sejam ativas em canais para  $Ca^{2+}$  devido à similaridade estrutural com a LTx2, porém apenas a expressão e a caracterização biológica de LTx1 e LTx3 podem revelar os alvos moleculares.

### **1.2.1. Efeitos cardiovasculares da peçonha da aranha *Lasiadora* sp.**

Em coração isolado de rato, a peçonha da aranha *Lasiadora* sp. provocou bradicardia concentração-dependente, com parada cardíaca transitória e distúrbios rítmicos após aplicação *in bolus* de 100 µg. O efeito da peçonha foi potencializado pelo anticolinesterásico neostigmina, abolido pelo antagonista muscarínico atropina e inibido por vesamicol, que é um inibidor da captação vesicular de acetilcolina. A tetrodotoxina (TTX) não alterou a ação da peçonha. Os resultados obtidos demonstraram que a peçonha provoca um aumento na liberação vesicular de acetilcolina nas terminações nervosas parassimpáticas, por ativar canais para  $Na^+$  resistentes à TTX (Kalapothakis *et al.*, 2003).

Silvestre (2005), analisando ESTs geradas a partir da biblioteca de cDNA construída por extração total dos mRNAs da glândula de peçonha da aranha *Lasiadora* sp., encontrou algumas ESTs que apresentaram similaridade com o peptídeo GsMTx4. Sabe-se que esse peptídeo, isolado da peçonha da tarântula *Grammostola spatulata*, inibe a fibrilação atrial por bloqueio de canais

iônicos ativados por estiramento (Suchyna *et al.*, 2000). A partir desses resultados do nosso grupo de pesquisa, surgiu um interesse em investigar a ação dessa peçonha no sistema cardiovascular.

O primeiro passo foi determinar os parâmetros cardiovasculares em ratos após administração da peçonha da aranha *Lasiadora* sp. Em animais normotensos anestesiados, a peçonha provocou hipotensão e bradicardia agudas após aplicação por via endovenosa em diferentes doses (2, 5, 10, 15 e 20 µg). A atropina, antagonista de receptores muscarínicos, reduziu a hipotensão e a bradicardia promovidas pela peçonha (2 µg). Já o L-NAME, inibidor não-seletivo das enzimas óxido nítrico sintases, reduziu apenas o efeito hipotensor (Horta, 2008).

Em anéis de aorta de rato, a peçonha de *Lasiadora* sp. (0,06 a 32 µg/mL) promoveu potente vasodilatação concentração-dependente. A retirada do endotélio vascular aboliu o efeito relaxante da peçonha (8 µg/mL), bem como a pré-incubação dos vasos com L-NAME. Foi investigada também a possibilidade de indução da produção de óxido nítrico (NO) pela peçonha via ativação da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS). Para isso, a fosforilação da enzima em dois sítios regulatórios, Ser1177 (sítio de ativação) e Thr495 (sítio de inativação), foi mensurada após estímulo dos anéis de aorta em tempos distintos com peçonha (16 µg/mL). Verificou-se que a peçonha ativa a eNOS por aumentar a fosforilação do sítio de ativação e a desfosforilação do sítio de inativação. Os resultados permitiram concluir que a peçonha causa hipotensão e bradicardia no rato anestesiado por ações diretas no coração e nos vasos sanguíneos e que o NO endotelial tem papel fundamental no efeito relaxante da peçonha em aorta de rato (Horta, 2008).

Em continuação a esses estudos, o presente trabalho visa isolar e caracterizar um ou mais compostos vasodilatadores presentes na peçonha da aranha *Lasiadora* sp.

### **1.3. Participação do endotélio no controle do tônus vascular**

O endotélio vascular constitui a túnica íntima dos vasos, composta por uma camada única de células escamosas orientadas longitudinalmente. Dentre as inúmeras funções do endotélio, destaca-se a regulação do tônus vascular

por meio da liberação de várias substâncias vasoativas, que podem causar vasodilatação ou vasoconstrição (Carvalho *et al.*, 2001; Triggle *et al.*, 2003).

As principais substâncias vasodilatadoras derivadas do endotélio são o óxido nítrico (NO), a prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) (Figura 22). Os principais fatores contráteis são endotelina-1, angiotensina-II, tromboxano A<sub>2</sub>, prostaglandinas contráteis e ânions superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) ou espécies reativas de oxigênio (ROS). Em condições fisiológicas, a produção de fatores relaxantes é mais importante (Mombouli & Vanhoutte, 1999; Kurahashi *et al.*, 2003; Khazaei *et al.*, 2008).

O NO é gerado por meio da conversão do aminoácido L-arginina em L-citrulina pela enzima óxido nítrico sintase (NOS). A NOS requer as flavinas FAD e FMN, bem como NADPH e tetraidrobiopterina (BH<sub>4</sub>), para catalisar a oxidação da L-arginina. Três isoformas da NOS foram identificadas: NOS-I, NOS-II e NOS-III. A NOS-I ou NOS neuronal (nNOS) é encontrada predominantemente no sistema nervoso central. A NOS-II ou NOS induzível (iNOS) é encontrada em macrófagos, neutrófilos e outras células inflamatórias. Por fim, a NOS-III ou NOS endotelial (eNOS) é encontrada em células endoteliais, cardiomiócitos, osteoblastos e osteoclastos (Alderton *et al.*, 2001; Ricciardolo *et al.*, 2004; Khazaei *et al.*, 2008).

A eNOS está ancorada à membrana da célula endotelial, em microdomínios denominados cavéolas, e tem atividade regulada pelo complexo intracelular cálcio-calmodulina (Ca<sup>2+</sup>-CaM). O controle é exercido por aumento da concentração intracelular de íons cálcio ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) e a ativação consiste em translocação para o citosol e subsequente ligação a Ca<sup>2+</sup>-CaM. A ligação da CaM desloca uma alça autoinibitória adjacente na eNOS. A fosforilação de resíduos específicos na enzima, que a torna mais ou menos ativa em determinadas concentrações de Ca<sup>2+</sup>-CaM, pode ser considerada um mecanismo adicional de modulação da atividade da eNOS (Fulton *et al.*, 2001; Fleming & Busse, 2003).

O NO é sintetizado nas células endoteliais em resposta a estímulos fisiológicos como força de cisalhamento ou a estímulos químicos diversos como acetilcolina, bradicinina, ATP, histamina, substância P. A força de cisalhamento, que é a força exercida pelo fluxo sanguíneo sobre a parede



vascular, induz ativação da eNOS via PI3K/Akt. Já os agonistas citados ligam-se a receptores específicos na membrana das células endoteliais, induzindo aumento da  $[Ca^{2+}]_i$  e promovendo ativação da eNOS principalmente via mecanismos dependentes de  $Ca^{2+}$ . Além disso, há outras vias de fosforilação, independentes de  $Ca^{2+}$ , que ativam a enzima eNOS (Harris *et al.*, 2001; Zecchin *et al.*, 2007).

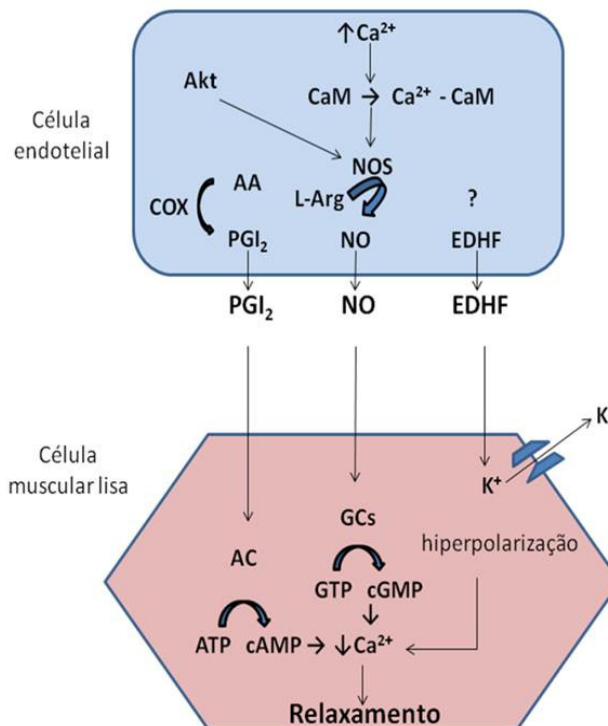
O NO sintetizado difunde-se do endotélio para o lúmen vascular e para o músculo liso vascular. No interior da célula muscular, o NO interage com o ferro do grupo heme da enzima guanilil-ciclase solúvel (GCs), ativando-a e promovendo então um aumento da formação de GMPc (Figura 22). Subsequentemente, ocorre ativação da proteína quinase dependente de GMPc (PKG), que reduz a  $[Ca^{2+}]_i$  e promove relaxamento muscular (Dusse *et al.*, 2003; Krumenacker *et al.*, 2004). Ressalta-se que o NO é uma importante molécula de sinalização e promove, quando liberado do endotélio, vasodilatação, proteção das células endoteliais à apoptose, inibição da proliferação de células musculares lisas, inibição da ativação plaquetária, dentre outras ações que regulam inflamação, angiogênese e trombose (Da Silva *et al.*, 2009).

Os prostanóides são produzidos pela ação de enzimas cicloxigenases (COX), que convertem o ácido araquidônico (AA) em endoperóxidos cíclicos (PGG<sub>2</sub> e PGH<sub>2</sub>). Enzimas adicionais produzem as prostaglandinas, como a prostaciclina sintase, responsável pela síntese de prostaciclina (PGI<sub>2</sub>). A PGI<sub>2</sub> é produzida por células endoteliais; no entanto, ao contrário do NO, o efeito vasodilatador da PGI<sub>2</sub> é determinado pela expressão de receptores específicos acoplados à proteína G nas células musculares lisas. Tais receptores ativam a adenilil-ciclase (AC), o que eleva os níveis intracelulares de AMPc (Figura 22). Esse nucleotídeo cíclico ativa a proteína quinase dependente de AMPc (PKA). A ação da PKA culmina em diminuição da  $[Ca^{2+}]_i$  e relaxamento do músculo liso (Coleman *et al.*, 1994; Vane & Corin, 2003; Wise, 2003).

O EDHF é definido como um mediador do relaxamento vascular via mecanismo independente de NO e de PGI<sub>2</sub> que envolve hiperpolarização de membrana nas células musculares lisas. A natureza exata do EDHF permanece não elucidada, mas vários estudos apontam candidatos, como

ácidos epoxieicosatrienóicos (EETs), íons potássio e peróxido de hidrogênio (Figura 22). A contribuição da resposta do EDHF em artérias é significativamente maior em vasos de resistência (Medhora *et al.*, 2001; Matoba & Shimokawa, 2003; Félétou & Vanhoutte, 2006; Campbell & Falck, 2007).

A figura 22 esquematiza a liberação das principais substâncias vasodilatadoras derivadas do endotélio e os respectivos efeitos no músculo liso.



**Figura 22:** Esquema representativo da liberação de fatores relaxantes das células endoteliais e respectivos efeitos em células musculares lisas. Adaptado de Mombouli & Vanhoutte (1999). Legenda: AA, ácido araquidônico; AC, adenilil-ciclase; L-Arg, L-arginina; CaM, calmodulina; COX, ciclooxigenase; EDHF, fator hiperpolarizante derivado do endotélio; GCs, guanilil-ciclase solúvel; NO, óxido nítrico; NOS, óxido nítrico sintase;  $\text{PGI}_2$ , prostaciclina.

# **Justificativa e Objetivos**

## 2. JUSTIFICATIVA

Nosso grupo de pesquisa mostrou pela primeira vez que a peçonha da aranha caranguejeira (*Lasiadora* sp.) promove hipotensão e bradicardia transitórias após administração endovenosa em ratos anestesiados. Além disso, verificou-se que a peçonha possui potente ação vasodilatadora em anéis de aorta de rato e ativa a enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS). Os resultados apontam que tal peçonha pode ser fonte potencial de compostos com efeitos benéficos para o sistema cardiovascular. Assim, técnicas de fracionamento são necessárias visando isolar um componente da peçonha que provoque esses efeitos biológicos.

## 3. OBJETIVOS

### 3.1. Objetivo geral

Isolar e caracterizar um ou mais componentes com ação vasodilatadora a partir da peçonha da aranha *Lasiadora* sp.

### 3.2. Objetivos específicos

- Fracionar a peçonha da aranha *Lasiadora* sp.;
- Isolar um ou mais componentes vasodilatadores por meio de técnicas de cromatografia associadas a ensaios biológicos em aorta de rato;
- Caracterizar e identificar o componente ativo por espectrometria de massas e ressonância magnética nuclear;
- Avaliar a proporção do composto ativo na peçonha total;
- Avaliar a reatividade vascular do componente isolado em aorta de rato;
- Avaliar a importância da ação do componente ativo no efeito vasodilatador da peçonha total.

# **Material e Métodos**

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Drogas utilizadas

A peçonha de aranha *Lasiadora* sp. e respectivas frações foram diluídas em água ultra pura grau biologia molecular (Phoneutria Biotecnologia e Serviços LTDA, Brasil). Para os ensaios de reatividade vascular, as amostras foram diluídas em solução de Krebs-Henseleit nas concentrações desejadas.

ADP, AMP e suramina (antagonista de receptores purinérgicos P2) foram adquiridos da Sigma (Sigma-Aldrich Co., USA) e diluídos em água ultra pura grau biologia molecular. ADP e AMP foram mantidos a -20°C na concentração-estoque de 100 mg/mL. A suramina foi estocada a -20°C na concentração de 10 mM. Para os experimentos em vaso isolado, as drogas foram diluídas em solução de Krebs-Henseleit nas concentrações desejadas.

### 4.2. Animais

As aranhas caranguejeiras (*Lasiadora* sp.) foram coletadas em Uberlândia, Minas Gerais, e criadas em cativeiro no Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG. Um espécime dessa aranha foi depositado na coleção do Instituto Butantan de São Paulo com o número IBSP 8539.

Foram utilizados ratos Wistar machos provenientes do Centro de Bioterismo (CEBIO) da UFMG, com idade entre 12 e 14 semanas (250 a 300 g). Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Fisiologia e Biofísica do ICB/UFMG, em ciclos de claro-escuro, com livre acesso a água e ração.

Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG, sob os protocolos 166/07 e 234/12.

### 4.3. Obtenção da peçonha bruta da aranha *Lasiadora* sp.

A extração da peçonha foi realizada por choque elétrico na quelícera (15 V). As amostras obtidas de diversas aranhas foram reunidas, diluídas em água ultra pura grau biologia molecular (Phoneutria Biotecnologia e Serviços LTDA,

Brasil) e centrifugadas a 4°C para a eliminação de impurezas. O sobrenadante foi liofilizado e estocado a -20°C para uso posterior.

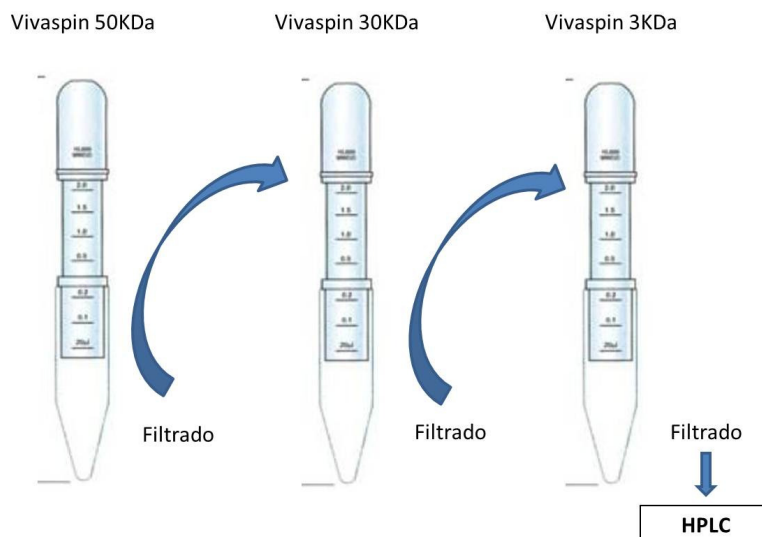
#### **4.4. Quantificação de proteínas**

A quantificação de proteínas da peçonha foi realizada segundo método descrito por Bradford (1976), utilizando-se albumina de soro bovino (BSA, fração 5) como padrão de proteínas.

#### **4.5. Fracionamento da peçonha bruta da aranha *Lasiadora* sp. e caracterização das frações obtidas**

##### **4.5.1. Filtração por massa molecular**

Ensaio preliminares de nosso grupo de pesquisa apontavam que o componente de interesse possui baixa massa molecular. Para separar componentes de baixa massa, foram utilizados filtros concentradores Vivaspin com diferentes cortes de membrana (GE Healthcare Lifesciences, USA). A peçonha bruta (30 mg) foi diluída em 60 mL de água ultrapura grau biologia molecular (Phoneutria Biotecnologia e Serviços LTDA, Brasil), transferida para tubos de centrífuga Vivaspin com corte de 50 kDa e centrifugada por 10 minutos a 4000 x g. O filtrado foi transferido para outros tubos Vivaspin com corte de 30 kDa e centrifugado por 10 minutos a 4000 x g. O filtrado proveniente dos tubos de 30 kDa foi transferido para tubos Vivaspin com corte de 3 kDa e centrifugado por 50 minutos a 4000 x g. O tempo e a rotação de cada etapa de centrifugação foram determinados de acordo com instruções do fabricante. Finalmente, o filtrado do tubo Vivaspin 3 kDa foi recolhido e liofilizado para a etapa seguinte de separação (Figura 23). Os filtrados e concentrados obtidos em cada etapa foram liofilizados e aplicados em gel de poliacrilamida SDS-PAGE.



**Figura 23:** Esquema de filtração seriada da peçonha bruta da aranha *Lasiodora* sp. Após centrifugação em filtros Vivaspin com determinado corte de membrana, os filtrados foram coletados e transferidos para filtro de corte menor. O filtrado proveniente da última etapa com Vivaspin de corte 3 kDa foi utilizado posteriormente para cromatografia em sistema HPLC.

#### 4.5.2. Resolução eletroforética em gel SDS-PAGE

Foi utilizado o sistema de gel desnaturante SDS-PAGE (Laemmli, 1970), preparado em placas de vidro com dimensões 10,0 x 8,0 x 0,2 cm com espaçadores de 1 mm. O gel de separação era constituído de 12,5% (v/v) de uma solução de: acrilamida/bisacrilamida 29:1 (p/p); Tris-HCl 0,4 M pH 8,8; SDS 0,1% (p/v); 50 mM de persulfato de amônia (PSA) e 0,05% (v/v) de TEMED. O gel de concentração era constituído de 4% (v/v) de uma solução de: acrilamida/bisacrilamida 29:1 (p/p); Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8; SDS 0,1% (p/v); PSA 50 mM e TEMED 0,025% (v/v). As amostras (10 µg, quando a dosagem de Bradford era possível) foram misturadas ao tampão de amostra desnaturante para SDS-PAGE 2X concentrado (100 mM de Tris-HCl pH 6,8; 4% de SDS; 0,2% de Azul de Bromofenol; 10% de β-mercaptoetanol; 20% de Glicerol), fervidas durante 5 minutos e aplicadas às canaletas do gel.

A eletroforese foi desenvolvida verticalmente com o tampão de eletroforese SDS-PAGE (0,3% Tris-HCl; 1,2% de glicina e 0,1% de SDS) a 120 V, 30 mA, durante aproximadamente 2 horas, até que o tampão da amostra atingisse o final do gel.



#### 4.5.3. Método de coloração pela prata

O método de coloração pela prata descrito por Rabilloud *et al.* (1994) foi realizado com algumas modificações. Após a eletroforese, o gel foi embebido durante 1 hora a 25°C em solução fixadora (50 mL de metanol, 12 mL de ácido acético, 40 µL de formaldeído, água destilada suficiente para 100 mL). Após 3 lavagens de 7 minutos com água destilada, o gel ficou em contato com uma solução de tiosulfato de sódio (0,04% p/v em água destilada) durante 1 minuto. Novamente, o gel foi submetido a 3 lavagens de 7 minutos com água destilada e então incubado por 20 minutos com solução de prata (0,1 g de AgNO<sub>3</sub>, 75 µL de formaldeído, água destilada suficiente para 100 mL). Seguiu-se rápida lavagem com água destilada. O gel foi mantido em contato com solução de desenvolvimento (6 g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 50 µL de formaldeído, 2 mL de solução aquosa de tiosulfato de sódio 0,04% p/v, água destilada suficiente para 100 mL) até o aparecimento de bandas. O gel foi então transferido imediatamente para recipiente contendo solução de parada (50 mL de metanol, 12 mL de ácido acético, água destilada suficiente para 100 mL).

#### 4.5.4. Cromatografia de fase reversa e caracterizações das frações

Em continuidade ao fracionamento, utilizou-se cromatografia líquida de fase reversa em sistema HPLC modelo Shimadzu Prominence (Shimadzu Co., Japan), em duas etapas. Primeiro, o filtrado proveniente da centrifugação em Vivaspin de 3 kDa (10 µL) foi diluído em 0,1 mL de ácido trifluoracético 0,1% (TFA, Sigma-Aldrich Co., USA) em água pura e filtrada e aplicado na coluna analítica C18SP (Grace Vydac, Inc., USA, C18 *small pore*, dimensões 90 Å, 5 µm, 4,6 x 250 mm), previamente equilibrada com o mesmo solvente. A fase móvel consistiu em TFA 0,1% em acetonitrila grau HPLC previamente filtrada (ACN, Merck, Germany). O gradiente utilizado foi de 0 a 17,5% de ACN (v/v) de 10 a 15 minutos e de 17,5 a 25% de ACN (v/v) de 15 a 50 minutos de corrida. Ressalta-se que, antes da padronização do gradiente, uma corrida teste era realizada com gradiente linear de 0 a 100% de ACN (v/v). O fluxo foi de 1 mL por minuto. As amostras foram monitoradas em absorbância de 214 nm. Essa primeira etapa de cromatografia foi realizada no Laboratório de Biologia

Molecular de Produtos Naturais do Departamento de Bioquímica e Imunologia do ICB/UFMG, orientado pelo Prof. Dr. Carlos Edmundo Salas Bravo.

Para identificar a presença do componente vasodilatador, uma triagem com as frações obtidas da cromatografia foi realizada em montagem de aorta isolada de rato (descrição da metodologia no item 4.8). Com a impossibilidade de dosagem pelo método de Bradford, a quantidade de cada fração a ser utilizada foi padronizada pela densidade óptica de cada pico a 214 nm, obtida no programa de aquisição de dados do HPLC Shimadzu Prominence. Considerou-se que a densidade óptica do filtrado proveniente do Vivaspin de corte 3 kDa resultou da soma das densidades de todos os picos obtidos. Foi determinada uma unidade arbitrária de concentração (unidade de concentração, UC) e a triagem foi realizada utilizando-se concentrações crescentes.

Amostra da fração que continha o componente vasoativo (0,1 mL) foi diluída em água ultrapura (q.s.p. 1 mL). Um espectro de absorção no ultravioleta (UV), no intervalo de 200 a 400 nm, foi adquirido com a amostra em espectrofotômetro.

Em uma segunda etapa de purificação, a fração que continha o componente vasoativo (100 µL) foi diluída em 0,5 mL de ácido trifluoracético (TFA) 0,1% em água e aplicada na coluna semi-preparativa C18SP (Grace Vydac, Inc., USA, C18 *small pore*, dimensões 90 Å, 5 µm, 10 x 250 mm), previamente equilibrada com o mesmo solvente. A fase móvel consistiu em TFA 0,1% em acetonitrila (ACN). O gradiente utilizado foi de 2 a 30% de ACN (v/v) em 75 minutos, 30 a 80% de ACN (v/v) de 75 a 85 minutos e de 80 a 2% de ACN (v/v) de 100 a 110 minutos de corrida. O fluxo foi de 5 mL por minuto. As amostras foram monitoradas em absorbâncias de 214 e 254 nm.

## **4.6. Avaliação estrutural do componente isolado**

### **4.6.1. Espectrometria de massas**

As análises foram realizadas no Centro de Espectrometria de Massas Aplicada (CEMSA), em São Paulo. Foi utilizado um espectrômetro de massas do tipo QqLIT (*hybrid triple quadrupole-linear ion trap*) – 3200 QTRAP (Applied Biosystems-Sciex, USA) acoplado à fonte de Electrospray (ESI). A amostra foi

diluída em solução 1:1 de água/acetonitrila. O modo de varredura foi positivo, em MS e MS/MS, a 4000 Da/segundo. Os parâmetros do equipamento foram: voltagem do capilar de 55 kV, fluxo de gás a 28 unidades arbitrárias (AU) e do gás auxiliar a 10 AU.

#### 4.6.2. Ressonância magnética nuclear (RMN)

A Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é uma das mais poderosas técnicas espectroscópicas no estudo de aspectos estruturais e dinâmicos de moléculas orgânicas em solução. Essa técnica está relacionada com as transições induzidas pelas radiofrequências entre estados quantificados de energia dos núcleos orientados em um campo magnético. Os espectros em uma dimensão (1D)  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  são obtidos rotineiramente, sendo que os dados de deslocamento químico são ferramentas importantes em uma determinação estrutural. As técnicas em duas dimensões (2D) permitem correlacionar hidrogênios e/ou carbonos que possuam alguma relação escalar ou espacial entre si. Assim, o mapeamento estrutural é mais preciso e completo, comparando-se à utilização dos espectros em 1D apenas (Kaiser, 2000).

As análises de RMN foram realizadas no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear da Escola de Química da *University of Edinburgh*, Reino Unido, coordenado pelo Prof. Dr. Dušan Uhrín.

A amostra de fração obtida na última etapa cromatográfica foi liofilizada e ressuspendida em 350  $\mu\text{L}$  de água deuterada.

Foram obtidos, a princípio, espectros de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , bem como mapas de contorno em duas dimensões de:  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY (*Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy*),  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY (*Correlation Spectroscopy*),  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  TOCSY (*Total Correlation Spectroscopy*),  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Coherence*) e  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC (*Heteronuclear Multiple Bond Coherence*). Após análise dos primeiros resultados, foi necessário obter os seguintes espectros:  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HMBC,  $^{31}\text{P}$ ,  $^1\text{H}$ - $^{31}\text{P}$  HMBC,  $^1\text{H}$  com e sem dissociação de  $^{31}\text{P}$ .

Os espectros iniciais foram obtidos com o pH da amostra, que era ácido (pH 3,8) devido à eluição na cromatografia com TFA 0,1% em água. Assim, o

pH foi ajustado para 6,5 e as análises também foram realizadas nessa condição.

Todos os espectros de RMN foram obtidos em um espectrômetro Bruker Avance 800 MHz (Bruker Daltonics, Germany).

#### **4.7. Determinação do conteúdo de ADP e AMP na peçonha**

Para esse protocolo, os compostos adenosina difosfato (ADP) e adenosina monofosfato (AMP) foram adquiridos comercialmente (Sigma-Aldrich Co., USA) e utilizados como padrão. A primeira etapa do trabalho foi avaliar o perfil de cada composto em cromatografia líquida de fase reversa em sistema HPLC modelo Shimadzu Prominence (Shimadzu Co., Japan).

Assim, 30 µg de cada composto foram diluídos em 1 mL de ácido trifluoracético (TFA) 0,1% em água e aplicados na coluna analítica C18 modelo Shim-pack VP-ODS (Shimadzu Co., Japan, dimensões 120 Å, 5 µm, 4,6 x 150 mm), previamente equilibrada com o mesmo solvente. A fase móvel consistiu em TFA 0,1% em acetonitrila (ACN). O gradiente utilizado foi de 0 a 80% de ACN (v/v) de 10 a 35 minutos, mantendo-se em 80% de ACN (v/v) por mais 10 minutos de corrida. O fluxo foi de 1 mL por minuto. As amostras foram monitoradas em absorbância de 214 e 254 nm.

A peçonha (260 µg) foi diluída em 1 mL de ácido trifluoracético (TFA) 0,1% em água e submetida ao mesmo processo de cromatografia, em condições semelhantes aos padrões. A presença de ADP e AMP na peçonha foi detectada comparando-se o tempo de retenção dos picos da amostra em relação aos padrões. Para confirmação, foi realizada cromatografia da amostra de peçonha com adição dos padrões de ADP e AMP.

