

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
**Programa de Pós-Graduação em Farmácia**  
**Área de Análises Clínicas**

BIBLIOTECA  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Universidade de São Paulo

**Avaliação da atividade do veneno da *Loxosceles gaucho* sobre glóbulos  
vermelhos de coelhos**

**Karina Soeiro Prestes**

**Dissertação para obtenção do título de MESTRE**  
**Orientador: Prof. Assoc. Orlando C. de O. Barretto**

**São Paulo**  
**2003**

17860

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
**Programa de Pós-Graduação em Farmácia**  
**Área de Análises Clínicas**

**BIBLIOTECA**  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Universidade de São Paulo

**Avaliação da atividade do veneno da *Loxosceles gaucho* sobre glóbulos vermelhos de coelhos**

**Karina Soeiro Prestes**

**Dissertação para obtenção do título de MESTRE**  
**Orientador: Prof. Assoc. Orlando C. de O. Barretto**

**São Paulo**  
**2003**

DEDALUS - Acervo - CQ



30100005818

**Ficha Catalográfica**

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e  
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Prestes, Karina Soeiro  
P936a Avaliação da atividade do veneno da *Loxosceles gaucho* sobre  
glóbulos vermelhos de coelhos / Karina Soeiro Prestes. -- São  
Paulo, 2003.  
73p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas  
e Toxicológicas.

Orientador: Barretto, Orlando Cesar de Oliveira

I. Aracnídeo : Toxicologia I. T. II. Barretto, Orlando Cesar  
de Oliveira, orientador.

615.942 CDD

**Karina Soeiro Prestes**

**Avaliação da atividade do veneno da *Loxosceles gaucho* sobre  
glóbulos vermelhos de coelhos**

**Comissão Julgadora  
Da  
Dissertação para obtenção do grau de Mestre**

**Prof. Dr. Orlando Cesar de Oliveira Barretto  
orientador/presidente**

---

**1º examinador**

---

**2º examinador**

**São Paulo, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.**



**Dedico este trabalho aos meus pais, que  
sempre me apoiaram em tudo nesta  
vida.**

À minha querida filha Pietra

---

## **Agradecimentos:**

Ao professor Barretto, orientador e amigo, pela acolhedora confiança e orientação.

À Kátia, pela disponibilidade, colaboração e atenção.

Ao pessoal do laboratório de hematologia, por tudo e todos os momentos: Mariana, Ana, Solange e Ricardo...Vou sentir saudades.

À professora Primavera e ao Altair, pela confiança e oportunidade de trabalhar no laboratório, e muito pela grande amizade nestes anos.

Ao professor Paulo Silveira e as meninas do seu laboratório, pela atenção e disponibilidade ao usar o LORRCA.

Ao Flávio Tavares, cuja presença, boa vontade e profissionalismo, fizeram com que este trabalho se tornasse possível. Muito obrigada por tudo!

A todas minhas amigas-irmãs (Mi, Bi e Lô) e a outras pessoas que de alguma forma colaboraram para realização deste trabalho.

# ÍNDICE

<b>I-INTRODUÇÃO</b>	
Generalidades.....	2
Características do gênero <i>Loxosceles</i> .....	4
Loxoscelismo cutâneo.....	6
Loxoscelismo viscerocutâneo.....	8
O veneno.....	10
A membrana eritrocitária .....	13
<b>II-OBJETIVO.....</b>	<b>24</b>
<b>III-MATERIAL E MÉTODOS</b>	
1. Materiais	
1.1-Animal escolhido.....	25
1.2-Veneno.....	25
1.3-Delineamento experimental.....	26
2. Métodos	
2.1-Preparo do estroma eritrocitário.....	27
2.2-Dosagem de proteínas e solubilização do estroma.....	27
2.3-Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	28
2.4-Curva de fragilidade dos eritrócitos.....	28
2.5-Determinação da deformabilidade dos eritrócitos.....	29
<b>IV-RESULTADOS</b>	
4.1-Curva de fragilidade osmótica dos eritrócitos.....	33
Padronização da curva de fragilidade osmótica (Tabela 1).....	34
Gráficos referentes a fragilidade osmótica de eritrócitos dos coelhos envenenados..	
.....	35, 36, 37, 38
4.2-Ectacitometria.....	41
Padronização da ectacitometria (Tabela2).....	35
Gráficos referentes a ectacitometria de eritrócitos dos coelhos envenenados.....	
.....	43, 44, 45, 46
4.3-Eletroforese SDS-PAGE.....	49
Foto 9.....	50
Foto 10.....	51
<b>V-DISSCUSSÃO.....</b>	<b>52</b>
<b>VI-CONCLUSÃO.....</b>	<b>59</b>
<b>VII-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>60</b>

<b>VIII-RÉSUMO.....</b>	<b>72</b>
<b>VIII-ABSTRACT.....</b>	<b>73</b>

## I - INTRODUÇÃO

### Generalidades:

Loxoscelismo é uma síndrome necrosante-hemolítica causada pela picada de aranhas do gênero *Loxosceles* e o envenenamento humano tem sido descrito em várias regiões do mundo. (MARTINEZ-VARGAS, 1987; REES et al, 1983; CARDOSO et al., 1988; SCHENONE et al., 1989; BORKAN et al., 1995).

No Brasil, as espécies do gênero *Loxosceles* são responsáveis por pouco mais da metade dos acidentes envolvendo aracnídeos, colecionando um total de mais de 6000 casos, no período entre 1990 a 1993 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1999). O envenenamento pela picada das aranhas deste gênero vem sendo um dos acidentes com animais peçonhentos que mais cresce neste país, principalmente, devido ao fato do aumento exagerado da proliferação destas aranhas em algumas regiões do Brasil, nas quais chega a ser um problema de Saúde Pública, como na região metropolitana de Curitiba.

O gênero *Loxosceles* pertence à família Sicariidae, sub ordem Araneomorphae (SCHENONE e SUAREZ 1978) com ampla distribuição mundial nas zonas tropicais, subtropicais e temperadas (SCHENONE E LETONJA, 1975; BUCHERL 1960/2, 1961). No Brasil, é registrada a ocorrência de oito diferentes espécies (CARDOSO et al., 2003) distribuídas desde a região Amazônica até a região Sul (CARDOSO et al., 1988). A *Loxosceles gaucho*, *Loxosceles intermedia* e *Loxosceles laeta* são as espécies mais encontradas na região Sul e Sudeste do País, onde ocorrem o maior número de acidentes por picada de aranhas deste gênero.

No estado de São Paulo, a *Loxosceles gaucho* é a espécie encontrada com maior frequência (CARDOSO et al., 1988). MELLO-LEITÃO (1934) denominou por

quase trinta anos esta espécie de *Loxosceles rufipes*, BUCHERL (1961-1964) empregou a denominação de *Loxosceles rufescens* e, em 1967, GERTSCH a denominou de *Loxosceles gaucho* pelo fato desta aranha ser muito encontrada na região Sul do País.



Foto 1: *Loxosceles gaucho* (cortesia Instituto Butantan)

### **Características do gênero *Loxosceles*:**

As aranhas do gênero *Loxosceles* medem de 1 a 2 cm de corpo e 3 a 4 cm de envergadura (contando as pernas), sendo que os machos têm corpo mais delgado e pernas mais longas que as fêmeas. Apresentam um colorido marrom (por isso são chamadas popularmente de aranha marrom), com o abdômen mais escuro que o cefalotórax e as pernas (SCHENONE, 1978). Possui seis olhos dispostos em três pares (2-2-2), em semicírculos. Como característica distinta, a *Loxosceles laeta* possui uma mancha em forma de violino no cefalotórax, enquanto que a *Loxosceles gaucho* possui uma mancha clara em forma de estrela (JORGE et al, 1991).

As aranhas marrons possuem hábitos noturnos, preferindo lugares secos e escuros. Encontram-se sob pedras, cascas de árvores e em fendas de barrancos e cavernas (EICKSTED,1975). No peridomicílio, são encontradas em pilhas de tijolos, telhas e entulhos em geral. Elas se adaptam facilmente ao ambiente domiciliar, alojando-se atrás de móveis, cantos da parede, quadros e rodapés soltos e em locais de difícil limpeza.

As aranhas desta espécie são sedentárias, não agressivas e suas teias são de formato irregular, formada por fios adesivos que lembram um lençol esbranquiçado revestindo o substrato (JORGE et al., 1991). A grande parte dos casos de acidentes envolvendo *Loxosceles* ocorre nos meses mais quentes do ano e a localização anatômica mais comum da picada é na região centrípeta do corpo (SEZERINO et al., 1998; SCHENONE, 1989).

Os acidentes com aranha do gênero *Loxosceles* ocorrem, principalmente, quando elas são comprimidas contra a pele, durante o sono (CARDOSO et al., 1988; GAJADO-TOBAR,1966), ou mesmo quando elas se alojam dentro das vestimentas,



picando somente como uma forma de defesa. Em um grande percentual dos casos, a aranha não é notada; em mais de noventa por cento deles, a aranha não é identificada e o diagnóstico é presumtivo, baseado na aparência e progressão da lesão dermonecrótica típica (SEGER e MURRAY 1994).

A picada da aranha deste gênero causa duas formas clínicas distintas: o loxoscelismo cutâneo, que ocorre em oitenta e sete a noventa e nove por cento dos casos e é caracterizado por uma lesão dermonecrótica no local da picada, e uma outra forma menos freqüente (um a treze por cento dos pacientes) que é a evolução para forma víscero-cutânea de loxoscelismo, que, além da lesão local característica, apresenta efeitos sistêmicos como hemólise intravascular e podem apresentar insuficiência renal aguda, que tem sido relatada como a maior causa de óbitos nestes pacientes. (CARDOSO et al., 1988; MINISTÉRIO DA SAÚDE., 1999; SEZERINO et al., 1998).

## Loxoscelismo cutâneo

Na forma cutânea de loxoscelismo, a dor local se inicia aproximadamente primeira hora após a picada e aumenta de intensidade gradativamente (ROSENFELD et al., 1972). Na região da picada, aparece um eritema em cujo centro usualmente surge uma placa equimótica. Com o passar das horas ou dias, geralmente a lesão toma o aspecto que é chamado de "placa marmórea" ou "placa livedóide" (SCHENONE et al., 1989; GAJARDO-TOBAR, 1966), com mácula equimótica entremada e/ou envolta por área acizentada que, por sua vez, é rodeada por um ou mais halos hiperêmicos de intensidade decrescente. Vesículas e bolhas de conteúdo hemorrágico ou sero hemorrágico podem se formar (SCHENONE et al., 1989).

A lesão tende a se infiltrar para baixo por ação gravitacional (DILLAH et al., 1964) e, em sua base vai se delimitando uma endureção facilmente palpável entre os dedos do examinador (JORGE e RIBEIRO, 1989). Um exantema, que em geral é morbiliforme, pode surgir horas ou dias após a picada e, às vezes, torna-se nitidamente petequial após a atenuação do eritema. Nestes casos, a partir da segunda semana pode aparecer descamação da epiderme, sobretudo das extremidades e da região próxima à picada. A febre, quando ocorre, é um sintoma precoce (SCHENONE et al., 1989). No final da primeira ou segunda semana de evolução, muitas vezes, torna-se bem definida uma área necrótica de cor escura: forma-se uma crosta negra que, à medida que seca, diminui de tamanho, desprende-se da pele ao seu redor e por fim, da base da lesão. No local pode surgir uma úlcera de proporções variáveis que, habitualmente, atinge até a hipoderme e pode ter aspecto leishmaniótico (JORGE et al., 1991). A cicatrização da lesão ocorre de uma semana a dois meses, dependendo da extensão da lesão, e como

---

seqüela pode permanecer uma cicatriz desfigurante com ou sem prejuízo funcional (SEZERINO et al., 1998; JORGE et al., 1991).

Um estudo histológico da lesão é obviamente difícil. PIZZI et al., 1957 fez um estudo histopatológico da lesão em coelhos em três tempos diferente, três, seis e quarenta e oito horas de evolução da lesão. Nas primeiras três horas foi observado o acúmulo de neutrófilos nos vasos próximos à picada, eritrócitos extravasculares foram encontrados sugerindo a perda da integridade vascular. Depois de seis horas, havia edema na derme e epiderme, uma intensa infiltração de polimorfonucleares nos vasos sangüíneos, vasodilatação, formação de coágulos intravasculares, necrose, vacuolização da parede de arteríolas e uma hemorragia intensa na derme e músculos adjacentes. Nas quarenta e oito horas subseqüentes, o aumento da infiltração de leucócitos polimorfonucleares mostrou-se presente. A presença destas células tem um papel de destaque na formação da lesão necrótica. Apesar de o veneno não exercer ação direta sobre os neutrófilos (MAJESK et al., 1977; BABCOCK et al., 1986), ocorre o recrutamento dos mesmos para o local da lesão, devido à ação deste veneno em outras células e sistemas.

SMITH e MICKS (1970) evidenciaram a importância de leucócitos polimorfonucleares e do sistema complemento na formação da lesão necrótica. Neste trabalho, foi induzida a leucopenia em coelhos e os pesquisadores observaram que não houve a formação da lesão após injeção intradérmica do veneno de *Loxosceles reclusa*. No mesmo trabalho, foi utilizado zimosan para inibir a via alternativa do complemento em cobaias, e da mesma maneira não ocorreu o aparecimento da lesão e nos dois experimentos foi inibido o recrutamento de leucócitos polimorfonucleares no local da injeção do veneno.

## Loxoscelismo viscerocutâneo

O Loxoscelismo-cutâneo visceral é bem mais raro, variando de acordo com a região do país de 1 a 13% (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1999) dos casos de acidentes por picada de aranhas do gênero *Loxosceles*; acomete sobretudo crianças (VORSE et al., 1972) e sobrevém horas ou dias após a picada (SEZERINO et al., 1998).

A sintomatologia mais freqüente deste quadro compreende diarreia, agitação (JORGE et al., 1991) no entanto se faz importante salientar que estas alterações sistêmicas podem ocorrer tanto na forma cutânea, como na forma cutâneo-visceral. O forma cutâneo-visceral é caracterizada por hemólise intravascular intensa, com conseqüente hemoglobinúria e icterícia. Trombocitopenia e coagulação intravascular disseminada podem ocorrer (FUTRELL, 1992 ; JORGE et al., 1991). Com a lesão do eritrócito e conseqüente liberação da hemoglobina para circulação os túbulos renais podem ser obstruídos e ter sua integridade comprometida, sendo o comprometimento renal a maior causa de óbito dentre estes pacientes (CARDOSO et al., 1988; FUTRELL, 1992).

O óbito nestes casos é comum, mas, freqüentemente, o paciente que sobrevive não apresenta nenhuma seqüela além da cicatriz relativa à lesão cutânea. Não existe correlação entre o tamanho da lesão no local da picada e o aparecimento de hemólise (GAJARDO-TOBAR, 1966; JORGE e RIBEIRO, 1989).

O motivo pelo qual alguns pacientes desenvolvem a forma cutânea e outros a viscerocutânea de loxoscelismo não está bem esclarecido. ANDRADE et al., 1999, ao investigarem diferenças intraespecíficas do veneno da *Loxosceles intermedia*, verificaram que as fêmeas produzem uma quantidade maior de veneno e este apresenta um potencial dermonecrótico e hemolítico maior do que os dos machos

---

da espécie. Outros fatores também estão relacionados quanto à severidade dos acidentes causados pelo gênero *Loxosceles* como a espécie de envolvida, sendo a *L. laeta* a maior responsável pelos acidentes que apresentam evolução para o quadro cutâneo-visceral (SEZERINO et al., 1998; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1999), o estágio de desenvolvimento da aranha (ANDRADE et al., 1999) e algumas características relacionadas, como o próprio paciente, podem contribuir para determinar a gravidade do caso, como a idade e o local da picada (SEZERINO et al., 1998), além de características genéticas do paciente, sendo os deficientes de G6PD possivelmente mais suscetíveis a uma evolução mais grave, com maiores probabilidade de desenvolver a forma sistêmica de loxoscelismo (BARRETTO et al., 1985).

## O veneno

O veneno loxoscélico possui em sua composição uma série de componentes que têm sido descritos a partir do isolamento e caracterização das suas toxinas. Entre eles os principais são lipases, hialuronidase, fosfatase alcalina, 5' ribonucleotidase e hidrolases. (WRIGHT et al., 1973; GEREN te al., 1974; GEREN et al., 1975; GEREN et al., 1976; NORMENT et al., 1979; REKOW et al., 1983; BABCOCK et al., 1986).

Alguns dos componentes do veneno foram caracterizados quanto a sua função biológica e relacionados à formação da lesão, assim como desencadeadores dos efeitos sistêmicos. O espalhamento gravitacional da lesão foi atribuído a componentes com massa molecular de 33 e 63 kDa encontrados no veneno da *Losceles gaucha*, que exercem uma degradação do ácido hialurônico (WRIGHT ET AL., 1973). Outros componentes importantes na difusão do veneno e na progressão da área lesada foram caracterizados por FEITOSA et al. (1998) em veneno da *Loxosceles intermedia*. No presente trabalho, foi observada a presença de duas metaloproteinases no veneno, a primeira, denominada Loxolisina A (com massa molecular de 20-28 kDa) que mostrou ter atividade de degradação em componentes da matriz extra celular como o fibrinogênio e a fibronectina. A segunda metaloproteinase, observada neste trabalho, foi chamada de Loxolisina B (com massa molecular de 32-35 kDa) com atividade gelatinolítica, que mais tarde foi estudada por VEIGA et al. (1999) e verificou-se ser dependente da deglicolização proteica.

