

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA



Thomaz Augusto Alves da Rocha e Silva

**“Análise Histológica do Aparato Venenífero e Caracterização
Farmaco-bioquímica da Peçonha de *Vitalius dubius*
(Araneae, Theraphosidae)”**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
THOMAZ AUGUSTO ALVES DA ROCHA E SILVA.
STEPHEN HYSLOP
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Doutor em Biologia Celular e Estrutural,
na área de Biologia Celular.

Orientador: Prof. Dr. Stephen Hyslop

Campinas, 2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

R582a	<p>Rocha e Silva, Thomaz Augusto Alves da Análise histológica do aparato venenífero e caracterização farmaco-bioquímica da peçonha de <i>Vitalius dubius</i> (Araneae, Theraphosidae) / Thomaz Augusto Alves da Rocha e Silva. – Campinas, SP: [s.n.], 2008.</p> <p>Orientador: Stephen Hyslop. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. Aranha caranguejeira. 2. Aparato venenífero. 3. Peçonhas. 4. <i>Vitalius dubius</i>. I. Hyslop, Stephen. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.</p> <p>(rcdt/ib)</p>
--------------	---

Título em inglês: Histological analysis of the venom apparatus and biochemical and pharmacological characterization of venom from *Vitalius dubius* (Araneae, Theraphosidae).

Palavras-chave em inglês: Tarantulas; Venom apparatus; Venom; *Vitalius dubius*.

Área de concentração: Biologia Celular.

Titulação: Doutor em Biologia Celular e Estrutural.

Banca examinadora: Stephen Hyslop, Fábio Bucarechi, Sebastião Roberto Taboga, Soraia Kátia Pereira Costa, Wagner Ferreira dos Santos.

Data da defesa: 31/01/2008.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural.

Campinas, 31 de janeiro de 2008.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Stephen Hyslop (Orientador)


Assinatura

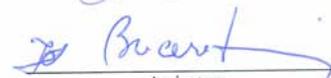
Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga


Assinatura

Profa. Dra. Soraia Katia Pereira Costa


Assinatura

Prof. Dr. Fabio Bucarechi


Assinatura

Prof. Dr. Wagner Ferreira dos Santos


Assinatura

Profa. Dra. Mary Anne Heidi Dolder

Assinatura

Profa. Dra. Catarina de Fatima Pereira Teixeira

Assinatura

Profa. Dra. Elen Cristina Teizem Landucci

Assinatura

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha **Tese de Doutorado** intitulada “**Análise Histológica do Aparato Venenífero e Caracterização Farmaco-bioquímica da Peçonha de *Vitalius dubius* (Araneae, Theraphosidae)**”.

() não se enquadra no Artigo 1º, § 3º da Informação CCPG 002/06, referente a bioética e biossegurança.

() está inserido no Projeto CIBio (Protocolo nº _____), intitulado _____

(X) tem autorização da Comissão de Ética em Experimentação Animal (Protocolos nºs 1228-1, 1229-1 e 1230-1).

() tem autorização do Comitê de Ética para Pesquisa com Seres Humanos (?) (Protocolo nº _____).



Aluno: Thomaz Augusto Alves da Rocha e Silva



Orientador: Prof. Dr. Stephen Hyslop

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido () Indeferido


Nome: _____
Função: Prof. Dra. ANAMÁRIA A. GUARALDO
Presidente
Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA/IB - UNICAMP

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Luciana Benjamin Benatti, Beatriz Benatti da Rocha e Silva e ao nenê que está chegando pelo amor, motivação e por estarem sempre ao meu lado me apoiando e incentivando;

Aos meus pais, pela vida, incentivo, suporte e orientação;

Às minhas irmãs, pela consagração do trio que formamos, e pela presença em todas as horas, mesmo estando longe;

A todos os meus familiares, por participarem da minha vida e por me aceitarem como sou;

Ao Professor Stephen, pela pequena parte de seu enorme conhecimento que foi possível ser transmitida e pela convivência, paciência e lições de profissionalismo;

Aos Professores Maria Alice da Cruz Höfling, Carla Beatriz Collares Buzatto, Edson Antunes e Léa Rodrigues Simioni, por abrirem seus laboratórios e pela ajuda sempre atenciosa;

Aos meus colegas de UNICAMP, pelo companheirismo de todas as horas;

Aos Centros de Controle de Zoonoses, em especial os de Itú e Campinas pela parceria, sem a qual este trabalho não seria possível;

Ao Dr. Alexandre E. Nowill e Gilberto C. Franchi Jr. do CIPOI, pela parceria e oportunidade;

Ao Professor Hernandes Faustino de Carvalho, pela parceria e ajuda em momentos difíceis;

Aos técnicos José Ilton, Toninho, Miguel, Marcos e o Biólogo Gildo pela ajuda e orientação e pelos bons momentos durante o trabalho;

À Fapesp, pelo apoio financeiro, e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural pela formação.

Agradeço também a todos os professores de minha vida até então, desde a Tia Cláudia, em 1981, até o Professor Igor A. Degterev, orientador de mestrado, por terem construído este aluno;

A todos os meus amigos que, felizmente, são muito numerosos, espalhados pelo mundo, por uma das melhores coisas da vida: amizade;

Aos amigos da espeleologia, por me mostrar e conduzir em lugares que realmente acalmam a alma.

Agradeço a toda energia do universo, por permitir a criação deste planeta, dos seres vivos, dos humanos, do pensamento e desta tese de doutorado;

Aos meus anjos da guarda, que tralham muito e estão sempre alegres, pela orientação e proteção em todos os momentos.

SUMÁRIO

ABREVIATURAS	7
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE TABELAS	10
RESUMO	11
ABSTRACT	13
INTRODUÇÃO	15
A FAMÍLIA THERAPHOSIDAE	15
ESTRUTURA DO APARATO VENENÍFERO	18
EXTRAÇÃO DE PEÇONHAS	19
COMPOSIÇÃO DAS PEÇONHAS	20
ATIVIDADES BIOLÓGICAS DAS PEÇONHAS	22
VARIAÇÃO NA COMPOSIÇÃO E AÇÃO DAS PEÇONHAS	30
NEUTRALIZAÇÃO POR ANTISORO	30
PURIFICAÇÃO DE TOXINAS	31
OBJETIVOS	32
MATERIAL E MÉTODOS	33
REAGENTES	33
ANIMAIS	33
HISTOLOGIA	34
CARACTERIZAÇÃO DA PEÇONHA	36
ENSAIOS IMUNOLÓGICOS	40
ATIVIDADES BIOLÓGICAS E PREPARAÇÕES FARMACOLÓGICAS	41
RESULTADOS	47
INSTALAÇÃO DO BIOTÉRIO DE ARTRÓPODES	47
DESCRIÇÃO ESTRUTURAL E ULTRAESTRUTURAL DO APARATO VENENÍFERO	48
EXTRAÇÃO DA PEÇONHA	66
ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA	68
ATIVIDADES ENZIMÁTICAS	68
CARACTERIZAÇÃO IMUNOLÓGICA	70
ATIVIDADES BIOLÓGICAS	71
FRACIONAMENTO DA PEÇONHA POR CROMATOGRAFIA DE FASE REVERSA	80
IDENTIFICAÇÃO DAS FRAÇÕES ATIVAS DA PEÇONHA	82
DISCUSSÃO	85
GLÂNDULA E APARATO VENENÍFERO	85
EXTRAÇÃO DA PEÇONHA	88
CARACTERIZAÇÃO DA PEÇONHA	90
ATIVIDADES BIOLÓGICAS	92
CONCLUSÕES	99
REFERÊNCIAS	100

ABREVIATURAS

5-HT:	5-Hidroxitriptamina ou serotonina,
Ach:	Acetilcolina,
ANOVA:	Análise de variância,
ASIC:	Canais de sódio sensíveis à acidez (do inglês, <i>acid-sensitive ion channel</i>),
CCVD:	Canais de cálcio voltagem-dependentes,
CIAE:	Canais iônicos ativados por estiramento,
E.P.M:	Erro padrão da média.
ELISA:	Ensaio enzimático de imunização (do inglês, <i>enzyme-linked immuno sorbent assay</i>),
HE:	Hematoxilina-eosina,
HPLC:	Cromatografia líquida de alta performance (do inglês, <i>high performance liquid chromatography</i>),
IgG:	Imunoglobulina G,
Kv:	Canais de potássio-voltagem dependente.
L-NAME:	L-Nitro-arginina-metil-éster,
MALDI-TOF:	Espectrometria de massa (do inglês, <i>matrix assisted laser dissociation- ionization time of flight</i>),
MET:	Microscopia eletrônica de transmissão.
MEV:	Microscopia eletrônica de varredura.
MTT:	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazólio,
Nav:	Canais de sódio voltagem-dependentes,
OPD:	o-Fenilenodiamina.
PAS:	Coloração histológica ácido periódico– corante de Schiff,
PBS:	Solução tamponante de fosfato salina (do inglês, <i>phosphate-buffered saline</i>),
REL:	Retículo endoplasmático liso.
RER:	Retículo endoplasmático rugoso.
SDS:	Dodecil sulfato de sódio.
SDS-PAGE:	Eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida (do inglês, <i>SDS-polyacrylamide gel electrophoresis</i>),
TRU:	Unidade relativa de turbidez (do inglês, <i>turbidity reducing unit</i>),
TTX:	Tetrodotoxina.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 – Esquemas do critério de divisão de subordens em Araneae.	16
Figura 2 – Exemplos de <i>Vitalius dubius</i> e biogeografia do gênero <i>Vitalius</i> .	17
Figura 3 – Macho adulto de <i>V. dubius</i> anestesiado, posicionado para extração da peçonha.	37
Figura 4 – Biotério das aranhas no laboratório.	48
Figura 5 – Vista frontal da aranha para localização das quelíceras e ferrões. Foto lateral de uma quelícera isolada.	49
Figura 6 – Eletromicrografia de varredura da quelícera de <i>V. dubius</i> isolada de uma exúvia (exoesqueleto resultante de uma ecdise).	50
Figura 7 – Cortes histológicos de quelícera de <i>V. dubius</i> .	51
Figura 8 – Microscopia eletrônica de varredura e óptica de glândula de peçonha de <i>V. dubius</i> .	52
Figura 9 – Secções transversais de glândula de peçonha de <i>V. dubius</i> mostrando a organização da musculatura (m) e epitélio	54
Figura 10 – Cortes transversais da glândula de <i>V. dubius</i> corados com HE.	
Figura 11 – Cortes longitudinais da glândula de peçonha mostrando a musculatura (m) e o epitélio (e).	56
Figura 12 – Eletromicrografia de varredura do epitélio glandular.	57
Figura 13 – Eletromicrografias de epitélio de glândula de peçonha.	59
Figura 14 – Eletromicrografia de vesículas lamelares da glândula de peçonha.	60
Figura 15 – Eletromicrografias de epitélio de glândula de peçonha um dia após extração de peçonha.	62
Figura 16 – Eletromicrografias de epitélio de glândula de peçonha três dias após extração de peçonha.	63
Figura 17 – Eletromicrografias de epitélio de glândula de peçonha sete dias após extração de peçonha.	64
Figura 18 – Eletromicrografias de epitélio de glândula de peçonha quinze dias após extração de peçonha.	65
Figura 19 – Rendimento de peçonha de <i>V. dubius</i> .	67
Figura 20 – SDS-PAGE da peçonha de <i>V. dubius</i> .	69
Figura 21 – Hialuronidase em peçonha de <i>V. dubius</i> .	69
Figura 22 – ELISA das peçonhas de <i>V. dubius</i> , <i>P. nigriventer</i> e <i>T. serrulatus</i> ,	70
Figura 23 – Immunoblotting em gel de acrilamida 10% das peçonhas de <i>V. dubius</i> , <i>P. nigriventer</i> e <i>T. serrulatus</i> .	71
Figura 24 – Curva dose-resposta de atividade hemolítica.	71

Figura 25 – Pannel de efeitos da citarabina e da peçonha de <i>V. dubius</i> em culturas de linhagens de células leucêmicas.	73
Figura 26 – Curva dose-resposta do edema causado pela peçonha de <i>V. dubius</i> .	74
Figura 27 – Caracterização do edema de pele causada pela peçonha de <i>V. dubius</i> em ratos.	74
Figura 28 – Neutralização do edema de pele em ratos tratados com as peçonhas de <i>V. dubius</i> , <i>P. nigriventer</i> e <i>T. serrulatus</i> .	75
Figura 29 – Curvas de concentração-resposta para alguns agonistas em íleo de cobaio.	77
Figura 30 – Inibição pela peçonha de <i>V. dubius</i> da curva de contração de músculo anococcígeo de rato obtida por eletroestímulo.	78
Figura 31 – Caracterização do sítio de ação da peçonha em músculo anococcígeo de rato.	78
Figura 32 – Caracterização do sítio de ação da peçonha em músculo anococcígeo de rato.	79
Figura 33 – Bloqueio neuromuscular causado pela peçonha de <i>V. dubius</i> (80 mg/mL) em preparação nervo frênico-diafragma de camundongo.	79
Figura 34 – Bloqueio neuromuscular produzido pela peçonha de <i>V. dubius</i> na preparação de biventer cervicis de pintainho.	81
Figura 35 – Perfil de eluição de peçonha de <i>V. dubius</i> (100 µg) após cromatografia de fase reversa.	82
Figura 36 – Atividade edematogênica das frações da peçonha de <i>V. dubius</i> .	83
Figura 37 – Ação neuromuscular das frações da peçonha de <i>V. dubius</i> em preparação de biventer cervicis de pintainho.	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Espécies de aranhas mantidas em cativeiro.

Página 46

Tabela 2 – Comparação entre três métodos de extração de peçonha.

Página 88

RESUMO

A aranha *Vitalius dubius* pertence à família Theraphosidae, que compreende todas as caranguejeiras. Sua distribuição é restrita à região Sudeste do Brasil, principalmente em São Paulo e Minas Gerais. Trata-se de uma espécie urbana, pouco agressiva e que não apresenta registros de acidentes com relevância clínica. O presente trabalho teve como objetivo descrever o aparato venenífero e caracterizar bioquímica e farmacologicamente a peçonha desta aranha. A estrutura do aparato venenífero consiste em duas robustas quelíceras anteriores, com grandes ferrões para imobilização de presas e inoculação de peçonha. Cada quelícera é preenchida por musculatura estriada, responsável pela mobilidade dos ferrões, além de abrigar a glândula de peçonha que, por sua vez, encontra-se imersa nesta musculatura, sem estar ligada à mesma. A glândula é envolta por duas túnicas musculares helicoidais entrelaçadas, responsáveis pela contração da glândula para expulsão da peçonha através de um duto interno ao ferrão. Interna à musculatura, uma camada basal rica em elastina sustenta uma complexa rede epitelial produtora de peçonha. Este epitélio extratificado possui células anastomosadas, com núcleos periféricos e prolongamentos citoplasmáticos voltados para a luz da glândula, organizado principalmente por filamentos de actina. Estes prolongamentos formam reservatórios envolvidos na biossíntese de peçonha. A análise ultra-estrutural deste epitélio revelou a presença de organelas envolvidas na síntese protéica, como núcleo com abundante eucromatina, nucléolo, retículo endoplasmático rugoso, polissomos, além de abundantes: retículo liso, aparato de Golgi, mitocôndrias e vacúolos autofágicos. Durante a fase de produção de peçonha, as principais alterações ultra-estruturais observadas foram compactação e remodelamento do epitélio, abundância de organelas e deformidade de núcleos, bem como a presença de hemócitos nos últimos estágios. A extração de peçonha revelou que as fêmeas possuem rendimento maior, em quantidade absoluta [$23,1 \pm 2,3$ (n=11) e $12,5 \pm 0,7$ (n=16) mg de peçonha/aranha/extração, para fêmeas e machos, respectivamente]. No entanto, quando a quantidade de peçonha é relacionada ao o peso do animal, os machos possuem maior índice. Além disso, as fêmeas adultas com maior peso apresentaram rendimento de peçonha menor que as mais jovens. A caracterização bioquímico-farmacológica da peçonha revelou através de eletroforese que a peçonha de *V. dubius* possui poucas proteínas de elevada massa molecular, mas é rica em peptídeos e pequenas moléculas. A

peçonha contém bastante hialuronidase, mas é destituída de atividade proteolítica, assim como não foi observada ação hemolítica. No imunoenensaio de ELISA, a peçonha apresentou reatividade cruzada com soro antiaracnídico do Instituto Butantan, preparado contra as peçonhas de *Loxosceles gaucho*, *Phoneutria nigriventer* e *Tityus serrulatus*. No entanto, o immunoblotting demonstrou que apenas componentes da peçonha maiores que 30 kDa foram responsáveis por esta reação. A peçonha de *V. dubius* (10 - 300 µg/mL) foi citotóxica para células leucêmicas em cultura e exerceu forte ação edematogênica (10 µg/sítio causou o extravasamento de 90 ± 20 µL de plasma, n = 4) em pele de ratos, mediada em parte por receptores serotoninérgicos e a formação do óxido nítrico. A peçonha não apresentou significativa toxicidade quando testada em coração semi-isolado de barata. Em músculo liso (íleo de cobaia) a peçonha não causou contratura, mas produziu uma pequena potencialização da ação da bradicinina, e o bloqueio parcial de contrações eletroestimuladas em músculo anocócigeo de ratos mediado por uma ação pré-sináptica da peçonha. Em preparação de nervo frênico-diafragma de camundongo, a peçonha (80 µg/mL) bloqueou as contrações por estímulos indiretos ($95 \pm 6\%$ de bloqueio em 56 ± 28 minutos, n = 3). Uma maior potência de bloqueio foi observada em preparação de biventer cervicis de pintainho, onde 25 µg/mL causou $85 \pm 4\%$ de bloqueio de contrações indiretamente estimuladas em 52 ± 6 minutos (n = 4); a peçonha também produziu contratura estável. Além disso, as respostas contráteis desta preparação à Ach e KCl foram diminuídas de forma concentração-dependente pela peçonha. O fracionamento da peçonha resultou em dois grupos de proteínas ativas e um inativo tanto no edema quanto na atividade neuromuscular. Estes dados sugerem que ao menos duas toxinas são responsáveis pelo aumento da permeabilidade vascular local. Além disso, o fracionamento da peçonha indicou a presença de, no mínimo, duas toxinas neuromusculares com ações possivelmente de antagonismo nicotínico reversível e promoção de danos à estrutura funcional muscular, respectivamente.

ABSTRACT

Vitalius dubius is a medium-sized, non-aggressive tarantula found in southeastern Brazil. In this work, we examined the histological organization of the venom apparatus of *V. dubius* and investigated some biochemical and pharmacological properties of this spider's venom. The venom apparatus consisted of two chelicerae fitted with large fangs for prey immobilization and venom injection. Each chelicera contained bundles of striated muscle involved in fang movement and also housed one venom gland that was surrounded by, but unattached to, these muscle bundles. The gland was closely associated with a helicoidally arranged muscle layer responsible for gland compression and venom extrusion through an inner fang duct that opened on the anterior face of the gland. Within the gland, an elastic basal membrane attached to muscles supported the secretory epithelium. This epithelium consisted of anastomosed cells, with peripheral nuclei and cytoplasmic elongations extending towards the gland lumen in an arrangement organized mainly by F-actin filaments. These elongations supported a complex network of vesicles and cisternae involved in venom biosynthesis. Ultrastructural analysis showed an abundance of organelles involved in protein synthesis, including smooth and rough endoplasmic reticulum, Golgi apparatus, mitochondria and lysosomes. Nuclei with evident nucleoli were seen. During venom production, the main ultrastructural changes were epithelial compactation, greater organelle abundance and alterations in nuclear shape. Venom was milked regularly by electrical stimulation. In absolute terms, females yielded more venom than males [23.1±2.3 mg (n=11) versus 12.5±0.7 mg (n=16) of venom/spider/milking], although when expressed in terms of body weight, males had slightly but significantly greater yields. Venom yield decreased with successive milkings and with spider age. SDS-PAGE showed that the venom contained few high molecular mass proteins, but a variety of small molecules (peptides). The venom was devoid of proteases but contained considerable hyaluronidase activity (estimated molecular mass: 45 kDa). ELISA showed that the venom reacted with immunoglobulins from commercial anti-arachnid antivenom raised against the venoms of *Loxosceles gaucho* (spider), *Phoneutria nigriventer* (spider) and *Tityus serrulatus* (scorpion). Immunoblotting showed that only venom components >30 kDa were responsible for this immunoreactivity. *Vitalius dubius* venom had no hemolytic activity but was cytotoxic to cultured leukemic cells (up to 300 µg/mL).

The venom caused potent, dose-dependent (0.1-100 µg/site) dorsal skin edema in rats that was mediated by serotonin and nitric oxide but not by bradykinin or histamine. The edema-forming activity was not neutralized by commercial anti-arachnid antivenom. The venom (100 µg) was weakly cardiotoxic in the cockroach isolated heart and did not contract non-vascular smooth muscle (isolated guinea pig ileum and rat anococcygeus), nor did it significantly alter the contractile responses to a variety of agonists in these preparations. However, electrically-induced muscle contractures in the anococcygeus were attenuated by co-incubation with the venom. Reversible neuromuscular blockade was seen in indirectly stimulated chick biventer cervicis preparations (10-50 µg/mL), with a less potent action in mouse phrenic nerve-diaphragm preparations (at 80 µg/mL). Attenuation of the responses to exogenous acetylcholine (110 µM) and KCl (20 mM) in avian preparations suggested that the venom affected postsynaptic nicotinic receptors and had a direct action on muscle. Marked muscle contracture was also seen with the venom. Fractionation of the venom by reverse-phase chromatography yielded three major groups of proteins, two of which produced both edema and neuromuscular blockade while the third was inactive in these assays. These findings indicate that *V. dubius* venom contains at least two toxins that cause edema and/or produce neuromuscular blockade.

INTRODUÇÃO

As aranhas compreendem a ordem Aranea, com aproximadamente 40.000 espécies, com estimativas de mais descobertas (Platnick, 2007). Esta ordem pertence ao filo Arthropoda, subfilo Chelicerata, este último com 68.000 espécies registradas (Ruppert e Barnes, 1996), menor apenas que os insetos.

A FAMÍLIA THERAPHOSIDAE

Classificação e biologia

Todas as aranhas são classificadas dentro da ordem Araneae que se subdivide em duas subordens: Mygalomorphae, que possuem as quelíceras e ferrões orientados antero-posteriormente, e Labidognatha, que possuem quelíceras e ferrões orientados latero-centralmente (figura 1A,B) (Bücherl, 1971). A figura 1C apresenta algumas famílias de aranhas, destacando os grupos que possuem gêneros de maior importância médica.

A família Theraphosidae, à qual pertence o gênero *Vitalius*, é da Subordem Mygalomorphae, por possuir quelíceras orientadas antero-posteriormente, e abrange 903 espécies de aranhas de grande porte, conhecidas como caranguejeiras no Brasil e “tarantulas” em países de língua inglesa. A distribuição é cosmopolita e os hábitos alimentares podem variar de insetos até pequenos vertebrados. No Brasil, as espécies de Theraphosidae se distribuem de acordo com a localização de seus habitats: a grande *Lasiadora*, comum na Mata Atlântica, a gigante *Theraphosa* amazônica (até 25 cm), e a *Acanthoscurria*, comum no sudeste, são exemplos de espécies brasileiras cuja peçonha já começou a ser estudada. No entanto, a grande maioria das espécies de Theraphosidae ainda não teve sua peçonha sequer coletada.

O gênero *Vitalius*, da subfamília Theraphosinae, é composto por nove espécies distribuídas principalmente pelo Sul e Sudeste do Brasil. A espécie *Vitalius dubius* (Lucas *et al.*, 1993) (figura 2A), anteriormente pertencente ao gênero *Pamphobeteus*, é composta por aranhas pouco agressivas de porte médio, comumente encontradas na região de Campinas e Sul de Minas Gerais (figura 2B) (Bertani, 2001), freqüentemente próximas a residências. Seus hábitos ainda não foram estudados detalhadamente, mas sabe-se por informações dos Centros de Controle de Zoonoses do Estado de São Paulo que a abundância é maior em épocas quentes do ano.

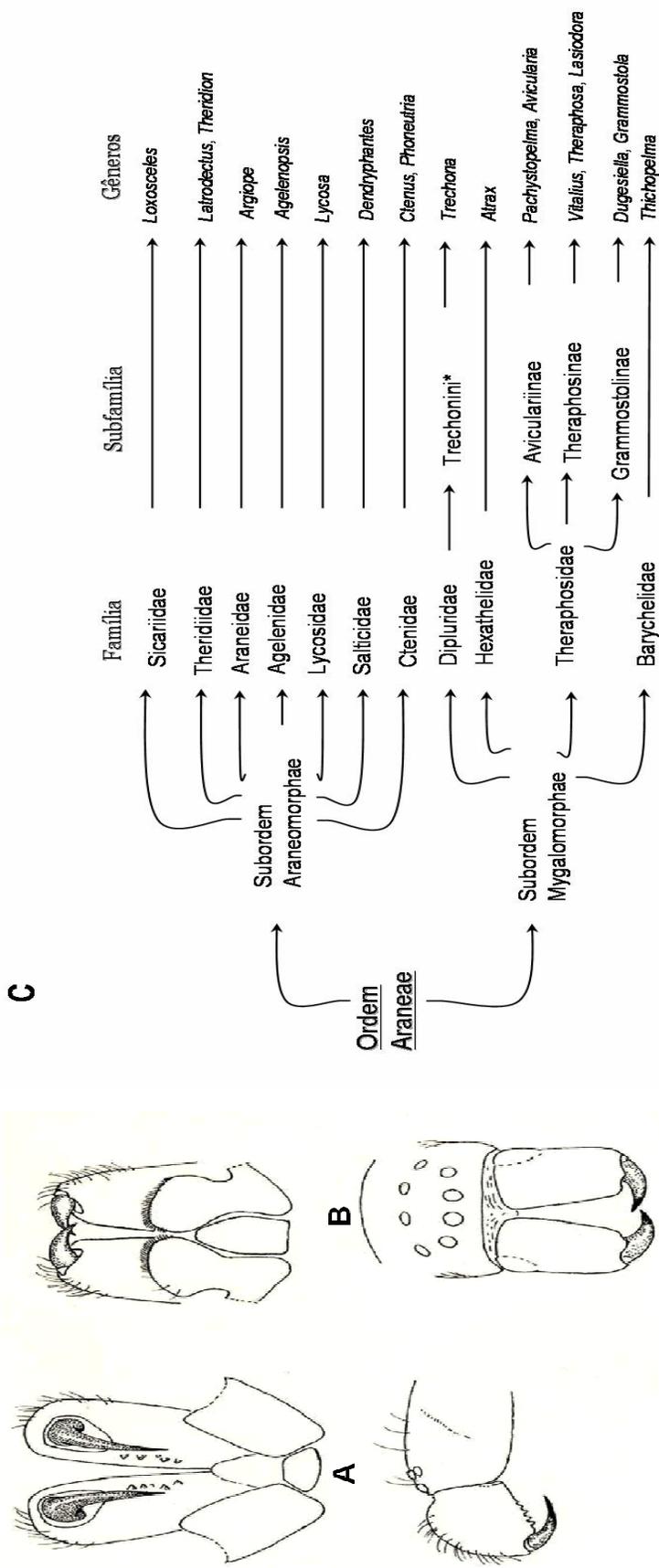


Figura 1 – Esquemas do critério de divisão de subordens em Araneae. (A) Mygalomorphae ou Orthognatha com quelíceras e ferrões orientados antero-posteriormente. (B) Araneomorphae ou Labidognatha, com quelíceras e ferrões orientados latero-centralmente. Extraído de http://personales.ciudad.com.ar/grismado_macn/GENERALIDADES.htm. (C) Exemplos das subdivisões da ordem Araneae em subordem, família, subfamília e gênero, com ênfase nos principais grupos de importância médica e destaque científico. Fonte: Bücherl (1971), atualizado por Platnik (2007).

* Trechonini é considerado uma tribo em Dipluridae.