O conteúdo de ADP e AMP na peçonha foi estimado por comparação dos valores de área sob a curva do pico de cada composto nas análises de cromatogramas de amostra e padrões. Tais valores foram calculados pelo programa de aquisição de dados do HPLC Shimadzu Prominence.

## 4.8. Procedimentos experimentais em vaso isolado

### 4.8.1. Preparação e montagem dos anéis de aorta de rato

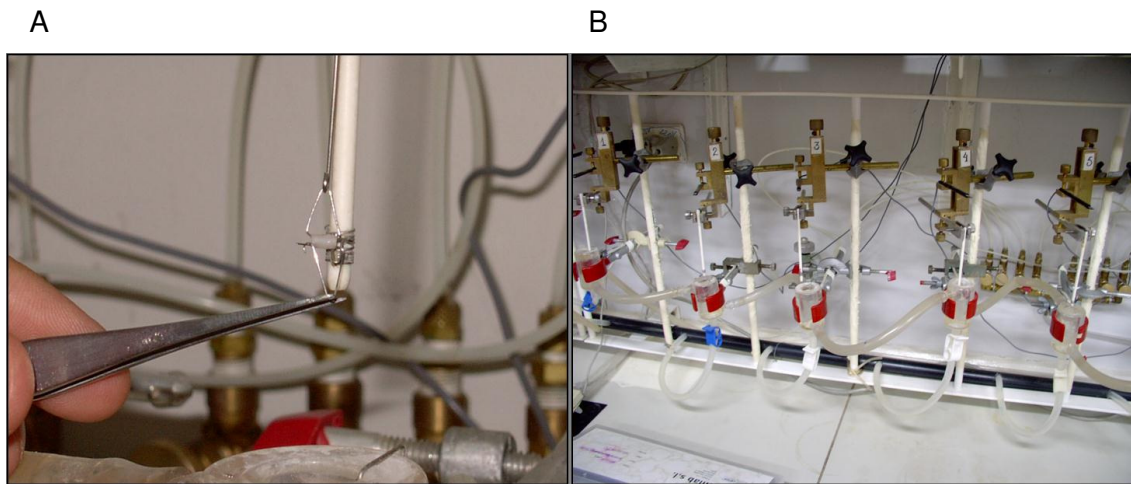
Os ensaios de reatividade vascular foram realizados no Laboratório de Fisiologia Cardiovascular do Departamento de Fisiologia e Biofísica do ICB/UFMG, orientado pela Profa. Dra. Virgínia Soares Lemos.

Os animais foram sacrificados por decapitação e exsanguinação. Os anéis de aorta foram montados conforme descrito por Lemos *et al.* (1999).

Após o sacrifício dos animais, a aorta torácica foi cuidadosamente removida, isolada de tecido adiposo e de tecido conjuntivo e transferida para uma placa de Petri contendo solução de Krebs-Henseleit (mM): NaCl 110,8; KCl 5,9; NaHCO<sub>3</sub> 25,0; MgSO<sub>4</sub> 1,07; CaCl<sub>2</sub> 2,49; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,33 e glicose 11,51. Em seguida, a aorta foi cortada em anéis de aproximadamente 3-4 mm de comprimento. Hastes metálicas triangulares foram passadas através do lúmen de cada anel e essas hastes foram acopladas a transdutores isométricos. A preparação ficou suspensa em cubas de vidro com capacidade para 10 mL e mantida em solução de Krebs-Henseleit aerada com carbogênio (95% O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>), a 37°C (Figura 24). Os vasos foram mantidos a uma tensão de 1g, que foi regulada durante a primeira hora do experimento para estabilização da preparação. Durante a estabilização, a solução presente nas cubas foi trocada a cada 15 minutos, a fim de evitar o acúmulo de produtos do metabolismo dos vasos. Após o período de estabilização, os vasos foram contraídos com fenilefrina (0,3 µM) e, uma vez que a contração atingiu um platô, a presença de endotélio funcional foi confirmada com a administração de acetilcolina (10 µM). Apenas os anéis de aorta que apresentavam relaxamento superior a 60% em relação à contração máxima induzida pela fenilefrina eram utilizados em protocolos experimentais que necessitavam de vasos com endotélio funcional. Após o teste de reatividade vascular, os anéis de aorta foram lavados e seguiu-se outro período de estabilização de 30 minutos antes do início dos protocolos experimentais, com troca da solução de Krebs-Henseleit a cada 15 minutos.

As respostas foram registradas utilizando-se transdutores de tensão isométrica (World Precision Instruments, Inc., USA) conectados a um amplificador (TBM-4; World Precision Instruments, Inc.) e a um computador equipado com placa conversora analógico/digital (AD16JR; World Precision

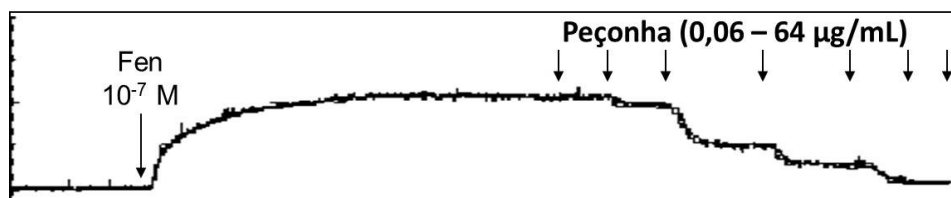
Instruments, Inc.). O programa Windaq (DATAQ Instruments, Inc., USA) foi utilizado para aquisição de dados.



**Figura 24:** (A) Conexão do anel de aorta às hastes metálicas e o acoplamento dessas a transdutores isométricos. (B) Sistema de banho de órgãos utilizado para experimentos de reatividade vascular no Laboratório de Fisiologia Cardiovascular do ICB.

#### 4.8.2. Avaliação de reatividade vascular em anéis de aorta de rato

Após o teste de funcionalidade do endotélio e o período de estabilização, os vasos foram pré-contraídos com fenilefrina ( $0,1 \mu\text{M}$ ) e, durante a fase tônica da contração, foram construídas curvas concentração-resposta cumulativas com a peçonha bruta ( $0,06$  a  $64 \mu\text{g/mL}$ ) (Figura 25) e frações provenientes de etapas de purificação da peçonha (filtrado  $3 \text{ kDa}$  e fração 2, de 1 a 127 unidades arbitrárias de concentração).



**Figura 25:** Esquema representativo da curva de relaxamento concentração-resposta cumulativa induzida pela peçonha da aranha *Lasiodora* sp. em vasos pré-contraídos com fenilefrina (Fen).

Para avaliar a importância da atividade do ADP no efeito vasodilatador da peçonha total, curvas concentração-resposta cumulativas da peçonha foram

realizadas na presença de suramina, um antagonista de receptores purinérgicos P2. Para isso, os anéis de aorta foram pré-incubados por 20 minutos com 100  $\mu\text{M}$  de suramina. Como controle, curvas concentração-resposta de ADP (0,001 a 316  $\mu\text{M}$ ) também foram feitas nas mesmas condições.

A fração da peçonha que continha o princípio ativo foi aplicada aos anéis de aorta em concentração única (4  $\mu\text{M}$ ), na presença e na ausência de 100  $\mu\text{M}$  de suramina.

#### 4.9. Análise estatística

Todos os parâmetros avaliados foram representados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM).

Os resultados dos protocolos em vaso isolado foram expressos como diminuição percentual da contração máxima induzida por fenilefrina, sendo que o ponto no qual a linha basal era alcançada foi considerado como 100%. Valores de  $EC_{50}$  (concentração que produz 50% do efeito máximo) foram calculados graficamente a partir das curvas concentração-resposta por regressão não linear. Os valores de efeito máximo ( $E_{\text{máx}}$ ) foram estimados graficamente.

Para a comparação das médias entre os grupos foi utilizado o teste t de Student. O teste ANOVA *Two-way*, seguido do teste de Bonferroni, foi utilizado para a comparação entre as médias de valores distintos de um grupo e as médias de valores de um segundo grupo. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos. Os cálculos e análises estatísticas foram realizados utilizando-se o programa Graph Pad Prism 4.0 (GraphPad Software, USA).

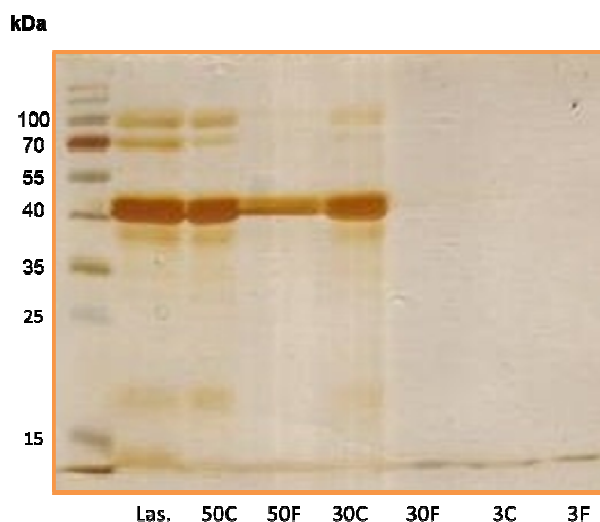
# Resultados



## 5. RESULTADOS

### 5.1. Fracionamento da peçonha bruta da aranha *Lasiodora* sp. e caracterização das frações obtidas

A figura 26 mostra a resolução eletroforética em gel SDS-PAGE dos filtrados e concentrados obtidos na primeira etapa de fracionamento da peçonha bruta de *Lasiodora* sp., utilizando-se filtros Vivaspín com diferentes cortes de membrana. Observa-se que componentes com massa molecular acima de 15 kDa já não são mais detectados por esse método a partir do filtrado de Vivaspín com corte de 30 kDa.

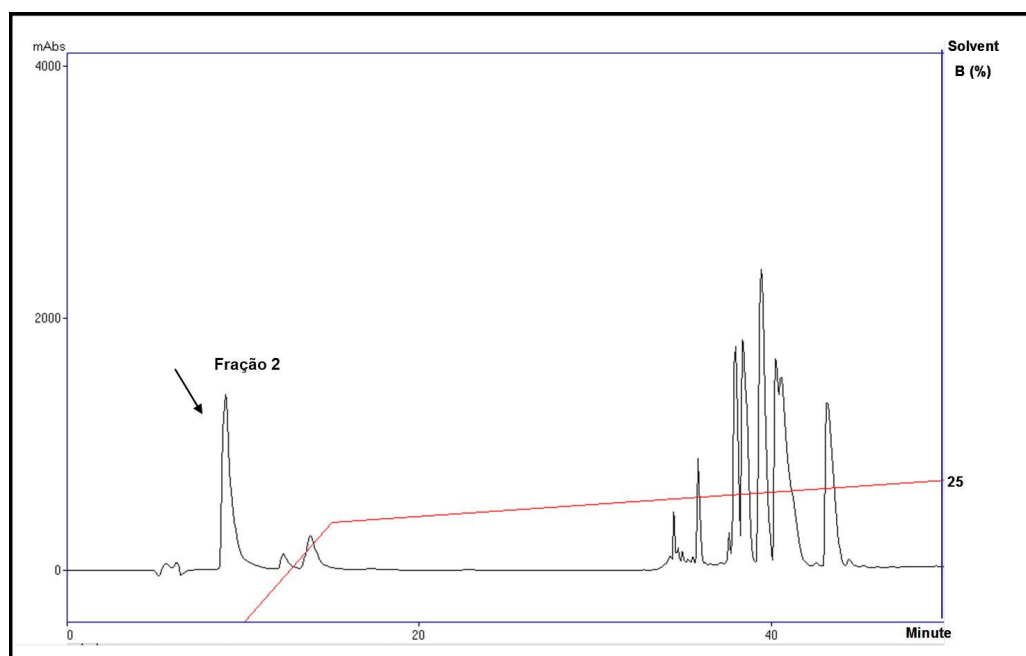


**Figura 26:** Eletroforese em gel de poliacrilamida a 12,5%. A primeira canaleta é o padrão de massa molecular pré-corado (Thermo Fischer Scientific, Inc., USA). A segunda canaleta é a peçonha bruta de *Lasiodora* sp. A terceira e a quarta canaletas mostram, respectivamente, o concentrado e o filtrado após centrifugação no Vivaspín de corte 50 kDa. A quinta e a sexta canaletas mostram, respectivamente, o concentrado e o filtrado após centrifugação no Vivaspín de corte 30 kDa. A sétima e a oitava canaletas mostram, respectivamente, o concentrado e o filtrado após centrifugação no Vivaspín de corte 3 kDa.

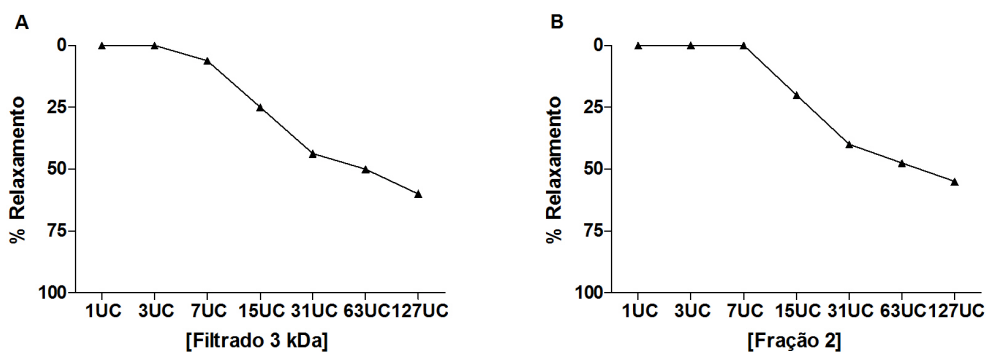
A primeira etapa de fracionamento concentrou o componente ativo no filtrado do Vivaspín de 3 kDa (Figura 28A). Testes de triagem farmacológica apontaram ação também no concentrado dessa mesma etapa, porém o efeito vasodilatador do filtrado foi mais acentuado. Dessa forma, esse filtrado foi aplicado em coluna C18SP e o cromatograma está exposto na Figura 27.

Assim como o filtrado, as frações resultantes da cromatografia em fase reversa não eram passíveis de ser dosadas pelo método de Bradford. Dessa forma, desconhecendo-se a natureza desses componentes e uma metodologia específica para dosá-los, a triagem de ação farmacológica em anéis de aorta foi realizada estimando-se a quantidade das amostras pela densidade óptica dos picos a 214 nm. Foi determinada uma unidade arbitrária de concentração (unidade de concentração, UC) e a triagem foi realizada utilizando-se concentrações crescentes.

A triagem revelou que apenas a fração 2, em destaque no cromatograma da figura 27, possui ação dilatadora em anéis de aorta (Figura 28B).

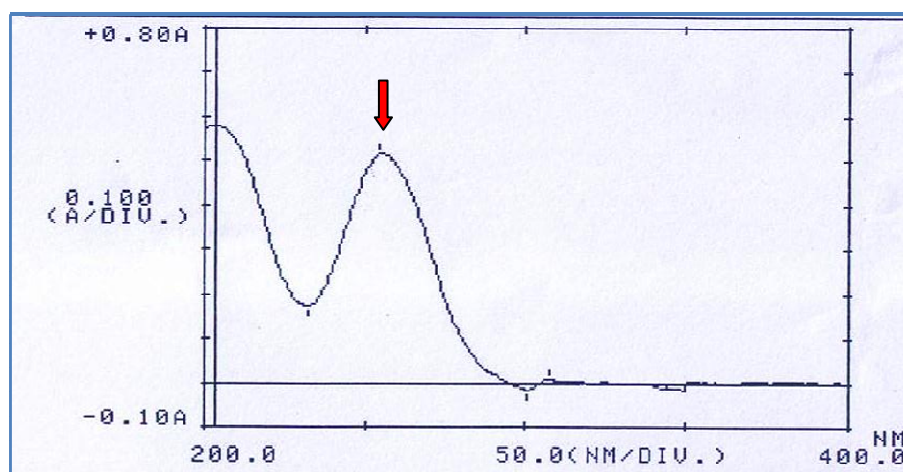


**Figura 27:** Perfil cromatográfico do filtrado do Vivaspín de corte 3 kDa em coluna analítica C18SP. O filtrado (10  $\mu$ L) foi diluído em 0,1 mL de ácido trifluoracético (TFA) 0,1% em água e aplicado na coluna previamente equilibrada com o mesmo solvente. A fase móvel consistiu em TFA 0,1% em acetonitrila (ACN). O gradiente utilizado foi de 0 a 17,5% de ACN (v/v) de 10 a 15 minutos e de 17,5 a 25% de ACN (v/v) de 15 a 50 minutos de corrida. O fluxo foi de 1 mL por minuto. As amostras foram monitoradas em absorvância de 214 nm. A seta destaca a fração que contém o componente vasodilatador.



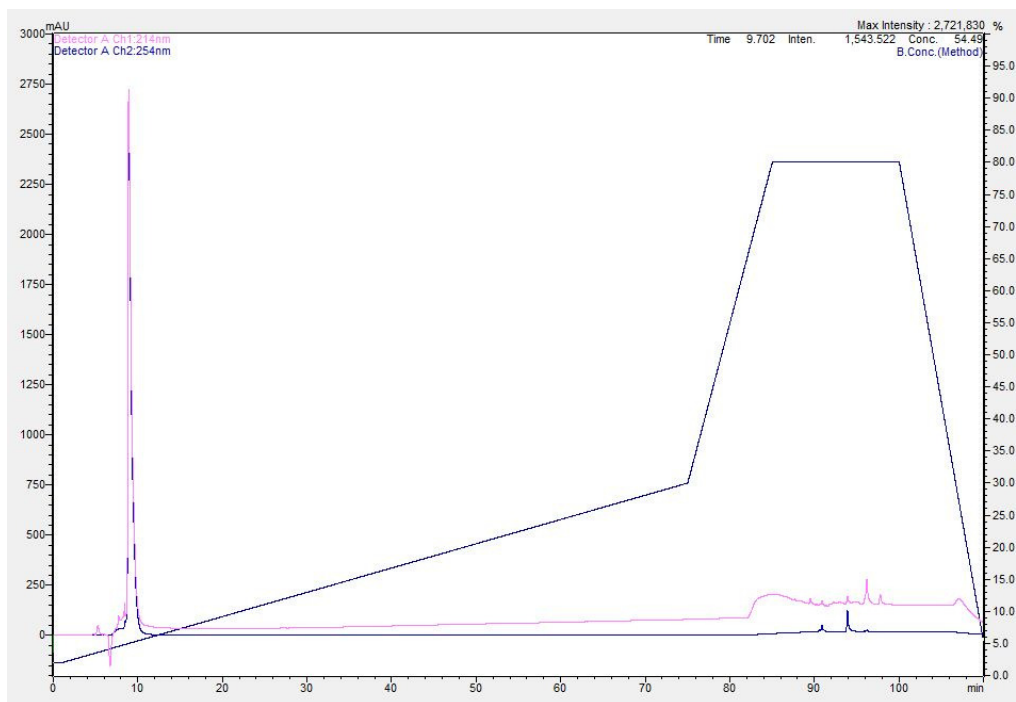
**Figura 28:** Efeito relaxante induzido pelo filtrado do Vivaspin de corte 3 kDa (A) e pela fração 2 proveniente de cromatografia em coluna C18SP (B), em diferentes concentrações (1UC a 127UC), em anéis de aorta de rato contendo endotélio funcional. As amostras foram dosadas estimando-se a quantidade pela densidade óptica dos picos a 214 nm. As concentrações foram determinadas em unidades arbitrárias (unidade de concentração, UC). Cada ponto representa o valor de um experimento realizado como triagem farmacológica.

O espectro de absorção no ultravioleta da fração 2 mostra picos de absorbância nas regiões de 214 e 254 nm (Figura 29).



**Figura 29:** Espectro no ultravioleta (200 a 400 nm) da fração 2 proveniente de cromatografia em coluna C18SP. A seta vermelha aponta pico de absorbância em 254 nm.

Como última etapa de purificação do componente vasodilatador da peçonha da aranha *Lasiodora* sp., a fração 2 foi aplicada em outra coluna de fase reversa. O perfil cromatográfico da Figura 30 mostra um pico predominante no início da corrida, que é vasodilatador.



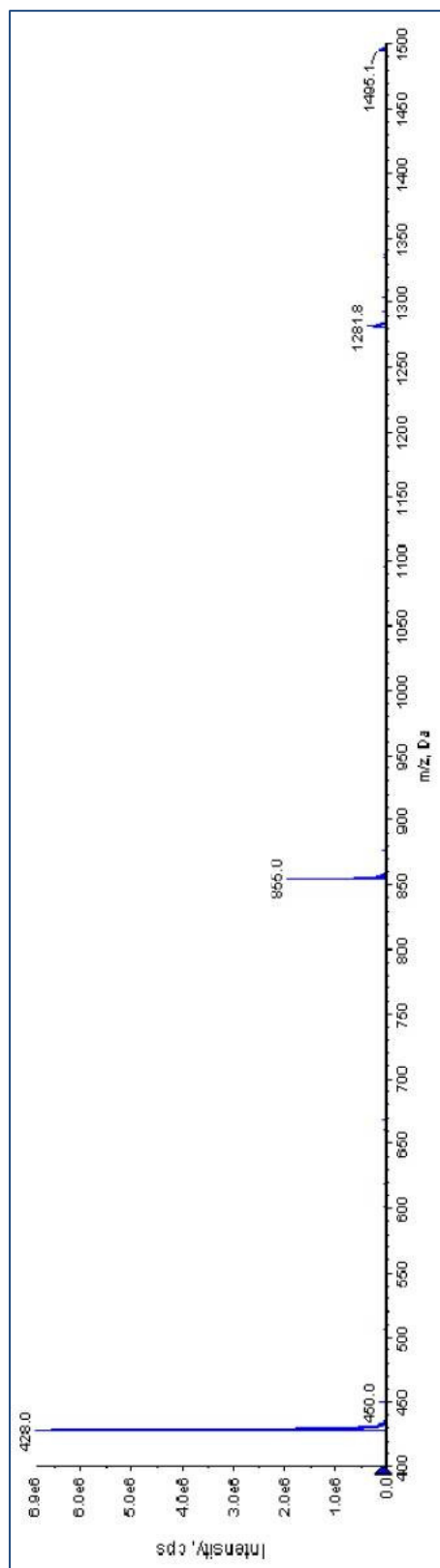
**Figura 30:** Perfil cromatográfico da fração 2 em coluna semi-preparativa C18SP. A fração 2 (100  $\mu$ L) foi diluída em 0,5 mL de ácido trifluoracético (TFA) 0,1% em água e aplicada na coluna previamente equilibrada com o mesmo solvente. A fase móvel consistiu em TFA 0,1% em acetonitrila (ACN). O gradiente utilizado foi de 2 a 30% de ACN (v/v) em 75 minutos, 30 a 80% de ACN (v/v) de 75 a 85 minutos e de 80 a 2% de ACN (v/v) de 100 a 110 minutos de corrida. O fluxo foi de 5 mL por minuto. As amostras foram monitoradas em absorvâncias de 214 (linha rosa) e 254 nm (linha azul).

## 5.2. Avaliação estrutural do componente isolado

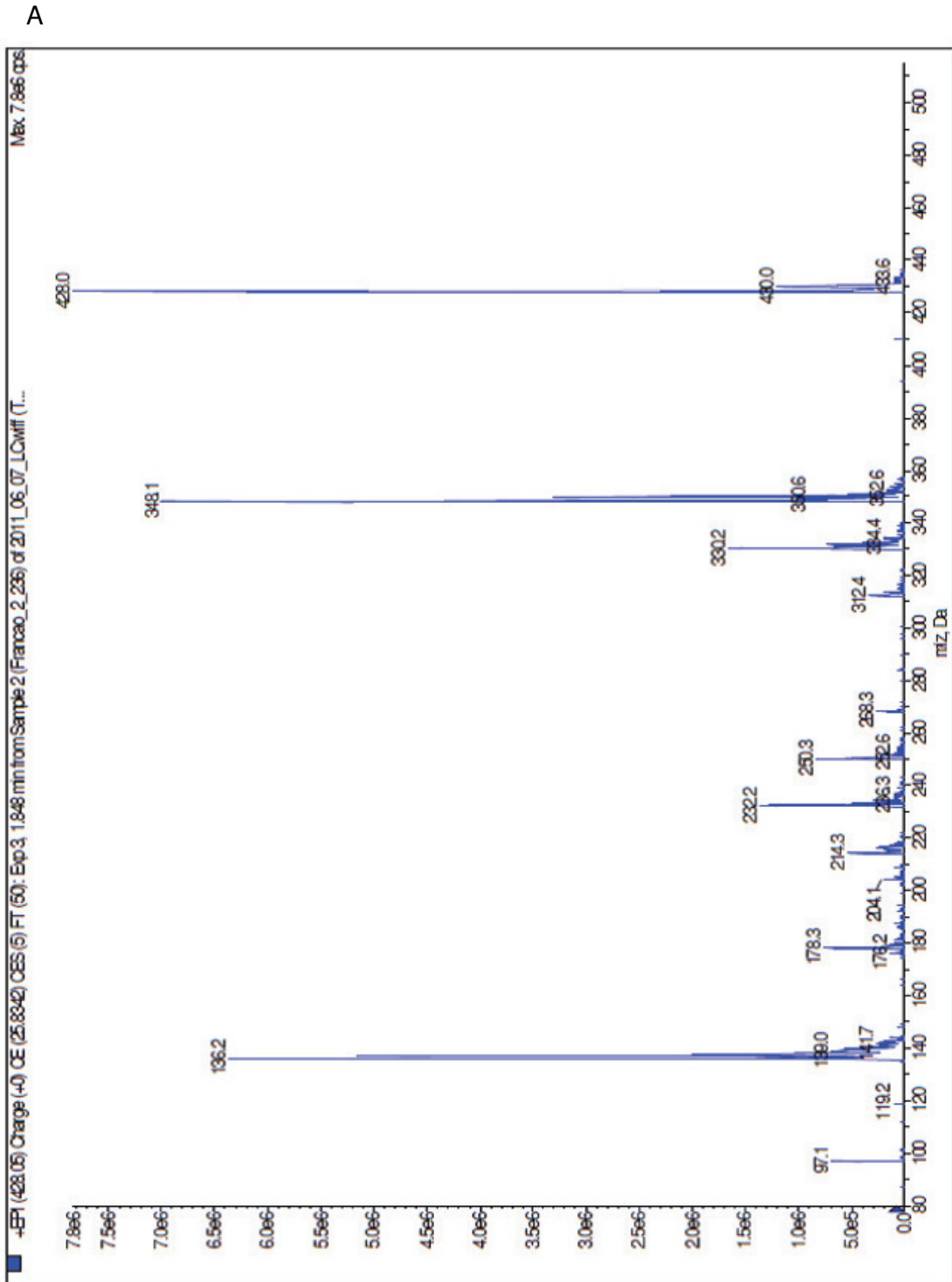
### 5.2.1. Espectrometria de massas

A determinação da relação massa/carga ( $m/z$ ) em ESI-MS revelou três íons moleculares, de 428, 855 e 1281,8  $m/z$  (Figura 31). A visão aproximada dos picos no espectro aponta que os íons moleculares possuem carga 1, ou seja, todos os íons moleculares estão na forma  $[M + H]^+$ .

A figura 32 mostra os espectros de massa após fragmentação dos três íons-moléculares em MS/MS, separadamente. A fragmentação do íon-molecular de 1281,8  $m/z$  resulta em íons-fragmentos de 855 e 428  $m/z$  (Figura 32C), assim como a fragmentação do íon-molecular de 855  $m/z$  revela o íon-fragmento de 428  $m/z$  (Figura 32B). Vale observar que os valores  $m/z$  das três moléculas são proporcionais entre si em um fator de 2. Os resultados sugerem que, possivelmente, há formação de dímeros e trímeros a partir de um componente de massa aproximada de 427 Da.



**Figura 31:** Espectro de massas ESI-MS, no modo positivo, da fração vasodilatadora, revelando picos de 428, 855 e 1281,8 m/z.



