

JOSIANA KUSMA

**ESTUDO DA ATIVIDADE NEFROTÓXICA DA TOXINA DERMONECRÓTICA
(fosfolipase-D) DO VENENO DE ARANHA MARROM *Loxosceles intermedia*.**

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

Orientador: Prof. Dr. Silvio Sanches Veiga

Co-orientador: Waldemiro Gremski

CURITIBA

2008

A meus pais,
Demetrio Kusma e
Ana Francisca P. Kusma

AGRADECIMENTOS

Durante o desenvolvimento desta dissertação de mestrado, muitas pessoas especiais participaram e colaboraram para o êxito deste trabalho. Tenho plena consciência de que sem elas, tudo se tornaria mais difícil. Assim, gostaria de agradecer e dedicar os méritos dessa conquista a essas pessoas que tanto me incentivaram.

Ao Prof. Dr. Silvio Sanches Veiga, pela sua dedicação e brilhantismo profissional, que se tornou referência para minha formação acadêmica. Agradeço ainda pela sua confiança, compreensão, incentivo e pela convivência, que muito contribuiu para minha vida profissional e pessoal.

Ao admirável Prof. Dr. Waldemiro Gremski, exemplo de dedicação e amor à Ciência.

A Prof^a. Dra. Lucélia Donatti, Prof^a. MSc Ana Carolina M. Wille , e ao Sr. Herculano Salviano dos Reis (Nino) pela amizade, atenção e colaboração prestada durante a realização deste trabalho.

Ao corpo docente, coordenação e secretaria do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular pela disponibilidade e auxílio prestado.

Aos companheiros do Laboratório de Matriz Extracelular e Biotecnologia de Venenos: Olga (orientadora para assuntos estratégicos) por toda ajuda e principalmente pela enorme paciência. Dilza e Youssef pela ajuda inestimável na realização dos experimentos. Daniele companheira incondicional para todas as horas. Anabel, Andréa, Isabela, Jenifer, Kátia, Luciellen, Luiza, Marcelo, Márcia, Rafael, Reginaldo, Rodrigo, Sandra e Valéria, enfim a todos pelo convívio, dedicação e amizade. Com vocês muitas coisas aprendi e muitos valores guardei.

Finalmente aos meus familiares e amigos que de alguma forma contribuíram para essa conquista.

“Nunca o homem inventará nada mais simples nem mais belo do que uma manifestação da natureza. Dada a causa, a natureza produz o efeito no modo mais breve em que pode ser produzido.”

Leonardo da Vinci

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS.....	vii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	x
1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1 Aranhas do gênero <i>Loxosceles</i>	01
1.2 Ocorrência e distribuição geográfica do gênero <i>Loxosceles</i>	03
1.3 Acidente Loxoscélico.....	03
1.4 Loxoscelismo.....	05
1.5 Características dos Venenos <i>Loxoscélicos</i>	09
2.2. OBJETIVOS.....	15
2.1 Objetivo geral.....	15
2.2 Objetivos específicos.....	15
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
3.1 MATERIAIS.....	16
3.1.1 Reagentes.....	16
3.2 MÉTODOS.....	16
3.2.1 Animais.....	16
3.2.2 Extração de RNA total a partir de glândula produtora de veneno.....	17
3.2.3 Cepas de <i>Escherichia coli</i> e vetores de expressão.....	17
3.2.4 Transformação de células competentes.....	17
3.2.5 Plaqueamento em ágar LB das bactérias transformadas.....	18
3.2.6 Expressão heteróloga das toxinas recombinantes LiRecDT1 e LiRecDT1MH12A em sistema procariótico.....	18
3.2.7 Purificação das proteínas LiRecDT1 e LiRecDT1MH12A em resina Ni-NTA agarose.....	18
3.2.8 Análises histopatológicas do tecido renal (microscopia de luz).....	19
3.2.9 Coloração pelo método de Hematoxilina e Eosina	19
3.2.10 Microscopia eletrônica de Transmissão	20
3.2.11 Dosagem de uréia sérica.....	20
3.2.12 Pesquisa de hemoglobinúria e hematúria.....	21

3.2.13 Pesquisa de Proteinúria.....	21
3.2.14 Coloração de géis de poliacrilamida.....	22
3.2.15 Ensaio de mortalidade em camundongos induzida pelas toxinas recombinantes LiRecDT1 e LiRecDT1M H12A.....	22
3.2.16Imunofluorescência tecido renal	22
3.2.17 Reações de Immunoblotting.....	24
3.2.18 Metodologia da análise de morfologia celular por microscopia óptica.....	24
3.2.19 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	25
3.2.20 Ensaio de citotoxicidade celular pelo método de captura do vermelho neutro.....	25
3.2.21 Imunofluorescência células MDCK.....	26
3.2.22 Análise Estatística.....	27
4. RESULTADOS.....	28
4.1 Efeitos histopatológicos das toxinas dermonecróticas recombinantes LiRecDT1 selvagem e da LiRecDT1M H12A sobre o tecido renal.....	28
4.2 Evidencias ultraestruturais de injúria renal (microscopia eletrônica de transmissão).....	30
4.3 Investigação laboratorial após a administração da toxina dermonecrótica recombinante LiRecDT1 Selvagem e LiRecDT1M H12A.....	33
4.4Pesquisa de proteinúria.....	35
4.5 Ensaio de letalidade em camundongos induzida pelas toxinas recombinantes LiRecDT1 e LiRecDT1M H12A.....	38
4.6 Análise do tecido renal por Imunofluorescência e da urina por Immunoblotting.....	39
4.7 Efeitos das toxinas dermonecróticas recombinantes LiRecDT1 selvagem e da LiRecDT1M H12A sobre a morfologia e a viabilidade celular em linhagem MDCK.....	42
4.8 Efeitos das toxinas dermonecróticas recombinantes LiRecDT1 selvagem e da LiRecDT1MH12A sobre a viabilidade de células da linhagem MDCK.....	44
4.9 Mudanças morfológicas em células MDCK induzidas pela Toxina recombinante dermonecrótica LiRecDT1 selvagem e LiRecDT1MH12A analisadas através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	45

4.10 Imunofluorescência de células MDCK.....	48
5. DISCUSSÃO.....	49
6. CONCLUSÃO.....	56
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58
8. ANEXOS	
Nephrotoxicity caused by brown spider venom phospholipase-D (dermonecrotic toxin) depends on catalytic activity.....	68

LISTA DE SIGLAS

ALFAC	- Álcool - Formol - Ácido acético
ATCC	- American Type Culture collection
BSA	- Albumina de soro bovino
BCiP/NBT	- Bromo cloro indofenil fosfato/nitro blue tetrazolium
°C	- Grau Celsius
C1P	- Ceramida-1-fosfato.
cDNA	- DNA complementar
CEEA	- Comissão de ética e experimentação animal
COBEA	- Colégio Brasileiro de Experimentação animal
DAPI	- 4-6-diamidino-2-fenilindole-dicloreto
DMEM	- <i>Dulbecos's Modified Eagles Medium</i>
EPM	- Erro padrão da média
EDTA	- Ácido etilenodiaminotetraacético
IgG	- Imunoglobulina G
IRA	- Insuficiência renal aguda
kDa	- Quilodaltos (unidade de massa molecular equivalente a mil daltons).
LALP	- Metalo protease do tipo astacina.
LiRecDT	- <i>Loxosceles intermedia</i> Dermonecrotic Recombinant Toxin.
LPA	- Ácido lisofosfatídico
mA	- Miliamperes
MDCK	- Madin Darby Canine Epithelial Cells
MET	- Microscopia eletrônica de Transmissão
MEV	- Microscopia Eletrônica de Varredura
mg	- Miligramas
mL	- Mililitro
mM	- Milimolar
µg	- Micrograma
µL	- Microlitro
PAGE-SDS	- Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
PBS	- Salina tamponada com fosfatos

pH	- Potencial hidrogeniônico
PLD	- Fosfolipase
p/v	- Proporção peso/volume
q.s.p	- Quantidade suficiente para.
rpm	- Rotação por minuto
SFB	- Soro fetal bovino
v/v	- Proporção volume/volume

RESUMO

Acidentes provocados pela picada de aranhas marrons (Gênero *Loxosceles*) estão relacionados com manifestações clínicas, incluindo dermonecrose com espalhamento gravitacional e envolvimento sistêmico que pode incluir insuficiência renal, trombocitopenia e hemólise. No presente trabalho, usando camundongos expostos a um tipo selvagem de fosfolipase – D recombinante (toxina dermonecrótica) e uma isoforma dessa toxina mutada no sítio catalítico, fomos capazes de mostrar que o mecanismo pelo qual o veneno provoca danos renais é dependente da atividade catalítica da enzima. Análises por microscopia óptica de biópsia renal de camundongos tratados com a toxina selvagem dermonecrótica recombinante “LiRecDT1” mostraram alterações morfológicas incluindo edema glomerular, eritrócitos e colapso do Espaço de Bowman, deposição de material protéico dentro do lúmen tubular e edema tubular, mas ausência de nefrotoxicidade para camundongos tratados com a isoforma da toxina mutada. Análises ultraestruturais por microscopia eletrônica de transmissão confirmam a citotoxicidade da toxina selvagem apontando distúrbios na estrutura glomerular em podócitos e no endotélio fenestrado. Alterações nos túbulos incluem deposição de material amorfo, edema do lúmen e um grande acúmulo de corpos multivesiculares bem como de estruturas elétron-densas no interior das células epiteliais. Adicionalmente, análises bioquímicas da urina e do sangue mostraram que a toxina selvagem induziu alterações na função renal como, hematúria e azotemia com elevação de uréia no sangue. Além disso, animais tratados com a fosfolipase – D selvagem tiveram proteinúria evidente, já a toxina mutada causou apenas atividade residual. Diferenças biológicas entre as toxinas recombinantes foram corroboradas através de ensaios de letalidade, que mostraram oligúria e mortalidade dos animais tratados com a toxina selvagem, porém ausência nos animais expostos à toxina mutada. Imunofluorescência com anticorpos que reconhecem a toxina fosfolipase–D foi analisada por microscopia confocal revelando deposição, tanto da toxina do tipo selvagem quanto a mutada, ao longo das estruturas tubulares renais. Por imunoblot utilizando soro hiperimune que reconhece a fosfolipase - D do veneno sobre urina de ratos tratados com as toxinas, nós detectamos sinal positivo na região de 30kDa de animais tratados com toxina do tipo selvagem, mas nenhuma reação positiva na urina de camundongos expostos à toxina mutada. Do mesmo modo, a toxina do tipo selvagem causou alterações morfológicas em células MDCK (epiteliais tubulares), incluindo aparecimento de vacúolos citoplasmáticos, defeito na adesão célula-célula e com o substrato de cultura. Também, tratamento com a toxina selvagem inibiu a viabilidade das células MDCK avaliadas pelo ensaio de captação do corante vital vermelho neutro, enquanto a isoforma mutada não apresentou nenhuma atividade. Assim, com base nos dados atuais, temos definida pela primeira vez na literatura um mecanismo molecular para a nefrotoxicidade causada pelo veneno de *Loxosceles intermedia* dependente da atividade catalítica da toxina fosfolipase – D.

ABSTRACT

Accidents evoked by the bites of brown spiders (*Loxosceles* genus) are related to clinical manifestations including skin necrosis with gravitational spreading and systemic involvement that may include renal failure, hemolysis and thrombocytopenia. In the present report, by using mice exposed to recombinant wild-type phospholipase-D (dermonecrotic toxin) and a mutated toxin isoform at the catalytic domain, we were able to show that the mechanism by which the venom induces renal damage is dependent on the catalytic activity of the enzyme. Light microscopy analysis of renal biopsies from recombinant wild-type phospholipase-treated mice showed morphologic alterations including glomerular edema, erythrocytes and collapse of Bowman's space, deposition of proteinaceous material within the tubular lumen and tubular edema, but absence of nephrotoxicity for mutated toxin-treated animals. Ultrastructural analysis through transmission electron microscopy confirmed wild-type toxin cytotoxicity pointing disorders of glomerular filter structure at foot processes and fenestrated endothelium membrane. Tubule alterations include deposits of amorphous material and edema of tubular lumina and increase in epithelial cytoplasmic multivesicular bodies and electron dense structures. Additionally, biochemical analyses of urine and blood showed that wild-type toxin induced changes in renal function causing hematuria and azotemia with elevation of blood urea. Moreover, wild-type phospholipase-D treatment induced proteinuria, whereas mutated toxin caused only residual activity. Biological differences for recombinant toxins were corroborated through mice lethality experiments, which showed oliguria and animal mortality after wild-type treatments, but an absence of lethality following mutated toxin exposure. Immunofluorescence with antibodies to phospholipase-D toxin and confocal microscopy analysis showed deposition of both wild-type and mutated toxins along the renal tubular structures. Immunoblotting with a hyperimmune antiserum against venom phospholipase on urine from toxins-treated mice, we detected a positive signal at region of 30kDa to animals treated with wild-type toxin, but no reaction on urine of mice exposed to mutated toxin. Similarly, wild-type toxin treatment caused morphological alterations of MDCK cells including appearance of cytoplasmic vacuoles, evoked impaired spreading cells detached from each other and from the culture substratum. Wild-type phospholipase toxin treatment of MDCK cells changed their viability evaluated by Neutral-Red Uptake, while mutated isoform had no activity. Thus, on the basis of the present data, we have defined for the first time at literature a molecular mechanism for *Loxosceles* venom nephrotoxicity dependent on the catalytic activity of phospholipase-D toxin.

1. INTRODUÇÃO

Algumas espécies de aracnídeos consistem em um problema de saúde pública, sendo o envenenamento por essas espécies de grande importância médica em todo o mundo. (ISBISTER *et al.*, 2003). Dentro do grupo dos artrópodes terrestres, a classe dos aracnídeos é a segunda em números de espécies, sendo que as aranhas compõem seu maior subgrupo (RUPPERT E BARNES, 1996).

Até os dias atuais, foram descritas aproximadamente 40.000 espécies de aranhas na literatura científica (ESCOUBAS *et al.*, 2000), o que representa, provavelmente, apenas uma parte do número real. Das espécies descritas, estima-se que menos de 100 são potencialmente perigosas ao homem (RUPPERT E BARNES, 1996;).

Entre as espécies de aranhas de grande importância médica pela gravidade dos acidentes provocados encontram-se as aranhas do gênero *Loxosceles* (família *Sicariidae*), cujos representantes são conhecidos como aranhas marrons, causam envenenamento caracterizado por lesão dermonecrótica e distúrbios sistêmicos (FUTRELL, 1992; BINFORD *et al.*, 2003).

1.1 Aranhas do gênero *Loxosceles*

Os animais desse gênero apresentam colorido uniforme que varia de marrom claro até o marrom escuro, podendo apresentar mancha clara (*Loxosceles gaucho*) ou mancha escura (*Loxosceles laeta*) no cefalotórax. São aranhas pequenas e possuem comprimento corporal variando de 8 a 15 mm e suas patas medem de 8 a 30 mm. Os machos (figura 1B) diferenciam-se das fêmeas (figura 1A) por apresentar o corpo menor e as pernas relativamente mais longas do que as fêmeas. Ambos os sexos são venenosos (FUTRELL, 1992; OLIVEIRA *et al.*, 1999).

A característica desse gênero é o formato do cefalotórax (figura 1C) que lembra um violino (FUTRELL, 1992), o qual apresentam 6 ocelos homogêneos

dispostos em três grupos de dois, formando uma linha curva, aparelho inoculador de veneno, composto por um par de quelíceras além de glândulas apócrinas (FOIL E NORMENT, 1979)

De hábitos noturnos, são sedentárias e não agressivas. Preferindo a escuridão, algumas vivem sob pedras, troncos de árvores, restos vegetais, telhas e tijolos empilhados. Com hábitos intradomiciliares podem ser encontradas atrás de quadros e móveis, no meio de roupas, livros, caixas de papelão e outros objetos. As teias são irregulares, semelhantes a algodão esfiapado (FRUTELL, 1992; SAMS *et al.*, 2001). *Loxosceles ssp* são carnívoras alimentando-se de pequenos insetos, reproduzem-se com facilidade, mesmo em ambientes desfavoráveis (SCHENONE E LETONJA, 1975; LUCAS, 1988; FUTRELL, 1992). Podem sobreviver por vários dias ou até meses sem alimento e água, suportam temperaturas entre 8 à 43°C (FUTRELL, 1992; FOIL E NORMENT, 1979).

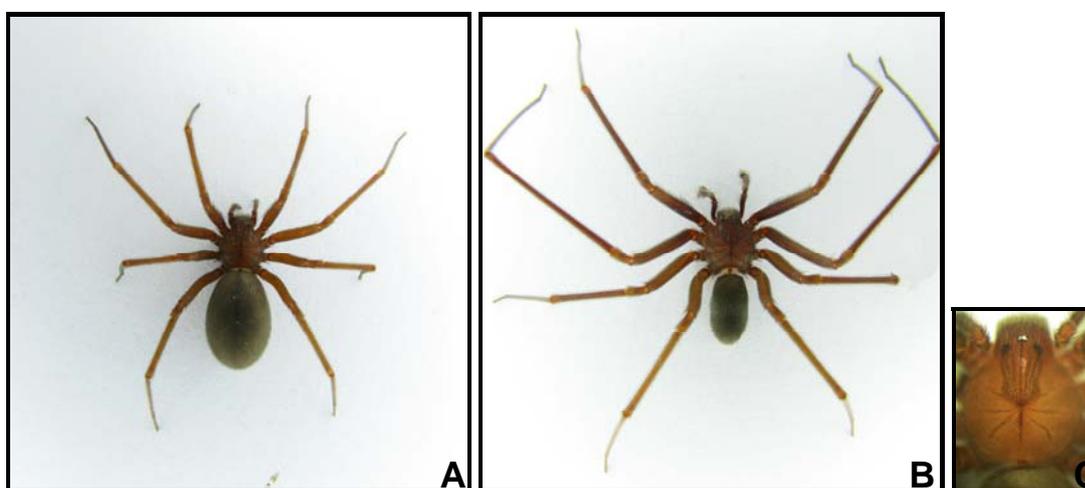


Figura 01. *Loxosceles intermedia*. (A) Fêmea, (B) Macho, (C) Cefalotórax.

1.2 Ocorrência e distribuição geográfica do gênero *Loxosceles*

As aranhas do gênero *Loxosceles* são cosmopolitamente distribuídas, adaptadas aos climas tropical, subtropical, e temperado; são descritas espécies em todos os continentes do mundo (FUTRELL, 1992; DA SILVA *et al.*, 2004).

No Brasil ocorrem oito espécies de *Loxosceles*, sendo quatro endêmicas do país: *L. similis* Moenkhaus, 1998 (PA, SP, MG e MS), *L. gaucho* Gerstch, 1967 (RS e SP), *L. amazonica* Gerstch, 1967 (AM, MG e MA) e *L. puortoi* Martins, Knysak & Bertani, 2002 (TO) e quatro ocorrendo também em países vizinhos: *L. laeta* (RS, SP, RJ, MG e PR); *L. intermedia* Mello-Leitão, 1934 (DF, RJ, SP e RS); *L. hirsuta* Mello Leitão, 1931 (RS e PR) e *L. adelaida* Gerstch, 1967 (RJ). Quatro das oito espécies de *Loxosceles* descritas para o Brasil estão presentes no estado Paraná: *L. intermedia*, *L. laeta*, *L. gaucho* e *L. hirsuta*. As espécies de maior importância clínica são: *L. intermedia*, *L. laeta*, *L. gaúcho*, sendo a espécie *L. intermedia* de maior distribuição do estado do Paraná e a principal espécie relacionada com acidentes no município de Curitiba (MARQUES-DA-SILVA e FISCHER, 2005).

1.3 Acidente Loxoscélico

No Brasil, o loxoscelismo não é muito freqüente, com exceção do estado do Paraná, particularmente em Curitiba e região metropolitana. No período de 2004-2006 somente em Curitiba foram notificados 8567 casos, que correspondem a 48,3% das notificações de acidentes por *Loxosceles spp.* registrados no Estado do Paraná (Dados fornecidos pela SESA – Secretaria Estadual de Saúde PR; Secretaria Municipal de Saúde, Curitiba – PR). Conforme foi verificado, a espécie predominante é a *L. intermedia*, mas, em algumas regiões, pode-se encontrar em menor população as espécies *L. hisurta*, *L. laeta* e *L. gaucho*. Ao contrário de outros animais peçonhentos, como ofídios, escorpiões e outros quelicerados, a aranha marrom não é agressiva. Os acidentes se relacionam aos hábitos adotados pela aranha marrom e tendem a ocorrer principalmente devido à compressão do animal,

inadvertidamente, contra a pele no ato de vestir-se, calçar-se, enxugar-se ou durante o sono (SUAREZ *et al.*, 1971; LUCAS, 1988; FUTRELL, 1992), sendo os locais mais afetados as regiões próximas dos membros inferiores, superiores e o tronco, caracterizando o acidente como doméstico e ocasionado principalmente pelo ato de defesa da aranha ao ser comprimida contra o corpo do indivíduo (SEZERINO *et al* 1998). Embora fatores múltiplos possam estar, relacionados, é provável que o aumento de acidentes envolvendo aranha marrom em Curitiba e região Metropolitana nos últimos anos deva-se a desequilíbrios ambientais e ecológicos, tais como desmatamento e extinção de predadores naturais, o que poderia impedir a manutenção da densidade populacional da espécie em níveis estáveis (BARBARO *et al.*, 1995), Figura 02.

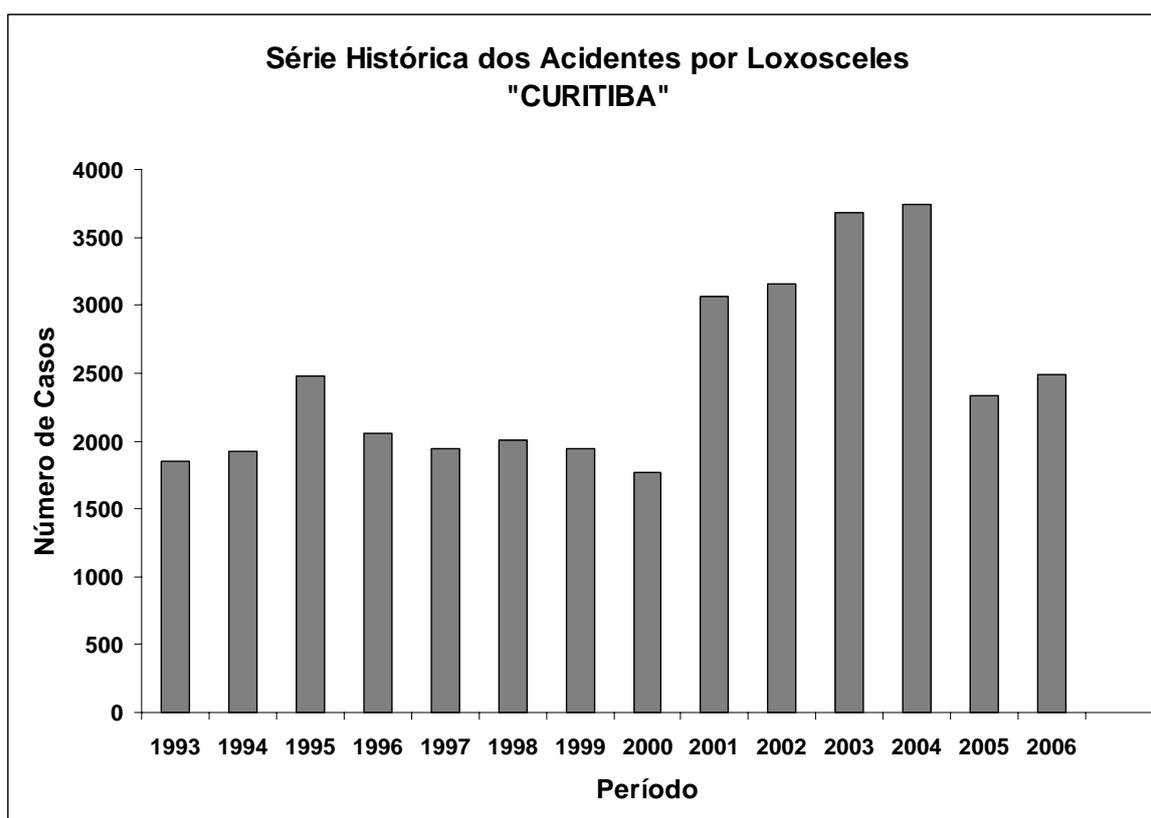


Figura 02. Número de acidentes por aranhas do gênero Loxosceles no município de Curitiba.

Fonte: Secretaria Municipal de Saúde, Curitiba – PR.

1. 4 Loxoscelismo

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

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

O quadro cutâneo caracteriza-se por dermonecrose no local da inoculação do veneno (REES *et al.*, 1984). A picada inicial, por ser pouco dolorosa, geralmente passa despercebida pelo paciente, porém após 2 a 8 horas, a dor pode variar de moderada a severa e é descrita como dor local do tipo “queimação” ou ardência, podendo ser acompanhada por prurido, edema, eritema, sensação de mal-estar geral e, em alguns casos, febre. Em seguida, pode surgir uma lesão de 1 a 30 cm de diâmetro, circundada por halo vermelho e uma zona pálida, denominada placa marmórea (FUTRELL, 1992; SCHENONE *et al.*, 1998). Após 3 a 5 dias do acidente pode ocorrer acúmulo de leucócitos polimorfonucleares, necrose e formação de abscesso (FUTRELL, 1992). Em alguns casos a lesão cutânea necrótica evolui em 2 a 6 semanas, com formação de uma escara de difícil cicatrização e pode dar origem a seqüelas deformantes. O ferimento crônico produzido pela picada da aranha marrom apresenta vasculite mediada por leucócitos, que pode produzir lesões como piodermia gangrenosa (REES *et al.*, 1984). Esta lesão pode ter como

agente sinérgico, acentuando sua gravidade, a presença de microorganismos provenientes das quelíceras, que no momento da picada injeta-os concomitantemente com o veneno. Um agente importante de infecção secundária à picada é o *Clostridium perfringens*, bacilo gram positivo anaeróbio (MONTEIRO *et al.*, 2002).