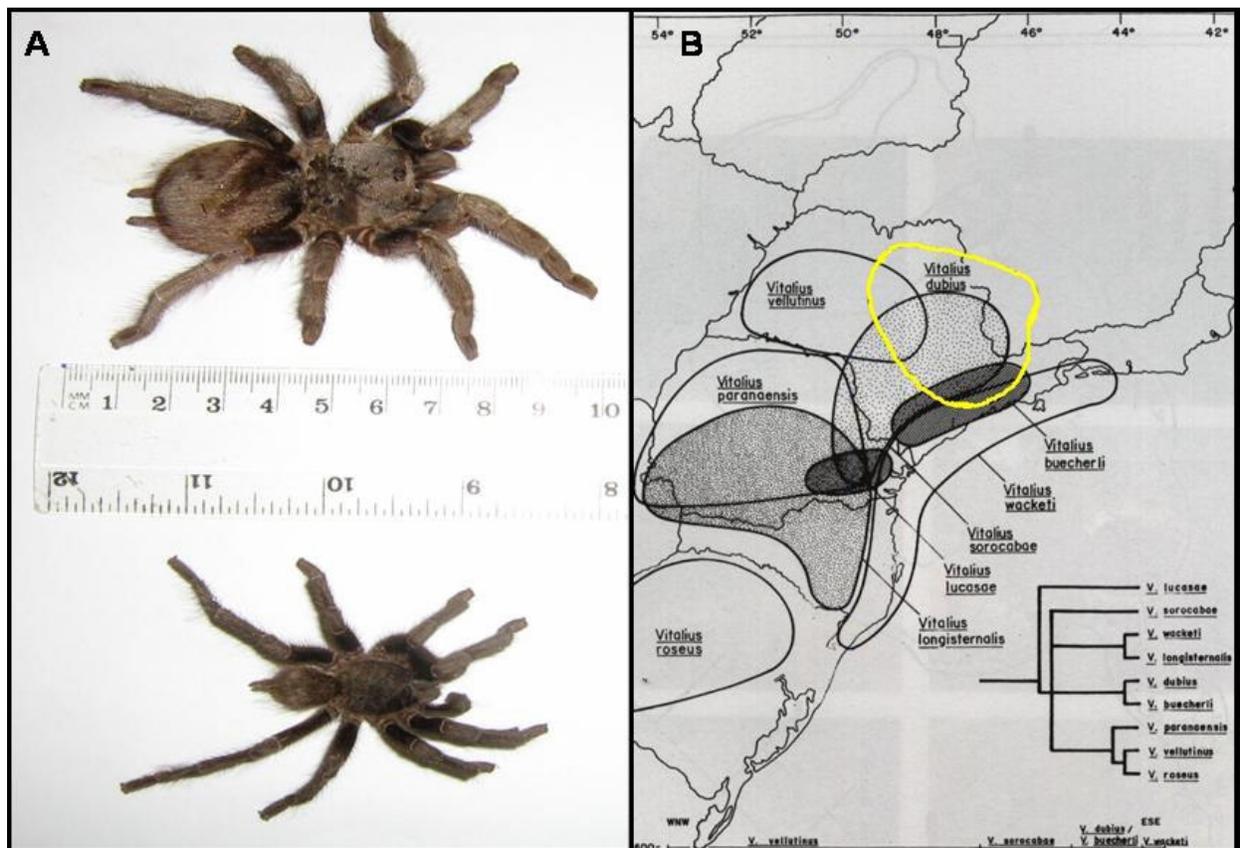


Figura 2 – (A) Exemplos de *Vitalius dubius* demonstrando tamanho aproximado de 8 a 12 cm. Fêmea acima e macho abaixo. (B) Biogeografia do gênero *Vitalius* com a distribuição de *V. dubius* destacada em contorno amarelo. Fonte: Bertani, 2001.

Toxinologia clínica

As principais manifestações clínicas decorrentes de envenenamentos por aranhas migalomorfas (incluindo Theraphosidae) são dor local com edema e eritema leve, os quais desaparecem algumas horas após o acidente; há poucos efeitos sistêmicos (Lucas *et al.*, 1994; Takaoka *et al.*, 2001; Isbister *et al.*, 2003). Entretanto, em cães, a peçonha de algumas Theraphosidae pode ser letal, indicando que existem importantes diferenças na sensibilidade à peçonha entre grupos taxonômicos (Isbister *et al.*, 2003). Além disso, o contato com os pêlos urticantes localizados na porção distal dorsal do abdômen da maioria das espécies de Theraphosidae (Bertani e Marques, 1995/1996) é capaz de levar a reações locais (urticária), com complicações caso os olhos estejam envolvidos (Esteso *et al.*, 1984; Bernardino e Rapuano, 2000; Spraul *et al.*, 2003). No Estado de São Paulo, acidentes envolvendo aranhas migalomorfas

(incluindo Theraphosidae) correspondem a menos de 1% dos acidentes em humanos causados por aranhas, o que, junto com as manifestações clínicas suaves, levam à conclusão de que estas aranhas não agressivas são de pouca relevância médica (Lucas, 1988; Lucas *et al.*, 1994).

ESTRUTURA DO APARATO VENENÍFERO

Frente às investigações detalhadas sobre as peçonhas, a estrutura e organização do aparato venenífero das aranhas têm recebido pouca atenção. Estes estudos têm importância no entendimento do processo de produção de peçonha, destacando as etapas de síntese de toxinas. Trabalhos voltados para a descrição das estruturas envolvidas na produção e inoculação de peçonha em aranhas são mais abundantemente encontrados em livros e revisões da metade do século XX. De modo geral, o aparato consiste em duas partes principais: as quelíceras, usadas para dar o bote e injetar a peçonha, e, internas a estas, as glândulas veneníferas onde são sintetizados os componentes das peçonhas. Esta organização é encontrada em Theraphosidae (Russell *et al.*, 1973) e também em outras aranhas. Assim, Santos *et al.* (2000) descreveram as glândulas veneníferas da araneomorfa *Loxosceles intermedia* utilizando microscopias óptica e eletrônica, bem como imunohistoquímica. Observaram externamente duas camadas musculares sobrepostas, multinucleadas, com abundante retículo sarcoplasmático, sobre uma membrana basal rica em fibras de colágeno. O tecido secretor aderido a esta membrana é formado por uma monocamada de células epiteliais, com abundante retículo endoplasmático, inúmeras mitocôndrias e vesículas de peçonha no citoplasma, com interdigitações na membrana plasmática. Tais características foram também observadas em *Phoneutria nigriventer* (Silva *et al.*, 2004).

Bücherl (1971), numa revisão da morfologia do aparato venenífero de diversos gêneros tanto de migalo- quanto de araneomorfos, indica que as glândulas veneníferas são revestidas externamente por musculatura estriada separada do epitélio secretor por uma membrana basal conjuntiva. Descreve diferentes orientações para a camada externa muscular, bem como para a camada conjuntiva. Em relação ao epitélio, este autor reúne descrições de duas camadas de diferentes tipos celulares nas migalomorfos (subcubóides basais e colunares voltadas ao lúmen) e três em araneomorfos (as duas como em migalomorfos e um terceiro tipo prismático na porção anterior da glândula).

Em Theraphosidae, Russell *et al.* (1973) observaram em *Aphonopelma* sp. e *Dugesiella echina*, através de microscopia eletrônica de transmissão, organização parecida com a descrita acima, citando semelhanças com as glândulas de *Latrodectus hesperus*. Relataram a presença de axônios em contato com o epitélio secretor e desmosomos nas superfícies laterais das células epiteliais além da presença de “microvilosidades irregulares ao redor do lúmen” (Jälfors *et al.*, 1969).

No entanto, há poucas publicações voltadas à descrição de alterações nos tecidos glandulares de aranhas durante a produção de peçonha (Kovoor e Zylberg, 1971). Em serpentes, esta descrição consta em trabalhos realizados com diversas espécies, apresentando diferenças significativas, principalmente no tamanho das células do epitélio secretor (para revisões, ver Bdolah, 1979 e Kochva, 1978, 1987).

EXTRAÇÃO DE PEÇONHAS

Ao contrário do consenso encontrado para a descrição morfológica, a extração de peçonha sempre foi alvo de discussões na literatura toxinológica, principalmente considerando as aranhas. Em um levantamento dos trabalhos envolvendo a retirada de peçonha de aranhas, concluímos que não há uma metodologia completamente padronizada, e os estudos publicados divergem consideravelmente quanto aos procedimentos usados e o material final obtido. Tais variações acabam refletindo no rendimento de peçonha. A homogenização de glândulas isoladas tem sido utilizada como um método confiável para evitar contaminação com sucos gástricos (Korsniak e Story, 1993). Entretanto, esta abordagem tem a desvantagem de resultar na contaminação da peçonha por outras proteínas glandulares não relacionadas à peçonha. A de coleta baseada em indução ao bote também foi descrita. Brazil e Vellard (1926) descreveram um instrumento capaz de induzir o ataque de *Phoneutria nigriventer*, bem como armazenar a peçonha e permitir sua coleta posteriormente. A coleta de peçonha espontaneamente depositada na superfície lateral de um tubo posicionado sob os ferrões, ligado a um sistema de aspiração, foi descrita por Celerier *et al.* (1993). No entanto, o uso do eletroestímulo é a técnica mais utilizada para obtenção da peçonha em aranhas (Friedel e Nentwig, 1989). Consiste em anestésiar as aranhas em câmara de CO₂, imobilizar o animal, aplicar uma corrente elétrica através de eletrodos posicionados nas laterais do cefalotórax e coletar o líquido expelido. Esta metodologia é utilizada inclusive por

fornecedores de peçonhas que as comercializam inclusive através da Internet.

Em caranguejeiras, a dificuldade para utilização do eletroestímulo é maior, pois a carapaça de quitina é mais grossa, e portanto exerce um efeito isolante maior. Schanbacher *et al.* (1973) adaptaram eficientemente o eletroestímulo do trabalho de Grothaus e Howell (1967) para a coleta de peçonha de migalomorfas, utilizando uma solução de eletrólitos e SDS para umedecer a quelícera, e tubos de polietileno para a coleta. Este método evita a contaminação por fluidos gástricos, um ponto de persistentes discussões na literatura (para revisão, ver Rash e Hodgson, 2002), uma vez que em alguns casos atividades enzimáticas, especialmente proteolíticas, outrora atribuídas à peçonha, demonstraram-se pertencentes a componentes do aparelho digestivo.

COMPOSIÇÃO DAS PEÇONHAS

A peçonha de aranhas tem sido alvo de muitos estudos de diferentes abordagens. Recentemente, a revista *Toxicon*, publicação oficial da Sociedade Internacional de Toxinologia, publicou um número inteiramente dedicado às peçonhas destes quelicerados (*Toxicon* 43(5), 2004) com o objetivo de discutir “a complexidade de peçonhas, uma avaliação realista do perigo que impõem aos humanos e a análise do potencial para a descoberta de drogas e inseticidas” (King, 2004).

Em relação à composição da peçonha, grande parte das publicações recentes sobre atividades biológicas encontradas em Theraphosidae aborda as interações de toxinas com canais iônicos (para revisão ver Escoubas e Rash, 2004). Porém, alguns trabalhos descreveram atividades enzimáticas em caranguejeiras (Schanbacher *et al.*, 1973b; Savel-Niemann, 1989) e proteases em peçonha de aranhas de outros grupos, como *Loxosceles* (Silveira *et al.*, 2002; Oliveira *et al.*, 2005) e *Nephila clavata* (Joo *et al.*, 2002). Destas, se destacam atividades hialuronidásica, gelatinases e serina-proteases, entre outras. Suas funções estão relacionadas à promoção da injúria local, como necrose e aumento da permeabilidade vascular.

De modo geral, as peçonhas de aranhas contêm vários componentes, sendo os principais: (1) substâncias de baixa massa molecular (<1.000 kDa), (2) peptídeos (>1.000 até aprox. 10-15.000 kDa), e (3) proteínas, principalmente enzimas (>10-15.000 kDa). A composição destas peçonhas e o modo de ação de várias de suas toxinas têm sido amplamente discutidos na literatura (Escoubas e Rash, 2004; Escoubas, 2006; Swanson e Vetter, 2006).

Componentes de baixa massa molecular

Componentes orgânicos e inorgânicos de baixa massa molecular são comumente encontrados em peçonhas de aranhas. Estes incluem aminas (catecolaminas, histamina, serotonina, e outras) (Lange *et al.*, 1992), aminoácidos livres, nucleosídeos e nucleotídeos (Savel-Niemann, 1989), glicose, ácidos (fosfórico, láctico, cítrico), uréia, e íons sódio, potássio, cálcio, magnésio, cloreto e fósforo (Fenton *et al.*, 1995; Escoubas *et al.*, 2000b; Rash e Hodgson, 2002), alguns dos quais podem contribuir para a estabilidade dos componentes da peçonha.

A serotonina (5-hidroxitriptamina ou 5-HT) encontrada na peçonha de várias espécies de Theraphosidae foi implicada no aumento da permeabilidade celular e do fluxo sanguíneo no local da picada (Welsh e Batty, 1963). A 5-HT também pode ter uma possível função defensiva, devido à sua capacidade de causar dor. Agonistas adrenérgicos que causam vasoconstrição foram encontrados em *Atrax robustus* (Morgans e Carroll, 1976), *Delena cancerides* e *Isopeda montana* (Korszniak e Story, 1993), todas estas aranhas australianas.

Além destes compostos, também são encontradas em peçonhas de aranhas, inclusive Theraphosidae, (acil)poliaminas e derivados (Cabbiness *et al.*, 1980; Skinner *et al.*, 1990; Escoubas *et al.*, 1999), as quais atuam principalmente como antagonistas dos receptores ionotrópicos de glutamato, NMDA e AMPA, bem como em alguns canais de Ca^{2+} , bloqueando a neurotransmissão mediada por estes receptores (Usherwood e Blagbrough, 1991, 1992; McCormick e Meinwald, 1993; Donevan *et al.*, 1996; Williams, 1997; Escoubas *et al.*, 2000b).

Peptídeos

O número de peptídeos presentes em peçonhas de aranhas é considerável, podendo chegar a 60 ou mais, conforme demonstrado por espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF de peçonhas (Escoubas, 2006). No caso das peçonhas de Theraphosidae, os principais constituintes são poliaminas e peptídeos, com uma preponderância destes últimos, conforme descritos adiante.

Proteínas (enzimas)

As peçonhas de aranhas contêm uma variedade de enzimas, principalmente fosfatases, hialuronidase, peptidases e proteases (colagenase, elastase, esterase) (Rash e Hodgson, 2002). As peçonhas de Theraphosidae também contêm proteínas (Herrero e Odell, 1988) com atividades

enzimáticas, tais como a hialuronidase (Schanbacher *et al.*, 1973a,b). Entretanto, com a possível exceção da hialuronidase, que contribui para a difusão das toxinas do sítio de inoculação, as funções biológicas da maioria das proteínas e enzimas de alto peso molecular presentes em peçonhas de Theraphosidae são desconhecidas.

ATIVIDADES BIOLÓGICAS DAS PEÇONHAS

A grande variedade taxonômica das aranhas reflete na variedade de ações biológicas e moléculas encontradas em suas peçonhas. Por isso, a peçonha de aranhas desperta atualmente interesse de pesquisadores na área da toxinologia. Por exemplo, pesquisadores australianos desenvolveram estudos com atracotoxinas, originadas das aranhas *Atrax* sp. (Isbister *et al.*, 2005), consideradas letais, alguns grupos chineses investigaram toxinas da peçonha da caranguejeira *Selenocosmia huwena* (Liang, 2004), coreanos descreveram compostos da peçonha de aranhas que confeccionam teias orbitais (Joo *et al.*, 2002), e europeus destacam-se no estudo de bloqueadores de canais iônicos e latrotoxinas (Escoubas *et al.*, 2002a,b; Escoubas e Rash, 2004; Mazzuca *et al.*, 2007). Entre pesquisadores brasileiros, destacam-se os estudos da aranha marrom *Loxosceles* (Oliveira *et al.*, 2005), juntamente com norte-americanos (Vetter *et al.*, 2003), e da aranha armadeira *Phoneutria nigriventer* (Herzig *et al.*, 2004; Teixeira *et al.*, 2004; Le Sueur *et al.*, 2005; Costa *et al.*, 2006).

Os efeitos observados em acidentes com aranhas geralmente orientam os pesquisadores na busca por antídotos ou compostos de interesse farmacológico. Por exemplo, a observação de necrose local em acidentes com *Loxosceles* sp. levou à identificação dos componentes tóxicos e à sua neutralização por anticorpos monoclonais (Guilherme *et al.*, 2001). De modo semelhante, o estudo das alterações hemodinâmicas causadas pela peçonha de *P. nigriventer* (Costa *et al.*, 1996; Estato *et al.*, 2000), levou a descrição de uma ação de contração por influxo de cálcio em tecido muscular liso (Teixeira *et al.*, 2004).

Em Theraphosidae, Lucas *et al.* (1994) apresentou um levantamento de 91 casos de acidentes com caranguejeiras no Estado de São Paulo. Dentre estes, nenhum apresentou conseqüências graves, mas foram descritos efeitos locais como dor, edema e inflamação, além de infecção. No entanto, as identificações de quais espécies foram responsáveis pelos acidentes não foi possível na maioria dos casos. Além destes, Takaoka *et al.* (2001) descreveram inflamação e

dor severa em dois casos de acidentes com *Haplopelma lividum*.

Ação local

Os efeitos locais produzidos por peçonhas de aranhas incluem dor, edema, inflamação, e necrose tecidual, efeitos estes que envolvem uma ação direta de compostos de baixo peso molecular presentes na peçonha (aminas, peptídeos, etc), bem como a produção ou liberação de mediadores endógenos e uma ação sobre componentes da matriz extracelular (Veiga *et al.*, 2001).

Reações locais, como o edema e a dor, têm sido mais investigadas em aranhas não-Theraphosidae, especialmente a aranha-de-bananeira *Phoneutria nigriventer* (Antunes *et al.*, 1992; Bento *et al.*, 1995; Zanchet e Cury, 2003) e a *Loxosceles deserta* (Desai *et al.*, 2000). Foi descrito para a peçonha de *P. nigriventer* (Labidognatha, Ctenidae), que o efeito edematogênico foi devido ao estímulo de receptores NK₁, vanilóides e purínicos (Costa *et al.*, 1997, 2000). Atkinson (1986) relatou que o edema causado por algumas peçonhas de aranhas Mygalomorphae australianas era devido à degranulação de mastócitos presentes na microcirculação. Em relação às Theraphosidae, os componentes e mecanismos envolvidos na dor e edema relatados após envenenamento por estas aranhas permanecem desconhecidos.

Em Theraphosidae, lesões musculares já foram relatadas para espécies tais como *Aphonopelma* sp., *Aphonopelma seemanni*, *Dugesiella hentzi*, e *Sphaerobothria hoffmani* (Ownby e Odell, 1983; Herrero, 1984; Herrero e Gutiérrez, 1984) Esta mionecrose aparentemente envolve a ruptura da membrana plasmática, seguida por uma incapacidade das mitocôndrias e do retículo endoplasmático em manter níveis normais de cálcio (Ownby e Odell, 1983). Lee *et al.* (1974) encontraram na caranguejeira *Dugesiella hentzi* uma toxina capaz de causar lesões no miocárdio, sendo esta atividade aumentada com a administração de ATP (apesar de já presente em grandes quantidades na própria peçonha) (Chan *et al.*, 1975).

Pouco se sabe dos mecanismos envolvidos na necrose causada por peçonhas de Theraphosidae, embora supõe-se que seja devido em parte à uma ação proteolítica. Entretanto, há discussão na literatura se esta atividade proteolítica é devido a proteases da peçonha propriamente dita ou devido à contaminação por enzimas digestivas durante a extração da peçonha (Perret, 1977; Escoubas *et al.*, 2000b; Rash e Hodgson, 2002). Considerando a variedade de toxinas atuantes sobre canais iônicos presentes nestas peçonhas (ver abaixo), é possível também que

parte da necrose seja devida a uma desregulação destes canais, levando a um desequilíbrio da composição iônica intracelular e subsequente lesão celular.

Atividade enzimática

Conforme mencionado acima, as peçonhas de aranhas possuem diversas atividades enzimáticas. A atividade hialuronidásica de peçonhas de caranguejeiras é alvo de estudos há mais de 30 anos (Schanbacher *et al.*, 1973a,b). Recentemente, atividades de enzimas serina-proteases e esfingomielinases foram descritas em peçonha de *Loxosceles* sp. (Veiga *et al.*, 2000a; Ramos-Cerrillo *et al.*, 2004). Young e Pincus (2001) descreveram comparativamente a ação hialuronidásica e proteolítica da peçonha de três espécies australianas responsáveis por provocar necrose após acidentes, e Rash e Hodgson (2002) citaram em sua revisão três espécies de aranhas com atividade colagenolítica em suas peçonhas.

Esfingomielinases presentes em peçonha de *Loxosceles intermedia* também foram isoladas e identificadas como promotoras de hemólise (Tambourgi *et al.*, 1998). Esta ação é destacada em diversas espécies deste gênero (Barreto *et al.*, 2003; Oliveira *et al.*, 2005), sendo pouco presentes em demais táxons (Sosa *et al.*, 1979).

Ação citotóxica

Comparado a outros aspectos da toxicologia das peçonhas de aranhas, pouco se tem investigado dos efeitos citotóxicos. Em estudo abrangente, Cohen e Quistad (1998) avaliaram a sensibilidade de células cultivadas de insetos (Sf9) às peçonhas de aranhas das famílias Araneidae, Lycosidae e Oxyopidae. As peçonhas de alguns gêneros, incluindo *Aphonopelma* (Theraphosidae), foram mais tóxicas para a linhagem de neuroblastoma de camundongo N1E-115 do que para células de insetos. Gao *et al.* (2005) descreveram atividade antitumoral em células He-La, da peçonha da migalomorfa *Macrothele raveni*. Este trabalho avaliou o potencial *in vitro*, constatando aumento na proporção de apoptose em relação a necrose. Também foi apresentado o resultado *in vivo*, em que o tamanho do tumor diminuiu significativamente em animais tratados por três semanas com a peçonha. De acordo com os autores, “a peçonha de aranha é um novo material para pesquisa antitumoral *in vivo* e *in vitro*.” Sob outra perspectiva, Choi *et al.* (2004) demonstraram que as psalmopeotoxinas 1 e 2, da caranguejeira *Psalmopoeus cambridgei*,

inibiam o desenvolvimento intra-eritrócito de *Plasmodium falciparum* (causador da malária), sem afetar o crescimento ou viabilidade de células epiteliais humanas.

Ações neuromuscular e cardiovascular

Como é de se esperar, a presença de numerosas toxinas que atuam sobre canais iônicos é refletida em neurotoxicidade e bloqueio da neurotransmissão *in vivo* e *in vitro* em invertebrados (principalmente insetos e crustáceos) e vertebrados (Escoubas *et al.*, 2000b; Escoubas e Rash, 2004). Em vertebrados, os principais efeitos de peçonhas de aranhas são sobre a neurotransmissão periférica e central (Fontana *et al.*, 2002; Gomez *et al.*, 2002; Costa *et al.*, 2003; Kuhn-Nentwig *et al.*, 2004; Cesar *et al.*, 2005), a função cardíaca (Bode *et al.*, 2001; Kalapothakis *et al.*, 2003; Liao *et al.*, 2007b), e a reatividade do músculo liso vascular (Antunes *et al.*, 1993; Ferreira *et al.*, 1996, 1998; Tertishnikova *et al.*, 2003; Teixeira *et al.*, 2003, 2004a,b, 2005).

Contudo, a principal abordagem dos estudos em peçonhas de aranhas Theraphosidae refere-se às interações de toxinas com canais iônicos e receptores. Preparações farmacológicas de tecidos, principalmente músculo liso, tecidos nervosos e junções neuromusculares, são ferramentas fundamentais para a identificação destas toxinas (Diefenbach *et al.*, 1969; Keith *et al.*, 1995; McDonough, 1997; Zhou *et al.*, 1997). Phillips *et al.* (2005) descreveram a interação de uma toxina da caranguejeira (*Selenocosmia huwena*) com canais de cálcio dependentes de voltagem. Também já foi descrita a interação da toxina GsMtx-4, um peptídeo da também caranguejeira *Grammostola spatulata*, com canais de cálcio, relevando sua importância na inibição da fibrilação atrial (Bode *et al.*, 2001; Suchyna *et al.*, 2004). Kalapothakis *et al.* (2003) descreveram bradicardia em preparação de coração de rato isolado, provocado pela peçonha de *Lasiadora* sp.

Fontana *et al.* (2001) descreveram bloqueio de neurotransmissão em preparação de nervo frênico-diafragma de camundongo, provocado pela peçonha de *Theraphosa blondii*. Este trabalho foi aprofundado por Ebbinghaus *et al.* (2004), que encontraram nesta mesma peçonha inibidores de canais de potássio em preparações “patch clamp” de células neuronais. Mais recentemente, Bosmans *et al.* (2006) descreveram bloqueio de canais de sódio dependentes de voltagem provocados pela peçonha de *Ceratogyrus cornuatus* e *Phrixotrichus auratus* (também

Theraphosidae). No entanto, nenhuma destas aranhas é considerada como perigosa, ou apresenta relevância clínica devido a acidentes ocorridos.

Toxinas que atuam em canais iônicos

De modo geral, as toxinas de peçonhas de aranha que atuam em canais iônicos de tecidos excitáveis (neuronal e muscular) são peptídicas. Os principais destes canais são os de Ca^{2+} , Na^+ , K^+ , os sensíveis ao ácido (ASIC ou “acid-sensing ion channels”), e os ativados por estiramento.

Canais de Ca^{2+}

Os principais canais de Ca^{2+} em tecido excitável são os dependentes de voltagem (canais de cálcio dependentes voltagem, CCVD), que consistem dos tipos L (diidropiridina sensíveis), N (neuronal), P (de fibras Purkinje), R (remanescente)/Q e T (transitórios) (Catterall *et al.*, 2005b). Das peçonhas de Theraphosidae já foram caracterizados bloqueadores como a ω -grammotoxina SIA (ω -GsTX SIA, 36 aminoácidos, 4,1 kDa, três pontes sulfídicas) da *Grammostola spatulata* (= *Phrixotrichus spatulatus*) (Lampe *et al.*, 1993; Takeuchi *et al.*, 2002), e a SNX482 da *Hysteroocrates gigas* (Newcomb *et al.*, 1998), sendo que esta última é a única toxina identificada até hoje que atua seletivamente sobre canais do tipo R, embora não seja específica pois também bloqueia parcialmente os canais do tipo L (Bourinet *et al.*, 2001). A ω -GsTX SIA atua preferencialmente em canais dos tipos N, P e Q de forma reversível (Lampe *et al.*, 1993; Piser *et al.*, 1994, 1995), já a SNX482 interage com os domínios III e IV dos canais R de forma a inibir a ativação destes (Bourinet *et al.*, 2001). Experimentos com a peçonha bruta de *Grammostola spatulata* sugerem que em miócitos ventriculares isolados de cobaia, a ação principal é através do bloqueio de canais de Ca^{2+} do tipo L (Pascarel *et al.*, 1997). O bloqueio de CCVD resulta de uma interação da toxina com o mecanismo de portão do canal, o que leva à inibição da liberação pré-sináptica de neurotransmissor devido ao bloqueio da entrada de Ca^{2+} (necessária para excitação) e, portanto, à paralisia flácida.

Além de toxinas que atuam em canais dependentes de voltagem, a toxina GsMTx-4, também de *Grammostola spatulata*, interage com canais de cálcio ativados por estiramento, facilitando a contratilidade cardíaca e mantendo sua frequência persistente por vários minutos mesmo após a morte do animal (Bowman *et al.*, 2007).