Somando-se a estes resultados, VEIGA et al. (2000) descreveram duas serina-proteases, com peso molecular de 85-95 kDa, provavelmente envolvidas no efeito deletério do veneno. A avaliação das funções específicas destas proteases mostrou que

elas têm atividade gelatinolítica sobre o colágeno desnaturado e nenhuma atividade sobre a laminina, soroalbumina bovina, hemoglobina, imunoglobulina ou fibrinogênio. Desta forma, a degradação de componentes da matriz extra celular, como o colágeno, é iniciada pela Loxolisina B (FEITOSA et al., 1998) e a serina-protease com atividade gelatinolítica, estudada por VEIGA et al. (2000) tem um papel importante completando a degradação do colágeno já desnaturado.

Um componente de destaque na formação da lesão e nos efeitos sistêmicos do veneno loxoscélico é uma fosfolipase descrita pela primeira vez por FORRESTIER et al. (1978): a esfingomielinase-D, que tem ação sobre a esfingomielina, um dos quatro principais fosfolípidos da membrana celular de mamíferos (REES et al., 1983; REES et al., 1985). Esta enzima cliva a esfingomielina liberando colina e formando N – acilesfingosina fosfato. KURPIEWSKI et al. (1981) confirmou a presença de quatro isoformas de esfingomielinase no veneno da *Loxosceles reclusa*, todas com massa molecular próximos de 32 kDa. Neste mesmo estudo, foi verificada a capacidade dessa enzima ativar a agregação plaquetária concomitante à liberação de serotonina; a adição de EDTA numa concentração de 0,3-6,0 mmol/L, inibiu estes dois eventos, sugerindo que o  $Ca^{2+}$  é necessário.

BARBARO et al (1996), ao estudarem o veneno das espécies *Loxosceles gaucho*, *L. intermedia* e *L. laeta*, relataram a presença de toxinas com atividade semelhante e massa molecular variando entre 32 a 35 kDa (*Loxosceles gaucho* e *L. intermedia*, possuem a toxina de 35kDa, e a *L. laeta* de 32 kDa). Estas enzimas estão relacionadas à atividade dermonecrótica e letal do veneno loxoscélico. Tais características, tanto na sua função como na semelhança do massa molecular, sugerem que esta enzima seja a esfingomielinase-D. No presente trabalho, foi verificada a ação

---

destas toxinas em animais experimentais, mostrando-se letais em camundongos e capazes de induzir a formação da lesão em coelhos.

O papel da esfingomielinase-D tem sido estudado e relacionado ao evento hemolítico característico do loxoscelismo cutâneo visceral. Dados mostram que a via alternativa do complemento está sendo ativada na lise de eritrócitos sensibilizados com a toxina de 35 kDa, uma vez que o fator B e íons  $Mg^{2+}$ , e não C2 e  $Ca^{2+}$ , são absolutamente essenciais para que ocorra a hemólise. Esta conclusão é reforçada pelo fato destas hemácias apresentarem deposição dos fatores B e C3. Em adição, a hipótese da via clássica do complemento estar envolvida no evento hemolítico não pode ser descartada, uma vez que foi observada a deposição do fator C1, C2 e C4 do sistema complemento nestas células (TAMBOURGI et al., 1995).

TAMBOURGI et al (2000), ao tentarem elucidar o mecanismo preciso pelo qual a esfingomielinase-D, induz a susceptibilidade do eritrócito humano ao sistema complemento, verificaram que não há alteração na expressão das moléculas reguladoras deste sistema: CR1, CD59 e DAF, eliminando a possibilidade de ele ser ativado como consequência a remoção das suas moléculas reguladoras pela atividade da toxina presente no veneno. No mesmo estudo foi relatada a clivagem de porções extra celulares das glicoforinas A, B e C em eritrócitos pré-tratados com a toxina de 35 kDa presente no veneno da *Loxosceles intermedia*, facilitando a ação do sistema complemento e consequente hemólise. Não foi observada a ação direta do veneno nas glicoforinas; assim sendo, os autores propuseram que a atividade da esfingomielinase-D induz a ativação de uma metaloproteinase endógena, que, por sua vez, cliva a glicoforina.



## **A membrana eritrocitária**

O eritrócito é uma célula altamente especializada, cuja principal função é o transporte de oxigênio através da molécula de hemoglobina. Para assegurar o transporte de oxigênio a todas as células do organismo, o eritrócito, que mede cerca de 7  $\mu\text{m}$  de diâmetro, tem que passar por capilares e sinusóides esplênicos, que medem apenas cerca de 2 a 3  $\mu\text{m}$  e, para isso, ele possui uma estrutura de membrana que lhe permite ter uma alta deformabilidade (MOHANDAS & CHASIS, 1993).

A membrana do glóbulo vermelho obedece ao modelo proposto para membrana das células de mamíferos, nas quais existem, essencialmente, proteínas com diferentes funções e uma bicamada lipídica. O eritrócito humano possui, em sua membrana, proporções semelhantes de proteínas e lipídios (1,25:1). (SCHRIER, 1985; EITAN et al., 1976).

Os lipídes da membrana são, quase na sua totalidade, fosfolípides e colesterol não esterificado e a relação molar entre estes componentes é praticamente igual (0,75 a 0,95), o que corresponde a mais de 95% do total lipídico da membrana (ALAN et al., 1980), os outros 5% são compostos por glicolípides, glicerídeos e ácidos graxos livres.

Os fosfolípides da membrana eritrocitária são divididos em subclasses: 30% correspondem a fosfatidilcolina, 28% a fosfatidiletalona, 14% a fosfatidilserina e 25% esfingomielina (SHOET e BEUTLER, 1990). Há também uma pequena porção de fosfatidilinosítídeos, ácido fosfatídico e poliglicerolfosfatídeos, sugerindo uma função moduladora sobre a ação de proteinoquinases, ao nível da associação proteica da membrana e talvez interferindo no metabolismo do cálcio (SCHIER, 1985).

Os fosfolípidos estão distribuídos assimetricamente entre as duas camadas lipídicas da membrana. Oitenta por cento ou mais dos aminofosfatídeos (fosfatidiletanolamina e fosfatidilserina) encontram-se na monocamada interna (citoplasmática), ao passo que os lípidos que contêm colina (fosfatidilcolina e esfingomiéline) são os principais componentes da monocamada externa. A fosfatidilserina não é detectada na camada lipídica externa.

A maior parte dos lípidios da membrana está na forma de dupla camada, na qual grupos polares dos fosfolípidos ficam posicionados para a parte externa e, os não polares para porção interna, formando um "core" hidrofóbico. O colesterol, hidrofóbico, é encontrado no "core" da dupla camada lipídica entre os duas camadas de lípidos.

As proteínas da membrana eritrocitária são classificadas, segundo a posição anatômica que ocupam na membrana, em dois grandes grupos: proteínas integrais ou transmembranas, e proteínas periféricas, que constituem o citoesqueleto protéico subjacente à bicamada lipídica.

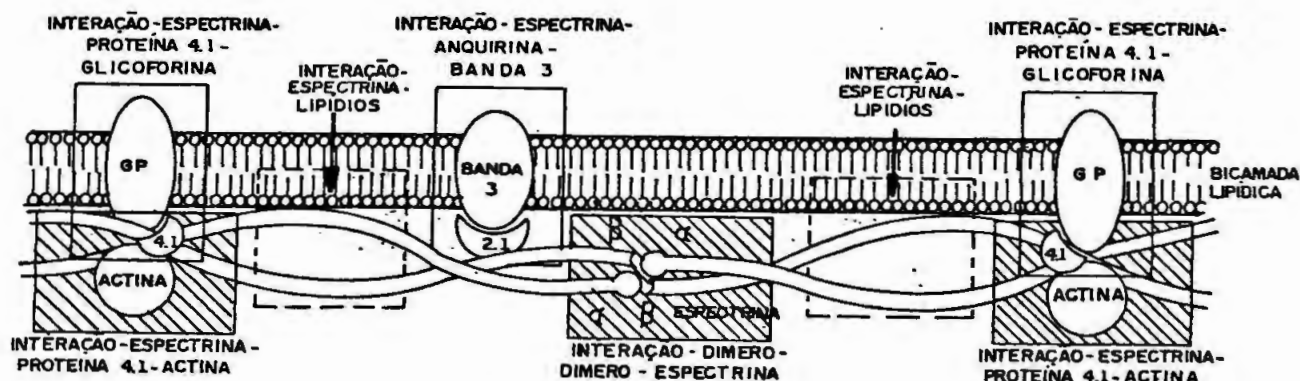


Figura 1: Representação esquemática da membrana eritrocitária, mostrando os tetrâmeros de espectrinas e as suas ligações com a banda 3 e glicoforina através da proteína 2.1 e complexo juncional respectivamente (PALEK, 1995).

## Proteínas periféricas

### 1 – Espectrinas

As espectrinas são moléculas filamentosas, que correspondem cerca de 25-30% do total protéico da membrana eritrocitária (SCHRIER, 1985). São consideradas o principal componente da subcamada adjacente à camada bilipídica, funcionando como um verdadeiro suporte físico a ela, dando a sustentação de membrana necessária para o glóbulo vermelho cumprir sua função (BODINE et al.,1984; AGRE.,1992; AGRE et al.,1982).

Estas proteínas são representadas por dois tipos diferentes de subunidades: a  $\alpha$  espectrina, com massa molecular de 240 kDa e composta por 2429 aminoácidos, e a  $\beta$  espectrina, com massa molecular de 220 kDa e composta por 2137 aminoácidos. De cada uma destas proteínas existe cerca de 200.000 cópias por célula (PALEK,1995).

A  $\alpha$  espectrina é composta por 20 segmentos homólogos, cada qual com 106 aminoácidos, e 2 segmentos não homólogos; um situado na posição 10 e outro na porção carboxi-terminal. A  $\beta$  espectrina é composta por 17 segmentos homólogos (cada qual composto por 106 aminoácidos) e 2 não homólogos, situados na posição  $\text{NH}_2$  e  $\text{COOH}$  terminais, que contêm o sítio de ligação para a actina ( $\text{NH}_2$ ) e o sítio de fosforilação  $\text{COOH}$  terminal (PALEK,1995). Na posição 15 da  $\beta$  espectrina se encontra o sítio de ligação para anquirina.

Apesar de serem proteínas homólogas formadas por segmentos repetitivos, as sínteses das espectrinas  $\alpha$  e  $\beta$  são comandadas por diferentes genes em diferentes cromossomos. A síntese da  $\alpha$  espectrina é regulada pelo gene SPTA 1,

localizado no cromossoma 1 e a espectrina  $\beta$  pelo gene SPTB localizado no cromossoma 14 (PALEK, 1995; HUBNER et al, 1985).

As associações entre as espectrinas  $\alpha$  e  $\beta$ , ocorrem de modo característico, em que uma molécula de  $\alpha$  espectrina se liga pela sua extremidade à extremidade de uma  $\beta$  espectrina, formando um heterodímero. Um heterodímero se associa lateralmente, mas de modo inverso, a outro heterodímero, formando a unidade fundamental estável, o tetrâmero de espectrina (SHOTTON et al, 1979; SPEICHER&SPEICHER, 1989; PALEK, 1995).

Os tetrâmeros se ligam entre si, por suas extremidades, através de um complexo juncional constituído pela actina, proteína 4.1 e 4.9, aducina e tropomiosina; este por sua vez se liga a glicoforina C, através da proteína 4.1. Além disto existe um sítio de ligação da espectrina com a Banda 3, através da anquirina e proteína 4.2.

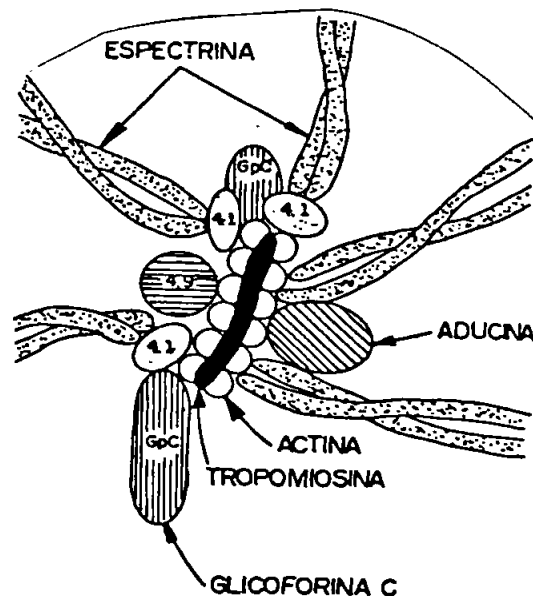


Figura 2: Complexo juncional formado pela interação entre as proteínas da membrana eritrocitária que promove a formação do citoesqueleto (BARRETTO, 1992 a partir do modelo proposto por BENNET, 1989).

A forma preferencial de organização dos tetrâmeros de espectrinas é na forma de hexágono, no qual cada lado e raio do polígono representam um tetrâmero. Ocasionalmente pode haver pentágonos ou heptágonos, formando juntamente com as proteínas periféricas, o complexo juncional e as proteínas 2.1 e 4.2, uma malha que reveste o folheto interno da dupla camada lipídica (YE et al, 1973).

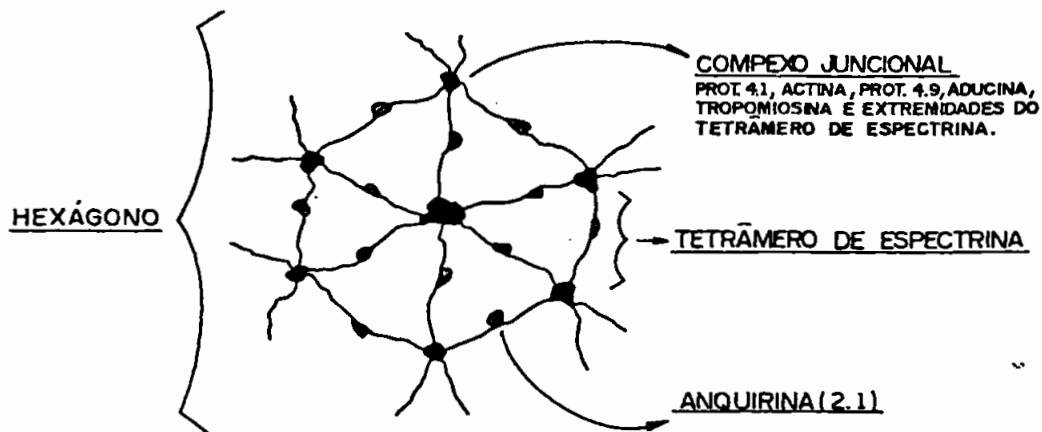


Figura 3: Formação de polígonos a partir da polimerização da espectrina, conforme demonstrado por microscopia eletrônica de alta resolução da membrana eritrocitária (BARRETTO, 1992, baseado em LIU, 1987).

## 2 – Proteína 4.1

Esta proteína tem massa molecular de 80 kDa e existem cerca de 200.000 cópias delas por eritrócito. A sua síntese é regulada pelo gene EL1, localizado no cromossoma 1 (PALEK, 1995).

Sua função está relacionada a facilitar interações, reforçando a ligação da espectrina a actina, e intermediando a ligação entre a espectrina e glicoforina C. Ela também se liga à banda 3 e estabelece ligação com lípidos carregados negativamente na face interna da bicamada lipídica (TCHERNIA et al., 1981).

Da mesma maneira que a anquirina, o segmento regulador desta proteína sofre alteração na transcrição do seu mRNA dando origem a proteína 4.1a, que é mais encontrada em eritrócitos, e 4.1b, que é mais encontrada em reticulócitos.

### 3 – Anquirina

A anquirina (massa molecular de 210 kDa) é uma proteína globular, embora assimétrica, composta por 1881 aminoácidos e sua síntese é comandada pelo gene ANK1, localizado no cromossoma 11 (PALEK, 1995). Existe cerca de 100.000 cópias por eritrócito, na proporção de uma molécula de anquirina para um tetrâmero de espectrina (BENNET, 1982; SCHRIER, 1985).

A anquirina é composta por 3 segmentos: o primeiro possui o sítio de ligação à banda 3; no segundo há o sítio de ligação para espectrina, e um último segmento que é regulador (BENNET & STENBURCK, 1980). Este segmento regulador sofre alteração na transcrição do seu mRNA, dando origem a uma família de anquirinas: 2.2, 2.3 e 2.4 (DAVIS et al., 1989).

### 4 – Proteína 4.2

A função desta proteína está relacionada à estabilização entre a anquirina e a Banda 3, uma vez que ela se liga a estas proteínas, reforçando esta interação (KORSGREN & COHEN, 1988).

Esta proteína tem massa molecular de 72 kDa, e seu número de cópias por eritrócito é de aproximadamente 100.000 moléculas por célula (COHEN et al., 1993). A

---

síntese desta proteína é regulada pelo gene EPB42 que está localizado no cromossoma 15 (PALEK, 1995).