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

Por razões óbvias, não foram executadas biópsias consecutivas do desenvolvimento do loxoscelismo cutâneo em humanos. Porém, as mudanças histopatológicas informadas incluem edema e espessamento do endotélio dos vasos sangüíneos, presença de células inflamatórias, vasodilatação, coagulação intravascular, degeneração da parede dos vasos sangüíneos, hemorragia dérmica e até mesmo subcutânea (SMITH E MICKS, 1970; FUTRELL, 1992). Em estudos realizados em coelhos, com veneno de *L. laeta* e *L. reclusa*, as amostras histopatológicas mostraram após 3 horas, o acúmulo de leucócitos polimorfonucleares ao redor de vênulas e eritrócitos extravasculares sugerindo perda da integridade vascular. Nas arteríolas, foi verificado somente edema de células endoteliais. Após 6 horas, havia edema da derme e epiderme, infiltração de leucócitos polimorfonucleares nas paredes das vênulas, vasodilatação, coagulação intravascular, hemorragia volumosa subcutânea, e até mesmo no músculo, necrose, vacuolização das paredes das arteríolas e destruição da integridade das mesmas. Após 48 horas, o infiltrado de leucócitos polimorfonucleares continua crescendo (SMITH E MICKS, 1970; FUTRELL, 1992). O estudo histopatológico detalhado da dermonecrose induzida por veneno de *L. intermedia* em coelhos mostra aparecimento de injúria tecidual a partir de 4 horas após a injeção do veneno chegando a um pico máximo de dano tecidual, inclusive com lise de tecidos mais

profundos que a derme (mionecrose e necrose coagulativa) em 5 dias, com aparecimento de tecido conjuntivo de reparo (OSPEDAL *et al.*, 2002), além de lesão de vasos sangüíneos com aparecimento de bolhas no endotélio, fibrinogenólise e trombose (VEIGA, *et al.*, 2001a; VEIGA, *et al.*, 2001b; ZANETTI *et al.*, 2002).

O loxoscelismo cutâneo-visceral ou sistêmico ocorre com menor frequência (3 – 16% dos casos) e é observado apenas nos casos mais graves. As primeiras manifestações aparecem após 24 horas e os sintomas incluem, além da reação local, astenia, febre, episódios eméticos, alterações sensoriais, cefaléia, insônia e nos casos mais graves ocorrem convulsões e coma. Pode também ocorrer prurido generalizado e petéquias (SCHENONE *et al.* 1989; FUTRELL, 1992).

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

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

Em 62% dos casos de loxoscelismo sistêmico há um comprometimento renal ocorrendo insuficiência renal aguda (IRA) e conseqüentemente necrose tubular (SCHENONE *et al.*,1989). O efeito hemolítico contribui para a injúria renal sugerindo que a presença de hemoglobina livre precipitada ao longo do néfron pode retardar o fluxo do fluido tubular e produzir uma resposta patológica representada pela redução da filtração glomerular desencadeando a IRA (COUTINHO, 1996). As

membranas basais desempenham diversas funções vitais em tecidos embrionários e adultos em condições normais e patológicas. A membrana basal glomerular atua como uma barreira seletiva regulando a filtração tanto em carga quanto em tamanho das moléculas do plasma que passam para o espaço urinário, sendo os sítios aniônicos regularmente distribuídos na membrana basal sendo representados por proteoglicanos e glicosaminoglicanos, principalmente heparan sulfato proteoglicano e ácido hialurônico. Estudos mostraram que a remoção enzimática do heparan sulfato proteoglicano e não do ácido hialurônico pode produzir alterações de permeabilidade na membrana basal glomerular (KANVAR e FAQUHAR, 1979). Assim a ausência de proteoglicanos ou um bloqueio de suas funções influencia o processo de filtração renal levando à proteinúria. É possível também a ocorrência de uma desorganização eletrostática da membrana glomerular prejudicando o processo de filtração, levando à excreção de proteínas plasmáticas que exibem carga negativa no plasma. Outros componentes da membrana basal devem ser considerados em processos patológicos como a laminina, colágeno do tipo IV, entactina e a fibronectina haja visto que estas macromoléculas desempenham uma função ativa fisiológica e estrutural (DE BARROS *et al.*, 1992).

LUCIANO *et al.* (2004) demonstraram a atividade nefrotóxica das toxinas presentes no veneno de *L. intermedia* em nível de estruturas glomerulares e tubulares. Análises por microscopia de luz revelaram, em relação aos túbulos, hialinização dos túbulos distais e proximais, vacuolização de células epiteliais dos túbulos e edema intersticial. Foi possível também a observação da ligação direta do veneno ao longo das estruturas tubulares e glomerulares, promovendo colapso glomerular além da deposição de material proteináceo no lúmen dos túbulos e a presença de eritrócitos no espaço de Bowman, evidenciando a injúria renal. Dados de microscopia eletrônica de transmissão revelaram alterações incluindo desordens da membrana basal, citotoxicidade de células endoteliais e epitélio glomerular.

A presença de uma banda na região de 30kDa em extratos renais de camundongos tratados com veneno bruto, através do ensaio de immunoblotting utilizando anticorpos que reconhecem as toxinas do veneno, denota a atividade tóxica renal produzida pelo envenenamento por *L. intermedia*.

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

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

1.5 Características dos Venenos *Loxoscélicos*

Os venenos de aranhas subdividem-se de acordo com sua composição, podendo apresentar moléculas de baixa massa molecular (inferiores a 1000 Da), de alta massa molecular (superior a 100.000 Da) e toxinas polipeptídicas (de 3.000 a 40.000 Da). Íons, sais, aminoácidos livres e neurotransmissores são alguns constituintes orgânicos que compõem estes venenos (ESCOUBAS *et al.*, 2000).

O veneno de *Loxosceles* é composto basicamente por enzimas e moléculas biologicamente ativas produzidas por glândulas situadas no cefalotórax da aranha. Em relação aos constituintes protéicos do veneno predominam proteínas de baixa massa molecular entre 5 e 40 kDa. Moléculas biologicamente ativas como sais inorgânicos, aminoácidos livres, ácidos nucleicos, monoaminas e poliaminas neurotóxicas também estão presentes (DA SILVEIRA *et al.*, 2002; DA SILVA *et al.*, 2004).

Estudos de identificação e caracterização das toxinas presentes no veneno de *Loxosceles* revelaram a presença de toxinas dermonecróticas (fosfolipases-D) metaloproteases do tipo astacinas (LALP), hialuronidase, serino-proteases, além de lipases, fosfatase alcalina e 5'-fosfohidrolase ribonucleotídica (FUTRELL, 1992; FEITOSA *et al.*, 1998; VEIGA *et al.*, 2000a; DA SILVA *et al.*, 2004; Da SILVEIRA *et al.*, 2007; SENFF-RIBEIRO *et al.*, 2008).

Análises em SDS-PAGE dos venenos de diferentes espécies como *L. gaucho*, *L. intermedia* e *L. laeta* revelaram similaridade em sua composição, com a presença de bandas nas regiões entre 30 e 35 kDa (BARBARO *et al.*, 1994a). As toxinas presentes no veneno destas três espécies podem ser separadas em três frações principais (A, B e C) sendo a atividade de dermonecrose restrita apenas à fração A (BARBARO *et al.*, 1996b). Em *L. gaucho* foi isolada uma fração de 30 kDa na qual foram identificadas duas isoformas denominadas Loxnecrogin A (31,4 kDa) e Loxnecrogin B (31,6 kDa) com atividade dermonecrótica, entretanto não tão intensa em relação a atividade produzida pelo veneno total.

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

Estudos anteriores caracterizavam a toxina dermonecrótica como uma esfingomielinase - D baseada na sua capacidade de hidrolisar a esfingomielina em colina e ceramida -1 -fosfato (KURPIEWSKI *et al.*, 1981). No entanto, com base nas análises bioquímicas dos fosfolipídios degradados, o termo esfingomielinase - D

foi substituído por fosfolipase -D para representar uma denominação mais exata e ampla, visto que a toxina não hidrolisa somente esfingofosfolipídios, mas também glicerofosfolipídios para gerar ceramida-1-fosfato (C1P) ou ácido lisofosfatídico (LPA) (LEE e LYNCH, 2005). Postula-se também, que por hidrólise dos fosfolipídios que geram ceramida -1-fosfato ou ácido lisofosfatídico, a toxina dermonecrótica ativaria moléculas sinalizadoras em diferentes células causando alterações fisiopatológicas, como resposta inflamatória, a agregação plaquetária, e o aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneos (ANLIKER *et al.*, 2004; MOOLENAAR *et al.*, 2004; LEE e LYNCH, 2005).

Metaloproteases de baixa massa molecular foram identificadas no veneno de *L. intermedia*, denominadas Loxolisina A (20-28k Da) e Loxolisina B (32-35 kDa). A atividade dessas metaloproteases está possivelmente relacionada a distúrbios hemostáticos decorrentes da atividade fibronectinolítica e fibrinogenolítica (Loxolisina A), e gelatinolítica (Loxolisina B), tais como hemorragia da derme, injúria de vasos sanguíneos, interferência na adesão plaquetária e também dificuldade na cicatrização das lesões cutâneas (FEITOSA *et al.*, 1998; VEIGA *et al.*, 2001a; VEIGA *et al.*, 2001b; DA SILVEIRA *et al.*, 2002; ZANETTI, *et al.*, 2002).

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

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

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

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

O componente amilóide P do soro pode estar envolvido com a ativação plaquetária, podendo ser responsável pelos efeitos de trombose vascular, isquemia tecidual e perda de pele no local da picada, conseqüentemente participando no efeito dermonecrótico provocado pelo veneno (GATES & REES, 1990). Os fenômenos de trombocitopenia, coagulação intravascular e o quadro hemorrágico são fenômenos dependentes de moléculas da matriz extracelular como a fibronectina plasmática e fibrinogênio devido a atividade proteolítica do veneno possivelmente atuar sobre esses substratos (DA SILVA *et al.*, 2004).

O sistema complemento no plasma também parece participar nas atividades nocivas do veneno, especialmente nos eritrócitos, causando uma hemólise dependente de complemento (FUTRELL, 1992). O efeito tóxico do veneno se deve à atividade em conjunto dos diferentes constituintes, ou seja, um efeito tóxico sinérgico (SENFF-RIBIERO *et al.*, 2008).

A clonagem e expressão de proteínas com o advento da tecnologia do DNA recombinante e as ferramentas de estudo proporcionadas pela Biologia Molecular, têm auxiliado na caracterização bioquímica dos venenos de *Loxosceles* de seus efeitos biológicos e no desenvolvimento de drogas farmacêuticas e modelos de obtenção de fármacos.

O primeiro relato da clonagem e expressão de uma toxina com atividade dermonecrótica e de hemólise dependente de complemento foi realizada por PEDROSA *et al.* (2002), obtida de uma biblioteca de cDNA da glândula de veneno de *L. laeta*. A proteína recombinante de *L. laeta* exibe propriedades biológicas similares ao veneno total

KALAPOTHAKIS *et al.* (2002) reportaram a clonagem e expressão de uma proteína presente no veneno de *L. intermedia*, a qual foi nomeada LiD1 (*L. intermedia* dermonecrotic toxin), obtida a partir da glândula de veneno, cuja sequência aminoacídica corresponde à família de proteínas com atividade dermonecrótica. A LiD1 foi reconhecida por anticorpos anti-toxina dermonecrótica e também foi capaz de gerar anticorpos contra proteínas dermonecróticas presentes no veneno de *L. intermedia*.

TAMBOURGI *et al.* (2004) clonaram e expressaram duas isoformas de toxinas dermonecróticas denominadas P1 e P2. Os resultados de caracterização bioquímica dessas toxinas e de sua atividade biológica foram semelhantes às do veneno total de *L. intermedia*.

Atividade inseticida foi encontrada em um grupo de toxinas (*Acylopolymine-like toxins*) presentes no veneno de *L. intermedia* e que são atribuídas à paralisia das presas, mediada pelo bloqueio da transmissão neuromuscular. Este grupo de toxinas foi avaliado contra *Spodoptera frugiperda* (Lepdoptera: Noctuidade), um inseto que ataca o milho. Três potenciais toxinas foram identificadas no veneno de *L. intermedia* denominadas LiTx X 1, LiTx X 2 e LiTx X 3, as quais foram clonadas para posteriores avaliações quanto a sua atividade inseticida (Castro *et al.*, 2004).

Chaim *et al.* (2006) clonou e expressou uma toxina dermonecrótica funcional chamada LiRecDT (*Loxosceles intermedia* Recombinant Dermonecrotic Toxin) a partir de uma biblioteca de cDNA de glândulas de veneno de aranhas *L. intermedia*. Esta proteína recombinante exibe propriedades dermonecrótica e Inflamatória semelhante ao veneno bruto e também causa citotoxicidade celular “*in vitro*” e a nefrotoxicidade em camundongos. Ademais, foram clonadas e expressas através da mesma biblioteca outras duas toxinas dermonecróticas, LiRecDT2 e LiRecDT3, com reatividade imunológica cruzada, induzem dermonecrose, resposta inflamatória, agregação plaquetária e aumento da permeabilidade vascular (da Silveira *et al.*, 2006). Mais recentemente, foram relatadas a clonagem, a expressão heteróloga e a funcionalidade das toxinas dermonecróticas LiRecDT4 e LiRecDT5 por da Silveira *et al.*, 2007a. Assim como, a toxina LiRecDT6, a qual também provoca uma maciça resposta inflamatória na derme, aumento da permeabilidade

vascular, edema, letalidade em camundongos e agregação plaquetária por Appel et al., 2008. Ainda a partir da mencionada biblioteca, foi realizada a identificação, clonagem, expressão, purificação e caracterização funcional de uma metaloprotease caracterizada como uma astacina (da Silveira et al., 2007c).

Estudos de identificação, caracterização bioquímica e do efeito biológico das toxinas presentes no veneno de *L. intermedia* têm sido intensamente realizados. Entretanto a atividade biológica destas e de outras toxinas ainda não descritas com possível aplicação farmacológica, necessitam ser identificadas e avaliadas bioquimicamente. O presente trabalho tem como intuito contribuir para o entendimento dos mecanismos biológicos da ação do veneno de *Loxosceles*, na caracterização dos domínios funcionalmente importantes dessas proteínas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliação da atividade nefrotóxica da toxina dermonecrótica (fosfolipase-D) do veneno da aranha marrom *L. intermedia*.

2.2 Objetivos específicos

1. Realizar análises histopatológicas por microscopia de luz, microscopia eletrônica de varredura e colorações citoquímicas diversas das alterações renais induzidas pela toxina dermonecrótica recombinante LiRecDT1 selvagem e LiRecDT1 toxina dermonecrótica mutada (H12-A).
2. Determinar parâmetros laboratoriais como hemograma, uréia, pesquisa de hematúria e hemoglobínúria dos camundongos expostos às toxinas recombinantes LiRecDT1 selvagem e LiRecDT1 mutada.
3. Realizar ensaios de citotoxicidade com as toxinas recombinantes LiRecDT1 selvagem e LiRecDT1 mutada sobre linhagem de célula renal estabelecidas em cultura (MDCK).
4. Determinar parâmetros moleculares que tragam subsídios para a compreensão da atividade nefrotóxica do veneno da aranha marrom, com ênfase na análise da atividade esfingomielinásica da toxina dermonecrótica.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

3.1.1 Reagentes

Os sais utilizados e o corante Vermelho Neutro foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha). O meio de cultura F12 e soro fetal bovino foram adquiridos da Cultilab (Campinas, Brasil) e D-MEM da Gibco BRL (Bethesda, EUA). Anestésico Ketamine – Agribands (Paulínia, Brasil) e Acepromazina – Univet (São Paulo, Brasil). A Albumina de Soro Bovino (BSA), o anticorpo secundário policlonal anti-IgG de coelho, além dos marcadores de massa molecular para SDS-PAGE e o corante Azul de Coomassie foram adquiridos da Sigma (St. Louis, MO, USA) a outros reagentes que se fizeram necessário, foram obtidos de fornecedores confiáveis como Gibco, Amersham, Merck, Bio-Rad Laboratories, entre outros.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Animais

Foram utilizados neste estudo camundongos suíços adultos, pesando aproximadamente 25-30g, provenientes do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR. Os experimentos envolvendo animais foram previamente analisados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) - Projeto de pesquisa Biodiversidade, toxinas e aplicações biotecnológicas, sob coordenação do professor Silvio Sanches Veiga (Certificado nº247) – e está de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

3.2.2 Extração de RNA total a partir de glândula produtora de veneno

O RNA total foi extraído de aproximadamente 200 glândulas produtoras de veneno de *L. intermedia* com o auxílio do reagente TRIZOL. Após a precipitação com isopropanol e lavagem com etanol 75%, o RNA foi redissolvido com água DEPC - tratada e quantificado por espectrometria a 260 nm (CHAIM *et al.*, 2006 ; da SILVEIRA *et al.*, 2006 e 2007

3.2.3 Cepas de *Escherichia coli* e vetores de expressão

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

3.2.4 Transformação de células competentes

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

3.2.5 Plaqueamento em ágar LB das bactérias transformadas

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

3.2.6 Expressão heteróloga das toxinas recombinantes LiRecDT1 e LiRecDT1MH12A em sistema procariótico

As colônias transformadas foram previamente expandidas em 10mL de meio líquido LB contendo ampicilina (100µg/mL) e cloranfenicol (34µg/mL) e posteriormente utilizadas para inocular volumes maiores de meio LB (1000mL). Estas culturas, em larga escala, foram mantidas a 37°C com aeração constante, até D.O.₅₅₀ = 0,5. A indução da expressão das toxinas foi realizada pela adição de IPTG 0.05mM e as culturas foram incubadas por um período de 3h½ à 30°C (CHAIM *et al.*, 2006, da SILVEIRA *et al.*, 2006 e 2007; RIBEIRO *et al.*, 2007).

3.2.7 Purificação das proteínas LiRecDT1 e LiRecDT1MH12A em resina Ni-NTA agarose

Após a indução da expressão das toxinas recombinantes, as células foram sedimentadas por centrifugação e rompidas por criofratura com o auxílio de 40mg de Lizosima adquirida da Sigma (St. Louis, MO, USA) em tampão de ligação (fosfato de sódio 20mM, pH 8,0; NaCl 500mM; imidazol 10mM), a quebra do DNA gênomico foi realizada mecanicamente. Após centrifugação adicional, o

sobrenadante foi aplicado em uma coluna de Ni-NTA agarose para a purificação das proteínas recombinantes contendo a cauda de histidina (His 6x TAG). A coluna foi lavada exaustivamente em tampão de lavagem (fosfato de sódio 20mM, pH 8,0; NaCl 500mM; imidazol 20mM) e eluída em tampão de eluição (fosfato de sódio 20mM, pH 8,0; NaCl 500mM; imidazol 250mM). As frações obtidas foram analisadas por SDS/PAGE 12,5%, reunidas e dialisadas contra PBS 1x. As toxinas recombinantes purificadas foram dosadas pelo método de Bradford, aliquotadas e mantidas a -80°C até o momento do uso (CHAIM *et al.*, 2006, da SILVEIRA *et al.*, 2006 e 2007; RIBEIRO *et al.*, 2007).

3.2.8 Análises histopatológicas do tecido renal (microscopia de luz)

Coletaram-se amostras de tecido renal de camundongos suíços do grupo controle e dos grupos tratados via intraperitoneal com 50µg (para cada 30g de peso corporal) de toxinas recombinantes LiRecDT1 selvagem e LiRecDT1M H12A (grupos de 5 animais) após 6 horas de exposição. No grupo controle, injetou-se PBS. As amostras reais foram seccionadas transversalmente e longitudinalmente e fixados por 16 horas em fixador ALFAC (85% de álcool a 80%) 10% de formol concentrado; 5% de ácido acético glacial.

O material foi submetido a processamento, como descrito por DRURY e WALLINGTON (1980) e emblocado em resina plástica Histosec[®]. Os blocos histológicos foram submetidos à microtomia, fornecendo cortes com 3 micras de espessura (DRURY *et al.*, 1980).

3.2.9 Coloração pelo método de Hematoxilina e Eosina

Após a desparafinização e hidratação, os cortes foram corados com Hematoxilina de Harris, por 50 segundos, lavados em água corrente por 10 minutos, 2 vezes em água destilada e corados com eosina, durante 1 minuto. Após

coloração, foram lavados com água destilada, desidratados em solução crescente de etanol (70-100%, durante 5 minutos cada etapa), diafanizados em xilol (2 etapas de 100%, durante 5 minutos cada) e montados com entellan (BEÇAK E PAULET, 1976).

3.2.10 Microscopia eletrônica de Transmissão

Coletaram-se amostras de tecido renal de camundongos suíços do grupo controle e dos grupos tratados via intraperitoneal com 50µg (para cada 30g de peso corporal) de toxinas recombinantes LiRecDT1 selvagem e LiRecDT1M H12A (grupos de 5 animais). No grupo controle, injetou-se PBS. O tecido renal foi fixado em solução de Karnovsky modificada (KARNOVSKY, 1965) por 2 horas. Depois da fixação, as peças foram passadas em tampão cacodilato 0,1M (pH 7,3), pós-fixadas em solução de OsO₄ 1% em solução de ácido cacodílico 0,1M (pH 7,3) por 1 hora, desidratadas em solução crescente de etanol (50 a 100%, durante 30 minutos cada etapa) óxido de propileno 100%, por 30 minutos e, finalmente, emblocadas em Epon 812 (Bio-Rad). Os cortes semi-finos e ultrafinos foram obtidos em ultramicrótomo LKB, sendo contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo e examinados em microscópio eletrônico JEOL-JEM 1200 EX II (DOS SANTOS *et al.*, 2000; LUCIANO *et al.*, 2004).

3.2.11 Dosagem de uréia sérica

Coletou-se o sangue de camundongos suíços do grupo controle e do grupo tratados via intraperitoneal com 1µg para cada grama de peso corporal das toxinas LiRecDT1 e LiRecDT1M H12A (6 animais de cada grupo), após 6 horas de exposição a toxina . A coleta foi realizada através de punção cardíaca (sem anticoagulante) após os animais serem anestesiados com Ketamina (Agrebands) e Acepromazina. As amostras foram encaminhadas para a dosagem de uréia. A

avaliação foi realizada pelo método cinético UV (ultravioleta) em autoanalisador Selectra 2 (Merck), utilizando Kit Wiener (Rosário, Argentina) (KAPLAN E PESCE, 1996; HENRY, 2001).

3.2.12 Pesquisa de hemoglobínúria e hematúria

Foi coletada urina com auxílio de uma micropipeta após leves massagens na região abdominal de camundongos suíços (6 animais cada grupo) que receberam por via intraperitoneal 1µg para cada grama de peso corporal de toxinas recombinantes LiRecDT1 e LiRecDT1 M H12A. Como controle negativo do experimento foi inoculado PBS. Usou-se tira reativa Uriscan[®] (GEN 11 YD diagnosties, Seoul, Korea) (KAPLAN E PESCE, 1996; HENRY, 2001).

3.2.13 Pesquisa de Proteinúria

Os animais (5 camundongos suíços para cada grupo) receberam por via intraperitoneal 10µg, 50µg e 100µg (para cada 30g de peso corporal) de toxinas recombinantes LiRecDT1 e LiRecDT1MH12A. Como controle negativo do experimento foi inoculado PBS. Coletou-se a urina dos animais do grupo controle e do grupo tratado no intervalo de duas em duas horas pelo período de 6 horas. Durante esse período a urina foi armazenada individualmente em eppendorfs mantidos a 4°C. A dosagem da concentração de proteínas na urina dos camundongos foi realizada através do método de Azul de Coomassie como descrito por BRADFORD (1976). A leitura da absorbância foi feita em comprimento de onda de 610nm em leitor de ELISA (Bio-Rad, Madison, EUA).

A fim de se obter um perfil protéico da urina dos camundongos tratados com as toxinas recombinantes dermonecróticas LiRecDT1 e LiRecDT1 M H12, foram realizadas eletroforeses em géis de poliacrilamida (SDS-PAGE) com concentração

de 12,5% em condições redutoras como descrito (LAEMMLI et al., 1970). Para o processamento das amostras foram utilizadas 10µl urinas de cada animal.

3.2.14 Coloração de géis de poliacrilamida

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

3.2.15 Ensaio de mortalidade em camundongos induzida pelas toxinas recombinantes LiRecDT1 e LiRecDT1M H12A.

Para demonstrar a atividade das toxinas no efeito de mortalidade, camundongos suíços (grupo de 5 animais) receberam por via intraperitoneal 10µg, 50µg e 100µg (para cada 30g de peso corporal) de toxinas recombinantes LiRecDT1 e LiRecDT1MH12A. Como controle negativo do experimento foi inoculado PBS. A mortalidade dos camundongos foi avaliada nos períodos de 8, 16, 24 e 48 horas.

3.2.16Imunofluorescência tecido renal

Coletaram-se amostras de tecido renal de camundongos suíços do grupo controle e dos grupos tratados com 50µg (para cada 30g de peso corporal) de toxinas recombinantes LiRecDT1 selvagem e LiRecDT1MH12A (grupos de 5 animais), as quais foram fixadas em paraformaldeído 2% em PBS por 30 minutos à 4°C. Posteriormente, emblocou-se o material em Tissue Freezing Medium™

(Electron Microscopy Sciences, Washington, PA, USA). Os cortes foram realizados e os radicais aldeídicos foram bloqueados com glicina 0,1M por 3 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas 5 vezes com PBS. Para bloquear os sítios específicos intracelulares, utilizou-se PBS/BSA 1% durante 1 hora em temperatura ambiente. Após, incubou-se por 1 hora com anticorpo anti-IgG hiper imune de coelho contra a toxina dermonecrótica LiRecDT1 (2µg/ml) (produzido pelo laboratório de Matriz Extracelular e Biotecnologia de Venenos – UFPR) Os cortes foram lavados 3 vezes com PBS e bloqueadas com PBS contendo 1% de BSA por 30 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, incubaram-se as lâminas com anticorpo secundário conjugado com Texas Red centrifugados previamente por 10 minutos à 5000RPM, 4°C, por um período de 40 minutos. Para a marcação do núcleo as amostras de tecido renal foram incubadas com DAPI (0.5 µg/ mL diluída em PBS) por 5 minutos. Após a incubação no escuro, as lâminas foram lavadas 10 vezes com PBS e mergulhadas rapidamente em água destilada e montaram-se as lâminas com Fluormont-G (meio de montagem aquoso).