Canais de K⁺

Os canais de K⁺ constituem três grupos principais: 1) os dependentes de voltagem (Kv) e os ativados por Ca²⁺ (KCa) (Gutman *et al.*, 2005; Wei *et al.*, 2005), 2) os retificadores de correntes para dentro da célula (Kir) (Kubo *et al.*, 2005), e 3) com dois domínios P (responsáveis pela formação do poro) e insensíveis a Ca²⁺ (Goldstein *et al.*, 2005). Dentre todos, os mais diversificados são os Kv, com vários tipos principais (Kv1, Kv2, etc), cada um com diversos subtipos, por exemplo Kv1.1-Kv1.5. As primeiras toxinas de peçonhas de aranha descobertas que atuam sobre canais de K⁺ (Kv2.1) foram as hanatoxinas 1 e 2 (HaTx1 e HaTx2) da *Grammostola spatulata* (Theraphosidae) (Swartz e MacKinnon, 1995, 1997a,b, Huang *et al.*, 2007). Estas toxinas contêm 35 aminoácidos com três pontes sulfídicas e sua seqüência primária possui pouca homologia com outros bloqueadores destes canais. Atuam de modo voltagem-dependente para modificar o mecanismo de portão dos canais ligando-se a quatro exosítios perto do sensor de voltagem dos canais. Apesar de seletivas para os canais Kv2.1, as hanatoxinas também atuam sobre CCVD, enquanto que o ω -GsTX SIA, bloqueador de CCVD também atua sobre canais Kv; estes dois grupos de toxinas ocorrem na mesma peçonha de *G. spatulata* (Milescu *et al.*, 2007). A dupla ação destas toxinas reflete a homologia seqüencial entre elas, o que permite que elas reconheçam o mesmo epítipo (domínio sensor de voltagem) nos canais voltagem-dependentes.

Uma toxina semelhante às hanatoxinas, a SGTx1, de 34 aminoácidos e três pontes sulfídicas, tem sido isolada da peçonha de uma Theraphosidae africana, *Scodra griseipes* (Lee *et al.*, 2004). Já as phrixotoxinas (PaTx1 e PaTx2), isoladas da *Phrixotrichus auratus*, atuam nos canais Kv4.2 e Kv4.3, bloqueando-os por um mecanismo semelhante ao das hanatoxinas nos canais Kv2.1 (Chagot *et al.*, 2004). Neste caso, as toxinas mostram uma preferência para canais fechados. Recentemente, Escoubas *et al.* (2002b) identificaram algumas toxinas novas em peçonhas de caranguejeiras africanas: a ScTx1 de *Stromatopelma calceata* e as HmTx1 e HmTx2 de *Heteroscodra maculata*. Estas toxinas de 34-38 aminoácidos possuem três pontes sulfídicas. A ScTx1 é o primeiro antagonista de alta afinidade para os canais Kv2.2, mas não é específico para estes uma vez que também inibe (com maior afinidade) os canais Kv2.1 e também heteromultímeros de Kv2.1/Kv9.3, bem como canais Kv4.2. Já a HmTx1 bloqueia canais Kv2 e Kv4 (4.1) com a mesma potência enquanto que a HmTx2 bloqueia especificamente Kv2. A

HmTx2 mostra homologia seqüencial com a ω -GsTX SIA. A HmTx1 é o primeiro antagonista peptídico ativo sobre os Kv4.1. Em sua revisão, Swartz (2007) descreve que estas toxinas consistem em estruturas moleculares bastante similares.

Canais de Na⁺

Os canais de Na⁺ dividem-se em dois grupos principais, os sensíveis à tetrodotoxina (TTX), encontrados principalmente em cérebro e músculo esquelético, e os TTX-insensíveis, encontrados em tecido cardíaco e neurônios sensoriais de gânglios periféricos (Catterall *et al.*, 2005a). De modo geral, os canais de Na⁺ dependentes de voltagem têm papel fundamental na fase de despolarização do potencial de ação, e contribuem em grande parte para a propagação do potencial de ação. Assim como as peçonhas de araneomorfos, como a *Phoneutria nigriventer*, que contêm vários bloqueadores destes canais (Corzo *et al.*, 2007; Nicholson, 2007), diversas toxinas de peçonhas de Theraphosidae que interagem com estes canais também já foram isoladas (Bosmans *et al.*, 2006). Priest *et al.* (2007) revisaram os estudos de dois peptídeos, ProTx-1 e ProTx-II, da peçonha de *Thrixopelma pruriens*, que inibem reversivelmente os canais de Na⁺ TTX-resistentes (do tipo NaV1.5). Estas toxinas contêm três pontes sulfídicas e, embora seletivas para estes canais, também inibem outros canais de Na⁺ voltagem-dependentes, bem como CCVD do tipo 3.1 e, em grau menor, canais de K⁺ Kv2.1 (10 vezes menos sensíveis que os canais de Na⁺). Xiao *et al.* (2007) descreveram a jingzhaotoxin-1, um facilitador de liberação de neurotransmissores por retardar o fechamento de canais de sódio. Clement *et al.* (2007) descreveram a toxina GrTx1, de *Grammostola rosea*, capaz de bloquear 85% (em 10 μ M) das correntes de sódio em células de neuroblastoma, através da modulação do mecanismo de portão do canal.

Vários fenômenos fisiológicos, tais como degustação, percepção de alterações de pH no cérebro e nocicepção estimulada por acidez, são mediados por canais de sódio sensíveis a H⁺ (ASIC) (Waldmann e Lazdunski, 1998). Escoubas *et al.* (2000a) caracterizaram uma toxina, a PcTX1 (40 aminoácidos, três pontes sulfídicas) da peçonha da caranguejeira *Psalmopoeus cambridgei*, que é potente bloqueadora seletiva dos canais da classe ASIC1a, expressos no sistema nervoso central e em alguns neurônios sensoriais e que transportam principalmente o Na⁺. Chen *et al.* (2006) descreveram que a psalmotoxina-1 desensibiliza canais ASICa por aumentar sua afinidade por H⁺, mas pode também atuar como agonista de canais ASICb em

condições levemente ácidas, revelando uma duplointeração da toxina entre um canal ácido-sensível, e seu variante transcricional.

Canais iônicos ativados por estiramento (CIAE)

Os CIAE têm uma distribuição ubíqua em tecidos de mamíferos, onde geralmente são não-seletivos para íons catiônicos (Ca^{2+} , K^+ , e Na^+). Estes canais são modulados por alterações no fluxo sanguíneo e por mudanças fisiológicas que levam ao estiramento do tecido (enchimento dos átrios ou ventrículos do coração, por exemplo), e estão envolvidos em processos desde a detecção de alterações osmóticas até a expressão gênica. Pelo menos duas toxinas que bloqueiam estes canais, a GsMTx-2 e a GsMTx-4 (35 aminoácidos, ~4 kDa) da peçonha de *G. spatulata* (a mesma espécie da ω -GsTX SIA e das hanatoxinas), já foram caracterizadas (Suchyna *et al.*, 2000; Oswald *et al.*, 2002). O bloqueio dos CIAE por estas toxinas em células inchadas e hipertróficas normaliza o tamanho celular bem como inibe as correntes e as arritmias induzidas por estiramento (Suchyna *et al.*, 2000; Bode *et al.*, 2001; Hurwitz *et al.*, 2002; Tertyshnikova *et al.*, 2003).

Outros peptídeos

Neurotóxicos

Além das toxinas mencionadas acima, há outras neurotoxinas identificadas em peçonhas de caranguejeiras, porém cujos mecanismos ou sítios de ação ainda não foram determinados. Estas incluem vários peptídeos isolados da peçonha de *Pterinochilus* sp., da África oriental (Bachmann, 1982), peptídeos de 38/39 aminoácidos e três pontes sulfídicas das peçonhas de *Eurypelma californicum* (as ESTX; Savel-Neimann, 1989) e de *Brachypelma smithii* (Kaiser *et al.*, 1994), e duas toxinas (lasiotoxinas 1 e 2) da caranguejeira brasileira *Lasiadora parahybana*, as quais mostram até 74% de homologia com as toxinas de *E. californicum* e *B. smithii* (Escoubas *et al.*, 1997). Em relação à interação com receptores, recentemente Siemens *et al.* (2006) descreveram ativadores de receptores de capsaicina na peçonha de *Psalmopoeus cambridgei* e *Grammostola roseus*, ambas caranguejeiras.

Não-neurotóxicos

Entre os peptídeos não-neurotóxicos caracterizados de peçonhas de caranguejeiras está um peptídeo de 6,7 kDa da peçonha de *Dugesiella henzi*, que produz necrose em músculo cardíaco (Lee *et al.*, 1974). Mais recentemente, foi identificado um grupo de toxinas, as covalitoxinas (CvTx-I, -II e -III) de *Corecnemius validus*, das quais a CvTx-I causa mionecrose em músculo esquelético de camundongos enquanto que a CvTx-II produz excitação em grilos mas não em baratas ou camundongos (Balaji *et al.*, 1999, 2000). Em peçonhas de espécies não-caranguejeiras também há uma variedade de peptídeos com diversas ações, tais como os PNV1 a PNV4 de *P. nigriventer* (Antunes *et al.*, 1993; Rego *et al.*, 1996) que têm ação direta na vasculatura, e os peptídeos tipo cininas de *Scaptocosa raptoria* (Ferreira *et al.*, 1996, 1998), ambas aranhas brasileiras.

VARIAÇÃO NA COMPOSIÇÃO E AÇÃO DAS PEÇONHAS

Numerosos estudos têm demonstrado a existência de variações quantitativas e qualitativas em peçonhas de aranhas, principalmente devido a influências ontogenéticas, sexuais, sazonais, e também do modo e frequência de obtenção da peçonha (Rash e Hodgson, 2002). Recentemente foram documentadas variações ontogenéticas (Herzig *et al.*, 2004) e intersexuais (Oliveira *et al.*, 2005) em *P. nigriventer* e *Loxosceles* sp., respectivamente. Em Theraphosidae, as fêmeas de *Scodra griseipes* produzem mais peçonha e com maior toxicidade a ratos, diferença esta creditada à presença de três bandas eletroforéticas a mais do que peçonhas de machos (Célérier *et al.*, 1993). Mais recentemente, tem sido usada a técnica de espectrometria de massa em conjunto com HPLC para caracterizar os principais componentes em algumas peçonhas de caranguejeiras (espécies de *Brachypelma*, *Poecilotheria* e *Pterinochilus*), bem como para distinguir entre espécies morfologicamente semelhantes, e estudar variações ontogenéticas e sexuais (Escoubas *et al.*, 1997, 1999, 2002). Estes últimos estudos demonstraram o potencial desta abordagem na área de taxonomia.

NEUTRALIZAÇÃO POR ANTISORO

A neutralização da peçonha por anticorpos e soros antiaracnídeos está descrita e estabelecida para espécies de relevância clínica. No entanto ocorre reatividade cruzada entre diferentes espécies. Este fenômeno foi descrito nos gêneros *Loxosceles* e *Latrodectus* (Nishikawa

et al., 1994; Graudins *et al.*, 2001; de Roodt *et al.*, 2007), enquanto Graudins *et al.* (2002) demonstraram que o soro antiaracnídico australiano neutraliza os efeitos tóxicos da peçonha de diferentes gêneros pertencentes à mesma família (*Atrax* e *Hadronyche*). Silvestre *et al.* (2005) relataram a reatividade cruzada de anticorpos produzidos contra a peçonha de *L. intermedia* com as peçonhas de *L. similis* e *P. nigriventer*. Toro *et al.* (2007) demonstraram que imunoglobulinas purificadas do soro antiaracnídico do Butantan, produzido contra as peçonhas de *Phoneutria nigriventer*, *Loxosceles gaucho* e *Tityus serrulatus* foram capazes de neutralizar a atividade edematogênica causada por estas mesmas peçonhas.

PURIFICAÇÃO DE TOXINAS

A purificação e seqüenciamento de toxinas de peçonhas de aranhas ocupam grande volume de publicações recentes. A cromatografia de fase reversa (Tambourgi *et al.*, 1998), construção de bibliotecas de cDNA, com posterior clonagem de toxinas (Diniz *et al.*, 1993) e espectrometria de massa (Pimenta *et al.*, 2005) são três das principais técnicas utilizadas hoje na purificação e caracterização de toxinas. Através destes processos, a investigação de mecanismos de ação e a busca de agentes neutralizadores se tornam mais específicas e, conseqüentemente, com maior chance de êxito. Além disso, estas ferramentas têm sido propostas na identificação de variações intra- e inter-específicas em Theraphosidae (Escoubas *et al.*, 2002a,b).

OBJETIVOS

Os objetivos principais deste trabalho foram:

- 1 Instalar e desenvolver um biotério de aranhas caranguejeiras no Departamento de Farmacologia da FCM – UNICAMP;
- 2 Estudar a histologia do aparato venenífero da caranguejeira *Vitalius dubius*;
- 3 Extrair e caracterizar a peçonha através de ensaios bioquímicos e farmacológicos;
- 4 Purificar parcialmente as toxinas com ações farmacológicas.

MATERIAL E MÉTODOS

REAGENTES

Ácido fosfomolibdico, ácido periódico fuccina básica, parafina, resina Entellan e resorcina foram obtidos da Merck S/A (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Acetato de sódio, acetato de amônio, acetonitrila, ácido trifluoroacético, bicarbonato de sódio, cloreto de cálcio, cloreto de potássio, cloreto de sódio, fosfatos de sódio monobásico e dibásico, glicose, todos de grau HPLC de pureza, foram utilizados da Mallinckrodt-Baker (Phillipsburg, NJ, EUA). Acetato de uranila, acetilcolina, ácido fosfotúngstico, ácido hialurônico, acrilamida, albumina bovina sérica, anticorpo anti-IgG de cavalo, Azocoll, azul de anilina, bradicinina, caseína, ciproheptadina, colágeno bovino, [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide] (MTT), dodecil sulfato de sódio (SDS), elastina-vermelho Congo, eosina, escarlata biebrich, fenilefrina, fuccina ácida, hematoxilina, histamina, HOE-140 (icatibant), mepiramina, N,N,N',N'-metileno bis-acrilamida, L-nitro-arginina-metil-éster (L-NAME), o-fenilenodiamia (OPD), persulfato de amônio, reagente ninidrina, serotonina, TEMED e tetróxido de ósmio foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). O ácido pícrico, carvão ativado, cloreto férrico, etanol P.A., metabisulfito de sódio, metanol P.A., permanganato de potássio e tiosulfato de sódio foram comprados da Labsynth (Diadema, SP, Brasil), o ácido oxálico da Nalgon (Itupeva, SP, Brasil). A historesina foi obtida da Leica (Wetzlar, Alemanha). Placas de 96 poços para ELISA e atividades enzimáticas foram adquiridas da Corning (Corning, MA, EUA). Soro antiaracnídeo (Instituto Butantan, SP, Brasil) foi cedido pelo Centro de Controle de Intoxicações do Hospital das Clínicas, vencido o prazo de validade. Este soro é produzido contra as peçonhas de *Phoneutria nigriventer* (aranha) (21,5%), *Loxosceles gaúcho* (aranha) (21,5%) e *Tityus serrulatus* (escorpião) (57%) (Cardoso *et al.*, 2003).

ANIMAIS

Aranhas e escorpiões

Exemplares de *Vitalius dubius* foram obtidos dos Centros de Controle de Zoonoses, principalmente o Centro de Animais Peçonhentos René D'Ávila, órgão do centro de Controle de Zoonoses de Itú. Os animais foram mantidos em um biotério adaptado, sob ciclo luz/escuro de 12

horas, em recipientes individuais para as aranhas e coletivo para escorpiões, com cobertura de solo peneirado e livre acesso à água. A alimentação por baratas ocorreu duas vezes por semana para todos os animais.

Vertebrados

Ratos Wistar machos (250-300 g) foram obtidos do Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica (CEMIB) da UNICAMP e cobaias machos foram obtidos da Anilab (Paulínia, SP), e foram mantidos a $22 \pm 2^\circ\text{C}$ sob ciclo luz/escuro de 12 horas, com livre acesso à água e ração. Os pintainhos foram obtidos da Granja “Globo Aves” e mantidos no biotério por no máximo uma semana até os experimentos. Os protocolos com animais foram realizados em acordo com as recomendações éticas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), aprovados pelo Comitê de Ética de Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Biologia da UNICAMP, sob os protocolos 1228-1, 1229-1 e 1230-1.

HISTOLOGIA

Microscopia de luz de quelícera e glândula venenífera de Vitalius dubius

Dez aranhas foram sacrificadas em câmaras de CO_2 e a extração das glândulas se deu a partir do isolamento da quelícera e corte do ferrão em sua base. As quelíceras foram abertas nas laterais, de modo que uma “tampa” ventral fosse removida. Com isso, a glândula foi facilmente pinçada na região da base do ferrão. As quelíceras ou glândulas foram extraídas e fixadas em solução de Karnovsky (2% paraformaldeído, 2,5% glutaraldeído, em tampão 0,1 M fosfato de sódio pH 7,8) ou Bouin (25% formaldeído, 75% solução aquosa saturada de ácido pícrico, 0,5% de ácido acético) durante 12 horas. Logo após a fixação, foram desidratadas em bateria de água:álcool e incluídas em parafina ou historesina. Cortes de 5 μm foram obtidos no micrótomo Leica RM 2145 e acondicionados em lâminas. Para cortes transversais seriados da glândula, foram obtidos cortes a cada 50 μm . Antes das colorações foi feita a desparafinização em xilol e reidratação em bateria de água:álcool, e após, desidratação, diafanização e montagem das lâminas com resina entellan. Além da coloração com hematoxilina-eosina (HE), foram instaladas três colorações especiais:

- Coloração de Weigert-van Gieson: utiliza corante de Weigert (composto por uma

mistura de resorcina, fuccina básica, cloreto férrico, ácido clorídrico e álcool 95%), corante de van Gieson (fuccina ácida 1% em solução aquosa saturada de ácido pícrico) e hematoxilina de Weigert (hematoxilina, álcool 95%, cloreto férrico, ácido clorídrico e água destilada). Foi utilizada para evidenciar fibras colágenas e elastina.

- Coloração tricrômica de Masson: fixativo de Bouin (descrito acima), hematoxilina de Weigert, solução de escarlate Biebrich (escarlate Biebrich, fuccina ácida, ácido acético glacial), solução ácida fosfotúngstica-fosfomolíbica (ácidos fosfotúngstico e fosfomolíbico), solução de azul de anilina (azul de anilina, ácido acético e água destilada), ácido acético 1%. Foi utilizada para evidenciar fibras colágenas, muco e queratina;

- Coloração do ácido periódico– corante de Schiff (PAS): reativo de Schiff (água destilada, fuccina básica, ácido clorídrico, metabissulfito de sódio e carvão ativo) e solução aquosa de ácido periódico 0,5%. Foi utilizada para evidenciar glicogênio e muco polissacarídeo.

Além destas técnicas, foi executada histoquímica com reagente faloidina para observação da organização de actina filamentosa, conforme método a seguir. As glândulas foram fixadas em formaldeído (diluída 1:10 em PBS) por 3 horas, lavadas em PBS - 5% sacarose, e deixadas nesta solução para pernoite. No dia seguinte, foram incluídas em Tissutec, seccionadas em criostato e os cortes de 8 µm acondicionados em lâminas silanizadas. O tratamento para faloidina consistiu em refixação em 2% paraformaldeído, permeabilização com 0,1% Triton X-100 e incubação com faloidina (diluída 1:50 em PBS) por uma hora à temperatura ambiente, no escuro. As lâminas foram montadas com meio Sigma. A observação deste material se deu em microscópio confocal Bio-Rad MRC 1024.

Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Os materiais foram extraídos de cinco aranhas ao todo, fixados em Karnovsky por 3 horas e desidratados em baterias de água:álcool, álcool:acetona e no equipamento ponto crítico CPD 030 Critical Point Dryer. Logo após foram instalados em stubs e impregnados com ouro Balzers SCD 050 Sputter Coater para observação em microscópio eletrônico de varredura Jeol JSM 5800LV. Para esta técnica, alguns materiais utilizados foram partes restantes da ecdise das aranhas, ou seja, material composto por quitina.

Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

As glândulas foram extraídas, cortadas em pedaços de 2 mm e fixadas em solução de Karnovsky durante uma noite. Foram subsequentemente desidratadas em baterias de água:álcool e álcool:acetona, refixadas em 1% tetróxido de ósmio no tampão 0,2 M cacodilato de sódio pH 7,4, e incluídas em resina epon. Cortes semifinos corados com toluidina orientaram a confecção de cortes ultrafinos (80 nm). Estes foram acondicionados nas telinhas, refixados em 1% tetróxido de ósmio e contrastados em citrato de chumbo e acetato de uranila. A observação se deu no microscópio eletrônico de transmissão Zeiss LEO 906 operado a 60 kV.

CARACTERIZAÇÃO DA PEÇONHA

Extração da peçonha

Para extração de peçonha, as aranhas recém chegadas de Centros de Zoonoses permaneciam por uma semana em quarentena antes da extração. Retiradas consecutivas de peçonha foram feitas em intervalos de um mês. A peçonha de *V. dubius* foi obtida a partir do método de Schanbacher *et al.* (1973), modificado. Foi desenvolvido um suporte para aranhas de grande porte onde estas, anestesiadas com CO₂, foram presas por barbantes com nós especiais, em três pontos: no cefalotórax, com a linha firmando entre os primeiros e segundos pares de patas; nas patas, com duas laçadas firmando cada uma as quatro patas e o palpo de cada lado, suspendendo-as e separando-as do local de inserção dos eletrodos. O suporte possui um orifício, a poucos centímetros do local onde o cefalotórax foi amarrado, onde foi encaixado um tubo de micro centrífuga, de volume 0,5 mL, com a borda acima do nível da aranha entre 1 e 3 cm (dependendo do tamanho do animal). Os ferrões foram estendidos com a ajuda de uma pinça e um afastador modificado, de forma que ficassem com as pontas inseridas no tubo. Este processo de imobilização e posicionamento da aranha leva em torno de 1,5 minuto. Não foi utilizada nenhuma solução de eletrólitos. Os eletrodos foram posicionados na base superior-lateral externa, um em cada quelícera, de forma que entrem em contato com uma fina membrana da articulação (pleura) existente entre estas e o cefalotórax. Neste local existe um espaço de forma que não é necessário perfurar a aranha e, para que isto não ocorra acidentalmente, os eletrodos possuíam pontas arredondadas. A figura 3 mostra a posição final da aranha no suporte. O posicionamento do eletrodo leva aproximadamente 30 s. A descarga elétrica foi de 5 a 15 V (depende do tamanho

do animal), com 10 Hz de frequência, por aproximadamente 10 s. A peçonha livre de qualquer contaminação (saliva ou suco gástrico) escorreu diretamente no tubo. Logo após o término dos estímulos, os ferrões foram gentilmente retirados do tubo e este vedado e colocado no gelo. O tempo total para a extração da peçonha de uma aranha foi de 3 a 5 minutos. Este método de extração de peçonha foi utilizado com sucesso em várias espécies de caranguejeiras. Para utilização nas metodologias propostas, peçonhas de ao menos 5 machos e 5 fêmeas foram extraídas, volumes iguais de cada foram misturados, os tubos foram centrifugados a 1000 x g por 10 minutos e o sobrenadante foi coletado e armazenado em freezer -80°C, para posterior liofilização.



Figura 3 – Macho adulto de *V. dubius* anestesiado, posicionado para extração da peçonha. Note a inserção dos eletrodos no espaço entre a quelícera e o cefalotórax.

Dosagem protéica

A quantificação de proteína presente na peçonha foi feita utilizando o método de Bradford (1976), modificado para placas de 96 poços (Tenkin e Hansen, 1998), e usando albumina bovina sérica como padrão. Para quantificação de proteína das frações cromatográficas, foi utilizado o método do ácido bicinonínico (Stoscheck, 1990) também com albumina bovina como padrão.

Eletroforese em géis de acrilamida contendo SDS

A eletroforese na presença de SDS foi feita usando-se géis de 10% e 15% de acrilamida em um sistema eletroforético GE Mighty Small II SE 260 (Laemmli, 1970). A peçonha foi diluída em tampão de amostra (concentrações finais: Tris-HCl 0,068 M, pH 6,8, contendo 4% de SDS, 0,005% de azul de bromofenol, e 10% de glicerol). Um padrão com proteínas de massa molecular conhecida foi incluído nas corridas. Após a corrida eletroforética (100 V fixos), os géis foram corados azul brilhante de Coomassie 0,1% e depois secos e documentados.

Atividades enzimáticas

Para economizar peçonha, as atividades proteolíticas foram adaptadas para placas de 96 poços. As concentrações e proporções de substrato e peçonha foram mantidas de forma a evitar diferenças na cinética das reações e, com isso, no tempo de incubação. Para todos os ensaios foram utilizadas placas de fundo cônico, que mimetizam o fundo de um tubo de ensaio comum, além da facilidade de isolar o sobrenadante após centrifugação. Para validação das metodologias, utilizamos a peçonha da serpente *Bothrops moojeni* como padrão, ou seja, as metodologias eram executadas em paralelo em sua forma tradicional e na placa. Para o registro das absorvâncias, foram aliqüotados dos tubos as mesmas quantidades que das placas e medidos todos em placas. Para todos os ensaios obtivemos os mesmos valores antes de executarmos os testes com a peçonha da aranha.

A atividade proteolítica geral da peçonha foi determinada usando-se caseína como substrato de acordo com o método de Kunitz (1947). A mistura final (150 µL) consistiu em caseína 0,5% em tampão 0,05 M Tris pH 8,0, e 0,1 a 0,5 mg de peçonha liofilizada/mL, incubados a 37°C por 20 minutos. A reação foi interrompida pela adição do mesmo volume da reação de ácido trifluoroacético 5%, e incubação no gelo por 30 minutos. Após centrifugação a 2500 x g, a absorvância de 200 µL sobrenadante foi lida em 280 nm.

A atividade colagenolítica (Martinez *et al.*, 1990) foi ensaiada utilizando-se dois substratos diferentes: a) Azocoll: a mistura final (200 µL) consistiu em Azocoll 2,5 mg/mL em tampão 0,1 M Tris-HCl pH 7,8 com 5 mM CaCl₂ e 0,05 a 0,5 mg/mL de peçonha liofilizada,

incubados por 5 horas a 37°C. Ao término da incubação, a mistura foi centrifugada em 2000 x g por 15 minutos e a absorbância do sobrenadante foi lida em 595 nm. A atividade foi expressa como o aumento de absorbância/mg de peçonha. b) Atividade colagenolítica sobre colágeno de tendão de Aquiles bovino como substrato (Martinez *et al.*, 1990): a mistura final (500 µL) consistiu em colágeno 4 mg/mL em tampão Tris-HCl 0,1 M pH 7,8 com CaCl₂ 5 mM e 10 a 500 µg de peçonha liofilizada, incubados por 24 horas a 37°C, em um tubo de microcentrífuga. Ao término da incubação, a mistura foi centrifugada em 2000 x g por 15 minutos e 200 µL do sobrenadante foi colocado em um tubo de ensaio com 500 µL do reagente ninidrina e aquecido a 100°C por 20 minutos. Após resfriar, foi adicionado 2 mL de isopropanol. A absorbância do sobrenadante foi registrada em 600 nm. A atividade foi expressa como o aumento de absorbância/mg de peçonha.

A atividade elástica foi determinada pelo método descrito por Shotton (1970), usando elastina conjugada ao vermelho-Congo como substrato. A mistura final (200 µL) consistiu de substrato 4 mg/mL em tampão 0,02 M borato de sódio com 5 mM CaCl₂ e 0,05 a 0,5 mg/mL de peçonha liofilizada, incubados a 37°C por 24 horas. A reação foi interrompida adicionando-se 20 µL de ácido acético, seguido por centrifugação a 2000 x g por 15 minutos. A absorbância de 150 µL do sobrenadante foi lida em 495 nm e a atividade enzimática foi expressa em aumento de absorbância/mg de peçonha.