#### 5 – Proteína 4.9 (Dematina)

Esta proteína tem massa molecular de 48 kDa, e liga-se aos filamentos de actina (SIEGEL & BRANTON, 1985). Sua função não está bem esclarecida, mas a diminuição da sua concentração, com o envelhecimento da célula, sugere que ela seja importante nos eritrócitos mais jovens (HUSAN-CHISHTI et al., 1989).

#### 6 – Actina

Esta proteína, juntamente com a dematina, proteína 4.1, aducina e tropomiosina, participa do complexo juncional. Existem cerca de 500.000 moléculas de actina por eritrócito, tem massa molecular de 43 kDa e sua síntese é regulada pelo gene ACTB, localizado no cromossoma 7 (PALEK, 1995).

A actina organiza-se em forma de filamento constituído de doze moléculas dispostas em duas fileiras anti-paralelas, cada qual com seis moléculas, dispostas ao longo de outra proteína, a tropomiosina (COHEN, 1983).

## 7 – Proteína 7 ou tropomiosina

A síntese desta proteína é regulada pelo gene TPM3, localizado no cromossoma 1 (PALEK, 1995).

A tropomiosina é composta por dois polipeptídeos de massa molecular de aproximadamente 30 kDa. Sua função está relacionada a estabilização dos filamentos de actina, que se dispõem ao longo da tropomiosina, fazendo parte do complexo juncional, importante na manutenção da estabilidade da membrana eritrocitária (BENETT, 1989).

## 8 – Aducina

Esta proteína está presente na proporção de 30.000 moléculas por célula e sua função é promover a ligação da actina à espectrina.

É formada por dois polipeptídeos de massa molecular de 103 kDa e 97 kDa e formam um heterodímero (PALEK, 1995).



## Proteínas integrais

### 1 – Banda 3

A banda 3 (AE1) é a mais abundante das proteínas integrais, com aproximadamente 1.200.000 cópias por células, sua síntese é comandada pelo gene EPB3, localizado no cromossoma 17 (PALEK,1995). É uma proteína integral composta por dois domínios estruturais cada qual com função biológica distinta: 1- a porção c-terminal, com massa molecular de 60 kDa, consiste de múltiplos segmentos hidrofóbicos que atravessam a membrana de 12 a 14 vezes. A atividade de troca ânionica desta proteína reside neste domínio. 2- Porção N-terminal (massa molecular 43 kDa), a qual tem uma carga negativa que é projetada no citoplasma, e é também responsável pelo ancoramento ao citoesqueleto se ligando a anquirina, proteína 4.2. Ela também se liga a hemoglobina e a algumas enzimas glicolíticas.

O canal ânionico permite que o eritrócito tenha uma alta permeabilidade ao cloro, cuja função fisiológica é facilitar o transporte do CO<sub>2</sub> dos tecidos para os alveólos pulmonares. O influxo de cloro se faz concomitantemente com o efluxo de bicarbonato.

A banda 3 tem um papel importante em definir a forma eritrocitária e manter a estabilidade da membrana, podendo a deficiência desta proteína causar uma anemia hemolítica, a esferocitose hereditária (LUX, 1990). Até pouco tempo atrás se pensava que a ausência total desta proteína fosse incompatível com a vida; porém, estudos recentes utilizando ratos mutantes comprovaram que a deficiência total de banda 3 causa anemia hemolítica crônica e aumento da morte perinatal destes animais.

---

## 2 – Glicoforinas

As glicoforinas são diferentes sialoglicoproteínas com massa molecular de 35 a 47 kDa, cujos carboidratos representam 60% da molécula. Quatro tipos de glicoforinas são identificáveis através na coloração de PAS à eletroforese de poliacrilamida, elas são: A,B,C e D.

A glicoforina A (número de cópias de aproximadamente 200.000 dímeros ou 400.000 monômeros, cuja produção é comandada pelo gene GYPA localizado no cromossoma 4) e B (número de cópias de aproximadamente 70.000, cuja produção é comandada pelo gene GYPB localizado no cromossoma 4), carregam antígenos do grupo sanguíneo M, N e Ss (OWENS et al., 1980; ANSTEE, 1981). Essas duas proteínas são formadas por aproximadamente 90% de ácido síalico, que conferem carga negativa aos eritrócitos, interagem ainda com a Banda 3 para auxiliar na estabilização do citoesqueleto.

A glicoforina C e D estão presentes em menor quantidade e são glicoproteínas relacionadas ao grupo sanguíneo Gerbich. A glicoforina C é uma importante proteína transmembrana, ligando-se à proteína 4.1, sendo este um importante sítio de ligação do citoesqueleto à membrana (ANSTEE & TANNER, 1986).

## 3 – Proteína transportadora de glicose

Esta é uma proteína integral que corre na região 4.5 a eletroforese em gel de poliacrilamida (SOGIN & HINKLE, 1978; SOGIN & HINKLE, 1980).

---

#### 4 – ATP ases

São proteínas integrais por sua localização na membrana. As mais importantes são o  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ , -ATPase, e a  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$ , -ATP ase (SCHRIER, 1985).

## II-OBJETIVO:

A forma cutâneo visceral de loxoscelismo é caracterizada principalmente por hemólise intravascular, portanto se faz necessário elucidar o mecanismo pelo qual o veneno loxoscélico age sobre os glóbulos vermelhos. Tavares (2002), ao estudar o efeito do veneno da *L. gaucho* injetado via intradérmica em coelhos, observou alterações em alguns parâmetros do hemograma, entretanto as dosagens dos níveis de bilirrubina e haptoglobina plasmática não indicaram um quadro hemolítico. Com o objetivo de verificar se o veneno de *L. gaucho* era capaz de induzir alterações na estrutura da membrana de eritrócitos de coelhos, foram realizados os seguintes testes:

- Curva de fragilidade osmótica dos eritrócitos.
  - Estudo da deformabilidade eritrocitária através do ectacitômetro.
  - Avaliação das proteínas da membrana eritrocitária através da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE).
-

### III- MATERIAL E MÉTODOS

#### 1 – Materiais

##### 1.1 – Animal escolhido

Foram utilizados coelhos albinos da raça Nova Zelândia, provenientes da Criex Cunicultura Ltda. Visando uma maior homogeneidade dos grupos, utilizaram-se somente animais machos, adultos, com pesos variando entre 3 e 4 kg. Estes foram mantidos em gaiolas individuais, com água e ração sendo fornecidos “ad libitum”.

Utilizou-se o coelho como modelo animal, por ser uma espécie há décadas utilizada no estudo do loxoscelismo (FURLANETTO, 1961).

##### 1.2 – Veneno

Utilizou-se para este trabalho amostras retiradas de um “pool” de veneno de *Loxosceles gaucho*, que foi obtido a partir de um lote de 1000 aranhas capturadas na região da Grande São Paulo. Após a captura, as aranhas foram deixadas em repouso pelo período mínimo de uma semana antes da coleta do veneno.

O veneno foi extraído das aranhas por eletro-estimulação e processado segundo a técnica de BÜCHERL (1969) e modificado por BARBARO et al. (1992). Para a extração, as aranhas foram mobilizadas com pinças e submetidas a um estímulo de 30 volts, por 2 segundos, na região ventral do cefalotórax, para induzir a secreção do veneno. Este foi imediatamente aspirado dos ferrões com o auxílio de uma micropipeta

---

automática e depositado em tubo eppendorff contendo solução salina (NaCl 0,15 M) graças à gentileza da Dr. Kátia Cristina Barbaro. Quando puro, o veneno é líquido incolor e transparente. Uma contaminação ocasional, pelo conteúdo estomacal, torna o veneno turvo, sendo neste caso, desprezado. O veneno obtido foi estocado a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  até o momento do uso. A concentração protéica do veneno foi determinada pelo método de BRADFORD (1976), utilizando-se uma curva padrão de soro albumina bovina (BSA).

### 1.3 – Delineamento Experimental

Os animais foram injetados por via intradérmica (i.d.), com o veneno total de "*L. gaucho*" ( $10\text{ }\mu\text{g/kg}$  de peso). O veneno foi diluído em 0,2 mL de solução de NaCl 0,15M, a mesma quantidade de salina injetada nos animais controles. Esta concentração de veneno apresentou-se suficiente para o desenvolvimento de extensa lesão dermonecrótica, tendo se demonstrado não letal nos tempos de envenenamento utilizado neste trabalho.

Foram considerados três tempos de envenenamento: 24, 72 e 120 horas. Estes tempos foram determinados a partir de observações feitas por TAVARES (2002), que ao estudar os eventos hematológicos produzidos pelo veneno da *L. gaucho* em coelhos, observou que as alterações relativas aos eritrócitos, plaquetas e sistema de coagulação ocorriam nos tempos citados acima. Decorridos os tempos de envenenamento estabelecidos, o sangue foi coletado da veia considerada de mais fácil acesso das orelhas dos animais por meio de um dispositivo "butterfly" de calibre 21G. Logo após a última coleta (tempo de 120 horas após a exposição ao veneno), os animais foram sacrificados com uma solução de KCl 5 M.

---

## 2 – Métodos

### 2.1 – Preparo do estroma eritrocitário

O sangue total de todas as amostras foi centrifugado a 4°C, 1000 g por 15 minutos para a retirada do plasma, leucócitos e plaquetas. Em seguida, os eritrócitos foram lavados três vezes em solução de NaCl 154 mM a 4°C, aliquotados em oito partes, e lisados posteriormente em tampão fosfato 5mM e pH 8,0 segundo DODGE e cols. (1963), na proporção de 1:40, contendo PMSF como inibidor de proteases.

O precipitado foi submetido a várias lavagens com o tampão fosfato 5 mM, até que os estromas ficassem totalmente livres de hemoglobina. Os estromas foram ressuspensos 1:1 no mesmo tampão e aliquotados e mantidos a -70° C até a realização das eletroforeses.

### 2.2 – Dosagem de proteínas e solubilização do estroma

A concentração de proteínas dos estromas foi determinada pelo método de LOWRY (1951), utilizando albumina sérica bovina como padrão. A solubilização das proteínas foi feita por adição de solução solubilizante (vide descrição adiante) aos estromas na proporção de 1:2 (solubilizante/estroma) e incubação em banho-maria fervente, durante 5 minutos.

### 2.3 – Eletroforese em gel de poliacrilamida – dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

Foram utilizadas placas de vidro de 12,5 por 16,5 centímetros e espaçadores de 1mm de espessura. Foi utilizado gel de corrida com 10% de acrilamida e gel de alinhamento com 3% de acrilamida, segundo LAEMMLI, 1970. Foram aplicados volumes de estromas solubilizados correspondentes a 80  $\mu$ g de proteínas. A corrida eletroforética foi feita a 25 volts, durante 18 horas, em tampão Tris-glicina pH 8,3 (Tris 0,05M e glicina 0,4M), contendo SDS 3,468 mM (0,1%).

Após a corrida eletroforética, foi feita a coloração do gel em solução contendo azul de Comassie R 0,605 mM durante a noite e posterior descoloração em solução de ácido acético a 10%.

### 2.4 – Curva de fragilidade dos eritrócitos

Esta técnica é baseada no princípio de as células ficarem mais frágeis quando colocadas em soluções gradativamente hipotônicas e os eritrócitos normais resistem mais a meio hipotônico do que células com comprometimento da estrutura da sua membrana, como ocorre na esferocitose hereditária. Os eritrócitos são submetidos a 13 soluções contendo diferentes concentrações de NaCl, que vão desde o meio isotônico para célula (0,9 g/L de NaCl) até uma solução extremamente hipotônica, contendo apenas 0,1 g/L de NaCl.

As curvas de fragilidade osmótica das amostras foram realizadas segundo o método descrito por DACIE & LEWIS, 1984.



## 2.5 – Determinação da deformabilidade dos eritrócitos

Para estudo da deformabilidade, será utilizado um ectacitômetro da marca LORRCA versão 1.00, de acordo com MOHANDAS & CHASIS, 1993 e SILVEIRA et al.,1997. (Foto 2)



Foto 2: Ectacitômetro da marca Lorrca.

O ectacitômetro simula a circulação sanguínea, expondo o eritrócito a temperatura e a pressão (shear stress) que ele sofre na circulação, em que é calculado o índice de alongação (IE), medindo o comprimento(A) e largura(B) da célula, e aplicando a seguinte fórmula:  $EI = A \cdot B / (A + B)$ .

É utilizada uma solução que contém PVP (polietilenopivitol) 0,14 mM e PBS em osmolalidade de 300mMos ao qual é adicionado 50  $\mu$ L de sangue total, formando uma solução de eritrócitos para ser submetida a análise pelo ectacitômetro.

Durante a análise, a suspensão de eritrócitos é mantida sob temperatura constante (37°C), e a pressão a que o eritrócito é submetido (shear stress) é gradativamente aumentada, variando de 0.01 a 100 Pa.



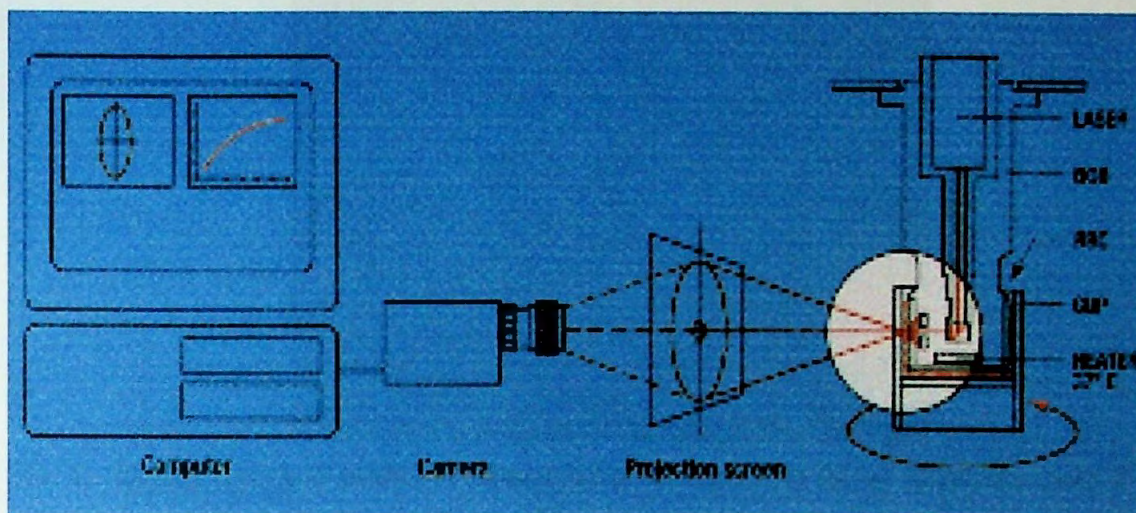


Foto 3: Esquemática do sistema de projeção e câmera de vídeo do LORRCA (Figura retirada do site de informações sobre o LORRCA,2003).

A solução de eritrócitos passa por dois cilindros. A rotação do cilindro externo, causa a deformação dos eritrócitos. A difração do laser ocorre quando a luz laser atravessa a suspensão de células (foto 4). A imagem é detectada por uma câmera de vídeo e analisada pelo computador (foto 5).

Foto 5: Análise feita pelo software do computador, aplicado ao LORRCA.



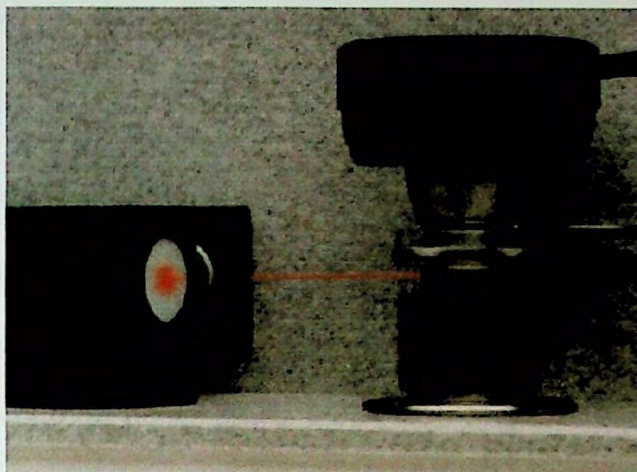


Foto 4: Nesta figura é possível observar a difração do laser atravessando a suspensão de eritrócitos.

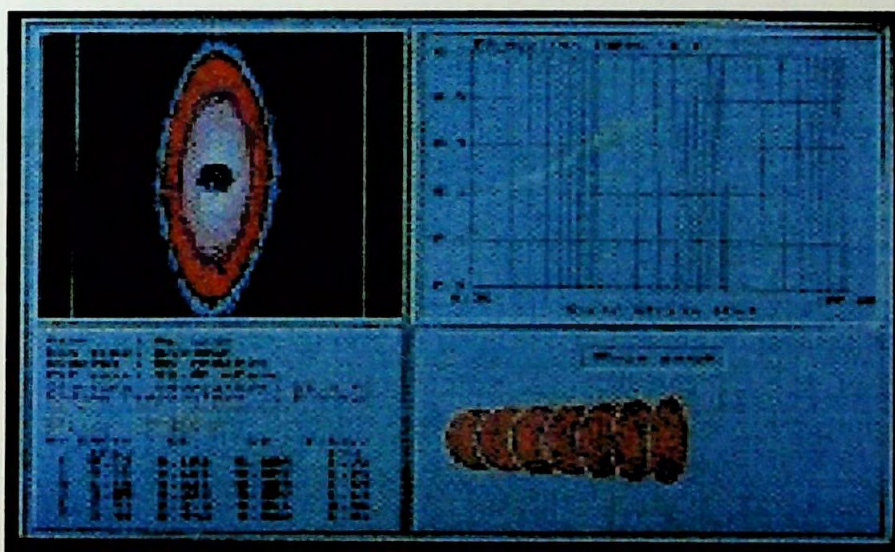


Foto 5: Análise feita pelo softwer do computador acoplado ao LORCCA.