Para controle empregaram-se as seguintes variáveis:

1. Para o ensaio de competição preparou-se uma solução de 2µg/ml de anticorpo anti-IgG hiper imune de coelho com 50µg/ml toxina dermonecrótica LiRecDT1 ou LiRecDT1MH12A diluída em PBS e deixou-se 1 hora em homogeneização para ocorrer a reação. A mistura foi incubada com os cortes de acordo com os procedimentos descritos acima
2. Para determinar o controle do imunomarcador, omitiu-se o anticorpo primário respeitando-se as demais passagens em PBS.

As lâminas foram observadas em microscópio Nikon Eclipse 800 com equipamento confocal de captura de imagem Radiance 2100 (Bio-Rad).

3.2.17 Reações de Immunoblotting

As membranas de nitrocelulose contendo o material para a análise foram previamente bloqueadas utilizando tampão PBS/Molico (low fat milk) 5% (p/v), pelo período de uma hora e incubadas por duas horas à temperatura ambiente sob agitação constante com anticorpo policlonal (10µg/mL – IgG α-LiRecDT1) diluído em PBS/Molico 5%. Em seguida foram feitas 10 lavagens com tampão PBS/Molico e posteriormente adicionado anticorpo secundário por 1 hora (1:1000 – anti-IgG de coelho), conjugado à fosfatase alcalina e a reação revelada utilizando os cromógenos BCIP/NBT, conforme descrito por HARLOW &LANE (1988).

3.2.18 Metodologia da análise de morfologia celular por microscopia óptica.

Para o presente estudo foi utilizada a linha celular MDCK (Madin Darby canine epithelial cells – ATCC nº CCL-34). As células estavam mantidas em nitrogênio líquido com um baixo número de passagens. Depois de descongeladas, as células foram cultivadas em meio de cultivo DMEM-F12 contendo penicilina (10,000IU/ml) e suplementado com 10% de soro fetal bovino. As células foram mantidas em estufas à 37°C (Forma Scientific), em atmosfera contendo 5% de CO₂, com umidade controlada. As células foram soltas através de um tratamento com uma solução de ácido de etilenodiaminotetraacético (EDTA) PBS a 2mM e 0.05% de tripsina por poucos minutos. Logo após as células foram resuspensas em um volume adequado de meio de cultivo suplementado com soro fetal bovino, e cultivadas em placas com 24 poços pelo período de 24 h. As células foram avaliadas na ausência e na presença da LiRecDT1 selvagem (10, 50 e 100µg/mL) e da LiRecDT1M H12A (10, 50 e 100µg/mL). Durante o experimento as placas foram fotografadas em 8 e 24 h usando um microscópio invertido (Leica-DMIL, Wetzlar, Germany), e as mudanças na morfologia das células foram avaliadas (CHAIM *et al.*, 2006).

3.2.19 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As células foram cultivadas em placas de 24 poços sobre lamínulas esterilizadas (13mm de diâmetro) pelo período de 48 horas em meio de cultivo DMEM-F12 suplementado com SFB. O meio de cultivo com SFB foi removido e em seguida foi adicionado meio contendo as toxinas recombinantes diluídas nas concentrações de 10µg/mL. Os poços referentes ao controle foram mantidos nas mesmas condições que os poços submetidos ao tratamento havendo substituição das toxinas recombinantes por PBS (pH 7,2). Após os períodos de 8 e 24 horas de tratamento, o meio de cultivo foi removido e as células lavadas em tampão cacodilato 0,1M, pH 7,4 e fixadas por 60 minutos em glutaraldeído 2,5% acrescido de tampão cacodilato. Depois foram novamente lavadas em tampão cacodilato, post-fixadas e contrastadas durante 1h com tetróxido de ósmio (O_3O_4) 1%. Posteriormente desidratadas em concentrações crescentes de etanol a fim de que fosse realizado o ponto crítico em CO_2 e metalização em ouro. Em seguida aos procedimentos realizados anteriormente as células foram observadas com Microscópio de Varredura JEOL J.S.M -6360 L.V. (Mariland, EUA) (PALUDO et al., 2006).

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

As células da linhagem MDCK, na concentração de 5×10^3 , foram cultivadas em placas de 96 poços pelo período de 24 horas em meio de cultivo DMEM-F12 suplementado com SFB para formação da monocamada celular. O meio de cultivo foi removido e em seguida foi adicionado meio contendo as toxinas recombinantes diluídas nas concentrações de 10, 50 e 100 µg/mL em hexaplicata. Os poços referentes ao controle foram mantidos nas mesmas condições que os poços submetidos ao tratamento havendo substituição das toxinas recombinantes por PBS (pH7, 2).

Após os períodos de 24 e 48 horas de tratamento, o meio de cultivo foi removido e os poços lavados com PBS. Adicionou-se às células a solução do corante Vermelho Neutro (50 µg/mL) diluída em meio de cultivo suplementado com 10% de SFB. Após 3h de incubação à 37°C o corante foi removido e as células lavadas 2 vezes com solução de formol-cálcio (200 µL) e o corante eluído das células com ácido acético-etanol por 15 min. Em seguida a leitura da absorbância foi realizada em comprimento de onda de 540nm em leitor ELISA (Bio-Rad, Madison, EUA). (FRESHENEY, 1994; PETRICK et al. 2000).

3.2.21 Imunofluorescência células MDCK

As células foram cultivadas em placas de 24 poços sobre lamínulas esterilizadas (13 mm de diâmetro) pelo período de 48 horas em meio de cultivo DMEM-F12 suplementado com SFB. O meio de cultivo com SFB foi removido e em seguida foi adicionado meio contendo as toxinas recombinantes diluídas na concentração de 10 µg/mL. Os poços referentes ao controle foram mantidos nas mesmas condições que os poços submetidos ao tratamento havendo substituição das toxinas recombinantes por PBS (pH7, 2). Após os períodos de 8 horas a 37°C em estufa (SANYO, modelo MCO-1SAC) contendo 5% de CO₂, o meio de cultivo foi removido e as células lavadas 5 vezes com PBS e fixadas com paraformaldeído 2% em PBS por 30 minutos à 4°C. As lamínulas com as células foram incubadas com glicina 0,1M por 3 minutos, lavadas com PBS e bloqueadas com PBS contendo 1% de BSA por 30 minutos a temperatura ambiente (25°C). As células foram incubadas com anticorpo primário anti-IgG hiper imune de coelho contra a toxina dermonecrótica LiRecDT1 (2µg/ml em PBS -1% BSA) (produzido pelo laboratório de Matriz Extracelular e Biotecnologia de Venenos – UFPR) por 1 hora em temperatura ambiente. Após lavar três vezes com PBS, as células foram incubadas com o anticorpo secundário conjugado com Texas Red centrifugado previamente por 10 minutos à 5000RPM, 4°C, por um período de 40 minutos. Para a marcação do núcleo as lamínulas contendo as células foram incubadas com DAPI

(0.5 µg/ mL diluída em PBS) por 5 minutos. Após a incubação no escuro, as lâminas foram lavadas 10 vezes com PBS e mergulhadas rapidamente em água destilada e montou-se as lâminas com Fluormont-G (meio de montagem aquoso).

Para controle empregaram-se as seguintes variáveis:

1. Para o ensaio de competição preparou-se uma solução de 2µg/ml de anticorpo anti-IgG hiper imune de coelho com 10µg/ml toxina dermonecrótica LiRecDT1 ou LiRecDT1MH12A diluída em PBS e deixou-se 1 hora em homogeneização para ocorrer a reação. A mistura foi incubada com as lamínulas contendo as células identicamente como descritas acima.
2. Para determinar o controle do imunomarcador, omitiu-se o anticorpo primário respeitando-se as demais passagens em PBS.

Observaram-se as lâminas em microscópio Nikon Eclipse 800 com equipamento confocal de captura de imagem Radiance 2100 (Bio-Rad).

3.2.22 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando análise de variância (ANOVA) sendo as médias comparadas utilizando o teste Tukey, através do software GraphPad InStat (versão 3.0 / Windows 2000). Os valores \pm erro padrão da média (EPM) foram utilizados (*P \leq 0.05, **P \leq 0.01, ***P \leq 0.001).

4. RESULTADOS

4.1 Análises histopatológicas das atividades das toxinas dermonecróticas recombinantes LiRecDT1 selvagem e da LiRecDT1M H12A sobre o tecido renal.

A fim de obter informações sobre uma correlação direta da atividade catalítica das toxinas fosfolipase-D do veneno da aranha marrom e danos renais, camundongos foram expostos através de injeções intraperitoneal à toxina dermonecrótica recombinante LiRecDT1 selvagem e a toxina LiRecDT1MH12A pelo período de 6h. Análises por microscopia de luz de biópsias renais coletadas a partir de animais que receberam a toxina dermonecrótica recombinante LiRecDT1 selvagem (conforme ilustrado na fig. 4B) revelaram alterações incluindo edema glomerular difuso, glóbulos vermelhos e colapso do espaço de Bowman, hialinização difusa com material protéico dentro do lúmen dos túbulos proximal e distal, e edema difuso das células epiteliais do túbulo proximal e distal comparado ao controle (fig. 4A). As análises de materiais a partir de animais que receberam toxina dermonecrótica recombinante LiRecDT1MH12A, não mostraram sinais evidentes de alterações (fig.4C).

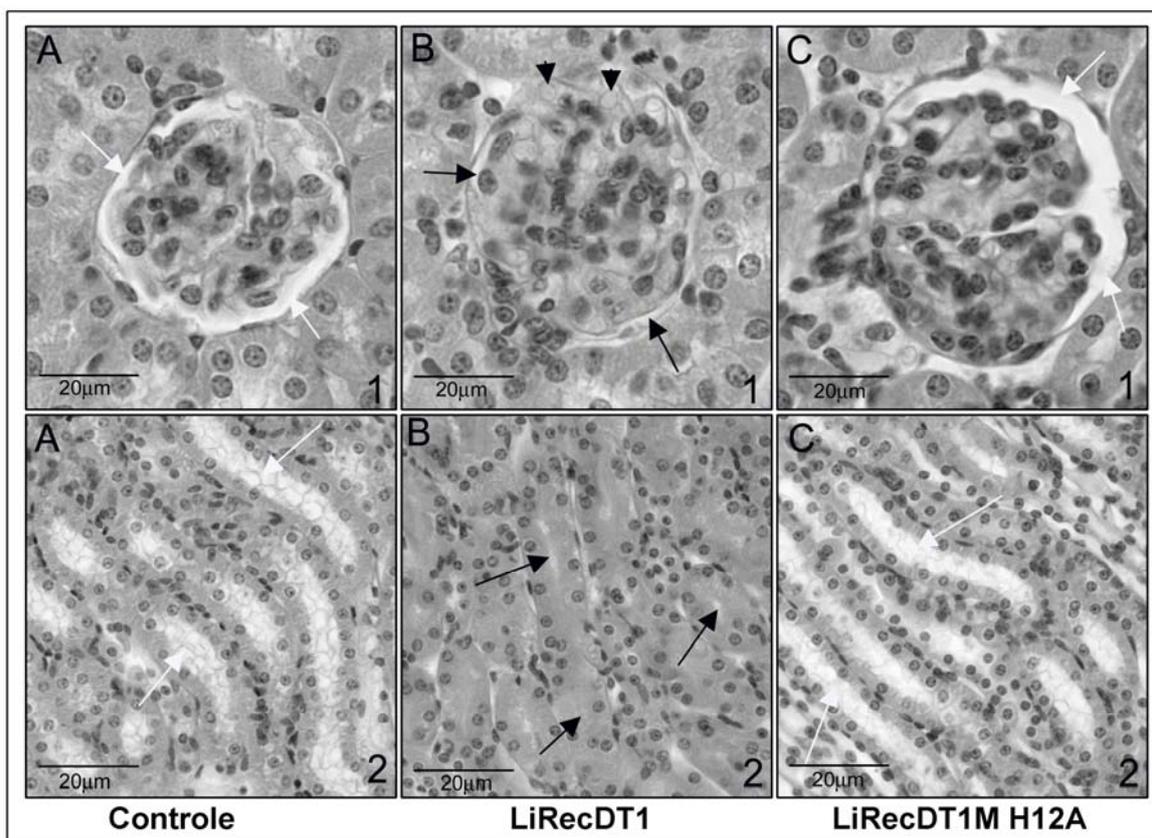


Figura 4. Análises histopatológicas de biópsias de rim de camundongos após tratamento com toxina dermonecrotica recombinante LiRecDT1 selvagem e LiRecDT1MH12A. Análise por microscopia de luz. Hematoxilina-Eosina. (A1) Glomérulo, setas demonstram espaço de Bowman e (A2) túbulos de animais controle (ausência de toxinas), setas demonstram o lúmen dos tubulos proximal e distal. (B1) Glomérulo apresentando edema, hemácias (cabeça setas) e colapso do espaço de Bowman (setas), (B2) estrutura tubular apresentando acúmulo de material protéico dentro do lúmen dos tubulos proximal e distal e edema (setas) nos rins de animais tratados com a toxina dermonecrotica recombinante LiRecDT1 selvagem. (C1) Glomérulo e (C2) túbulos de rins de camundongos expostos à toxina dermonecrotica recombinante LiRecDT1M H12A. Ausência de alterações patológicas semelhante aos animais controles. As análises foram realizadas em 6h após exposição as toxinas, na concentração de 50µg/mL.

4.2 Evidências ultraestruturais de injúria renal (microscopia eletrônica de transmissão)

Para melhorar a compreensão das conclusões histopatológicas descritas através de microscopia de luz que apontam nefrotoxicidade causada pela toxina dermonecrótica recombinante LiRecDT1 selvagem e não pela toxina dermonecrótica recombinante LiRecDT1MH12A, biopsias renais de camundongos tratados com as toxinas dermonecróticas recombinantes LiRecDT1 selvagem e LiRecDT1MH12A foram estudados por microscopia eletrônica de transmissão. Conforme ilustrado na figura 5 as biopsias renais coletados de camundongos expostos à toxina dermonecrótica recombinante LiRecDT1 selvagem mostraram evidências de dano glomerular caracterizada por evidente citotoxicidade sobre os podócitos e o endotélio fenestrado. Injúrias tubulares incluem deposição de material amorfo elétron-denso no lúmen dos túbulos, edema das células epiteliais com uma aparente diminuição do lúmen dos túbulos, um grande acúmulo de corpos multivesiculares bem como de estruturas elétron-densas no interior das células epiteliais, e destruição difusa das células do tecido conjuntivo peritubular. Em contrapartida não houve sinais evidentes de destruição celular em biopsias de animais que receberam toxina dermonecrótica recombinante LiRecDT1MH12A em comparação ao controle.

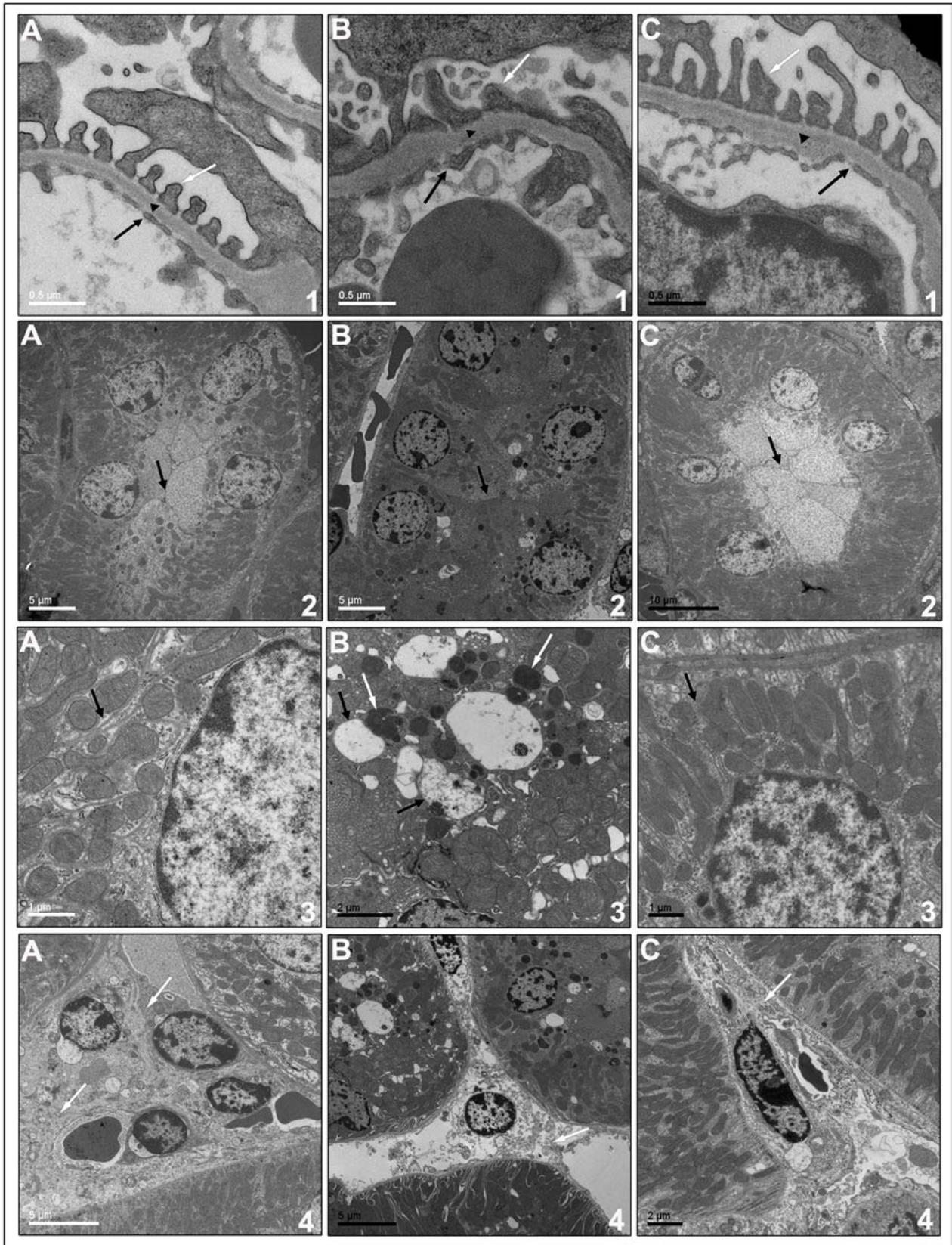


Figura 5. Análise Ultraestrutural de biópsias de rins de camundongos após tratamento com toxina dermonecrótica recombinante LiRecDT1 selvagem e LiRecDT1MH12A. Análise por microscopia eletrônica de transmissão. **(A)** Micrografia de biópsias de rins de camundongos controle. Detalhes da estrutura glomerular (1) mostrando podócitos (seta branca) e endotélio fenestrado preservados (seta preta), (2) estrutura tubular (seta retrata um lúmen de túbulo proximal preservado), (3) Detalhes do citoplasma das células epiteliais tubulares (seta aponta para a coleção de mitocôndrias), (4) um grupo de células do tecido conjuntivo peritubular (setas mostram o citoplasma das células preservado). **(B)** Micrografia de biópsias de rins de camundongos tratados com a toxina dermonecrótica recombinante LiRecDT1 selvagem. Detalhes da estrutura glomerular. (1) mostrando alterações nos podócitos (seta branca) e nas fenestras de células endoteliais (seta preta), (2) estrutura tubular (seta retrata oclusão do lúmen tubular e edema das células), (3) detalhes do citoplasma do epitélio tubular (setas brancas apontam para um aumento do número de corpos elétron-densos e setas pretas mostram acúmulo de estruturas multivesiculares), (4) uma célula danificada do tecido conjuntivo peritubular (seta aponta para o lise do citoplasma). **(C)** Micrografia de biópsias de rins de camundongos tratados com a toxina dermonecrótica recombinante LiRecDT1MH12A. Detalhes da estrutura glomerular (1) mostrando podócitos e (seta branca) e endotélio fenestrado preservados (seta preta), (2) estrutura tubular (seta retrata um lúmen de túbulo proximal preservado), (3) Detalhes do citoplasma das células epiteliais tubulares (seta aponta para a coleção de mitocôndrias), (4) um grupo de células do tecido conjuntivo peritubular (setas mostram o citoplasma das células preservado). As análises foram realizadas em 6h após exposição às toxinas, na concentração de 50µg/mL.

4.3 Investigação laboratorial após a administração da toxina dermonecrótica recombinante LiRecDT1 Selvagem e LiRecDT1M H12A

Com o objetivo de confirmar efeitos nocivos atribuídos à toxina dermonecrótica recombinante LiRecDT1 selvagem, determinamos parâmetros bioquímicos de urianálise e de uréia sérica de camundongos tratados com a toxina dermonecrótica recombinante LiRecDT1 selvagem e LiRecDT1MH12A. Conforme mostrado na tabela 1, a uréia sérica foi significativamente aumentada em camundongos tratados com a toxina dermonecrótica recombinante LiRecDT1 ($66.5 \pm 1,204$) selvagem em comparação aos camundongos do grupo controle (44.33 ± 2.140). Os camundongos tratados com a toxina dermonecrótica recombinante LiRecDT1MH12A (41.16 ± 1.1682) não apresentaram diferenças significativas em relação ao controle. Do mesmo modo, a hematúria foi evidenciada nos animais tratados com a toxina dermonecrótica recombinante LiRecDT1 selvagem em relação aos camundongos do grupo que recebeu a toxina dermonecrótica recombinante LiRecDT1MH12A. Estes dados juntamente com achados histopatológicos apóiam a idéia da catálise da fosfolipase-D na nefrotoxicidade após a exposição à toxina selvagem.

Animais	Hemoglobinuria ^b	Hematuria ^b	UréiaSérica(mg/dL) ^a
Controle			
1	-	-	34.0
2	-	-	44.0
3	-	-	46.0
4	-	-	47.0
5	-	-	47.0
6	-	-	48.0
*** LiRecDT1			
1	-	+	63.0
2	-	+	65.0
3	-	+	65.0
4	-	+	66.0
5	-	+	69.0
6	-	+	71.0
LiRecDT1M H12A			
1	-	-	35.0
2	-	-	39.0
3	-	-	40.0
4	-	-	43.0
5	-	-	43.0
6	-	-	47.0

Tabela 1. Investigação bioquímica laboratorial.

^a Uréia sérica significância definida como $p < 0.5$, t-teste

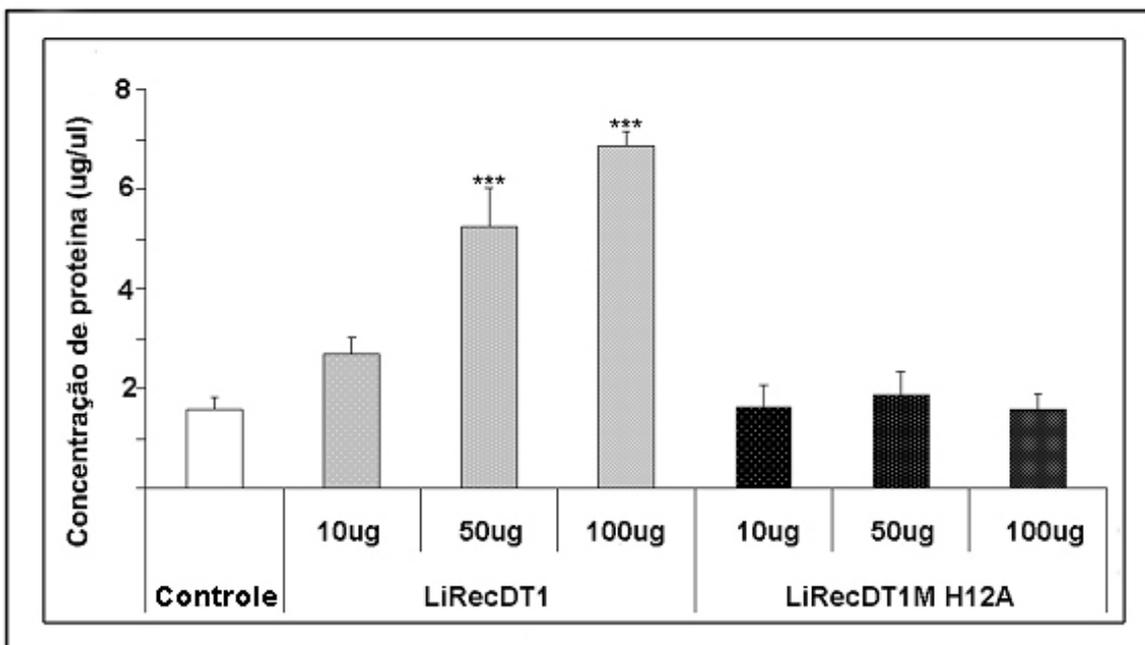
*** Diferenças significativas ($p < 0.001$)

^b (-) negativo; (+) positivo.

4.5 Pesquisa de proteinúria

Camundongos que receberam injeção intraperitoneal de toxinas dermonecróticas recombinante LiRecDT1selvagem e LiRecDT1MH12A tiveram sua urina recolhida para verificação da concentração de proteínas (proteinúria) pelo método de Bradford. A Figura 6A representa alteração da função renal pela presença de uma elevada concentração de proteínas em camundongos tratados com a toxina dermonecrótica recombinante LiRecDT1 selvagem. Para reforçar esta prova foram realizadas eletroforeses em géis de poliacrilamida (SDS - PAGE) com concentração de 12,5% de acrilamida em condições redutoras e corados com Azul de Coomassie com a urina dos camundongos tratados conforme mostrado na figura 6B, assim, fomos capazes de confirmar a alta concentração de proteínas na urina de camundongos tratados com a toxina dermonecrótica recombinante LiRecDT1 de forma concentração dependente e a ausência de proteinúria nos camundongos do grupo tratado com a toxina dermonecrótica recombinante LiRecDT1MH12A.