A atividade hialuronidásica foi determinada pelo método de Di Ferrante (1956) usando-se ácido hialurônico como substrato. A mistura consistiu de: 0,2 mL de ácido hialurônico (1 mg/mL em tampão 0,2 M acetato de sódio, pH 6,0 com 0,15 M NaCl) e 0,3 mL do mesmo tampão contendo 0,05, 0,1, 0,15, 0,2 mg de peçonha liofilizada, incubada a 37°C por 15 minutos. A reação foi interrompida adicionando-se 2 mL de CTAB 2,5% em 2% NaCl seguido por incubação por 30 minutos a 20°C. A turbidez resultante foi lida em 400 nm. Uma unidade de atividade (“turbidity reducing unit”, TRU) foi definida como a quantidade de peçonha capaz de causar uma redução de 50% na turbidez gerada por 200 µg de ácido hialurônico.

Zimografia para hialuronidase

Para determinar a massa molecular da enzima hialuronidase foi feita zimografia em gel de acrilamida 10% contendo ácido hialurônico 0,5 mg/mL. Amostras de peçonha (2 a 50 µg) foram aplicadas conforme metodologia descrita para eletroforese (ver acima). Após a corrida, o gel foi lavado duas vezes em tampão fosfato de sódio 0,1 M, com NaCl 150 mM, pH 5,8 (PBS) com Triton X-100 5% por 1 hora, seguido por mais uma lavagem em PBS com Triton X-100 0,05% por 1 hora e outra em PBS por 10 minutos, sempre em temperatura ambiente. Após as lavagens, o gel foi incubado em PBS a 37°C por 2 horas e lavado duas vezes em tampão Tris-HCl 15 mM pH 7,95 por 15 minutos em temperatura ambiente. Para corar, o gel foi incubado por 15 horas em solução corante (composição: 5 mL de solução de Stain-all 0,1% em formamida, 5 mL de formamida, 20 mL de isopropanol, 1,5 mL de Tris-HCl 1 M pH 7,5 e água deionizada q.s.p. 100 mL). Para visualização da(s) banda(s) negativa(s), o gel foi descorado em solução descorante (composição: 5 mL de formamida, 20 mL de isopropanol, 1,5 mL de Tris-HCl 1 M pH 7,5 e água deionizada q.s.p. 100 mL) até as bandas se tornarem nítidas. Um marcador de massa molecular pré-colorido foi utilizado como referência.

ENSAIOS IMUNOLÓGICOS

ELISA (“Enzyme-linked immunosorbent assay”)

Para este teste, placas de alta ligação foram sensibilizadas com quantidades de 1 ng até 10 µg de peçonhas de *P. nigriventer*, *T. serrulatus* e *V. dubius* por 18 horas, em tampão carbonato de sódio, 0,05 M, pH 9,6. Após esta incubação, os poços foram lavados com solução salina contendo Tween 20 0,5% (solução de lavagem, SL). O bloqueio de sítios inespecíficos se deu por duas horas com solução PBS pH 7,4 com caseína 2%, seguido de lavagem com SL. As amostras foram incubadas com IgG purificadas do soro antiaracnídico do Instituto Butantan por imunoafinidade em coluna de proteína G-Sepharose. Foram usadas concentrações de IgG de 0,3 mg/mL para peçonha de *V. dubius* e 0,1 mg/mL para a peçonha de *P. nigriventer* e *T. serrulatus*. Os anticorpos foram diluídos em tampão PBS com caseína 0,25% e Tween 20 0,05%. Após uma hora, as placas foram lavadas com SL e as amostras foram incubadas uma hora com anticorpo anti-cavalo de coelho conjugado à peroxidase (GE LifeSciences), diluído 1:299 no mesmo tampão do anticorpo primário. Após mais uma lavagem, as amostras foram incubadas por 20

minutos com a solução de substrato ortofenilenodiamina 0,2 mg/mL em tampão citrato, pH 5,0. Após este período, a reação foi interrompida adicionando-se H₂SO₄ 5%. As absorbâncias foram registradas em 492 nm usando um leitor de placas Molecular Devices SpectraMax340.

Immunoblotting (western blotting)

Para este ensaio, amostras das peçonhas de *P. nigriventer*, *T. serrulatus* e *V. dubius* foram corridas em géis de eletroforese (10% de acrilamida) e as proteínas transferidas para membrana PVDF em uma cuba de transferência GE Mighty Small TE22, em tampão Towbin (Tris, glicina, SDS e metanol 18%) por 1,5 horas. As membranas foram colocadas em solução de leite 5%-Tween-20 0,25% por duas horas para bloqueio de sítios inespecíficos. As membranas foram lavadas com TBS-T (Tris 0,05%, NaCl 170 mM e Tween 0,1%, pH 7,6) por três vezes de 10 minutos. Em seguida foram incubadas com IgG purificadas do soro antiaracnídico do Instituto Butantan (30 µg/mL, diluídas em tampão TBS-T). Após 16 horas, as membranas foram lavadas com TBS-T por três vezes de 10 minutos e incubadas uma hora com anticorpo anti-cavalo de coelho conjugado à peroxidase, diluído 1:999 também em TBS-T. Após mais uma série de lavagens (três vezes de 10 minutos cada em TBS-T) as membranas foram incubadas por cinco minutos com a solução de substrato comercial luminescente (Pierce Super Signal Luminescent kit). Após este período, as membranas foram envolvidas em plástico de PVC e reveladas em filmes KodaK T-MAT.

ATIVIDADES BIOLÓGICAS E PREPARAÇÕES FARMACOLÓGICAS

Atividade hemolítica

A atividade hemolítica da peçonha foi avaliada usando hemácias lavadas de rato (n = 3), conforme descrito por Hink *et al.* (1994). A porcentagem de hemólise foi calculada usando uma curva padrão preparada a partir de diluições de uma amostra com 100% de hemólise induzida, incubando as hemácias com Triton X-100 0,1%. Para controle positivo, utilizamos a peçonha da vespa *Polistes lanio lanio*.

Citotoxicidade

O potencial citotóxico da peçonha de *V. dubius* foi avaliado em testes de viabilidade celular baseado na redução do 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide (MTT), indicador do funcionamento da desidrogenase mitocondrial. Foram utilizadas duas linhagens de células leucêmicas, sendo uma a K562, mais resistente à quimioterápicos, e outra a HL-60, mais sensível aos mesmos. As células foram cultivadas em frascos de 50 mL e transferidas para placas de 96 poços, a uma densidade de 25.000 células por poço. Após um período de 12 horas, as células foram incubadas com peçonha (10, 30, 100 e 300 µg/mL) por três tempos diferentes. Para comparação, utilizamos as mesmas concentrações (massa:volume) de citarabina comercial, um quimioterápico de ação conhecida. Foram utilizadas quatro placas, onde uma foi submetida ao teste de viabilidade imediatamente após a aplicação da droga e peçonha, para avaliarmos o “input”, ou seja, a quantidade de células no tempo inicial. As placas restantes foram incubadas por 24, 48 e 72 horas, com o objetivo de avaliarmos a cinética de ação da peçonha em comparação com a citarabina. O ensaio de viabilidade consiste em, ao final da incubação, centrifugar a placa a 600 x g por 10 minutos, e retirar o sobrenadante. As células foram então ressuspensas com 100 µL de PBS e foram adicionados 10 µL de MTT (thiazolyl blue tetrazolium bromide, MTT, 5 mg/mL em PBS) seguidos por incubação durante 4 horas. Terminado este período, adicionou-se 100 µL da solução de solubilização (SDS 10% em HCl 0,01 M) e procedeu-se à medida da absorbância em 600 nm. Como critério de avaliação dos resultados, consideramos citoestase como diminuição ou bloqueio do crescimento das células em relação ao controle, e citotoxicidade como a diminuição do número de células em relação ao “input”.

Teste de permeabilidade vascular (edema)

Para investigar a capacidade da peçonha em promover alterações na permeabilidade vascular, ratos machos (n = 6) foram anestesiados com tiopental (60 mg/kg, i.p.) e, uma vez atingido um nível de anestesia adequado (determinado pela perda de reflexos pedal e córneo), a superfície dorsal foi depilada e quantidades variadas de peçonha foram injetadas usando um esquema de seleção randomizada para os sítios de injeção. Trinta minutos antes de serem sacrificados, os ratos receberam cada um 1 µCi de ¹²⁵I-albumina humana (i.v., via veia peniana),

e 5 min antes do sacrifício, 1 mL de sangue foi coletado para a determinação da quantidade de albumina circulante. Após o sacrifício dos ratos com halotano, os sítios de pele injetados com peçonha foram recortados e os níveis de radioatividade determinados num contador de radiação gama (Antunes *et al.*, 1993; Marangoni *et al.*, 1993). A quantidade de extravasamento protéico foi expressa em μL de plasma baseado na radioatividade detectada na amostra de sangue. Para avaliar o mecanismo pelo qual a peçonha provoca o edema, os animais ($n = 6$, cada) foram pré-tratados com antagonistas de: receptor de histamina H_1 (mepiramina, 6 mg/kg peso corporal, i.p.), receptores de bradicinina (HOE-140, 0,6 mg/kg peso corporal, i.v.), receptores de aminas (ciproheptadina, 2 mg/kg de peso corporal, i.p.) e inibidor da óxido nítrico sintase (L-NAME, 100 nmol por sitio, co-injeção). Nestes ensaios foram utilizados como controles positivos, respectivamente: histamina, bradicinina e C48/80 (30 nmol, 10 nmol e 0,5 μg por sítio, respectivamente), Para ensaios de neutralização do edema por imunoglobulinas de soro antiaracnídeo do Instituto Butantan, as peçonhas foram pré-incubadas com imunoglobulinas 1 hora a 37°C , antes de serem co-injetadas ($n = 6$).

Cardiotoxicidade em coração semi-isolado de barata

A atividade cardiotoxica da peçonha foi avaliada usando-se a preparação de coração semi-isolado de barata (*Leucophea madere*) (Bauman and Gersch, 1982; Klowden *et al.*, 1992; Predel *et al.*, 1999; Vilaplana *et al.*, 1999). Os insetos foram mantidos à temperatura ambiente em terrário de vidro com acesso livre à água e ração. Para uso, os insetos ($n = 4$) foram anestesiados com clorofórmio e imobilizados com a superfície ventral voltada para cima. Com a ajuda do estereoscópio, foi feita uma incisão abdominal para expor os órgãos internos. O trato digestivo e outras vísceras foram deslocados para expor o coração que foi banhado em NaCl 0,15 M a temperatura ambiente. Após 5-10 min para estabilização da frequência cardíaca, a peçonha ou fração purificada (em 10 μl de salina) foi aplicada ao coração e as alterações monitoradas durante os próximos 30 min. A frequência cardíaca foi monitorada continuamente com câmera de vídeo montado no microscópio.

Preparação de íleo isolado de cobaia

Após sacrifício de cada animal ($n = 4$ ou 6) com uma dose letal de pentobarbital sódico

(Hypnol®, Cristalia, Itapira, SP; >50 mg/kg, i.p.), o abdômen foi aberto e o íleo retirado e colocado em solução de Tyrode (composição, em mM: NaCl 137; Na₂HPO₄ 0,42; NaHCO₃ 11,9; CaCl₂ 1,8; MgCl₂ 0,49; KCl 2,7 e glicose 11,1) que foi oxigenada continuamente com uma mistura de 95% de O₂ e 5% de CO₂ a 37°C. Fragmentos de íleo (2-3 cm) foram recortados e limpos de resíduos da membrana mesentérica antes de serem montados numa cuba de incubação de 10 mL de Tyrode, sob uma tensão de 0,5 g. Após 30 min para estabilização, a reatividade da preparação foi testada utilizando concentrações crescentes da peçonha de *V. dubius*. Para avaliar a influência da peçonha sobre a contração induzida por diferentes agonistas, curvas concentração-resposta de acetilcolina, bradicinina e serotonina (0,001 a 10 µM para todos) foram obtidas e, em seguida, repetidas na presença da peçonha, após pré-incubação de 20 minutos. As respostas contráteis foram registradas em um registrador GraphTec, utilizando-se transdutores isotônicos da Harvard Instrument Company. As contrações foram expressas relativas à contração máxima obtida com o respectivo agonista.

Preparação de músculo anococcígeo de rato

Os ratos (n = 4) foram sacrificados em câmara de CO₂, o abdômen aberto e o músculo anococcígeo extraído. A preparação foi montada sob uma tensão de 10 mN em uma cuba de 10 mL com solução nutritiva de Krebs (composição, em mM: NaCl 136; KCl 5; CaCl₂ 2,5; NaHCO₃ 23,8; MgSO₄ 1,2; KH₂PO₄ 1,2 e glicose 11), aerada por uma mistura de 5% de CO₂ e 95% de O₂, a 37°C. Após estabilização por uma hora, concentrações cumulativas de peçonha foram aplicadas à preparação. Na ausência de contração pela peçonha, o tecido foi eletroestimulado com frequências crescentes (5 V, 1 a 32 Hz), e concentrações diferentes de peçonha (1, 10 e 100 µg/mL) foram adicionadas para avaliação da influência na contração (Rego *et al.*, 1996). Para investigar o sítio de ação da peçonha (pré ou pós-sináptico), foram obtidas curvas concentração-resposta com fenilefrina (10 nM a 10 µM), um agonista pós-sináptico, na ausência e presença de peçonha e, separadamente, com tiramina (100 µM), um precursor que estimula a exocitose de norepinefrina em nível sináptico, na presença de peçonha.

Preparação de nervo frênico-diafragma de camundongo

Camundongos (n = 3) foram anestesiados por via intraperitoneal com hidrato de cloral

(300 mg/kg) e posteriormente exsanguinados por secção dos vasos cervicais. Após a dissecação para a retirada do hemidiafragma esquerdo e isolamento do nervo frênico correspondente (Bülbring, 1946), as preparações foram banhadas em solução nutritiva de Tyrode (pH 7,5) aerada com carbogênio (mistura de 95% de O₂ e 5% de CO₂) à 37°C. O segmento do hemidiafragma foi fixado em uma cuba com capacidade para 5 ml, preenchida com solução nutritiva. O músculo foi mantido, por sua porção tendinosa, sob tensão constante de 5 g. O nervo frênico ficou sobreposto a um eletrodo de platina que se manteve em contato com a superfície da solução nutritiva. O transdutor isométrico BG-50g foi acoplado a um fisiógrafo Gould RS 3400. A preparação então, foi estimulada indiretamente, através do nervo frênico, e diretamente (estimulador Grass S48), usando estímulos supramaximais e frequência de 0,1 Hz e 0,2 ms, para estímulos indiretos, e 2 ms para estímulos diretos. Após o registro em condições controle e a verificação do perfeito estado da preparação, a peçonha (20 a 80 µg/mL) foi adicionada, seguida por incubação de até 90 minutos.

Preparação de biventer cervicis de pintainho

A preparação foi isolada e montada de acordo com o método de Ginsborg e Warriner (1960). Os pintainhos (n = 4) foram sacrificados em câmara de halotano e, após o isolamento, o músculo foi suspenso em uma cuba de 5 ml, contendo solução nutritiva de Krebs (composição, em mM: NaCl 136; KCl 5; CaCl₂ 2,5; NaHCO₃ 23,8; MgSO₄ 1,2; KH₂PO₄ 1,2 e glicose 11). A solução foi aerada de modo constante com carbogênio e mantida a 37°C. A preparação foi submetida a uma tensão constante de 1 g e estimulada por meio de eletrodos bipolares (estimulação de campo). Foram aplicados estímulos de até 4 V com pulsos supramaximais de 0,1 Hz de frequência e 0,2 ms de duração para estimulação indireta (estimulador Grass S48). As contrações musculares resultantes foram avaliadas na ausência e durante incubação com a peçonha (10 a 50 mg/µL) ou frações (15 mg/µL). Em cada experimento, o registro das contraturas para acetilcolina (110 µM) e KCl (20 mM) foi realizado na ausência de estimulação elétrica antes da adição da peçonha ou frações, e após o período de 60 minutos de incubação com as mesmas. Este procedimento teve por objetivo checar a funcionalidade dos receptores nicotínicos e conseqüente transmissão do potencial (acetilcolina), e a integridade da estrutura funcional do músculo (Harvey *et al.*, 1994). As contrações e contraturas foram registradas em

fisiógrafo Gould RS 3400, por meio de transdutores isométricos Load Cell BG-10 GM.

Cromatografia líquida de fase reversa

A peçonha de *V. dubius* foi fracionada por cromatografia de fase reversa em uma coluna GE Resource RPC divinil-bezeno (volume: 1 mL, esferas de 15 µm de diâmetro) usando um sistema cromatográfico GE ÄKTApurifier 10. A coluna foi equilibrada com ácido trifluoroacético 0,1% em água deionizada (solução A) e a solução eluente foi acetonitrila 90% em solução aquosa de ácido trifluoroacético 0,1% (solução B). Dois miligramas de peçonha foram aplicados à coluna e lavados por 10 volumes de coluna (VC) com tampão. Em seguida, as proteínas retidas na coluna foram eluídas usando-se um gradiente de 0% a 40% de solução B em 20 VC, seguido de 40% a 100% de solução B em 6 VC. O perfil de eluição foi monitorado em 214 nm e 280 nm e as frações obtidas foram coletados automaticamente em volume fixo de 0,5 mL para liofilização.

Análise estatística

Quando possível, os resultados foram expresso como a média + E.P.M. do número de determinações ou experimentos indicados. As comparações estatísticas foram feitas usando o teste t de Student, ou ANOVA seguido pelo teste de Tukey, onde um valor de $p < 0,05$ indicava significância.

RESULTADOS

INSTALAÇÃO DO BIOTÉRIO DE ARTRÓPODES

Para o desenvolvimento do projeto, foi necessário mantermos as aranhas em cativeiro para a extração regular de peçonha. Para tanto, instalamos um biotério de artrópodes no Departamento de Farmacologia. Neste local, mantivemos aranhas caranguejeiras para extração de peçonha, e baratas comuns para alimentação das mesmas.

Para obtenção dos animais, mantivemos contato oficial com os Centros Municipais de Controle de Zoonoses das cidades de Campinas, Itú, Indaiatuba, Itapira, Hortolândia, Sumaré, Limeira, Santa Bárbara d'Oeste, Americana, Jaboticabal, Jundiaí, Piracicaba, Sorocaba, São Paulo, Vinhedo e Valinhos. Destes, os que forneceram exemplares foram os de Campinas, Hortolândia, Indaiatuba, Itapira, Poços de Caldas, São José dos Campos e Sumaré, com destaque ao Centro de Animais Peçonhentos René D'Ávila, em Itu, cujo trabalho desenvolvido com a comunidade local acarretou no fornecimento de 90 dos 137 exemplares de caranguejeiras registrados em nosso biotério.

No entanto, visto a diversidade das espécies de caranguejeiras, nem todos os exemplares são de *Vitalius dubius*, sendo necessária a identificação e separação destes animais. Para tanto, contamos com a cooperação do Prof. Dr. Rogério Bertani do Instituto Butantan que orientou para a identificação destes animais. A tabela 1 traz as espécies identificadas, com o número de indivíduos machos e fêmeas mantidos em nosso laboratório.

Espécie	Campinas	Poços de Caldas	Itú	São José dos Campos	Indaiatuba	Hortolândia	Itapira	Sumaré	Total
<i>Vitalius dubius</i>	8	10	52	0	0	0	2	2	72
<i>Vitalius sorocabae</i>	0	2	9	0	0	0	0	0	11
<i>Acanthoscurria gomesiana</i>	5	3	6	2	0	2	0	0	18
<i>Acanthoscurria atrox</i>	1	0	3	0	0	0	0	0	4
Outras	0	0	2	0	0	0	0	0	2
Não Identificadas	3	6	18	0	1	0	2	0	30
Total	17	21	90	2	1	2	4	2	137

Tabela 1 – Espécies principais de aranhas mantidas em cativeiro em nosso biotério, de acordo com o local de origem.

As aranhas foram acondicionadas individualmente em recipientes plásticos (tipo baleiros) empilháveis por encaixe, de dimensões 20 x 15 x 20 cm (c x l x a), com cobertura de terra e acesso à água *ad libitum*. As aranhas foram alimentadas com baratas semanalmente ou camundongos neonatos a cada quinze dias.



Figura 4 – Biotério das aranhas no laboratório. Os recipientes são plásticos, empilháveis e forrados com terra peneirada. As aranhas são mantidas em terrários individuais.

DESCRIÇÃO ESTRUTURAL E ULTRAESTRUTURAL DO APARATO VENENÍFERO

Organização geral da quelícera

A quelícera constitui a unidade produtora e inoculadora de peçonha em *V. dubius*. Nela estão localizados o ferrão e a glândula de peçonha, bem como a musculatura responsável pela mobilidade desta peça. Cada indivíduo possui um par, anteriormente ao prossoma, orientadas no sentido postero-anterior em relação à base em direção ao ferrão (figura 5). As fêmeas de *Vitalius dubius* possuem quelíceras maiores que machos, de acordo com a diferença do tamanho corporal.

Externamente, a quelícera consiste em uma rígida e grossa peça esférico-alongada de quitina com muitos pêlos e articulações na junção com o prossoma e na base do ferrão. Este por sua vez se caracteriza por uma robusta estrutura de quitina, medindo de 6 a 11 mm, com um duto interno para a extrusão da peçonha. Este duto abre-se em um orifício localizado na face anterior (frontal) do ferrão adjacente à ponta do mesmo (figura 6A). Além disso, observamos na região ventral uma fila de saliências na orientação do ferrão, similares a “dentes de quitina” (figura 6B). O ferrão de apresenta transversalmente triangular, ao invés de cilíndrico, com a face anterior achatada, que contém o orifício, enquanto as laterais se unem posteriormente formando um aparato cortante que facilita a penetração durante a picada.

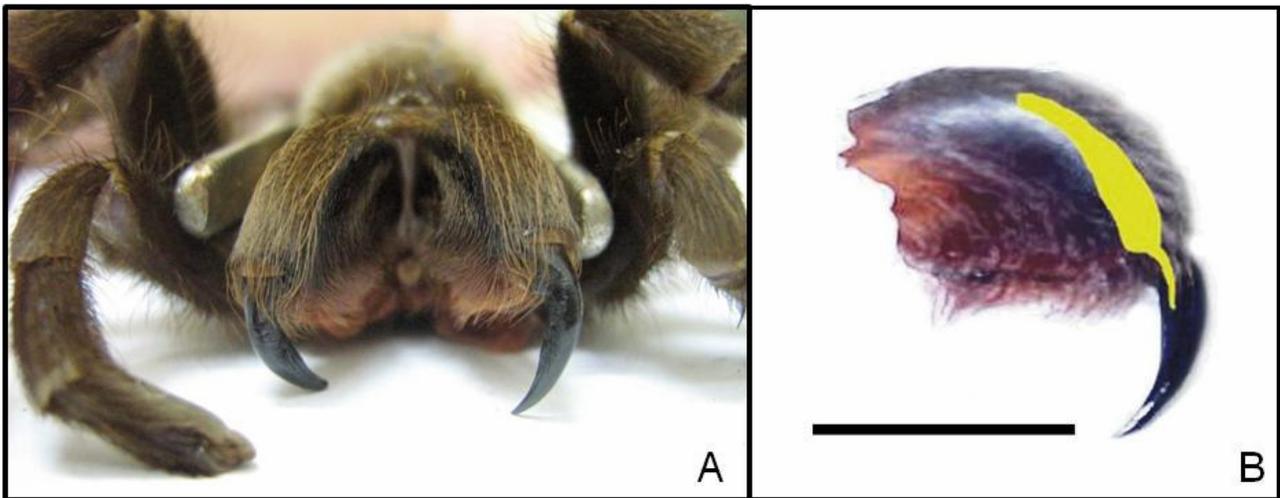


Figura 5 – (A) Vista frontal da aranha para localização das quelíceras e ferrões. (B) Foto lateral de uma quelícera isolada. Em amarelo está representada a posição da glândula de peçonha internamente. Barra = 1 cm.

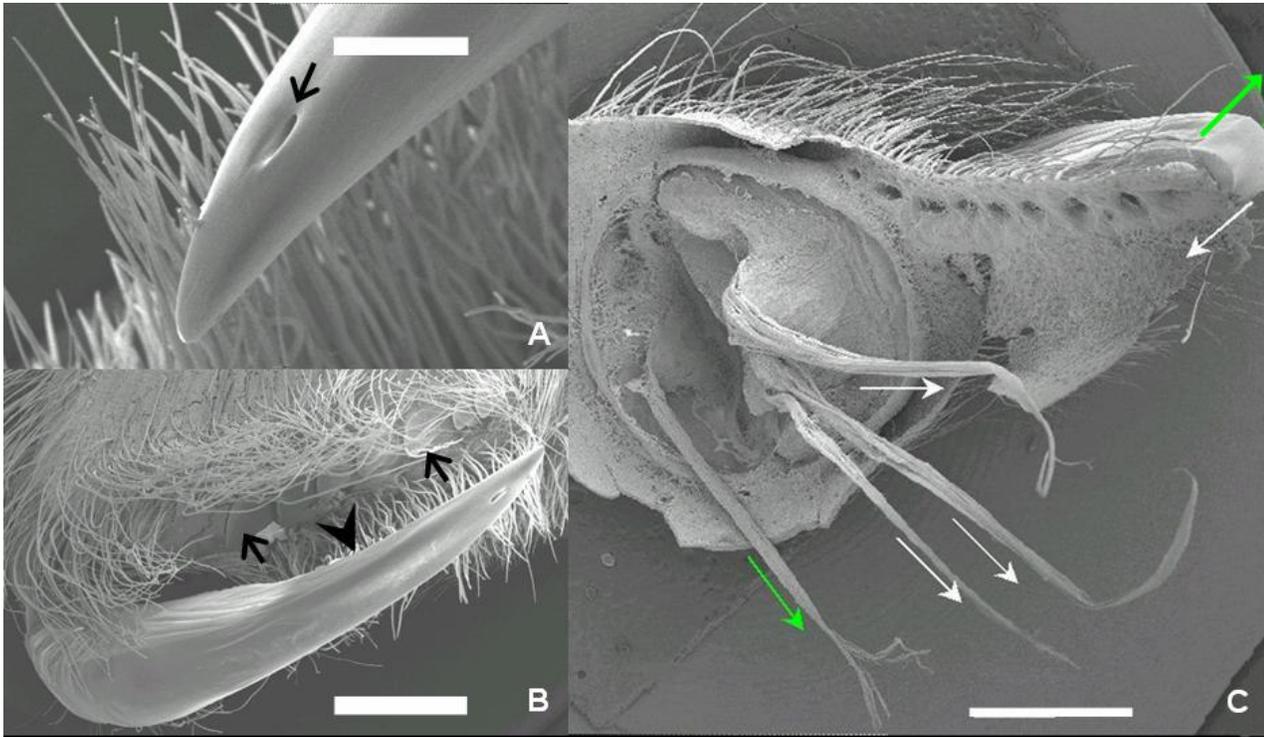


Figura 6 – Eletromicrografia de varredura da quelícera de *V. dubius* isolada de uma exúvia (exoesqueleto resultante de uma ecdise). (A) Detalhe do ferrão mostrando a abertura do orifício de saída de peçonha na face anterior (seta). (B) Vista ventral do ferrão mostrando estruturas similares a “dentes de quitina” (setas). (C) Imagem posterior de ligamentos internos de quitina responsáveis pela abertura (seta verde) e fechamento (setas brancas) do ferrão. Barras: A = 0,5 mm, B e C = 2 mm.

A figura 6C mostra que internamente à quelícera existem ligamentos de quitina que se inserem em uma área próxima à articulação do ferrão. Estes ligamentos atuam junto com a musculatura da quelícera responsáveis pela extensão e flexão do ferrão em resposta à atividade muscular, onde observamos, através de experimento com exúvias que um ligamento é responsável pela extensão do ferrão, enquanto três atuam na flexão.

Na microscopia óptica, observa-se que o exoesqueleto é formado por uma fina epicutícula quitinosa, uma segunda camada lamelar de quitina e um epitélio aderido com características pavimentosas, que se ancora na superfície interna da quelícera através de invaginações na quitina. Este epitélio se torna delgado em sítios onde a musculatura se adere à face interna da carapaça (figura 7A). A este epitélio se associam células que atravessam a quitina e se expandem na forma

de cálice, ligadas aos pêlos (figura 7B).