#### IV- RESULTADOS

Os animais expostos ao veneno da *L. gaucho* apresentaram prostração, inapetência, diminuição da locomoção e da atividade geral, sintomas que mantiveram-se praticamente ao longo de todos os tempos observados. Esta sintomatologia acompanha o surgimento e a evolução de extensa lesão dermonecrotica, aspecto marcante deste envenenamento. A lesão observada apresentou características clássicas, com surgimento inicial de eritema, com evolução para áreas hemorrágicas extensas e equimóticas, que foram acompanhadas de pronunciado edema. Com 24 horas, tempo em que a lesão atinge o seu máximo, observou-se o espalhamento gravitacional e definição das áreas de necrose. Não foram observadas alterações na coloração da urina e fezes dos animais.

#### **4.1 – Curva de Fragilidade Osmótica**

Foram feitas curvas de fragilidade osmótica de vinte coelhos machos, albinos da raça Nova Zelândia com finalidade de se estabelecer uma curva de fragilidade osmótica referência, através da qual o resultado dos coelhos envenenados foram analisados.

Foi feita uma média e, por meio dela, calculou-se o desvio padrão, utilizando-se dois desvios a cima e dois abaixo da média; foi construída a curva-referência de fragilidade osmóticas dos eritrócitos de coelho. Os resultados referentes aos coelhos normais se encontram na Tabela 1.

Os resultados que compõem as curvas de fragilidade osmótica referente a eritrócitos de coelhos envenenados estão representados nos gráficos de 1 a 6.



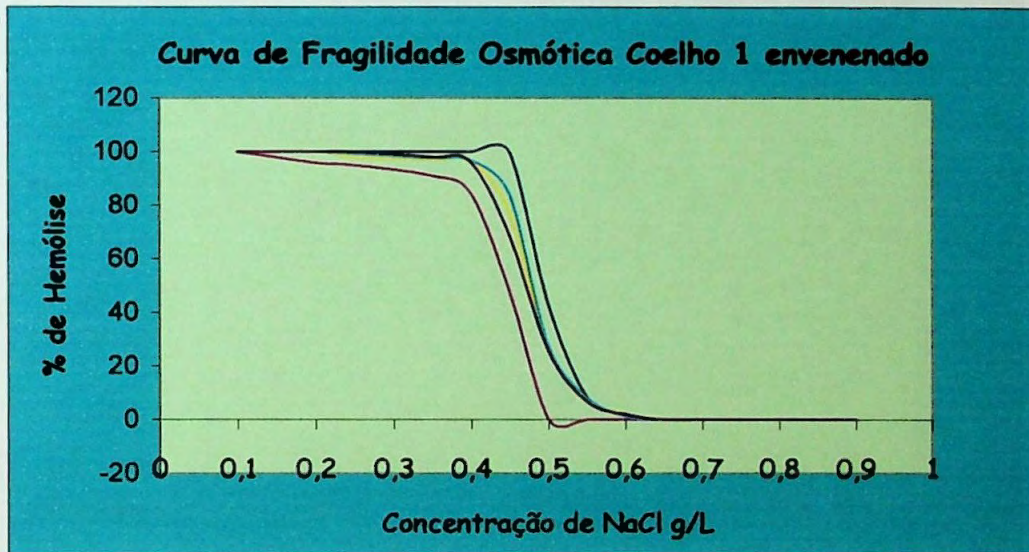
**TABELA 1:** Resultado referente a fragilidade osmótica de 20 coelhos adultos, albinos, da raça Nona Zelândia, com peso entre 3 e 4 kg.

NaCl g/L	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
0,1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
0,2	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	94	100	100	94,5	100	100	100	100	100	100
0,25	100	100	99,2	98,5	100	98,5	100	100	100	98,4	93,6	100	99,6	94,2	98,6	98,5	96,5	99	98,6	100
0,35	98	97,8	96,8	95,9	98	95,5	95,8	97,8	97,5	96	93	98,4	98	86,7	98,4	94,8	95,9	97,9	98,4	95,2
0,4	92,6	95,2	95,2	93,3	95,1	96	85	95	94,3	92,3	87,5	98,3	94,1	81	96	93,3	95,1	90,2	96	89,6
0,45	81,8	66	70,6	73,5	71,5	81,3	75,5	85	73,8	78,2	86,2	88,6	82,4	30,4	94,1	73,5	63,4	56,2	86	82
0,5	28,1	12	12,1	11,8	11	10,4	11	31,7	14	33,2	29,6	22,7	16,7	22,4	40	16,2	11	12,9	40	41,8
0,55	0	2,3	1,4	4,4	3,4	1,5	4,2	7,8	2,3	8,1	4	3	3,9	1,45	6,8	4,4	3,4	3,9	6,8	5
0,6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2,7	2	0,6	0	0	0,7	0	1,45	0	2
0,65	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Coluna vertical: concentração de NaCl em gramas por litro; coluna horizontal: coelhos de 1 a 20.



**GRÁFICO 1:** Curva de fragilidade osmótica do coelho número 1 após os tempos de 24, 72 e 120 horas da injeção intradérmica do veneno (10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) de *L. gaucho*. Os resultados são comparados com as curvas de referência máxima e mínima de porcentagem de hemólise.



---- Curva referência de máxima porcentagem de hemólise

---- Curva referência de mínima porcentagem de hemólise

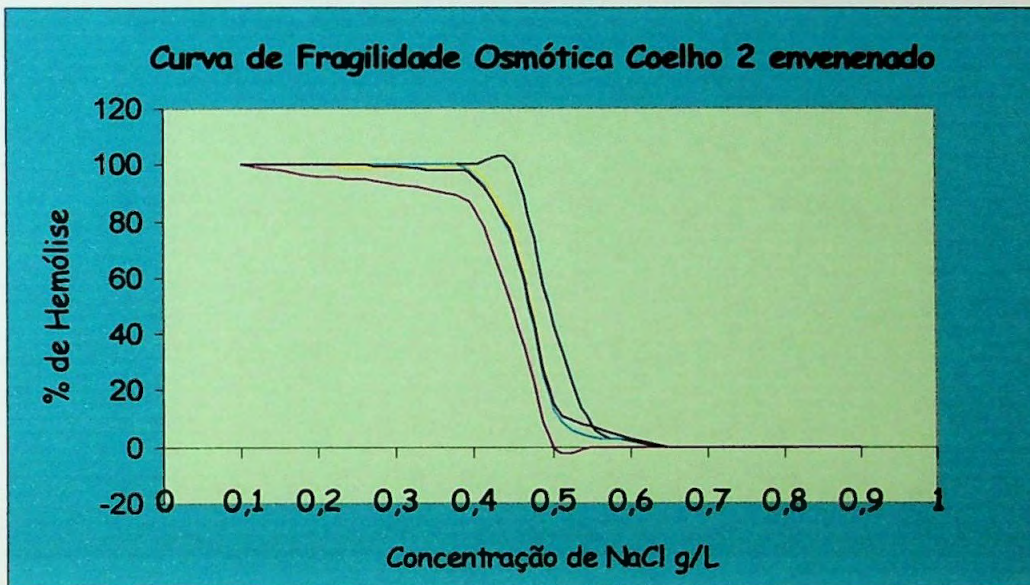
---- Curva de fragilidade osmótica coelho 1 após 24 horas da inoculação intradérmica do veneno de *Loxosceles gaucho*

---- Curva de fragilidade osmótica coelho 1 após 72 horas da inoculação intradérmica do veneno de *Loxosceles gaucho*.

---- Curva de fragilidade osmótica coelho 1 após 120 horas da inoculação intradérmica do veneno de *Loxosceles gaucho*.



**GRÁFICO 2:** Curva de fragilidade osmótica do coelho número 2 após os tempos de 24, 72 e 120 horas da injeção intradérmica do veneno (10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) de *L. gaucho*. Os resultados são comparados com as curvas de referência máxima e mínima de porcentagem de hemólise.



---- Curva referência de máxima porcentagem de hemólise

---- Curva referência de mínima porcentagem de hemólise

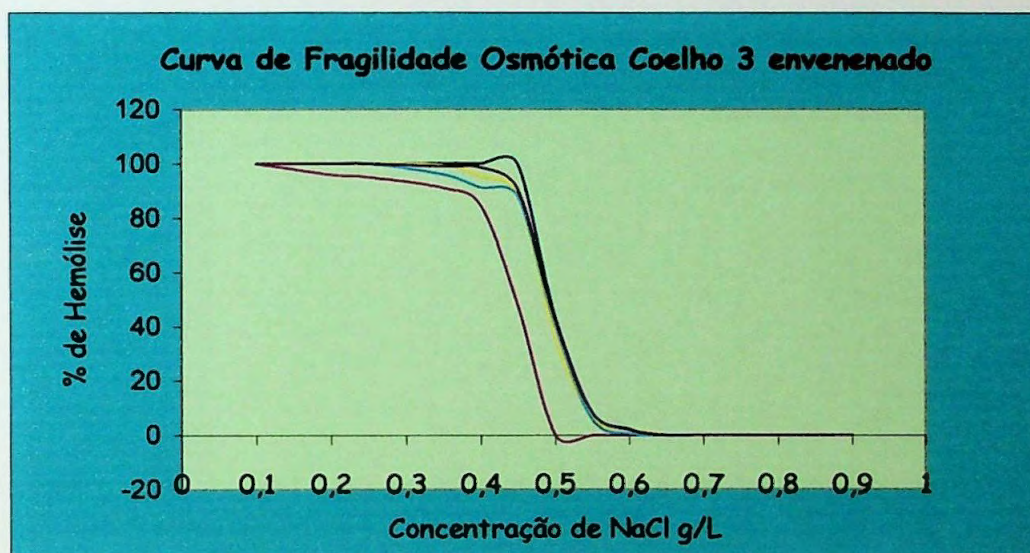
— Curva de fragilidade osmótica coelho 2 após 24 horas da inoculação intradérmica do veneno de *Loxosceles gaucho*.

---- Curva de fragilidade osmótica coelho 2 após 72 horas da inoculação intradérmica do veneno de *Loxosceles gaucho*.

---- Curva de fragilidade osmótica coelho 2 após 120 horas da inoculação intradérmica do veneno de *Loxosceles gaucho*.



**GRÁFICO 3:** Curva de fragilidade osmótica do coelho número 3 após os tempos de 24, 72 e 120 horas da injeção intradérmica do veneno (10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) de *L. gaucho*. Os resultados são comparados com as curvas de referência máxima e mínima de porcentagem de hemólise.



--- Curva referência de máxima porcentagem de hemólise

--- Curva referência de mínima porcentagem de hemólise

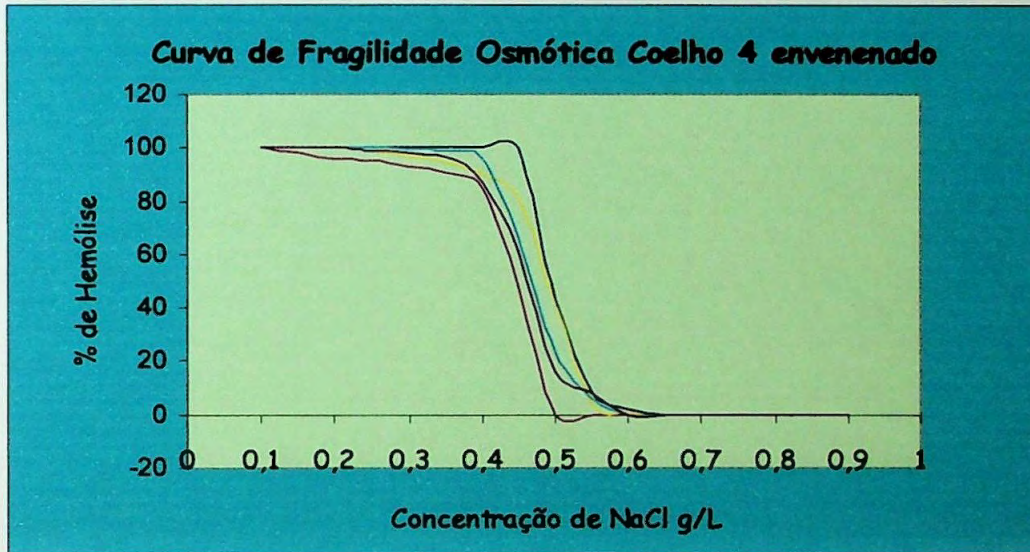
--- Curva de fragilidade osmótica coelho 3 após 24 horas da inoculação intradérmica do veneno de *Loxosceles gaucho*.

--- Curva de fragilidade osmótica coelho 3 após 72 horas da inoculação intradérmica do veneno de *Loxosceles gaucho*.

--- Curva de fragilidade osmótica coelho 3 após 120 horas da inoculação intradérmica do veneno de *Loxosceles gaucho*.



**GRÁFICO 4:** Curva de fragilidade osmótica do coelho número 4 após os tempos de 24, 72 e 120 horas da injeção intradérmica do veneno (10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) de *L. gaucho*. Os resultados são comparados com as curvas de referência máxima e mínima de porcentagem de hemólise.



---- Curva referência de máxima porcentagem de hemólise

---- Curva referência de mínima porcentagem de hemólise

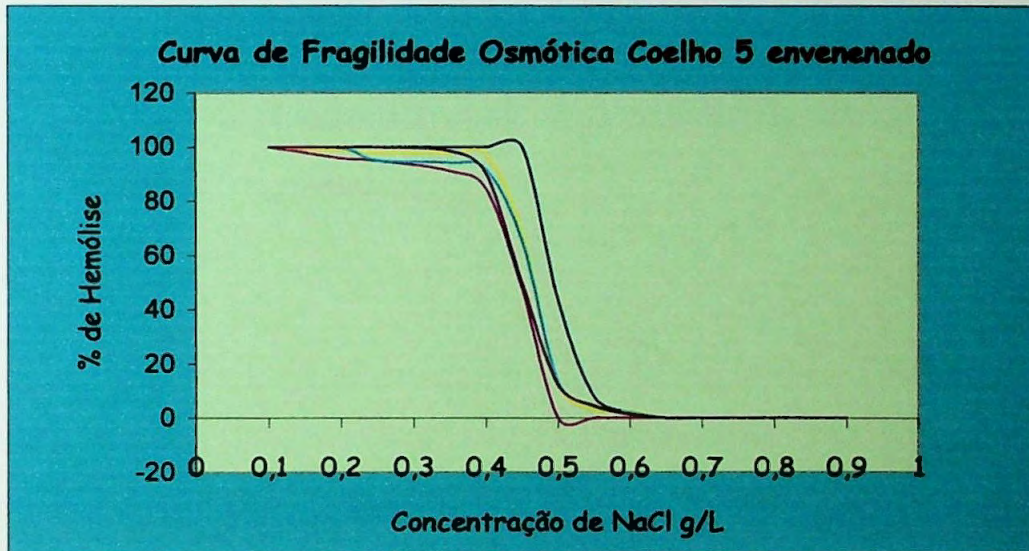
--- Curva de fragilidade osmótica coelho 4 após 24 horas da inoculação intradérmica do veneno de *Loxosceles gaucho*.

--- Curva de fragilidade osmótica coelho 4 após 72 horas da inoculação intradérmica do veneno de *Loxosceles gaucho*.

--- Curva de fragilidade osmótica coelho 4 após 120 horas da inoculação intradérmica do veneno de *Loxosceles gaucho*.



**GRÁFICO 5:** Curva de fragilidade osmótica do coelho número 5 após os tempos de 24, 72 e 120 horas da injeção intradérmica do veneno (10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) de *L. gaucho*. Os resultados são comparados com as curvas de referência máxima e mínima de porcentagem de hemólise.



---- Curva referência de máxima porcentagem de hemólise

---- Curva referência de mínima porcentagem de hemólise

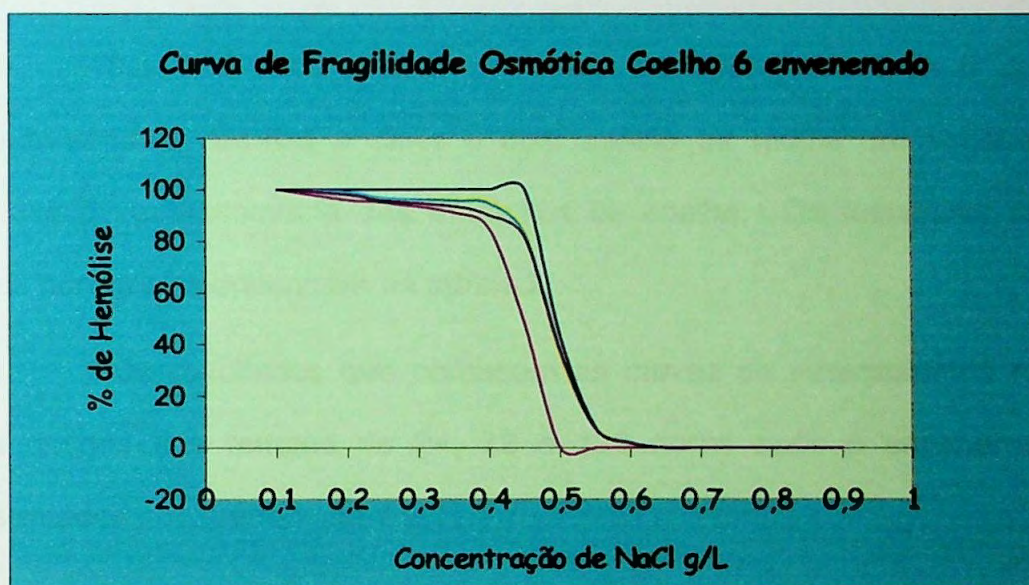
---- Curva de fragilidade osmótica coelho 5 após 24 horas da inoculação intradérmica do veneno de *Loxosceles gaucho*.