A



B

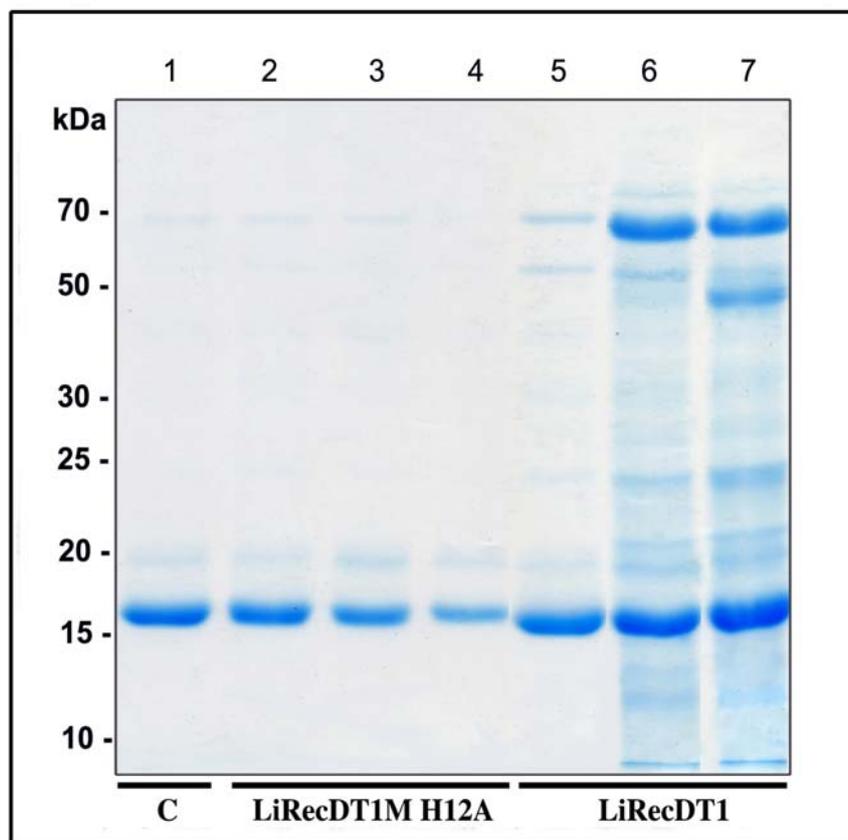


Figura 6. Pesquisa de proteinúria. (A) Camundongos (6 animais de cada grupo) receberam injeções intraperitoneais de toxinas dermonecróticas recombinantes LiRecDT1 selvagem e LiRecDT1MH12A e após 6h de tratamento a urina foi recolhida e realizada a determinação da concentração de proteínas segundo o método de Bradford (Azul brilhante de Coomassie). Valores indicados são a média \pm SEM. **(B)** Amostras de urinas coletadas (10 μ l) de camundongos controle que não receberam toxinas (linha 1), camundongos que receberam 10, 50 e 100 μ g de toxina dermonecrótica recombinante LiRecDT1M H12A (linha 2, 3 e 4 respectivamente) e camundongos que receberam 10, 50 e 100 μ g de toxina dermonecrótica recombinante LiRecDT1 selvagem (linha 5, 6 e 7 respectivamente), separadas eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12,5% em condições redutoras e corados com Azul de Coomassie.

4.5 Ensaio de letalidade em camundongos induzida pelas toxinas recombinantes LiRecDT1 e LiRecDT1MH12A.

O efeito de letalidade do veneno de *L.intermedia* é atribuído à sua fração dermonecrótica (FRUTELL, 1992; BARBARO et al., 1996; da Silva et al., 2004). Com o objetivo de demonstrar a participação da toxina dermonecrótica neste efeito e avaliar a funcionalidade da toxina recombinante LiRecDT1, camundongos suíços foram expostos às toxinas LiRecDT1 e LiRecDT1MH12 em concentrações de 10 µg, 50µg e 100 µg (para cada 30 g de peso corporal). A taxa de mortalidade foi determinada após o período de 8h, 16h, 24h e 48h de observação. A toxina LiRecDT1 induziu mortalidade com as doses de 50 µg e 100 µg a partir do período de 16 horas de tratamento. A inoculação da toxina LiRecDT1MH12, bem como a inoculação de PBS (controle negativo), não provocou mortalidade nos animais.

Letalidade (%)	Controle			LiRecDT1			LiRecDT1M H12A		
	10ug	50ug	100ug	10ug	50ug	100ug	10ug	50ug	100ug
8h	0/5 (0%)	0/5(0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)
16h	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	3/5 (60%)	4/5 (80%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)
24h	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	5/5 (100%)	5/5 (100%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)
48h	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	---	---	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)

Tabela 2. Efeito de mortalidade em camundongos expostos às toxinas dermonecróticas recombinantes LiRecDT1 Selvagem e LiRecDT1MH12A.

4.6 Análise do tecido renal por Imunofluorescência e da urina por Immunoblotting.

Com a finalidade de demonstrar uma interação direta da toxina dermonecrótica recombinante LiRecDT1 selvagem e LiRecDT1MH12 com as estruturas renais, investigamos biópsias renais de camundongos tratados com as toxinas dermonecróticas recombinantes LiRecDT1 selvagem e LiReDT1MH12A que foram examinadas por reações de imunofluorescência usando IgG hiperimune que reage com toxina recombinante LiRecDT1. Conforme mostrado na figura 7A, o anticorpo anti-IgG interagiu com a toxina recombinante LiRecDT1 selvagem e LiRecDT1MH12A. Os resultados mostram um perfil positivo com um padrão típico linearmente pontuado marcando a superfície celular de túbulos, bem como uma marcação positiva extremamente sutil na regial glomerular, e assim apoiando a ligação direta de ambas as toxinas independente do domínio catalítico.

Para comprovar a interação específica de ligação do anticorpo com as toxinas recombinantes, realizamos um ensaio de competição onde o anticorpo foi incubado previamente com as toxinas em solução. Esta solução foi testada em biópsias renais de camundongos expostos às toxinas recombinantes, tendo como resultado uma reação negativa (não ilustrada).

Além disso, amostras de urinas de animais tratados com as toxinas dermonecrótica recombinante LiRecDT1 selvagem e LiRecDT1MH12 foram processadas por eletroforese e em seguida realizado um Immunoblotting com o mesmo soro hiperimune. Conforme mostrado na figura 7B, fomos capazes de detectar um sinal positivo na região de 30kDa na urina de camundongos tratados com a toxina dermonecrótica recombinante LiRecDT1 selvagem, em comparação com a ausência de sinal do grupo tratado com a toxina dermonecrótica recombinante LiRecDT1MH12A, sugerindo que a toxina dermonecrótica LiRecDT1 bloqueia a reabsorção tubular de proteína e/ou metabolismo intracelular, em comparação com a toxina dermonecrótica recombinante LiRecDT1M H12A e, portanto é liberada na urina.

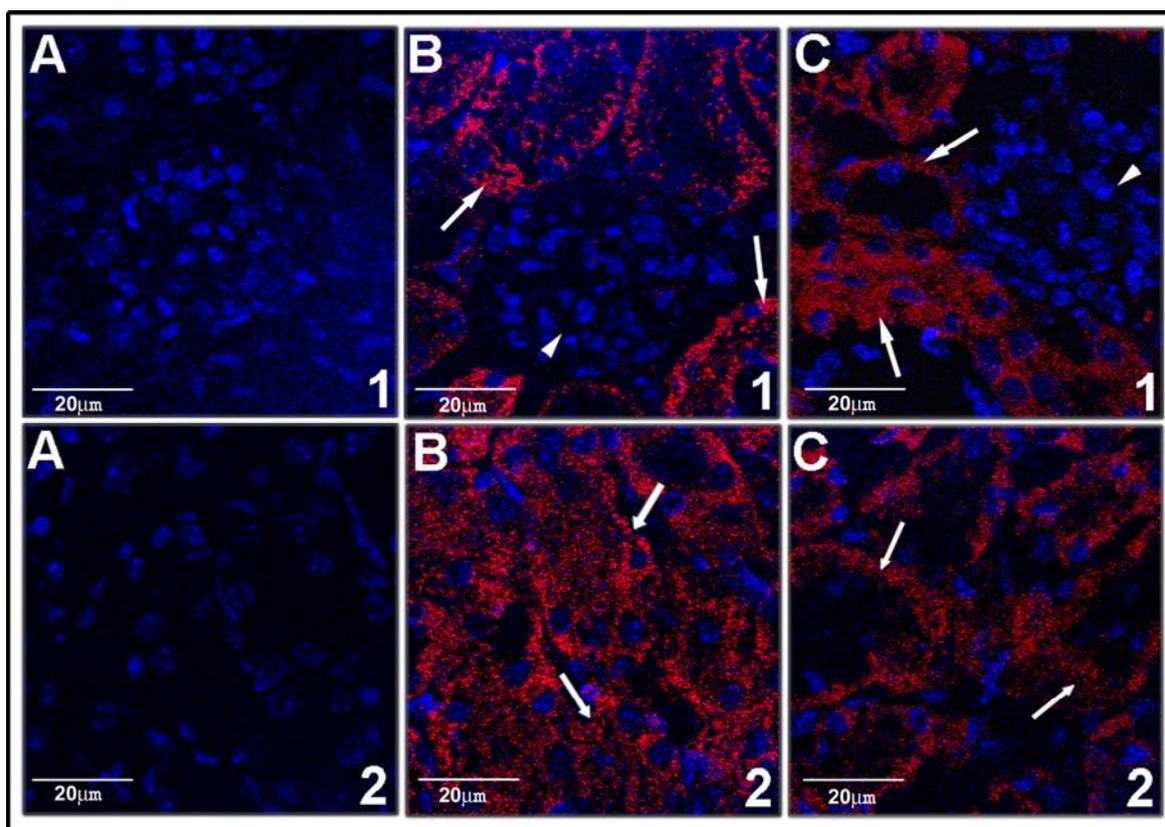


Figura 7A: Imunofluorescência de tecido renal. Análise por microscopia confocal. As biópsias renais foram incubadas com anticorpo específicos para toxina dermonecrótica recombinante LiRecDT1 selvagem, anticorpo secundário conjugado com Texas Red e para a marcação do núcleo foram incubadas com DAPI. **(A)** Secções de um rim do grupo controle, que não recebeu toxinas. Coloração dos núcleos com DAPI em regiões de glomérulo (1) e túbulos (2). **(B)** secções de rim de camundongos tratados com a toxina dermonecrótica recombinante LiRecDT1 selvagem, mostrando regiões ricas em glomérulos (1, cabeça de flecha) e túbulos (1, setas) e uma região rica em túbulos (2, setas). **(C)** Secções de biópsias de camundongos tratados com a toxina dermonecrótica recombinante LiRecDT1H12A. Região glomerular (1, cabeça de flecha), região tubular (1, setas) e região tubular (2, setas). Resultados apontam para a presença de “antígenos plantados” em estruturas tubulares renais expostas as duas toxinas. A positividade é aparentemente restrita a estruturas tubulares e mostra um perfil de fluorescência pontuado na superfície das células tubulares.

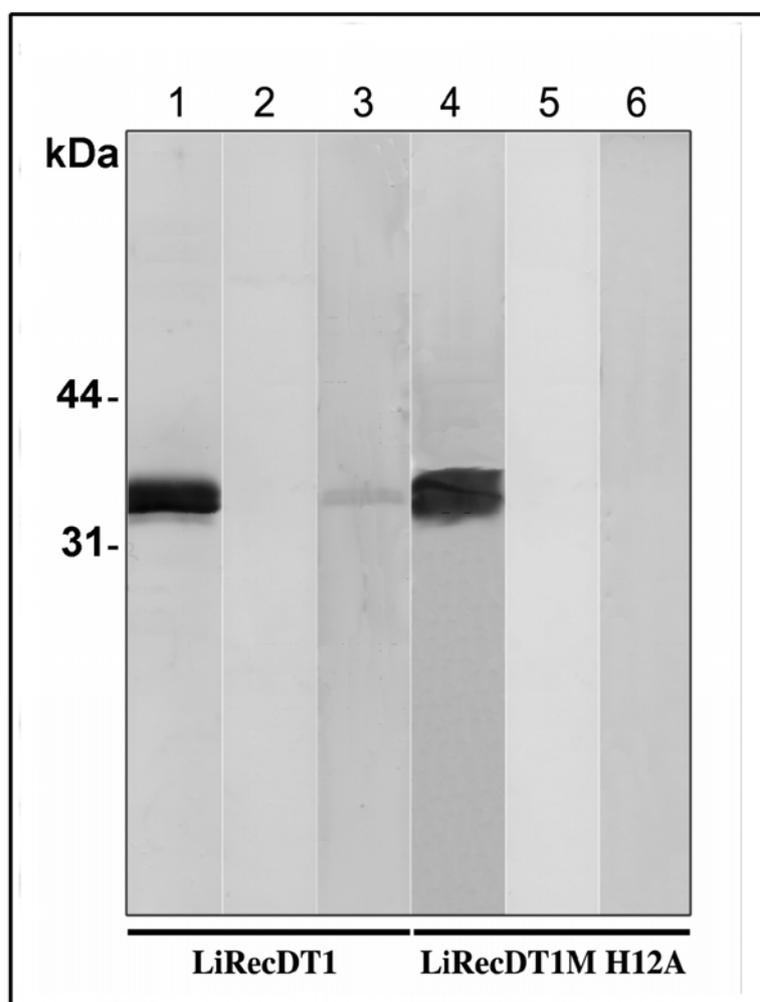


Figura 7B: Amostras de urina coletadas de camundongos tratados com as toxinas dermonecroticas LiRecDT1 e LiRecDT1 MH12A. Análise por Reações de Immunoblotting. (linha 1 e 4) mostram respectivamente as toxinas dermonecroticas recombinantes purificadas LiRecDT1 selvagem e LiRecDT1MH12A, como controle positivo. (linha 2 e 5) animais com ausência de tratamento, controle negativo. Linha 3, urina de animais tratados com a toxina dermonecrotica recombinante LiRecDT1 selvagem. Linha 6, urina de animais tratados com a toxina dermonecrotica recombinante LiRecDT1MH12A.

4.7 Efeitos das toxinas dermonecróticas recombinantes LiRecDT1 selvagem e da LiRecDT1MH12A sobre a morfologia e a viabilidade celular em linhagem MDCK.

Com o objetivo de verificar se as toxinas dermonecróticas recombinantes LiRecDT1 selvagem e LiRecDT1MH12A são capazes de causar danos morfológicos à linhagem celular MDCK, estas células foram tratadas com as toxinas recombinantes (10, 50 e 100µg/mL) por 8 e 24 horas e então observadas por microscopia óptica invertida. Conforme ilustrado na figura 8, a ação da toxina LiRecDT1 selvagem em diferentes concentrações induziu a formação de bolhas e vacuolização do citoplasma promovendo alteração celular, perda da adesão célula-célula e também em relação ao substrato, evidenciando a ação citotóxica concentração tempo-dependente. A toxina dermonecrótica recombinante LiRecDT1MH12A não causou qualquer tipo de mudança celular, mesmo na maior concentração de toxina utilizada.

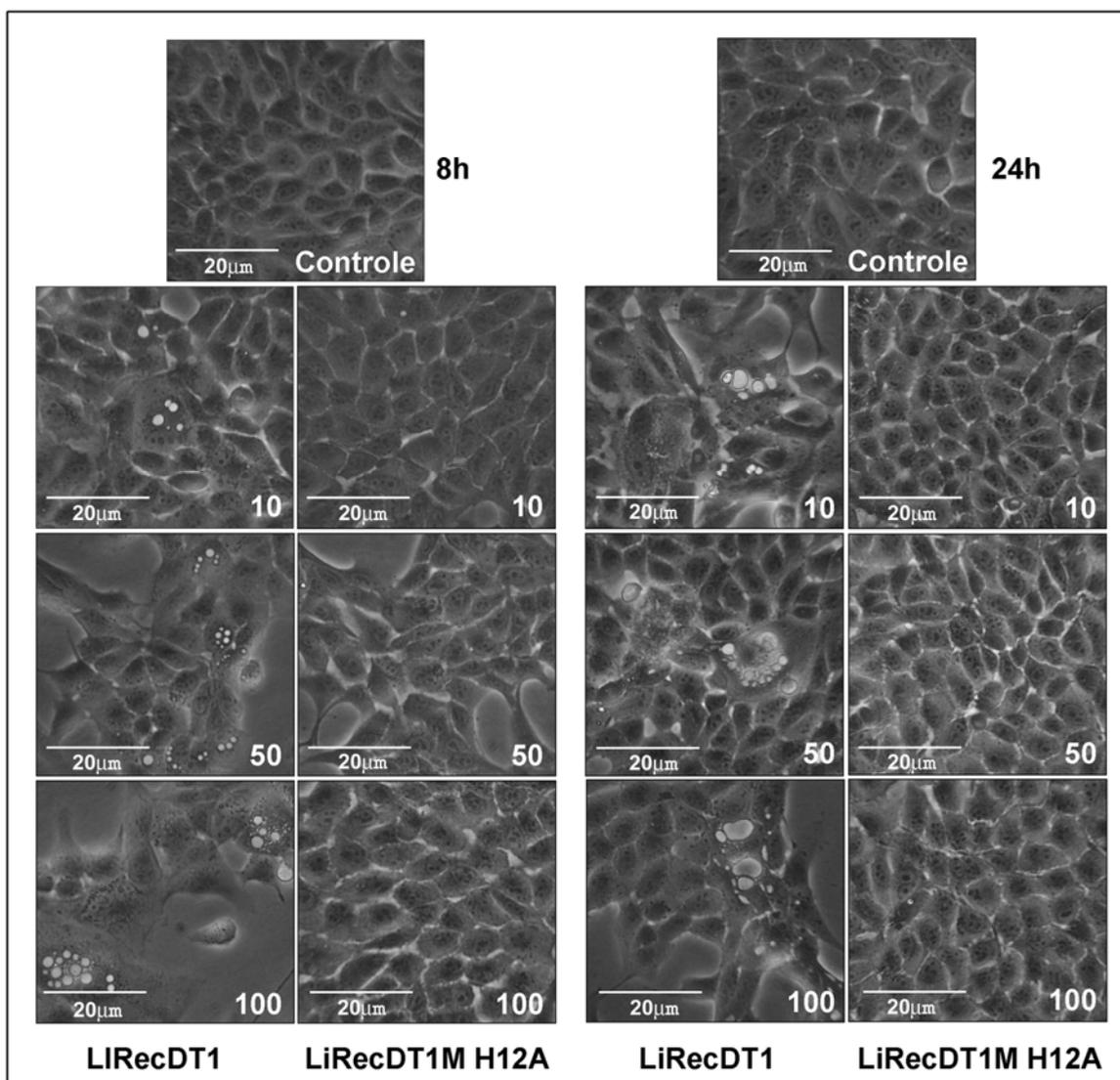


Figura 8: Alteração morfológica de células MDCK após tratamento com toxina dermonecrotica recombinante LiRecDT1 selvagem e LiRecDT1MH12A. Análise por microscopia invertida. A toxina dermonecrotica recombinante LiRecDT1 selvagem induziu vacuolização do citoplasma concentração tempo-dependente. Semelhantemente a alteração do espalhamento celular parece ser prejudicada, e a perda da adesão célula-célula e ao substrato foi observada. As análises foram realizadas em 8h e 24h após exposição às toxinas, nas concentrações de 10µg/mL, 50µg/mL e 100 µg/mL. Controle foi analisado na ausência de toxinas.

4.8 Efeitos das toxinas dermonecróticas recombinantes LiRecDT1 selvagem e da LiRecDT1MH12A sobre a viabilidade de células da linhagem MDCK.

Para comprovar os dados morfológicos que demonstram o efeito citotóxico direto em células renais MDCK provocados pela toxina LiRecDT1 selvagem, células MDCK foram incubadas com as toxinas dermonecróticas LiRecDT1 selvagem e LiRecDT1MH12A nas concentrações de 10µg/mL, 50µg/mL e 100µg/mL, e tiveram avaliadas as suas viabilidades no período de 24 horas e 48 horas após a incubação. Como demonstra a figura 9, o experimento de viabilidade celular indicou alterações significativas na viabilidade das células tratadas com a toxina LiRecDT1 selvagem em relação ao controle negativo. Em contrapartida não houve redução da viabilidade celular das células tratadas com a toxina LiRecDTMH12A.

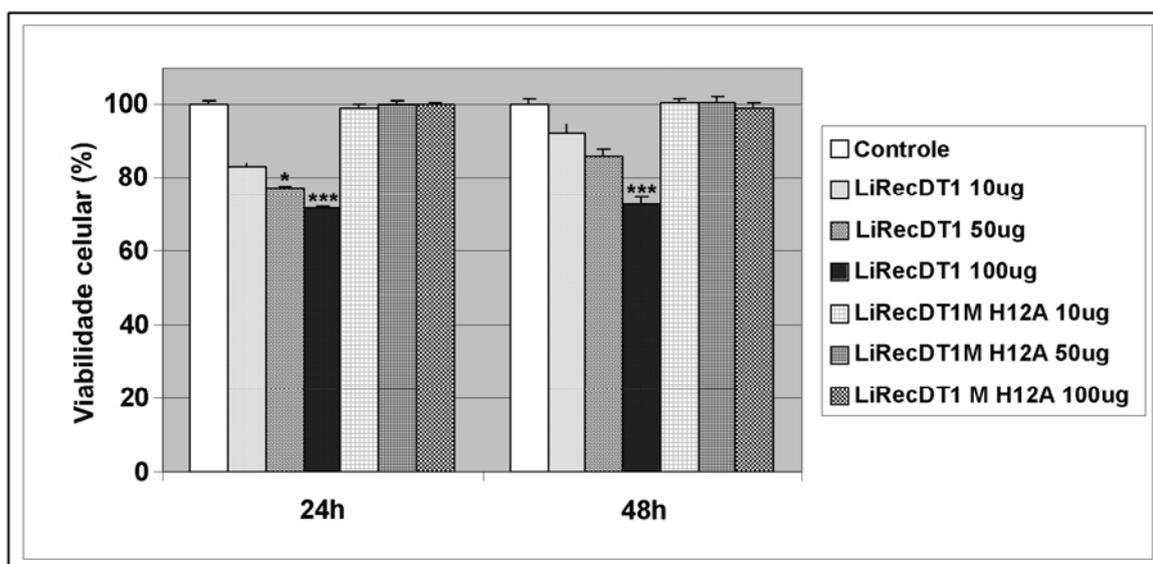


Figura 9: Ensaio de citotoxicidade pelo método do vermelho neutro. O efeito citotóxico das toxinas dermonecróticas LiRecDT1 selvagem e LiRecDT1MH12A foi determinado após 24h e 48h nas concentrações de 10µg/mL, 50µg/mL e 100µg/mL. O experimento foi realizado em hexaplicata e os valores dados pela média \pm SEM.

4.9 Mudanças morfológicas em células MDCK induzidas pela Toxina recombinante dermonecrótica LiRecDT1 selvagem e LiRecDT1MH12A analisadas através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

Análise por microscopia eletrônica de varredura (Figura 10) de células expostas à 10µg/mL de toxina dermonecrótica recombinante LiRecDT1 selvagem apontou alterações morfológicas, incluindo perda da adesão célula-célula e também em relação ao substrato, bem como formato celular arredondado com a retração do volume citoplasmático, redução da área do corpo celular e um arredondamento central. As células com ausência de tratamento (controle) e as tratadas com a toxina dermonecrótica recombinante LiRecDT1MH12A mostram a morfologia típica das células MDCK em cultura.

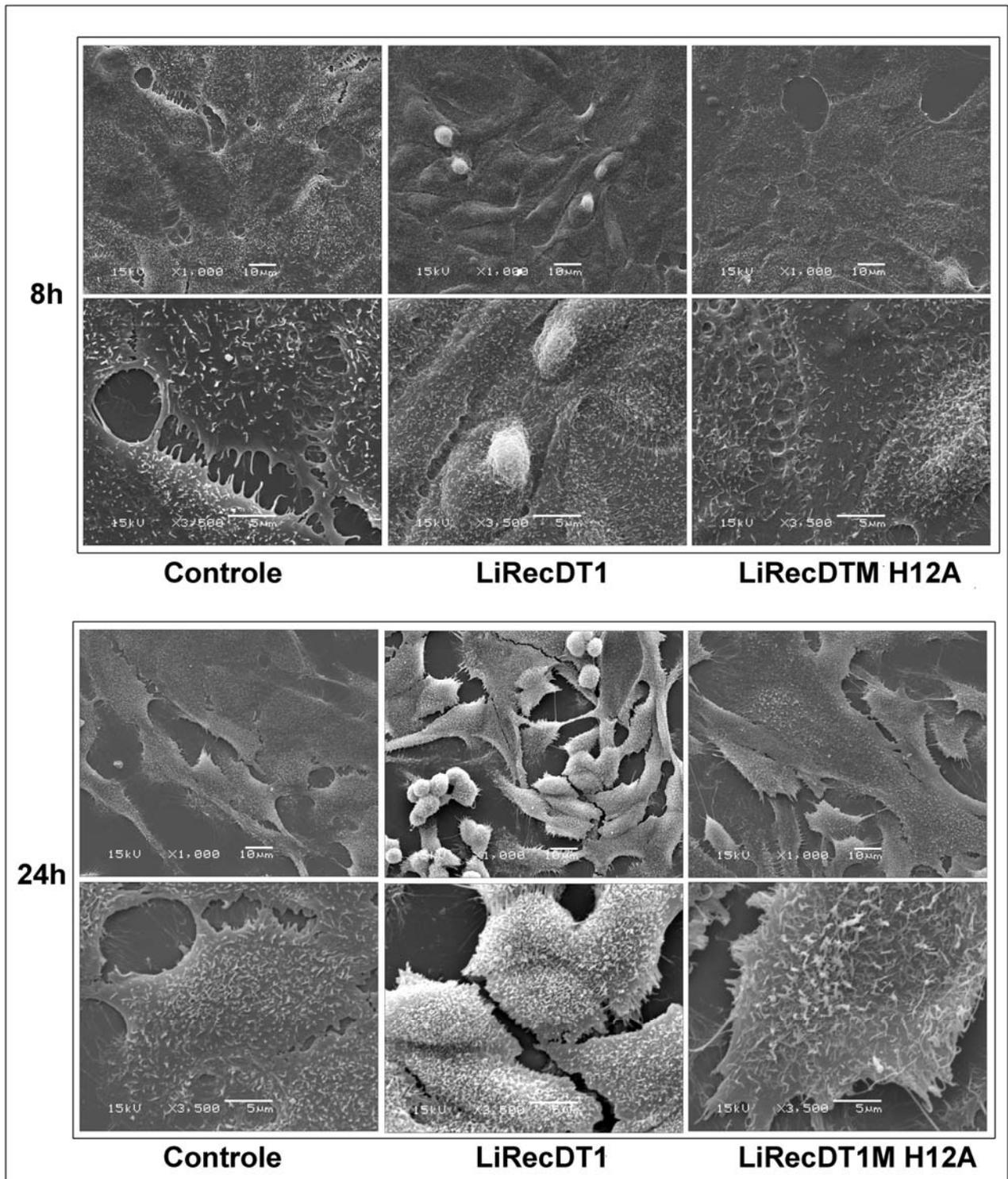


Figura 10: Alteração morfológica de células MDCK após tratamento com toxina dermonecrótica recombinante LiRecDT1 selvagem e LiRecDT1M H12A. Análise por microscopia eletrônica de varredura. As micrografias demonstram que a toxina dermonecrótica recombinante LiRecDT1 selvagem induziu a retração do citoplasma, arredondamento do corpo celular, perda da adesão célula-célula e ao substrato, comparado ao controle e as células expostas à toxina dermonecrótica recombinante LiRecDT1MH12A. As análises foram realizadas em 8h e 24h após exposição às toxinas, na concentração de 10µg/mL. Controle foi analisado na ausência de toxinas.