A quelícera se caracteriza internamente por uma densa massa muscular onde a glândula de insere em meio à musculatura estriada, separada desta por uma membrana conjuntiva (figura 7C). Em algumas regiões, a glândula pode apresentar-se rente à carapaça (figura 7D).

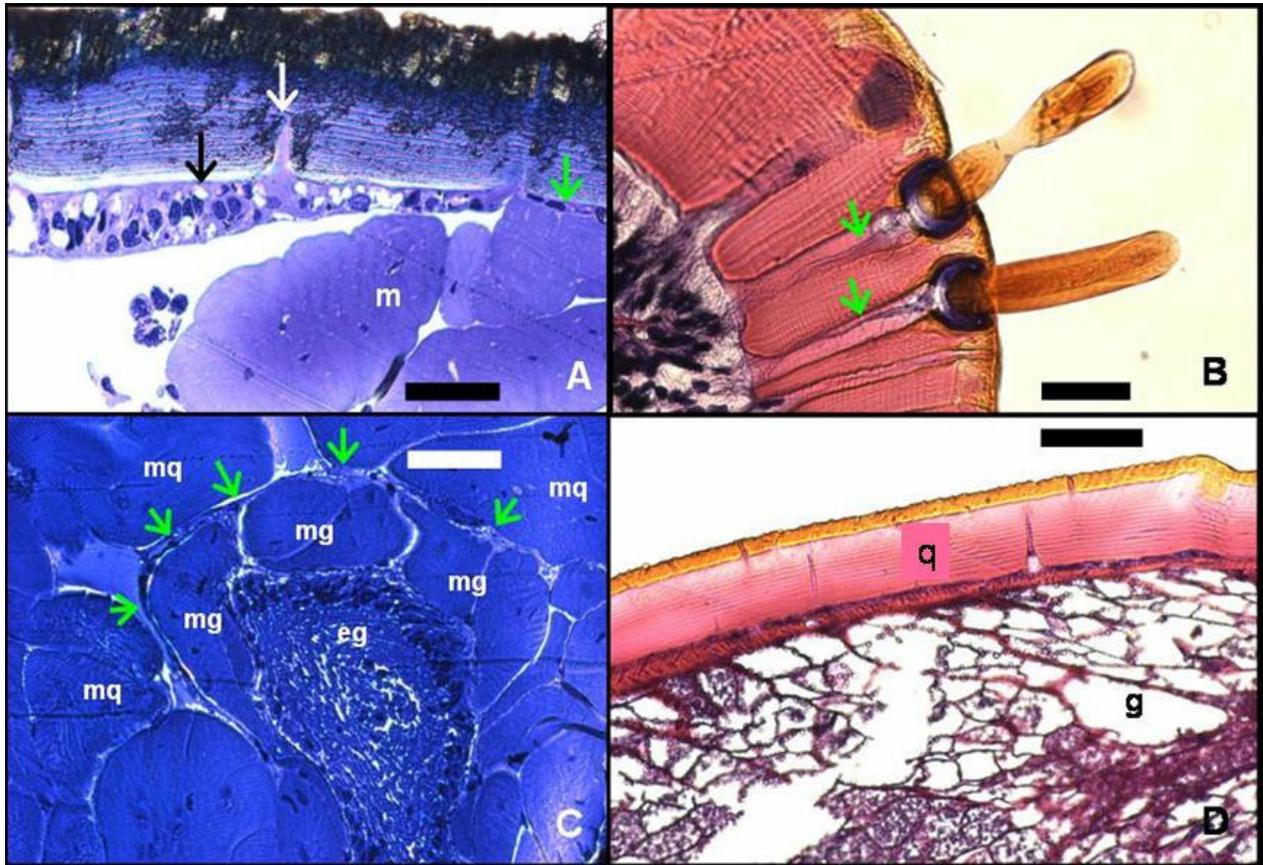


Figura 7 – Cortes histológicos de quelícera de *V. dubius*. (A) Corte da quelícera mostrando o epitélio adjacente à quitina (seta preta) e à musculatura (m) (seta verde). Note a invaginação na quitina para ancoragem do epitélio (seta branca). (B) Células caliciformes (setas) estendendo-se do epitélio à base dos pêlos, provavelmente exercendo uma função sensorial. (C) Glândula de peçonha envolta por musculatura da quelícera (c). Os músculos (mg) e epitélio (eg) da glândula estão isolados dos músculos da quelícera (mq) por uma membrana de tecido conjuntivo (setas). (D) Glândula de peçonha (g) adjacente à carapaça de quitina (q). Barras: A,B,C = 50 μ m, D = 100 μ m.

Estrutura da glândula de peçonha

Para estudo da estrutura, foram utilizadas glândulas de aranhas que não tiveram sua peçonha extraída por pelo menos 30 dias. Conforme revelado em micrografias de varredura, as duas glândulas de peçonha, presentes uma em cada quelícera, apresentaram-se sob formato alongado com aproximadamente 8 mm de comprimento, podendo atingir até 1,5 cm incluindo o ducto de peçonha, com variação de diâmetro entre 0,5 e 1,2 mm. Possuem duas principais regiões: a anterior, formada por um alargamento onde se insere o ducto de peçonha, e o corpo principal, que diminui seu diâmetro no sentido antero-posterior. O epitélio “esponjoso” é envolvido por duas densas túnicas entrelaçadas de musculatura, arrançadas em sentido oblíquo helicoidal (Figura 8).

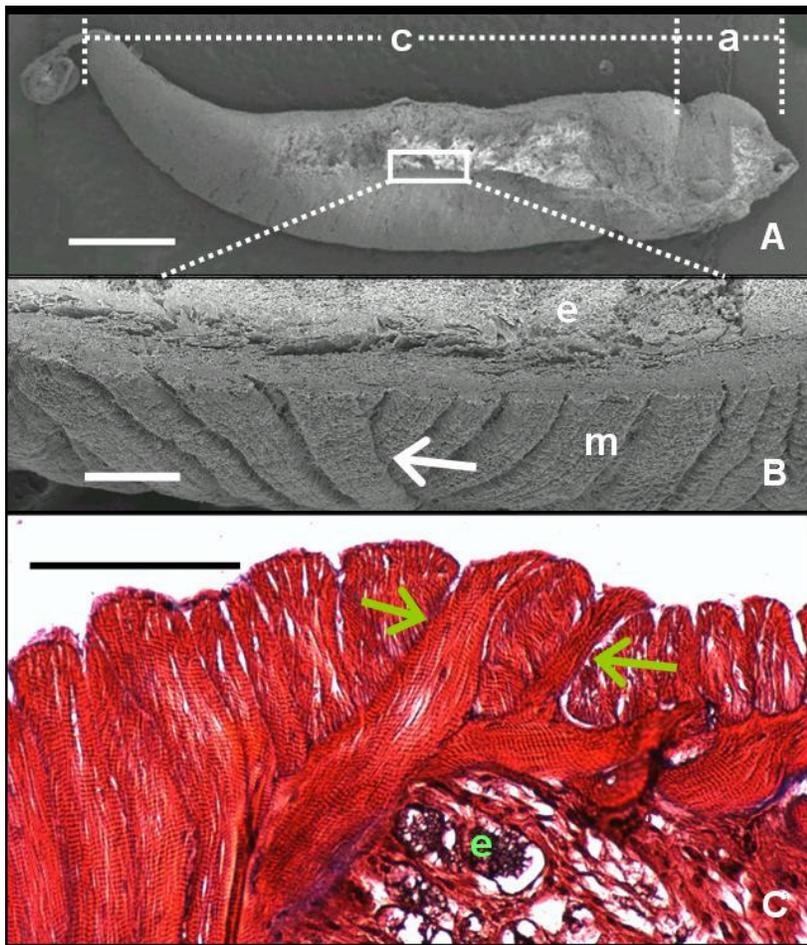


Figura 8 – Microscopia eletrônica e óptica de glândula de peçonha de *V. dubius*. (A) Eletromicrografia de varredura mostrando as duas regiões da glândula de peçonha: anterior (a) e corpo principal (c). O ducto de peçonha (não mostrado) se liga à região anterior. (B) Detalhe do painel A mostrando a musculatura da glândula (m) e o epitélio (e). A seta indica fibras musculares sobrepondo-se em eixos helicoidais. (C) Secção histológica mostrando a organização das fibras musculares (setas) sobrepondo-se como epitélio intrincado. Coloração tricrômica de Masson. Barras: A = 1 mm, B = 200 μ m and C = 100 μ m.

Adjacente à musculatura, encontra-se uma camada de tecido elástico, mas que também apresenta colágeno (figura 9A), evidenciados pelas colorações utilizadas. Em todos os cortes transversais, “dobras” foram observadas nesta camada basal. Além disso, pela utilização da coloração do PAS, foi evidenciada a presença de muco polissacarídeo na porção basal do epitélio, bem como nas regiões próximas ao lúmen (figura 9B).

O epitélio secretor forma uma complexa estrutura no interior da glândula. Organiza-se ao redor do lúmen, aderido à membrana basal, com extensos prolongamentos citoplasmáticos (figura 9C). Em sua base, localizam-se preferencialmente corpos celulares com muitos núcleos e grânulos evidenciados por coloração por azul de toluidina. Os prolongamentos citoplasmáticos formam uma rede de conexões anastomosadas em direção à luz da glândula. Nestes prolongamentos alguns núcleos podem ser encontrados. Estas conexões formam espaços onde a peçonha é confinada, o que sugere ter participação no processo de produção da mesma. Esta organização não apresenta variações significativas ao longo da glândula (figura 10), exceto pela polarização inferior do lúmen em regiões anteriores e na camada muscular que se torna mais delgada posteriormente. Através de reação com faloidina e observação em microscopia confocal, constatamos que estes espaços formados pelos prolongamentos citoplasmáticos são sustentados por actina filamentosa (figura 11).

A microscopia eletrônica de varredura evidenciou a estrutura tridimensional formada pelas células epiteliais. Na figura 12, observamos claramente que estas formam lamelas e, por sua vez, estabelecem canalículos e bolsas.

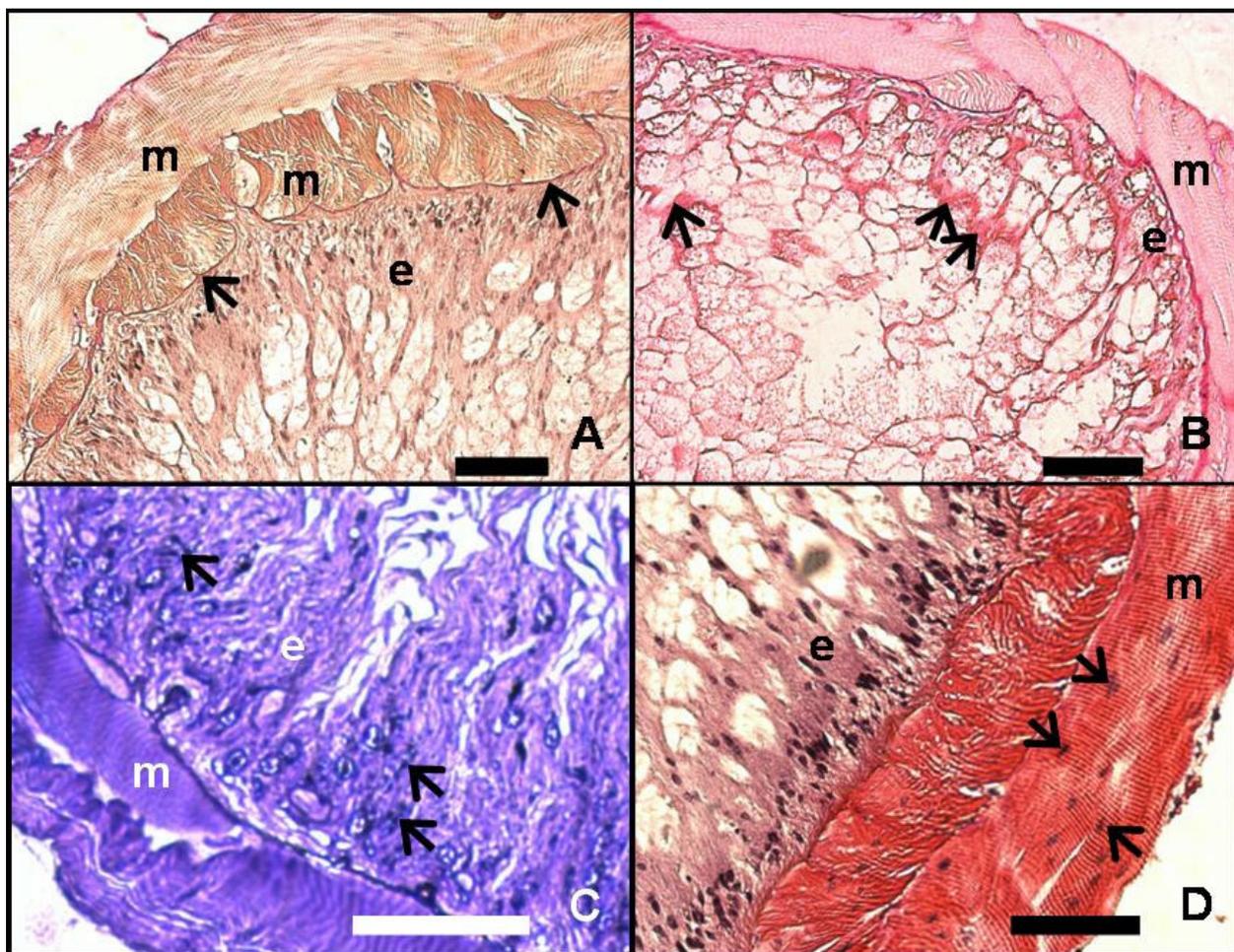


Figura 9 – Secções transversais de glândula de peçonha de *V. dubius* mostrando a organização da musculatura (m) e epitélio (e). (A) Coloração de Weigert van Gieson evidenciando em marrom membrana basal (setas), o que indica a presença de fibras elásticas. (B) Reação de PAS mostrando a presença de polissacarídeos na membrana basal e espaço epitelial (setas). (C) Grânulos epiteliais corados com azul de toluidina (setas). (D) Coloração tricrômica de Masson evidenciando a distribuição de núcleos na musculatura e epitélio (setas). As glândulas foram emblocadas em parafina (A, B e D) ou historesina (C). Barras: A,D = 100 µm, B,C = 200 µm.

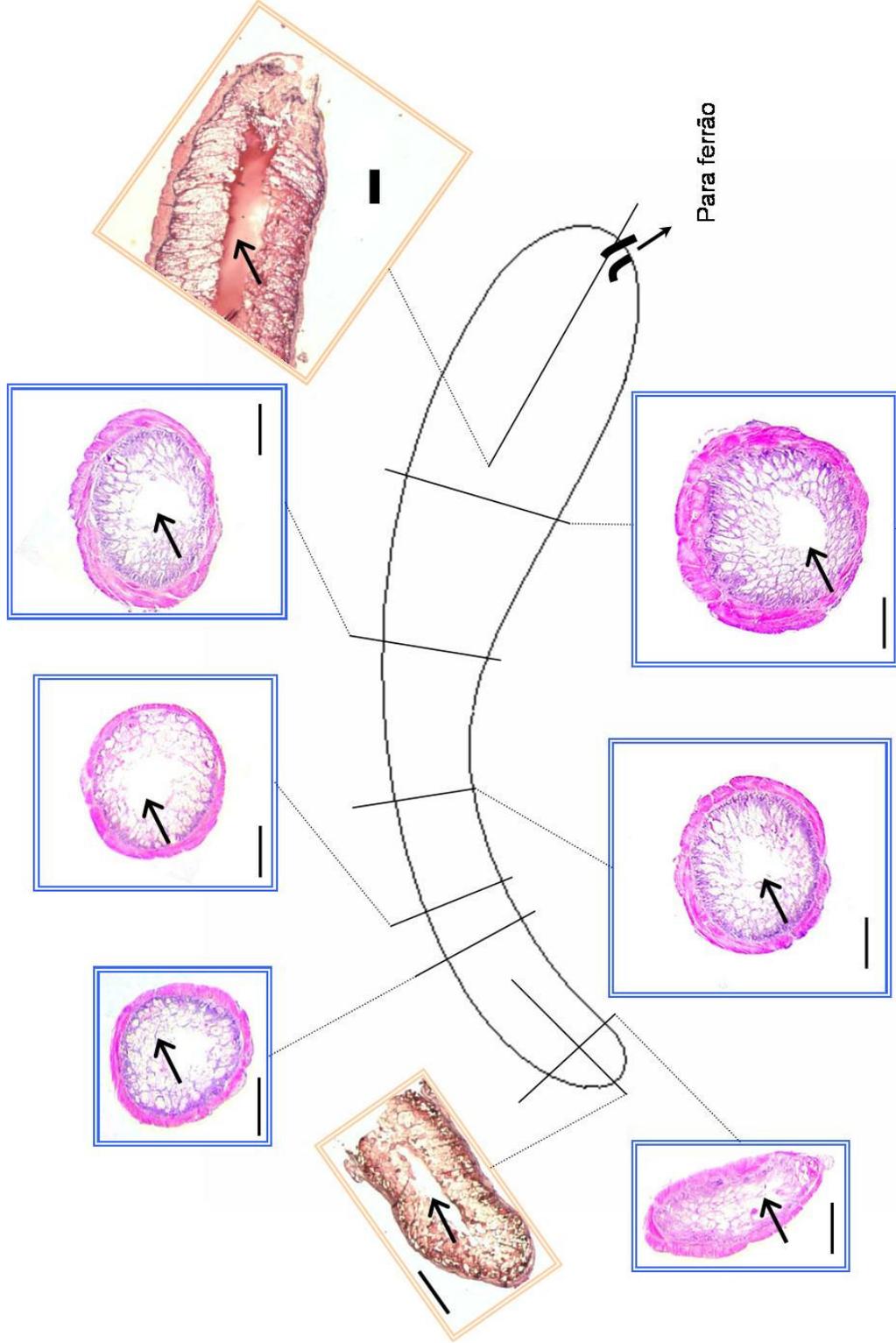


Figura 10 – Cortes sequenciais de glândula de peçonha de *V. dúbuis*. Note que a musculatura se torna mais espessa anteriormente e que a luz está presente em toda a glândula (setas). Cortes transversais (azuis) corados com HE e longitudinais (laranja) corados com PAS. Barras 0,3 mm.

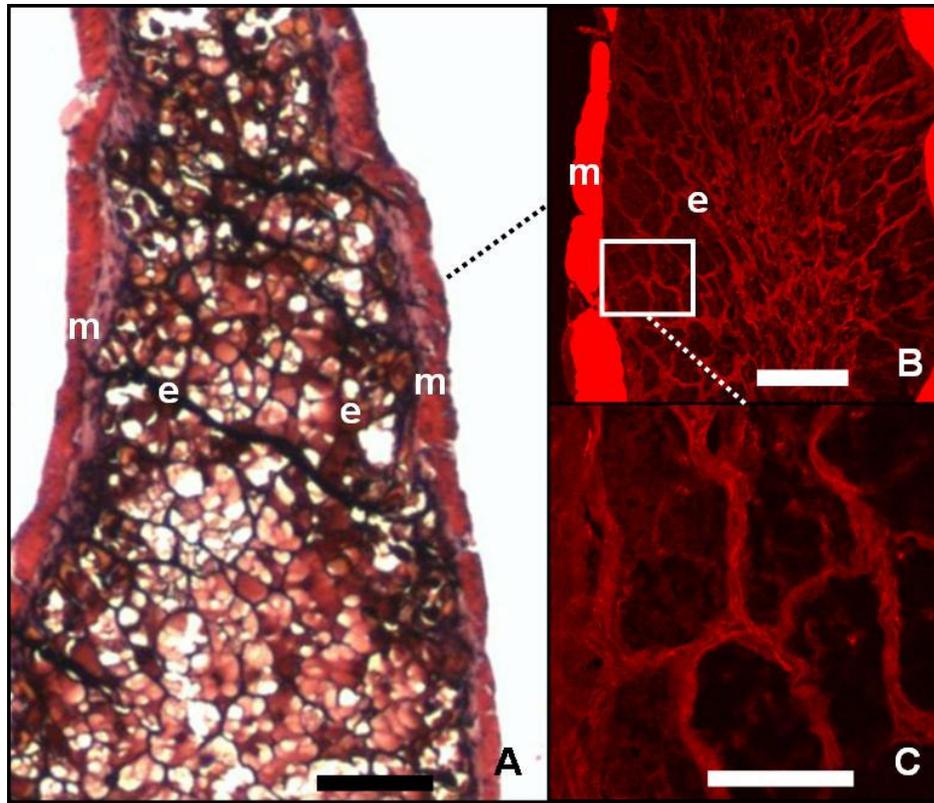


Figura 11 – Cortes longitudinais da glândula de peçonha mostrando a musculatura (m) e o epitélio (e). (A) Microscopia óptica com coloração tricrômica de Masson. (B e C) Microscopia confocal evidenciando F-actina (vermelho) no epitélio secretor. (B) Foto panorâmica e (C) detalhe do epitélio. Barras: A,B = 50 μm , C = 0,2 μm .

Ultraestrutura da glândula de peçonha

A microscopia eletrônica de transmissão (MET) da glândula revelou presença de estruturas celulares e organelas, como complexo de Golgi, lisossomos, mitocôndrias, núcleo, nucléolo e abuntes retículos endoplasmático liso e rugoso e vacúolos autofágicos. Foram observadas células epiteliais com diferentes eletrodensidades citoplasmáticas. As que apresentaram menor eletrondensidade se localizam em contato com a membrana basal, possuem nucléolo evidente, mitocôndrias e polissomos, mas poucos vacúolos autofágicos. Nestas foi mais evidente a presença de núcleos com morfologias atípicas, caracterizadas por diversas invaginações do envoltório nuclear. As células de maior eletrondensidade citoplasmática localizavam-se mais afastadas da membrana basal e apresentavam muitos e grandes vacúolos autofágicos e abundantes retículo rugoso, aparato de Golgi, mitocôndrias e retículo liso. MET mostrou também que as células epiteliais estavam bastante anastomosadas, com muitas interdigitações que dificultou a determinação dos limites entre os tipos similares. (figura 13 A, B e C).

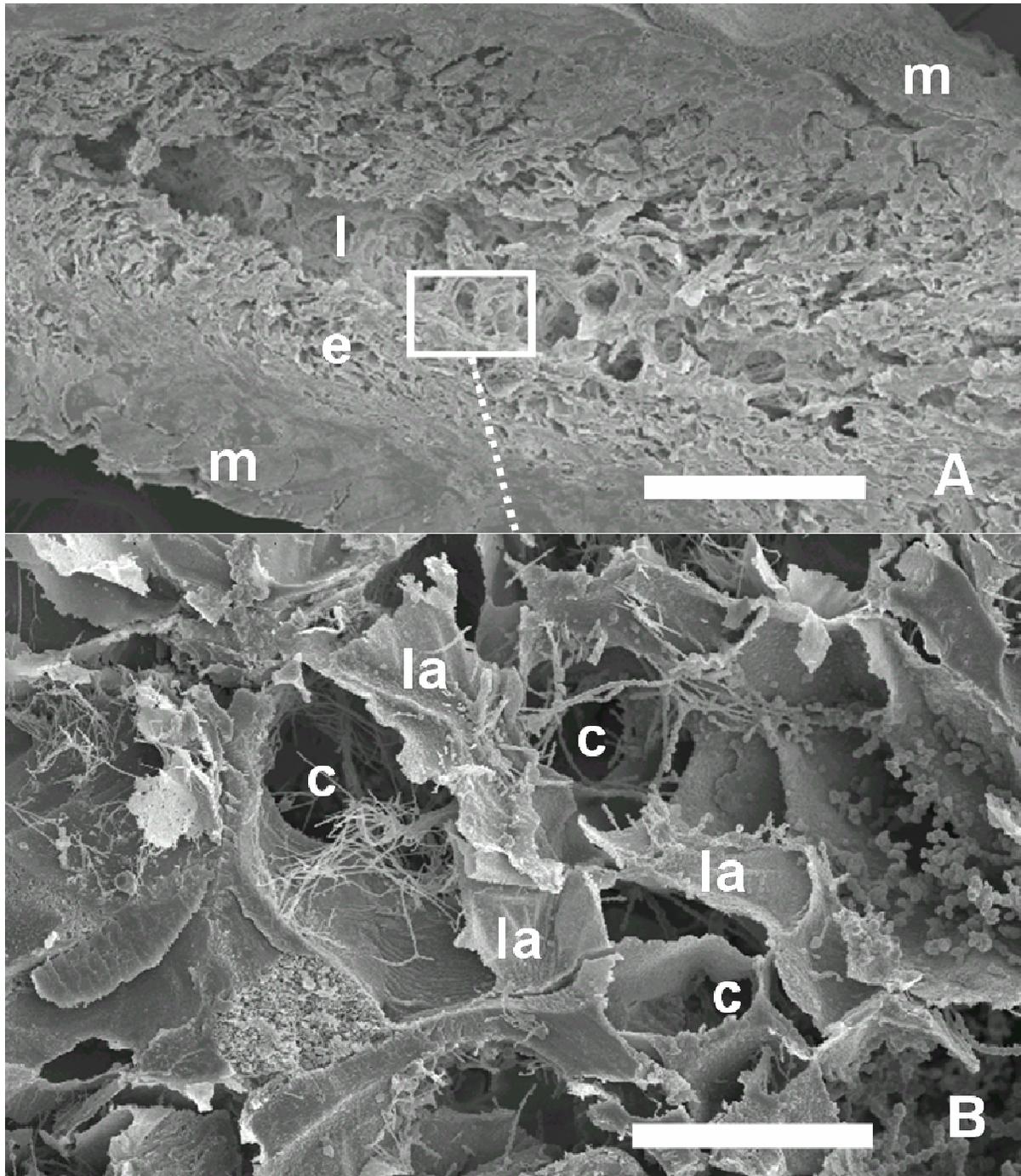


Figura 12 – Eletromicrografia de varredura do epitélio glandular. (A) Imagem panorâmica de um corte longitudinal mostrando musculatura (m), epitélio (e) e luz (l). (B) Detalhe de (A) mostrando a estrutura do epitélio semelhante a uma colméia. c = câmara da cavidade luminal, la = parede de câmara. Alguns artefatos podem ser observados aderidos às paredes das lamelas. Barras: A = 0,5 mm, B = 50 μ m.

A rede de extensões epiteliais em direção à luz da glândula consistiu em prolongamentos citoplasmáticos de diversas espessuras, com as mais grossas apresentando abundância de mitocôndrias e retículo liso, complexo de Golgi e vacúolos autofágicos (figura 13 D, E, F e G). As lacunas formadas por esta rede continham uma variedade de vesículas com diferentes eletrondensidades, bem como regiões preenchidas com peçonha, presumivelmente. Além disso, regiões de diferentes granulações foram observadas frequentemente lado a lado, mas separadas por uma fina membrana.

Figura 13 (página seguinte) – Eletromicrografias de epitélio de glândula de peçonha. (A) Vista panorâmica mostrando núcleos (n), lisossomos (setas) e membrana basal conjuntiva (b). (B) Núcleo (n) com evidente nucléolo (seta), característico de células epiteliais deste tecido. (C) Detalhe apresentando mitocôndrias (setas) e vacúolo autofágico eletrondenso (l). (D) Complexo de Golgi com cisternas cis (c) e trans (t). (E) Interdigitações epiteliais com retículo endoplasmático rugoso (setas brancas) e mitocôndria (setas pretas). (F) Região lamelar mostrando os prolongamentos citoplasmáticos (c) envolvidos por peçonha (v) na luz da glândula (l). (G) Grande vesícula no epitélio demonstrando o confinamento de peçonha (v) e gotas aderidas (setas). Note a granularidade da vesícula. Prolongamentos citoplasmáticos se apresentaram largos (w) ou finos (t), os primeiros com mitocôndrias e retículo liso, e os últimos predominantemente membranosos. Barras: A = 5 μm , B = 2 μm , C = 5 μm , D = 0.5 μm , E = 1 μm , F = 2 μm , G = 10 μm .