---- Curva de fragilidade osmótica coelho 5 após 72 horas da inoculação intradérmica do veneno de *Loxosceles gaucho*.

---- Curva de fragilidade osmótica coelho 5 após 120 horas da inoculação intradérmica do veneno de *Loxosceles gaucho*.



**GRÁFICO 6:** Curva de fragilidade osmótica do coelho número 6 após os tempos de 24, 72 e 120 horas da injeção intradérmica do veneno (10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) de *L. gaucho*. Os resultados são comparados com as curvas de referência máxima e mínima de porcentagem de hemólise.



---- Curva referencia de máxima porcentagem de hemólise

---- Curva referencia de mínima porcentagem de hemólise

--- Curva de fragilidade osmótica coelho 6 após 24 horas da inoculação intradérmica do veneno de *Loxosceles gaucho*.

--- Curva de fragilidade osmótica coelho 6 após 72 horas da inoculação intradérmica do veneno de *Loxosceles gaucho*.

--- Curva de fragilidade osmótica coelho 6 após 120 horas da inoculação intradérmica do veneno de *Loxosceles gaucho*.

## 4.2 – Ectacitometria

Da mesma maneira que foi feita para curva de fragilidade osmótica, foram construídas curvas de referência máxima e mínima de ectacitometria, a partir dos dados obtidos de 11 coelhos albinos da raça Nova Zelândia.

Foi feita uma média, por meio da qual calculou-se o desvio padrão, utilizando-se dois desvios a cima e dois abaixo da média: foi construída a curva-referência de ectacitometria dos eritrócitos de coelho. Os resultados referentes aos coelhos normais se encontram na tabela 2.

Os resultados que compõem as curvas de ectacitometria referentes aos dados obtidos nos tempos de 24, 72 e 120 horas após o envenenamento, estão representados nos gráficos de 7 a 12.

Os mesmos animais utilizados para padronizar as referências máxima e mínima de porcentagem de hemólise, foram utilizados para padronizar a deformabilidade eritrocitária, fazendo uma referência máxima e mínima do índice de alongação. Destes animais, seis foram utilizados para o experimento (injetando 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  peso de veneno de *L. gaucho*), e após os tempos determinados feitos os parâmetros já mencionados (curva de fragilidade osmótica, deformabilidade eritrocitária e eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE).

---



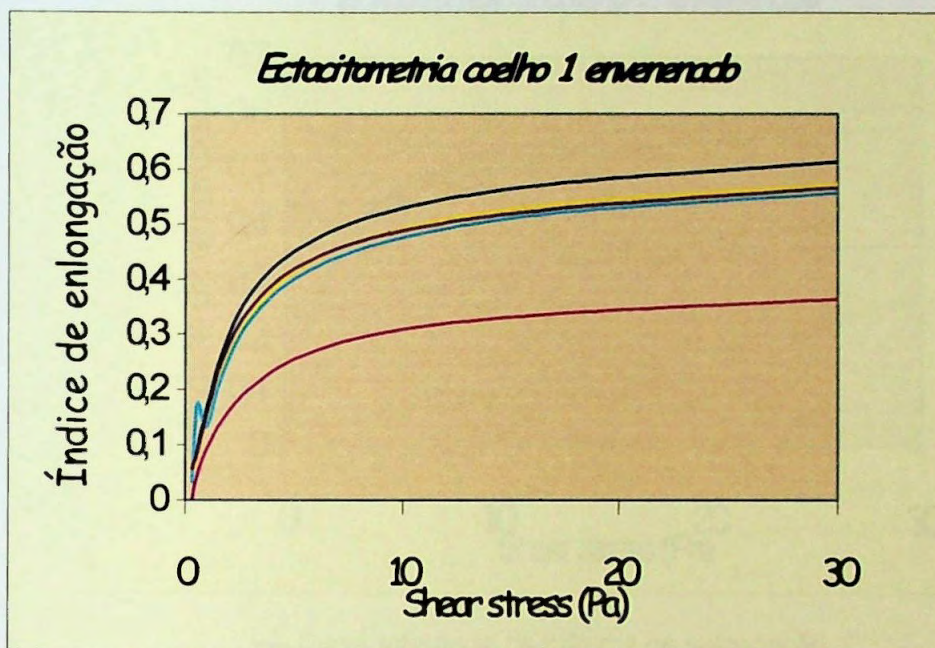
**TABELA 2:** Resultados referentes a ectacitometria de 11 coelhos albinos, adultos, da raça Nova Zelândia com peso entre 3 e 4 kg.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
<i>Shear</i>											
<i>Stress</i>											
<i>(Pa)</i>											
<b>0.3</b>	0,018	0,014	0,045	0,032	0,021	0,023	0,011	0,013	0,021	0,008	0,013
<b>0.53</b>	0,064	0,065	0,084	0,067	0,077	0,078	0,062	0,054	0,062	0,057	0,06
<b>0.95</b>	0,126	0,117	0,157	0,12	0,148	0,152	0,13	0,102	0,112	0,104	0,122
<b>1.69</b>	0,219	0,2	0,257	0,206	0,229	0,254	0,214	0,165	0,248	0,225	0,267
<b>3.00</b>	0,306	0,288	0,357	0,292	0,313	0,353	0,316	0,229	0,248	0,225	0,267
<b>5.34</b>	0,382	0,365	0,433	0,361	0,386	0,428	0,399	0,285	0,302	0,293	0,328
<b>9.48</b>	0,443	0,427	0,488	0,409	0,452	0,484	0,459	0,329	0,344	0,348	0,379
<b>16.86</b>	0,448	0,48	0,528	0,448	0,489	0,528	0,509	0,365	0,377	0,384	0,407
<b>30.05</b>	0,522	0,529	0,569	0,483	0,517	0,562	0,544	0,394	0,406	0,413	0,435

Coluna vertical: Shear stress à qual os eritrócitos foram submetidos; Coluna horizontal: Numeração dos coelhos de 1 a 11.



**GRÁFICO 7:** Ectacitometria do coelho número 1 após os tempos de 24, 72 e 120 horas da injeção intradérmica do veneno (10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) de *L. gaucho*. Os resultados são comparados com as curvas de referência máxima e mínima de alongação.



— Curva referência de máxima de alongação

--- Curva referência de mínima de alongação

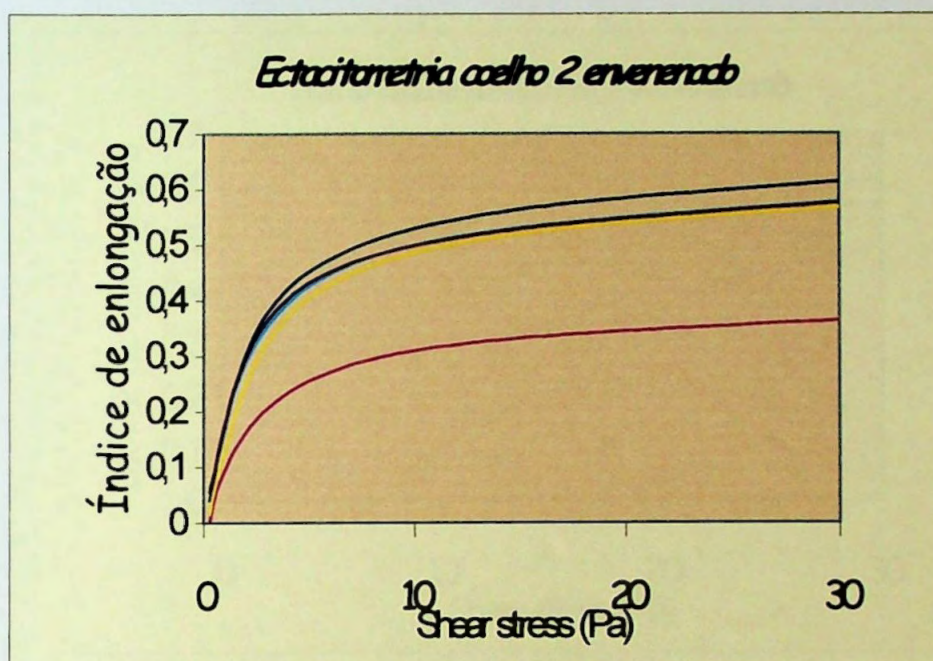
— Ectacitometria coelho 1 após 24 horas da inoculação intradérmica do veneno de *Loxosceles gaucho*.

--- Ectacitometria coelho 1 após 72 horas da inoculação intradérmica do veneno de *Loxosceles gaucho*.

--- Ectacitometria coelho 1 após 120 horas da inoculação intradérmica do veneno de *Loxosceles gaucho*.



**GRÁFICO 8:** Ectacitometria do coelho número 2 após os tempos de 24, 72 e 120 horas da injeção intradérmica do veneno (10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) de *L. gaucho*. Os resultados são comparados com as curvas de referência máxima e mínima de alongação.



--- Curva referência de máxima de alongação

--- Curva referência de mínima de alongação

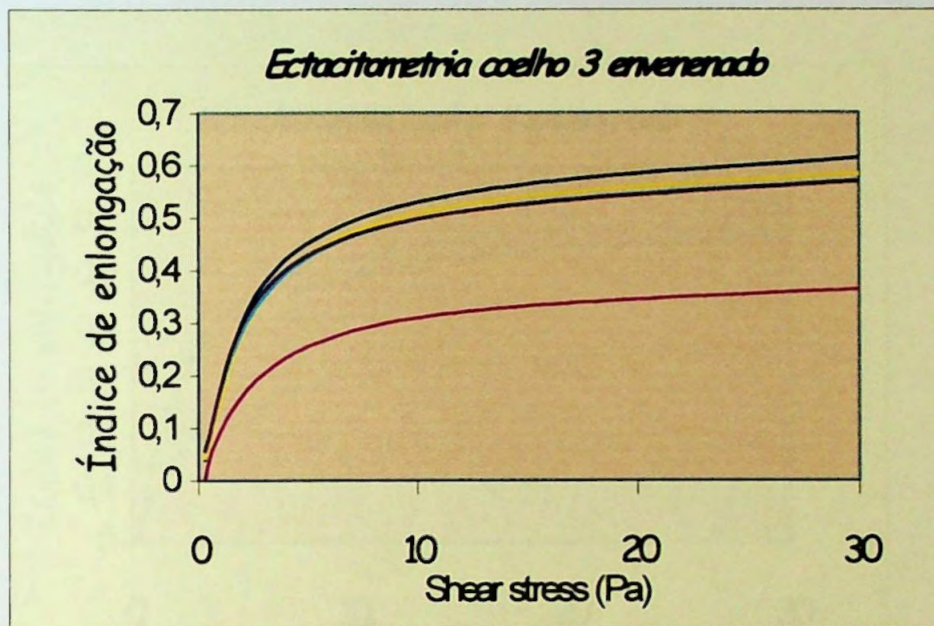
--- Ectacitometria coelho 2 após 24 horas da inoculação intradérmica do veneno de *Loxosceles gaucho*.

--- Ectacitometria coelho 2 após 72 horas da inoculação intradérmica do veneno de *Loxosceles gaucho*.

--- Ectacitometria coelho 2 após 120 horas da inoculação intradérmica do veneno de *Loxosceles gaucho*.



**GRÁFICO 9:** Ectacitometria do coelho número 3 após os tempos de 24, 72 e 120 horas da injeção intradérmica do veneno (10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) de *L. gaucho*. Os resultados são comparados com as curvas de referência máxima e mínima de alongação.



--- Curva referência de máxima de alongação

--- Curva referência de mínima de alongação

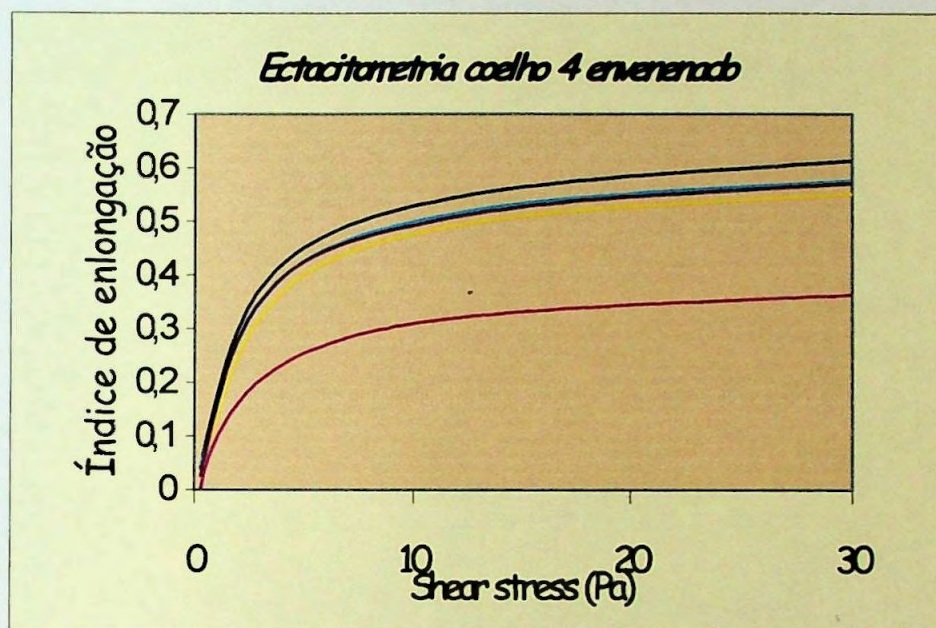
--- Ectacitometria coelho 3 após 24 horas da inoculação intradérmica do veneno de *Loxosceles gaucho*.

--- Ectacitometria coelho 3 após 72 horas da inoculação intradérmica do veneno de *Loxosceles gaucho*.

--- Ectacitometria coelho 3 após 120 horas da inoculação intradérmica do veneno de *Loxosceles gaucho*.



**GRÁFICO 10:** Ectacitometria do coelho número 4 após os tempos de 24, 72 e 120 horas da injeção intradérmica do veneno (10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) de *L. gaucho*. Os resultados são comparados com as curvas de referência máxima e mínima de alongação.



--- Curva referência de máxima de alongação

--- Curva referência de mínima de alongação

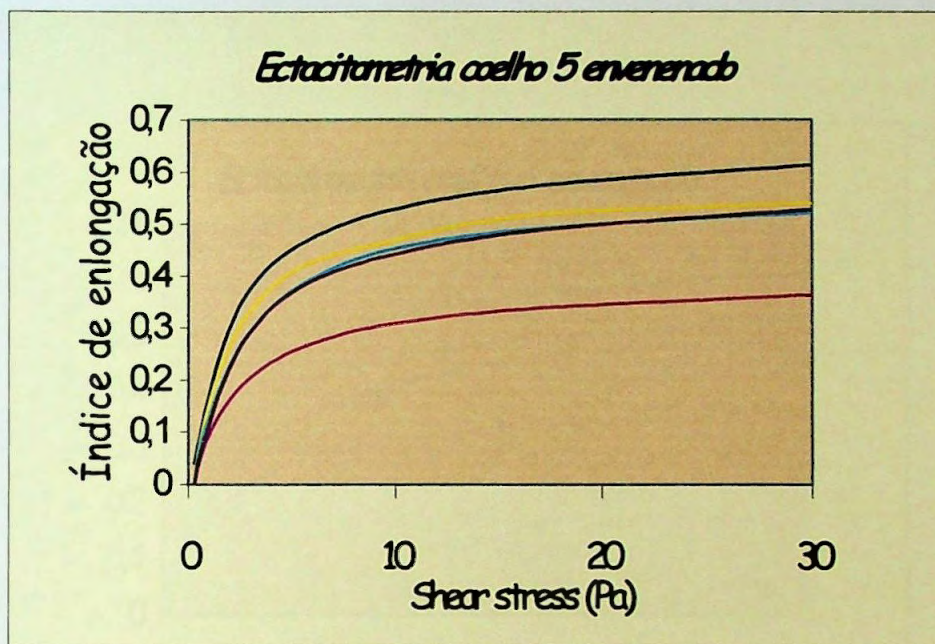
--- Ectacitometria coelho 4 após 24 horas da inoculação intradérmica do veneno de *Loxosceles gaucho*.

--- Ectacitometria coelho 4 após 72 horas da inoculação intradérmica do veneno de *Loxosceles gaucho*.

--- Ectacitometria coelho 4 após 120 horas da inoculação intradérmica do veneno de *Loxosceles gaucho*.