4.10 Imunofluorescência de células MDCK

Com o objetivo de confirmar a citotoxicidade direta da toxina dermonecrótica recombinante LiRecDT1 selvagem, as células renais estabelecidas em cultura (MDCK) tratadas com as toxinas dermonecróticas recombinantes LiRecDT1 selvagem e LiRecDT1MH12A foram examinadas por reações de imunofluorescência usando IgG hiperimune que reage com toxina recombinante LiRecDT1. A figura 11 ilustra reação negativa para células MDCK não tratadas. A figura 11B e 11C mostram que o anticorpo anti-IgG interagiu com as toxinas recombinantes LiRecDT1 selvagem e LiRecDT1 M H12A, respectivamente. Para comprovar a interação específica de ligação do anticorpo com as toxinas recombinantes, realizamos um ensaio de competição onde o anticorpo foi incubado previamente com as toxinas em solução. Esta solução foi testada em células MDCK expostas às toxinas recombinantes, tendo como resultado uma reação negativa (não ilustrada). Os resultados supõem a ligação direta das Toxinas (LiRecDT1 e LiRecDT1MH12A) nas células renais em cultura MDCK.

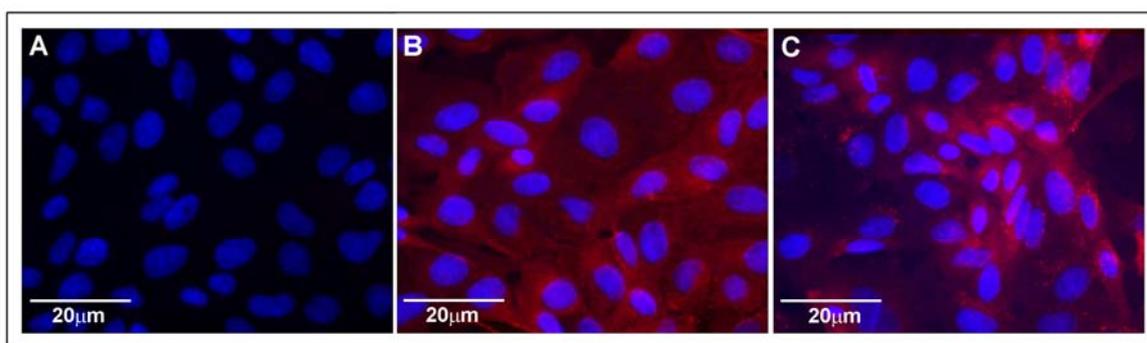


Figura 11: Imunofluorescência de células MDCK após tratamento com toxina dermonecrótica recombinante LiRecDT1 selvagem e LiRecDT1MH12A. Análise por microscopia confocal. As células foram incubadas com anticorpo específicos para toxina dermonecrótica recombinante LiRecDT1 selvagem, anticorpo secundário conjugado com Texas Red e para a marcação do núcleo as células MDCK foram incubadas com DAPI. (A) Células MDCK com ausência de tratamento (B) células MDCK tratadas com a toxina dermonecrótica recombinante LiRecDT1 e (C) Células MDCK tratadas com Toxina dermonecrótica LiREcDT1MH12A.

5. DISCUSSÃO

Loxoscelismo é a denominação utilizada para designar o quadro clínico desenvolvido no envenenamento induzido por acidentes com aranhas marrons. As características clínicas da picada da aranha marrom são associadas a lesões dermonecroticas, que também pode ser acompanhada por um envolvimento sistêmico incluindo fraqueza, vômitos, febre, convulsões, coagulação intravascular disseminada, hemólise intravascular e insuficiência renal. (FUTRELL, 1992; DA SILVA *et al.*, 2004; HOGAN *et al.*, 2004; SWANSON e VETTER, 2006). O quadro sistêmico é menos comum do que o quadro cutâneo, mas ela pode ser a causa de complicações que podem levar a morte após o envenenamento (FUTRELL, 1992; DA SILVA *et al.*, 2004).

Os efeitos nefrotóxicos do veneno de *Loxosceles* são demonstrados com base nas características clinica e laboratoriais observadas em algumas vítimas, que podem incluir elevação dos níveis de creatina quinase, hematúria, hemoglobinúria e proteinúria. (BEY *et al.*, 1997; FRANÇA *et al.*, 2002; LUNG AND MALLORY, 2000; WILLIAMS *et al.*, 1995). Além disso, dados obtidos através de experimentação animal, utilizando camundongos, comprovam os achados clínicos e apontam a atividade nefrotóxica das toxinas presentes no veneno de *L. intermedia* em nível de estruturas glomerulares e tubulares. Análises por microscopia de luz revelaram, em relação aos túbulos, hialinização dos túbulos distais e proximais, vacualização de células epiteliais dos túbulos e edema intersticial. Foi possível também a observação da ligação direta do veneno ao longo das estruturas tubulares e glomerulares, promovendo colapso glomerular além da deposição de material proteináceo no lúmen dos túbulos e a presença de eritrócitos no espaço de Bowman, evidenciando a injúria renal. Dados de microscopia eletrônica de transmissão revelaram alterações incluindo desordens da membrana basal, citotoxicidade de células endoteliais e epitélio glomerular (LUCIANO *et al.*, 2004).

Alterações hematológicas, como anemia hemolítica e coagulação intravascular disseminada, bem como nefrotoxicidade secundária a complicações de lesões dermatológicas têm sido postuladas como processos patológicos que

podem conduzir a insuficiência renal. (FUTRELL, 1992; WILLIAMS *et al.*, 1995; LUNG e MALLORY, 2000). Por outro lado, problemas renais podem ser consequência de vírus, produtos parasitários, bactérias e drogas que agem diretamente nas células renais (COTRAN *et al.*, 1999). A insuficiência renal aguda causada por agentes nefrotóxicos (medicamentos; peçonhas, venenos de origem animal como serpentes, escorpiões e aranhas; pigmentos como hemoglobina e a mioglobina) é caracterizada principalmente por necrose tubular aguda (ZATS, 2000; ANDRADE *et al.* 2004), embora possam aparecer outras alterações, às vezes um tanto sutis, como a condensação de cromatina nuclear, comprometimento de cristas mitocondriais e vacuolização citoplasmática, frequentemente visíveis apenas a microscopia eletrônica (ZATS, 2000). Além disso, achados histopatológicos após envenenamentos de camundongos (modelo animal que não desenvolve lesões dermonecróticas causada por veneno de *Loxosceles* (FUTRELL, 1992; DA SILVA *et al.*, 2004), juntamente com a ligação das toxinas do veneno em estruturas renais, a aparente ausência de hemoglobina e a deposição de material protéico no interior da cápsula de Bowman e dos túbulos renais após o envenenamento (LUCIANO *et al.* 2004), confirmam a atividade nefrotóxica das toxinas do veneno e a hipótese de “toxinas plantadas” intrinsecamente aos componentes da estrutura renal (COTRAN *et al.*, 1999).

A presença de uma proteína de 30KDa a partir do lisado renal de camundongos tratados com o veneno de aranha marrom foi o indicativo do envolvimento de toxinas dermonecróticas nas lesões renais (LUCIANO *et al.*, 2004). Esta hipótese foi apoiada por uma relação direta da nefrotoxicidade provocada pela toxina dermonecrótica (fosfolipase - D) (CHAIM *et al.*, 2006).

Estudos anteriores caracterizavam a toxina dermonecrótica como uma esfingomielinase - D baseada na sua capacidade de hidrolisar a esfingomielina em colina e ceramida -1 -fosfato (KURPIEWSKI *et al.*, 1981). No entanto, com base nas análises bioquímicas dos fosfolipídios degradados, o termo esfingomielinase - D foi substituído por fosfolipase -D para representar uma denominação mais exata e ampla, visto que a toxina não hidrolisa somente esfingofosfolipídios, mas também glicerofosfolipídios para gerar ceramida-1-fosfato (C1P) ou ácido lisofosfatídico

(LPA) (LEE e LYNCH, 2005). Postula-se também, que por hidrólise dos fosfolipídios que geram ceramida -1-fosfato ou ácido lisofosfatídico, a toxina dermonecrótica ativa moléculas sinalizadoras em diferentes células causando alterações fisiopatológicas, como resposta inflamatória, a agregação plaquetária, e o aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneos (ANLIKER *et al.*, 2004; MOOLENAAR *et al.*, 2004; LEE E LYNCH, 2005).

Andrade *et al.* (2006) através estudos de toxinas clonadas e expressas denominadas P1 e P2, com atividade fosfolipásica tipo D do veneno de *L. intermedia*, demonstraram que ao menos duas histidinas localizam-se (His₁₂ e Hist₄₇) próximas ao sítio catalítico previamente proposto (MURAKAMI *et al.*, 2005), e apresenta por avaliação em cinética de pH que as enzimas perdem sua atividade em valores similares aos de ionização dos resíduos de histidina. Os resultados sugerem que resíduos de histidina são essenciais para a atividade esfingomielinásica das toxinas P1 e P2. A importância da função catalítica dos resíduos de histidina são também recentemente mostrados por Lee e Lynch (2005) através de mutações diretas no sítio da esfingomielinase D de *L. reclusa*.

Neste estudo, usamos duas isoformas recombinantes da toxina fosfolipase-D, uma “selvagem” proveniente da biblioteca de cDNA da glândula de veneno de *Loxosceles intermedia* denominada LiRecDT1 (CHAIM *et al.*, 2006) e a outra com um único aminoácido mutado H12A no sítio catalítico da toxina (CHAIM *et al.*, 2008).

Os achados histológicos e ultraestruturais em biópsias renais de camundongos expostos às toxinas através de injeções intraperitoneais, demonstram danos renais causados pela toxina do tipo selvagem, mas não pela isoforma mutante, foi evidenciado por mudanças glomerulares e tubulares (microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão). As células epiteliais tubulares de animais tratados com a toxina selvagem apresentaram um aumento de vacúolos e vesículas elétron-densas no citoplasma. Uma possível explicação para esse acúmulo de vesículas, poderia ser relacionada ao fato de que a degradação de esfingolipídios ocorre em compartimentos lisossomais (HUWILER *et al.*, 2000). Fragmentos da membrana plasmática contendo metabólitos de esfingolipídios

gerados pela exposição à toxina poderiam ser endocitados e transportados pelos compartimentos endossomais até a degradação final nos lisossomos.

Em contraste com a lesão cutânea em que leucócitos polimorfonucleares desempenham um papel essencial na patogênese (ELSTON *et al.*, 2000; OSPEDAL *et al.*, 2002), a lesão provocada pela toxina selvagem não é associada com alterações inflamatórias já que leucócitos não foram observados ao longo das estruturas renais expostas a toxina selvagem.

A azotemia detectada pelo aumento da uréia sérica e alterações bioquímicas detectadas na urina como hematúria em decorrência da exposição à toxina selvagem, mas não à toxina mutada, evidenciam a nefrotoxicidade causada pela toxina (PLD) dependente da sua atividade catalítica. Além disso, a proeminente proteinúria observada após a exposição à toxina selvagem, mas não à toxina mutada, reforçou a participação do domínio catalítico da toxina em um papel essencial para tal nefrotoxicidade. Estudos utilizando modelos experimentais sugerem que a fusão das células epiteliais, deslocamento focal de podócitos da membrana basal, retração da membrana basal glomerular, alterações na integridade endotelial e estruturais da membrana basal têm relação direta com a proteinúria. Os podócitos, nesse contexto, têm sido avaliados quanto a sua participação na permeabilidade glomerular. Estudo utilizando modelo de proteinúria espontânea em ratos não mostrou alterações funcionais da membrana basal glomerular que justificassem a alteração de seletividade nesses animais. (SANTOS *et al* 2001).

As reações de imunofluorescência analisadas por microscopia confocal utilizando anticorpos, que reconhecem as toxinas recombinantes, foram capazes de detectar tanto a toxina do tipo selvagem quanto a toxina mutada como “antígenos plantados” principalmente ao longo das estruturas tubulares dos animais expostos a essas moléculas. No entanto, através da imunoensaio de Western Blot da urina de animais tratados com a toxina selvagem ou mutada, utilizando-se de anticorpos que reconhecem as toxinas (PLD) recombinantes, foi identificada apenas a presença da toxina do tipo selvagem e não da mutada, na região de 30KDa, confirmando a toxina selvagem como um agente nefrotóxico. A explicação racional dos resultados

acima mencionados provém de propriedades físico-químicas da toxina (baixa massa molecular e ponto isoelétrico próximo ao neutro), na qual a função da barreira glomerular depende da massa molecular da proteínas (moléculas com massa inferior a 70KDa são mais permeáveis que as proteínas maiores) (FARQUAR, 1991; COTRAN *et al.*, 1999). Portanto, as toxinas podem atravessar a barreira glomerular e vincularem-se as estruturas tubulares onde a toxina selvagem é citotóxica, alterando a reabsorção protéica tubular e causando a proteinúria. No entanto, a toxina mutada apesar de ligar-se nas estruturas tubulares é desprovida de citotoxicidade, pois não alterou as células epiteliais tubulares e a reabsorção tubular. Além disso, a presença da toxina selvagem na urina de animais tratados confirmou esta proteína como uma molécula que induz dano tubular e pode explicar a insuficiência renal aguda descrita no quadro sistêmico dos envenenamentos pela aranha marrom, de forma semelhante a da patogênese nefrotóxica da necrose tubular aguda (COTRAN *et al.*, 1999; DA SILVA *et al.*, 2004) e reforça a idéia da participação da atividade catalítica desta toxina como essencial no papel nocivo à função renal.

A nefrotoxicidade da LiRecDT1 selvagem foi ainda observada usando células epiteliais da linhagem MDCK em cultura, o que descarta a interferência do componente imunológico da análise. As células tratadas em cultura com a toxina selvagem, mas não pela isoforma mutada, mostraram uma evidente atividade tóxica, especialmente visualizada como alterações morfológicas, o que induziu o aparecimento de vacúolos no citoplasma, defeito na adesão célula-célula e com o substrato de cultura. Da mesma forma, a toxina inibiu a viabilidade celular em concentração e tempo-dependente mais uma vez demonstrando a citotoxicidade direta da toxina selvagem e adicionalmente comprovando o envolvimento da atividade catalítica da enzima como essencial para a nefrotoxicidade.

O mecanismo bioquímico pelo qual as toxinas fosfolipases-D presentes no veneno das aranhas marrons causam nefrotoxicidade é por nós sugerido baseado nas propriedades físico-químicas da toxina dermonecrótica do tipo selvagem (aproximadamente 30KDa e pI 7,2), em conjunto com a sua hidrossolubilidade, e tais propriedades podem explicar a afinidade destas moléculas às estruturas renais

e a conseqüente propriedade nefrotóxica. Adicionalmente, a correlação entre a atividade de Fosfolipase-D de toxinas dermonecróticas e a nefrotoxicidade que pôde ser observada pelos resultados experimentais aqui relatados é também coerente com relatos na literatura que descrevem a capacidade das fosfolipases do veneno da aranha marrom (entre outras) poderem gerar subprodutos de degração de fosfolipídios como o ácido lisofosfatídico (LPA) e/ou ceramida -1 - fosfato (C1P) que são conhecidos como indutores de várias respostas patológicas, incluindo inflamação e agregação plaquetária (ANLIKER *et al.*, 2004; MOOLENAAR *et al.*, 2004; LEE e LYNCH, 2005). Então, a formação de mediadores lipídicos a partir das membranas das células renais (ao se ligarem nas estruturas do tecido renal) através da atividade fosfolipásica das toxinas dermonecróticas (PLD) do veneno loxoscélico, tornaria a função renal mais susceptível ao estresse fisiológico contribuindo para a falência renal. Nesse ínterim, por exemplo, o metabolismo da esfingomielina para ceramida induziria a perda da estabilidade das membranas celulares, por meio de alterações nos microdomínios lipídicos, conhecidos como “Lipid rafts”, que por sua vez perturbariam a fluidez da membrana desencadeando diversos processos intracelulares (HUWILER *et al.*, 2000). Além disso, sabe-se que os metabólitos da esfingomielina gerados pela ação de toxinas de venenos, como ceramida e ceramida-1-fosfato poderiam ter em alvo receptores de membrana que desencadeariam cascatas de sinalização intracelular. Dados na literatura descrevem mudanças intracelulares após a estimulação por ceramida, tais como a ativação da cascatas de proteínas-quinase ativadas por mitógeno (MAPK), isto é, as clássicas proteínas-quinase reguladas por sinal extracelular (ERK) 1 e 2 e também mais recentemente as proteínas-quinase ativadas por estresse da subfamília SAPK/JNK (BOKEMEYER *et al.*, 1996). Tais vias de sinalização paralelas regulam aspectos essenciais da função celular como metabolismo, secreção e expressão gênica (HUWILER *et al.*, 2000).

Finalmente, os resultados aqui descritos corroboram com os dados de que metabólitos de esfingolipídios e a ceramida são agentes de estresse renal agudo que participam de diferentes atividades tóxicas e com especial ênfase na isquemia nefrotóxica e insuficiência renal aguda (ZAGER *et al.*, 1998). Também foi relatado

que o metabolismo de esfingolipídios desempenha um papel importante em uma variedade de processos renais patológicos ou adaptativos específicos (SHAYMAN, 1996; 2000).

A atividade catalítica da toxina dermonecrótica LiRecDT1 selvagem ao sofrer a substituição na posição 12 de um resíduo de histidina (aminoácido carregado positivamente) por alanina (aminoácido apolar) foi modificada em suas propriedades físico-químicas. A desestabilização ou desorganização do sítio catalítico pode explicar as diferenças de funcionalidade entre a toxina dermonecrótica LiRecDT1 selvagem e a LiRecDT1M H12A. A citotoxicidade desencadeada durante os experimentos pela toxina dermonecrótica recombinante LiRecDT1 selvagem, *in vitro* e *in vivo*, não foram evidenciadas quando tratadas com a toxina dermonecrótica recombinante mutada LiRecDT1M H12A, apresentando uma atividade catalítica praticamente nula como observado por Chaim et al. (2008). Os dados aqui descritos indicam a participação da atividade fosfolipásica do veneno da aranha marrom na nefrotoxicidade, trazendo compreensão sobre os mecanismos patológicos no loxoscelismo e oferecendo parâmetros científicos para uma terapia racional para o quadro de envenenamento, baseada numa possível inibição da atividade catalítica da toxina (PLD).

6. CONCLUSÃO

O presente trabalho permitiu o aprofundamento do conhecimento do efeito citotóxico do veneno de aranha marrom, associando a ação in vivo e in vitro de uma toxina dermonecrótica recombinante LiRecDT1 (família da fosfolipase-D) sobre o modelo renal. Desse modo, verificamos alterações histopatológicas e ultraestruturais em biópsias renais de camundongos expostos à toxina do tipo selvagem, mas não pela isoforma mutante (com um único aminoácido mutado H12A no sítio catalítico da toxina), evidenciados por mudanças glomerulares e tubulares (microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão).

Por meio de análises bioquímicas, foi detectado a elevação no nível de uréia sérica nos camundongos suíços testados, comprovando o comprometimento renal causado pela ação pela toxina do tipo selvagem, mas não pela isoforma mutante.

Adicionalmente, a proeminente proteinúria observada após a exposição à toxina selvagem, mas não a toxina mutada, apoiou a participação do domínio catalítico da toxina em um papel essencial para a nefrotoxicidade.

O ensaio de letalidade em camundongos reforçou a diferença na atividade biológica das toxinas dermonecróticas recombinantes.

Por reação de imunofluorescência e microscopia confocal detectamos que as toxinas dermonecróticas recombinantes ligaram-se às células tubulares de camundongos suíços testados. Portanto, as toxinas podem atravessar a barreira glomerular e ligarem-se as estruturas tubulares onde a toxina selvagem é citotóxica, alterando a reabsorção protéica tubular e causando a proteinúria. A toxina mutada por outro lado, apesar de ligar nas estruturas tubulares é desprovida de citotoxicidade, não altera as células epiteliais tubulares e a reabsorção tubular.

A presença da toxina selvagem na urina de animais tratados confirmou esta proteína como uma molécula que causa dano tubular e pode explicar a insuficiência renal aguda que aparece em seguida ao envenenamento pela aranha marrom.

A nefrotoxicidade da LiRecDT1 selvagem foi ainda provada usando células epiteliais da linhagem MDCK em cultura, o que descarta a interferência do componente imunológico da análise. As células tratadas em cultura com a toxina selvagem, mas não pela isoforma mutada, mostrou uma potente atividade nociva,

especialmente em distúrbios morfológicos, o que induziu o aparecimento de vacúolos no citoplasma, defeito na adesão célula-célula e com o substrato de cultura. Da mesma forma, a toxina inibiu a viabilidade celular em uma concentração tempo-dependente mais uma vez demonstrando a citotoxicidade direta da toxina selvagem e adicionalmente comprovando o envolvimento da atividade catalítica da enzima como essencial para a nefrotoxicidade.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANDRADE, R.M.G.; OLIVEIRA, K.C.; GIUSTI, A.L.; SILVA, W.D.; TAMBOURGI, D.V. Ontogenetic development of *L. intermedia* spider venom. **Toxicon**. 37:627-632, 1999.
2. ANDRADE, S.C.; DEZOTI, C.; SHIBUYA, C.A.; WATANABE, M.; VATTIMO, M.F.F. Insuficiência Renal aguda Isquêmica: Efeitos comparativos do Alopurinol e N-Acetilcisteína como antioxidantes. **J Bras Nefrol**. 26(2): 69-75, 2004.
3. ANDRADE, S.A.; MURAKAMI, M.T.; CAVALCANTE, D.P.; ARNI, R.K.; TAMBOURGI, D.V. Kinetic and mechanistic characterization of Sphingomyelinases D from *Loxosceles intermedia* spider venom. **Toxicon**. 47: 380-386, 2006.
4. ANLIKER, B.; CHUN, J. Lysophospholipid G Protein-coupled Receptors. **J. Biol. Chem**. 279, 20555-20558, 2004.
5. APPEL, M. H.; DA SILVEIRA, R. B.; CHAIM, O.M.; PALUDO, K. S.; SILVA, D. T.; CHAVES, D. M.; SILVA, P. H.; MANGILI, O. C.; SENFF-RIBEIRO, A.; GREMSKI, W.; NADER, H. B.; VEIGA, S. S. Identification, cloning and functional characterization of a novel dermonecrotic toxin (phospholipase-D) from brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. **Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects**, 1780, 167-178, 2008.
6. BARBARO, K.C.; CARDOSO, J.L.C.; EICKSTEDT, V.R.D.; MOTA, I. Dermonecrotic and lethal components of *L. gaucho* spider venom. **Toxicon**. 30:331-338, 1992.
7. BARBARO, K.C.; EICKSTEDT, V.R.D.; MOTA, I. Antigenic crossreactivity of venoms from medically important *Loxosceles* (Araneae) species in Brazil. **Toxicon** 32, 113–120. 1994a
8. BARBARO, K.C.; EICKSTEDT, V.R.D.; MOTA, I. Adjuvant effect of *L. gaucho* (South American brown spider) venom. **Toxicon**. 32:687-693, 1994b.
9. BARBARO, K.C.; JARED, C.; MOTA, I. Aranhas venenosas no Brasil. **Ciência Hoje**, Rio de Janeiro, v.19, n.114, p.48-52, 1995.

10. 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.** 15, 337–343, 1996.
11. BARRETO, CO; CARDOSO, JL; DE CILLO, D. Viscerocutaneous form of loxoscelism and erythrocyte glucose-6-phosphate deficiency. **Ver. Inst. Med. Trop. São Paulo**, 27:264, 1985.
12. BASCUR, L; YEVENES, I; BARJA, P. Effects of *L. laeta* spider venom on blood coagulation. **Toxicon**. 20:795-796, 1982.
13. BEÇAK, W.; PAULET, J. Técnicas de Citologia e Histologia. Livros Técnicos e científicos Editora S. A, 1976.
14. BEY, T.A.; WALTER, F.G.; LOBER, W.; SCHMIDT, J.; SPARK, R.; SCHLIEVERT, P.M. *Loxosceles arizonica* bite associated with shock. **Ann. Emerg. Med.** 30, 701-703, 1997.
15. BINFORD, G.J; WELLS, M.A. The phylogenetic distribution of sphingomyelinase D activity in venoms of Haplogyne spiders. **CBP – Comparative Biochemistry and Physiology**, Part B 135, p. 25-33, 2003.
16. BOKEMEYER, D; SOROKIN, A.; DUNN, M.J. Multiple intracellular MAP kinase signaling cascades. **Kidney International**, 49 (5): 1187-1198, 1996.
17. Castro, S.C.; Silvestre, F.G.; Araújo, S.C.; Yazbeck, G.M.; Mangili, O.C.; Cruz I, Chávez-Olórtegui C.; Kalapothakis, E.; Identification and molecular cloning of insecticidal toxins from the venom of the brown spider *Loxosceles intermedia*. **Toxicon**: 44, 273-80, 2004
18. 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. Appl. Pharmacol.** 2006; 211:64-77.
19. CHAIM, O. M.; DA SILVEIRA, R. B.; SILVA, D. T.; FERRER, V. P.; NADER, H. B.; GREMSKI, W.; VEIGA, S.S. Mechanistic relationship of phospholipase activity and toxicity of dermonecrotic toxin from brown spider venom. 2008. *In press*.