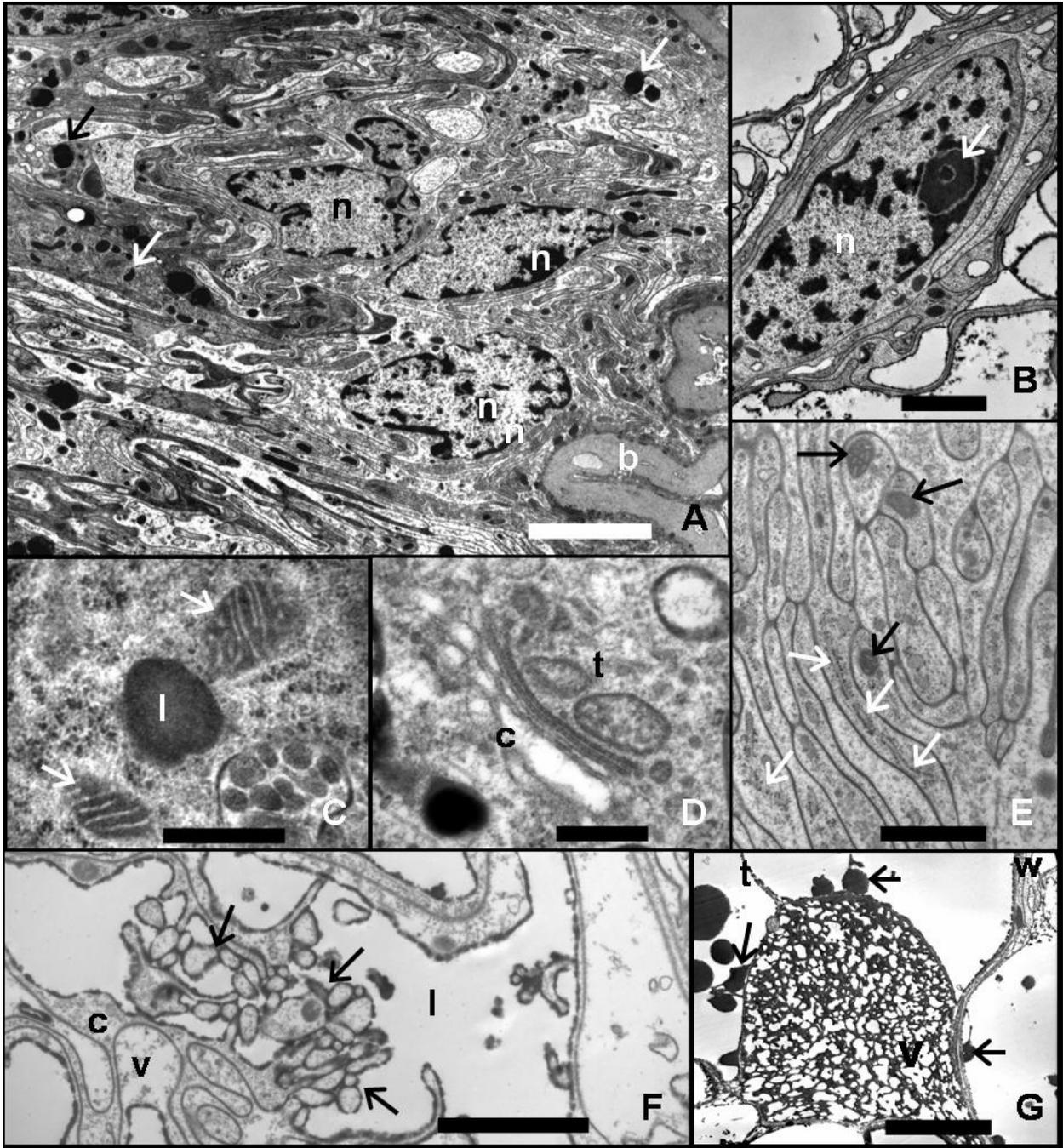


Figura 13.

A microscopia de transmissão também mostrou que estas lamelas possuem complexa organização intracelular, além de gotículas de peçonha aderidas à face externa da membrana plasmática (figura 14).

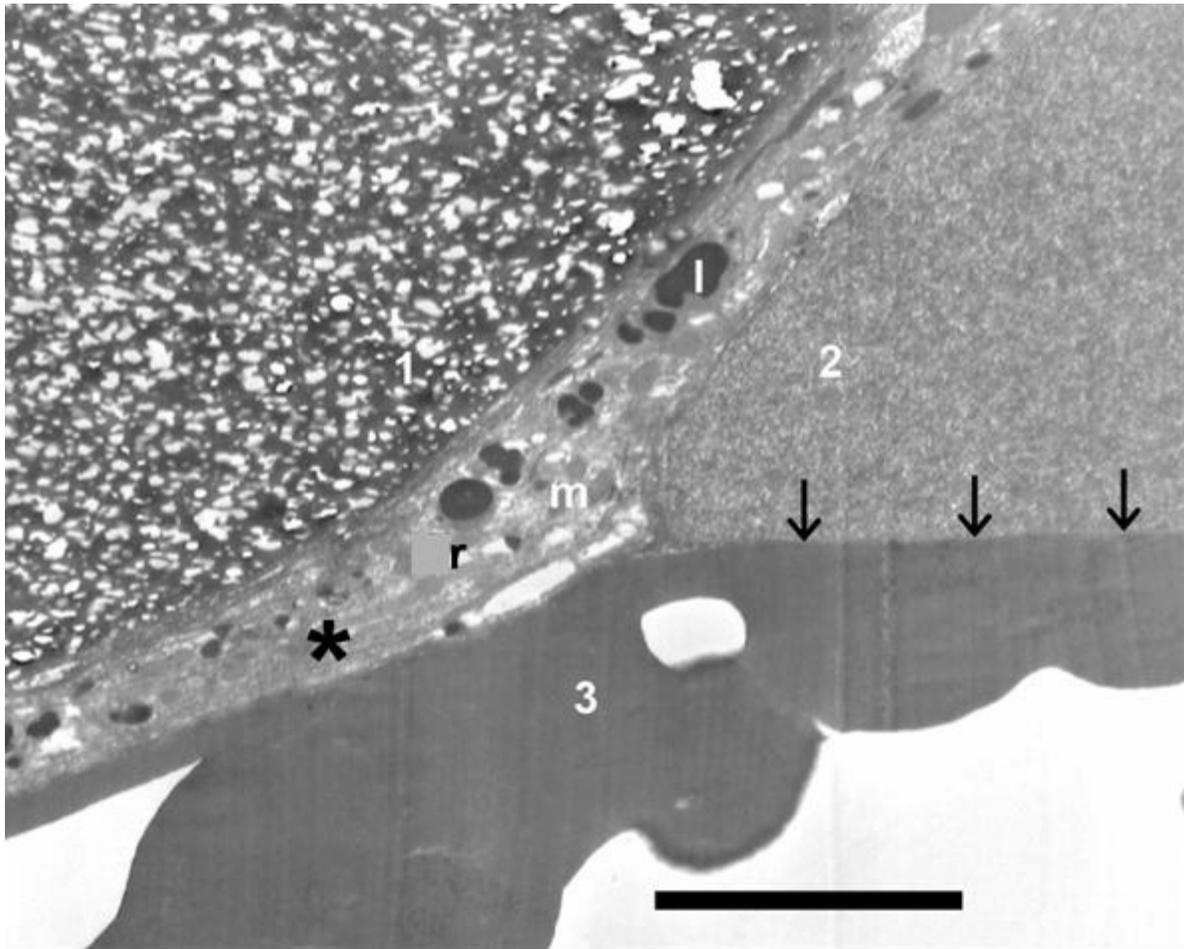


Figura 14 – Eletromicrografia de vesículas lamelares da glândula de peçonha. Note as três regiões (1, 2 e 3) contendo material de diferentes granulações e eletrondensidades. Estas regiões estão isoladas por prolongamentos citoplasmáticos, um dos quais (asterisco) contém mitocôndrias (m), retículo endoplasmático (r) e lisossomos (l). Setas indicam o prolongamento citoplasmático membranoso.

Alterações ultraestruturais após a extração de peçonha

A análise da glândula durante a produção da peçonha permite a avaliação das alterações epiteliais associadas a esta biossíntese. Baseado em dados obtidos durante a extração de peçonha,

a glândula produz quantidade máxima em torno do vigésimo dia após a última extração. Para tanto, foram realizadas extrações de peçonha de doze animais, sendo três aranhas sacrificadas para remoção das glândulas em cada período: no primeiro, terceiro, sétimo e décimo quinto dias após extração de peçonha. De cada aranha foi destinada uma glândula à microscopia óptica e uma a MET.

Em microscopia óptica, poucas alterações foram observadas. A principal delas foi no epitélio, onde os prolongamentos celulares em direção ao lúmen da glândula estavam mais espessos entre um e três dias após a extração de peçonha.

Um dia após a extração, não havia alterações evidentes no complexo de Golgi e retículo endoplasmático rugoso, comparado com os tecidos descritos anteriormente, mas mitocôndrias estavam mais abundantes (figura 15). A rede formada pelo epitélio secretor estava compactada, com poucas lacunas, apesar de uma pequena quantidade de peçonha residual presente. O destaque se deu por conta da abundância de vacúolos autofágicos nesta região.

Três dias após a extração de peçonha o epitélio estava menos compactado e núcleos eram mais abundantes, com um aumento na quantidade de retículo endoplasmático e aparato de Golgi (figura 16).

Sete dias após, a membrana basal conjuntiva estava distendida e as células anastomosadas do epitélio continham abundantes retículos liso e rugoso e aparato de Golgi (figura 17). Numerosos núcleos foram observados, muitos dos quais constringidos e deformados, e, os mais próximos aos prolongamentos citoplasmáticos possuíam nucléolo evidente, além de estarem cercados por vacúolos autofágicos eletrondensos. Vesículas contendo peçonha estavam maiores que nos estágios anteriores e as organelas eram menos eletrondensas.

Finalmente após quinze dias (figura 18), a reposição de peçonha na glândula estava essencialmente completa. Os retículos liso e rugoso ainda eram abundantes e algumas células continham muitos vacúolos. Células que não apresentaram as mesmas características de funcionalidade que o epitélio (por exemplo, retículo endoplasmático e mitocôndrias) foram observadas em contato com a luz da glândula e identificadas como hemócitos, ou seja, leucócitos comuns em artrópodes.

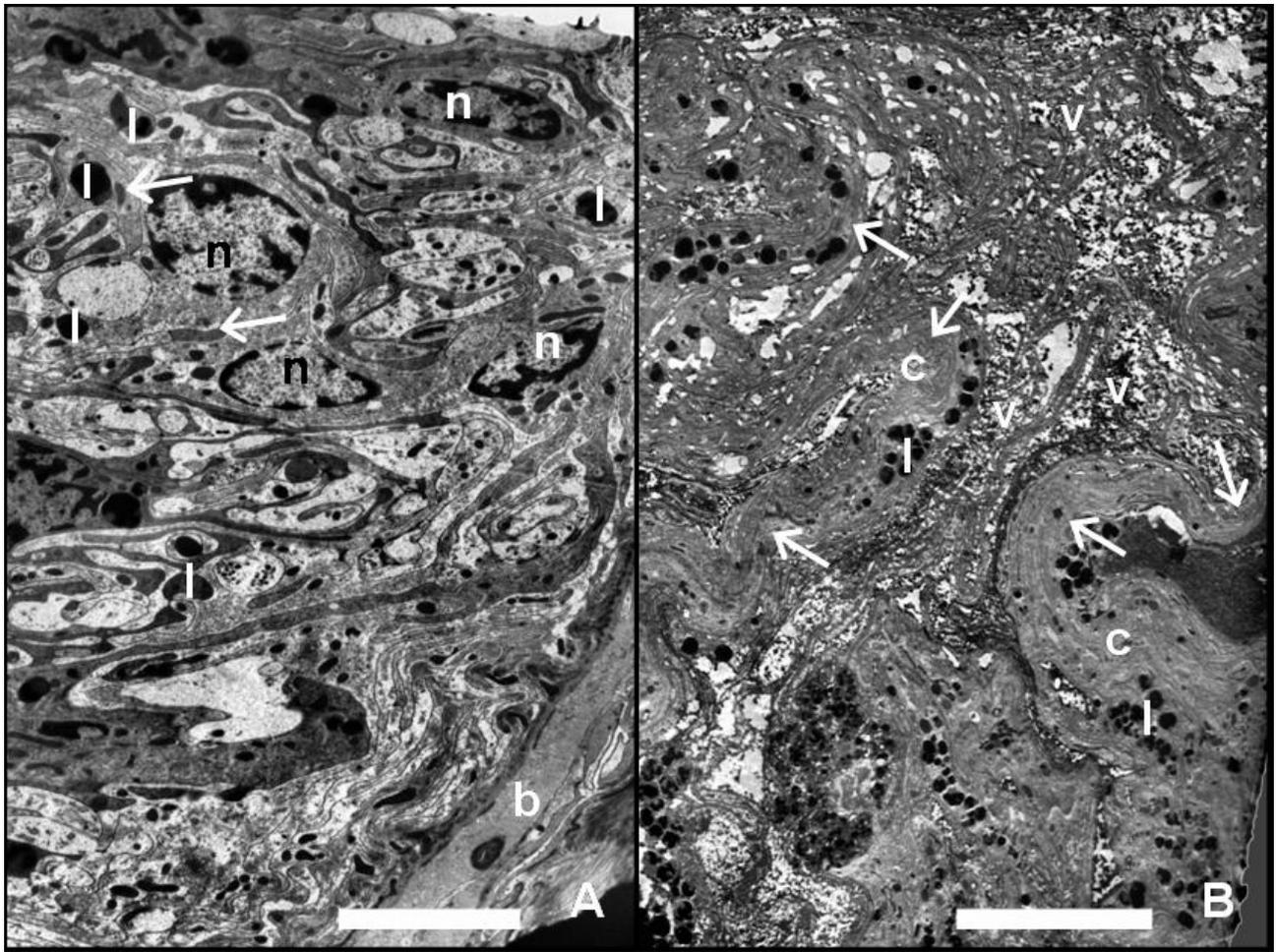


Figura 15 – Eletromicrografias de epitélio de glândula de peçonha um dia após extração de peçonha. (A) Epitélio e lâmina basal (b) mostrando poucos núcleos (n), vacúolos autofágicos (l) e mitocôndrias (setas). (B) Região lamelar com longos prolongamentos citoplasmáticos (c) comprimidos (setas) pelo esvaziamento da glândula. Grandes vesículas contendo material granular residual (v). Barras: A = 5 μ m, B = 10 μ m.

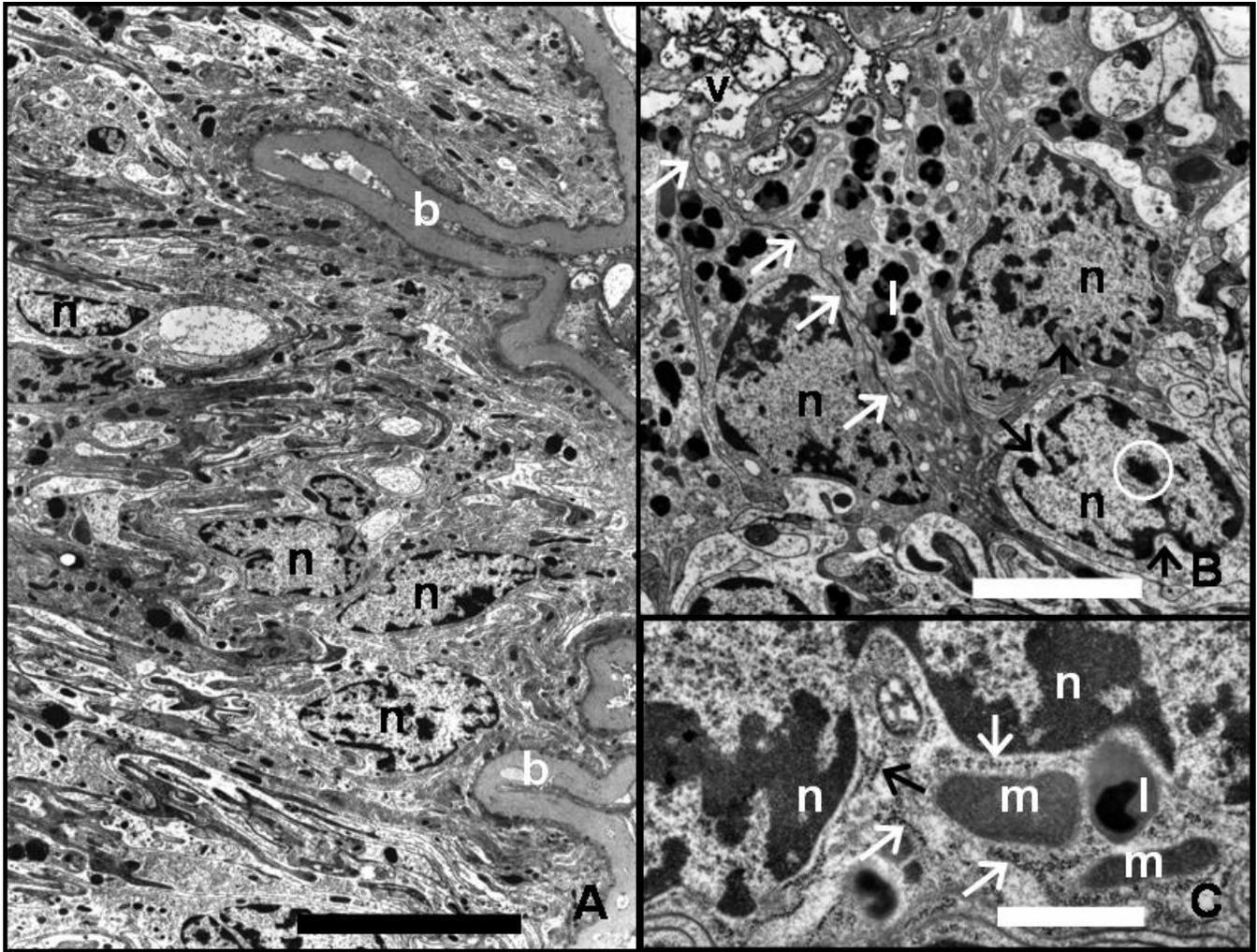


Figura 16 – Eletromicrografias de epitélio de glândula de peçonha três dias após extração de peçonha. (A) Vista panorâmica mostrando lâmina basal (b) e epitélio com núcleos (n). (B) Epitélio secretor mostrando vacúolos (v) e núcleos (n) com nucléolos (círculo branco) e regiões constringidas (setas pretas). Vesículas de peçonha (v) desenvolvem-se como uma bitembrana em torno da região nuclear a abrem-se na região lamelar (setas brancas). (C) Mitocôndria (m), lisossomos (l) e RER (setas brancas) em torno do núcleo (n). Barras: A = 10 μm , B = 5 μm , C = 1 μm .

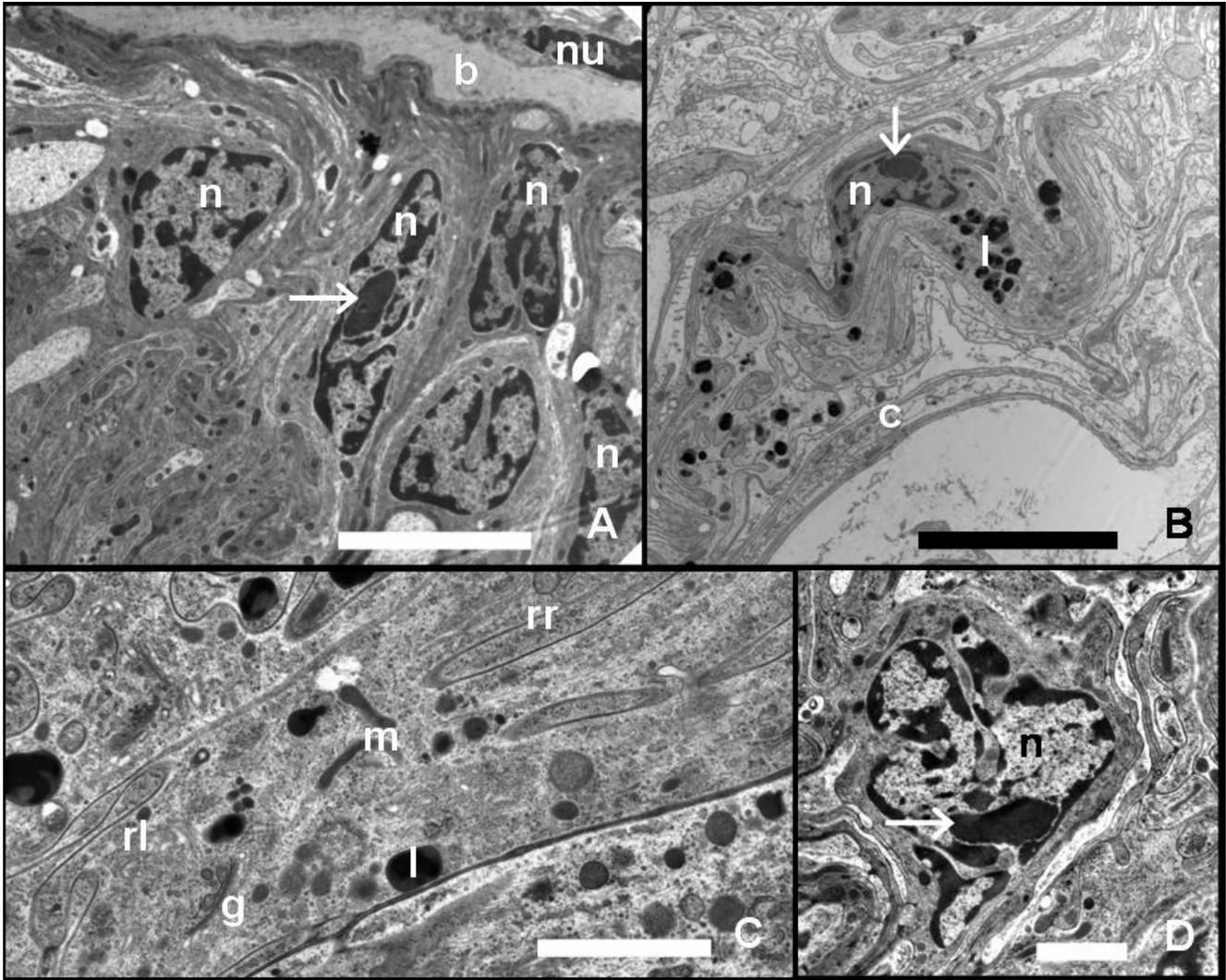


Figura 17 – Eletromicrografias de epitélio de glândula de peçonha sete dias após extração de peçonha. (A) Vista panorâmica mostrando núcleos (nu) da lâmina basal (b) e epitélio. Núcleos (n) de células secretoras estão mais abundantes e anastomosados. Nucléolos são evidentes (seta). (B) Região lamelar com núcleos (n) e prolongamentos citoplasmáticos (c). Note o nucléolo (seta) e vacúolos (l) em torno do núcleo. (C) Organelas abundantes, incluindo aparato de Golgi (g), mitocôndria (m), vacúolos (l) e retículo endoplasmático liso (s) e rugoso (r). (D) Detalhe de um núcleo (n) deformado com diversas constrições e nucléolo (seta) evidente. Barras: A e B = 5 μ m, C e D = 2 μ m.

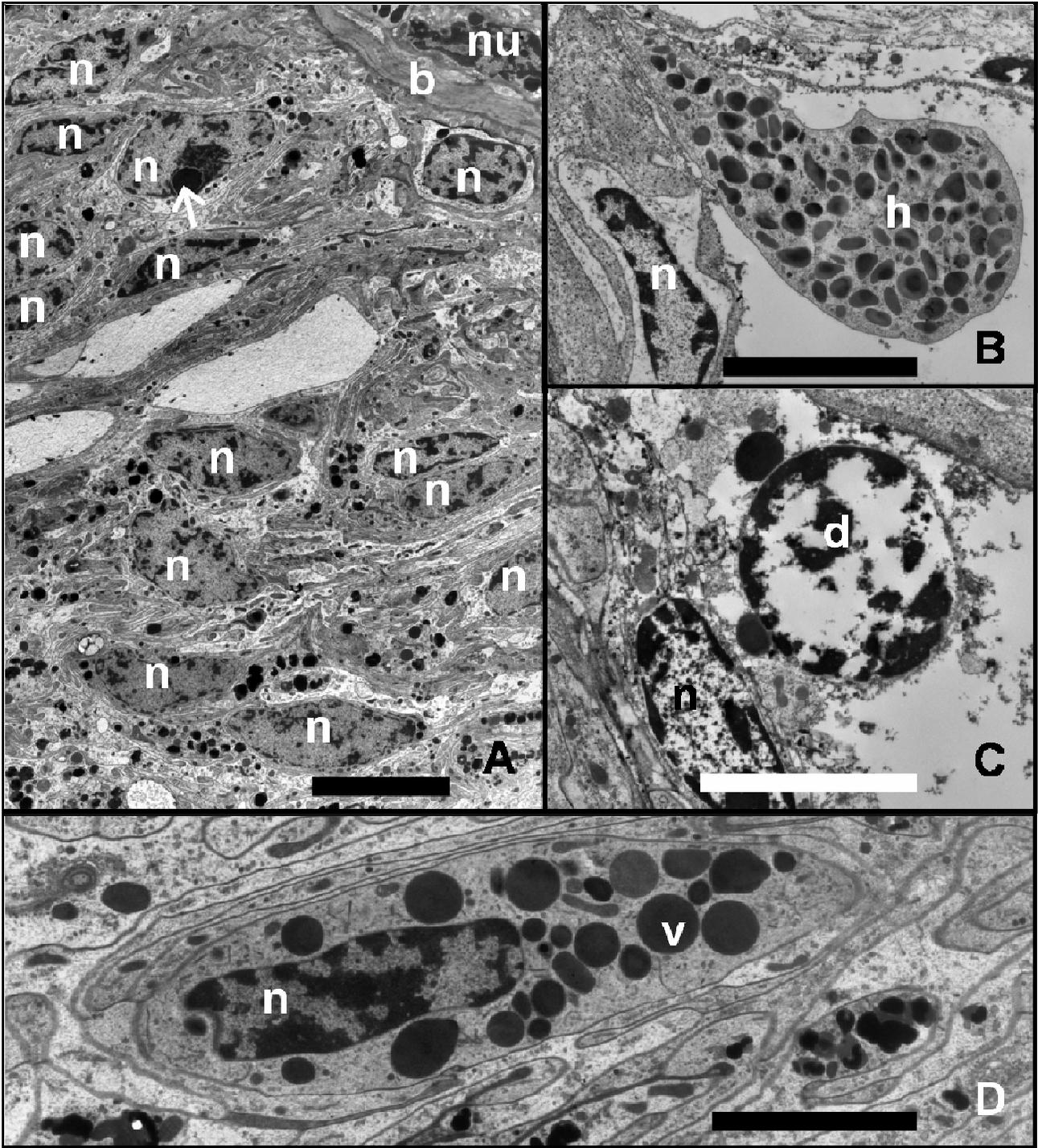


Figura 18 (página anterior) - Eletromicrografias de epitélio de glândula de peçonha quinze dias após extração de peçonha. (A) Vista panorâmica mostrando núcleos (nu) da lâmina basal (b) e epitélio. Note a abundância de núcleos (n), inclusive na membrana basal (nu), alguns com nucléolo (seta). (B e D) Hemócitos (h) com vacúolos autofágicos (v) ao redor de núcleos (n). (C) Estruturas consideradas como *debris* celular (d). Barras: A = 10 μm , B e C = 5 μm , D = 2 μm .