**Figura 32A:** Espectro de fragmentação MS/MS do pico de 428 m/z.

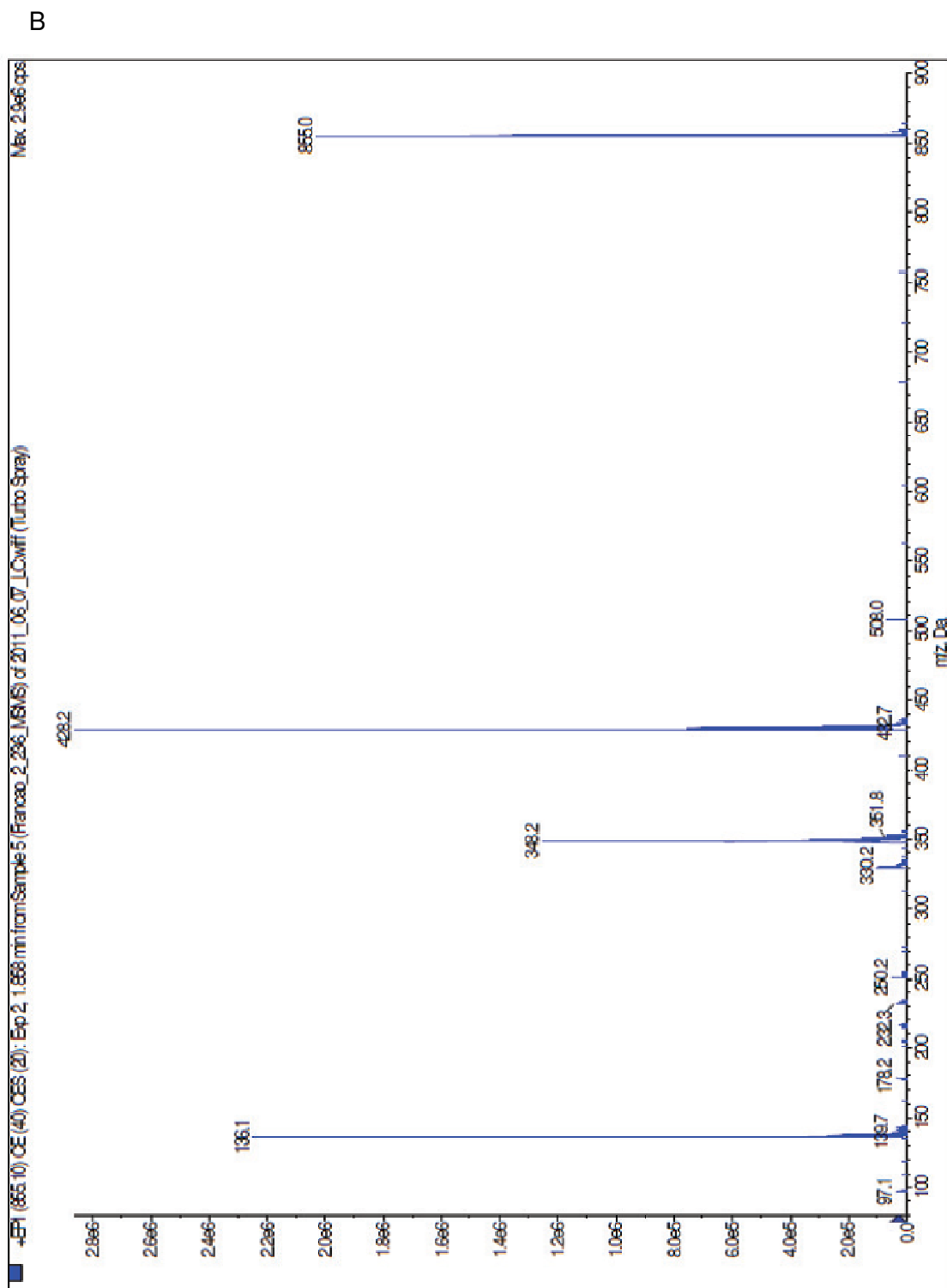
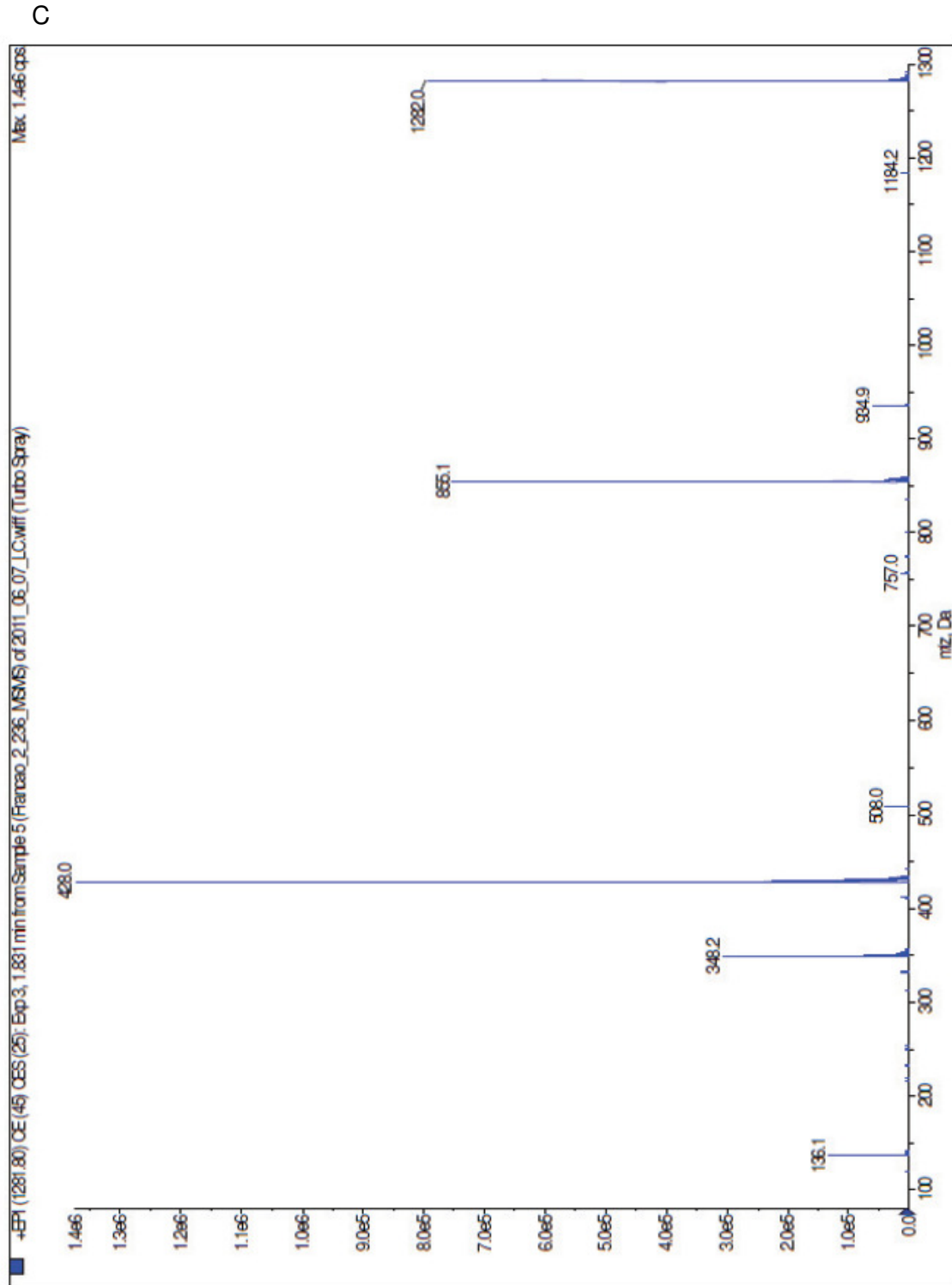


Figura 32B: Espectro de fragmentação MS/MS do pico de 855 m/z.



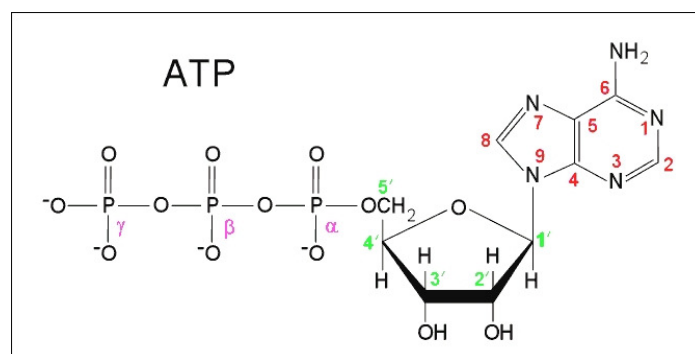
**Figura 32C:** Espectro de fragmentação MS/MS do pico de 1281,8 m/z.



### 5.2.2. Ressonância magnética nuclear

As análises iniciais dos espectros apontavam para uma mistura de dois componentes similares com uma estrutura básica semelhante à de nucleotídeos. Diante dessa suspeita, a revisão dos resultados de espectrometria de massas apontou para o composto adenosina difosfato (ADP), que é um nucleotídeo de 427,2 Da.

As análises seguintes foram então realizadas utilizando-se comparações com a estrutura de nucleotídeos, como a da figura 33, suspeitando-se que a amostra consistia em adenosina difosfato (ADP) e, em menor quantidade na mistura, adenosina monofosfato (AMP).



**Figura 33:** Estrutura molecular de adenosina trifosfato (ATP), com destaque para a numeração dos átomos, que foi utilizada nos ensaios.

O espectro COSY mostrou as correlações de acoplamentos esperadas para os prótons da ribose  $H1' \rightarrow H2' \rightarrow H3' \rightarrow H4' \rightarrow H5a'b'$ . O espectro TOCSY apresentou a transferência de magnetização esperada entre os prótons de uma estrutura de ribose. O espectro NOESY, que detecta a proximidade espacial dos prótons, confirmou que o carboidrato presente na estrutura da molécula é de fato uma ribose. Observa-se na tabela 4 que há proximidade internuclear entre H8 e H1', H2', H3', H5a' (mas não com H4', já que esse próton localiza-se no anel do lado oposto ao de H8).

**Tabela 4:** Intensidades de picos de correlação obtidos no espectro 2D NOESY para ADP.

	H8	H2	H1'	H2'	H3'	H4'	H5a'	H5b'
H8			média	forte	fraca		muito fraca	
H2			muito fraca					
H1'	média			média	fraca	média		
H2'					forte		fraca	
H3'						média	forte	
H4'							forte	forte
H5a'								

Nos espectros RMN de  $^1\text{H}$ , foram observados alguns sinais de deslocamento químico ( $\delta/\text{ppm}$ ), que estão expostos na tabela 5.

**Tabela 5:** Deslocamentos químicos no espectro RMN de  $^1\text{H}$  ( $\delta/\text{ppm}$ ) para os componentes da amostra em diferentes condições de pH.

Átomo	ADP(pH=3,8)	ADP(pH=6,5)	AMP(pH=3,8)	AMP(pH=6,5)
H8	8,676	8,533	8,637	8,466
H2	8,451	8,283	8,443	8,280
H1'	6,208	6,159	6,212	6,152
H2'	4,816	4,781	4,787	4,788
H3'	4,584	4,578	4,531	4,515
H4'	4,431	4,404	4,416	4,387
H5a'	4,270	4,250	4,177	4,09
H5b'	4,24	4,22	4,139	4,09

Observa-se que as mudanças no pH afetam principalmente os deslocamentos químicos dos prótons da base nitrogenada, H2 e H8. O próton

H1' é também afetado devido à proximidade com a base. Isso ocorre em razão de diferentes níveis de protonação no anel da base. Observa-se também que o estado de protonação do grupo fosfato terminal  $\text{PO}_2^-$  afeta mais H5a'b' da molécula de AMP do que os mesmos prótons da molécula de ADP. Isso ocorre porque, na molécula de AMP, o grupo fosfato terminal está ligado diretamente ao carbono C5'.

Quando os deslocamentos químicos de  $^1\text{H}$  para ADP e AMP em um mesmo valor de pH são comparados, as maiores diferenças entre ADP e AMP são observadas para H5a'b'. Isso ocorre devido à diferença de mono ou difosforilação das moléculas, pois os prótons H5a'b' estão mais próximos a esse sítio e são, por isso, mais afetados.

Nos espectros RMN de  $^{13}\text{C}$ , os valores de deslocamento químico ( $\delta/\text{ppm}$ ) da amostra foram comparados aos sinais para ADP e AMP descritos na literatura, como exposto na tabela 6.

**Tabela 6:** Deslocamentos químicos no espectro RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\delta/\text{ppm}$ ) para os componentes da amostra, em diferentes condições de pH, bem como valores descritos na literatura para ADP e AMP.

Átomo	ADP(pH=3,8)	ADP(pH=6,5)	AMP(pH=3,8)	AMP(pH=6,5)	ADP*	AMP*
C6	150,63	155,78	ND	ND	155,74	156,41
C4	148,58	149,28	ND	ND	149,58	149,94
C5	118,68	118,80	ND	ND	119,22	119,5
C8	142,42	140,06	142,17	140,12	140,75	141,11
C2	145,55	152,98	145,95	152,98	152,89	153,73
C1'	87,95	86,97	87,95	86,97	87,77	88,08
C2'	74,71	74,39	74,71	74,46	74,93	75,28
C3'	70,42	70,35	70,43	70,65	70,91	71,46
C4'	84,41	84,03	84,46	84,04	84,4	85,3
C5'	65,02	64,97	64,41	64,05	65,64	64,53

\*Fonte: Spectral Database for Organic Compounds SDBS, 2012.

ND: não determinado.

As maiores diferenças de deslocamento químico de  $^{13}\text{C}$  decorrentes de mudança no pH foram observadas para os carbonos C2, C6 e também para C1'. Tais observações são consistentes com os diferentes estados de protonação da base nitrogenada com a variação de pH. Quando os deslocamentos  $^{13}\text{C}$  de ADP e AMP em um mesmo valor de pH são comparados, as maiores diferenças entre ADP e AMP são vistas para C5'. O mesmo ocorre quando os deslocamentos químicos descritos na literatura para ADP e AMP são comparados. Tais observações são semelhantes às obtidas com deslocamento  $^1\text{H}$  de ADP e AMP (tabela 5), como visto anteriormente, refletindo a diferença de fosforilação entre os dois compostos.

Os dados experimentais ficaram em melhor conformidade com os dados da literatura quando o pH foi ajustado para 6,5.

Análises dos deslocamentos químicos no espectro RMN de  $^{31}\text{P}$  mostraram que a titulação para pH 6,5 promoveu um movimento dos sinais de ADP e AMP (Tabela 7). Essas ressonâncias foram confirmadas pelo espectro  $^1\text{H}$ - $^{31}\text{P}$  HMBC, no qual a correlação com os prótons H5' foi observada para ADP e AMP. Os dados estão de acordo com o que é descrito na literatura para ADP e AMP (Trandunh & Neumann, 1977; Kalic *et al.*, 1997; Mascaros *et al.*, 2011).

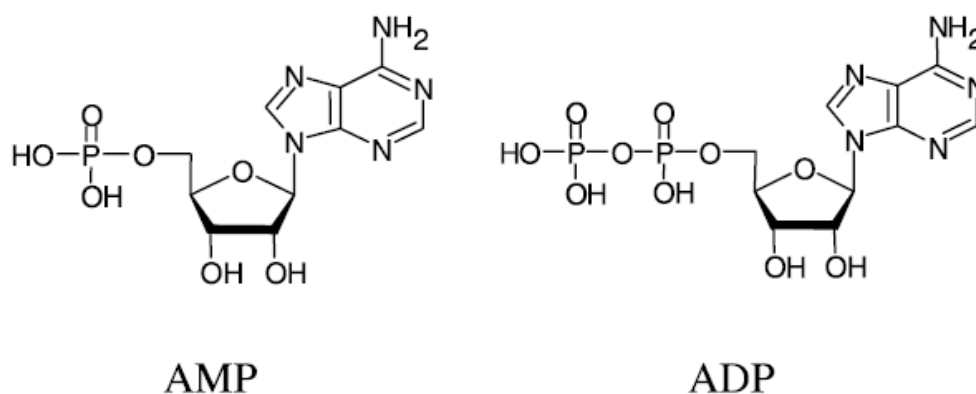
**Tabela 7:** Deslocamentos químicos no espectro RMN de  $^{31}\text{P}$  ( $\delta/\text{ppm}$ ) para os componentes da amostra, em diferentes condições de pH.

Átomo	pH=3,8	pH=6,5	pH=6,5
	ADP	ADP	ADP*
P $\alpha$	-11,1	-11,0	-11,1
P $\beta$	-10,7	-9,4	-9,6
	AMP	AMP	-
P $\alpha$	0,28	1,72	-

\*Fonte: Mascaros *et al.*, 2011.

Os experimentos realizados confirmaram a hipótese inicial. Foram identificados na amostra, além de algumas impurezas, dois compostos

principais: ADP (88%) e AMP (12%) (Figura 34). As imagens dos espectros obtidos encontram-se no anexo deste trabalho.

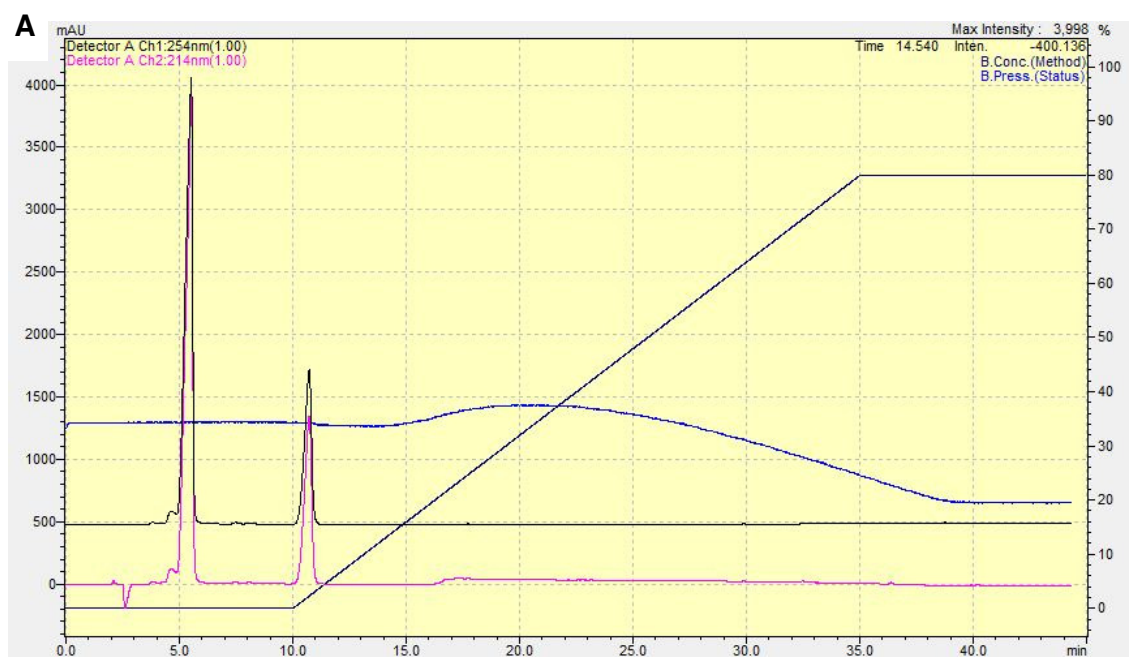


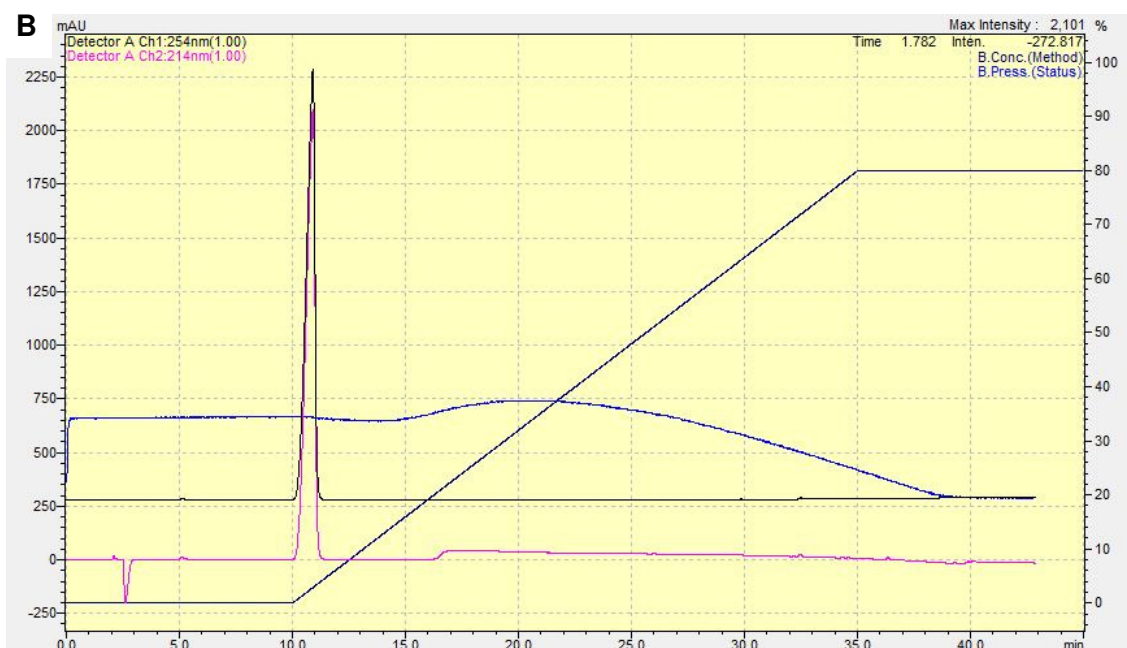
**Figura 34:** Estruturas moleculares de adenosina monofosfato (AMP) e adenosina difosfato (ADP). Fonte: Qian *et al.*, 2004.

### 5.3. Determinação do conteúdo de ADP e AMP na peçonha

Para estimar a quantidade de ADP e AMP presente na peçonha da aranha *Lasiodora* sp., foi padronizada cromatografia desses compostos puros, adquiridos comercialmente.

A figura 35 mostra os perfis cromatográficos de ADP e AMP em coluna analítica C18. Nota-se que, durante a cromatografia, há formação de AMP proveniente de ADP (Figura 35A).

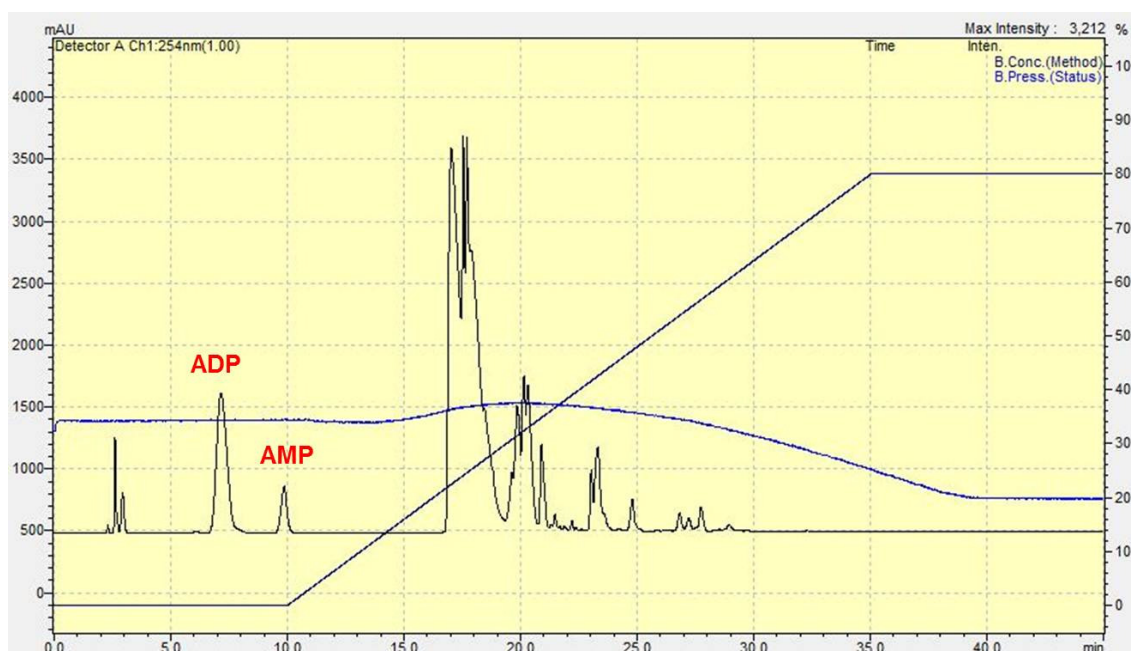




**Figura 35:** Perfil cromatográfico de ADP (A) e AMP (B) em coluna analítica C18. 30 µg de cada composto foram diluídos em 1 mL de ácido trifluoracético (TFA) 0,1% em água e aplicados na coluna previamente equilibrada com o mesmo solvente. A fase móvel consistiu em TFA 0,1% em acetonitrila (ACN). O gradiente utilizado foi de 0 a 80% de ACN (v/v) de 10 a 35 minutos, mantendo-se em 80% de ACN (v/v) por mais 10 minutos de corrida. O fluxo foi de 1 mL por minuto. As amostras foram monitoradas em absorvâncias de 214 (linha rosa) e 254 nm (linha preta).

Após a cromatografia dos padrões de ADP e AMP, a peçonha bruta da aranha *Lasiadora* sp. foi aplicada à mesma coluna C18, nas mesmas condições de corrida. A figura 36 aponta o perfil de separação da peçonha e destaca os picos referentes a ADP e AMP. Tais picos foram identificados pelos tempos de retenção, que foram comparados aos padrões. A confirmação foi realizada com adição de ADP e AMP comerciais à peçonha e aplicação dessa mistura à coluna C18 (dados não mostrados).

A partir dos cromatogramas, o programa de aquisição de dados do HPLC calculou a área sob a curva para cada pico de ADP e AMP de padrões e amostra. Estimou-se que a peçonha da aranha *Lasiadora* sp. contém aproximadamente 0,16 µg de ADP e 0,006 µg de AMP por µg de proteína. Considera-se que parte do AMP seja proveniente do ADP, já que, durante a cromatografia do padrão de ADP, foi observada hidrólise de cerca de 17% desse composto.

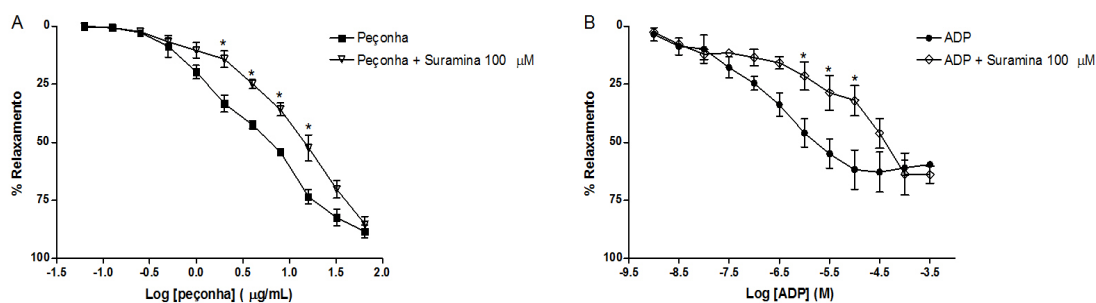


**Figura 36:** Perfil cromatográfico da peçonha de *Lasiodora* sp. em coluna analítica C18. A peçonha (260 µg) foi diluída em 1 mL de ácido trifluoracético (TFA) 0,1% em água e aplicada na coluna previamente equilibrada com o mesmo solvente. A fase móvel consistiu em TFA 0,1% em acetonitrila (ACN). O gradiente utilizado foi de 0 a 80% de ACN (v/v) de 10 a 35 minutos, mantendo-se em 80% de ACN (v/v) por mais 10 minutos de corrida. O fluxo foi de 1 mL por minuto. As amostras foram monitoradas em absorvância de 254 nm. Em destaque, os picos referentes a ADP e AMP.

#### 5.4. Avaliação de reatividade vascular em anéis de aorta de rato

Para avaliar a importância da atividade do ADP no efeito vasodilatador da peçonha total, curvas concentração-resposta cumulativas da peçonha (0,06 a 64 µg/mL) foram realizadas na ausência e na presença de 100 µM de suramina, um antagonista de receptores purinérgicos P2. Como controle, curvas concentração-resposta cumulativas de ADP (0,001 a 316 µM) foram construídas nas mesmas condições.