20. CICARELLI, R.M.B. et al. Avaliação da atividade tóxica do veneno de *Loxosceles gaucho* em termos de DL₅₀ e titulação do antiveneno específico em camundongos. **Mem. Inst. Butantan**. 47/48: 45-53, 1983/1984.
21. COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L. Pathologic basis of disease. Elsevier, Boston, 1999.
22. COUTINHO, N.L.R. Avaliação funcional e histopatológica das alterações renais induzidas pelo veneno da “aranha marrom”, *L. intermedia* (Mello-Leitão, 1934). **Dissertação de Mestrado em Morfologia, Biologia Celular**. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1996.
23. DA SILVA, P.H.; DA SILVEIRA, R.B.; APPEL, M.H.; MANGILI, O.C.; GREMSKI, W.; VEIGA, S.S. Brown spiders and loxoscelism. **Toxicon**. 44: 693-709, 2004.
24. DA SILVEIRA, R.B.; FILHO, J.F.S.; MANGILI, O.C.; VEIGA, S.S.; GREMSKI, W.; NADER, H.B., DIETRICH, C.P. Identification of proteases in the extract of venom glands from brown spiders. **Toxicon**. 40: 815-822, 2002.
25. DA SILVEIRA, R.B.; PIGOZZO, R.B.; CHAIM, O.M.; APPEL, M.H.; SILVA, D.T.; DREYFUSS, J.L. Two novel dermonecrotic toxins LiRecDT4 and LiRecDT5 from Brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom: from cloning to functional characterization. **Biochimie** 89, 289–300, 2007a.
26. DA SILVEIRA, R.B.; WILLE, A.C.M.; CHAIM, O.M.; APPEL, M.H.; SILVA, D.T.; FRANCO, C.R.C. Identification, cloning, expression and functional characterization of an astacin-like metalloprotease toxin from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. **Biochem. J.** 406, 355–363, 2007b
27. 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-b-Nacetylhexosaminidases hydrolases. **Toxicon**, 2007c; 49, 758-68.
28. DE BARROS, M. L.; VARANDA, W. A.; LACHAT, J. J.; ALVES-DA-SILVA, C. G.; COIMBRA, T. M. Glomerular permeability to macromolecules in gentamicin-treated rats. **Rev. Med. Inst. Mexicano seguro social**, v.22, n.6, p.403-406, 1992.

29. DRURY, R.A.B.; WALLINGTON, E.A. Preparation and Fixation of Tissues. Carletons Histological Tecnique, 5th ed. Oxford Univ. Press, Oxford, 1980.
30. DOS SANTOS, V.L.P.; FRANCO, C.R.C.; VIGGIANO, R.L.L.; SILVEIRA, R.B.; CANTÃO, M. P.; MANGILI, O.C.; VEIGA, S.S.; GREMSKI, W. Stuctural and ultrastructural description of the venem gland of *Loxosceles intermedia* (brown spider). **Toxicon**. 38: 265-285, 2000.
31. 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. Dermatopath**. 22, 242-246, 2000
32. ESCOUBAS, P. *et al.* Structure and pharmacology of spider venom neurotoxins. **Biochimie**. 82: 893-907, 2000.
33. FARQUHAR, M.G., 1991. The glomerular basement membrane: A selective macromolecular filter. In Hay, E.D. ed.: Cell Biology of the Extracellular Matrix. Plenum Press, New York.
34. FEITOSA, L.; GREMSKI, W.; VEIGA, S.S.; ELIAS, M.C.Q.B.; GRANER, E.; MANGILI, O.C.; BRENTANI, R.R. Detection and characterization of metalloproteinases with gelatinolytic, fibronectinolytic and fibrinogenolytic activities in brown spider (*L. intermedia*) venom. **Toxicon**. v.36, p. 1039-1051, 1998.
35. FRANÇA, F.O.S.; BARBARO, K.C.; ABDULKADER, C.R.M. Rhabdomyolysis in presumed viscerocutaneous loxoscelism: report of two cases. **Trans. R. Soc. Med. Hyg**. 96, 287-290, 2002
36. FRESHNEY RI. Culture of animal cells: a manual of basic techniques. 4. ed. Wiley-Liss Inc, 1994, USA.
37. FOIL L.D.; NORMENT B.R. Envenomation by *Loxosceles reclusa*. **J Med Entomol** 16, 18-25, 1979
38. FUTRELL, JM. . **Med. Sci**. 304:261-267, 1992. Loxoscelism. **Am. J**
39. GATES, C.A.; REES, R.S. Serum amyloid P component: its role in platelet activation stimulated by sphingomyelinase D purified from the venom of brown recluse spider (*L. reclusa*). **Toxicon**. 28:1303-1315, 1990.

40. HARLOW & LANE D. **Antibodies – A laboratory manual**. Cold Spring Harbor Laboratory, 1988.
41. HENRY, J.H. Clinical diagnosis and management by Laboratory Methods. Philadelphia, WB Saunders.,2001.
42. HOGAN, C.J.; BARBARO, K.C.; WINKEL, K. Loxoscelism: old obstacles, new directions. **Ann. Emerg. Med.** 44, 608-624, 2004.
43. HUWILER, A.; KOLTER, T.; PFEILSCHIFER, J.; SANDHOFF, K. Physiology and pathophysiology of sphingolipid metabolism and signaling. **Biochim. Biophys. Acta.** 1485, 63-99, 2000.
44. ISBISTER, G. K.; GRAUDINS, A.; WHITE, J.; WARRELL, D. Antivenom Treatment in Arachnidism. **Clinical Toxicology**. v. 41, 3, p. 291–300, 2003.
45. KALAPOTHAKIS, E.; ARAUJO, S.C.; DE CASTRO, C.S.; MENDES, T.M.; GOMEZ, M.V.; MANGILI, O.C.; GUBERT, I.C.; CHAVEZ-OLORTEGUI C. Molecular cloning, expression and immunological properties of LiD1, a protein from the dermonecrotic family of *L. intermedia* spider venom. **Toxicon**. 40: 1691-1699, 2002.
46. KANVAR, Y. S. and FAQUHAR, M. G. Presence of heparan sulphate in the glomerular basement membrane. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** v.76, n.3, p. 1203-1307, 1979.
47. KAPLAN L.A.; PESCE A.J. Clinical chemistry. Theory, Analysis, Correlation. St Louis, Mosby, 1996.
48. 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.** 678(3):467-76, 1981.
49. LAEMMILI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**. 277:680-685, 1970.
50. LEE, S.; LYNCH, K.R. Brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*) venom phospholipase D (PLD) generates lysophosphatidic acid (LPA). **Biochem. J.** 391, 317–323, 2005
51. LUCAS, S. Spiders in Brazil. **Toxicon**. v.26, n.9, p.759-772, 1988.

52. LUCIANO, M. N.; SILVA, P.H.; CHAIM, O. M.; SANTOS, V.L.O.; FRANCO, C. R. C.; SOARES, M. F. S.; ZANATA, S. M.; MANGILI, O. C.; GREMSKI, W.; VEIGA, S.S. Experimental evidence for a direct cytotoxicity of *Loxosceles intermedia* (Brown spider) venom in renal tissue. **J. Histochem.Cytochem.** 52: 457-467, 2004.
53. LUNG, J.M.; MALLORY, S.B. A child with spider bite and glomerulonephritis: a diagnostic challenge. **Int. J. Dermatol.** 39: 287-289, 2000.
54. MARQUES-DA-SILVA, E; FISCHER M.L. Distribuição das espécies do gênero *Loxosceles* Heinecken & Lowe, 1835 (Araneae; Sicariidae) no Estado do Paraná. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** 38(4):331-335, jul-ago, 2005.
55. MOOLENAAR, W. H.; VAN MEETEREN, L. A. AND GIEPMANS, B. N. The ins and outs of lysophosphatidic acid signaling. **Bio Essays** 26, 870-881, 2004.
56. MONTEIRO, C.L.B.; RUBEL, R.; COGO, L.L.; MANGILI, O.C; GREMSKI, W.; VEIGA, S.S. Isolation and identification of *Clostridium perfringens* in the venom and fangs of *Loxosceles intermedia* (brown spider): enhancement of the lesion in loxoscelism. **Toxicon.** 40:409-418, 2002
57. MORÁN, O.; ZAVALETA, A.; LA MATA, C.R. Efectos hematológicos Del veneno de *Loxosceles laeta* em ratones albinos. **Bol. Chile parasit.** 36: 20-23, 1981.
58. 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.** 280(14):13658-64, 2005.
59. OLIVEIRA, K.C.; ANDRADE, R.M.G.; GIUSTI, A.L.; SILVA, W.D; TAMBOURGI, D.V. Sexlinked variation of *Loxosceles intermedia* spider venoms. **Toxicon.** 37:217-221,1999.
60. OSPEDAL, K. Z.; APPEL, M.H.; NETO, J.N.; MANGILI, O. C.; VEIGA, S.S.; GREMSKI, W. Histopathological findings in rabbits after experimental acute exposure to the *L. intermedia* (brown spider) venom. **Int. J. Exp. Path.** 84: 287-294, 2002.
61. PALUDO, K.S.; GRENSKI, L.H; VEIGA, S.V.; CHAIM, M.C.; GRENSKI, W.; BUCHI, D.F.; NADER, H.B.; DIETRICH, C.P.; FRANCO, C.R.C. The effect of

- brown spider venom on endothelial cell morphology and adhesive structures. **Toxicon**. 47: 844-853, 2006.
62. PEDROSA, M. F. F.; AZEVEDO, I. L. M. J.; ANDRADE, R. M. G.; BERG, C. W.; RAMOS, C. R. R., HO, P. L.; TAMBOURGI, D. V. Molecular cloning and expression of a functional dermonecrotic and haemolytic factor from *L. laeta* venom. **Biochem. Bioph. Res. Commun.** 298, 638-645, 2002.
63. PETRICK, J.S.; AYALA-FIERRO; F., CULLEN, W.R.; CARTER D.E.; VASKEN APOSHIAN, H. Monomethylarsonous acid (MMA(III)) is more toxic than arsenite in Chang human hepatocytes. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** 163,203-207, 2000
64. RAMOS-CERRILLO, B.; OLVERA, A.; ODELL, G.V.; ZAMUDIO, F.; PANIAGUA-SOLÍS, J.; ALAGÓN, A.; STOCK, R.P. Isoforms from the North American fiddleback spiders *L. boneti* and *L. reclusa*. **Toxicon**. 44: 507-514, 2004.
65. REES, RS; GATES, C; TIMONS, S; DES-PRES, RM; KING, LE Jr. Plasma components are requieres for platelet activation by the toxin of *L. reclusa*. **Toxicon**. 26:1035-1046, 1988.
66. RUPPERT, E.E.; BARNES, R.D. **Zoologia dos invertebrados**. Ed. Roca, São Paulo, 6ª ed., 1996.
67. SAMS H.H.; DUNNICK C.A.; SMITH M.L.; KING L.E. Necrotic arachdism. **J Am Acad Dermatol** 44, 61-573, 2001.
68. SANTOS, V.L; FRANCO, C.R; VIGGIANO, R.L.L; SILVEIRA.R.B; CANTÃO, M.P; MANGILI, O.C; VEIGA, S.S; GREMSKI, W. Structural and ultrastructural description of the venom gland of *Loxosceles intermedia* (brown spider). **Toxicon** 38: 265-285, 2000
69. SANTOS, A. M. R.; LEMOS C.C.S.; BREGMAN, R. Revisão: Proteinúria-marcador clássico de comprometimento glomerular. **J Brás Nefrol.**,23: 217-220, 2001.
70. SCHENONE, H.; LETONJA, T. Notas sobre la biologia y distribuicion geográfica de las aranas del género *L.*. **Bol. Chil. Parasitol.**, Chiba, n.30, p.27-29, 1975.
71. SCHENONE, H; SAAVEDRA,T; ROJAS,A; VILLARROEL,F. Loxoscelismo en Chile. Estudios epidemiológicos, clínicos y experimentales. **Rev. Inst. Med. Trop.** São Paulo, São Paulo, v.31, n.6, p.403-415, 1989.

72. SENFF-RIBEIRO, A.; DA SILVA, P.H.; CHAIM, O.M.; GREMSKI, L.H; PALUDO, K.S.; DA SILVEIRA, R.B.; GREMSKI, W.; MANGILI, O.C.; VEIGA, S.S. Biotechnological applications of brown spider (*Loxosceles* genus) venom toxins. **Biotechnology Advances**. 2008, *In press*.
73. SEZERINO, UM; ZANNIN, M; COELHO, LK. A clinical and epidemiological study of *L. spider* envenoming in Santa Catarina, Brasil. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 92:546, 1998.
74. SHAYMAN, J. A. Sphingolipids: their role in intracellular signalling and renal growth. **J. Am. Soc. Nephrol.** 7, 171-182, 1996.
75. SMITH, W.C.; MICKS, W.D. The role of polymorphonuclear leukocytes in the lesion caused by the venom of the brown spider, *L. reclusa*. **Lab. Invest.**, Baltimore, v.22, p.90-93, 1970.
76. SOERENSEN, B. Acidentes por animais peçonhentos: reconhecimento, clínica e tratamento. Editora Atheneu, 1996.
77. SUAREZ, G.; BIGGERMANN, U.; SCHENONE, H. Estudios bioquímicos del veneno de *L. laeta* y sus mecanismos de acción. **Bol. Chil. Parasitol.**, Chiba, n.26, p.60-62, 1971.
78. SWANSON, D.L.; VETTER, R.S. LOXOSCELISM, **Clin. Dermatol.** 24, 213-221, 2006.
79. TAMBOURGI, D.V.; MAGNOLI, F.C.; EICKSTEDT, V.R.D.; BENEDETTI, Z.C.; PETRICEVICH, V.L.; SILVA, W.D. Incorporation of a 35 kDa purified protein from *Loxosceles intermedia* spider venom transforms human erythrocytes into activators of autologous complement alternative pathway. **J. Immunol.** 155, 4459–4466, 1995.
80. TAMBOURGI, D. V.; PEDROSA, M. F. F.; VAN DEN BERG, C. W.; GONÇALVES-DE-ANDRADE, R. M.; FERRACINI, M.; PAIXÃO-CAVALCANTE, D. Molecular cloning, expression, function and immunoreactivities of members of a gene family of sphingomyelinases from *L. venom* glands. **Molecular Immunology.** 41, 831–840, 2004.

81. VEIGA, S.S. *et al.* Oligosaccharide residues of *L. intermedia* (brown spider) venom proteins: dependence of glycosylation for dermonecrotic activity. **Toxicon**. 37:587-607, 1999.
82. VEIGA, S.S.; FEITOSA, L.; SANTOS, V.L.P.; DE SOUZA, G.A.; RIBEIRO, A.S.; MANGILI, O.C.; PORCIONATTO, M. A.; NADER, H.B.; DIETRICH, C.P.; BRENTANI, R.R. and GREMSKI, W. Effect of *L. intermedia* (brown spider) venom on basement membrane structures. **Histochemical Journal**.32, 397-408, 2000a.
83. VEIGA, S.S.; SILVEIRA, R.B.; DREYFUSS, J.L.; HAOACH, J.; PEREIRA, A.M.; MANGILI, O.C.; GREMSKI, W. Identification of high molecular weight serine-proteases in *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. **Toxicon** 38, 825–839, 2000b.
84. 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. **Thrombosis Research**. 102: 229-237, 2001a.
85. VEIGA, S.S.; ZANETTI, V.C.; BRAZ, A.; MANGILI, O.C.; GREMSKI, W. Extracellular matrix molecules as targets for brown spider venom toxins. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 34:843-850, 2001b.
86. WILLIAMS, S.T.; KHARE, V.K.; JOHNSTON, G.A.; BLACKALL, D.P. Severe intravascular hemolysis associated with brown recluse spider envenomation. *Am. J. Clin. Pathol.* 104, 463-467, 1995
87. YOUNG, A.R.; PINCUS, S.J. Comparison of enzymatic activity from three species of necrotising arachnids in Australia: *L. rufescens*, *Badumna insignis* and *Lampona cylindrata*. **Toxicon**. 39, 391-400, 2001.
88. ZANETTI, V.C.; DA SILVEIRA, R.B.; DREYFUSS, J.L.; HAOACH, J.; MANGILI, O.C.; VEIGA, S.S.; GREMSKI, W. Morphological and biochemical evidence of blood vessel damage and fibrinogenolysis triggered by Brown spider venom. **Blood Coagulation and Fibrinolysis**. 13: 1-14, 2002.

89. ZAGER, R. A.; CONRAD, S. L.; SWEENEY, E. A.; IGARASHI, Y.; BURKHART, K. M. Altered sphingomyelinase and ceramide expression in the setting of ischemic and nephrotoxic acute renal failure. *Kidney Int.* 53, 573-582, 1998.
90. ZATS, R. Série Fisiopatologia Clínica – Fisiopatologia renal (vol.2). Atheneu, São Paulo, 2000.

8. ANEXOS

Nephrotoxicity caused by brown spider venom phospholipase-D (dermonecrotic toxin) depends on catalytic activity.

Josiana Kusma^a, Olga Meiri Chaim^{a, b}, Ana Carolina M. Wille^c, Valéria P. Ferrer^a, Youssef Bacila Sade^a, L. Donatti^a, Oldemir C. Mangili^d, Waldemiro Gremski^{a,e}, Silvio Sanches Veiga^{a*}

^aDepartment of Cell Biology, Federal University of Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil;

^bDepartment of Biochemistry, Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil;

^cDepartment of Structural, Molecular Biology and Genetics, State University of Ponta Grossa, Paraná, Brazil; ^dDepartment of Physiology, Federal University of Paraná;

^eCatholic University of Paraná, Health and Biological Sciences Institute, Curitiba, Paraná, Brazil.

***Corresponding author:**

Silvio S. Veiga

Department of Cell Biology, Federal University of Paraná, Jardim das Américas, 81531-990, Curitiba, Paraná, Brazil.

Fax: +55 41 3266 2042

E-mail: veigass@ufpr.br

GenBank data deposition information for *L. intermedia* cloned cDNA LiRecDT1 is: DQ218155

Abstract

Accidents evoked by the bites of brown spiders (*Loxosceles* genus) are related to clinical manifestations including skin necrosis with gravitational spreading and systemic involvement that may include renal failure, hemolysis and thrombocytopenia. In the present report, by using mice exposed to recombinant wild-type phospholipase-D (dermonecrotic toxin) and a mutated toxin isoform at the catalytic domain, we were able to show that the mechanism by which venom induces renal damage is dependent of catalytic activity of enzyme. Light microscopy analysis of renal biopsies from recombinant wild-type phospholipase-treated mice showed morphologic alterations including glomerular edema, erythrocytes and collapse of Bowman's space, deposition of proteinaceous material within the tubular lumen and tubular edema, but absence of nephrotoxicity for mutated. Ultrastructural analyses through transmission electron microscopy confirmed wild-type toxin cytotoxicity pointing disorders of glomerular filter structure at foot processes and fenestrated endothelium membrane. Tubule alterations include deposits of amorphous material and edema of tubular lumina and increase of epithelial cytoplasmic multivesicular bodies and electron dense structures. Additionally, biochemical analyses of urine and blood showed that wild-type toxin-induced changes in renal function as, hematuria and azotemia with elevation of blood urea. Moreover, wild-type phospholipase-D treatment induced proteinuria, whereas mutated toxin caused only residual activity. Biological differences for recombinant toxins were corroborated through mice lethality experiments, which showed oliguria and animal mortality after wild-type treatments, but an absence of lethality following mutated toxin exposure. Immunofluorescence with antibodies to phospholipase-D toxin and confocal microscopy analysis showed deposition of both wild-type and mutated toxins along the renal tubular structures. By immunoblotting with a hyperimmune antiserum against venom phospholipase on urine from toxins-treated mice, we detected a positive signal at region of 30kDa to animals treated with wild-type toxin, but no reaction on urine of mice exposed to mutated toxin. Similarly, wild-type toxin treatment caused morphological alterations of MDCK cells including appearance of cytoplasmic vacuoles, evoked impaired spreading and detached cells from each one

and from culture substratum. Wild-type phospholipase toxin treatment of MDCK cells changed their viability evaluated by Neutral-Red Uptake, while mutated isoform had no activity. Thus, on the basis of the present data, we have defined for the first time at literature a molecular mechanism for *Loxosceles* venom nephrotoxicity dependent on catalytic activity of phospholipase-D toxin.

Introduction

Brown spider (*Loxosceles* genus) bites commonly are related to several clinical manifestations including swelling, erythema, dermonecrotic lesion and gravitational spreading (the hallmark of accidents) near and at the bite site. At systemic level hematological disturbances such as platelet aggregation causing thrombocytopenia and disseminated intravascular coagulation, as well as red blood cell lyses may be described. Additionally, acute renal failure followed accidents has also been reported. Systemic involvement is less common than skin injuries but it may also be the cause of complications and death of victims (Futrell, 1992; da Silva et al., 2004; Hogan et al., 2004; Swanson and Vetter, 2006).

The whole venom is a complex mixture of proteic toxins enriched in proteins with low molecular mass in the range of 5-40kDa. The total venom volume injected after accidents is minute (between one or two microliters) and contains just some ten of micrograms of proteins (Sams et al., 2001; da Silva et al., 2004). Toxins including alkaline phosphatase, hyaluronidase, metalloproteases (astacin-like proteases), low molecular mass (5.6-7.9kDa) insecticidal peptides and phospholipase-D have been identified in the venom (Futrell, 1992; Feitosa et al., 1998; de Castro et al., 2004; Barbaro et al., 2005; da Silveira et al., 2006, 2007a, 2007b, 2007c).

Phospholipase-D also named dermonecrotic toxin is the best known molecule found in the brown spider venom. This toxin was previously biochemically characterized in the venom of *L. reclusa* as a sphingomyelinase D based on the generation of ceramide-1-phosphate from sphingomyelin (Futrell, 1992; da Silva et al., 2004). Nevertheless, based on biochemical approaches it has now been described that the toxin has a broad substrate specificity, hydrolyzing glycerophospholipids and sphingophospholipids to generate lysophosphatidic acid or ceramide-1-phosphate. As a result, it has been suggested that the toxin might more accurately be described as a phospholipase D to account for its broader lipid hydrolyze activity (Lee and Lynch, 2005). By generating ceramide-1-phosphate or lysophosphatidic acid, it is postulated that the phospholipase D toxin activates signaling pathways in different cells causing pathophysiological changes such as

inflammatory response, platelet aggregation, and increased blood vessel permeability (Moolenaar and Meeteren, 2004; Anliker and Chun, 2004). Through proteomic studies (two-dimensional electrophoresis, mass spectrometry and Edman chemical amino acid sequencing), and molecular biology techniques (cDNA cloning, phylogenetic analyses and recombinant toxins expression), literature data strengthen the idea of the existence of an intraspecies family of dermonecrotic toxins and suggests that the noxious activities induced by dermonecrotic toxins reflect a synergistic mechanism for different toxin isoforms found in the whole venom (Machado et al., 2005; Binford et al., 2005, Chaim et al., 2006; da Silveira et al., 2006, 2007b, Kalapothakis et al., 2007).

The nephrotoxic effect of *Loxosceles* spider venom is demonstrated experimentally by mice exposed to the whole venom. Histopathological findings of kidneys from venom-treated animals showed hyalinization and erythrocytes in the Bowman's space, glomerular collapse, tubular epithelial cells cytotoxicity and deposition of proteinaceous material within tubular lumen (Luciano *et al.*, 2004). Additionally, by using mice exposed to a *L. intermedia* recombinant dermonecrotic toxin (phospholipase-D), Chaim et al. (2006) showed a direct induction of renal injuries. Analysis of renal biopsies showed alterations including glomerular edema and tubular necrosis. Additionally, biochemical analyses showed toxin-induced changes in renal function as hematuria and azotemia with elevation of blood urea levels. Immunofluorescence with antibodies to dermonecrotic toxin and confocal microscopy analysis showed deposition and direct binding of this toxin to renal intrinsic structures.

Herein, by comparing recombinant phospholipase-D toxins (wild-type and a site directed mutated at the catalytic domain), we reported the involvement of the catalytic domain of toxin in the nephrotoxicity evoked by brown spider venom. Such results strengthen the previous data reporting the participation of dermonecrotic toxins in nephrotoxicity and point out for the first time in literature a molecular mechanism for this event.

Materials and Methods

Reagents

Polyclonal antibodies to *L. intermedia* phospholipase-D toxin was produced in a rabbit as described by Luciano et al. (2004) and Chaim et al. (2006). Hyperimmune IgGs were purified from serum using a mixture of Protein-A and Protein-G Sepharose beads (Amersham Biosciences, Piscataway, USA) as recommended by the manufacturer. Fluorescein-conjugated anti-rabbit IgG and Alkaline Phosphatase-conjugated anti-rabbit IgG were purchased from Sigma, St. Louis, USA.

Recombinant phospholipase-D wild-type and mutated toxin expression

The venom gland cDNA library was built following Chaim et al. (2006) and da Silveira et al. (2006). GenBank data deposition information for *L. intermedia* cloned cDNAs are: LiRecDT1, DQ218155. For negative control was used a recombinant toxin with similar molecular mass and obtained from the same cDNA library. This control toxin was characterized as an “Astacin-like metalloprotease” (da Silveira et al., 2007c) and it causes no dermonecrosis evidenced by dermonecrotic assay, followed rabbit injection into the skin (data not shown). The cDNA corresponding to the mature phospholipase-D wild-type protein was amplified by PCR. The forward primer used was 30Rec sense (5'-CTCGAGGCAGGTAATCGTCGGCCTATA-3') designed to contain an Xho I restriction site (underlined) plus the sequence related to the first seven amino acids of mature protein. The reverse primer used was 30Rec antisense (5'-CGGGATCCTT**ATTTCTTGAATGTCACCCA**-3'), which contains a BamH I restriction site (underlined) and the stop codon (bold). The PCR product was cloned into pGEM-T vector (Promega, Madison, USA). The pGEM-T vector containing the mature protein encoding cDNA was then digested with Xho I and BamH I restriction enzymes. The excised insert was gel purified using QIAquick Gel

Extraction Kit (QIAGEN) and subcloned into pET-14b (Novagen, Madison, USA) digested with the same enzymes. The mutated toxin was obtained by Single-tube Megaprimer PCR method which is performed with two rounds of PCR to introduce a site-directed mutagenesis in the LiRecDT1 sequence (Chaim et al, 2008). Briefly, the first round includes the site-directed mutagenesis in the first histidine amino acid residue by using the reverse primer P1H12A (5'- ATTTACCATGGCCCCCATGATC-3') designed to contain the codon substitute for alanine plus the sequence related to the others original amino acids of mature protein. The correct constructs were confirmed by sequencing. Both recombinant constructs were expressed as fusion proteins, with a 6x His-Tag at the N-terminus and a 13 amino acid linker including a thrombin site between the 6x His-Tag and the mature protein (N-terminal amino acid sequence before the mature protein: MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMLE). pET-14b/ *L. intermedia* cDNA constructs were transformed into One Shot *E. coli* BL21(DE3)pLysS competent cells (Invitrogen) and plated on LB agar plates containing 100µg/ml ampicillin and 34µg/ml chloramphenicol. A single colony was inoculated into 50ml LB broth (100µg/ml ampicillin and 34µg/ml chloramphenicol) and grown overnight at 37°C. A 10ml portion of this overnight culture was grown in 1L LB broth/ampicillin/chloramphenicol at 37°C until the OD at 550nm reached 0.5. IPTG (isopropyl β-D-thiogalactoside) was added to a final concentration of 0,05mM and the culture was induced by the incubation for additional 3.5h at 30°C (with vigorous shaking). Cells were harvested by centrifugation (4,000xg, 7min) and the pellet was frozen at -20°C overnight.