EXTRAÇÃO DA PEÇONHA

Anteriormente a qualquer tentativa de extração, nos atentamos por buscar um método que evitasse a contaminação por secreções gástricas, o que pode interferir nos resultados, conforme amplamente discutido na literatura (Rash e Hodgson, 2002). Testamos metodologias como indução ao bote com placas de Petri ou tubos tipo eppendorf recobertos por filme PVC ou dominar a aranha com uma pinça e aproximar um tubo para que esta depositasse peçonha espontaneamente. O eletroestímulo acabou demonstrando-se ser o método mais eficaz e com reprodutibilidade de resultados. No entanto, a metodologia descrita por Schanbacher *et al.* (1973) não mostrou boa aplicabilidade pois a solução de eletrólitos-SDS, utilizada para aumentar a condutividade da isolante e grossa camada de quitina, acarretava em uma distribuição generalizada da descarga elétrica, provocando injúria excessiva às aranhas.

Na busca por uma metodologia “a seco”, encontramos um ponto na base da quelícera, onde a carapaça se caracteriza como uma fina membrana e, ao posicionarmos os eletrodos, cada um na base de uma das quelíceras, encontramos a condutividade necessária. A aplicação de 5 a 10 V, com frequência de 10 Hz, por 10 segundos, é suficiente para a extração da peçonha.

Rendimento de peçonha

O gênero das aranhas influenciou diretamente no rendimento bruto e quantidade de proteínas de peçonha extraída. As fêmeas produziram mais peçonha que machos [$23,1 \pm 2,3$ (n=11) e $12,5 \pm 0,7$ (n=16) mg de peçonha/aranha/menor extração, respectivamente], o que foi de acordo com seu maior tamanho ($11,2 \pm 1,1$ g e $4,4 \pm 0,9$ g, respectivamente). Mas quando o rendimento foi relacionado ao peso corporal, o chamado índice de produtividade de peçonha, os machos apresentaram produtividade um pouco maior (figura 19). O peso corporal das fêmeas, associado

à idade do animal, também afetou o rendimento de peçonha. Até atingir a fase adulta, quanto maiores mais peçonha é produzida, no entanto animais mais velhos tendem a ter a produção diminuída. Este fator explica a diminuição no índice de produtividade de peçonha das fêmeas de *V. dubius*.

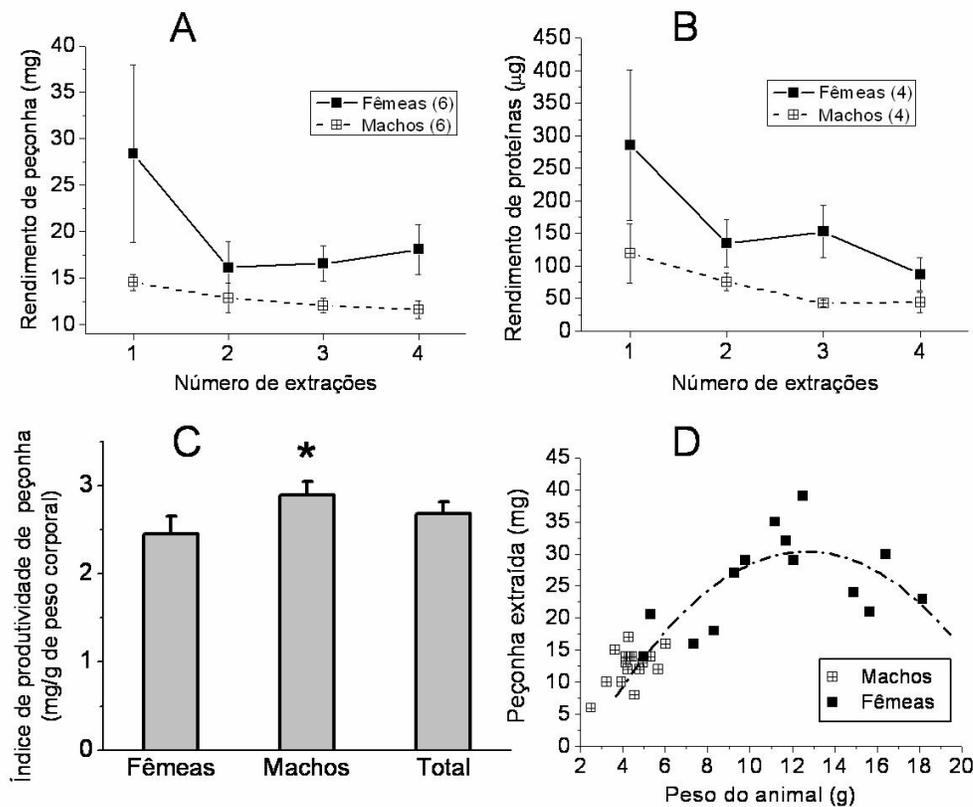


Figura 19 – Rendimento de peçonha de *V. dubius*. (A) Rendimento de peçonha (peso seco) em quatro extrações mensais consecutivas (número de indivíduos entre parênteses). (B) Rendimento de proteínas. (C) Índice de produtividade de peçonha (rendimento corrigido pelo peso corporal). Os machos forneceram significativamente mais peçonha que as fêmeas, por grama de peso corporal (teste *t* de Student, $p < 0.05$, $n = 14$ fêmeas e 16 machos). (D) Relação entre peso da aranha (g) e rendimento de peçonha. Note a tendência de fêmeas adultas acima de 14 g em fornecerem menos peçonha.

De maneira geral, a peçonha de *V. dubius* apresentou concentração protéica de $18 \pm 2,4$ mg/mL, com um rendimento de $16,7 \pm 4,7\%$ de peso seco em relação ao peso total. A peçonha seca possui $27 \pm 3\%$ de proteína.

ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA

A eletroforese em gel de acrilamida revelou um padrão para a peçonha de *V. dubius* que incluiu diversas bandas (figura 20). Em gel de 15%, as bandas principais foram divididas dois grupos de acordo com a massa molecular. Uma é observável em 100 kDa e outras duas ao redor de 45 kDa. Outras bandas menos evidentes são notáveis, no entanto, o maior destaque para o padrão desta peçonha é a grande quantidade de compostos abaixo de 15 kDa. São dois grandes arrastos de peptídeos, um entre 6 e 12 kDa e outra abaixo de 6 kDa.

ATIVIDADES ENZIMÁTICAS

A atividade proteolítica geral, avaliada usando caseína como substrato, não foi observada na peçonha de *V. dubius*, até a concentração final de 1 mg/mL. No entanto, os registros desta atividade (em 280 nm) evidenciaram uma curva dose-resposta que, se atribuída à atividade enzimática, seria superior à da serpente *B. jararaca* utilizada como controle positivo, o que levantou a hipótese de um artefato. A provável presença de uma grande quantidade de componentes de baixo peso molecular na peçonha, como ATP, purinas e pequenos peptídeos, que não precipitam na presença do ácido trifluoroacético mas que absorvem neste comprimento de onda, contribuiria para este fenômeno, sendo necessário um controle sem substrato para subtrair da amostra com substrato. Após a execução deste controle, foi verificada a ausência de atividade caseinolítica na peçonha de *V. dubius*. Da mesma forma, não foram encontradas atividades elastásica e colagenásica significativas.

A atividade da enzima hialuronidase foi avaliada, obtendo-se 275 ± 24 unidades de turbidez por mg de proteína em peçonha líquida (figura 21). Após a liofilização, houve uma diminuição de aproximadamente três vezes na potência desta atividade. A zimografia utilizando ácido hialurônico como substrato revelou a massa molecular da enzima em torno de 45 kDa (figura 21).

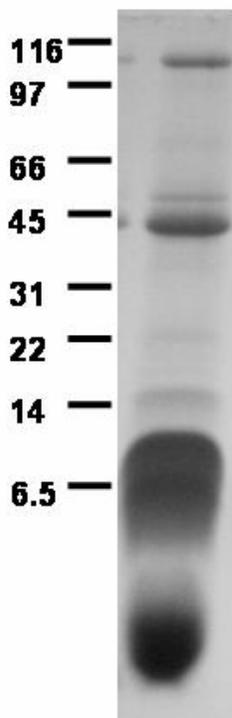


Figura 20 – SDS-PAGE da peçonha de *V. dubius* (100 μ g) em um gel de 15% corado com azul brilhante de coomassie. Note as poucas bandas de maior peso molecular e a grande quantidade de compostos de baixo peso.

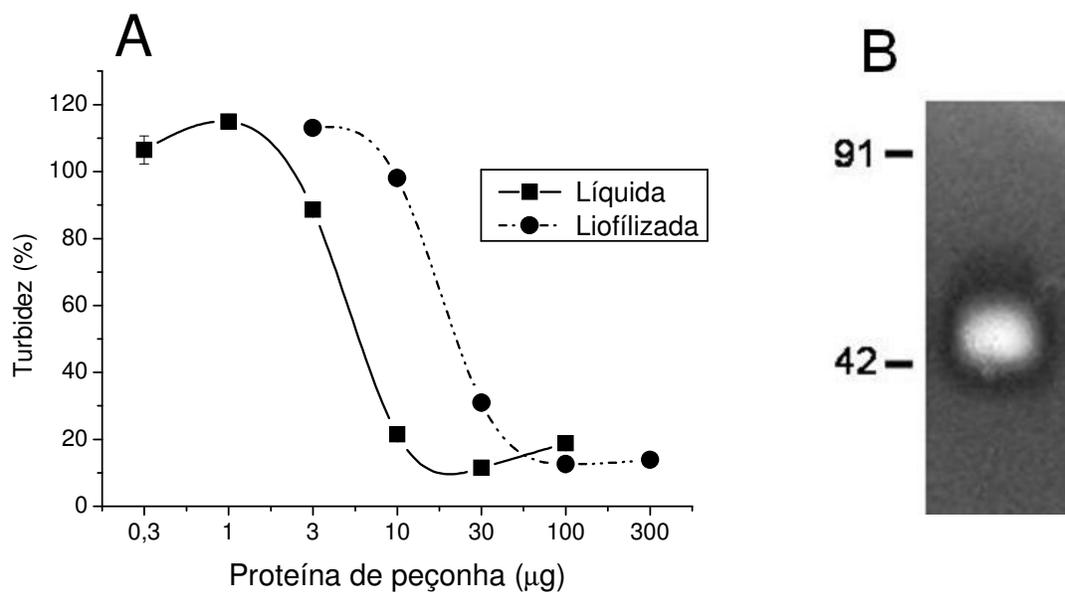


Figura 21 – Hialuronidase em peçonha de *V. dubius*. (A) Curva concentração-resposta da atividade hialuronidásica de peçonha de *V. dubius*, demonstrando perda de atividade da peçonha após liofilização. Os pontos representam a média \pm E.P.M. de 4 determinações cada. As barras de desvio são freqüentemente menores que os símbolos. (B) Zimograma da atividade hialuronidásica após SDS-PAGE em um gel de poliacrilamida a 12%, revelando a massa molecular da hialuronidase de *V. dubius* em torno de 45 kDa. Foram aplicados 30 μ g de peçonha.

CARACTERIZAÇÃO IMUNOLÓGICA

A caracterização imunológica da peçonha teve início com a padronização do método de ELISA indireto. Utilizamos como anticorpos primários imunoglobulinas purificadas do soro antiaracnídico do Instituto Butantan. Este soro é preparado através da imunização de cavalos com peçonhas das aranhas *Loxosceles* sp., *Phoneutria nigriventer* e do escorpião *Tityus serrulatus*. Como controle, padronizamos a técnica para as peçonhas de *P. nigriventer* e *Tityus serrulatus*.

O resultado indicou reatividade cruzada da peçonha de *V. dubius* com as imunoglobulinas do soro. A figura 22 mostra a imunorreatividade das peçonhas de *V. dubius*, *P. nigriventer* e *T. serrulatus* com as IgGs purificadas. Note que para detecção adequada da peçonha de *V. dubius* foi necessária uma concentração de IgGs três vezes maior que aquela usada para as outras peçonhas. A reação com a peçonha de escorpião foi maior que com as outras peçonhas. Embora a absorbância máxima obtida com a *P. nigriventer* fosse maior que a de *V. dubius*, esta última foi detectada melhor em concentrações menores.

O ELISA tem a limitação de mostrar apenas a imunorreatividade total da peçonha. Para avaliar quais os componentes da peçonha que estão envolvidas nesta reatividade, foram realizados experimentos de western blotting. Conforme mostra a figura 23, as IgGs de soro antiaracnídico interagiram apenas com componentes da peçonha de *V. dubius* acima de 30 kDa. Já em relação às peçonhas de *P. nigriventer* e *T. serrulatus*, houve também reatividade com algumas proteínas de massa molecular menor, especialmente com a peçonha de *T. serrulatus*.

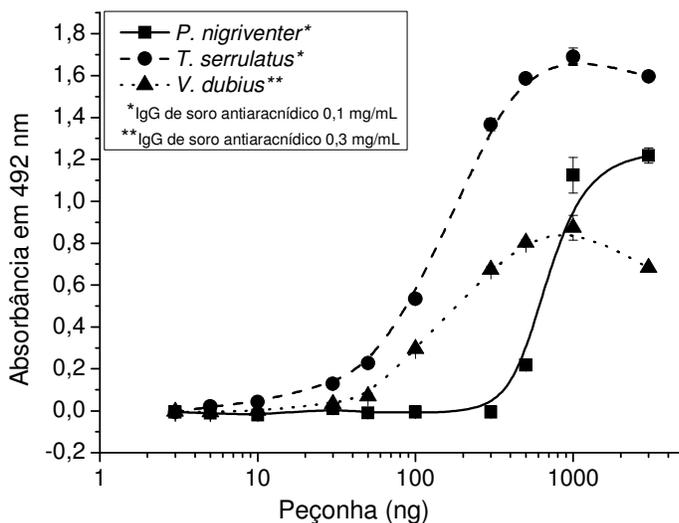


Figura 22 – ELISA das peçonhas de *V. dubius*, *P. nigriventer* e *T. serrulatus*, mostrando maior afinidade das IgGs de soro antiaracnídico do Instituto Butantan pela peçonha de *T. serrulatus*. Note que foi usada uma concentração maior de IgGs para detectar a peçonha de *V. dubius* (0,3 mg/mL) quando comparada àquela usada para as de *P. nigriventer* e *T. serrulatus* (0,1 mg/mL). Os pontos são a média ± E.P.M. de 3 determinações.

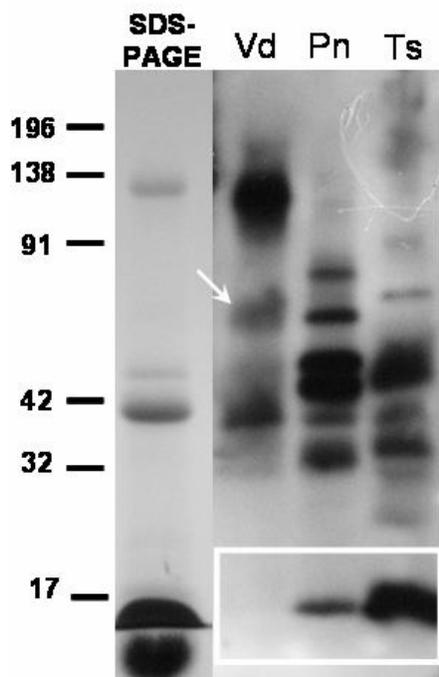


Figura 23 – Immunoblotting em gel de acrilamida 10% das peçonhas de *V. dubius* (Vd, 1 µg), *P. nigriventer* (Pn, 1 µg) e *T. serrulatus* (Ts, 0,5 µg), utilizando imunoglobulinas de soro antiaracnídico do Instituto Butantan como anticorpo primário. Note a presença de um composto de aproximadamente 65 kDa (seta) evidente no immunoblotting mas não na eletroforese (SDS-PAGE). Em destaque (retângulo branco) a região de baixa massa molecular evidenciando a reação das imunoglobulinas com peçonhas de *P. nigriventer* e *T. serrulatus*, mas não com *V. dubius*. Eletroforese (SDS-PAGE) de 100 µg de peçonha de *V. dubius* corado com azul brilhante de Coomassie.

ATIVIDADES BIOLÓGICAS

Ação hemolítica da peçonha

Os testes de hemólise indicaram que a peçonha de *V. dubius* não possui atividade hemolítica em hemácias de ratos. A figura 24 apresenta os resultados, juntamente com uma curva de hemólise obtida com peçonha de vespa, usada como controle positivo.

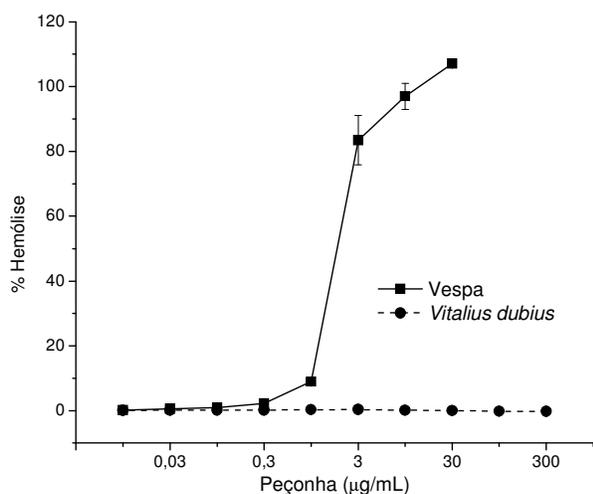


Figura 24 – Curva dose-resposta de atividade hemolítica. A peçonha da vespa *Polistes lanio lanio* foi utilizada como controle positivo. Note a ausência desta atividade na peçonha de *V. dubius*. Os pontos representam a média ± E.P.M. As barras de desvio são freqüentemente menores que os símbolos.

Citotoxicidade da peçonha

A ação citotóxica da peçonha de aranhas tem sido pouco estudada. Neste trabalho, investigamos o efeito da peçonha de *V. dubius* sobre a viabilidade celular utilizando o método MTT em duas linhagens de células leucêmicas. Para comparação, utilizamos citarabina, um fármaco citotóxico de ação conhecida (figura 25).

Os resultados demonstram diferentes efeitos da peçonha de acordo com o tipo celular. Na linhagem Nalm-6, mais sensível a quimioterápicos, as menores concentrações de peçonha se mostraram ineficientes ou citostáticas apenas, atingindo citotoxicidade apenas na maior concentração (300 µg/mL). Enquanto isso, a citarabina apresentou citotoxicidade a partir da menor concentração.

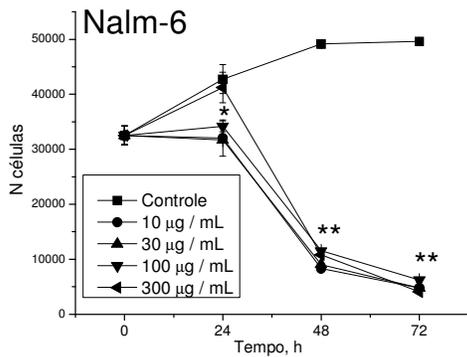
Na cultura da linhagem K562, mais resistente a quimioterápicos, enquanto as diferentes doses de citarabina mantiveram a cultura sob citostase, a peçonha de *V. dubius* demonstrou atividade citostática nas menores concentrações e atingiu o limiar de citotoxicidade nas duas maiores concentrações. Em todos os experimentos, as concentrações de peçonha e citarabina foi a mesma na relação massa:volume.

Ação local da peçonha

A figura 26 mostra que a peçonha de *V. dubius* produz edema de pele dose-dependente. Para investigar os mecanismos pelo(s) qual(is) a peçonha aumenta a permeabilidade vascular, ratos foram pré-tratados com mepiramina (0,6 mg/kg de peso corporal, i.p.), um bloqueador de receptores histaminérgicos tipo H₁. A estes receptores são comumente envolvidos em alterações de permeabilidade vascular.

A figura 27A mostra que o pré-tratamento com mepiramina não alterou o edema causado pela peçonha de *V. dubius*, indicando que receptores H₁ não estão envolvidos neste aumento de permeabilidade vascular.

Células cultivadas com citarabina



Células cultivadas com peçonha

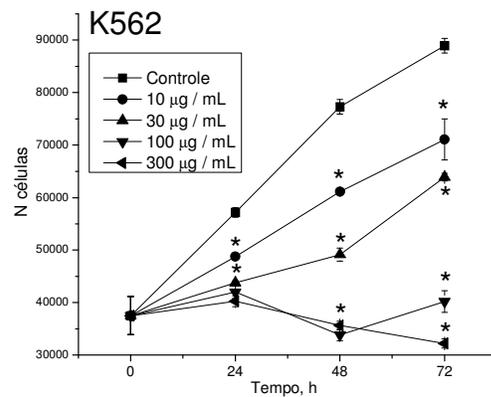
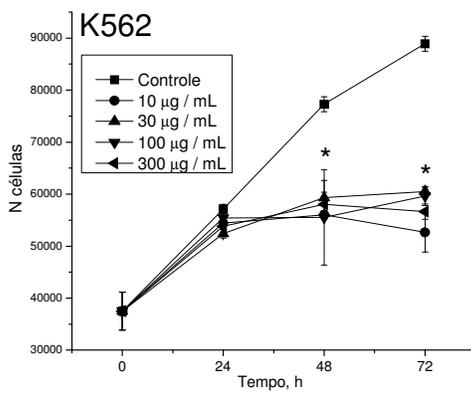
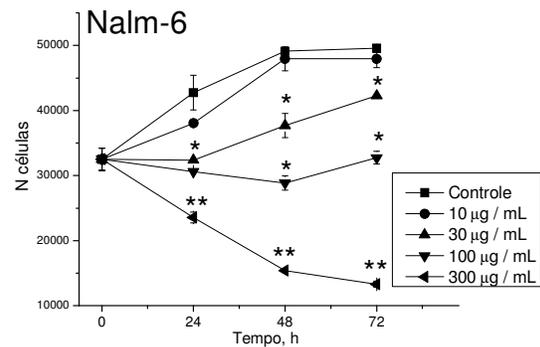


Figura 25 – Pannel de efeitos da citarabina (esquerda) e da peçonha de *V. dubius* (direita) em culturas de linhagens de células leucêmicas. Em células Nalm-6, a peçonha foi citostática nas concentrações de 30 e 100 µg/µL, e citotóxica em 300 µg/µL. Já em células K562, foi citostática com 10 e 30 µg/µL, e pouco citotóxica com 100 e 300 µg/µL. O símbolos indicam $p < 0,05$ em relação ao controle (*) ou ao tempo inicial (**), indicando citostase e citotoxicidade, respectivamente. Os pontos representam a média \pm E.P.M (n = 3). As barras de desvio são freqüentemente menores que os símbolos.

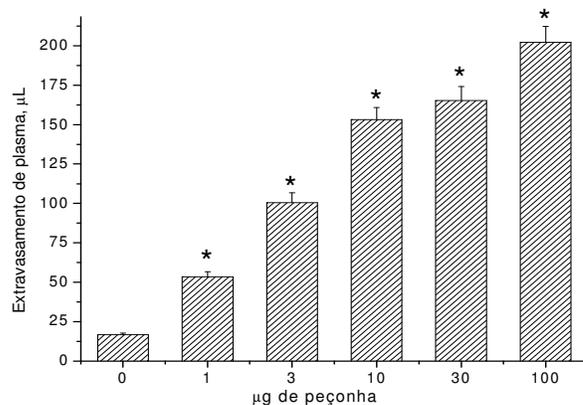


Figura 26 – Curva dose-resposta do edema causado pela peçonha de *V. dubius*. As colunas representam a média ± E.P.M., n = 6. *p < 0,05 comparado ao controle.

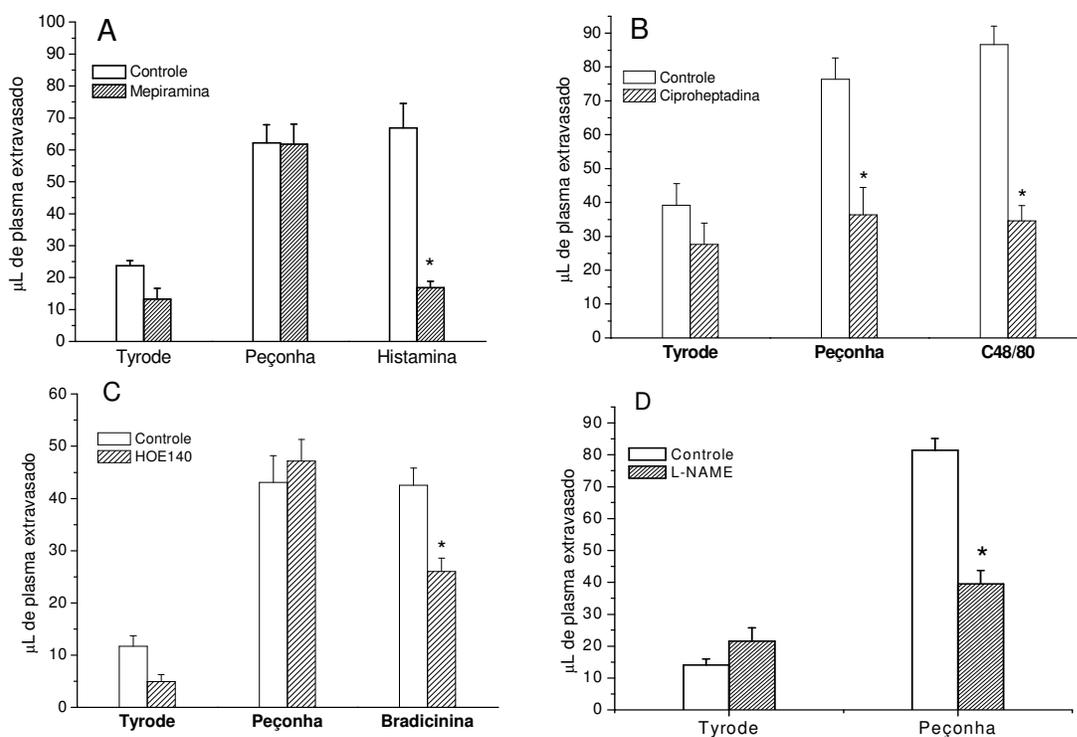


Figura 27 – Caracterização do edema de pele causada pela peçonha de *V. dubius* (10 µg) em ratos. (A) Ausência de efeito da mepiramina (antagonista de receptores H₁; 0,6 mg/kg, i.p.) no edema. (B) Inibição do edema na presença de ciproheptadina (antagonista de receptores H₁ e 5HT₂; 2 mg/kg, i.p.). (C) Ausência de efeito do HOE-140 (antagonista de receptores B₂ de bradicinina, 0,6 mg/kg, i.v.) em diminuir a ação da peçonha. (D) Redução do edema causado pela peçonha após a co-injeção de L-NAME (100 nmol/sítio). Estes resultados indicam a participação da serotonina e do óxido nítrico, mas não da histamina e da bradicinina, no edema produzido pela peçonha. As colunas representam a média±E.P.M. de 6 ratos. *p<0,05 em ANOVA e teste de Tukey.

No entanto, este experimento não poderia descartar a ação de outras aminas como, por exemplo, serotonina. Para investigar esta possibilidade, os ratos foram pré-tratados com ciproheptadina, um duplo bloqueador de receptores H₁ (histamina, assim como mepiramina) e 5-HT₂ de serotonina. Este tratamento aboliu o edema causado pela peçonha, com nível de edema semelhante àquele visto nos sítios injetados com veículo (controle; solução de Tyrode) (figura 27B). Como o experimento anterior com mepiramina já havia descartado a participação dos receptores H₁, concluímos que há um papel importante dos receptores serotoninérgicos na permeabilidade vascular provocada pela peçonha de *V. dubius*.

Os resultados apresentados anteriormente em íleo isolado de cobaio sugeriram uma possível influência da peçonha sobre as curvas de bradicinina, o que nos levou a investigar o envolvimento deste peptídeo no aumento de permeabilidade vascular também. Conforme mostrado na figura 27C, o pré-tratamento com HOE-140, um inibidor de receptores B₂ de bradicinina, não alterou o edema causado pela peçonha quando comparado aos ratos não tratados, indicando o não-envolvimento da bradicinina nesta resposta.