**GRÁFICO 11:** Ectacitometria do coelho número 5 após os tempos de 24, 72 e 120 horas da injeção intradérmica do veneno (10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) de *L. gaucho*. Os resultados são comparados com as curvas de referência máxima e mínima de alongação.



---- Curva referência de máxima de alongação

---- Curva referência de mínima de alongação

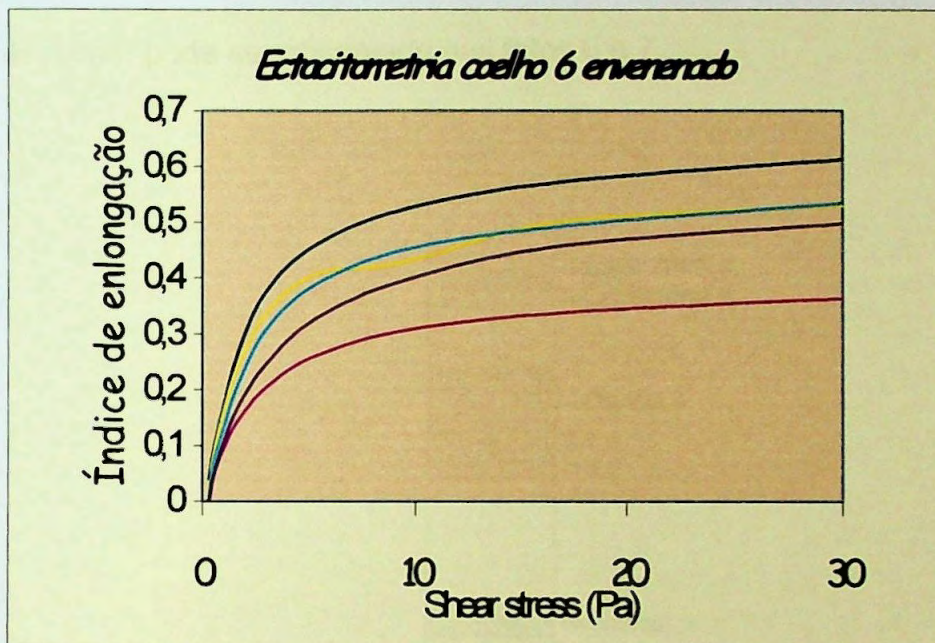
---- Ectacitometria coelho 5 após 24 horas da inoculação intradérmica do veneno de *Loxosceles gaucho*.

---- Ectacitometria coelho 5 após 72 horas da inoculação intradérmica do veneno de *Loxosceles gaucho*.

---- Ectacitometria coelho 5 após 120 horas da inoculação intradérmica do veneno de *Loxosceles gaucho*.



**GRÁFICO 12:** Ectacitometria do coelho número 6 após os tempos de 24, 72 e 120 horas da injeção intradérmica do veneno (10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) de *L. gaucho*. Os resultados são comparados com as curvas de referência máxima e mínima de alongação.



— Curva referência de máxima de alongação

--- Curva referência de mínima de alongação

— Ectacitometria coelho 6 após 24 horas da inoculação intradérmica do veneno de *Loxosceles gaucho*.

--- Ectacitometria coelho 6 após 72 horas da inoculação intradérmica do veneno de *Loxosceles gaucho*.

--- Ectacitometria coelho 6 após 120 horas da inoculação intradérmica do veneno de *Loxosceles gaucho*.

### 4.3 – Eletroforese SDS-PAGE

O resultado das eletroforeses feitas veio a corroborar com os outros resultados obtidos nas Curvas de Fragilidade Osmótica e Ectacitometria. No gel de poliacrilamida a 10% (SDS-PAGE) foram aplicadas 80  $\mu\text{g}$  de proteína da membrana do eritrócitos de coelhos aonde não foi observada nenhuma alteração na estrutura da membrana dos eritrócitos coelhos envenenados quando comparados com o coelho controle, como pode ser observado nas fotos 6 e 7.

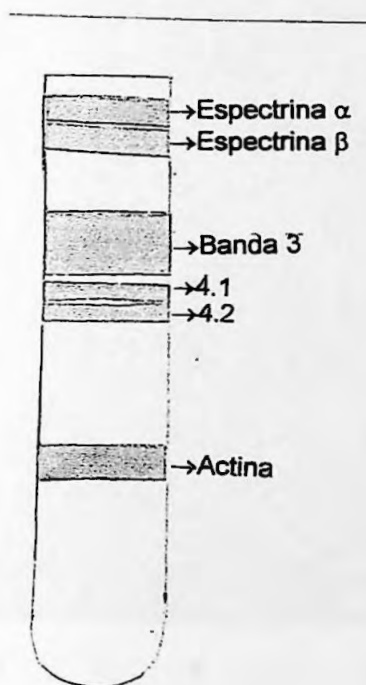
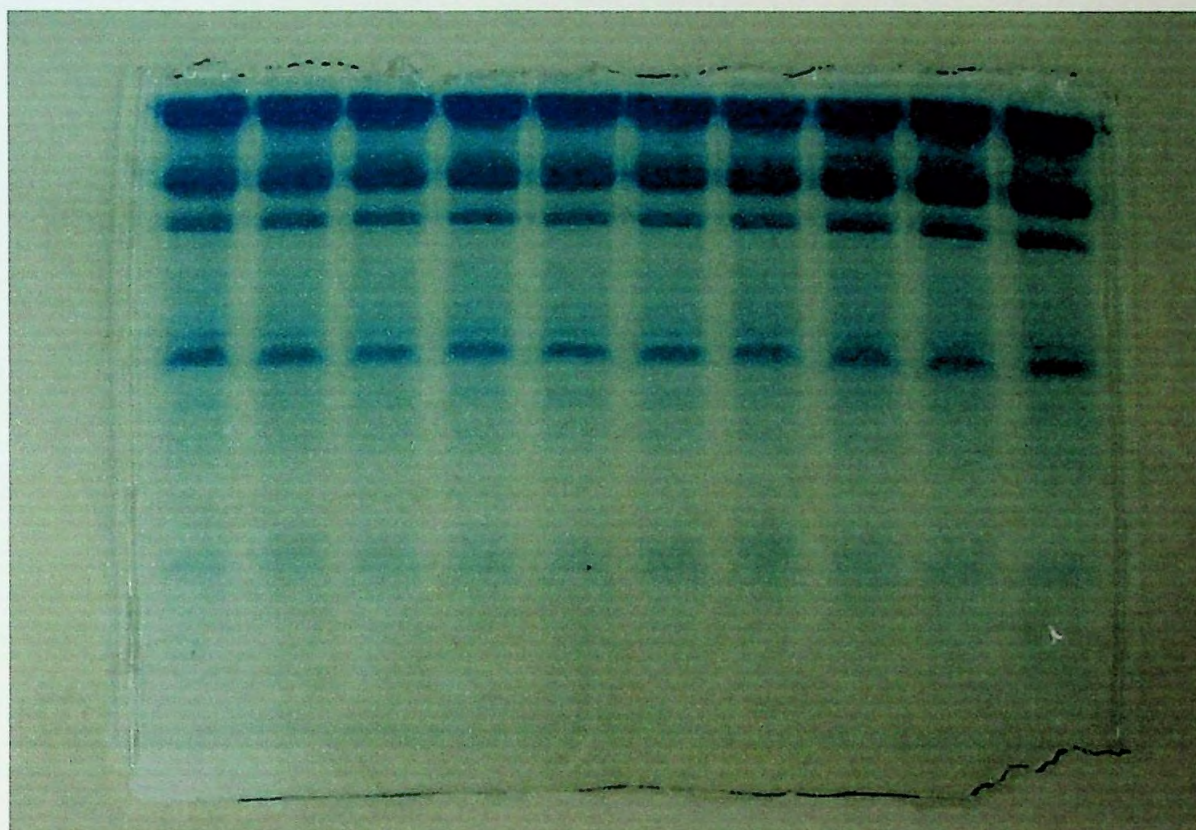


Figura 3: Posição eletroforética das principais frações proteicas da membrana eritrocitária de coelhos visíveis em eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE, segundo LAEMMLI e cols., 1970.



**Foto 6:** Eletroforese SDS-PAGE (10% de acrilamida) das proteínas da membrana eritrocitária dos coelhos após 24, 72 e 120 horas da injeção intradérmica do veneno (10 $\mu$ g/kg de peso do animal) de *L. gaucho*. Os resultados são comparados com a eletroforese das proteínas da membrana eritrocitária de um coelho controle.

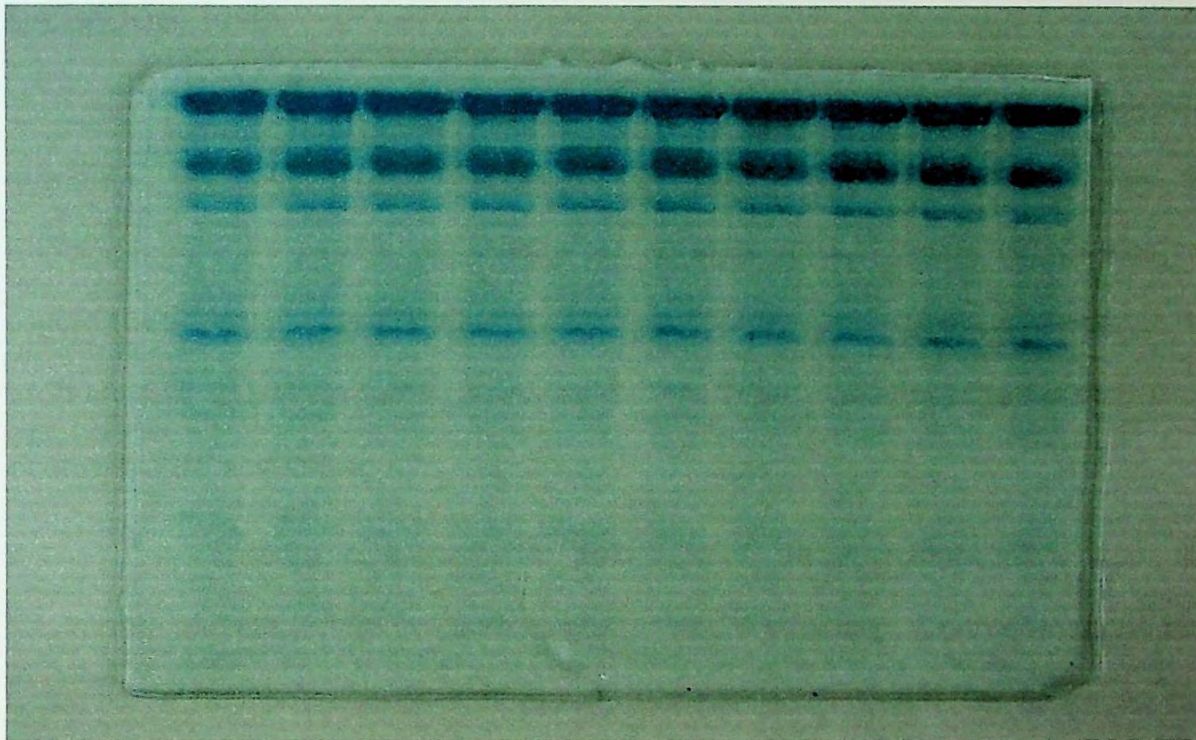


1      2      3      4      5      6      7      8      9      10

- 1 - Coelho controle
- 2 - Coelho 1 após 24 horas da inoculação intradérmica do veneno de *L. gaucho*
- 3 - Coelho 1 após 72 horas da inoculação intradérmica do veneno de *L. gaucho*
- 4 - Coelho 1 após 120 horas da inoculação intradérmica do veneno de *L. gaucho*
- 5 - Coelho 2 após 24 horas da inoculação intradérmica do veneno de *L. gaucho*
- 6 - Coelho 2 após 72 horas da inoculação intradérmica do veneno de *L. gaucho*
- 7 - Coelho 2 após 120 horas da inoculação intradérmica do veneno de *L. gaucho*
- 8 - Coelho 3 após 24 horas da inoculação intradérmica do veneno de *L. gaucho*
- 9 - Coelho 3 após 72 horas da inoculação intradérmica do veneno de *L. gaucho*
- 10 - Coelho 3 após 120 horas da inoculação intradérmica do veneno de *L. gaucho*



**Foto 7:** Eletroforese SDS-PAGE (10% de acrilamida) das proteínas da membrana eritrocitária dos coelhos após 24, 72 e 120 horas da injeção intradérmica do veneno (10 $\mu$ g/kg de peso do animal) de *L. gaucho*. Os resultados são comparados com a eletroforese das proteínas da membrana eritrocitária de um coelho controle.



1      2      3      4      5      6      7      8      9      10

- 1 - Coelho controle
- 2 - Coelho 4 após 24 horas da inoculação intradérmica do veneno de *L. gaucho*
- 3 - Coelho 4 após 72 horas da inoculação intradérmica do veneno de *L. gaucho*
- 4 - Coelho 4 após 120 horas da inoculação intradérmica do veneno de *L. gaucho*
- 5 - Coelho 5 após 24 horas da inoculação intradérmica do veneno de *L. gaucho*
- 6 - Coelho 5 após 72 horas da inoculação intradérmica do veneno de *L. gaucho*
- 7 - Coelho 5 após 120 horas da inoculação intradérmica do veneno de *L. gaucho*
- 8 - Coelho 6 após 24 horas da inoculação intradérmica do veneno de *L. gaucho*
- 9 - Coelho 6 após 72 horas da inoculação intradérmica do veneno de *L. gaucho*
- 10 - Coelho 6 após 120 horas da inoculação intradérmica do veneno de *L. gaucho*

## V- DISCUSSÃO

O envenenamento por picada de aranhas do gênero *Loxosceles* causa reações locais e até mesmo sistêmicas, sendo consideradas, devido ao grande número de casos notificados, as aranhas de maior importância médica no Brasil. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1999).

O interesse por aranhas deste gênero vem crescendo de acordo com o aumento significativo dos casos de acidentes humanos nas últimas décadas, principalmente no estado da região sul do País. Em algumas localidades, como na região metropolitana de Curitiba, a proliferação ambiental da aranha marrom tornou-se pronunciada, culminando no aumento da infestação intradomiciliar e das chances de ocorrência de acidentes.

Embora o mecanismo pelo qual o veneno loxoscélico age, não estar totalmente elucidado, um tratamento efetivo não é possível. A caracterização bioquímica e funcional dos componentes ativos do veneno pode ajudar na aplicação da terapia adequada, sendo pertinentes os estudos sobre a sua atividade tóxica e sobre a fisiopatologia deste envenenamento.

No presente trabalho, foram avaliadas possíveis alterações na estrutura de membrana eritrocitária resultantes da inoculação intradérmica do veneno de *Loxosceles gaucho*, que é a espécie de maior prevalência no estado de São Paulo. Foram estudadas a deformabilidade, a fragilidade osmótica e proteínas da membrana dos eritrócitos de coelhos envenenados, procurando verificar se o veneno loxoscélico tem alguma ação sobre as proteínas da membrana do glóbulo vermelho, e ser esta mais uma causa para hemólise intravascular.



Todos os eritrócitos normais apresentam equilíbrio osmótico em soluções isotônicas de cloreto de sódio com concentrações entre 0,8 e 0,9%. Contudo, eritrócitos com defeito na constituição proteica da membrana se comportam com maior fragilidade osmótica em relação aos eritrócitos normais. Esses eritrócitos mais frágeis hemolisam intensamente, a partir de soluções de NaCl com concentrações decrescentes: 0,6%, 0,5%, 0,4% e 0,3%. Para conhecer o grau de hemólise foi realizado o teste de fragilidade osmótica, a fim de evidenciar um possível aumento da fragilidade dos eritrócitos dos coelhos envenenados devido à ação do veneno loxoscélico sobre as proteínas da membrana desta célula, como não havia descrição na literatura de uma referência para curva de fragilidade osmótica em eritrócitos de coelhos, foi feita uma padronização utilizando 20 coelhos saudáveis, e a partir desta foi construída uma curva referência para comparar com as curvas dos animais injetados intradérmicamente com veneno de *L. gaucho*.

O estudo da deformabilidade dos eritrócitos é uma técnica sensível que permite verificar sutis alterações na membrana do glóbulo vermelho. O eritrócito é uma célula com alta capacidade de se deformar uma vez que tem que passar por capilares e sinusóides do sistema retículo endotelial com diâmetro até oito vezes menor que o seu e a estrutura da membrana desta célula é a responsável por esta habilidade. Portanto, uma alteração na composição da membrana eritrocitária compromete a deformabilidade e, conseqüentemente, diminui o tempo de vida desta célula (ALLARD et al., 1977; LACELLE et al., 1970). Da mesma forma que a curva de fragilidade osmótica, não havia referência para o comportamento de eritrócitos de coelhos usando ectacitometria, então foram utilizados 8 animais saudáveis para padronizar e construir uma referência do comportamento dos eritrócitos destes animais frente a esta técnica.

Por meio da técnica de eletroforese SDS-PAGE descrita por LAMMELI (1970), foi feita a avaliação das proteínas da membrana eritrocitária dos coelhos envenenados, não sendo encontrada nenhuma alteração quando comparada ao controle. As três técnicas utilizadas não mostram alterações relativas à membrana eritrocitária, sugerindo que neste modelo experimental a toxina presente no veneno da *Loxosceles gaucho* não tem efeito sobre a membrana do glóbulo vermelho.