Recombinant proteins purification

Cell suspensions were thawed and additionally disrupted by 6 cycles of 10 seconds sonication at low intensity. Lysed materials were centrifuged (20,000xg, 20 minutes) and the supernatants were incubated with 1ml Ni²⁺-NTA agarose beads for

1 hour at 4°C (with gentle agitation). The suspensions were loaded into a column and the packed gel was exhaustively washed with the appropriate buffer (50mM sodium phosphate pH 8.0, 500mM NaCl, 20mM imidazole) until the OD at 280nm reached 0.01. Recombinant proteins were eluted with 10ml of elution buffer (50mM sodium phosphate pH 8.0, 500mM NaCl, 250mM imidazole) and 1ml fractions were collected and analyzed by 12.5% SDS-PAGE under reducing conditions. Fractions were pooled and dialyzed against phosphate buffered saline (PBS).

Phospholipase activity assay

Phospholipase-D activity was measured using the Amplex Red Assay Kit (Molecular Probes, Eugene, USA). In this assay, phospholipase-D activity is monitored using 10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine (Amplex Red reagent), a sensitive fluorogenic probe for H₂O₂ (da Silveira et al., 2006). First, phospholipase hydrolyzes sphingomyelin to yield ceramide-1-phosphate and choline. Choline is oxidized by choline oxidase to betaine and H₂O₂. Finally, H₂O₂, in the presence of horseradish peroxidase, reacts with Amplex reagent in a 1:1 stoichiometry to generate the highly fluorescence product, resorufin. Recombinant toxins (5 and 10 µg each, in three trials) were added to the Amplex Red reagent mixture. The reaction tubes were incubated at 37°C for 30 minutes and fluorescence was measured in a fluorometer (Shimadzu Model RF-5301 PC Fluorescence Spectrophotometer) using excitation at 540nm with emission detection at 590nm.

Animals

Adult Swiss mice weighing approximately 25-30g and adult rabbits weighing approximately 3kg from the Central Animal House of the Federal University of Paraná were used for *in vivo* experiments with recombinant toxins. All experimental protocols using animals were performed according to the “Principles of laboratory animal care” (NIH Publication n° 85-23, revised 1985) and “Brazilian Federal Laws”, and ethical committee agreement number 126 of Federal University of Paraná.

Mouse intraperitoneal injections

Mouse mortality studies were conducted with adult Swiss (25-30g) animals. Purified recombinant toxins (10, 50 and 100 µg/Kg of mice) were each injected intraperitoneally into five mice. A recombinant toxin (astacin-like metalloprotease) without dermonecrotic activity was used as negative control (da Silveira et al., 2007c). The mice were observed for 8, 16 and 24 and 48h after injection and survival was assessed at one-hour intervals.

Histological methods for light microscopy

Kidneys were collected from mice anesthetized with ketamine (Agribands, Paulinia, Brazil) and acepromazine (Univet, São Paulo, Brazil) and then fixed in "ALFAC" fixative solution (ethanol absolute 85%, formaldehyde 10% and glacial acetic acid 5%) for 16h at room temperature. After fixation, samples were dehydrated in a graded series of ethanol before paraffin embedding (for 2h at 58°C), then, thin sections (4 µm) were processed for histology. Tissue sections were stained by hematoxylin and eosin (HE) (Culling et al., 1985).

Transmission electron microscopy and scanning electron microscopy

Kidneys were fixed with modified Karnovsky's fixative with para formaldehyde 2,0%, glutaraldehyde 2,5% in 0.1M cacodylic acid buffer (Karnovsky 1965) for 2h, washed in 0.1M cacodylic acid buffer, pH 7.3, postfixed in 1% OsO₄ in 0.1 M cacodylic acid buffer, pH 7.3, for 1 h, dehydrated with ethanol and propylene oxide, embedded in Epon 812, contrasted with uranyl acetate and lead citrate, and examined with a JEOL-JEM 1200 EX II transmission electron microscope at an accelerating voltage of 80 kV (Peabody, MA, USA). Alternatively for scanning electron microscopy, MDCK cells were fixed with modified Karnovsky's fixative (Karnovsky, 1965) for 1h, washed in 0.1M cacodylic acid buffer (pH 7.3), incubated with PBS or toxins overnight and postfixed for 1h in 1% OsO₄ diluted in 0.1M

cacodylic acid buffer pH 7.3. Materials were then dehydrated in ethanol, critical-point dried (Bal-Tec CPD-030), sputter-coated with gold (Balzers SCD-030) and examined with JEOL-JSM 6360 LV scanning electron microscope.

Gel Electrophoresis and Immunoblotting

Protein content of samples was determined by the Coomassie Blue method (BioRad, Hercules, USA) following Bradford (1976). For protein analysis, 12.5% SDS-PAGE were carried out under reduced conditions following Laemmli (1970) and for protein detection, gels were stained with Coomassie Blue dye. For immunoblotting, proteins were transferred to nitrocellulose filters overnight following Towbin et al. (1979) and immunostained with hyperimmune purified IgG, which reacts to phospholipase-D toxin (as described in Reagents). Molecular mass markers were acquired from Sigma.

Blood and urine collections and laboratory analyses

Blood samples (directly from the heart) were obtained from mice anesthetized with ketamine (Agribands, Paulínia, Brazil) and acepromazine (Univet, São Paulo, Brazil). Urine samples were obtained from mice submitted to soft massage on the abdominal region and collected using a micropipette. Blood urea and urinalysis were determined using standardized techniques and reagents as described by Henry (2001).

Cell cytotoxicity assays

MDCK cells were grown in monolayer cultures in DMEM-F12 medium containing penicillin (10,000IU/ml) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS). The cultures were kept at 37°C in a humidified atmosphere plus 5% CO₂. Release of cells was performed by treating with a 2mM solution of ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) in cation-free/PBS and 0.05% trypsin for a few minutes. After counting, the cells were then resuspended in an adequate volume of medium supplemented

with FCS and allowed to adhere and grow for 24h. Cells were then evaluated in the presence or absence of recombinant phospholipases (10, 50 and 100 µg/ml). During the experiments, the plates were photographed at 24 and 48h using an inverted microscope (Leica-DMIL, Wetzlar, Germany), and changes in cell morphology were evaluated. Alternatively, cytotoxicity assays were carried out on 96-well plates (TPP, Trasadingen, Switzerland). Cells (5×10^3 cells/well) were plated and allowed to adhere and grow for 24h before incubation with recombinant toxins at concentrations of 10, 50 and 100 µg/ml for 24 and 48h in hexaplicate. After toxin incubation, the measurement of toxicity was performed by estimation of viability by neutral red uptake (Merck, Darmstadt, Germany) as described by Freshney (2000). The same experimental conditions were used with a control group except that the medium contained adequate amounts of vehicle (PBS) rather than toxins. The cell viability of the control group (in the absence of toxins) was normalized to 100%.

Kidney sections immunofluorescence assays

For immunofluorescence microscopy, kidney tissues from wild-type and mutated treated animals were fixed with 2% paraformaldehyde in PBS for 30min at 4°C, incubated with 0.1 M glycine for 3min, and blocked with PBS containing 1% BSA for 1h at room temperature. Histological sections were incubated for 1h with specific antibodies raised against phospholipase-D (2 µg/ml) as described in Reagents. The sections were washed three times with PBS, blocked with PBS containing 1% BSA for 30min at room temperature, and incubated with fluorescein-conjugated anti-rabbit IgG secondary antibodies (Sigma) at room temperature for 40min. After washing, samples were mounted with Fluormont-G (Sigma) and observed under a fluorescence confocal microscope (Confocal Radiance 2,100, BioRad, Hercules, USA) coupled to a Nikon-Eclipse E800 with Plan-Apochromatic objectives (Sciences and Technologies Group Instruments Division, Melville, USA).

Statistical analysis

Statistical analysis of biochemical parameters and viability data were performed using analysis of variance (ANOVA) and the Tukey test for average comparisons GraphPad InStat program version 3.00 for Windows 2000. Mean \pm S.E.M. values were used. Significance was determined as $p \leq 0.05$.

Results

Histopathologic findings in kidneys from mice that received wild-type phospholipase-D but not mutated toxin

In order to obtain information on a direct correlation of the catalytic activity of phospholipase-D toxins from brown spider venom and renal damage, mice were intraperitoneally exposed to wild-type toxin and to mutated toxin isoform for 6h. Light microscopic analyses of renal biopsy specimens collected from animals that received wild-type toxin (as depicted in fig. 1B) revealed remarkable alterations including diffuse glomerular edema, red blood cells and collapse of Bowman's space, diffuse hyalinization with proteinaceous material within the proximal and distal tubules lumen, and diffuse edema of proximal and distal tubular epithelial cells compared to control (fig. 1A). Analyses of materials from animals that received mutated toxin showed no apparent signals of alterations (fig.1C).

Ultrastructural evidence of renal injuries caused by wild-type toxin but not mutated isoform

To improve the understanding of histopathological findings described through light microscopy analyses of materials collected from mice exposed to toxins, which pointed the nephrotoxicity of wild-type phospholipase-D but not mutated molecule, biopsies from toxins-treated mice were studied by transmission electron microscopy. As depicted in figure 2, ultrastructural findings supported additional signs of renal disturbances. Analyses of materials collected from mice exposed to wild-type toxin showed evidence of glomerular damage characterized by disturbed foot processes and filtration slits of epithelial cells and alterations of fenestrated endothelial cells at the capillary level. Tubule injuries included deposition of amorphous electron-dense material into the lumen of tubules, a massive edema of epithelial cells with an apparent decrease of lumen of tubules, a deep accumulation of multivesicular bodies and electron-dense structures inside of epithelial cells and a diffuse destruction of cells of connective tissue neighboring to tubules. Comparatively, analyses of

materials from mice exposed to mutated toxin and control pointed no signs of cell destruction.

Laboratory investigations after administration of wild-type toxin and mutated phospholipase-D isoform

With the goal to confirm noxious effects followed wild-type phospholipase-D treatment and to further evaluate the involvement of catalysis in these effects, we additionally determined biochemical parameters as urinalysis and serum urea comparing wild-type toxin-treated mice with toxin mutated group. As shown in Table I, serum urea was significantly increased in wild-type toxin-treated mice compared to mutated toxin group. Similarly, hematuria was evidenced in wild-type toxin-treated animals compared to group that received mutated isoform. These data together with histopathological findings supported the idea of phospholipase-D catalysis upon nephrotoxicity following toxin exposure.

Experimental evidence that wild-type phospholipase-D but not mutated isoform causes proteinuria in mice

With the objective to corroborate that the catalytic activity of phospholipase-D from brown spider venom is direct involved upon nephrotoxicity, mice that received *i.p.* injections of wild-type toxin and mutated isoforms had their urine collected and checked for protein concentration (proteinuria). Figure 3A depicts a significant alteration of renal function detected by the presence of a high concentration of proteins following wild-type toxin exposure but not mutated toxin, assayed by Bradford Method. Additionally, to strengthen this evidence urine from wild-type and mutated phospholipase-D-treated mice were electrophoresed in a 12% SDS-PAGE under reducing conditions and stained with Coomassie Blue Dye. As shown in figure 3B, we were able to confirm the presence of proteins in the urine from wild-type phospholipase-D-treated animals in a concentration-dependent manner compared to an absence in the mutated group, confirming the above described results and strengthen the idea of a catalytic dependent activity for venom phospholipase-D nephrotoxicity.

Comparative mouse mortality induced by wild-type recombinant toxin and mutated isoform

It is known that mouse mortality due to *Loxosceles* spider venom is attributed to the dermonecrotic (phospholipase-D) fraction of the venom and that systemic loxoscelism such as acute renal failure is responsible by complications of accidented victims (Futrell, 1992; da Silva et al., 2004). Therefore, to analyze the involvement of catalytic activity of phospholipase-D upon deleterious effects of brown spider venom, Swiss mice were exposed *i.p.* to wild-type and mutated toxins. The death: survival ratio was determined after 8, 16, 24 and 48h. Wild-type phospholipase-D induced mice mortality and oliguria in a concentration and time-dependent manner, while the mutated toxin and the negative control (animals that received a recombinant toxin without sphingomyelinase activity) showed no lethal effects (table II).

Evidence that wild-type phospholipase-D and mutated toxin bind to intrinsic renal components

With the purpose to demonstrate a direct interaction of phospholipase-D toxin from brown spider venom to kidney structures, we investigated renal biopsies from wild-type toxin-treated and mutated toxin-treated animals by immunofluorescence and confocal microscopy using an antibody, which reacts with the phospholipase-D. As shown in figure 4A, the antibody reaction produced a positive signal in renal biopsies from both wild-type toxin-treated mice and with the samples from mutated toxin-treated group. Results show a positive profile as a typical linearly punctuated staining at cell-cell borders or cell surface of tubules and supported the direct binding of both toxins in a catalytic domain-independent manner. Additionally, urine from wild-type toxin-treated and mutated toxin-treated mice were electrophoresed and immunoblotted with the same hyperimmune serum. As shown in figure 4B, we were able to detect a positive signal at region of 30kDa in the wild-type toxin-treated urine compared to an absence in the mutated isoform-treated group, suggesting that wild-type toxin blocked tubular protein reabsorption and/or intracellular metabolism

compared to mutated isoform and identifying the catalytic activity of phospholipase-D toxin as playing a role in the deleterious activity upon kidney structures.

Comparative effects of wild-type phospholipase-D and mutated phospholipase-D on the morphology and viability of kidney tubule epithelial cells

To ascertain the renal damage evoked by phospholipase-D of *Loxosceles* spider venom and further to analyze the involvement of catalytic activity of this enzyme upon kidney noxious effects, MDCK cells were exposed to recombinant wild-type toxin and to mutated isoform. As depicted in figure 5A, wild-type toxin treatment induced appearance of blebs and cytoplasmic vacuolization, caused defective cell spreading and detached cells from each one and culture substratum, which enhanced in a time and toxin-dependent way. Interestingly mutated toxin did not evoke any kind of cellular change, even at the higher toxin concentration used. Experiments on the cellular viability by Neutral-Red Uptake (fig. 5B) indicated a significant alteration of MDCK cell viability following wild-type phospholipase-D exposure when compared to mutated toxin. Finally, scanning electron microscopy analysis (fig. 5C) of cells exposed to wild-type toxin pointed for morphological changes including cell detachment from one-another and from culture substratum, as well as rounded cell shape with retraction of cytoplasmic volume, reduction of cell body area and a rounded center. Cells without toxin treatment (control) and cells treated with mutated toxin show typical morphology of MDCK cells in culture. These *in vitro* experiments strengthen the idea of phospholipase-D nephrotoxicity and point for the involvement of catalytic activity of toxin.

Discussion

Brown spider accidents are commonly associated at the bite site with dermonecrosis, gravitational spreading and a massive inflammatory response, along with systemic problems that may include hematological disturbances and renal failure (Futrell, 1992; da Silva et al., 2004; Hogan et al., 2004; Swanson and Vetter, 2006). The mechanisms by which the venom exerts its nephrotoxic effect is currently under investigation, while it is known that the venom contains a major toxin family (dermonecrotic toxin, biochemically a phospholipase-D) that can experimentally induce dermonecrosis, inflammatory response, animal mortality, platelet aggregation, hemolysis, and endothelial cell hyperpermeability (Futrell, 1992; da Silva et al., 2004; Hogan et al., 2004; Swanson and Vetter, 2006).

The nephrotoxic effect of *Loxosceles* spiders venom are demonstrated based on the clinical and laboratory features observed in accidented victims, which can include elevated creatine kinase levels, hematuria, hemoglobinuria, proteinuria and shock (Williams et al., 1995; Bey et al., 1997; Lung and Mallory, 2000; França et al., 2002). Additionally, nephotoxicity is supported by animal experimental protocols, which comproved clinical data from accidented patients and pointed renal lesions followed venom exposure (Luciano et al., 2004) and a direct nephrotoxicity evoked by the dermonecrotic (phospholipase-D) toxin (Chaim et al., 2006).

Previous studies have characterized dermonecrotic toxin as a sphingomyelinase-D molecule based on its activity to hydrolyze the phospholipid sphingomyelin into choline and acylsphingosine phosphate (Futrell, 1992). Nevertheless, based on lipid biochemical analysis the term sphingomyelinase-D has been replaced by phospholipase-D to represent a more accurate and broader denomination since the toxin hydrolyzes not only sphingophospholipids but also glycerophospholipids to generate ceramide-1-phosphate (C1P) or lysophosphatidic acid (LPA) (Lee and Lynch, 2005). It is postulated that by hydrolyzing phospholipids that generate ceramide-1-phosphate or lysophosphatidic acid, the dermonecrotic toxin activates signaling pathways in different cells causing pathophysiological changes such as

inflammatory response, platelet aggregation, and increased blood vessel permeability (Anliker et al., 2004; Moolenaar et al., 2004; Lee and Lynch, 2005).

The previous denomination of one dermonecrotic toxin today has been changed to the idea of a family of related toxins. A family of resembling molecules for dermonecrotic toxins was first suggested based on a biochemical characterization of a native toxin from *L. reclusa* venom in which four toxins were described (Futrell, 1992). Immunological studies found antigenic cross-reactivity for dermonecrotic toxins from different brown spider venoms, including *L. gaucho*, *L. laeta* and *L. intermedia* (Barbaro et al., 1996). Additionally, immunological and biochemical analyses of *L. reclusa* and *L. deserta* venom showed antigenic cross-reactivity and biochemical homologies (amino acid composition) for dermonecrotic toxins (Gomez et al., 2001). Also, two phospholipase-like toxins were described in *L. gaucho* (Cunha et al., 2003) and four in *L. boneti* venom (Ramos-Cerrillo et al., 2004). Through proteomic studies dermonecrotic toxins have been identified in *L. gaucho* venom (Machado et al., 2005), thereby supporting the idea of a toxin family. Finally, through molecular biology studies this concept was further supported by the cloning and expression of phospholipase-D toxins from a variety of *Loxosceles* spiders. Binford et al. (2005) reported three cDNA sequences for phospholipases in *L. arizonica*. Chaim et al. (2006) and da Silveira et al. (2006, 2007b) and Appel, et al. (2008) using a cDNA library obtained from the venom gland of *L. intermedia*, cloned, expressed and reported differential functionality for sex related toxins classified as phospholipases. Today, a family of similar phospholipases is recognized and the noxious effects induced by *Loxosceles* whole venom putatively represent a family synergism among these toxins (Kalapothakis et al., 2007).

In this study, by using two recombinant isoforms of the phospholipase-D toxin from *L. intermedia* venom gland, a wild-type molecule and a single amino acid mutated H12A at the catalytic site of toxin (Chaim et al., 2008), we have experimental data that supports the involvement of phospholipase-D activity upon nephrotoxicity evoked by the toxin. Our first results are based on histochemical findings from renal biopsies followed toxins exposure. Renal damage caused by wild-type toxin but not by mutated isoform is evidenced by glomerular and tubular changes (light

microscopy and ultrastructural analyses) from mice that received intraperitoneal injections of toxins. Tubular epithelial cells from wild-type-treated animals show an increase in cytoplasmic vacuoles and electron dense vesicles. Such an explanation comes from the fact that the degradation of sphingolipids occurs in lysosomal compartments (Huwiler et al., 2000). Fragments of plasma membrane containing sphingolipid metabolites generated by toxin exposition can be endocytosed and traffic through the endosomal compartments to the lysosome to a final degradation. The azotemia detected by the increase in serum urea, and biochemical urine changes as hematuria followed wild-type toxin exposure but not mutated toxin, further evidenced the nephrotoxicity caused by phospholipase toxin and the catalytic activity of this molecule. Moreover, the prominence proteinuria observed after wild-type toxin exposure but not mutated molecule supported the participation of catalytic domain of phospholipase toxin as playing a role on nephrotoxicity.

Interestingly, by confocal immunofluorescence microscopy using antibodies to phospholipase toxin, we were able to detect both wild-type and mutated toxins as “planted antigens” deposited mainly along the tubular structures of animals exposed to these molecules. Nevertheless, through immunoblotting analysis of urine from wild-type or mutated toxin-treated mice using antibodies to venom phospholipase, we identified the presence only of wild-type toxin but not mutated isoform at 30kDa region, confirming wild-type toxin as a nephrotoxic agent. The rational explanation of the above mentioned results comes from physicochemical properties of recombinant toxins (low molecular mass and neutral isoelectric point), since glomerular barrier function is dependent on the molecular mass of proteins (molecules with mass lower than 70kDa are more permeable than larger proteins) (Farquhar, 1991; Cotran *et al.*, 1999) Then, both toxins can pass through the glomerular barrier binding to the tubular structures where wild-type toxin is cytotoxic changing tubular protein reabsorption and causing proteinuria. Mutated toxin on the other hand, in spite of binding to the tubular structures is devoided of cytotoxicity, does not alter tubular epithelial cells and does not change tubular protein reabsorption. Additionally, the presence of wild-type toxin in the urine of treated animals confirmed this protein as a tubular injurer molecule and can explain acute renal failure seem following brown

spider envenomation, in a similar way of the pathogenesis of nephrotoxic acute tubular necrosis (Cotran *et al.*, 1999) and strengthened the idea of catalytic domain of this toxin as playing a role on such deleterious activity.

Wild-type phospholipase toxin nephrotoxicity was additionally proved by using MDCK epithelial cells in culture. Cells treated in culture with wild-type toxin, but not mutated molecule, showed a potent noxious activity, especially on disturbance of cell morphology, which induced the appearance of vacuoles in cytoplasm, changed their spreading aspect and caused defective cell-cell and culture substratum. Likewise, the toxin also inhibited cellular viability in a concentration and time dependent way further demonstrating a toxin direct cytotoxicity and additionally comprovig the involvement of catalytic domain for phospholipase activity as playing a role on nephrotoxicity.

Since mice were used (an animal model which does not develop dermonecrotic lesions) (Futrell, 1992; da Silva *et al.*, 2004), we can rule out nephrotoxicity *in vivo* secondary to complications of dermonecrosis. This conclusion is similarly corroborated by the wild-type toxin direct cytotoxicity upon MDCK cells *in vitro*. In contrast to cutaneous lesion in which polymorphonuclear leukocytes play an essential role in the pathogenesis (an aseptic coagulative tissue necrosis) (Elston *et al.*, 2000; Ospedal *et al.*, 2002), the renal injury evoked by wild-type phospholipase toxin is not associated with inflammatory changes, since leukocytes were not observed along the injured renal structures followed toxin exposure.

What is the biochemical mechanism by which phospholipase-D toxins from brown spider venom cause nephrotoxicity? We postulated based on the physicochemical properties of wild-type toxin (approximately 30kDa and pI 7.2), together with its water solubility, that these properties can account for the binding of this molecule to kidney structures and consequent nephrotoxicity. Finally, the direct correlation between phospholipase-D activity and nephrotoxicity, can be speculated by experimental data as reported herein and strengthened by the fact that brown spider venom phospholipases can generate lysophosphatidic acid and/or ceramide-1-phosphate that are known to induce several pathological responses, including inflammation and platelet aggregation (Anliker *et al.*, 2004; Moolenaar *et al.*, 2004; Lee and Lynch,

2005). Then, by generating lipid mediators from renal tissue structures (wild-type toxin binds to kidney), venom phospholipases stimulate renal damage by rendering cell membranes more open to physiological stress that can contribute to renal injuries. Transformation of sphingomyelin to ceramide would alter global membrane properties such as lipid rafts and membrane fluidity, triggering intracellular pathways (Huwiler et al., 2000). Additionally, sphingomyelin metabolites generated by toxin action, such as ceramide and ceramide-1-phosphate could target to membrane receptors that lately will trigger intracellular stimulation. Literature data have been described intracellular changes after ceramide stimulation such as mitogen-activated protein kinase (MAPK), extracellular signal-regulated kinases (ERK-1 and ERK-2) and stress-activated protein kinases (SAPK/JNK) subfamily regulating essential aspects of cell function as metabolism, secretion and gene expression (Huwiler et al., 2000). Finally, the results described herein are strengthened by the fact that sphingolipid metabolites and ceramide are acute renal stress agents that are altered in diverse renal insults and with special emphasis in ischemic and nephrotoxic acute renal failure, as is the case reported here (Zager et al., 1998). Additionally, it has been reported that sphingolipid metabolism play a pathophysiology role in a variety of renal-specific processes (Shayman, 1996; 2000).

Data described herein indicates the participation of catalytic activity of phospholipase-D from brown spider venom playing a role on nephrotoxicity, brings insights into loxoscelism and offers contribution on the possibility of a therapy based on inhibition of catalysis of phospholipase toxin.

Acknowledgments

This work was supported by grants from Secretaria de Estado de Ciência, Tecnologia e Ensino Superior (SETI) do Paraná, Fundação Araucária-PR, CNPq and CAPES, Brazil.

Legends

Figure 1. Light microscopy analysis of kidneys from wild-type and mutated toxin-treated mice. Sections of kidneys from mice treated with wild-type and mutated phospholipases were stained with HE and analyzed by light microscopy. (A) Appearance of normal glomerulus (1) and tubules (2) of control animals that did not receive toxins. (B) Cross-section of glomerulus (1) showing edema, erythrocytes (arrowheads) and collapse of Bowman's space (arrows) and tubule structures (2) showing accumulation of proteinaceous material within the proximal and distal tubules lumen and edema (arrows) of materials obtained from wild-type treated animals. (C) Details of glomerular cross-section (1) and tubule structures (2) of kidneys exposed to mutated toxin. Note absence of pathological alterations similarly to control animals (magnification 400x).