A figura 37 mostra que a suramina promoveu um desvio para a direita das curvas de relaxamento de peçonha e de ADP, reduzindo de forma significativa a potência dos efeitos vasodilatadores. A tabela 8 contém os valores médios de  $EC_{50}$  e de  $E_{máx}$  obtidos nas curvas concentração-resposta de peçonha e de ADP, na presença e na ausência de suramina.



**Figura 37:** Efeito relaxante induzido por (A) peçonha de *Lasiodora* sp. (0,06 a 64  $\mu\text{g/mL}$ ) e (B) ADP (0,001 a 316  $\mu\text{M}$ ) em anéis de aorta de rato com endotélio funcional, na presença e na ausência de suramina (100  $\mu\text{M}$ ). Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM de pelo menos quatro experimentos. \* $P < 0,05$  comparado ao grupo sem suramina (ANOVA *Two-way* seguido de Bonferroni).

**Tabela 8:** Valores de  $EC_{50}$  e  $E_{m\acute{a}x}$  para peçonha de *Lasiodora* sp. e ADP, na presença e na ausência de suramina (100  $\mu\text{M}$ ).

Condição experimental	$EC_{50}$	$E_{m\acute{a}x}$ (% relaxamento) <sup>†</sup>
Peçonha	$5,7 \pm 0,3 \mu\text{g/mL}$	$88,9 \pm 2,4$
Peçonha + Suramina	$13,5 \pm 1,2 \mu\text{g/mL}^*$	$82,5 \pm 3,4$
ADP	$(8,5 \pm 4,5) \times 10^{-6} \text{ M}$	$74,8 \pm 4,1$
ADP + Suramina	$(8,0 \pm 4,0) \times 10^{-5} \text{ M}^*$	$65,1 \pm 6,3$

Notas: Os valores representam a média  $\pm$  EPM

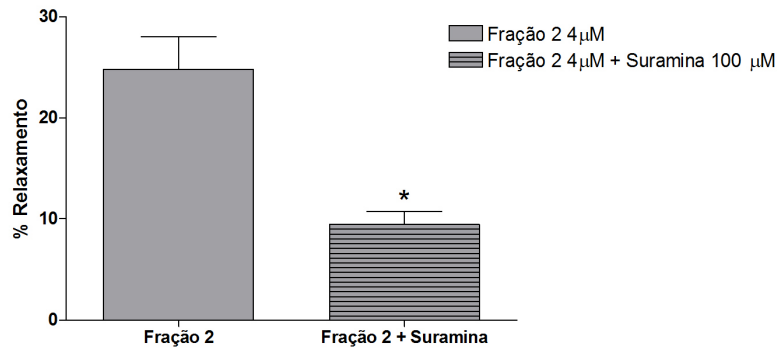
<sup>†</sup>Valores estimados graficamente

\* $P < 0,05$  comparado ao grupo sem suramina (ANOVA *Two-way*).

De acordo com a estimativa de conteúdo de ADP na peçonha, calcula-se que o valor de  $EC_{50}$  da peçonha corresponde a aproximadamente 2,13  $\mu\text{M}$  de ADP, que é um valor próximo ao  $EC_{50}$  desse composto.

A atividade vasodilatadora da fração 2 também foi testada na presença de suramina (100  $\mu\text{M}$ ). Para isso, o conteúdo de ADP na fração 2 foi estimado por determinação de área sob a curva em cromatografia, como descrito anteriormente. A fração foi utilizada nos ensaios em concentração única, equivalente a 4  $\mu\text{M}$  de ADP. O gráfico da figura 38 aponta que, em anéis de aorta de rato, o efeito relaxante da fração 2 ( $24,8 \pm 3,2\%$  de relaxamento) foi inibido de forma significativa ( $9,4 \pm 1,2\%$  de relaxamento) pela suramina.





**Figura 38:** Efeito relaxante induzido pela fração 2 (4  $\mu\text{M}$ ) da peçonha da aranha *Lasiodora* sp. em anéis de aorta de rato, contendo endotélio funcional, na presença e na ausência de suramina 100  $\mu\text{M}$ . Os valores representam a média  $\pm$  EPM de quatro experimentos. \* $P < 0,05$  comparado ao grupo sem suramina (Teste t de Student).

Os resultados sugerem que o ADP, componente isolado da peçonha da aranha *Lasiodora* sp., possui papel importante na ação vasodilatadora da peçonha total. No entanto, a comparação entre os efeitos relaxantes máximos de peçonha e ADP na aorta sugere que, na peçonha total, há um sinergismo de ação com outras substâncias.

# Discussão

## 6. DISCUSSÃO

Os acidentes com animais peçonhentos constituem um problema de saúde pública no Brasil e no mundo devido à frequência e gravidade. Assim, os primeiros estudos com peçonhas tiveram início com as espécies de importância médica. Essas pesquisas são de grande valor e vêm ganhando força desde que a Organização Mundial de Saúde incluiu os acidentes com serpentes como condição ou doença tropical negligenciada (WHO, 2012). Além disso, no Brasil, a Academia Brasileira de Ciências reconheceu em 2010 os acidentes com animais peçonhentos como doenças negligenciadas (ABC, 2012).

No entanto, as pesquisas com peçonhas animais não se concentram apenas no envenenamento e respectivo tratamento. Sabe-se que a evolução do aparato venenoso dos animais, para fins de predação e defesa, foi uma importante conquista biológica. Assim, as peçonhas acumulam múltiplos farmacóforos e constituem uma verdadeira biblioteca de milhares de moléculas potencialmente ativas, seletivas e potentes, que possuem como alvos vários mecanismos celulares em insetos e vertebrados. Dessa forma, as peçonhas são fontes de ferramentas valiosas para pesquisas aplicadas às ciências médicas e à agricultura, bem como para pesquisas básicas em fisiologia celular e áreas diversas (Theakston & Kamiguti, 2002; De Lima *et al.*, 2007; Escoubas *et al.*, 2008; King & Hardy, 2013).

Peçonhas de aranhas da subordem Mygalomorphae são pouco tóxicas a humanos. Os acidentes causam apenas dor, edema e eritema no local da picada. Por isso, a peçonha de *Lasiadora* sp. não foi estudada sistematicamente até o momento, sendo que nosso grupo de pesquisa realizou a maioria dos estudos existentes. Como descrito previamente, a ação dessa peçonha no sistema cardiovascular foi observada. Em ratos, promove hipotensão e bradicardia agudas, bradicardia em coração isolado e vasodilatação dependente de óxido nítrico em anéis de aorta (Kalapothakis *et al.*, 2003; Horta, 2008). O presente trabalho teve como objetivo isolar um ou mais componentes vasodilatadores a partir da peçonha bruta da aranha *Lasiadora* sp.

Nos últimos anos, houve um incremento no estudo e na descoberta de novas toxinas isoladas a partir de peçonhas de aranhas devido à aplicação de métodos de cromatografia e ao uso extensivo de técnicas de espectrometria de massas associadas a técnicas de separação. O fracionamento de peçonha direcionado a ensaios biológicos tem sido utilizado para identificar compostos de interesse dentre as diversas moléculas presentes nas peçonhas animais (Escoubas, 2006).

Neste trabalho, utilizamos o fracionamento da peçonha por filtração e HPLC, direcionando a purificação do composto de interesse por meio de ensaios de reatividade vascular das frações obtidas. Ao longo desse percurso, resultados preliminares indicavam que o princípio ativo era uma molécula pequena e possivelmente não proteica. Inclusive, o aquecimento da peçonha em altas temperaturas não alterava o efeito vasodilatador.

Decidimos realizar uma tentativa de fracionamento utilizando filtros com diferentes cortes de membrana. Essa metodologia de filtração, na prática, não promove uma separação por massa molecular muito aprimorada. No gel de poliacrilamida SDS-PAGE da figura 26 observa-se que proteínas com alta massa molecular foram detectadas na filtração com corte de 30 kDa. No entanto, para o propósito específico do presente trabalho, as moléculas de baixa massa molecular foram separadas e, principalmente, o princípio ativo de interesse concentrou-se no filtrado do tubo de corte de 3 kDa (Figura 28A).

Nas etapas seguintes em HPLC, revelou-se uma fração vasodilatadora única, eluída no início da corrida, na porção hidrofílica. Verificou-se que possuía alta absorvância em 254 nm e massa aproximada de 427 Da (Figuras 29 e 30). Para conclusão da estrutura molecular desse composto, a técnica de RMN foi empregada. Essa técnica, com equipamento de última geração de 800 MHz, foi adotada diante da escassez da amostra liofilizada e desconhecimento de técnica para estimar a respectiva quantidade. Atualmente, é muito comum realizar medidas de RMN para uma determinada substância, mesmo antes de se obter um espectro de infravermelho ou um espectro de massas (Kaiser, 2000).

Os primeiros espectros de RMN direcionavam para a presença de uma mistura de moléculas semelhantes a nucleotídeos. Nesse momento, as

informações preliminares de massa e absorvância em UV corroboravam essa hipótese. Os demais espectros foram obtidos diante de comparação com dados da literatura para ADP e AMP. As análises finais confirmaram, então, que a fração 2 vasodilatadora de *Lasiodora* sp. trata-se de ADP (88%) e, em menor quantidade, AMP (12%).

A espectrometria de massas analisa íons criados a partir de compostos ou misturas, que são separados em função da relação massa carga ( $m/z$ ). Adicionalmente, esses íons resultantes da ionização de moléculas intactas podem ser quebrados em íons-fragmentos, que fornecem informações estruturais acerca da molécula original (Glish & Vachet, 2003). No presente trabalho, o espectro de fragmentação (ESI-MS/MS) do íon-molecular de 428  $m/z$ , proveniente da ionização da molécula de ADP, mostra dois íons-fragmentos principais na forma  $[M + H]^+$ . O primeiro íon, de 348,1  $m/z$ , corresponde ao AMP e o segundo íon, de 136,2  $m/z$ , corresponde à base nitrogenada adenina (Figura 31A).

Dentre os diversos componentes presentes nas peçonhas animais, há compostos orgânicos de baixa massa molecular, por exemplo, ácidos livres como os ácidos cítrico e láctico, glicose, aminoácidos livres, aminas biogênicas como diaminopropano, putrescina, cadaverina, espermina e espermidina, neurotransmissores como aspartato, glutamato, serotonina, histamina, GABA, dopamina e epinefrina (Welsh & Batty, 1963; Chan *et al.*, 1975; Escoubas *et al.*, 2000).

Análises de cromatografia líquida associada à espectrometria de massas (LC/MS) da peçonha da aranha *Lasiodora parahybana* revelaram que os primeiros componentes eluídos na corrida foram moléculas orgânicas de baixa massa, como acilpoliaminas e aminas biogênicas, seguidos de peptídeos e proteínas (massa molecular de 3100 a 8500 Da) durante a maior parte do tempo da cromatografia. As últimas frações eluídas continham quatro componentes de alta massa molecular (Guette *et al.*, 2006). A alta sensibilidade de técnicas como a de espectrometria de massas permitiu, nos últimos anos, a identificação de diversas toxinas de baixa massa molecular, que antes não eram facilmente identificadas. Com isso, importantes moléculas

com atividades vasoativas e antimicrobianas, por exemplo, vêm sendo descobertas (Pimenta & De Lima, 2005).

Palma & Nakajima (2005) revisam que foram descritos em peçonhas de aranhas pelo menos quatro tipos de componentes de baixa massa molecular (<1 kDa): acilpoliaminas, que são compostos neurotóxicos presentes em peçonhas de diversas aranhas, bem caracterizados como antagonistas de diferentes subtipos de receptores ionotrópicos para glutamato (Estrada *et al.*, 2007); bis-(agmatina)-oxamida, isolada da peçonha de *Plectreurys tristis* (Quistad *et al.*, 1993); as  $\beta$ -carbolinas, compostos alcalóides isolados da peçonha de *Parawixia bistrata*, que inibem a enzima monoamino oxidase (Cesar *et al.*, 2005) e o gliconucleosídeo di-sulfato HF7, inibidor de receptores de cainato, isolado da peçonha de *Hololena curta* (Goldin *et al.*, 1995). Gomes *et al.* (2011) isolaram e caracterizaram um componente de baixa massa molecular da peçonha da aranha *Phoneutria nigriventer*. Essa molécula orgânica neuroativa foi denominada nigriventrina.

Alguns trabalhos já constataram as presenças de histamina e ATP em peçonhas animais. Inclusive, a dor decorrente da picada pode estar relacionada a uma combinação de injúria mecânica (provocada pelas grandes quelíceras), baixo pH da peçonha (tipicamente pH 5) e efeitos de aminas biogênicas (serotonina e histamina), adenosina e ATP (Schanbacher *et al.*, 1973; Chan *et al.*, 1975; Odell *et al.*, 1989).

Chan *et al.* (1975) descreveram a presença de ATP, ADP e AMP em peçonhas de aranhas dos gêneros *Dugesiella* e *Aphonopelma*, pertencentes à família Theraphosidae. Já Savel-Niemann (1989) descreveu a presença de ATP, ADP e AMP na peçonha da aranha *Eurypelma californicum*, também da citada família, a mesma da aranha *Lasiodora* sp.

Os nucleotídeos purínicos exercem um papel essencial nos sistemas biológicos. Essas moléculas são constituídas de três componentes principais: um açúcar ribose, uma base nitrogenada e um ou mais grupos fosfato. Os nucleotídeos participam da síntese de ácidos nucleicos e servem como fontes de energia em vias metabólicas. Como são compostos simples e ubíquos, que exercem importantes funções intracelulares em diversos processos bioquímicos, houve resistência da comunidade científica, no início do século

XX, para aceitar estudos que apontavam que os nucleotídeos são também mensageiros extracelulares. Atualmente, reconhece-se que a sinalização purinérgica é um sistema primitivo envolvido em mecanismos neuronais e não-neuronais, incluindo secreções exócrinas e endócrinas, respostas imunes, inflamação, dor, agregação plaquetária e vasodilatação. Além disso, os processos de proliferação, diferenciação e morte celulares que ocorrem no desenvolvimento e regeneração são mediados por receptores purinérgicos (Burnstock, 2007; Hess *et al.*, 2009; Dodbiba *et al.*, 2010).

Os receptores purinérgicos estão presentes na membrana de várias células e são classificados em dois tipos principais: P1 e P2. Em geral, P1 possui mais afinidade pelo nucleosídeo adenosina enquanto os nucleotídeos ATP, ADP, UTP e UDP ligam-se ao P2. Há duas famílias de receptores P2: P2X, que são receptores ligados a canais iônicos com 7 subtipos, e P2Y, que são receptores acoplados à proteína G com 8 subtipos. P1 possui 4 subtipos e todos são receptores acoplados à proteína G (Burnstock, 2007; Von Kügelgen & Harden, 2011).

Os nucleotídeos, que podem ser secretados de plaquetas e células endoteliais, regulam a homeostase vascular por meio da ativação de receptores presentes na superfície de plaquetas, células endoteliais e células musculares lisas vasculares. Estão envolvidos em mecanismos de controle do tônus vascular, angiogênese e aterosclerose. Sabe-se que os nucleotídeos purínicos causam vasodilatação e hipotensão, porém os mecanismos de sinalização celular desses compostos no sistema vascular ainda não são totalmente elucidados. Como ATP e ADP são hidrolisados por ectonucleotidases presentes em células endoteliais, musculares lisas, dendríticas e monócitos, gerando adenosina, todos os receptores purinérgicos podem ter papel nos efeitos vasculares (Zimmermann, 2001; Burnstock, 1993, 2002, 2008; Burnstock & Ralevic, 1994).

No leito vascular, a distribuição dos diferentes tipos de receptores purinérgicos em células endoteliais e musculares lisas, que ativam vias de sinalização celular distintas, faz com que o ATP tenha um efeito dual no controle do tônus. O ATP liberado como cotransmissor de nervos simpáticos perivasculares contrai os vasos via receptores P2X presentes nas células

musculares lisas. Já o ATP liberado de células endoteliais durante o estresse de cisalhamento ou hipóxia age em receptores P2Y<sub>2</sub> na membrana de células endoteliais e promove liberação de NO, resultando em relaxamento da musculatura vascular. O mesmo ocorre com o ATP liberado de plaquetas. Adenosina gerada por hidrólise de ATP no meio extracelular causa vasodilatação via receptores P1 presentes nas células musculares lisas. Já o ADP causa vasodilatação via ativação de receptores P2Y<sub>1</sub> presentes nas células endoteliais, com liberação de NO (Hansmann *et al.*, 1997; Buvinic *et al.*, 2002; Burnstock, 2006). O ADP possui menos afinidade pelos receptores P2X e, por isso, parece não exercer o efeito dual no tônus vascular. Buvinic *et al.* (2002) não observaram tal efeito para o ADP em anel de artéria mesentérica de rato. Da mesma forma, durante nossos ensaios em anéis de aorta de rato, não observamos contração em vasos desprovidos de endotélio tratados com ADP (dados não mostrados).

No endotélio, a ligação do ADP ao receptor metabotrópico P2Y<sub>1</sub> impulsiona uma cascata de sinalização celular dependente de ativação de fosfolipase C (PLC). Após ativação da PLC, há aumento de diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>), com conseqüente aumento da [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> e ativação de proteína quinase C (PKC). Dessa forma, o complexo intracelular cálcio-calmodulina e a fosforilação por PKC ativam a eNOS. A ação vasodilatadora do ADP ocorre via NO/GMPc. Em células endoteliais humanas, o tratamento com ADP promove fosforilação da enzima no resíduo Ser<sup>1177</sup>, que é um sítio de ativação. Esse processo é independente de adenosina (Da Silva *et al.*, 2009). Em células endoteliais bovinas, o ADP fosforila os sítios de ativação da eNOS em Ser<sup>1179</sup> e Ser<sup>635</sup>, bem como desfosforila o sítio de inativação em Ser<sup>116</sup>. Tais efeitos ocorreram via ativação de receptores P2Y<sub>1</sub> (Hess *et al.*, 2009). Da mesma forma, em anéis de aorta de rato, a peçonha da aranha *Lasiadora* sp. causa vasodilatação dependente de NO e ativa a eNOS por fosforilação do sítio de ativação da enzima em Ser<sup>1177</sup> e desfosforilação do sítio de inativação em Thr<sup>495</sup> (Horta, 2008).

Diante dessas informações, foi necessário avaliar o papel do ADP no efeito vasodilatador da peçonha total de *Lasiadora* sp. Para isso, estimamos o conteúdo dessa molécula na peçonha, que é de 0,16 µg de ADP por µg de



proteína. O segundo passo foi a determinação da reatividade vascular da peçonha total e de um padrão de ADP em anéis de aorta de rato. Nos ensaios, a suramina, que é antagonista competitivo e não-seletivo de receptores P2, foi utilizada para investigar a participação desses receptores. Os resultados mostraram que ADP e peçonha promovem vasodilatação concentração-dependente e que a suramina inibe de forma significativa o efeito relaxante de ambos (Figura 37). Como a fração 2 é composta principalmente de ADP, a suramina também inibiu o efeito vasodilatador dessa fração, testado em concentração única (Figura 38). Analisando-se o valor de  $EC_{50}$  da peçonha ( $5,7 \pm 0,3 \mu\text{g/mL}$ ), calculamos que essa quantidade de peçonha possui aproximadamente  $2,13 \mu\text{M}$  de ADP, que é um valor próximo ao  $EC_{50}$  desse composto ( $8,5 \pm 4,5 \mu\text{M}$ ).

Os resultados indicam que o ADP é um importante componente vasodilatador da peçonha da aranha *Lasiodora* sp. No entanto, observa-se que a curva de relaxamento da peçonha não possui perfil semelhante à curva de ADP (Figura 37), apesar de apresentarem potências semelhantes quando os valores de  $EC_{50}$  são comparados. Em nossos ensaios e nos dados da literatura (Hansmann *et al.*, 1997; Guns *et al.*, 2005), o efeito relaxante máximo do ADP é parcial e não ultrapassa 80%. Já o efeito vasodilatador máximo da peçonha é maior e pode chegar a 100% quando a concentração é aumentada. Isso sugere a presença de outras substâncias na peçonha que agem em sinergismo com o ADP, causando o efeito dilatador observado em anéis de aorta de rato.

Há estudos com diferentes peçonhas que apontam moléculas orgânicas ou peptídeos como componentes responsáveis por causar vasodilatação dependente de NO. Compostos com capacidade de restaurar os níveis de NO possuem potencial terapêutico para o tratamento de doenças como hipertensão arterial e aterosclerose, que são caracterizadas por disfunção do endotélio vascular com conseqüente redução da liberação, da disponibilidade biológica e da ação de fatores relaxantes derivados do endotélio (Boulangier, 1999; Shimokawa, 1999; Triggle *et al.*, 2003; Barbato & Tzeng, 2004).

A resposta relaxante da peçonha da aranha *Lycosa godeffroyi* em anéis de aorta de rato foi inibida pela retirada do endotélio, por um inibidor da NOS e por um antagonista de receptores histaminérgicos H1. Um ensaio fluorimétrico

detectou a presença de histamina na peçonha e os autores concluíram que se trata do principal composto vasoativo da peçonha dessa aranha (Rash *et al.*, 1998). Rattmann *et al.* (2008) mostraram que, em anéis de aorta de rato, a peçonha da aranha *Loxosceles intermedia* promove relaxamento parcial (cerca de 40%) dependente de endotélio e de NO. Nos vasos, a peçonha induz degranulação de mastócitos e liberação de histamina, que é uma substância vasodilatadora. Weinberg *et al.* (2002) estudaram o efeito de uma fração semi-purificada da peçonha da aranha *Phoneutria nigriventer* em artéria mesentérica de rato. Essa fração induziu liberação de NO das células endoteliais e consequente relaxamento dependente de endotélio. Já a toxina Tx2-6 de *Phoneutria nigriventer* potencializa a função erétil de ratos e induz um aumento significativo da liberação de NO no tecido cavernoso (Nunes *et al.*, 2008, 2010). Verano-Braga *et al.* (2008) descreveram uma família de peptídeos potenciadores de bradicinina (BPP) na peçonha do escorpião *Tityus serrulatus*, que foram denominados hipotensinas. O peptídeo TsHpt-I e respectivo análogo TsHpt-I<sub>[17-25]</sub> promovem, em anéis de aorta de rato, relaxamento dependente de liberação de NO derivado do endotélio.

Por fim, destaca-se que os nucleotídeos são importantes moléculas de sinalização e estão envolvidos em diversos mecanismos celulares. A presença significativa de ADP na peçonha da aranha *Lasiodora* sp. pode ter relação direta com os efeitos observados no envenenamento, como dor, edema e eritema.

# Conclusão

## 7. CONCLUSÃO

O fracionamento da peçonha da aranha *Lasiodora* sp. direcionado a ensaios biológicos em anéis de aorta de rato resultou na separação de uma fração vasoativa. Caracterizações dessa fração por meio de espectrometria de massas e ressonância magnética nuclear identificaram uma mistura de ADP e, em menor proporção, AMP. O ADP, assim como a peçonha, causa vasodilatação concentração-dependente. A participação do ADP no efeito relaxante da peçonha é significativa, visto que o antagonista de receptores purinérgicos reduziu esse efeito. Além disso, a peçonha contém quantidade de ADP suficiente para promover vasodilatação. Os resultados mostram que o ADP é um importante componente vasodilatador da peçonha da aranha *Lasiodora* sp.

# **Referências**

# **Bibliográficas**

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

### 8.1. Apresentação e Capítulo 1

ABDULKADER, R.C.; BARBARO, K.C.; BARROS, E.J.; BURDMANN, E.A. Nephrotoxicity of insect and spider venoms in Latin America. *Semin Nephrol.* v. 28, n. 4, p. 373-382, 2008.

ALVARENGA, L.M.; MARTINS, M.S.; MOURA, J.F.; KALAPOTHAKIS, E.; OLIVEIRA, J.C.; MANGILI, O.C.; GRANIER, C.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. Production of monoclonal antibodies capable of neutralizing dermonecrotic activity of *Loxosceles intermedia* spider venom and their use in a specific immunometric assay. *Toxicon.* v. 42, n. 7, p. 725-731, 2003.

ÁLVARES, E.S.S.; RODRIGUES, T.; DE MARIA, M. On *Loxosceles anomala* (Mello-Leitão) (Araneae: Sicariidae). *Revista Ibérica de Aracnología.* v. 10, p. 293-295, 2004.

ANDERSEN, R.J.; CAMPOLI, J.; JOHAR, S.K.; SCHUMACHER, K.A.; ALLISON, E.J.JR. Suspected brown recluse envenomation: a case report and review of different treatment modalities. *J Emerg Med.* v. 41, n. 2, p. e31-37, 2011.

ANDRADE, R.M.G.; GALATI, E.A.B.; TAMBOURGI, D.V. Presença de *Loxosceles similis* Moenkhaus, 1898 (Araneae, Sicariidae) na Serra da Bodoquena, Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* v. 34, n. 3, p. 275-277, 2001.

ANLIKER, B.; CHUN, J. Lysophospholipid G protein-coupled receptors. *J Biol Chem.* v. 279, n. 20, p. 20555-20558, 2004.

APPEL, M.H.; DA SILVEIRA, R.B.; CHAIM, O.M.; PALUDO, K.S.; SILVA, D.T.; CHAVES, D.M.; DA SILVA, P.H.; MANGILI, O.C.; SENFF-RIBEIRO,

A.; GREMSKI, W.; NADER, H.B.; VEIGA, S.S. Identification, cloning and functional characterization of a novel dermonecrotic toxin (phospholipaseD) from brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. *Biochim Biophys Acta*. v. 1780, n. 2, p. 167-178, 2008.

ARAUJO, S.C.; CASTANHEIRA, P.; ALVARENGA, L.M.; MANGILI, O.C.; KALAPOTHAKIS, E.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. Protection against dermonecrotic and lethal activities of *Loxosceles intermedia* spider venom by immunization with a fused recombinant protein. *Toxicon*. v. 41, n. 3, p. 261-267, 2003.

BALAZS, L.; OKOLICANY, J.; FERREBEE, M.; TOLLEY, B.; TIGYI, G. Topical application of the phospholipid growth factor lysophosphatidic acid promotes wound healing in vivo. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. v. 280, p. R466–R472, 2001.

BARBARO, K.C.; CARDOSO, J.L.; EICKSTEDT, V.R.; MOTA, I. Dermonecrotic and lethal components of *Loxosceles gaucho* spider venom. *Toxicon*. v. 30, n. 3, p. 331-338, 1992.

BARBARO, K.C.; EICKSTEDT, V.R.; MOTA, I. Antigenic cross-reactivity of venoms from medically important *Loxosceles* (Araneae) species in Brazil. *Toxicon*. v. 32, n. 1, p. 113-120, 1994.

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

BARBARO, K.C.; FERREIRA, M.L.; CARDOSO, D.F.; EICKSTEDT, V.R.; MOTA, I. Identification and neutralization of biological activities in the venoms of *Loxosceles* spiders. *Braz J Med Biol Res*. v. 29, n. 11, p. 1491-1497, 1996a.

BARBARO, K.C.; SOUSA, M.V.; MORHY, L.; EICKSTEDT, V.R.; MOTA, I. Compared chemical properties of dermonecrotic and lethal toxins from spiders of the genus *Loxosceles* (Araneae). *J Protein Chem.* v. 15, n. 4, p. 337-343, 1996b.

BARBARO, K.C., KNYSAK, I., MARTINS, R., HOGAN, C., WINKEL, K. Enzymatic characterization, antigenic cross-reactivity and neutralization of dermonecrotic activity of five *Loxosceles* spider venoms of medical importance in the Americas. *Toxicon.* v. 45, n. 4, p. 489–499, 2005.

BARBARO, K.C.; LIRA, M.S.; ARAÚJO, C.A.; PAREJA-SANTOS, A.; TÁVORA, B.C.; PREZOTTO-NETO, J.P.; KIMURA, L.F.; LIMA, C.; LOPES-FERREIRA, M.; SANTORO, M.L. Inflammatory mediators generated at the site of inoculation of *Loxosceles gaucho* spider venom. *Toxicon.* v. 56, n. 6, p. 972-979, 2010.

BARRETTO, O.C.; CARDOSO, J.L.; DE CILLO, D. Viscerocutaneous form of loxoscelism and erythrocyte glucose-6-phosphate deficiency. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* v. 27, n. 5, p. 264-267, 1985.