A toxina loxoscélica já foi descrita como capaz de alterar a composição da membrana do glóbulo vermelho. TAMBOURGI et al. 1995, ao estudarem eritrócitos humanos sensibilizados pela proteína purificada do veneno loxoscélico, verificaram a clivagem de porções extracelulares das Glicoforinas C, A e B acompanhada pela indução a susceptibilidade do eritrócito à ação do sistema complemento.

Glicoforinas são sialoglicoproteínas cuja função está relacionada em manter a integridade da célula. Já foi descrita na literatura a capacidade destas proteínas transmembranas, inibirem a lise mediada pelo complemento (BRAUCH et al., 1983; OKADA et al., 1983; PARKER et al., 1984), e a remoção do ácido sialílico faz com que a via alternativa do sistema complemento seja ativada (PANGBURN e MÜLLER, 1978; FEARON, 1978).

Não pode ser excluída a possibilidade de que, no envenenamento loxoscélico, outro fator além da remoção das glicoforinas, deixe o eritrócito susceptível à ação do sistema complemento. A mudança na distribuição assimétrica dos fosfolípidos na bicamada lípica da membrana eritrocitária pode exteriorizar a fosfatidilserina (o único fosfolípido encontrado exclusivamente na monocamada interna) e já é bem conhecida a capacidade deste fosfolípido, quando exteriorizado, em ativar o sistema complemento (WANG et al, 1993; KRAUS et al, 1998). TAMBOURGI et al., 2002, usando citometria de fluxo, observaram que eritrócitos sensibilizados com a proteína purificada de *Loxosceles*

*intermedia*, exibiam fosfatidilserina na monocamada externa, sendo esta mais uma possível causa para ativação do sistema complemento e lise dos eritrócitos na forma cutâneo-visceral do loxoscelismo.

Outras alterações na composição da membrana eritrocitária devidas à ação do veneno loxoscélico já foram relatadas. BARRETTO et al., 2003 sensibilizaram *in vitro* a membrana de eritrócitos humanos ("ghosts") com o veneno bruto de *Loxosceles gaucho*, e foi observado o desaparecimento gradativo da banda 3. Esta proteólise foi inibida quando adicionado EDTA ao estroma eritrocitário, sugerindo então que a protease envolvida seja uma metaloproteinase.

A sintomatologia apresentada pelos animais foi condizente com o desenvolvimento de uma extensa lesão no local de injeção do veneno, com formação de edema e eritema iniciais, seguida do aparecimento de extensas áreas de hemorragia e necrose. A urina e fezes dos animais permaneceram-se inalteradas.

No entanto, a membrana eritrocitária parece estar intacta. A alteração em proteínas da membrana eritrocitária humana (como a degradação da banda 3) que ocorre *in vitro* não foi reproduzida. O resultado obtido no presente trabalho não mostrou nenhuma alteração nos parâmetros avaliados, sugerindo que os eritrócitos destes animais não foram sensibilizados pelo veneno da aranha marrom.

Estes dados corroboram com dados descritos na literatura. TAVARES (2002), ao estudar os eventos hematológicos produzidos pela injeção intradérmica do veneno de *Loxosceles gaucho* em coelhos, não observou nenhuma alteração relativa a haptoglobina. A diminuição da haptoglobina sérica é indicativa de hemólise intravascular, que, quando ocorre, a hemoglobina extravasada no plasma se conjuga à molécula de haptoglobina, dada a grande afinidade entre ambas. O complexo formado por estas duas moléculas é retirado rapidamente da circulação pelo sistema monocítico-fagocitário

(LIM et al., 2001; SOWEMIMO-COCKER, 2002). Depletada a haptoglobina plasmática, o restante de hemoglobina livre passa a ser detectável e apresenta níveis proporcionais à magnitude da hemólise.

No mesmo trabalho em que foi dosada a haptoglobina, TAVARES (2002) verificou a contagem do número de hemácias, hematócrito e hemoglobina nos tempos de 3, 24, 48, 72 e 120 horas após a inoculação do veneno, e o que se pode observar foi um decréscimo dos valores de eritrócitos nos tempos de 72 e 120 horas, acompanhado também pela diminuição do hematócrito e dosagem de hemoglobina. Porém esta aparente anemia não parece ocorrer por efeito direto do veneno, mais sim por uma hemodiluição compensatória, uma vez que os níveis de fibrinôgeno e haptoglobina se mostraram elevados. Uma vez que estas duas proteínas ocorrem na fase aguda de infecção, o aumento destas sugerem uma hiperproteinemia, não detectada pelos níveis de proteína total, que resultaria em hemodiluição compensatória, determinando um decréscimo nos parâmetros observados no hemograma.

Outro trabalho muito importante foi desenvolvido por FUTRELL, 1979. Neste trabalho eritrócitos humanos, de coelhos, de porcos, de cachorros e de porcos da Índia foram sensibilizados com o veneno Loxoscélico e quando adicionado o soro ativo correspondente, somente eritrócito de porcos e eritrócitos humanos foram hemolisados; os eritrócitos de coelhos e dos outros animais com exceção ao porco, se mostraram insensíveis à lise.

Uma possível explicação para o motivo pelo qual o coelho não desenvolve a forma cutâneo-visceral de loxoscelismo, e também o porque a membrana eritrocitária deste animal parece ser insensível ao veneno loxoscélico, se faz necessária. A membrana eritrocitária do coelho tem algumas diferenças na sua composição, quando comparada a do eritrócito humano. A membrana eritrocitária do coelho não possui

Glicoforinas (RAUENBUEHLER et al.,1982; LIGI et al., 1998); assim sendo, um dos motivos pelo qual o eritrócito do coelho não hemolisa pode estar relacionado à ausência desta proteína na estrutura da sua membrana, uma vez que uma das funções desta proteína está em proteger o eritrócito contra a ação lítica do sistema complemento. Com a ausência desta proteína a metaloproteinase ativada pela degradação da esfingomielina por ação da esfingomielinase-D presente no veneno, não encontra o substrato (que no caso seria porções extracelulares de Glicoforinas que são clivadas em eritrócitos humanos, deixando estas células mais susceptíveis à ação do complemento) para agir; desta forma, o eritrócito do coelho parece ser mais "resistente" à ação do sistema complemento.

Outra diferença importante na composição da membrana eritrócitária de humanos e coelhos, está na diferença de concentração de lípidos entre ambas. A porcentagem de esfingomielina na membrana do eritrócito humano é de 25,75% em relação aos outros lípidos que compõem a bicamada lipídica, enquanto que no coelho a proporção deste lípido em relação aos demais é de 19% (RAUENBUEHLER et al., 1982; WESSEL-VEERKAMP, 1973). A esfingomielinase-D presente no veneno loxoscélico tem sido descrita como a toxina de maior importância no veneno, sendo ela a principal responsável tanto pelos eventos locais como sistêmicos no envenenamento por *Loxosceles*. Esta enzima tem ação sobre a esfingomielina e, uma vez que a concentração deste lípido no eritrócito humano é maior em relação ao eritrócito do coelho, faz sentido pensar que o dano causado no eritrócito humano seja maior que no eritrócito animal, já que o eritrócito humano tem mais "substrato" para o veneno agir.

Além dos fatores já citados, não pode ser descartada a possibilidade de que a toxina presente no veneno encontre substrato suficiente na lesão local e aí seja consumida, não sobrando ou sobrando pouca toxina para causar dano a nível sistêmico.

Esta hipótese é fundamentada no trabalho de DOMINGOS et al., 2003, no qual injetou, via intradérmica, o veneno de *Loxosceles gaucho* em camundongos e estes não apresentaram lesão cutânea no local da inoculação. Porém, houve evidências de intoxicação sistêmica. Neste mesmo trabalho o veneno foi incubado com esfingomielina exógena antes de ser inoculado nos camundongos e o que se observou foi a formação da lesão cutânea no local da injeção do veneno, e a ausência de efeito sistêmico nestes animais, o que leva a concluir que, se encontrar a quantidade necessária de substrato, o veneno é consumido praticamente na sua totalidade no local em que foi injetado e causou a lesão cutânea. Como a lesão cutânea no coelho causada pela injeção intradérmica do veneno loxoscélico é muito extensa, deve ser considerada a possibilidade do veneno estar sendo consumido no local da lesão, não havendo toxina adicional para causar danos sistemicamente.

Portanto, este trabalho veio a contribuir na pesquisa de um animal modelo ideal para se estudar loxoscelismo sistêmico, descartando o coelho desta possibilidade, e abrindo portas para que um outro animal possa exercer melhor esta função.

---

## VI- CONCLUSÃO

- O veneno loxoscelico não tem ação, tanto direta quanto indireta sobre glóbulos vermelhos de coelhos.
- Apesar de ser um ótimo modelo para avaliar a lesão dermonecrótica, o coelho não parece ser o animal ideal para estudo do loxoscelismo cutâneo visceral.

## VII- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRE, P. Clinical relevance of basic research on red cell membranes. **Clinical Research**, v.40, n.2, p.176-86, 1992.

AGRE, P.; ORRINGER, E.P.; BENNETT, V. Deficient red cell spectrin in severe, recessively inherited spherocytosis. **New England Journal of Medicine**, v.306, n.19, p.1155-61, 1982.

ALLAN, D.; THOMAS, P.; LIMBRICK, A.R. The isolation and characterization of 60 nm vesicles ("nanovesicles") produced during ionophore A23187-induced budding of human erythrocytes. **Biochemical Journal**, v.188, n.3, p.881-7, 1980.

ALLARD, C.; MOHANDA, N.; BESSIS, M. Red cell deformability changes in hemolytic anemias estimated by diffractometric methods (ektacytometry). **Blood Cells**, v.3, p.209-28, 1977.

ANDRADE, R.M.G.; OLIVEIRA, K.C.; GIUSTI, A.L. et al. Ontogenetic development of *Loxosceles intermedia* spider venom. **Toxicon**, v.37, n.4, p.627-32, 1999.

ANSTEE, D.J. The blood group MNSs-active sialoglycoproteins. **Seminars in Hematology**, v18, n.1, p.13-31, 1981.

ANSTEE, D.J.; TANNER, M.J. Structure and function of red cell membrane sialoglycoproteins. **British Journal of Haematology**, v.64, n.2, p.211-5, 1986.

BABCOCK, J.L.; MARMER, D.J.; STEELE, R.W. Immunotoxicology of brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*) venom. **Toxicon**, v.24, n.8, p.783-90, 1986.

BARBARO, K.C.; CARDOSO, J.L.; EICKSTEDT, V.R. et al. Dermonecrotic and lethal components of *Loxosceles gaucho* spider venom. **Toxicon**, v.30, n.3, p.331-8, 1992.



BARBARO, K.C.; SOUZA, M.V.; MORHY, L. et al. Compared chemical properties of dermonecrotic and lethal toxins from spider of the genus *Loxosceles* (*Araneae*). **Journal of Protein Chemistry**, v.15, n.4, p.337-43, 1996.

BARRETTO, O.C.; CARDOSO, J.L.; DE CILLO, D. Viscerocutaneous form of loxoscelism and erythrocyte glucose-6-phosphate deficiency. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.27, n.5, p.264-7, 1985.

BARRETTO, O.C.; SATAKE, M.; NONOYAMA, K. et al. The calcium-dependent protease of *Loxosceles gaucho* venom acts preferentially upon red cell band 3 transmembrane protein. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.36, n.3, p.309-13, 2003.

BENNETT, V. The molecular basis of membrane-cytoskeleton in association human erythrocytes. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.18, n.1, p.49-65, 1982.

BENNETT, V. The spectrin-actin junction of erythrocyte membrane skeletons. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.988, n.1, p.107-21, 1989.

BENNETT, V.; STENBUCK P.J. Association between ankyrin and the cytoplasmic domain of band 3 isolated from the human erythrocyte membrane. **Journal of Biological Chemistry**, v.255, n.13, p.6424-32, 1980.

BODINE, D.M. IV; BIRKENMEIER, C.S.; BARKER, J.E. Spectrin deficient inherited hemolytic anemias in the mouse: characterization by spectrin synthesis and mRNA activity in reticulocytes. **Cell**, v.37, n.3, p.721-9, 1984.

BORKAN, J.; GROSS, E.; LUBIN, Y. et al. An outbreak of venomous spider bites in a citrus grove. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.52, n.3, p.228-30, 1995.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-54, 1976.

BRAUCH, H.; ROELCKE, D.; ROTHER, U. Glycophorin A inhibits lysis by the complement attack phase. **Immunobiology**, v.165, n.2, p.115-20, 1983.

BÜCHERL, W. Aranhas do gênero *Loxosceles* e "loxoscelismo" na América do Sul. **Memórias do Instituto Butantan**, v.30, p.167-86, 1960/2.

BÜCHERL, W. Aranhas do gênero *Loxosceles* e loxoscelismo na América. **Ciência & Cultura**, v.13, p.213-24, 1961.

BÜCHERL, W. Biologia de artrópodes peçonhentos. **Memórias do Instituto Butantan**, v.31, p.85-94, 1964.

BÜCHERL, W. Biology and venoms of the most important South American spiders of the genera *Phoneutria*, *Loxosceles*, *Lycosa*, and *Latrodectus*. **American Zoologist**, v.9, n.1, p.157-9, 1969.

CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, F.O.S.; WEN, F.H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD, V. Jr. **Animais Peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. 1ª ed. São Paulo; Savier, 2003. 160p.

CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, F.O.S.; EICKSTEDT, V.R.D. et al. Loxoscelismo: estudo de 242 casos (1980-1984). **Revista da Sociedade Brasileira de Toxicologia**, v.31, p.403-15, 1988.

COHEN, C.M. The molecular organization of the red cell membrane skeleton. **Seminars in Hematology**, v.20, n.3, p.141-58, 1983.

DACIE, J.V.; LEWIS, S.M. **Practical haematology**. 6<sup>th</sup> ed. Edinburgh; New York: Churchill Livingstone, 1984. 453p.

DAVIS, L.; LUX, S.E.; BENNETT, V. Mapping the ankyrin-binding site of the human erythrocyte anion exchanger. **J Biol Chem** v.5, n.264, p.9665-72, 1989.

DILLAH, C.J.; JANSEN, G.T.; HONEY-CUTT, W.M. Nort american loxocelism. **JAMA** v.188, n.1, p.153-6, 1964.

---

DODGE, J.T.; MITCHELL, C.; HANAHAN, D.J. The preparation and chemical characteristics of hemoglobin free ghosts of human erythrocytes. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.100, p.119-30, 1963.

DOMINGOS, M.O.; BARBARO, K.C.; TYNA W.; PENNY J.; LEWIS D.J.M.; NEW R.R.C. **Toxicon**, 1993. (no prelo)

EICKSTEDT, V.R.D. Aranhas coletadas nas grutas calcárias de Iporanga, São Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Butantan**, v.39, p.61-71, 1975.

EITAN, A.; ALONI, B.; LIVNE, A. Unique properties of the camel erythrocyte membrane, II. Organization of membrane proteins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.426, n.4, p.647-58, 1976.

FEARON, D.T. Regulation by membrane sialic acid of  $\beta$ 1H-dependent decay-dissociation of amplification C3 convertase of the alternative complement pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v.75, n.4, p.1971-5, 1978.

FEITOSA, L.; GREMSKI, W.; VEIGA, S.S. et al. Detection and characterization of metalloproteinases with gelatinolytic, fibronectinolytic and fibrinogenolytic activities in brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. **Toxicon**, v.36, n.7, p.1039-51, 1998.

FORRESTER, L.J.; BARRET, J.T.; CAMPBELL, B.J. Red blood cell lysis induced by the venom of the brown recluse spider: the role of sphingomyelinase D. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.187, n.2, p.355-65, 1978.

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

FUTRELL, J.M. Loxoscelism. **American Journal of Medical Sciences**, v.304, n.4, p.261-7, 1992.

FUTRELL J.M.; MORGAN, B.B.; MORGAN, P.N. An *in vitro* model for studying hemolysis associated with venom from the brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*). **Toxicon**, v.17, n.4, p.355-62, 1979.

GAJARDO-TOBAR, R. Mi experiencia sobre loxoscelismo. **Memórias do Instituto Butantan**, v.33, p.689-98, 1966.

GEREN, C.R.; CHAN, T.K.; HOWELL, D.E. et al. Isolation and characterization of toxins from brown recluse spider venom (*Loxosceles reclusa*). **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.174, n.1, p.90-9, 1976.

GEREN, C.R.; CHAN, T.K.; HOWELL, D.E. et al. Partial characterization of the low molecular weight fractions of the extract of the venom apparatus of the brown recluse spider and of its hemolymph. **Toxicon**, v.13, n.4, p.233-8, 1975.

GEREN, C.R.; CHAN, T.K.; HOWELL, D.E.; ODELL, G.V. Isolation and characterization of toxins from brown recluse spider venom (*Loxosceles reclusa*). **Arch. Biochem. Biophys.**, v.174, p. 90-4, 1974.

HUEBNER, K.; PALUMBO, A.P.; ISOBE, M. et al. The alpha-spectrin gene is on chromosome 1 in mouse and man. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v.82, n.11, p.3790-3, 1985.