Figure 2. Ultrastructural analysis of kidneys from wild-type and mutated toxin-treated mice. Transmission electron micrographs of cross-sectioned kidneys exposed to wild-type and mutated toxins. (A) Micrographs from biopsies of control animals. Details of glomerular filter structure (1) showing preserved foot processes (white arrow) and fenestrated endothelium membrane (black arrow), (2) tubule structure (arrow depicts a preserved lumen of a proximal tubule), (3) Details of tubular epithelial cell cytoplasm (arrow points to mitochondria collection), (4) a group of cells from connective tissue neighboring tubular structure (arrows show preserved cytoplasm of cells). (B) Micrographs from biopsies of wild-type toxin-treated mice. Details of glomerular filter structure (1) showing alterations of foot processes and filtration slits (white arrow) and fenestra of endothelial cells (black arrow), (2) tubule

structure (arrow depicts occlusion of tubular lumina and edema of cells, (3) Details of tubular epithelial cytoplasm (white arrows point to a increased number of electron-dense bodies and black arrows show heterologous vesicular structures), (4) a damaged cell from connective tissue among tubules (arrow points to the lyses of cytoplasm). (C) Micrographs from biopsies of kidney obtained of mutated toxin-treated mice. (1) Details of glomerular filter structure (arrows), (2) proximal tubule lumen (arrow), (3) tubular epithelial cytoplasm (arrow) and (4) a connective tissue cell with preserved cytoplasm (arrow). Note that analyses of biopsies from animals exposed to mutated toxin show no signs of cytotoxicity.

Figure 3. Treatment of mice with wild-type phospholipase but not with mutated toxin causes proteinuria. (A) Animals (n=6) received intraperitoneal injections of recombinant toxins at indicated concentrations and after 6h had collected urine, from which was determined protein concentration followed Bradford Method (Coomassie brilliant blue G-250). Values given are the average \pm SEM. (B) Urine samples (10 μ l) collected from control animal that did not receive toxins (lane 1), animals which received mutated toxin 10, 50 and 100 μ g (respectively lanes 2 to 4) and animals exposed to wild-type toxin 10, 50 and 100 μ g (respectively lanes 5 to 7) were separated by 12% SDS-PAGE under reducing conditions. The gel was stained by Coomassie blue dye. Molecular protein standard position masses are shown on the left of figure.

Figure 4. Direct binding of phospholipase toxins to kidney tubular structures. Fig.(4A) Confocal immunofluorescence microscopy analysis of kidney sections from toxin-treated mice. Cross-sectioned kidneys immunostained with antibodies against venom phospholipase and fluorescence cytochemistry for nuclei with the blue fluorescent dye DAPI. (A) Sections of a kidney from control group, which did not receive toxins. Staining of nuclei with DAPI at regions of glomerulus (1) and tubules (2). (B) Kidney sections from wild-type-treated animals showing regions rich in glomeruli (1, arrowhead) and tubules (1, arrows) and a region rich in tubules (2, arrows). (C) Sections of biopsies from mutated toxin-treated animals. Glomerular

region (1, arrowhead), tubular region (1, arrows) and tubular region (2, arrows). Results point for "planted antigen" in kidney tubular structures from both wild-type and mutated toxins-treated mice. The positivity is apparently restricted to tubular structures and shows a fluorescence profile of punctuated staining at tubular cells surface (magnification 400x). Fig. (4B) Samples of urine (10 μ l) collected from wild-type-treated animals (lanes 2 and 3) and mutated toxin-treated mice (lanes 5 and 6) were separated by 12% SDS-PAGE under reducing conditions. The gel was transferred to a nitrocellulose membrane that was immunoreacted with antibodies against venom phospholipase (lanes 3 and 6) or preimmune serum (lanes 2 and 5). Lanes 1 and 4 depict respectively purified recombinant wild-type and mutated toxins as control for immunopositivity. Molecular protein standard masses are shown on the left of figure (B).

Figure 5. Effect of wild-type and mutated toxins on the morphology and viability of tubular epithelial cells. (A) MDCK cells exposed to wild-type toxin or mutated isoform were observed in an inverted microscope. For wild-type toxin-treated cells the cytoplasm of the cells becomes vacuolated in a toxin concentration and time exposure way. Identically, cell spreading seems to be impaired and detachment from the substrate was observed. Analyses were performed at 8h and 24h after toxin exposure. Concentrations of purified toxins in culture medium were respectively 10 μ g/mL, 50 μ g/mL and 100 μ g/mL. For control, cells were analyzed in the absence of toxins (control). (B) Cytotoxic effect of toxins on MDCK epithelial cells was also analyzed by dye uptake (Neutral-Red uptake). Cytotoxic effect was determined after 24h and 48h at indicated concentrations of purified toxins. Experiments were performed in hexaplicates and values given are the mean \pm SEM. Significance is defined as *** $p < 0,01$. (C) Finally, cells were exposed to wild-type toxin or mutated molecule (10 μ g) for 8h and 24h and observed by using a scanning electron microscope. Micrographs show for cells exposed to wild-type toxin retraction of cytoplasm, rounded cell shape, desadhesion from culture substratum and from one-another, compared to negative control and mutated toxin exposed cells.

Table I Effects of recombinant toxins on mice mortality.

Table II Biochemical laboratory analyses of serum and urine from toxin-treated mice.

References

- Anliker, B., Chun, J., 2004. Lysophospholipid G Protein-coupled Receptors. *J. Biol. Chem.* 279, 20555-20558.
- Appel, M. H., da Silveira, R. B., Chaim, O.M., Paludo, K. S., Silva, D. T., Chaves, D. M., Silva, P. H., Mangili, O. C., Senff-Ribeiro, A., Gremski, W., Nader, H. B., Veiga, S. S., 2008. Identification, cloning and functional characterization of a novel dermonecrotic toxin (phospholipase-D) from brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. *Biochimica et Biophysica Acta- General Subjects*, 1780, 167-178.
- Barbaro, K.C., Sousa, M.V., Morhy, L., Eickstedt, V.R., Mota, I., 1996. Compared chemical properties of dermonecrotic and lethal toxins from spiders of the genus *Loxosceles* (Araneae). *J. Protein Chem.* 15, 337-343.
- Barbaro, K.C., Knysak, I., Martins, R., Hogan, C., Winkel, K., 2005. Enzymatic characterization, antigenic cross-reactivity and neutralization of dermonecrotic activity of five *Loxosceles* spider venoms of medical importance in the Americas. *Toxicon.* 45, 489-499.
- Bey, T.A., Walter, F.G., Lober, W., Schmidt, J., Spark, R., Schlievert, P.M., 1997. *Loxosceles arizonica* bite associated with shock. *Ann. Emerg. Med.* 30, 701-703.
- Binford, G.J., Cordes, M.H.J., Wells, M.A., 2005. Sphingomyelinase D from venoms of *Loxosceles* spiders: evolutionary insights from cDNA sequences and gene structure. *Toxicon* 45, 547-60.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.

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., 2006. Brown spider dermonecrotic toxin directly induces nephrotoxicity. *Toxicol. App. Pharmacol.* 211, 64-77.

Chaim, O. M., da Silveira, R. B., Silva, D. T., Ferrer, V. P., Nader, H. B., Gremski, W., Veiga, S.S. 2008. Mechanistic relationship of phospholipasic activity and toxicity of dermonecrotic toxin from brown spider venom. *In press*.

Cotran, R.S., Kumar, V., Robbins, S.L., 1999. *Pathologic basis of disease*. Elsevier, Boston.

Culling, C.F.A., Allison, R.T., Barr, W.T., 1985. *Cellular Pathology Technique*, Butterworth & Co Ltda, London, England.

Cunha, R.B., Barbaro, K.C., Muramatsu, D., Portaro, F.C.V., Fontes, W., Sousa, M.V., 2003. Purification and characterization of Loxnecrogin, a dermonecrotic toxin from *Loxosceles gaucho* brown spider venom. *J. Protein Chem.* 22, 135-146.

da Silva, P.H., da Silveira, R.B., Appel, M.H., Mangili, O.C., Gremski, W., Veiga, S.S., 2004. Brown spider and loxoscelism. *Toxicon* 44, 693-709.

da Silveira, R.B., Pigozzo, R.B., Chaim, O.M., Appel, M.H., Dreyfuss, J.L., Toma, L., Mangili, O.C., Gremski, W., Dietrich, C.P., Nader, H.B., Veiga, S.S., 2006. Molecular cloning and functional characterization of two isoforms of dermonecrotic toxin from *Loxosceles intermedia* (Brown spider) venom gland. *Biochimie* 88, 1241-1253.

da Silveira, R. B., Chaim, O. M., Mangili, O. C., Gremski, W., Dietrich, C. P., Nader, H. B., Veiga, S. S., 2007a. Hyaluronidases in *Loxosceles intermedia* (Brown spider) venom are endo- β -N-acetylhexosaminidases hydrolases. *Toxicon*, 49, 758-768.

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., 2007b. Two novel dermonecrotic toxins LiRecDT4 and LiRecDT5 from Brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom: from cloning to functional characterization. *Biochimie* 89, 289-300.

da Silveira, R. B., Wille, A. C. M., Chaim, O. M., Appel, M. H., Silva, D. T., Franco, C. R. C., Toma, L., Mangili, O. C., Gremski, W., Dietrich, C. P., Nader, H. B., Veiga, S. S., 2007c. Identification, cloning, expression and functional characterization of an astacin-like metalloprotease toxin from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. *Biochem. J.* 406, 355-363.

de Castro, C.S., Silvestre, F.G., Araújo, S.C., Gabriel, M.Y., Mangili, O.C., Cruz, I., Chavez-Olortegui, C., Kalapothakis, E., 2004. Identification and molecular cloning of insecticidal toxins from the venom of the brown spider *Loxosceles intermedia*. *Toxicon* 44, 273-280.

Elston, D.M., Eggers, J.S., Schmidt, W.E., Storrow, A.B., Doe, R.H., McGlasson, D., Fischer, J.R., 2000. Histological findings after brown recluse spider envenomation. *Am. J. Dermatopath.* 22, 242-246.

Farquhar, M.G., 1991. The glomerular basement membrane: A selective macromolecular filter. In Hay, E.D. ed.: *Cell Biology of the Extracellular Matrix*. Plenum Press, New York.

Feitosa, L., Gremski, W., Veiga, S.S., Elias, M.C.Q.B., Graner, E., Mangili, O.C., Brentani, R.R., 1998. Detection and characterization of metalloproteinases with gelatinolytic, fibronectinolytic and fibrinogenolytic activities in brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. *Toxicon* 36, 1039-1051.

França, F.O.S., Barbaro, K.C., Abdulkader, C.R.M., 2002. Rhabdomyolysis in presumed viscerocutaneous loxoscelism: report of two cases. *Trans. R. Soc. Med. Hyg.* 96, 287-290.

Freshney, R. I., 2000. *Culture of animal cells: a manual of basic techniques*, 4th. ed. Wiley-Liss, Inc. New York, USA.

Futrell, J., 1992. Loxoscelism. *Am. J. Med. Sci.* 304, 261-267.

Gomez, H.F., Miller, M.J., Waggener, M.W., Lankford, H.A., Warren, J.S., 2001. Antigenic cross-reactivity of venoms from medically important North American *Loxosceles* spider species. *Toxicon* 39, 817-824.

Henry, J.H., 2001. *Clinical diagnosis and management by laboratory methods*. United States, Saunders.

Hogan, C.J., Barbaro, K.C., Winkel, K., 2004. Loxoscelism: old obstacles, new directions. *Ann. Emerg. Med.* 44, 608-624.

Huwiler, A., Kolter, T., Pfeilschifer, J., Sandhoff, K., 2000. Physiology and pathophysiology of sphingolipid metabolism and signaling. *Biochim. Biophys. Acta.* 1485, 63-99.

Kalapothakis, E., Chatzaki, M., Dornelas, H.G., 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., 2007. The LoxTox protein family in *Loxosceles intermedia* (Mello-Leitão) venom. *Toxicon*, 50, 938-946.

Karnovsky, M.J., 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J Cell Biol* 27: 137A.

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

Lee, S., K.R. Lynch., 2005. Brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*) venom phospholipase D (PLD) generates lysophosphatidic acid (LPA). *Biochem. J.* 391, 317-323.

Luciano, M. N., Silva, P.H., Chaim, O.M., Santos, V.P., Franco, C.R.C., Soares, M.F.S., Zanata, S.M., Mangili, O.C., Gremski, W., Veiga, S.S., 2004. Experimental evidence for a direct cytotoxicity of *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom on renal tissue. *J. Histochem. Cytochem.* 52, 455-467.

Lung, J.M., Mallory, S.B., 2000. A child with spider bite and glomerulonephritis: a diagnostic challenge. *Int. J. Derm.* 39, 287-289.

Machado, L.F., Laugesen, S., Botelho, E.D., Ricart, C.A., Fontes, W., Barbaro, K.C., Roepstorff, P., Sousa M.V., 2005. Proteome analysis of brown spider venom: identification of loxnecrogin isoforms in *Loxosceles gaucho* venom. *Proteomics* 5, 2167-2176.

Moolenaar, W. H., van Meeteren, L. A. and Giepmans, B. N., 2004. The ins and outs of lysophosphatidic acid signaling. *BioEssays* 26, 870-881.

Ospedal, K.Z., Appel, M.H., Neto, J.F., Mangili, O.C., Veiga, S.S., Gremski, W., 2002. Histopathological findings in rabbits after experimental acute exposure to the *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. *Int. J. Exp. Path.* 83, 287-294.

Ramos-Cerrillo, B., Olvera, A., Odell, G.V., Paniagua-Solis, J., Alagón, A., Stock, R.P., 2004. Genetic and enzymatic characterization of sphingomyelinase D isoforms

from the North American fiddleback spiders *Loxosceles boneti* and *Loxosceles reclusa*. *Toxicon* 44, 507-514.

Sams, H.H., Dunnick, C.A., Smith, M.L., King, L.E., 2001. Necrotic arachnidism. *J. Am. Acad. Dermatol.* 44, 561-573.

Shayman, J. A., 1996. Sphingolipids: their role in intracellular signalling and renal growth. *J. Am. Soc. Nephrol.* 7, 171-182.

Shayman, J. A., 2000. Sphingolipids. *Kidney Int.* 58, 11-26.

Swanson, D.L., Vetter, R.S., 2006. Loxoscelism. *Clin. Dermatol.* 24, 213-221.

Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J., 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedures and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4350-4354.

Williams, S.T., Khare, V.K., Johnston, G.A., Blackall, D.P., 1995. Severe intravascular hemolysis associated with brown recluse spider envenomation. *Am. J. Clin. Pathol.* 104, 463-467.

Zager, R. A., Conrad, S. L., Sweeney, E. A., Igarashi, Y., Burkhart, K. M., 1998. Altered sphingomyelinase and ceramide expression in the setting of ischemic and nephrotoxic acute renal failure. *Kidney Int.* 53, 573-582.

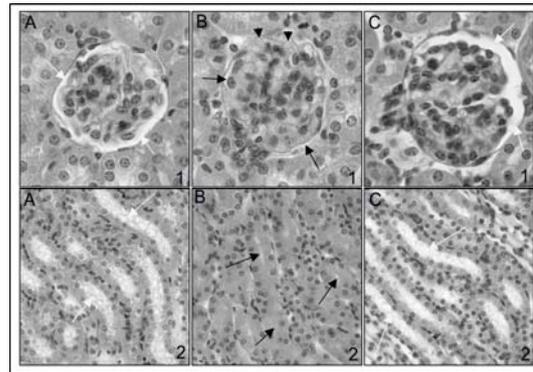


Figure 1

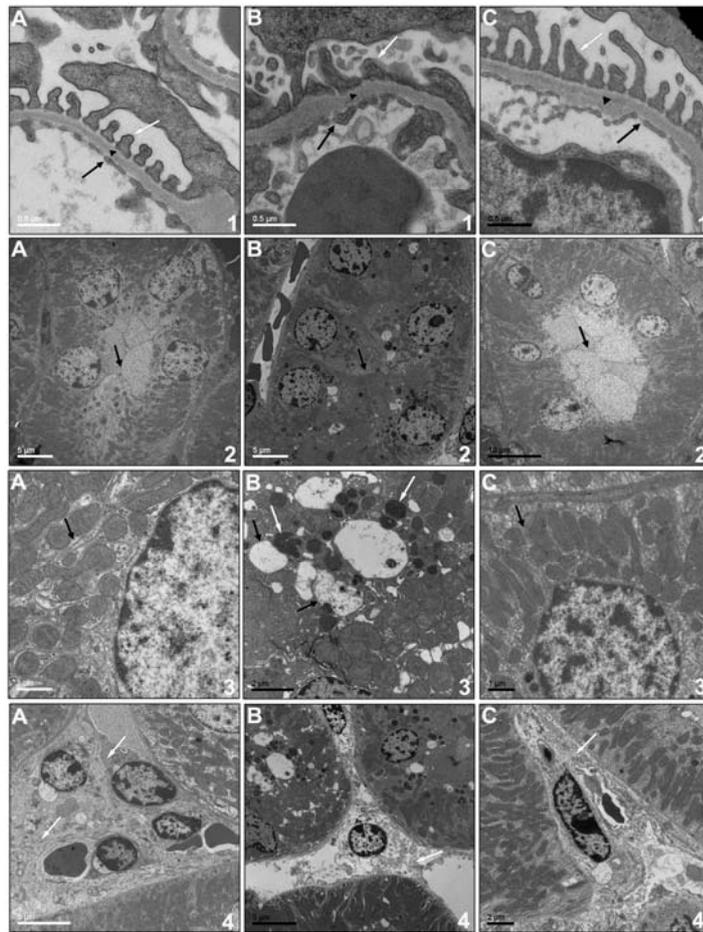


Figure 2

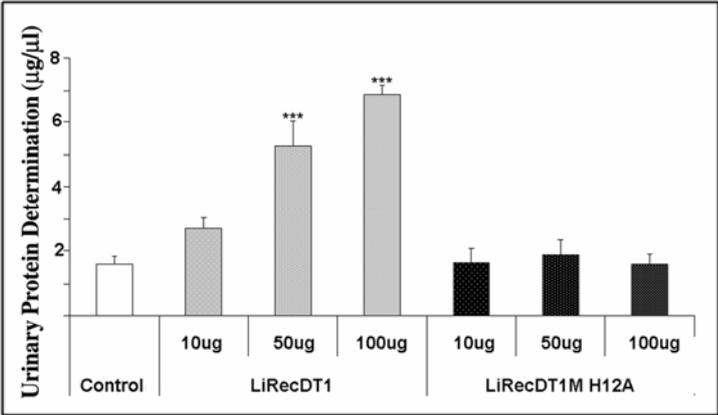


Figure 3A

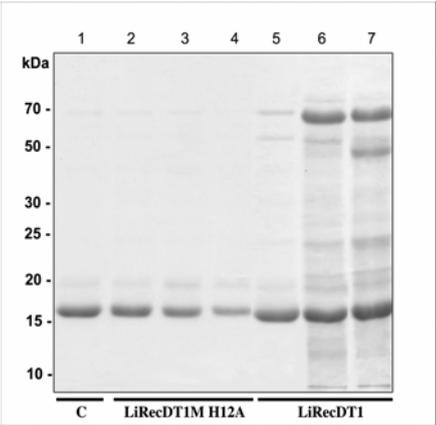


Figure 3B

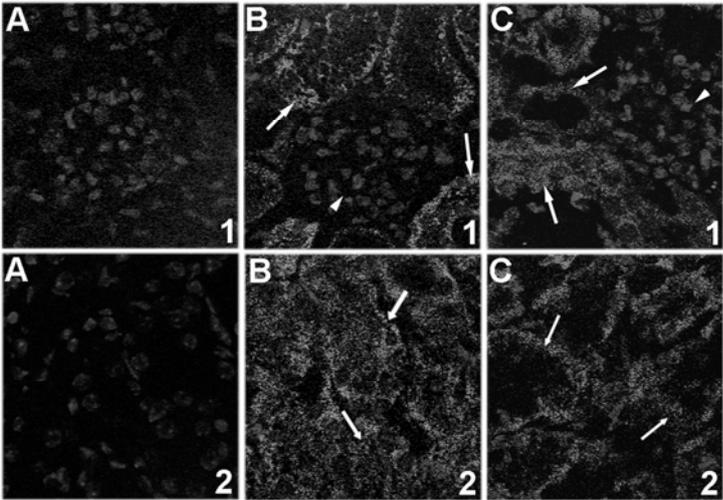


Figure 4A

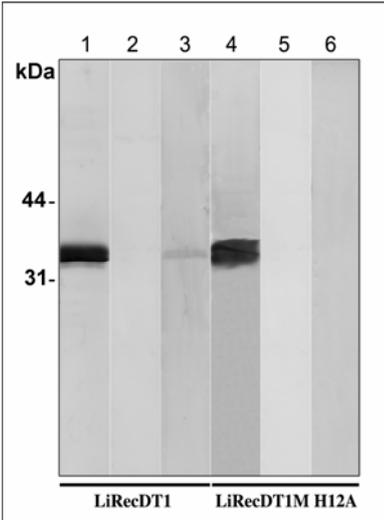


Figure 4B

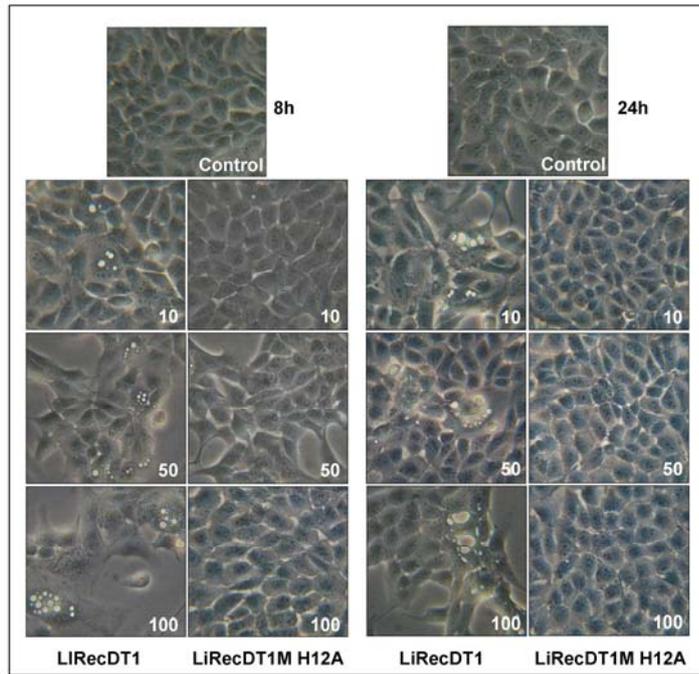


Figure 5A

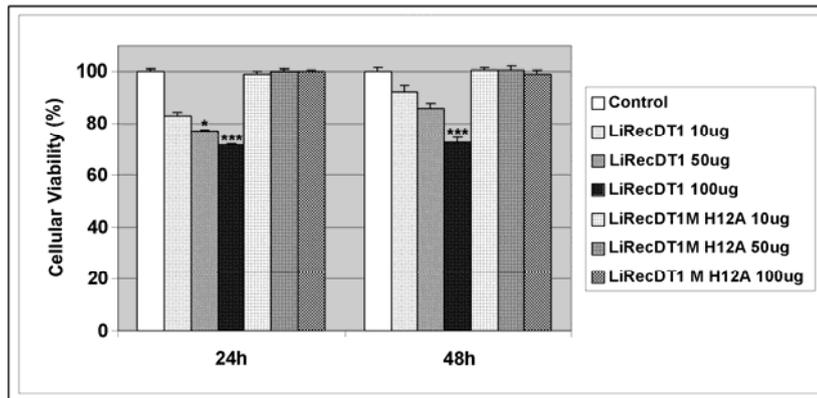


Figure 5B

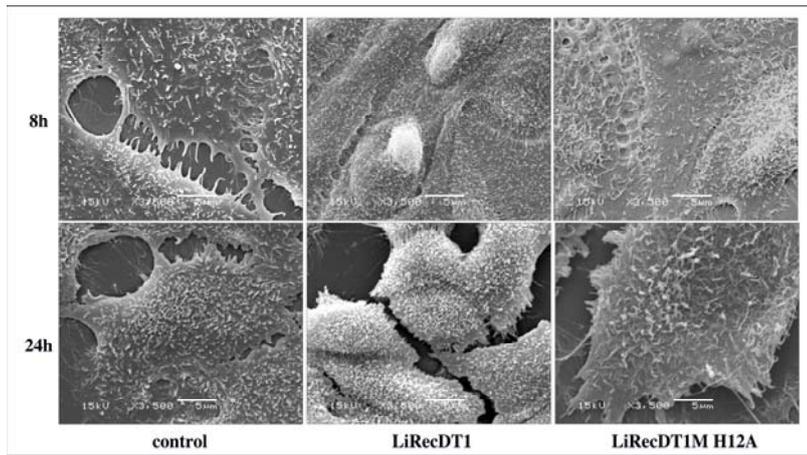


Figure 5C

Table 1: Biochemical Laboratory Analyses			
	Hemoglobinuria ^b	Hematuria ^b	Urea (mg/dL) ^a
Control			
1	-	-	34.0
2	-	-	44.0
3	-	-	46.0
4	-	-	47.0
5	-	-	47.0
6	-	-	48.0
*** LiRecDT1			
1	-	+	63.0
2	-	+	65.0
3	-	+	65.0
4	-	+	66.0
5	-	+	69.0
6	-	+	71.0
LiRecDT1M H12A			
1	-	-	35.0
2	-	-	39.0
3	-	-	40.0
4	-	-	43.0
5	-	-	43.0
6	-	-	47.0

^a Serum Urea significance is defined as $p < 0.5$, *t*-test
^b (-), negative; (+), positive.
 *** Significant differences ($p < 0.001$)

Table I

Lethality (%)	Control			LiRecDT1			LiRecDT1M H12A		
	10ug	50ug	100ug	10ug	50ug	100ug	10ug	50ug	100ug
8h	0/5 (0%)	0/5(0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)
16h	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	3/5 (60%)	4/5 (80%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)
24h	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	5/5 (100%)	5/5 (100%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)
48h	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	---	---	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)

Table II