BARRETTO, O.C.; SATAKE, M.; NONOYAMA, K.; CARDOSO, J.L. The calcium-dependent protease of *Loxosceles gaucho* venom acts preferentially upon red cell band 3 transmembrane protein. *Braz J Med Biol Res.* v. 36, n. 3, p. 309-313, 2003.

BARRETTO, O.C.; SOEIRO PRESTES, K.; FIGUEIREDO FONSECA, L.K.; ACHUCARRO SILVEIRA, P.A. Functional alterations of rabbit erythrocytes induced by *Loxosceles gaucho* venom. *Hum Exp Toxicol.* v. 26, n. 10, p. 817-821, 2007.

BARRETT, S.M.; ROMINE-JENKINS, M.; BLICK, K.E. Passive hemagglutination inhibition test for diagnosis of brown recluse spider bite envenomation. *Clin Chem.* v. 39, n. 10, p. 2104-2107, 1993.



BELEBONI, R.O.; PIZZO, A.B.; FONTANA, A.C.K.; CAROLINO, R.O.G.; COUTINHO-NETTO, J.; SANTOS, W.F. Spider and wasp neurotoxins: pharmacological and biochemical aspects. *Eur. J. Pharmacol.* v. 493, p. 1-17, 2004.

BINFORD, G.J.; CORDES, M.H.; WELLS, M.A. Sphingomyelinase D from venoms of *Loxosceles* spiders: evolutionary insights from cDNA sequences and gene structure. *Toxicon.* v. 45, n. 5, p. 547-560, 2005.

BINFORD, G.J.; CALLAHAN, M.S.; BODNER, M.R.; RYNERSON, M.R.; NÚÑEZ, P.B.; ELLISON, C.E.; DUNCAN, R.P. Phylogenetic relationships of *Loxosceles* and *Sicarius* spiders are consistent with Western Gondwanan vicariance. *Mol Phylogenet Evol.* v. 49, n. 2, p. 538-553, 2008.

BOGIN, O. Venom Peptides and their Mimetics as Potential Drugs. *Modulator.* v. 19, p. 14-20, 2005.

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

BRAZ, A.; MINOZZO, J.; ABREU, J.C.; GUBERT, I.C.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. Development and evaluation of the neutralizing capacity of horse antivenom against the Brazilian spider *Loxosceles intermedia*. *Toxicon.* v. 37, n. 9, p. 1323-1328, 1999.

BÜCHERL, W. *Invertebrados - As Aranhas*. 1. ed. São Paulo: EDART, 1972. 158 p.

CAMPOLINA, D.; ANDRADE FILHO, A.; DIAS, M.B. Araneísmo. In: ANDRADE FILHO *et al.* (Org.). *Toxicologia na Prática Clínica*. Belo Horizonte: Folium, 2001. p. 81-89.

CASCIOLA-ROSEN, L.; ROSEN, A.; PETRI, M.; SCHLISSEL, M. Surface blebs on apoptotic cells are sites of enhanced procoagulant activity: implications for coagulation events and antigenic spread in systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. v. 93, n. 4, p. 1624-1629, 1996.

CATALÁN, A.; CORTES, W.; SAGUA, H.; GONZÁLEZ, J.; ARAYA, J.E. Two new phospholipase D isoforms of *Loxosceles laeta*: cloning, heterologous expression, functional characterization, and potential biotechnological application *J Biochem Mol Toxicol*. v. 25, n. 6, p. 393-403, 2011.

CHAIM, O.M.; SADE, Y.B.; DA SILVEIRA, R.B.; TOMA, L.; KALAPOTHAKIS, E.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C.; MANGILI, O.C.; GREMSKI, W.; DIETRICH, C.P.; NADER, H.B.; VEIGA, S.S. Brown spider dermonecrotic toxin directly induces nephrotoxicity. *Toxicol. App. Pharmacol*. v. 211, p. 64–77, 2006.

CHAIM, O.M.; DA SILVEIRA, R.B.; TREVISAN-SILVA, D.; FERRER, V.P.; SADE, .YB.; BÓIA-FERREIRA, M.; GREMSKI, L.H.; GREMSKI, W.; SENFF-RIBEIRO, A.; TAKAHASHI, H.K.; TOLEDO, M.S.; NADER, H.B.; VEIGA, S.S. Phospholipase-D activity and inflammatory response induced by brown spider dermonecrotic toxin: endothelial cell membrane phospholipids as targets for toxicity. *Biochim Biophys Acta*. v. 1811, n. 2, p. 84-96, 2011.

CHATZAKI, M.; HORTA, C.C.; ALMEIDA, M.O.; PEREIRA, N.B.; MENDES, T.M.; DIAS-LOPES, C.; GUIMARÃES, G.; MORO, L.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C.; HORTA, M.C.; KALAPOTHAKIS E. Cutaneous loxoscelism caused by *Loxosceles similis* venom and neutralization capacity of its specific antivenom. *Toxicon*. v. 60, n. 1, p. 21-30, 2012.

CHAVES-MOREIRA, D.; CHAIM, O.M.; SADE, Y.B.; PALUDO, K.S.; GREMSKI, L.H.; DONATTI, L.; DE MOURA, J.; MANGILI, O.C.; GREMSKI, W.; DA SILVEIRA, R.B.; SENFF-RIBEIRO, A.; VEIGA, S.S. Identification of a direct hemolytic effect dependent on the catalytic activity induced by phospholipase-D

(dermonecrotic toxin) from brown spider venom. *J Cell Biochem.* v. 107, p. 655–666, 2009.

CHAVES-MOREIRA, D.; SOUZA, F.N.; FOGAÇA, R.T.; MANGILI, O.C.; GREMSKI, W.; SENFF-RIBEIRO, A.; CHAIM, O.M.; VEIGA, S.S. The relationship between calcium and the metabolism of plasma membrane phospholipids in hemolysis induced by brown spider venom phospholipase-D toxin. *J Cell Biochem.* v. 112, n. 9, p. 2529-2540, 2011.

CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C.; ZANETTI, V.C.; FERREIRA, A.P.; MINOZZO, J.C.; MANGILI, O.C.; GUBERT, I.C. ELISA for the detection of venom antigens in experimental and clinical envenoming by *Loxosceles intermedia* spiders. *Toxicon.* v. 36, n. 4, p. 563-569, 1998.

CHIPPAUX, J.P.; GOYFFON, M. Venoms, antivenoms and immunotherapy. *Toxicon.* v. 36, n. 6, p. 823-846, 1998.

CHOI, J.W.; LEE, C.W.; CHUN, J. Biological roles of lysophospholipid receptors revealed by genetic null mice: an update. *Biochim. Biophys. Acta.* v. 1781, p. 531-539, 2008.

CHOI, J.W.; HERR, D.R.; NOGUCHI, K.; YUNG, Y.C.; LEE, C.W.; MUTOH, T.; LIN, M.E.; TEO, S.T.; PARK, K.E.; MOSLEY, A.N.; CHUN, J. LPA receptors: subtypes and biological actions. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* v. 50, p. 157-186, 2010.

CHRISTOFF, A.O.; DE OLIVEIRA, A.; CHAIM, O.M.; LUGARINI, D.; BASTOS PEREIRA, A.L.; PALUDO, K.S.; QUEIROZ TELLES, J.E.; BRACHT, A.; VEIGA, S.S.; ACCO, A. Effects of the venom and the dermonecrotic toxin LiRecDT1 of *Loxosceles intermedia* in the rat liver. *Toxicon.* v. 52, n. 6, p. 695-704, 2008.

CHUN, J.; HLA, T.; LYNCH, K.R.; SPIEGEL, S.; MOOLENAAR, W.H. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXVIII.

Lysophospholipid receptor nomenclature. *Pharmacol Rev.* v. 62, n. 4, p. 579-587, 2010.

CORZO, G.; ESCOUBAS, P. Pharmacologically active spider peptide toxins. *Cell. Mol. Life Sci.* v. 60, p. 2409-2426, 2003.

CUNHA, R.B.; BARBARO, K.C.; MURAMATSU, D.; PORTARO, F.C.V.; FONTES, W.; SOUSA, M.V. Purification and characterization of Loxnecrogin, a dermonecrotic toxin from *Loxosceles gaucho* brown spider venom. *J. Protein Chem.* v. 22, p. 135-146, 2003.

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

DA SILVEIRA, R.B.; 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.* v. 40, p. 815–822, 2002.

DA SILVEIRA, R.B.; PIGOZZO, R.B.; CHAIM, O.M.; APPEL, M.H.; DREYFUSS, J.L.; TOMA, L.; MANGILI, O.C.; GREMSKI, W.; DIETRICH, C.P.; NADER, H.B.; VEIGA, S.S. Molecular cloning and functional characterization of two isoforms of dermonecrotic toxin from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom gland. *Biochimie.* v. 88, n. 9, p. 1241-1253, 2006.

DA SILVEIRA, R.B.; PIGOZZO, R.B.; CHAIM, O.M.; APPEL, M.H.; SILVA, D.T.; DREYFUSS, J.L.; TOMA, L.; DIETRICH, C.P.; NADER, H.B.; VEIGA, S.S.; GREMSKI, W. Two novel dermonecrotic toxins LiRecDT4 and LiRecDT5 from brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom: from cloning to functional characterization. *Biochimie.* v. 89, n. 3, p. 289-300, 2007a.

DA SILVEIRA, R.B.; WILLE, A.C.; CHAIM, O.M.; APPEL, M.H.; SILVA, D.T.; FRANCO, C.R.; TOMA, L.; MANGILI, O.C.; GREMSKI, W.; DIETRICH, C.P.;

NADER, H.B.; VEIGA, S.S. Identification, cloning, expression and functional characterization of an astacin-like metalloprotease toxin from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. *Biochem J.* v. 406, n. 2, p. 355-363, 2007b.

DA SILVEIRA, R.B.; CHAIM, O.M.; MANGILI, O.C.; GREMSKI, W.; DIETRICH, C.P.; NADER, H.B.; VEIGA, S.S. Hyaluronidases in *Loxosceles intermedia* (Brown spider) venom are endo-beta-N-acetyl-d-hexosaminidases hydrolases. *Toxicon.* v. 49, n. 6, p. 758-768, 2007c.

DE ALMEIDA, D.M.; FERNANDES-PEDROSA, M.F.; DE ANDRADE, R.M.; MARCELINO, J.R.; GONDO-HIGASHI, H.; DE AZEVEDO, I.L.; HO, P.L.; VAN DEN BERG, C.; TAMBOURGI, D.V. A new anti-loxoscelic serum produced against recombinant sphingomyelinase D: results of preclinical trials. *Am J Trop Med Hyg.* v. 79, n. 3, p. 463-470, 2008.

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

DE GIUSEPPE, P.O.; ULLAH, A.; SILVA, D.T.; GREMSKI, L.H.; WILLE, A.C.; CHAVES-MOREIRA, D.; RIBEIRO, A.S.; CHAIM, O.M.; MURAKAMI, M.T.; VEIGA, S.S.; ARNI, R.K. Structure of a novel class II phospholipase D: catalytic cleft is modified by a disulphide bridge. *Biochem Biophys Res Commun.* v. 409, n. 4, p. 622-627, 2011.

DE LIMA, M.E.; STANKIEWICZ, M.; HAMON, A.; DE FIGUEIREDO, S.G.; CORDEIRO, M.N.; DINIZ, C.R.; MARTIN-EAUCCLAIRE, M.; PELHATE M. The toxin Tx4(6-1) from the spider *Phoneutria nigriventer* slows down Na(+) current inactivation in insect CNS via binding to receptor site 3. *J Insect Physiol.* v. 48, n. 1, p. 53-61, 2002.

DE MOURA, J.; FELICORI, L.; MOREAU, V.; GUIMARÃES, G.; DIAS-LOPES, C.; MOLINA, L.; ALVARENGA, L.M.; FERNANDES, P.; FRÉZARD, F.; RIBEIRO, R.R.; FLEURY, C.; NGUYEN, C.; MOLINA, F.; GRANIER, C.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. *Protection against the toxic effects of *Loxosceles intermedia* spider venom elicited by mimotope peptides. *Vaccine*. v. 29, n. 45, p. 7992-8001, 2011.*

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

DE OLIVEIRA, K.C.; ANDRADE, R.M.G.; PIAZZA, R.M.; FERREIRA JR., J.M.; VAN DEN BERG, C.W.; TAMBOURGI, D.V. Variations in *Loxosceles* spider venom composition and toxicity contribute to the severity of envenomation. *Toxicon*. v. 45, p. 421–429, 2005.

DESAI, A.; MILLER, M.J.; GOMEZ, H.F.; WARREN, J.S. *Loxosceles deserta* spider venom induces NF-kappaB-dependent chemokine production by endothelial cells. *J Toxicol Clin Toxicol*. v. 37, n. 4, p. 447-456, 1999.

DESAI, A.; LANKFORD, H.A.; WARREN, J.S. *Loxosceles deserta* spider venom induces the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in keratinocytes. *Inflammation*. v. 24, n. 1, p. 1-9, 2000.

DE SANTI-FERRARA, G.I.; FERNANDES-PEDROSA, M.F.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I.L.; GONÇALVES-DE-ANDRADE, R.M.; PORTARO, F.C.; MANZONI-DE-ALMEIDA, D.; MURAKAMI, M.T.; ARNI, R.K.; VAN DEN BERG, C.W.; HO, P.L.; TAMBOURGI, D.V. SMase II, a new sphingomyelinase D from *Loxosceles laeta* venom gland: molecular cloning, expression, function and structural analysis. *Toxicon*. v. 53, n. 7-8, p. 743-753, 2009.

DE SOUZA, G.A.; RIBEIRO, A.S.; SANTOS, V.L.P.; VEIGA, S.S.; MANGILI, O.C.; GREMSKI, W. Proteolytic effect of *Loxosceles intermedia* (brown spider)

venom proteins on EHS-basement membrane structures. *Acta Biologica Paranaense*. v. 27, p. 97-109, 1998.

DE SOUZA, A.L.; MALAQUE, C.M.; SZTAJNBOK, J.; ROMANO, C.C.; DUARTE, A.J.; SEGURO, A.C. *Loxosceles* venom-induced cytokine activation, hemolysis, and acute kidney injury. *Toxicon*. v. 51, n. 1, p. 151-156, 2008.

DIAS-LOPES, C.; FELICORI, L.; GUIMARÃES, G.; GOMES, E.R.; ROMAN-CAMPOS, D.; DUARTE, H.; DAMASCENO, D.; MARTINS, M.; KALAPOTHAKIS, E.; ALMEIDA, A.P.; GRANIER, C.; CRUZ, J.S.; GUATIMOSIM, S.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. Cardiotoxic effects of *Loxosceles intermedia* spider venom and the recombinant venom toxin rLiD1. *Toxicon*. v. 56, n. 8, p. 1426-1435, 2010a.

DIAS-LOPES, C.; GUIMARÃES, G.; FELICORI, L.; FERNANDES, P.; EMERY, L.; KALAPOTHAKIS, E.; NGUYEN, C.; MOLINA, F.; GRANIER, C.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. A protective immune response against lethal, dermonecrotic and hemorrhagic effects of *Loxosceles intermedia* venom elicited by a 27-residue peptide. *Toxicon*. v. 55, n. 2-3, p. 481-487, 2010b.

DIAZ, J.H.; LEBLANC, K.E. Common spider bites. *Am Fam Physician*. v. 75, n. 6, p. 869-873, 2007.

DRAGULEV, B.; BAO, Y.; RAMOS-CERRILLO, B.; VAZQUEZ, H.; OLVERA, A.; STOCK, R.; ALGARON, A.; FOX, J.W. Upregulation of IL-6, IL-8, CXCL1, and CXCL2 dominates gene expression in human fibroblast cells exposed to *Loxosceles reclusa* sphingomyelinase D: insights into spider venom dermonecrosis. *J Invest Dermatol*. v. 127, n. 5, p. 1264-1266, 2007.

DYACHENKO, P.; ZIV, M.; ROZENMAN, D. Epidemiological and clinical manifestations of patients hospitalized with brown recluse spider bite. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. v. 20, n. 9, p. 1121-1125, 2006.

ELSTON, D.M.; EGGERS, J.S.; SCHMIDT, W.E.; STORROW, A.B.; DOE, R.H.; MCGLASSON, D.; FISCHER, J.R. Histological findings after brown recluse spider envenomation. *Am J Dermatopathol.* v. 22, n. 3, p. 242-246, 2000.

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

ESKAFI, F.M.; NORMENT, B.R. Physiological action of *Loxosceles reclusa* venom on insect larvae. *Toxicon.* v. 14, p. 7–12, 1976.

FANG, X.; YU, S.; BAST, R.C.; LIU, S.; XU, H.J.; HU, S.X.; LAPUSHIN, R.; CLARET, F.X.; AGGARWAL, B.B.; LU, Y.; MILLS, G.B. Mechanisms for lysophosphatidic acid-induced cytokine production in ovarian cancer cells. *J Biol Chem.* v. 279, p. 9653-9661, 2004.

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.* v. 36, n. 7, p. 1039–1051, 1998.

FELICORI, L.; ARAUJO, S.C.; DE AVILA, R.A.; SANCHEZ, E.F.; GRANIER, C.; KALAPOTHAKIS, E.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. Functional characterization and epitope analysis of a recombinant dermonecrotic protein from *Loxosceles intermedia* spider. *Toxicon.* v. 48, n. 5, p. 509-519, 2006.

FELICORI, L.; FERNANDES, P.B.; GIUSTA, M.S.; DUARTE, C.G.; KALAPOTHAKIS, E.; NGUYEN, C.; MOLINA, F.; GRANIER, C.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. An in vivo protective response against toxic effects of the dermonecrotic protein from *Loxosceles intermedia* spider venom elicited by synthetic epitopes. *Vaccine.* v. 27, n. 31, p. 4201-4208, 2009.



FERNANDES PEDROSA, M.F.; JUNQUEIRA DE AZEVEDO, I.L.; GONÇALVES-DE-ANDRADE, R.M.; VAN DEN BERG, C.W.; RAMOS, C.R.; HO, P.L.; TAMBOURGI, D.V. Molecular cloning and expression of a functional dermonecrotic and haemolytic factor from *Loxosceles laeta* venom. *Biochem Biophys Res Commun.* v. 298, n. 5, p. 638-645, 2002.

FERNANDES PEDROSA, M.F.; JUNQUEIRA DE AZEVEDO, I.L.; GONÇALVES DE ANDRADE, R.M.; KOBASHI, L.S.; ALMEIDA, D.D.; HO, P.L.; TAMBOURGI, D.V. Transcriptome analysis of *Loxosceles laeta* (Araneae, Sicariidae) spider venomous gland using expressed sequence tags. *BMC Genomics.* v. 9, p. 279, 2008.

FERREIRA, R.L.; MARTINS, R.P.; YANEGA, D. Ecology of bat guano arthropod communities in a Brazilian dry cave. *Ecotropica.* v. 6, p. 105–115, 2000.

FERREIRA, R.L.; PROUS, X.; MACHADO, S.F.; MARTINS, R.P. Population dynamics of *Loxosceles similis* (Moenkhaus, 1898) in a Brazilian dry cave: a new method for evaluation of population size. *Rev. Bras. Zoo.* v. 7, p. 129–141, 2005.

FORRESTER, L.J.; BARRETT, J.T.; CAMPBELL, B.J. Red blood cell lysis induced by the venom of the brown recluse spider. *Arch. Biochem. Biophys.* v. 187, n. 2, p. 355-365, 1978.

FOURCADE, O.; SIMON, M.F.; VIODÉ, C.; RUGANI, N.; LEBALLE, F.; RAGAB, A.; FOURNIÉ, B.; SARDA, L.; CHAP, H. Secretory phospholipase A2 generates the novel lipid mediator lysophosphatidic acid in membrane microvesicles shed from activated cells. *Cell.* v. 80, n. 6, p. 919-927, 1995.

FURLANETTO, R.S. Estudos sobre a preparação do soro antiloxoscélico. Tese de Doutorado (Livre Docência). Faculdade de Farmácia e Odontologia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1961.

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

GALIANO, M.E.; HALL, M. Datos adicionales sobre el ciclo vital de *Loxosceles laeta* (Nicolet, 1849) (Araneae). *Physis.* v. 32, n. 85, p. 277–288, 1973.

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.* v. 174, p. 90–99, 1976.

GERTSCH, W.J. The spider genus *Loxosceles* in South America (Araneae, Scytodidae). *Bull. Am. Museum Nat. Hist.* v. 136, p. 117-174, 1967.

GIRISH, K.S.; KEMPARAJU, K. The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: a biological overview. *Life Sci.* v. 80, n. 21, p. 1921-1943, 2007.

GIRISH, K.S.; KEMPARAJU, K.; NAGARAJU, S.; VISHWANATH, B.S. Hyaluronidase inhibitors: a biological and therapeutic perspective. *Curr Med Chem.* v. 16, n. 18, p. 2261-2288, 2009.

GOMES, M.T.; GUIMARÃES, G.; FRÉZARD, F.; KALAPOTHAKIS, E.; MINOZZO, J.C.; CHAIM, O.M.; VEIGA, S.S.; OLIVEIRA, S.C.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. Determination of sphingomyelinase-D activity of *Loxosceles* venoms in sphingomyelin/cholesterol liposomes containing horseradish peroxidase. *Toxicon.* v. 57, n. 4, p. 574-579, 2011.

GOMEZ, H.F.; MILLER, M.J.; DESAI, A.; WARREN, J.S. *Loxosceles* spider venom induces the production of alpha and beta chemokines: implications for the pathogenesis of dermonecrotic arachnidism. *Inflammation.* v. 23, n. 3, p. 207-215, 1999a.

GOMEZ, H.F.; MILLER, M.J.; TRACHY, J.W.; MARKS, R.M.; WARREN, J.S. Intradermal anti-*Loxosceles* Fab fragments attenuate dermonecrotic arachnidism. *Acad Emerg Med.* v. 6, n. 12, p. 1195-1202, 1999b.

GOMEZ, H.F.; MILLER, M.J.; WAGGENER, M.W.; LANKFORD, H.A.; WARREN, J.S. Antigenic cross-reactivity of venoms from medically important North American *Loxosceles* spider species. *Toxicon*. v. 39, n. 6, p. 817-824, 2001.

GONÇALVES DE ANDRADE, R.M.; DE OLIVEIRA, K.C.; GIUSTI, A.L.; DIAS DA SILVA, W.; TAMBOURGI, D.V. Ontogenetic development of *Loxosceles intermedia* spider venom. *Toxicon*. v. 37, n. 4, p. 627-632, 1999.

GREMSKI, L.H.; DA SILVEIRA, R.B.; CHAIM, O.M.; PROBST, C.M.; FERRER, V.P.; NOWATZKI, J.; WEINSCHUTZ, H.C.; MADEIRA, H.M.; GREMSKI, W.; NADER, H.B.; SENFF-RIBEIRO, A.; VEIGA, S.S. A novel expression profile of the *Loxosceles intermedia* spider venomous gland revealed by transcriptome analysis. *Mol Biosyst*. v. 6, n. 12, p. 2403-2416, 2010.

GRIMM, M.C.; BEN-BARUCH, A.; TAUB, D.D.; HOWARD, O.M.; RESAU, J.H.; WANG, J.M.; ALI, H.; RICHARDSON, R.; SNYDERMAN, R.; OPPENHEIM, J.J. Opiates transdeactivate chemokine receptors:  $\delta$  and  $\mu$  opiate receptor-mediated heterologous desensitization. *J. Exp. Med*. v. 188, p. 317-325, 1998.

GUILHERME, P.; FERNANDES, I.; BARBARO, K.C. Neutralization of dermonecrotic and lethal activities and differences among 32-35 kDa toxins of medically important *Loxosceles* spider venoms in Brazil revealed by monoclonal antibodies. *Toxicon*. v. 39, n. 9, p. 1333-1342, 2001.

GUTIÉRREZ, J.M.; LEÓN, G.; LOMONTE, B. Pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships of immunoglobulin therapy for envenomation. *Clin Pharmacokinet*. v. 42, n. 8, p. 721-741, 2003.

HANNUN, Y.A.; OBEID, L.M. Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nat Rev Mol Cell Biol*. v. 9, n. 2, p. 139-150, 2008.

HEITZ, J.R.; NORMENT, B.R. Characteristics of an alkaline phosphatase activity in brown recluse venom. *Toxicon*. v. 12, n. 2, p. 181–187, 1974.

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

ISBISTER, G.K.; GRAUDINS, A.; WHITE, J.; WARRELL, D. Antivenom treatment in arachnidism. *J Toxicol Clin Toxicol*. v. 41, n. 3, p. 291-300, 2003.

ISBISTER, G.K. Necrotic arachnidism: the mythology of a modern plague. *Lancet*. v. 364, n. 9433, p. 549-553, 2004.

ISBISTER, G.K.; VETTER, R.S. Loxoscelism and necrotic arachnidism: more myths and minor corrections. *Ann Emerg Med*. v. 46, n. 2, p. 205-206, 2005.

ISBISTER, G.K.; FAN, H.W. Spider bite. *Lancet*. v. 378, n. 9808, p. 2039-2047, 2011.

JACKSON, H.; PARKS, T.N. Spider toxins: Recent applications in neurobiology. *Ann. Rev. Neurosci*. v. 12, p. 405-414, 1989.

JONG, Y.S.; NORMENT, B.R.; HEITZ, J.R. Separation and characterization of venom components in *Loxosceles reclusa*-II. Protease enzyme activity. *Toxicon*. v. 17, n. 6, p. 529–537, 1979.

KALAPOTHAKIS, E.; ARAUJO, S.C.; DE CASTRO, C.S.; MENDES, T.M.; GOMEZ, M.V.; MANGILI, O.C.; GUBERT, I.C.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. Molecular cloning, expression and immunological properties of LiD1, a protein from the dermonecrotic family of *Loxosceles intermedia* spider venom. *Toxicon*. v. 40, n. 12, p. 1691-1699, 2002.

KALAPOTHAKIS, E.; CHATZAKI, M.; GONÇALVES-DORNELAS, H.; DE CASTRO, C.S.; SILVESTRE, F.G.; LABORNE, F.V.; DE MOURA, J.F.; VEIGA, S.S.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C.; GRANIER, C.; BARBARO, K.C. The Loxtox protein family in *Loxosceles intermedia* (Mello-Leitão) venom. *Toxicon*. v. 50, n. 7, p. 938-946, 2007.

KATO, K.; FUKUI, R.; OKABE, K.; TANABE, E.; KITAYOSHI, M.; FUKUSHIMA, N.; TSUJIUCHI, T. Constitutively active lysophosphatidic acid receptor-1 enhances the induction of matrix metalloproteinase-2. *Biochem Biophys Res Commun*. v. 417, p. 790-793, 2012a.

KATO, K.; YOSHIKAWA, K.; TANABE, E.; KITAYOSHI, M.; FUKUI, R.; FUKUSHIMA, N.; TSUJIUCHI, T. Opposite roles of LPA(1) and LPA(3) on cell motile and invasive activities of pancreatic cancer cells. *Tumour Biol*. v. 33, n. 5, p. 1739-1744, 2012b.

KISHIMOTO, T.; AKIRA, S.; NARAZAKI, M.; TAGA, T. Interleukin-6 family of cytokines and gp130. *Blood*. v. 86, n. 4, p. 1243-1254, 1995.

KITAMURA, K.; NAKAMOTO, Y.; KANEKO, S.; MUKAIDA, N. Pivotal roles of interleukin-6 in transmural inflammation in murine T cell transfer colitis. *J Leukoc Biol*. v. 76, n. 6, p. 1111-1117, 2004.

KLEINER, D.E.; STELER-STEVENSON, W.G. Structural biochemistry and activation of matrix metalloproteases. *Curr. Opin. Cell Biol*. v. 5, p. 891–897, 1993.

KLEMM, S.; ZIMMERMANN, S.; PESCHEL, C.; MAK, T.W.; RULAND, J. Bcl10 and Malt1 control lysophosphatidic acid-induced NF-kappaB activation and cytokine production. *Proc Natl Acad Sci U S A*. v. 104, n. 1, p. 134-138, 2007.

KREIL, G. Hyaluronidases - A group of neglected enzymes. *Prot. Sci*. v. 4, p. 1666–1669, 1995.