HUSAIN-CHISHTI, A.; FAQUIN, W.; WU, C.C. et al. Purification of erythrocyte dematin (protein 4.9) reveals an endogenous protein kinase that modulates action bundling activity. **Journal of Biological Chemistry**, v.264, n.15, p.8985-91, 1989.

JORGE, M.T.; RIBEIRO, L.A. Acidentes causados por animais peçonhentos. In: AMATO NETO, V.; BALDY, J.L.S. **Doenças transmissíveis**. São Paulo: Sarvier, 1989. p.133-41.

JORGE, M.T.; VON EICKSTEDT, V.R.D.; KNYSAK, I, et al. Acidentes por picada de aranha/corso sobre acidentes com animais peçonhentos. **Arquivos Brasileiros de Medicina**, v.65, p.457-68, 1991.

---

KORSGREN, C.; COHEN, C.M. Associations of human erythrocyte band 4.2: Binding to ankyrin and to the cytoplasmic domain of band 3. **Journal of Biological Chemistry**, v.263, n.21, p.10212-8, 1988.

KRAUS, D.; MEDOF, M.E., MOLD, C. Complementary recognition of alternative pathway activators by decay-accelerating factor and factor H. **Infection and Immunity**, v.66, n.2, p.399-405, 1998.

KURPIEWSKI, G.; FORRESTER, L.J.; BARRETT, J.T. et al. Platelet aggregation and sphingomyelinase D activity of a purified toxin from the venom of *Loxosceles reclusa*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.678, n.3, p.467-76, 1981.

LA CELLE, P.L.; WEED, R.I. The contribution of normal and pathologic erythrocytes to blood rheology. **Progress in Hematology**, v.7, n.0, p.1-31, 1971.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, n.259, p.680-5, 1970.

LIGI, F.; CIACCI, C.; PALMA, F.; et al. Comparative study of the cytoplasmic domain of band 3 from human and rabbit erythrocyte membranes. **Comparative Biochemistry and Physiology B: Biochemistry and Molecular Biology**, v.121, n.3, p.265-71, 1998.

LIM, S.K.; FERRARO, B.; MOORE, K. et al. Role of haptoglobin in free hemoglobin metabolism. **Redox Report**, v.6, n.4, p.219-27, 2001.

LIU, S.C.; DERICK, L.H.; PALEK, J. Visualization of the hexagonal lattice in the erythrocyte membrane skeleton. **Journal of Cellular Biology**, v.104, n.3, p.527-36, 1987.

LOWRY, O.H.; ROSENBROUGH, N.J.; FARR, A.L. et al. Protein measurement with folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v.193, p.265-75, 1951.

LUX, S.E.; TSE, W.T.; MENNINGER, J.C. et al. Hereditary spherocytosis associated with deletion of human erythrocyte ankyrin gene on chromosome 8. **Nature**, v.345, n.6277, p.736-9, 1990.

MAJESKI, J.A.; STINNETT, J.D.; ALEXANDER, J.W. et al. Action of venom from the brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*) on human neutrophils. **Toxicon**, v.15, n.5, p.423-7, 1977.

MARTINEZ-VARGAS, A.Z. Loxoscelismo, un problema de salud en el Peru. **Boletín da la Oficina Sanitaria Panamericana**, v.103, p.378-86, 1987.

MELLO-LEITÃO, C.F. Espécies brasileiras do gênero *Loxosceles*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.6, p.69-73, 1934.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Fundação Nacional de Saúde/Coordenação de Controle de Zoonoses e Animais Peçonhentos **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. Brasília: CENEPI, 1999.

MOHANDAS, N.; CHASIS, J.A. Red blood cell deformability, membrane material properties and shape: regulation by transmembrane, skeletal and cytosolic proteins and lipids. **Seminars in Hematology**, v.30, n.3, p.171-92, 1993.

NORMENT, B.R.; JONG, Y.S.; HEITZ, J.R. Separation and characterization of venom components in *Loxosceles reclusa* – III. Hidrolytic enzyme activity. **Toxicon**, v.17, n.6, p.539-48, 1979.

OKADA, H.; TANAKA, H. Species-specific inhibition by glycophorins of complement activation via the alternative pathway. **Molecular Immunology**, v.20, n.11, p.1233-6, 1983.

OLIVEIRA, K.C.; ANDRADE, R.M.G.; GIUSTI, A.L. et al. Sex-linked variation of *Loxosceles intermedia* spider venoms. **Toxicon**, v.37, n.1, p.217-21, 1999.

---

OWENS, J.W.; MUELLER, T.J.; MORRISON, M. A minor sialoglycoprotein of the human erythrocyte membrane. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.204, n.1, p.247-54, 1980.

PALEK, J. The red cell membrane. In: BEUTLER, E.; WILLIAMS, W.J. et al, eds. **Williams hematology**. 5<sup>th</sup> ed. New York: McGraw-Hill, 1995. p.406-16.

PANGBURN, M.K.; MULLER-EBERHARD H.J. Complement C3 convertase: cell surface restriction of  $\beta$ 1H control and generation of restriction on neuraminidase-treated cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v.75, n.5, p.2416-20, 1978.

PARKER, C.J. SOLDATO, C.M.; TELEN M.J. Increased efficiency of binding of nascent C3b to the erythrocytes of chronic cold agglutinin disease. **Journal of Clinical Investigation**, v.74, n.3, p.1050-62, 1984.

PIZZI, T.; ZACARIAS, J.; SCHENONE, H. Studio histopatologico experimental en el envenenamiento por *Loxosceles laeta*. **Biológica**, Santiago, v.23, p.33-51, 1957.

RAUENBUEHLER, P.B.; CORDES, K.A.; SALHANY J.M. Identification of the hemoglobin binding sites on the inner surface of the erythrocyte membrane. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.692, n.3, p.361-70, 1982.

REES, R.S.; FIELDS, J.P.; KING L.E. Jr. Do brown recluse spider bites induce pyoderma gangrenosum? **Southern Medical Journal**, v.78, n.3, p.283-7, 1985.

REES, R.S.; O'LEARY, J.P.; KING, L.E. Jr. The pathogenesis of systemic loxoscelism following brown recluse spider bites. **Journal of Surgical Research**, v.35, n.1, p.1-10, 1983.

REKOW, M.A.; CIVELLO, D.J.; GEREN, C.R. Enzymatic and hemolytic properties of brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*) toxin and extracts of venom apparatus, cephalothorax and abdomen. **Toxicon**, v.21, n.3, p.441-4, 1983.

---

ROSENFELD, G. Animais peçonhentos e tóxicos do Brasil. In: LACAZ, C.S.; BARUZZI, R.G.; SIQUEIRA Jr, W. **Introdução à geografia médica do Brasil**. São Paulo: Blucher/USP, 1972.

SCHENONE, H.; LETONJA, T. Notas sobre la biologia y distribucion geográfica de las aranas del género *Loxosceles*. **Boletín Chileno de Parasitología**, v.30, n.1-2, p.27-9, 1975.

SCHENONE, H.; SUAREZ, G. Venoms of *Scytodidae*, Genus *Loxosceles*. **Handbuch der experimentellen pharmakologie. Arthropod Venoms.**, v.48, Chap. II, p.247-75, 1978.

SCHENONE, H.; SAAVEDRA, T.; ROJAS, A; VILLAROEL, F. Loxoscelismo en Chile. Estudios epidemiologicos, clinicos y experimentales. **Res. Inst. Med. Trop. São Paulo**, 31: 403-15, 1989.

SCHRIER, S.L. Red cell membrane biology – introduction. **Clinical Haematology**, v.14, p.1-12, 1985.

SEGER, D.L.; MURRAY L.M. Hemolytic anemia following a presumitive brown recluse spider bite. **J. Toxicol Clin Toxicol**, v.32, n.4, p.451-6, 1994.

SEZERINO, U.M.; ZANNIN, M.; COELHO, L.K. et al. A clinical and epidemiological study of *Loxosceles* spider envenoming in Santa Catarina, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.92, n.5, p.546-8, 1998.

SHOET, S.B.; BEUTLER, E. The red cell membrane. In: WILLIAMS, W.J.; BEUTLER, E.; ERLEV, A.J. et al, eds. **Hematology**. 4<sup>th</sup> ed. New York: McGraw-Hill, 1990. p.368-78.

SHOTTON, D.M.; BURKE B.E.; BRANTON, D. The molecular structure of human erythrocyte spectrin. Biophysical and electron microscopic studies. **Journal of Molecular Biology**, v.131, n.2, p.303-29, 1979.



SIEGEL, D.L.; BRANTON, D. Partial purification and characterization of an actin bundling protein, band 4.9, from human erythrocytes. **Journal of Cellular Biology**, v.100, n.3, p.775-85, 1985.

SILVEIRA, P.; CYNOBER T.; DHERMY, D. et al. Red blood cell abnormalities in hereditary elliptocytosis and their relevance to variable clinical expression. **American Journal of Clinical Pathology**, v.108, n.4, p.391-9, 1997.

SMITH C.W.; MICKS D.W. The role of polymorphonuclear leukocytes in the lesion caused by the venom of the brown spider, *Loxosceles reclusa*. **Lab Invest**, v.22, n.1, p.90-3, 1970.

SOGIN D.C.; HINKLE, P.C. Binding of cytochalasin B to human erythrocyte glucose transporter. **Biochemistry**, v.19, n.23, p.5417-20, 1980.

SOGIN D.C.; HINKLE, P.C. Characterization of the glucose transport from human erythrocytes. **Journal of Supramolecular Structure**, v.8, n.4, p.447-53, 1978.

SOWEMIMO-COKER, S.O. Red blood cell hemolyses during processing. **Transfusion Medicine Reviews**, v.16, n.1, p.46-60, 2002.

SPEICHER, D.W; SPEICHER, K.D. Analysis of spectrin conformation using multiples approaches. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.13B, suppl., p.220, 1989.

TAMBOURGI, D.V.; MAGNOLI, F.C.; VON EICKSTEDT V.R. et al. Incorporation of a 35-kilodalton purified protein from *Loxosceles intermedia* spider venom transforms human erythrocytes into activators of autologous complement alternative pathway. **Journal of Immunology**, v.155, n.9, p.4459-66, 1995.

TAMBOURGI, D.V.; MORGAN, B.P.; ANDRADE, R.M. et al. *Loxosceles intermedia* spider envenomation induces activation of an endogenous metalloproteinase, resulting in cleavage of glycoporphins from the erythrocyte surface and facilitating complement-mediated lysis. **Blood**, v.95, n.2, p.683-91, 2000.

TAMBOURGI, D.V.; SILVA M.S.; BILLINGTON S.J. et al. Mechanism of induction of complement susceptibility of erythrocytes by spider and bacterial sphingomyelinases. *Immunology*, v.107, n.1, p.93-101, 2002.

TAVARES, F.L. **Alterações hematológicas induzidas experimentalmente em coelhos pelo veneno da aranha marrom, *Loxosceles gaucho***. 2002. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo.

TCHERNIA, G.; MOHANDAS, N.; SHOHET, S.B. Deficiency of skeletal membrane protein band 4.1 in homozygous hereditary elliptocytosis. Implications for erythrocyte membrane stability. *Journal of Clinical Investigation*, v.68, n.2, p.554-60, 1981.

VEIGA, S.S.; GREMSKI, W.; SANTOS, V.L. et al. Oligosaccharide residues of *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom proteins: dependence on glycosylation for dermonecrotic activity. *Toxicon*, v.37, n.4, p.587-607, 1999.

VEIGA, S.S.; SILVEIRA, R.B.; DREYFUS, J.L. et al. Identification of high molecular weight serineproteases in *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. *Toxicon*, v.38, n.6, p.825-39, 2000.

VORSE, H.; SECCARECCIO, P.; WOODRUFF, K. et al. Disseminated intravascular coagulopathy following fatal brown spider bite (necrotic arachnidism). *Journal of Pediatrics*, St. Louis, v.80, n.6, p.1035-7, 1972.

WANG, R.H.; PHILLIPS, G. Jr.; MEDOF M.E. et al. Activation of the alternative complement pathway by exposure of phosphatidylethanolamine and phosphatidylserine on erythrocytes from sickle cell disease patients. *Journal of Clinical Investigation*, v.92, n.3, p.1326-35, 1993.

WESSELS, J.M.; VEERKAMP J.H. Some aspects of the osmotic lysis of erythrocytes.3. Comparison of the glycerol permeability and lipid composition of red blood cell membranes from eight mammalian species. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.291, n.1, p.190-6, 1973.

WRIGHT, R.P.; ELGERT K.D.; CAMPBELL, B.J. et al. Hyaluronidase and esterase activities of the venom of the poisonous brown recluse spider. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.159, n.1, p.415-26, 1973.

YU, J.; FISCHMAN, D.A.; STECK, T.L. Selective solubilization of proteins and phospholipids from red blood cell membranes by nonionic detergents. **Journal of Supramolecular Structure**, v.1, n.3, p.233—48, 1973.

---

## VIII- RESUMO

Acidentes humanos causados pela picada de aranhas do gênero *Loxosceles* são caracterizados pela formação de uma lesão dermonecrótica no local da picada. No entanto, alguns pacientes desenvolvem o loxoscelismo cutâneo visceral, que além da lesão dermonecrótica apresentam um envolvimento sistêmico mais severo acompanhado principalmente por hemólise intravascular, que pode resultar em insuficiência renal aguda. Na tentativa de elucidar o mecanismo pelo qual o veneno loxoscélico age ao destruir glóbulos vermelhos, objetivou-se estudar possíveis alterações na membrana eritrocitária de coelhos injetados intradérmicamente com veneno de *L. gaucho*, espécie predominante no estado de São Paulo. Para isso, após os tempos de 24, 72 e 120 horas da injeção intradérmica com veneno de *L. gaucho* (10 µg/kg), foram feitos testes de fragilidade osmótica, deformabilidade e estudo das proteínas da membrana eritrocitária dos coelhos através da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE). Os animais estudados desenvolveram extensa lesão dermonecrótica no local da injeção intradérmica, porém tanto nos testes de fragilidade osmótica, deformabilidade e eletroforese não foi detectada nenhuma alteração na estrutura da membrana do eritrócito destes animais. Somando a resultados obtido por Tavares (2002), que observou não haver aumento da haptoglobina e da bilirrubina plasmática nestes mesmos animais, os presentes resultados levam a inferir que o glóbulo vermelho do coelho não é sensível à ação do veneno loxoscélico, portanto não sendo um bom modelo para estudo da forma viscerocutânea de loxoscelismo.

## IX- ABSTRACT

The human accidents caused by bite of spiders of the gender *Loxosceles* are characterized by the formation of a dermonecrotic lesion in the local of the bite. Nevertheless, some patients develop viscerocutaneous loxoscelism wich besides the dermonecrosis they also present a more severe systemic involvement mainly by intravascular hemolysis that can result in a renal failure. For a better understanding of the mechanism through which the loxoscelic venom destroys red blood cells, the study was focused on the possible alterations in rabbits erythrocytes membrane which were intradermic injected by *L. gaucho* venom (spicimen mostly found in São Paulo state). For this purpose, after the times of 24, 72, 120 hours of injections i.d. of the venom, there were made tests of red blood cell osmotic fragility, deformability and the study of rabbit erythrocytes membrane proteins through SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) technique. These studied animals developed a large dermonecrotic lesion in the intradermic (i.d.) shot place, buti it wasn't detected any alterations in the structure of the erythrocytes membrane when used the red blood cell osmotic fragility, deformability and eletroforese tests. Adding to the results obtained by Tavares (2002) who observed there was no haptoglobin and plasmatic bilirrubin increase in the same animals, this present study infer that the rabbit red cells are not sensitive tl the loxoscelic venom, regarding this result the rabbits are not a good model for the viscerocutaneous loxoscelism study approach.

## IX- ABSTRACT

The human accidents caused by bite of spiders of the gender *Loxosceles* are characterized by the formation of a dermonecrotic lesion in the local of the bite. Nevertheless, some patients develop viscerocutaneous loxoscelism wich besides the dermonecrosis they also present a more severe systemic involvement mainly by intravascular hemolysis that can result in a renal failure. For a better understanding of the mechanism through which the loxoscelic venom destroys red blood cells, the study was focused on the possible alterations in rabbits erythrocytes membrane which were intradermic injected by *L. gaucho* venom (spicimen mostly found in São Paulo state). For this purpose, after the times of 24, 72, 120 hours of injections i.d. of the venom, there were made tests of red blood cell osmotic fragility, deformability and the study of rabbit erythrocytes membrane proteins through SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) technique. These studied animals developed a large dermonecrotic lesion in the intradermic (i.d.) shot place, buti it wasn't detected any alterations in the structure of the erythrocytes membrane when used the red blood cell osmotic fragility, deformability and eletroforese tests. Adding to the results obtained by Tavares (2002) who observed there was no haptoglobin and plasmatic bilirrubin increase in the ~~same~~ animals, this present study infer that the rabbit red cells are not sensitive tl the loxoscelic venom, regarding this result the rabbits are not a good model for the viscerocutaneous loxoscelism study approach.

LIV.	Duocaps de Antis
N. E.	-
DATA	29/03/04
PREÇO	-
TOMBAMENTO	31/03/04

A117810

Data:	29 / 03 / 04
Lilacs:	-
Dedalus:	1368782
MFN:	26408
Terminal:	OK

BIBLIOTECA  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Universidade de São Paulo