KRÜTTGEN, A.; ROSE-JOHN, S. Interleukin-6 in sepsis and capillary leakage syndrome. *J Interferon Cytokine Res.* v. 32, n. 2, p. 60-65, 2012.

KRYWKO, D.M.; GOMEZ, H.F. Detection of *Loxosceles* species venom in dermal lesions: A comparison of 4 venom recovery methods. *Ann Emerg Med.* v. 39, p. 475–480, 2002.

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*. *Biochim. Biophys. Acta.* v. 678, n. 3, p. 467–476, 1981.

KUSHMERICK, C.; KALAPOTHAKIS, E.; BEIRÃO, P.S.; PENAFORTE, C.L.; PRADO, V.F.; CRUZ, J.S.; DINIZ, C.R.; CORDEIRO, M.N.; GOMEZ, M.V.; ROMANO-SILVA, M.A.; PRADO, M.A. *Phoneutria nigriventer* toxin Tx3-1 blocks A-type K<sup>+</sup> currents controlling Ca<sup>2+</sup> oscillation frequency in GH3 cells. *J Neurochem.* v. 72, n. 4, p. 1472-1481, 1999.

KUSMA, J.; CHAIM, O.M.; WILLE, A.C.; FERRER, V.P.; SADE, Y.B.; DONATTI, L.; GREMSKI, W.; MANGILI, O.C.; VEIGA, S.S. Nephrotoxicity caused by brown spider venom phospholipase-D (dermonecrotic toxin) depends on catalytic activity. *Biochimie.* v. 90, n. 11-12, p. 1722-1736, 2008.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970.

LANCASTER, M.V.; FIELDS, R.D. Antibiotic and Cytotoxic Drug Susceptibility Assays using Resazurin and Poising Agents. *U.S. Patent No. 5,501,959*, 1996.

LEE, H.; GOETZL, E.J.; AN, S. Lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate stimulate endothelial cell wound healing. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* v. 278, p. C612-618, 2000.

LEE, S.; LYNCH, K.R. Brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*) venom phospholipase D (PLD) generates lysophosphatidic acid (LPA). *Biochem J.* v. 391, p. 317–323, 2005.

LEE, Z.; SWABY, R.F.; LIANG, Y.; YU, S.; LIU, S.; LU, K.H.; BAST, R.C.JR.; MILLS, G.B.; FANG, X. Lysophosphatidic acid is a major regulator of growth-regulated oncogene alpha in ovarian cancer. *Cancer Res.* v. 66, p. 2740-2748, 2006.

LEWIS, R. J.; GARCIA, M. L. Therapeutic potential of venom peptides. *Nat. Rev. Drug. Disc.* v. 2, n. 10, p. 790-802, 2003.

LUCAS, S. Spiders in Brazil. *Toxicon*, v. 26, n. 9, p. 759-772, 1988.

LUCATO, R.V.JR.; ABDULKADER, R.C.; BARBARO, K.C.; MENDES, G.E.; CASTRO, I.; BAPTISTA, M.A.; CURY, PM.; MALHEIROS, D.M.; SCHOR, N.; YU, L.; BURDMANN, E.A. *Loxosceles gaucho* venom-induced acute kidney injury--in vivo and in vitro studies. *PLoS Negl Trop Dis.* v. 5, n. 5, e1182, 2011.

LUCIANO, M.N.; DA SILVA, P.H.; CHAIM, O.M.; DOS SANTOS, V.L.; FRANCO, C.R.; SOARES, M.F.; ZANATA, S.M.; MANGILI, O.C.; GREMSKI, W.; VEIGA, S.S. Experimental evidence for a direct cytotoxicity of *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom in renal tissue. *J Histochem Cytochem.* v. 52, n. 4, p. 455-467, 2004.

MACHADO, E.O.; ÁLVARES, E.S.S.; DE MARIA, M.; KALAPOTHAKIS, E. Sobre a presença de três espécies de *Loxosceles* Heineken & Lowe (Araneae: Sicariidae) no município de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. *Lundiana.* v. 6, n. 2, p. 113-115, 2005a.

MACHADO, L.F.; LAUGESSEN, S.; BOTELHO, E.D.; RICART, C.A.; FONTES, W.; BARBARO, K.C.; ROEPSTORFF, P.; SOUSA, M.V. Proteome analysis of

brown spider venom: identification of loxnecrogin isoforms in *Loxosceles gaucho* venom. *Proteomics*. v. 5, p. 2167-2176, 2005b.

MAJESKI, J.A.; STINNETT, J.D.; ALEXANDER, J.W.; DURST, G.G.SR. Action of venom from the brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*) on human neutrophils. *Toxicon*. v. 15, n. 5, p. 423-427, 1977.

MAJNO, G.; JORIS, I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol*. v. 146, n. 1, p. 3-15, 1995.

MÁLAQUE, C.M.; ORI, M.; SANTOS, S.A.; ANDRADE, D.R. Production of TNF-alpha by primary cultures of human keratinocytes challenged with *Loxosceles gaucho* venom. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. v. 41, n. 3, p. 179-182, 1999.

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

MÁLAQUE, C.M.; SANTORO, M.L.; CARDOSO, J.L.; CONDE, M.R.; NOVAES, C.T.; RISK, J.Y.; FRANÇA, F.O.; DE MEDEIROS, C.R.; FAN, H.W. Clinical picture and laboratorial evaluation in human loxoscelism. *Toxicon*. v. 58, n. 8, p. 664-671, 2011.

MANRÍQUEZ, J.J.; SILVA, S. Loxoscelismo cutáneo y cutáneo-visceral: Revisión sistemática. *Rev. chil. infectol*. v.26, n. 5, p. 420-432, 2009.

MARQUES-DA-SILVA, E.; FISCHER, M.L. Distribuição das espécies do gênero *Loxosceles* Heineken & Lowe, 1835 (Araneae; Sicariidae) no Estado do Paraná. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop*. v. 38, n. 4, p.331-335, 2005.

MARTIN, S.J.; REUTELINGSPERGER, C.P.; MCGAHON, A.J.; RADER, J.A.; VAN SCHIE, R.C.; LAFACE, D.M.; GREEN, D.R. Early redistribution of



plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med.* v. 182, n. 5, p. 1545-1556, 1995.

MCGLOSSON, D.L.; GREEN, J.A.; STOECKER, W.V.; BABCOCK, J.L.; CALCARA, D.A. Duration of *Loxosceles reclusa* venom detection by ELISA from swabs. *Clin Lab Sci.* v. 22, n. 4, p. 216-222, 2009.

MERCHANT, M.L.; HINTON, J.F.; GEREN, C.R. Sphingomyelinase D activity of brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*) venom as studied by <sup>31</sup>P-NMR: effects on the time-course of sphingomyelin hydrolysis. *Toxicon.* v. 36, n. 3. p. 537-545, 1998.

MILLER, M.J.; GOMEZ, H.F.; SNIDER, R.J.; STEPHENS, E.L.; CZOP, R.M.; WARREN, J.S. Detection of *Loxosceles* venom in lesional hair shafts and skin: application of a specific immunoassay to identify dermonecrotic arachnidism. *Am J Emerg Med.* v. 18, n. 5, p. 626-628, 2000.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Governo Federal. Brasil. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. 2ª ed. - Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 120p., 2001.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Governo Federal. Brasil. Portal da Saúde. Acidentes por animais peçonhentos – aranhas, 2012. Disponível em:  
< [http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id\\_area=1536](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1536)>  
Acesso em: 28 Jun. 2012.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Governo Federal. Brasil. Portal da Saúde. Sistema de Informação de Agravos de Notificação – Sinan Net, 2012. Disponível em:  
<<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/>>. Acesso em: 25 Set. 2012.

MONTEIRO, C.L.; RUBEL, R.; COGO, L.L.; MANGILI, O.C.; GREMSKI, W.; VEIGA, S.S. Isolation and identification of *Clostridium perfringens* in the

venom and fangs of *Loxosceles intermedia* (brown spider): enhancement of the dermonecrotic lesion in loxoscelism. *Toxicon*. v. 40, n. 4, p. 409-418, 2002.

MOOLENAAR, W.H. Bioactive lysophospholipids and their G protein-coupled receptors. *Exp Cell Res*. v. 253, n. 1, p. 230-238, 1999.

MOOLENAAR, W.H.; VAN MEETEREN, L.A.; GIEPMANS, B.N. The ins and outs of lysophosphatidic acid signaling. *Bioessays*. v. 26, n. 8, p. 870-881, 2004.

MORO, L.; MARTINS, A.S.; ALVES, C.M.; SANTOS, F.G.A.; NUNES, J.E.S.; CARNEIRO, R.A.; CARVALHO, R.; VASCONCELOS, A.C. Apoptosis in canine distemper. *Arch. Virol*. v. 148, p. 153–164, 2003.

MORTIER, A.; VAN DAMME, J.; PROOST, P. Overview of the mechanisms regulating chemokine activity and availability. *Immunol Lett*. v. 145, n. 1-2, p. 2-9, 2012.

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

MURAKAMI, M.T.; FERNANDES-PEDROSA, M.F.; TAMBOURGI, D.V.; ARNI, R.K. Structural basis for metal ion coordination and the catalytic mechanism of sphingomyelinases D. *J Biol Chem*. v. 280, n. 14, p. 13658-13664, 2005.

NELSON, P.J.; TEIXEIRA, M.M. Dissection of inflammatory processes using chemokine biology: Lessons from clinical models. *Immunol Lett*. v. 145, n. 1-2, p. 55-61, 2012.

NORMENT, B.R.; JONG, Y.S.; J.R. HEITZ. Separation and characterization of venom components in *Loxosceles reclusa*-III. Hydrolytic enzyme activity. *Toxicon*. v. 17, n. 6, p. 539–548, 1979.

NOWATZKI, J.; DE SENE, R.V.; PALUDO, K.S.; VEIGA, S.S.; OLIVER, C.; JAMUR, M.C.; NADER, H.B.; TRINDADE, E.S.; FRANCO, C.R. Brown spider venom toxins interact with cell surface and are endocytosed by rabbit endothelial cells. *Toxicon*. v. 56, n. 4, p. 535-543, 2010.

NOWATZKI, J.; SENE, R.V.; PALUDO, K.S.; RIZZO, L.E.; SOUZA-FONSECA-GUIMARÃES, F.; VEIGA, S.S.; NADER, H.B.; FRANCO, C.R.; TRINDADE, E.S. Brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom triggers endothelial cells death by anoikis. *Toxicon*. v. 60, n. 3, p. 396-405, 2012.

ODELL, G.V.; HUDIBURG, S.A.; OWNBY, C.; GRISHIN, E.; MILLS, J.; AIRD, S.; MORRIS, J. Characterization of theraphosidae spider venom components. *Toxicon*. v. 29, n. 3, p. 292, 1991.

OHTA, H.; SATO, K.; MURATA, N.; DAMIRIN, A.; MALCHINKHUU, E.; KON, J.; KIMURA, T.; TOBO, M.; YAMAZAKI, Y.; WATANABE, T.; YAGI, M.; SATO, M.; SUZUKI, R.; MUROOKA, H.; SAKAI, T.; NISHITOBA, T.; IM, D.S.; NOCHI, H.; TAMOTO, K.; TOMURA, H.; OKAJIMA, F. Ki16425, a subtype-selective antagonist for EDG-family lysophosphatidic acid receptors. *Mol Pharmacol*. v. 64, n. 4, p. 994-1005, 2003.

OLVERA, A.; RAMOS-CERRILLO, B.; ESTÉVEZ, J.; CLEMENT, H.; DE ROODT, A.; PANIAGUA-SOLÍS, J.; VÁZQUEZ, H.; ZAVALA, A.; ARRUZ, M.S.; STOCK, R.P.; ALAGÓN, A. North and South American *Loxosceles* spiders: development of a polyvalent antivenom with recombinant sphingomyelinases D as antigens. *Toxicon*. v. 48, n. 1, p. 64-74, 2006.

OSPEDAL, K.Z.; APPEL, M.H.; FILLUS NETO, J.; MANGILI, O.C.; SANCHES VEIGA, S.; GREMSKI, W. Histopathological findings in rabbits after experimental acute exposure to the *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. *Int J Exp Pathol*. v. 83, n. 6, p. 287-294, 2002.

OZ-ARSLAN, D.; RÜSCHER, W.; MYRTEK, D.; ZIEMER, M.; JIN, Y.; DAMAJ, B.B.; SORICHTER, S.; IDZKO, M.; NORGAUER, J.; MAGHAZACHI, A.A. IL-6 and IL-8 release is mediated via multiple signaling pathways after stimulating dendritic cells with lysophospholipids. *J Leukoc Biol.* v. 80, n. 2, p. 287-97, 2006.

PAIXÃO-CAVALCANTE, D.; VAN DEN BERG, C.W.; FERNANDES-PEDROSA, M.; GONCALVES DE ANDRADE, R.M.; TAMBOURGI, D.V. Role of matrix metalloproteinases in HaCaT keratinocytes apoptosis induced by *Loxosceles* venom sphingomyelinase D. *J. Invest. Dermatol.* v. 126, p. 61-68, 2006.

PAIXÃO-CAVALCANTE, D.; VAN DEN BERG, C.W.; GONÇALVES DE ANDRADE, R.M.; FERNANDES PEDROSA, M. DE F.; OKAMOTO, C.K.; TAMBOURGI, D.V. Tetracycline protects against dermonecrosis induced by *Loxosceles* spider venom. *J. Invest. Dermatol.* v. 127, p. 1410-1418, 2007.

PALMETSCHOFER, A.; ROBSON, S.C.; NEHLS, V. Lysophosphatidic acid activates nuclear factor kappa B and induces proinflammatory gene expression in endothelial cells. *Thromb Haemost.* v. 82, n. 5, p. 1532-1537, 1999.

PALUDO, K.S.; GREMSKI, L.H.; VEIGA, S.S.; CHAIM, O.M.; GREMSKI, W.; DE FREITAS BUCHI, D.; NADER, H.B.; DIETRICH, C.P.; FRANCO, C.R. The effect of brown spider venom on endothelial cell morphology and adhesive structures. *Toxicon.* v. 47, n. 8, p. 844-853, 2006.

PALUDO, K.S.; BISCAIA, S.M.; CHAIM, O.M.; OTUKI, M.F.; NALIWAIKO, K.; DOMBROWSKI, P.A.; FRANCO, C.R.; VEIGA, S.S. Inflammatory events induced by brown spider venom and its recombinant dermonecrotic toxin: a pharmacological investigation. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* v. 149, n. 3, p. 323-333, 2009.

PARK, S.Y.; JEONG, K.J.; PANUPINTHU, N.; YU, S.; LEE, J.; HAN, J.W.; KIM, J.M.; LEE, J.S.; KANG, J.; PARK, C.G.; MILLS, G.B.; LEE, H.Y.

Lysophosphatidic acid augments human hepatocellular carcinoma cell invasion through LPA1 receptor and MMP-9 expression. *Oncogene*. v. 30, p. 1351-1359, 2011.

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

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

PAULI, I.; MINOZZO, J.C.; DA SILVA, P.H.; CHAIM, O.M.; VEIGA, S.S. Analysis of therapeutic benefits of antivenin at diferente time intervals after experimental envenomation in rabbits by venom of the brown spider (*Loxosceles intermedia*). *Toxicon*. v. 53, n. 6, p. 660-671, 2009.

PEREIRA, N.B.; CAMPOS, P.P.; DE JESUS OVIEDO SOCARRÁS, T.; PIMENTA, T.S.; PARREIRAS, P.M.; SILVA, S.S.; KALAPOTHAKIS, E.; ANDRADE, S.P.; MORO, L. Sponge implant in Swiss mice as a model for studying loxoscelism. *Toxicon*. v. 59, n. 7-8, p. 672-679, 2012.

PIZZI, T.P.; ZACARÍAS, J.S.; SCHENONE, H.F. Estudio histopatológico experimental en el envenenamiento por *Loxosceles laeta*. *Biologica*. v. 23, p. 33-51, 1957.

PLATNICK, N.I. The world spider catalog. Version 13.0. New York: American Museum of Natural History, 2012. Disponível em: <<http://research.amnh.org/iz/spiders/catalog/INTRO1.html>>. Acesso em: 28 Jun. 2012.

PRADÈRE, J.P.; GONZALEZ, J.; KLEIN, J.; VALET, P.; GRÈS, S.; SALANT, D.; BASCANDS, J.L.; SAULNIER-BLACHE, J.S.; SCHANSTRA, J.P. Lysophosphatidic acid and renal fibrosis. *Biochim Biophys Acta*. v. 1781, n. 9, p. 582-587, 2008.

PRETEL, F.; GONÇALVES-DE-ANDRADE, R.M.; MAGNOLI, F.C.; DA SILVA, M.E.; FERREIRA, J.M.JR.; VAN DEN BERG, C.W.; TAMBOURGI, D.V. Analysis of the toxic potential of venom from *Loxosceles adelaida*, a Brazilian brown spider from karstic areas. *Toxicon*. v. 45, n. 4, p. 449-458, 2005.

QIAN, Y.; HAMILTON, M.; SIDDURI, A.; GABRIEL, S.; REN, Y.; PENG, R.; KONDRU, R.; NARAYANAN, A.; TRUITT, T.; HAMID, R.; CHEN, Y.; ZHANG, L.; FRETLAND, A.J.; SANCHEZ, R.A.; CHANG, K.C.; LUCAS, M.; SCHOENFELD, R.C.; LAINE, D.; FUENTES, M.E.; STEVENSON, C.S.; BUDD, D.C. Discovery of highly selective and orally active lysophosphatidic Acid receptor-1 antagonists with potent activity on human lung fibroblasts. *J Med Chem*. v. 55, n. 17, p. 7920-7939, 2012.

QUATTROCCHI, C.C.; WANNENES, F.; PERSICO, A.M.; CIAFRÉ, S.A.; D'ARCANGELO, G.; FARACE, M.G.; KELLER, F. Reelin is a serine protease of the extracellular matrix. *J Biol Chem*. v. 277, n. 1, p. 303-309, 2002.

RAMOS-CERRILLO, B.; OLVERA, A.; ODELL, G.V.; PANIAGUA-SOLIS, J.; ALAGO'N, A.; STOCK, R.P. Genetic and enzymatic characterization of sphingomyelinase D isoforms from the North American fiddleback spiders *Loxosceles boneti* and *Loxosceles recluse*. *Toxicon*. v. 44, p. 507-514, 2004.

RASH, L.D.; HODGSON, W.C. Pharmacology and biochemistry of spider venoms. *Toxicon*. v. 40, p. 225-254, 2002.

RATES, B.; VERANO-BRAGA, T.; SANTOS, D.M.; NUNES, K.P.; PIMENTA, A.M.; DE LIMA, M.E. From the stretcher to the pharmacy's shelf: drug leads

from medically important brazilian venomous arachnid species. *Inflamm Allergy Drug Targets*. v. 10, n. 5, p. 411-419, 2011.

RATTMANN, Y.D.; PEREIRA, C.R.; CURY, Y.; GREMSKI, W.; MARQUES, M.C.; DA SILVA-SANTOS, J.E. Vascular permeability and vasodilation induced by the *Loxosceles intermedia* venom in rats: involvement of mast cell degranulation, histamine and 5-HT receptors. *Toxicon*. v. 5, p. 363-372, 2008.

REES, R.; SHACK, R.B.; WITHERS, E.; MADDEN, J.; FRANKLIN, J.; LYNCH, J.B. Management of the brown recluse spider bite. *Plast Reconstr Surg*. v. 68, n. 5, p. 768-773, 1981.

REES, R.S.; NANNEY, L.B.; YATES, R.A.; KING, L.E JR. Interaction of brown recluse spider venom on cell membranes: the inciting mechanism? *J Invest Dermatol*. v. 83, n. 4, p. 270-275, 1984.

REES, R.S.; GATES, C.; TIMMONS, S.; DES PREZ, R.M.; KING JR., L.E. Plasma components are required for platelet activation by the toxin of *Loxosceles reclusa*. *Toxicon*. v. 26, n. 11, p. 1035–1045, 1988.

REKOW, M.A.; CIVELLO, D.J.; GEREN, C.R. Enzymatic and hemolytic properties of brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*) toxin and extracts of venom apparatus, cephalothorax and abdomen. *Toxicon*. v. 21, n. 3, p. 441–444, 1983.

ROSSKOPF, D.; DAELMAN, W.; BUSCH, S.; SCHURKS, M.; HARTUNG, K.; KRIBBEN, A.; MICHEL, M.C.; SIEFERT, W. Growth factor-like action of lysophosphatidic acid on human B lymphoblasts. *Am. J. Physiol*. v. 274, p. C1573-C1582, 1998.

SADE, Y.B.; BÓIA-FERREIRA, M.; GREMSKI, L.H.; DA SILVEIRA, R.B.; GREMSKI, W.; SENFF-RIBEIRO, A.; CHAIM, O.M.; VEIGA, S.S. Molecular cloning, heterologous expression and functional characterization of a novel

translationally-controlled tumor protein (TCTP) family member from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. *Int J Biochem Cell Biol.* v. 44, n. 1, p. 170-177, 2012.

SAMS, H.H.; DUNNICK, C.A.; SMITH, M.L.; KING, L.E. Necrotic arachnidism. *J. Am. Acad. Dermatol.* v. 44, p. 561–573, 2001.

SCHENONE, H.; SUAREZ, G. Venoms of Scytodidae. Genus *Loxosceles*. In: S. Bettini (Ed.). *Handbook of Experimental Pharmacology.* v. 48, Arthropod Venoms. New York: Springer-Verlag, 1978. p. 247–275.

SCHENONE, H.; SAAVEDRA, T.; ROJAS, A.; VILLARROEL, F. Loxoscelism in Chile. Epidemiologic, clinical and experimental studies. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* v. 31, n. 6, p. 403-415, 1989.

SCHENONE, H.; SANTIAGO, R.A.; SAAVEDRA, T.; ROJAS, A. Loxoscelismo en pediatría. Región Metropolitana, Chile. *Rev. chil. pediatr.* v. 72, n. 2, 2001.

SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE, Curitiba, Paraná, Brasil. Acidentes Loxoscélicos - Protocolo técnico e fluxo de atenção em Curitiba, 2006. Disponível em:

<[http://www.saude.curitiba.pr.gov.br/images/institucional/arquivos/protocolos/protocolo\\_001.pdf](http://www.saude.curitiba.pr.gov.br/images/institucional/arquivos/protocolos/protocolo_001.pdf)>.

Acesso em: 25 Jun. 2012.

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

SILVESTRE, F.G.; DE CASTRO, C.S.; DE MOURA, J.F.; GIUSTA, M.S.; DE MARIA, M.; ALVARES, E.S.; LOBATO, F.C.; ASSIS, R.A.; GONÇALVES, L.A.; GUBERT, I.C.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C.; KALAPOTHAKIS, E.



Characterization of the venom from the Brazilian Brown Spider *Loxosceles similis* Moenkhaus, 1898 (Araneae, Sicariidae). *Toxicon*. v. 46, n. 8, p. 927-936, 2005.

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

SOLLOD, B.L.; WILSON, D.; ZHAXYBAYEVA, O.; GOGARTEN, J.P.; DRINKWATER, R.; KING, G.F. Were arachnids the first to use combinatorial peptide libraries? *Peptides*. v. 26, p. 131-139, 2005.

SONGER, J.G. Bacterial phospholipases and their role in virulence. *Trends Microbiol.* v. 5, p. 156-161, 1997.

STOCK, R.P.; BREWER, J.; WAGNER, K.; RAMOS-CERRILLO, B.; DUELUND, L.; JERNSHØJ, K.D.; OLSEN, L.F.; BAGATOLLI, L.A. Sphingomyelinase D activity in model membranes: structural effects of in situ generation of ceramide-1-phosphate. *PLoS One*. v. 7, n. 4, e36003, 2012.

STORTELEERS, C.; KERKHOVEN, R.; MOOLENAAR, W.H. Multiple actions of lysophosphatidic acid on fibroblasts revealed by transcriptional profiling. *BMC Genomics*. v. 9, p. 387-402, 2008.

SUNDERKÖTTER, C.; SEELIGER, S.; SCHÖNLAU, F.; ROTH, J.; HALLMANN, R.; LUGER, T.A.; SORG, C.; KOLDE, G. Different pathways leading to cutaneous leukocytoclastic vasculitis in mice. *Exp Dermatol*. v. 10, p. 391-404, 2001.

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

TAMBOURGI, D.V.; MAGNOLI, F.C.; VON EICKSTEDT, V.R.; BENEDETTI, Z.C.; PETRICEVICH, V.L.; DA 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.* v. 155, n. 9, p. 4459-4466, 1995.

TAMBOURGI, D.V.; MAGNOLI, F.C.; VAN DEN BERG, C.W.; MORGAN, B.P.; DE ARAUJO, P.S.; ALVES, E.W.; DIAS DA SILVA, W. Sphingomyelinases in the venom of the spider *Loxosceles intermedia* are responsible for both dermonecrosis and complement-dependent hemolysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* v. 251, n. 1, p. 366–373, 1998a.

TAMBOURGI, D.V.; PETRICEVICH, V.L.; MAGNOLI, F.C.; ASSAF, S.L.; JANCAR, S.; DIAS DA SILVA, W. Endotoxemic-like shock induced by *Loxosceles* spider venoms: pathological changes and putative cytokine mediators. *Toxicon.* v. 36, n. 2, p. 391-403, 1998b.

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

TAMBOURGI, D.V.; DE SOUSA DA SILVA, M.; BILLINGTON, S.J.; GONÇALVES DE ANDRADE, R.M.; MAGNOLI, F.C.; SONGER, J.G.; VAN DEN BERG, C.W. Mechanism of induction of complement susceptibility of erythrocytes by spider and bacterial sphingomyelinases. *Immunology.* v. 107, p. 93–101, 2002.

TAMBOURGI, D.V.; PAIXÃO-CAVALCANTE, D.; GONÇALVES DE ANDRADE, R.M.; FERNANDES-PEDROSA, M.F.; MAGNOLI, F.C.; PAUL MORGAN, B.; VAN DEN BERG, C.W. *Loxosceles* sphingomyelinase induces complement-

dependent dermonecrosis, neutrophil infiltration, and endogenous gelatinase expression. *J Invest Dermatol.* v. 124, n. 4, p. 725-731, 2005.

TAMBOURGI, D.V.; PEDROSA, M.F.; DE ANDRADE, R.M.; BILLINGTON, S.J.; GRIFFITHS, M.; VAN DEN BERG, C.W. Sphingomyelinases D induce direct association of C1q to the erythrocyte membrane causing complement mediated autologous haemolysis. *Mol Immunol.* v. 44, n. 4, p. 576-582, 2007.

TANG, B.L. ADAMTS: a novel family of extracellular matrix proteases. *Int J Biochem Cell Biol.* v. 33, n. 1, p. 33-44, 2001.

TAUB, D.D.; ANVER, M.; OPPENHEIM, J.J.; LONGO, D.L.; MURPHY, W.J. T lymphocyte recruitment by interleukin-8 (IL-8). IL-8-induced degranulation of neutrophils releases potent chemoattractants for human T lymphocytes both in vitro and in vivo. *J. Clin. Invest.* v. 97, p. 1931-1941, 1996.

TAVARES, F.L.; SOUSA-E-SILVA, M.C.; SANTORO, M.L.; BARBARO, K.C.; REBECCHI, I.M.; SANO-MARTINS, I.S. Changes in hematological, hemostatic and biochemical parameters induced experimentally in rabbits by *Loxosceles gaucho* spider venom. *Hum Exp Toxicol.* v. 23, n. 10, p. 477-486, 2004.

TORO, A.F.; MALTA, M.B.; SOARES, S.L.; DA ROCHA, G.C.; DA SILVA LIRA, M.; DE OLIVEIRA, T.A.; TAKEHARA, H.A.; LOPES-FERREIRA, M.; SANTORO, M.L.; GUIDOLIN, R.; GONDO HIGASHI, H.; FERNANDES, I.; BARBARO, K.C. Role of IgG(T) and IgGa isotypes obtained from arachnidic antivenom to neutralize toxic activities of *Loxosceles gaucho*, *Phoneutria nigriventer* and *Tityus serrulatus* venoms. *Toxicon.* v. 48, n. 6, p. 649-661, 2006.

TRAJANO, E.; GNASPINI-NETTO, P. Composição da fauna cavernícola brasileira, com uma análise preliminar da distribuição dos táxons. *Rev. Bras. Zool.* v.7, n.3, p. 383-407, 1990.

TREVISAN-SILVA, D.; GREMSKI, L.H.; CHAIM, O.M.; DA SILVEIRA, R.B.; MEISSNER, G.O.; MANGILI, O.C.; BARBARO, K.C.; GREMSKI, W.; VEIGA, S.S.; SENFF-RIBEIRO, A. Astacin-like metalloproteases are a gene family of toxins present in the venom of different species of the brown spider (genus *Loxosceles*). *Biochimie*. v. 92, n. 1, p. 21-32, 2010.

VAN CRUCHTEN, S.; VAN DEN BROECK, W. Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anat Histol Embryol*. v. 31, n. 4, p. 214-223, 2002.

VAN DEN BERG, C.W.; GONÇALVES DE ANDRADE, R.M.; MAGNOLI, F.C.; TAMBOURGI, D.V. *Loxosceles* spider venom induces the release of trombomodulin and endothelial protein C receptor: implications for the pathogenesis of intravascular coagulation as observed in loxoscelism. *J. Thromb. Haemost.* v. 5, p. 989–995, 2007.

VAN DEN BERG, C.W.; GONÇALVES-DE-ANDRADE, R.M.; OKAMOTO, C.K.; TAMBOURGI, D.V. C5a receptor is cleaved by metalloproteases induced by sphingomyelinase D from *Loxosceles* spider venom. *Immunobiology*. v. 217, n. 9, p. 935-941, 2012.

VAN DIJK, M.C.; POSTMA, F.; HILKMANN, H.; JALINK, K.; VAN BLITTERSWIJK, W.J.; MOOLENAAR, W.H. Exogenous phospholipase D generates lysophosphatidic acid and activates Ras, Rho and Ca<sup>2+</sup> signaling pathways. *Curr Biol*. v. 8, n. 7, p. 386-392, 1998.

VAN MEETEREN, L.A.; FREDERIKS, F.; GIEPMANS, B.N.; PEDROSA, M.F.; BILLINGTON, S.J.; JOST, B.H.; TAMBOURGI, D.V.; MOOLENAAR, W.H. Spider and bacterial sphingomyelinases D target cellular lysophosphatidic acid receptors by hydrolyzing lysophosphatidylcholine. *J Biol Chem*. p. 279, n. 12, p. 10833-10836, 2004.

VAN MEETEREN, L.A.; STORTELERS, C.; MOOLENAAR, W.H. Upregulation of cytokine expression in fibroblasts exposed to loxosceles sphingomyelinase D: what is the trigger? *J Invest Dermatol.* p. 127, n. 5, p. 1266-1267, 2007.

VASSILEVSKI, A.A.; KOZLOV, S.A.; GRISHIN, E.V. Molecular diversity of spider venom. *Biochemistry (Mosc).* v. 74, n. 13, p. 1505-1534, 2009.

VEIGA, S.S.; GREMSKI, W.; DOS SANTOS, V.L.; FEITOSA, L.; MANGILI, O.C.; NADER, H.B.; DIETRICH, C.P.; BRENTANI, R.R. Oligosaccharide residues of *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom proteins: dependence on glycosylation for dermonecrotic activity. *Toxicon.* v. 37, n. 4, p. 587-607, 1999.

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

VEIGA, S.S.; FEITOSA, L.; DOS SANTOS, V.L.; DE SOUZA, G.A.; RIBEIRO, A.S.; MANGILI, O.C.; PORCIONATTO, M.A.; NADER, H.B.; DIETRICH, C.P.; BRENTANI, R.R.; GREMSKI, W. Effect of brown spider venom on basement membrane structures. *Histochem J.* v. 32, n. 7, p. 397-408, 2000b.

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

VEIGA, S.S.; ZANETTI, V.C.; FRANCO, C.R.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. *Throm. Res.* v. 102, p. 229-237, 2001b.

VERMES, I.; HAANEN, C.; STEFFENS-NAKKEN, H.; REUTELINGSPERGER, C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods*. v. 184, n. 1, p. 39-51, 1995.

VETTER, R.S.; VISSCHER, P.K. Bites and stings of medically important venomous arthropods. *Int J Dermatol*. v. 37, n. 7, p. 481-496, 1998.

VETTER, R.S.; BUSH, S.P. Reports of presumptive brown recluse spider bites reinforce improbable diagnosis in regions of North America where the spider is not endemic. *Clin Infect Dis*. v. 35, n. 4, p. 442-445, 2002.

VETTER, R.S.; ISBISTER, G.K. Medical aspects of spider bites. *Annu Rev Entomol*. v. 53, p. 409-429, 2008.

VETTER, R.S. Arachnids misidentified as brown recluse spiders by medical personnel and other authorities in North America. *Toxicon*. v. 54, n. 4, p. 545-547, 2009.

WEI, Y.; LIU, S.W.; ZHAO, L.Q.; ZHOU, G.Q.; CHEN, S.W.; LI, H. Lysophosphatidic acid as a potential trigger of atrial fibrillation. *Med Hypotheses*. v. 79, p. 649-652, 2012.

WELSH, J.H.; BATTY, C.S. 5-hydroxytryptamine content of some arthropod venoms and venom-containing parts. *Toxicon*, v. 1, p. 165-173, 1963.

WHETSTONE, W.D.; ERNSTING, K.; WARREN, J.S.; GOMEZ, H.F. Inhibition of dermonecrotic arachnidism with interleukin-8 monoclonal antibody. *Acad Emerg Med*. v. 4, p. 437, 1997.

WRIGHT, R.P.; ELGERT, K.D.; CAMPELL, B.J.; BARRETT J.T. Hyaluronidase and esterase activities of the venom of the poisonous brown recluse spider. *Arch. Biochem. Biophys*. v. 159, p. 415-426, 1973.

YE, X.; ISHII, I.; KINGSBURY, M.A.; CHUN, J. Lysophosphatidic acid as a novel cell survival/apoptotic factor. *Biochim Biophys Acta*. v. 1585, n. 2-3, p. 108-113, 2002.

YOUNG, A.R.; PINCUS, S.J. Comparison of enzymatic activity from three species of necrotising arachnids in Australia: *Loxosceles rufescens*, *Badumna insignis* and *Lampona cylindrata*. *Toxicon*. v. 39, n. 2-3, p. 391-400, 2001.

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

ZOBEL-THROPP, P.A.; BODNER, M.R.; BINFORD, G.J. Comparative analyses of venoms from American and African Sicarius spiders that differ in sphingomyelinase D activity. *Toxicon*. v. 55, n. 7, p. 1274-1282, 2010.

ZOBEL-THROPP, P.A.; KERINS, A.E.; BINFORD, G.J. Sphingomyelinase D in sicariid spider venom is a potent insecticidal toxin. *Toxicon*. v. 60, n. 3, p. 265-271, 2012.

ZUPUNSKI, V.; KORDIS, D.; GUBENSEK, F. Adaptive evolution in the snake venom Kunitz/BPTI protein family. *FEBS Lett*. v. 547, n. 1-3, p. 131-136, 2003.

## 8.2. Capítulo 2

ACADEMIA BRASILEIRA DE CIÊNCIAS. Doenças Negligenciadas. 2010. Disponível em: <<http://www.abc.org.br/IMG/pdf/doc-199.pdf>>. Acesso em: 26 Nov. 2012.

ALDERTON, W.K.; COOPER, C.E.; KNOWLES, R.G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem. J.* v. 357, p. 593-615, 2001.

BARBATO, J.E.; TZENG, E. Nitric oxide and arterial disease. *J. Vasc. Surg.* v. 40, n. 1, p. 187-193, 2004.

BERTANI, R. Revision, cladistic analysis and zoogeography of *Vitalius*, *Nhandu* and *Proshapadopus*, with notes on other Theraphosidae genera (Araneae, Theraphosidae). *Arq. Zool. S. Paulo.* v. 36, n. 3, p. 265-356, 2001.

BOULANGER, C.M. Secondary endothelial dysfunction: hypertension and heart failure. *J. Mol. Cell. Cardiol.* v. 31, n. 1, p. 39-49, 1999.

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

BRAZIL, V.; VELLARD, J. Contribuição ao estudo do veneno das aranhas. *Mem. Inst. Butantan*, Tomo II, v. 23, p. 284-285, 1926.

BURNSTOCK, G. Integration of factors controlling vascular tone. *Anesthesiology.* v. 79, p. 1368-1380, 1993.

BURNSTOCK, G.; RALEVIC, V. New insights into the local regulation of blood flow by perivascular nerves and endothelium. *Br J Plast Surg.* v. 47, p. 527-543, 1994.



BURNSTOCK, G. Purinergic signalling and vascular cell proliferation and death. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* v. 22, p. 364-373, 2002.

BURNSTOCK, G. Pathophysiology and therapeutic potential of purinergic signaling. *Pharmacol Rev.* v. 58, n. 1, p. 58-86, 2006.

BURNSTOCK, G. Purine and pyrimidine receptors. *Cell Mol Life Sci.* v. 64, n. 12, p. 1471-1483, 2007.

BURNSTOCK, G. Dual control of vascular tone and remodelling by ATP released from nerves and endothelial cells. *Pharmacol Rep.* v. 60, n. 1, p. 12-20, 2008.

BUVINIC, S.; BRIONES, R.; HUIDOBRO-TORO, J.P. P2Y(1) and P2Y(2) receptors are coupled to the NO/cGMP pathway to vasodilate the rat arterial mesenteric bed. *Br J Pharmacol.* v. 136, n. 6, p. 847-56, 2002.

CAMPBELL, W.B.; FALCK, J.R. Arachidonic acid metabolites as endothelium-derived hyperpolarizing factors. *Hypertension.* v. 49, n. 3, p. 590-596, 2007.

CARVALHO, M.H.C.; NIGRO, D.; LEMOS, V.S.; TOSTES, R.C.A.; FORTES, Z.B. Hipertensão arterial: o endotélio e suas múltiplas funções. *Rev. Bras. Hipertens.* v. 8, p. 76-88, 2001.

CESAR, L.M.; MENDES, M.A.; TORMENA, C.F.; MARQUES, M.R.; DE SOUZA, B.M.; SAIDEMBERG, D.M.; BITTENCOURT, J.C.; PALMA, M.S. Isolation and chemical characterization of PwTx-II: a novel alkaloid toxin from the venom of the spider *Parawixia bistriata* (Araneidae, Araneae). *Toxicon.* v. 46, n. 7, p. 786-796, 2005.

CHAN, T.K.; GEREN, C.R.; HOWELL, D.E.; ODELL, G.V. Adenosine triphosphate in tarantula spider venoms and its synergistic effect with the venom toxin. *Toxicon.* v. 13, p. 61-66, 1975.

COLEMAN, R.A.; SMITH, W.L.; NARUMIYA, S. International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. *Pharmacol. Rev.* v. 46, n. 2, p. 205-229, 1994.

COOKE, J.A.L.; MILLER, F.R.; WAND GROVER, R.; DUFFY, J.S. Urticaria caused by Tarantula hairs. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* v. 22, n. 1, p. 130-133, 1973.

DA SILVA, C.G.; SPECHT, A.; WEGIEL, B.; FERRAN, C.; KACZMAREK, E. Mechanism of purinergic activation of endothelial nitric oxide synthase in endothelial cells. *Circulation.* v. 119, n. 6, p. 871-879, 2009.

DE DEUS, Alessandra Duarte Torres. Isolamento dos componentes tóxicos do veneno bruto da aranha *Lasiadora* sp. 76 f. Orientador: Evanguedes Kalapothakis. Dissertação (Mestrado em Farmacologia Bioquímica e Molecular) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2003.

DE LIMA, M.E.; FIGUEIREDO, S.G.; PIMENTA, A.M.; SANTOS, D.M.; BORGES, M.H.; CORDEIRO, M.N.; RICHARDSON, M.; OLIVEIRA, L.C.; STANKIEWICZ, M.; PELHATE, M. Peptides of arachnid venoms with insecticidal activity targeting sodium channels. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* v. 146, n. 1-2, p. 264-279, 2007.

DODBIBA, E.; BREITBACH, Z.S.; WANIGASEKARA, E.; PAYAGALA, T.; ZHANG, X.; ARMSTRONG, D.W. Detection of nucleotides in positive-mode electrospray ionization mass spectrometry using multiply-charged cationic ion-pairing reagents. *Anal Bioanal Chem.* v. 398, n. 1, p. 367-376, 2010.

DUSSE, L.M.S.; VIEIRA, L.M.; CARVALHO, M.G. Revisão sobre óxido nítrico. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 39, n. 4, p. 343-350, 2003.

DUTRA, A.A.; SOUSA, L.O.; RESENDE, R.R.; BRANDÃO, R.L.; KALAPOTHAKIS, E.; CASTRO, I.M. Expression and characterization of LTx2, a neurotoxin from *Lasiodora* sp. effecting on calcium channels. *Peptides*. v. 29, n. 9, p. 1505-13, 2008.

ESCOUBAS, P.; CÈLERIER, M.L.; ROMI-LEBRUN, R.; NAKAJIMA, T. Two novel peptide neurotoxins from the venom on the tarantula *Lasiodora parahybana*. *Toxicon*. v. 35, n. 6, p. 805-806, 1997.

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

ESCOUBAS, P.; RASH, L. Tarantulas: eight-legged pharmacists and combinatorial chemists. *Toxicon*, v. 43, p. 555-574, 2004.

ESCOUBAS, P. Mass spectrometry in toxinology: a 21st-century technology for the study of biopolymers from venoms. *Toxicon*. v. 47, n. 6, p. 609-613, 2006.

ESCOUBAS, P.; QUINTON, L.; NICHOLSON, G.M. Venomics: unraveling the complexity of animal venoms with mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* v. 43, p. 279-295, 2008.

ESTRADA, G.; VILLEGAS, E.; CORZO, G. Spider venoms: a rich source of acylpolyamines and peptides as new leads for CNS drugs. *Nat. Prod. Rep.* v. 24, p. 145-161, 2007.

FÉLÉTOU M, VANHOUTTE PM. Endothelium-derived hyperpolarizing factor: where are we now? *Arterioscler. Thromb. Vasc.* v. 26, n. 6, p. 1215-1225, 2006.

FLEMING, I.; BUSSE, R. Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* v. 284, n. 1, p. R1-R12, 2003.

FULTON, D.; GRATTON, J.P.; SESSA, W.C. Post-translational control of endothelial nitric oxide synthase: why isn't calcium/calmodulin enough? *J. Pharmacol. Exp. Ther.* v. 299, n. 3, p. 818-824, 2001.

GLISH, G.L.; VACHET, R.W. The basics of mass spectrometry in the twenty-first century. *Nat Rev Drug Discov.* v. 2, n. 2, p. 140-150, 2003.

GOLDIN, S. *et al.* Fucosylated guanosine disulfates as excitatory amino acid antagonists. US. Pat. 5438130, 1 Ago. 1995.

GOMES, P.C.; DE SOUZA, B.M.; DIAS, N.B.; CESAR-TOGNOLI, L.M.; SILVA-FILHO, L.C.; TORMENA, C.F.; RITTNER, R.; RICHARDSON, M.; CORDEIRO, M.N.; PALMA, M.S. Nigriventrine: a low molecular mass neuroactive compound from the venom of the spider *Phoneutria nigriventer*. *Toxicon.* v. 57, n. 2, p. 266-274, 2011.

GUETTE, C.; LEGROS, C.; TOURNOIS, G.; GOYFFON, M.; CÉLÉRIER, M.L. Peptide profiling by matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry of the *Lasiodora parahybana* tarantula venom gland. *Toxicon.* v. 47, n. 6, p. 640-649, 2006.

GUNS, P.J.; KORDA, A.; CRAUWELS, H.M.; VAN ASSCHE, T.; ROBAYE, B.; BOEYNAEMS, J.M.; BULT, H. Pharmacological characterization of nucleotide P2Y receptors on endothelial cells of the mouse aorta. *Br J Pharmacol.* v. 146, n. 2, p. 288-295, 2005.

HANSMANN, G.; BÜLTMANN, R.; TULUC, F.; STARKE, K. Characterization by antagonists of P2-receptors mediating endothelium-dependent relaxation in the rat aorta. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* v. 356, n. 5, p. 641-52, 1997.

HARRIS, M.B.; JU, H.; VENEMA, V.J.; LIANG, H.; ZOU, R.; MICHELL, B.J.; CHEN, Z.P.; KEMP, B.E.; VENEMA, R.C. Reciprocal phosphorylation and

regulation of endothelial nitric-oxide synthase in response to bradykinin stimulation. *J. Biol. Chem.* v. 276, n. 19, p. 16587-16591, 2001.

HESS, C.N.; KOU, R.; JOHNSON, R.P.; LI, G.K.; MICHEL, T. ADP signaling in vascular endothelial cells: ADP-dependent activation of the endothelial isoform of nitric-oxide synthase requires the expression but not the kinase activity of AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem.* v. 284, n. 47, p. 32209-32224, 2009.

HORTA, Carolina Campolina Rebello. Efeitos Cardiovasculares do veneno da aranha *Lasiadora* sp. em ratos 140 f. Orientador: Evanguedes Kalapothakis. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Farmacologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

ISBISTER, G.K.; SEYMOUR, J.E.; GRAY, M.R.; RAVEN, R.J. Bites by spiders of the family Theraphosidae in humans and canines. *Toxicon*, v. 41, p. 519-524, 2003.

KAISER, C. R. RMN 2D: detecção inversa e gradiente de campo na determinação estrutural de compostos orgânicos. *Química Nova*. v. 23, n. 2, 2000.

KALAPOTHAKIS, E.; KUSHMERICK, C.; GUSMÃO, D.R.; FAVARON, G.O.C.; FERREIRA, A.J.; GÓMEZ, M.V.; ALMEIDA, A.P. Effects of the venom of a mygalomorph spider (*Lasiadora* sp.) on the isolated rat heart. *Toxicon*. v. 41, p. 23-28, 2003.

KALIC, M.; BUSSELMANN, G.; LAUTERWEIN, J.; KAMP, G. Phosphorous metabolites in boar spermatozoa - Identification of AMP by multinuclear magnetic resonance. *BBA-Bioenergetics*. v. 1320, n. 2, p. 208-216, 1997.

KHAZAEI, M.; MOIEN-AFSHARI, F.; LAHER, I. Vascular endothelial function in health and diseases. *Pathophysiology*. v. 15, n. 1, p. 49-67, 2008.

KING, G.F.; HARDY, M.C. Spider-Venom Peptides: Structure, Pharmacology, and Potential for Control of Insect Pests. *Annu Rev Entomol*. v. 58, p. 475-496, 2013.

KRUMENACKER, J.S.; HANAFY, K.A.; MURAD, F. Regulation of nitric oxide and soluble guanylyl cyclase. *Brain Res. Bull*. v. 62, n. 6, p. 505-515, 2004.

KURAHASHI, K.; NISHIHASHI, T.; TRANDAFIR, C.C.; WANG, A.M.; MURAKAMI, S.; JI, X. Diversity of endothelium-derived vasoconstricting factors - arachidonic acid metabolites. *Acta Pharmacol. Sin*. v. 24, n. 11, p. 1065-1069, 2003.

KUSHMERICK, C.; CARVALHO, F.M.; MARIA, M.; MASSENSINI, A.R.; ROMANO-SILVA, M.A.; GOMEZ, M.V.; KALAPOTHAKIS, E.; PRADO, M.A.M. Effects of a *Lasiadora* spider venom on Ca<sup>2+</sup> and Na<sup>+</sup> channels. *Toxicon*. v. 39, p. 991-1002, 2001.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. v. 227(5259), p. 680-5, 1970.

LEMOS, V.S.; FREITAS, M.R.; MULLER, B.; LINO, Y.D.; QUEIROGA, C.E.; CÔRTEZ, S.F. Dioclein, a new nitric oxide- and endothelium-dependent vasodilator flavonoid. *Eur. J. Pharmacol*. v. 386, n. 1, p. 41-46, 1999.

LUCAS, S. Sobre a distribuição geográfica dos gêneros da subfamília *Theraphosinae* Thorell, 1870 no Brasil (Araneae, Theraphosidae). *Mem. Inst. Butantan*. v. 46, p. 339-352, 1982.

LUCAS, S.; DA SILVA JR, P.I.; BERTANI, R.; CARDOSO, J.L.C. Mygalomorph spider bites: a report on 91 cases in the state of São Paulo, Brazil. *Toxicon*, v. 32, n. 10, p. 1211-1215, 1994.

MASCAROS, P.A.; BAZZICALUPI, C.; BIANCHI, A.; GIORGI, C.; VALERO, M.D.G.; GARZON, R.L.; SALIDO, M.L.G.; VALTANCOLI, B. Molecular recognition of ADP over ATP in aqueous solution by a polyammonium receptor containing a pyrimidine residue. *Chem. Comm.* v. 47, n. 10, p. 2814-2816, 2011.

MATOBA, T.; SHIMOKAWA, H. Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in animals and humans. *J. Pharmacol. Sci.* v. 92, n. 1, p. 1-6, 2003.

MEDHORA, M.; NARAYANAN, J.; HARDER, D.; MAIER, K.G. Identifying endothelium-derived hyperpolarizing factor: recent approaches to assay the role of epoxyeicosatrienoic acids. *Jpn. J. Pharmacol.* v. 86, n. 4, p. 369-75, 2001.

MOMBOULI; J.V.; VANHOUTTE, P.M. Endothelial dysfunction: from physiology to therapy. *J. Mol. Cell Cardiol.* v. 31, p. 61-74, 1999.

NICHOLSON, G.M. Insect-selective spider toxins targeting voltage-gated sodium channels. *Toxicon*. v. 49, p. 490-512, 2007.

NUNES, K.P.; COSTA-GONÇALVES, A.; LANZA, L.F.; CORTES, S.F.; CORDEIRO, M.N.; RICHARDSON, M.; PIMENTA, A.M.; WEBB, R.C.; LEITE, R.; DE LIMA, M.E. Tx2-6 toxin of the *Phoneutria nigriventer* spider potentiates rat erectile function. *Toxicon*. v. 51, n. 7, p. 1197-1206, 2008.

NUNES, K.P.; CORDEIRO, M.N.; RICHARDSON, M.; BORGES, M.N.; DINIZ, S.O.; CARDOSO, V.N.; TOSTES, R.; DE LIMA, M.E.; WEBB, R.C.; LEITE R. Nitric oxide-induced vasorelaxation in response to PnTx2-6 toxin from

Phoneutria nigriventer spider in rat cavernosal tissue. *J Sex Med.* v. 7, n. 12, p. 3879-3888, 2010.

ODELL, G.V.; HUDIBURG, S.A.; HERRERO, M.; CABBINESS, S.G.; CHAN, T.K.; AIRD, S.D.; KAISER, I. Tarantula venom components: *Brachypelma smithii*, *Brachypelma emilia*, *Dugesiella hentzi* and *Aphonopelma seemanni*. *Toxicon.* v. 27, p. 67, 1989.

PALMA, M.S.; NAKAJIMA, T. A Natural Combinatorial Chemistry Strategy in Acylpolyamine Toxins in Nephilinae Orb-Web-Spiders. *Journal of Toxicology. Toxin Reviews.* v. 24, n. 2, p. 209-234, 2005.

PIMENTA, A.M.; DE LIMA, M.E. Small peptides, big world: biotechnological potential in neglected bioactive peptides from arthropod venoms. *J Pept Sci.* v. 11, n. 11, p. 670-676, 2005.

PLATNICK, N.I. The world spider catalog. Version 13.0. New York: American Museum of Natural History, 2012. Disponível em: <<http://research.amnh.org/iz/spiders/catalog/INTRO1.html>>. Acesso em: 28 Jun. 2012.

QIAN, T.; CAI, Z.; YANG, M.S. Determination of adenosine nucleotides in cultured cells by ion-pairing liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Biochem.* v. 325, n. 1, p. 77-84, 2004.

QUISTAD, G.B.; LAM, W.W.; CASIDA, J.E. Identification of bis(agmatine)oxalamide in venom from the primitive hunting spider, *Plectreurys tristis* (Simon). *Toxicon.* v. 31, n. 7, p. 920-924, 1993.

RABILLOUD, T.; VUILLARD, L.; GILLY, C.; LAWRENCE, J.J. Silver-staining of proteins in polyacrylamide gels, a general overview. *Cell. Mol. Biol.* V. 40, p. 57-75, 1994.



RASH, L.D.; KING, R.G.; HODGSON, W.C. Evidence that histamine is the principal pharmacological component of venom from an Australian wolf spider (*Lycosa godeffroyi*). *Toxicon*. v. 36, n. 2, p. 367-375, 1998.

RATTMANN, Y.D.; PEREIRA, C.R.; CURY, Y.; GREMSKI, W.; MARQUES, M.C.; DA SILVA-SANTOS, J.E. Vascular permeability and vasodilation induced by the *Loxosceles intermedia* venom in rats: involvement of mast cell degranulation, histamine and 5-HT receptors. *Toxicon*. v. 5, p. 363-372, 2008.

RICCIARDOLO, F.L.; STERK, P.J.; GASTON, B.; FOLKERTS, G. Nitric oxide in health and disease of the respiratory system. *Physiol. Rev.* v. 84, n. 3, p. 731-765, 2004.

SAVEL-NIEMANN, A. Tarantula (*Eurypelma californicum*) venom, a multicomponent system. *Biol. Chem. Hoppe Seyler*. v. 370, n. 5, p. 485-498, 1989.

SCHANBACHER, F.L.; LEE, C.K.; HALL, J.E.; WILSON, I.B.; HOWELL, D.E.; ODELL, G.V. Composition and properties of tarantula *Dugesiella hentzi* (Girard) venom. *Toxicon*. v. 11, p. 21-29, 1973.

SCHIAPELLI, R.D.; DE PIKELIN, B.S.G. Estudio sistematico comparativo de los generos "Theraphosa" Walck., 1805; "Lasiodora" C. L. Koch, 1851 y "Sericipelma" Ausserer, 1875 (Araneae, Theraphosidae). *Atas do Simpósio sobre a Biota Amazônica*. v. 5 (Zoologia), p. 481-494, 1967.

SCHMIDT, G. Efficacy of bites from Asiatic and African tarantulas. *Trop. Med. Parasitol.* v. 40, p. 114, 1989.

SCHVARTSMAN, S. Acidentes por Aranhas (Araneísmo). In: *Plantas Venenosas e Animais Peçonhentos*. São Paulo: Sarvier, 1992. p. 189-210.

SHIMOKAWA, H. Primary endothelial dysfunction: atherosclerosis. *J. Mol. Cell. Cardiol.* v. 31, n. 1, p. 23-37, 1999.

SILVESTRE, Flávia Galindo. Caracterização bioquímica, imunológica e molecular do veneno das aranhas do gênero *Loxosceles* e *Lasiadora*. 185 f. Orientador: Evanguedes Kalapothakis. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2005.

SPECTRAL DATABASE FOR ORGANIC COMPOUNDS SDBS. National Institute of Advanced Industrial Science and Technology. Japan. Disponível em: <[http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct\\_frame\\_top.cgi](http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct_frame_top.cgi)>. Acesso em: 15 Ago. 2012.

SUCHYNA, T.M.; JOHNSON, J.H.; HAMER, K.; LEYKAM, J.F.; GAGE, D.A.; CLEMO, H.F.; BAUMGARTEN, C.M.; SACHS, F. Identification of a peptide toxin from *Grammostola spatulata* spider venom that blocks cation-selective stretch-activated channels. *J. Gen. Physiol.* v. 115, n. 5, p. 583-598, 2000.

THEAKSTON, R.D.; KAMIGUTI, A.S. A list of animal toxins and some other natural products with biological activity. *Toxicon.* v. 40, n. 5, p. 579-651, 2002.

TRANDUNH, S.; NEUMANN, J.M. P-31-NMR study of interaction of Mg<sup>2+</sup> ions with nucleoside diphosphates. *Nuc. Acids. Res.* v. 4, n. 2, p. 397-403, 1977.

TRIGGLE, C.R.; HOLLENBERG, M.; ANDERSON, T.J.; DING, H.; JIANG, Y.; CERONI, L.; WIEHLER, W.B.; NG, E.S.; ELLIS, A.; ANDREWS, K.; MCGUIRE, J.J.; PANNIRSELVAM, M. The endothelium in health and disease - a target for therapeutic intervention. *J. Smooth Muscle Res.* v. 39, n. 6, p. 249-267, 2003.

VANE, J.; CORIN, R.E. Prostacyclin: a vascular mediator. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* v. 26, n. 6, p. 571-8, 2003.

VERANO-BRAGA, T.; ROCHA-RESENDE, C.; SILVA, D.M.; IANZER, D.; MARTIN-EAUCLAIRE, M.F.; BOUGIS, P.E.; DE LIMA, M.E.; SANTOS, R.A.; PIMENTA, A.M. *Tityus serrulatus* Hypotensins: a new family of peptides from scorpion venom. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* v. 371, n. 3, p. 515-520, 2008.

VIEIRA, A.L.; MOURA, M.B.; BABÁ, E.H.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C.; KALAPOTHAKIS, E.; CASTRO, I.M. Molecular cloning of toxins expressed by the venom gland of *Lasiadora* sp. *Toxicon.* v. 44, n. 8, p. 949-952, 2004.

VON KÜGELGEN, I.; HARDEN, T.K. Molecular pharmacology, physiology, and structure of the P2Y receptors. *Adv Pharmacol.* v. 61, p. 373-415, 2011.

WEINBERG, M.; CORDEIRO, M.N.; DE LIMA, M.E.; OLIVEIRA, L.C.; DINIZ, C. R. Endothelium-dependent relaxation of rat mesenteric arterial rings by a *Phoneutria nigriventer* venom fraction. *Jpn. J. Pharmacol.* v. 88, n. 2, p. 189-196, 2002.

WELSH, J.H.; BATTY, C.S. 5-hydroxytryptamine content of some arthropod venoms and venom-containing parts. *Toxicon*, v. 1, p. 165-173, 1963.

WISE, H. Multiple signaling options for prostacyclin. *Acta Pharmacol. Sin.* v. 24, n. 7, p. 625-630, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Neglected Tropical Diseases. Disponível em: <[http://www.who.int/neglected\\_diseases/diseases/snakebites/en/](http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/snakebites/en/)>. Acesso em: 13 out. 2012.

ZECCHIN, H.G.; PRIVIERO, F.B.; SOUZA, C.T.; ZECCHIN, K.G.; PRADA, P.O.; CARVALHEIRA, J.B.; VELLOSO, L.A.; ANTUNES, E.; SAAD, M.J. Defective insulin and acetylcholine induction of endothelial cell-nitric oxide synthase through insulin receptor substrate/Akt signaling pathway in aorta of obese rats. *Diabetes.* v. 56, n. 4, p. 1014-1024, 2007.

ZIMMERMANN, H. Ectonucleotidases: some recent developments and a note on nomenclature. *Drug Dev Res.* v. 52, p. 44-56, 2001.

**Anexos**

## **9. ANEXOS**

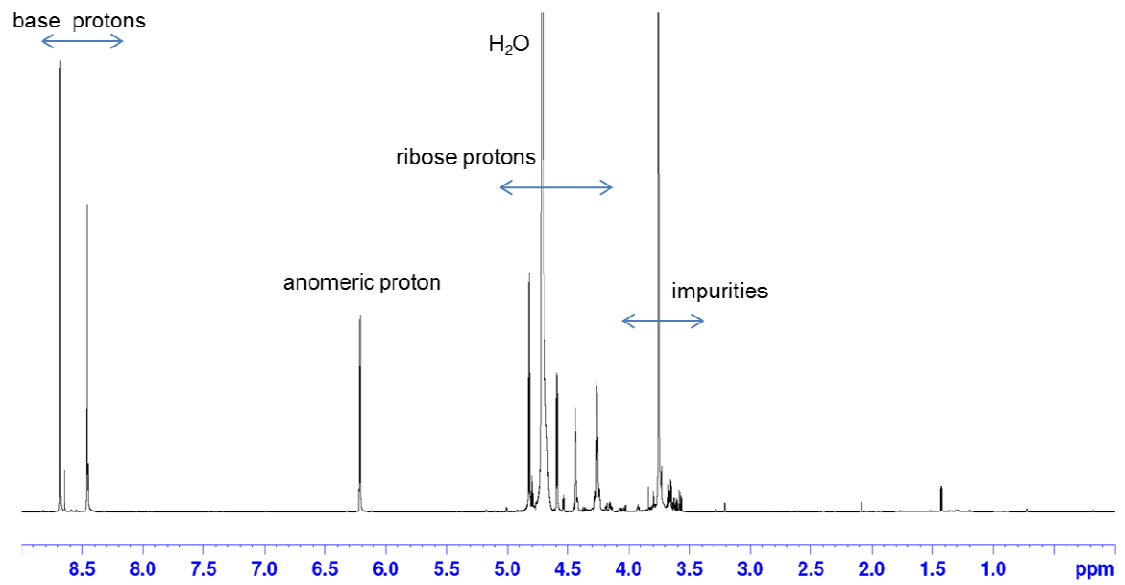
### **9.1. Espectros de RMN**

### **9.2. Artigo publicado no periódico Toxicon**

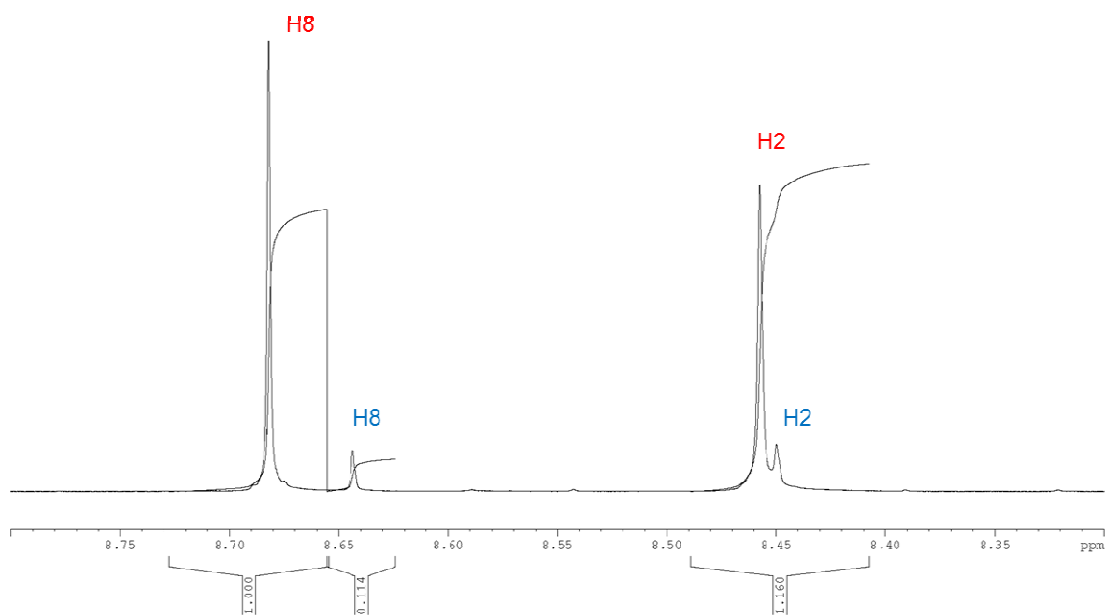
Cutaneous loxoscelism caused by *Loxosceles similis* venom and neutralization capacity of its specific antivenom.

### **9.3. Artigo aceito para publicação no periódico Journal of Investigative Dermatology**

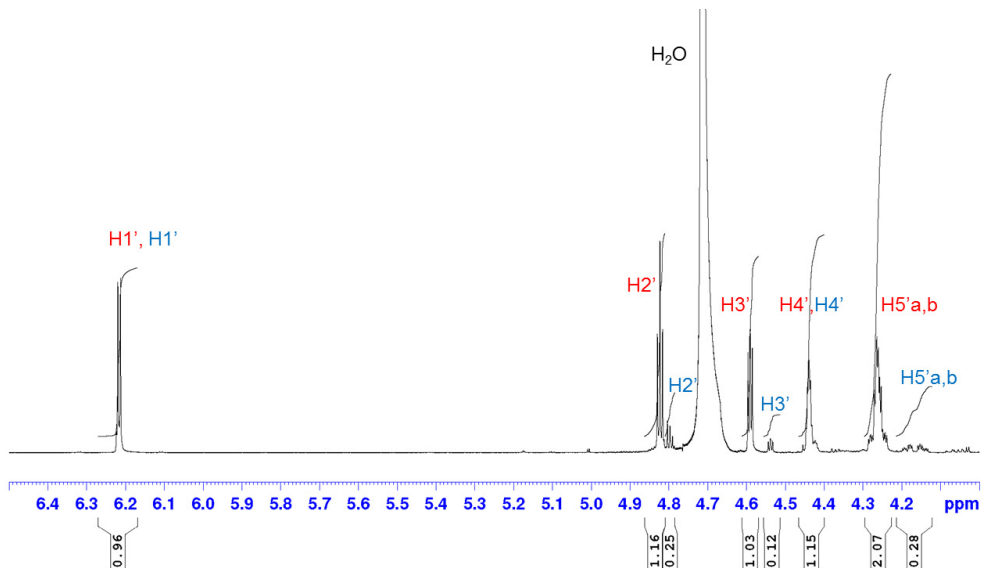
Lysophosphatidic acid mediates the release of cytokines and chemokines by human fibroblasts treated with *Loxosceles* spider venom.



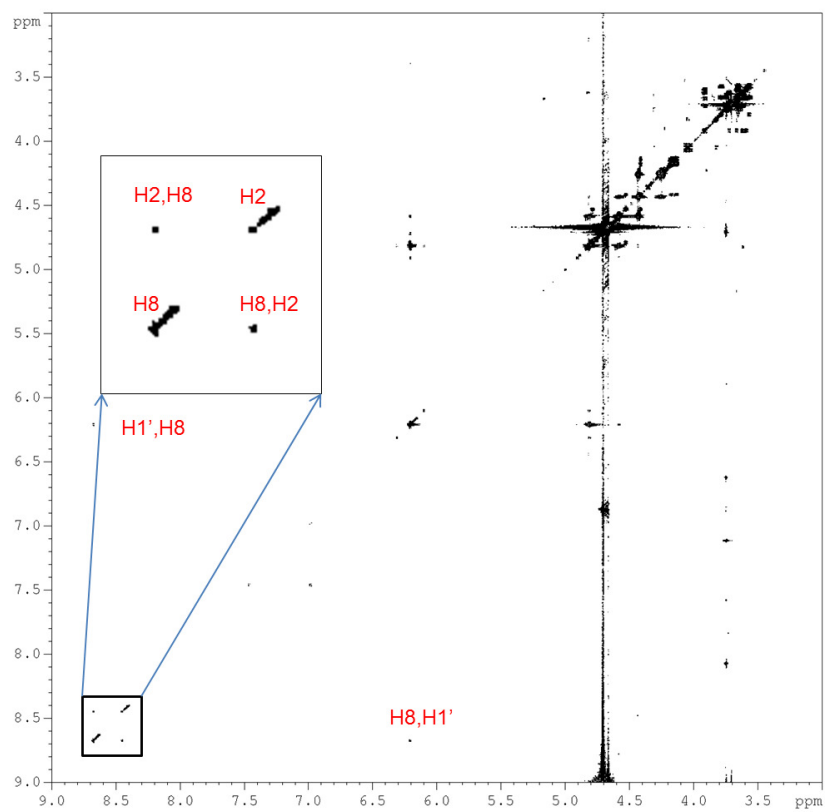
Espectro <sup>1</sup>H de RMN (800 MHz) da amostra, pH 3,8.



Espectro <sup>1</sup>H de RMN (800 MHz) da amostra, pH 3,8. Região aromática: ADP (vermelho), AMP (azul).

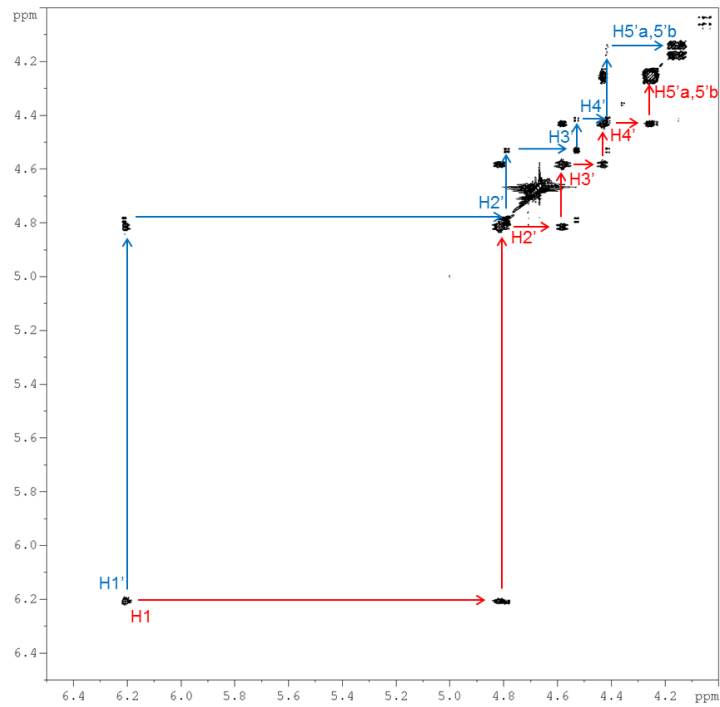


Espectro  $^1\text{H}$  de RMN (800 MHz) da amostra, pH 3,8. Ressonâncias de ribose: ADP (vermelho), AMP (azul).

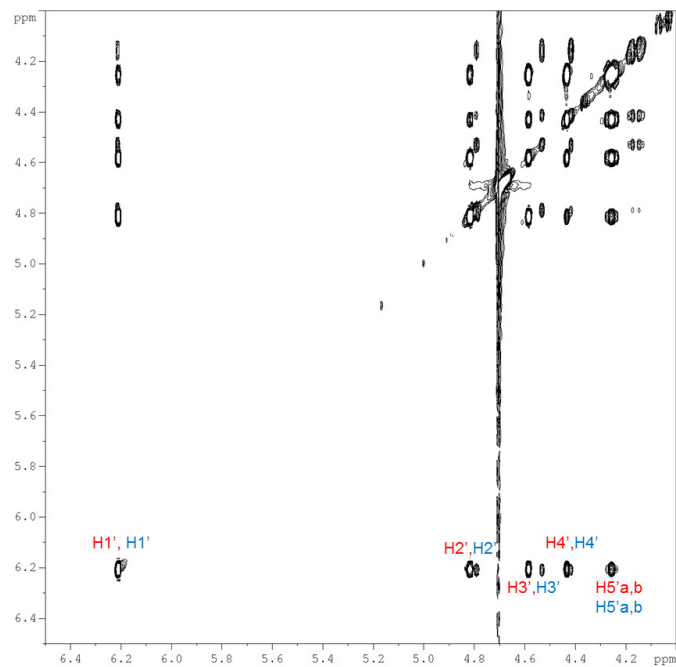


Espectro 2D COSY da amostra, pH 3,8. A expansão destaca os sinais de adenina.

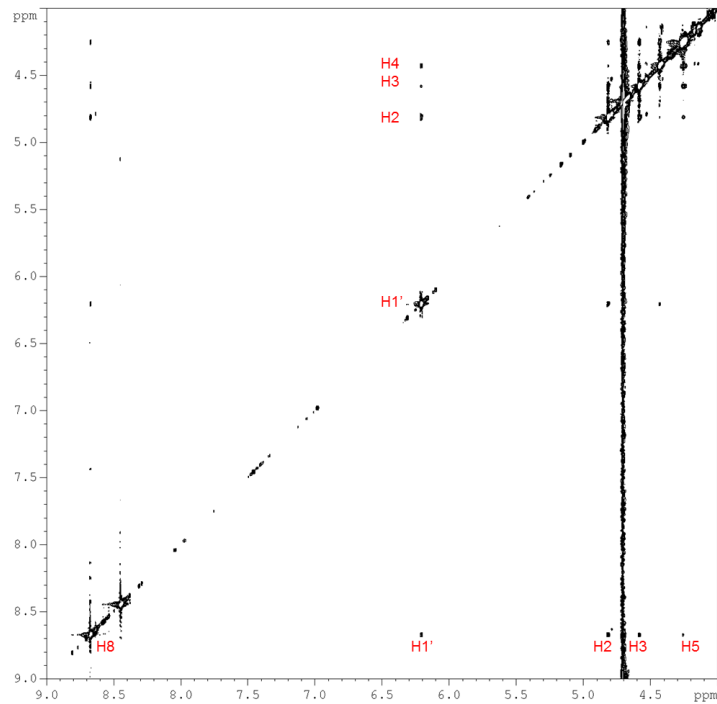




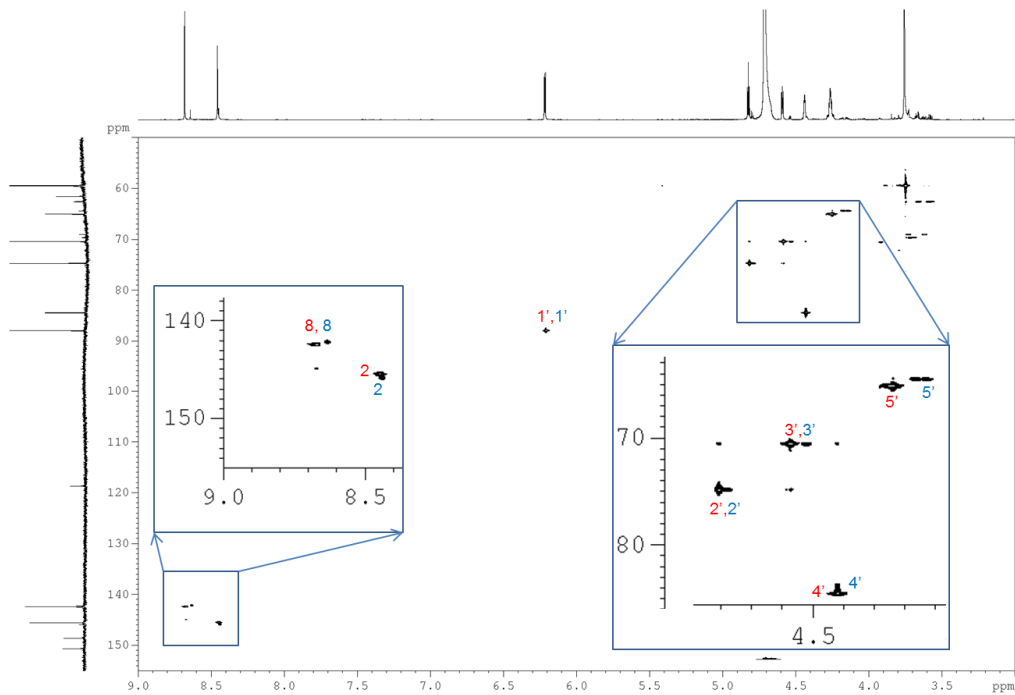
Espectro 2D COSY da amostra, pH 3,8. Região de ribose: ADP (vermelho), AMP (azul).



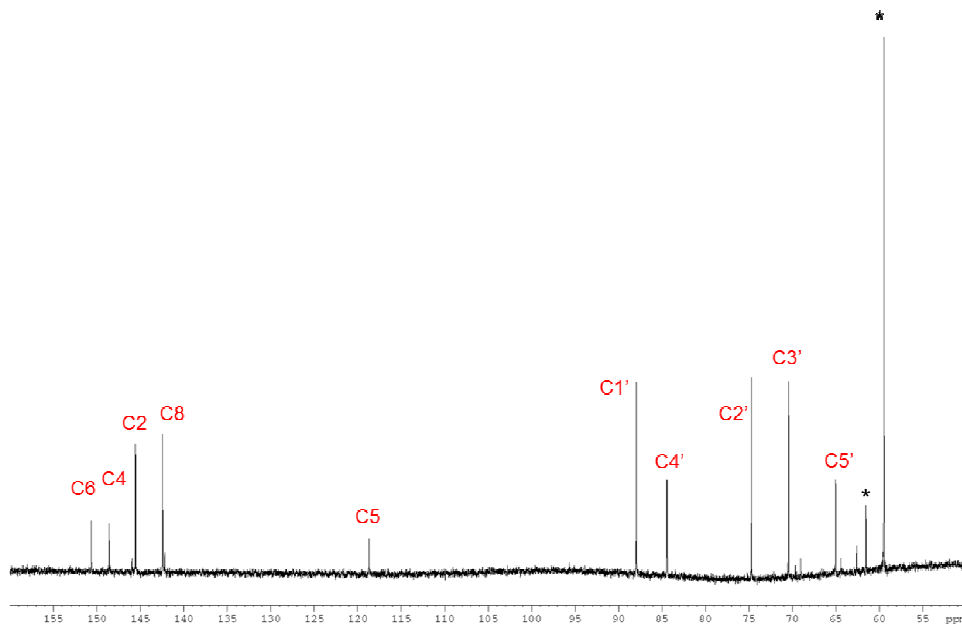
Espectro 2D TOCSY da amostra, pH 3,8. Região de ribose: ADP (vermelho), AMP (azul).



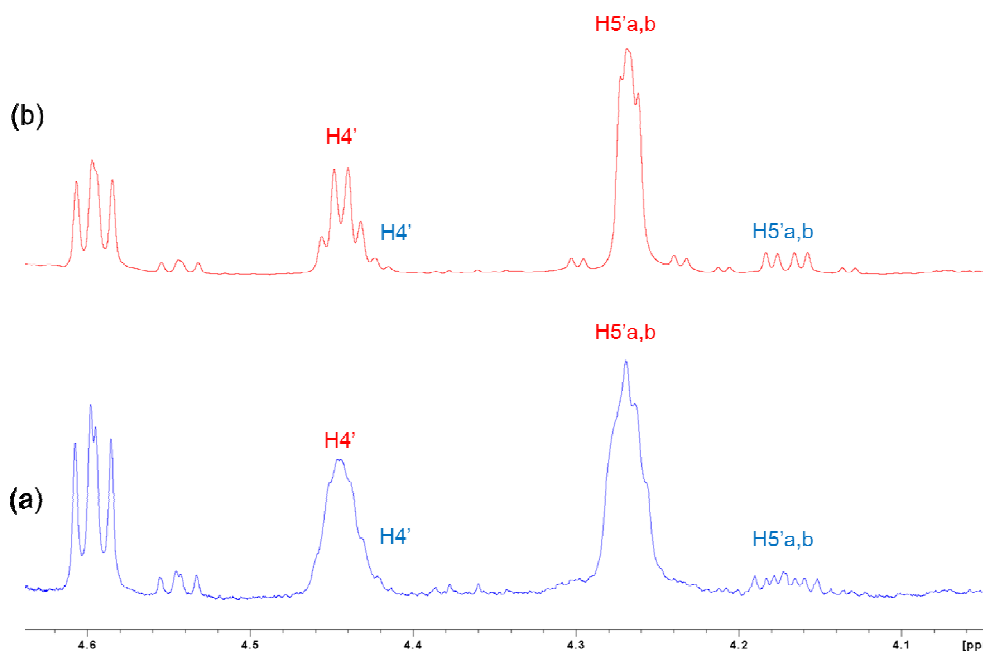
Espectro 2D <sup>1</sup>H NOESY da amostra, pH 3,8. ADP (vermelho), AMP (azul).



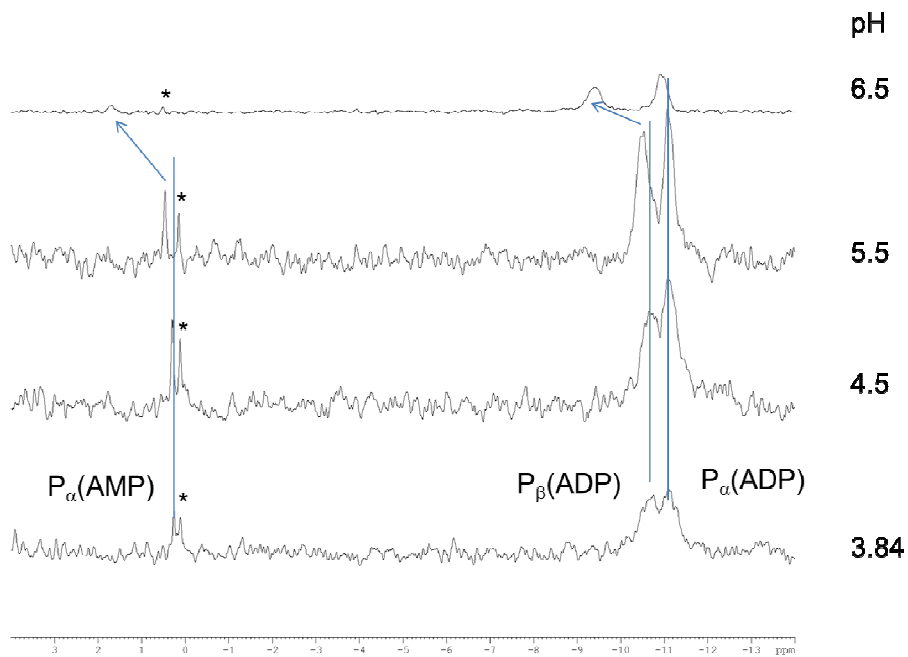
Espectro 2D <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC da amostra, pH 3,8. A expansão destaca os sinais de base e ribose. ADP (vermelho), AMP (azul).



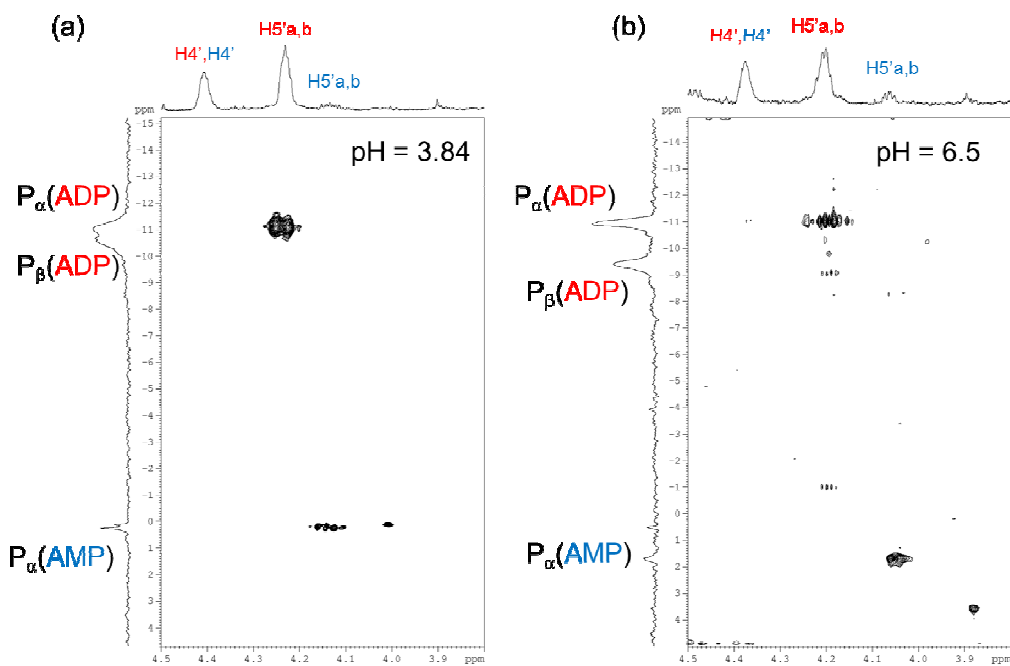
Espectro  $^{13}\text{C}$  de RMN da amostra. Apenas os sinais de ADP são suficientemente intensos para serem marcados. Sinais de impurezas estão marcados com asterisco.



Espectro  $^1\text{H}$  de RMN (400 MHz) da amostra, com (b) e sem (a) dissociação de  $^{31}\text{P}$ . ADP (vermelho), AMP (azul).



Espectro  $^{31}\text{P}$  de RMN (400 MHz) da amostra, em função do pH.



Espectro 2D  $^1\text{H}$ - $^{31}\text{P}$  de RMN (400 MHz) da amostra, em pH 3,84 (a) e pH 6,5 (b).