Para investigar o papel do óxido nítrico no edema, foi co-injetado L-NAME, um inibidor da óxido nítrico sintase, junto com a peçonha. Este tratamento reduziu o edema em mais de 50% (figura 27D), sugerindo um papel importante para o óxido nítrico nesta resposta biológica.

A figura 28 mostra que o edema causado pela peçonha de *V. dubius* não foi neutralizado pelo soro antiaracnídico do Instituto Butantan, ao contrário da neutralização completa vista com as peçonhas de *P. nigriventer* e *T. serrulatus*.

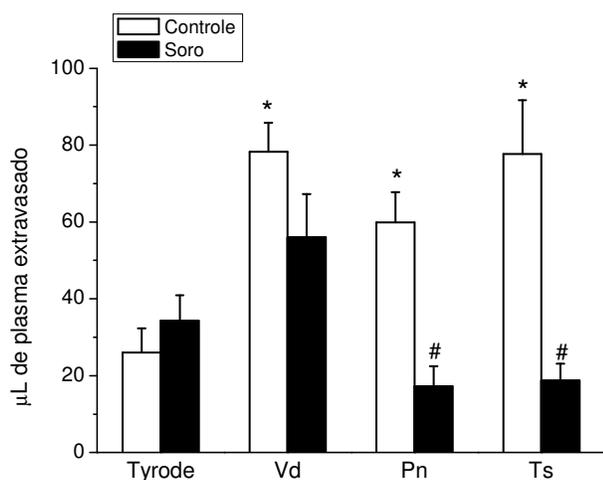


Figura 28 – Neutralização do edema de pele em ratos tratados com as peçonhas de *V. dubius* (Vd, 10 µg), *P. nigriventer* (Pn, 5 µg) e *T. serrulatus* (Ts, 10 µg). As peçonhas foram pré-incubadas (1 hora a 37°C) com IgGs isoladas do soro antiaracnídico do Instituto Butantan antes de serem testadas em ratos. Note que não houve neutralização do edema causado por *V. dubius*. As colunas representam a média \pm E.P.M. de 6 ratos. p < 0,05 comparado ao Tyrode (*) e ao respectivo controle (#, peçonha sozinha).

Ação sobre músculo liso

A atividade da peçonha de *V. dubius* sobre musculatura lisa foi testada em dois tecidos diferentes. Em íleo de cobaio isolado, a administração de peçonha em concentrações até 100 µg/mL não provocou contração. Com isso, concluímos a ausência de agonistas com atividade contrátil nesta preparação. Isto nos levou a testar uma possível interferência na ação de agonistas, como acetilcolina, bradicinina e serotonina. Para isto, após a estabilização do tecido no banho, realizamos uma ou duas curvas dose-resposta com o agonista a ser estudado. Após lavagem e um intervalo de 20 minutos para estabilização, incubamos o tecido com 50 µg de peçonha/mL por 30 minutos antes da obtenção das novas curvas dose-resposta dos agonistas. Estas eram comparadas com as primeiras, em termos de porcentagem da contração máxima. Não foi possível obter curvas dose-resposta reproduzíveis com histamina.

Os resultados (figura 29) mostram que a peçonha de *V. dubius* não influenciou significativamente nas curvas dose-resposta de contração para os agonistas acetilcolina, bradicinina e serotonina. No entanto, houve potencialização da resposta contrátil à bradicinina. Apesar da diferença não ter sido estatisticamente significativa em relação à bradicinina sozinha, a potencialização foi vista na maioria dos experimentos.

Um leve relaxamento foi observado após a aplicação de peçonha nos testes acima, sugerindo uma possível atividade relaxadora em musculatura lisa pré-contraída. Para investigarmos esta ação, foi necessária uma preparação que mantivesse pré-contração estável por pelo menos 20 minutos, o que não foi possível em íleo de cobaio. Para tanto, recorremos à preparação de músculo anococcígeo de ratos.

Apesar de não observar relaxamento do músculo anococcígeo pré-contraído com fenilefrina, obtivemos resultados quando testamos a influência da peçonha em preparações eletroestimuladas. A figura 30 mostra as curvas de contração por eletroestímulo da preparação, com frequências (Hz) crescentes. A peçonha de *V. dubius* bloqueou parcialmente a contração, com recuperação parcial da contratilidade após lavagem na maior frequência de estímulo. A recuperação da contratilidade após a lavagem da preparação indica que a toxina responsável pelo bloqueio não se liga covalentemente ao sítio de ação.

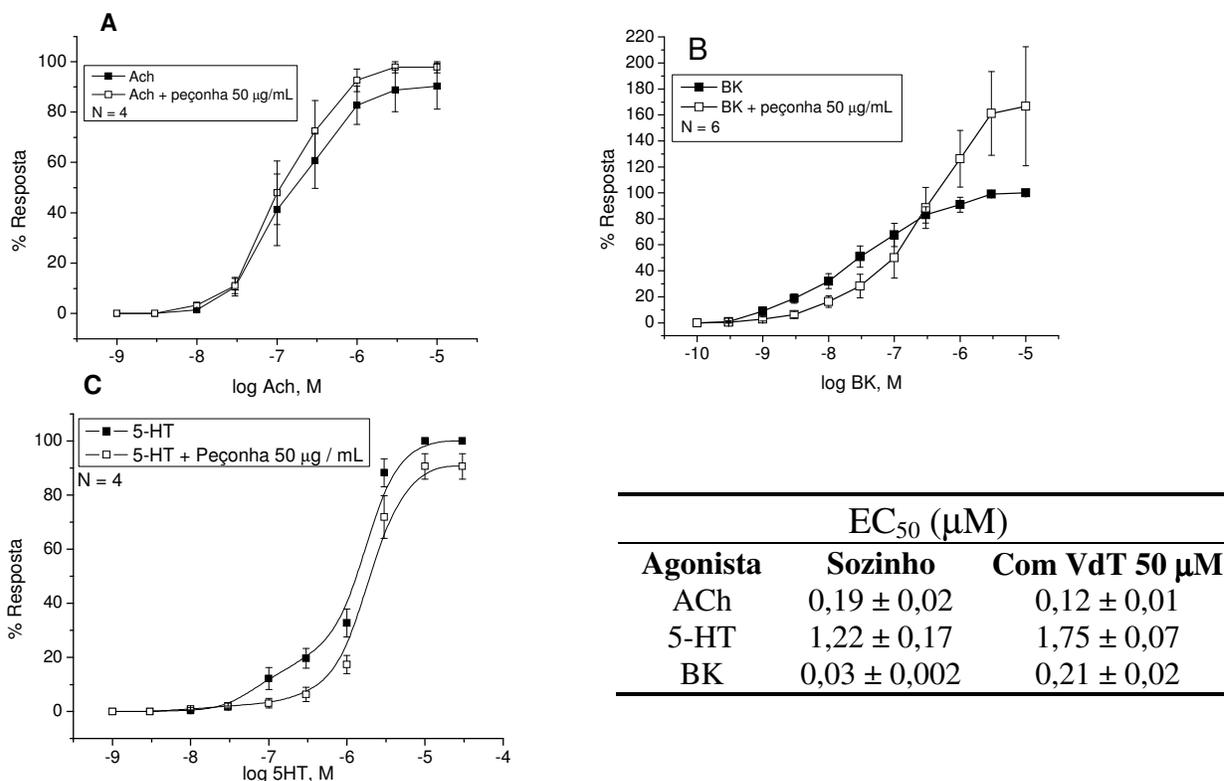


Figura 29 – Curvas de concentração-resposta para alguns agonistas em íleo de cobaio. A peçonha de *V. dubius* não alterou significativamente as curvas dose-resposta de contração da acetilcolina (ACh) (A), bradicinina (BK) (B) e serotonina (5-HT) (C). A tabela mostra os dados de EC₅₀ calculados para cada agonista sozinho e após incubação com a peçonha. Os pontos representam a média ± E.P.M. As barras de desvio são freqüentemente menores que os símbolos.

Em seguida, buscamos elucidar o local de ação desta toxina, ou seja, se atua pré-, ou pós-sinápticamente, ou na própria sinapse. Para avaliar se a ação seria pós-sináptica, investigamos curvas de contração obtidas com fenilefrina, um agonista pós-sináptico, onde não constatamos alteração significativa na presença da maior concentração de peçonha (figura 31A). Da mesma forma, a pequena alteração na contração induzida por tiramina (10 µM), um promotor de liberação de norepinefrina em nível vesicular sináptico, não foi considerada como suficiente para estar relacionada ao efeito da peçonha (figura 31B). Estas observações sugerem que o sítio de ação da peçonha seja pré-sináptico, porém em um sítio diferente das vias envolvidas na ação da tiramina (possivelmente através de canais iônicos).

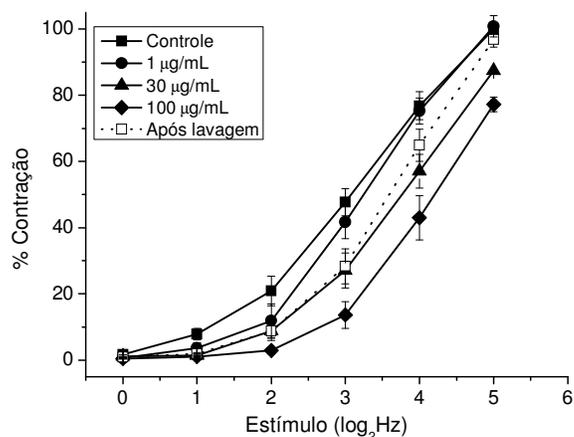


Figura 30 – Inibição pela peçonha de *V. dubius* da curva de contração de músculo anococcígeo de rato obtida por eletroestimulação. Note que a inibição foi concentração-dependente e que, na maior concentração, foi parcialmente revertida por lavagem da preparação. Os pontos são a média±E.P.M. de 4 determinações.

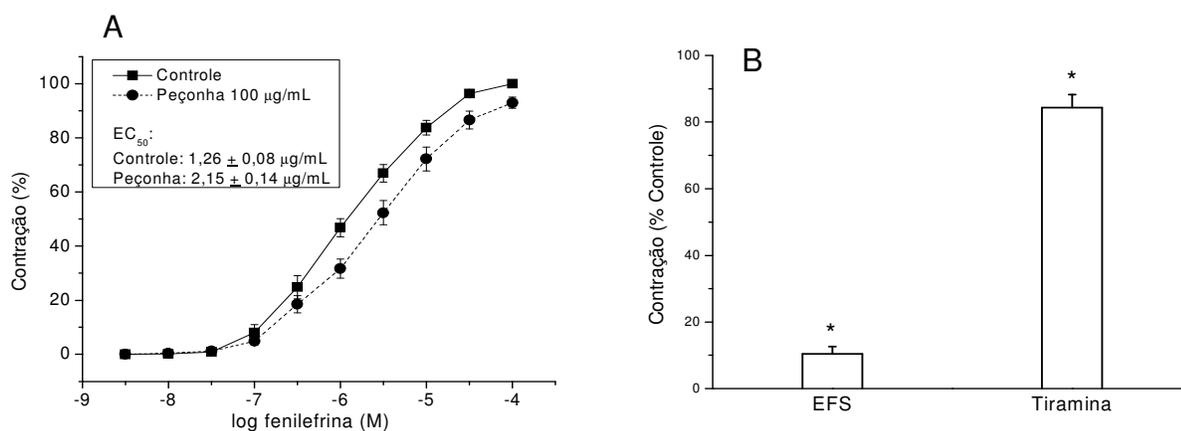


Figura 31 – Caracterização do sítio de ação da peçonha em músculo anococcígeo de rato. (A) Contração de músculo anococcígeo em resposta à fenilefrina (agonista de receptores pós-sinápticos). (B) Contração de músculo anococcígeo em resposta a tiramina (precursor de norepinefrina que estimula a liberação sináptica deste neurotransmissor), com estímulo elétrico (EFS) como controle no mesmo tecido, anterior à aplicação de tiramina. A peçonha não afetou significativamente as respostas a estes dois agonistas. Os pontos e colunas são a média ± E.P.M. de 4 determinações. * $p < 0,05$ para teste *t* de Student, em relação ao controle (100%), $n = 4$.

Cardiotoxicidade em coração semi-isolado de barata

A peçonha de *V. dubius* não possui efeito proeminente em nesta preparação. Com 60 µg, o efeito foi negligível. Na dose de 100 µg, o efeito foi mais marcante e reversível (figura 32). Considerando a dose a alta necessária para esta preparação e a quantidade limitada de peçonha, resolvemos por não dar continuidade aos estudos desta preparação.

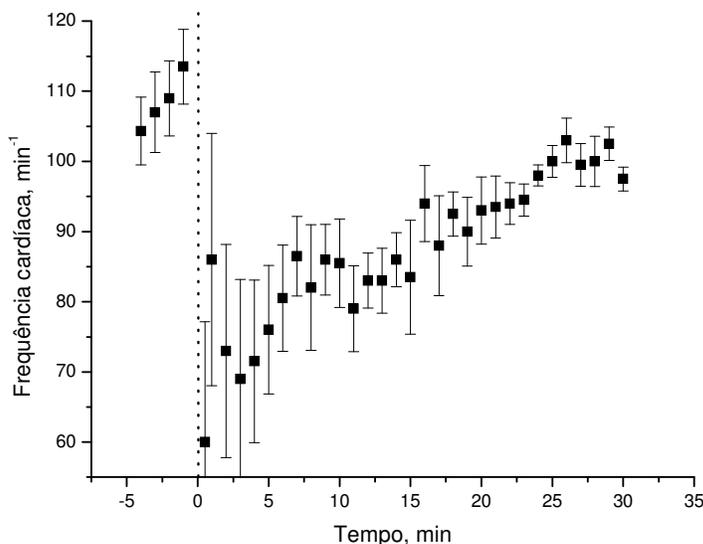


Figura 32 – Caracterização do sítio de ação da peçonha em músculo anococcígeo de rato. Uma queda inicial na frequência cardíaca é observada, sendo reversível após aproximadamente 30 minutos. Os pontos são a média \pm E.P.M. de 4 experimentos.

Junção neuromuscular

A peçonha de *V. dubius* ($80 \mu\text{g/ml}$) de bloqueou em $95 \pm 6\%$ da contratilidade na preparação nervo frênico-diafragma de camundongo, em 56 ± 28 minutos ($n = 3$). Este efeito abre novas possibilidades de investigações em toxinas na peçonha de *V. dubius*. A figura 33 mostra um registro obtido nesta preparação.

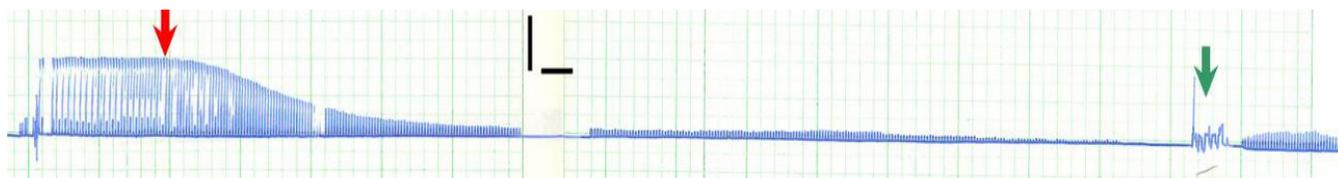


Figura 33 – Bloqueio neuromuscular causado pela peçonha de *V. dubius* ($80 \mu\text{g/mL}$) em preparação nervo frênico-diafragma de camundongo. Barras: horizontal = 10 minutos, vertical = 3 mN. Setas: vermelha = aplicação da peçonha, verde = lavagem da preparação.

Em biventer cervicis de pintainho a peçonha se mostrou mais ativa (ver abaixo), o que resultou em economia da peçonha pois esta última preparação requer menos peçonha devido ao tamanho menor da cuba de órgão isolado usado e a sensibilidade do tecido. Além disso, a

possibilidade de extrair duas preparações por pintainho comparado com apenas uma em camundongos permite a realização de maior número de experimentos por animal.

Na concentração de 50 µg/mL, a peçonha de *V. dubius* promoveu bloqueio total da resposta contrátil do biventer cervicis, com 50% atingido após 7 ± 2 minutos ($n = 4$), e também causou marcada contratura do músculo biventer; na concentração de 25 µg/mL, o bloqueio máximo foi de $85 \pm 4\%$, com 50% atingido em 13 ± 3 minutos ($n = 4$), e contratura menor. Já com a concentração de 10 µg/mL o bloqueio foi de 50% com, no entanto, baixa contratura. Estes efeitos foram parcialmente revertidos após a lavagem da preparação (figura 34A,B). A incubação com a peçonha reduziu as respostas contráteis ao KCl (20 mM) e à acetilcolina (ACh, 110 µM) exógenos em $35 \pm 11\%$ e $50 \pm 3\%$ ($n = 4$), respectivamente, na concentração de 50 µg/mL (figura 34C).

Estes resultados indicam que a peçonha causa bloqueio reversível na preparação biventer cervicis de pintainho. A atenuação das respostas ao KCl e ACh exógenos indica uma possível ação pós-sináptica envolvendo o músculo (bloqueio de receptores e/ou lesão das fibras musculares).

FRACIONAMENTO DA PEÇONHA POR CROMATOGRAFIA DE FASE REVERSA

O fracionamento da peçonha de *V. dubius* resultou em três principais frações ou grupos de moléculas, onde três picos foram reunidos no primeiro grupo (G1), um pico com “ombro” no segundo (G2) e dois picos no terceiro (G3). A figura 35 mostra o cromatograma para a peçonha total de *V. dubius* (mistura de machos e fêmeas).

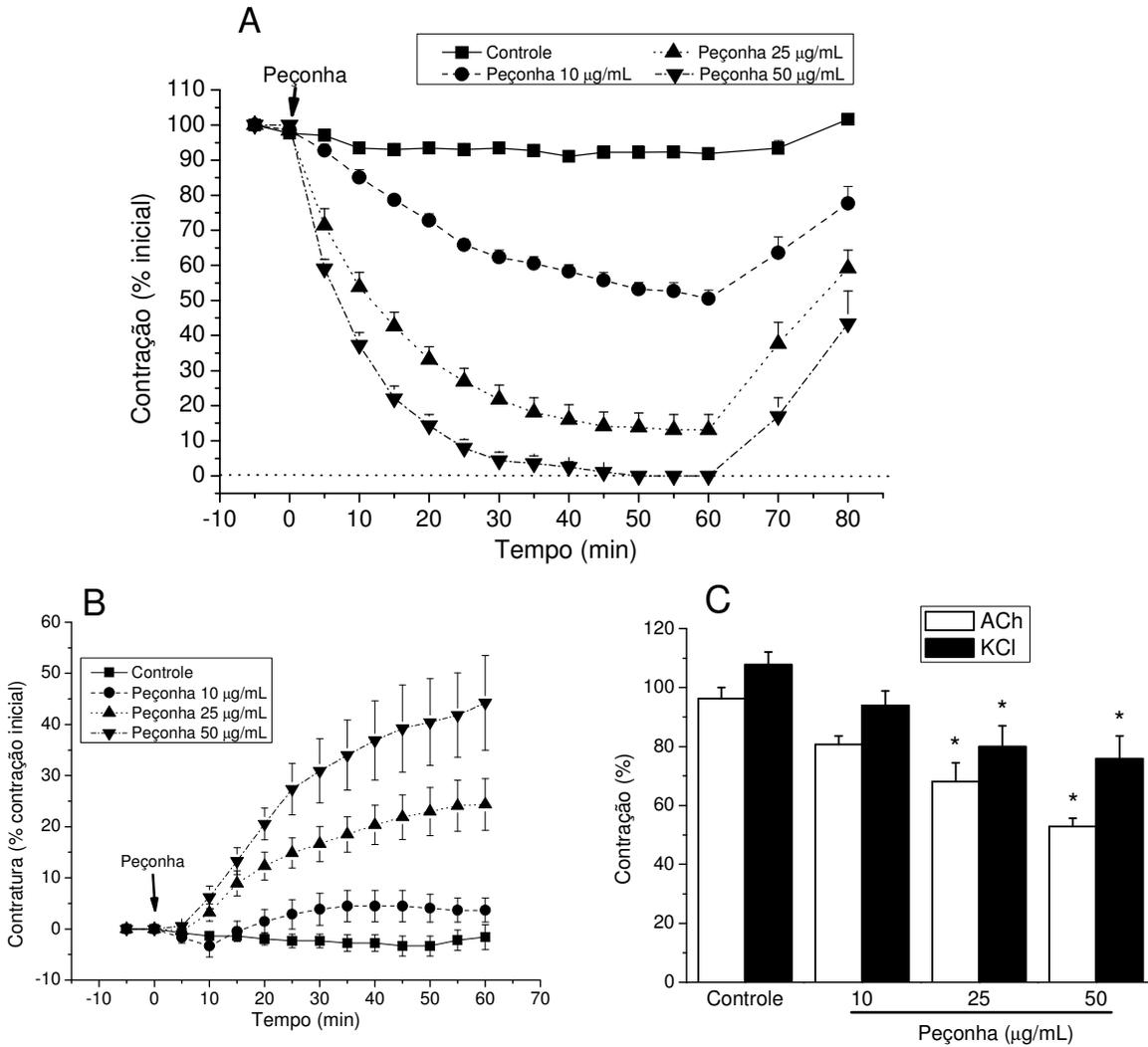


Figura 34 – Bloqueio neuromuscular produzido pela peçonha de *V. dubius* na preparação de biventer cervicis de pintainho. (A) Bloqueio da contração eletroestimulada. A linha tracejada após 60 min indica a reversão do bloqueio após lavagem das preparações. (B) Contratura causada pela peçonha. (C) Bloqueio das contraturas produzidas pela aplicação de acetilcolina (ACh, 110 µM) e KCl (20 mM) exógenos. Os pontos e as colunas representam a média ± E.P.M. de 4 experimentos. * $p < 0,05$ comparado com o controle (ANOVA e teste de Tuckey).

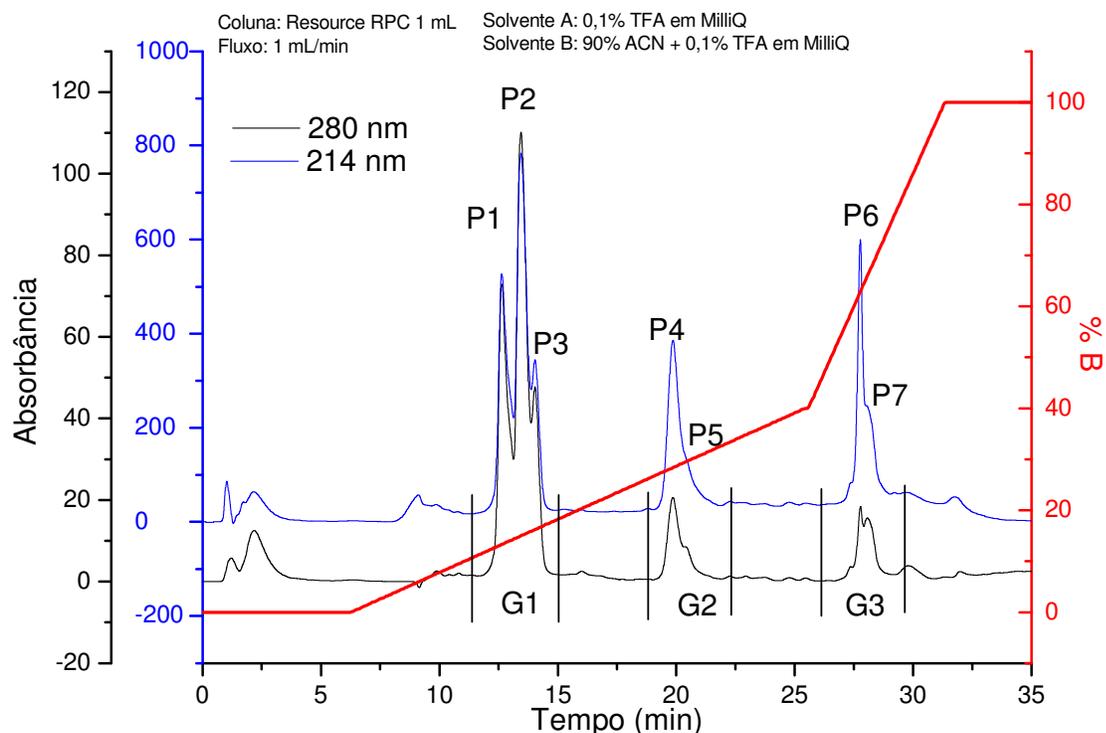


Figura 35 – Perfil de eluição de peçonha de *V. dubius* (100 µg) após cromatografia de fase reversa. O fracionamento resultou em 7 picos (P1 a P7) principais divididos em três grupos (G1 a G3).

IDENTIFICAÇÃO DAS FRAÇÕES ATIVAS DA PEÇONHA

A primeira etapa do fracionamento da peçonha de *V. dubius* consistiu em uma cromatografia com 2 mg de peçonha liofilizada (diluída no tampão de equilíbrio). Esta cromatografia resultou em três grupos de picos (G1, G2 e G3) (figura 35). Para os testes das atividades biológicas, as quantidades de frações foram normalizadas de acordo com a dosagem de proteínas da peçonha total.

Permeabilidade vascular

A figura 36 mostra a atividade edematogênica das frações da peçonha de *V. dubius*. A fração que demonstrou maior atividade foi G1, seguida por G2. Ao contrário, a fração G3 não aumentou a permeabilidade vascular. Este resultado sugere a presença de pelo menos duas toxinas edematogênicas na peçonha. No entanto, só poderemos inferir sobre a potência das mesmas após um maior grau de purificação.

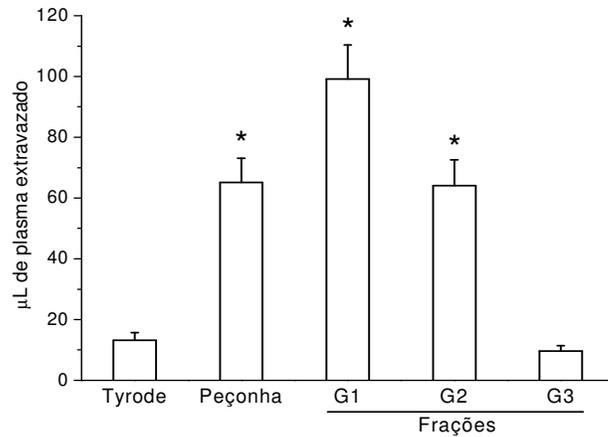


Figura 36 – Atividade edematogênica das frações da peçonha de *V. dubius*. As frações G1 e G2 mostraram-se ativas, indicando a presença de ao menos duas toxinas edematogênicas. Para todas as frações foram aplicados 15 µg de proteína/sítio. As colunas representam a média ± E.P.M. de 6 ratos. * $p < 0,05$ comparado com a solução de tyrode (ANOVA e teste de Tukey).

Junção neuromuscular

O músculo biventer cervicis de pintainho foi usado para identificar as frações ativas na junção neuromuscular. As três frações e a peçonha foram testadas na concentração de 15 µg de proteína/mL. Assim como no ensaio de permeabilidade vascular, as frações G1 e G2 foram ativas e a fração G3 não apresentou atividade bloqueadora. No entanto, houve uma distribuição distinta das atividades entre as duas primeiras frações. Enquanto a fração G1 bloqueiou parcialmente a contração eletroestimulada, promovendo uma ação rápida, sem ocorrência de contratura, a fração G2, além de promover o bloqueio, causou contratura muscular acentuada (figura 37A,B). O bloqueio da contração eletroestimulada, quando comparado com a peçonha total, não indica a ocorrência de sinergismo das frações G1 e G2, mas sim uma soma dos efeitos..

Além disso, outro parâmetro revelou diferenças entre as frações: a influência nas contrações causadas por ACh e KCl. Enquanto a fração G3, não apresentou diferenças significativas em relação ao controle, observamos ações diferenciadas das frações G1 e G2 (figura 37C): a primeira diminuiu a contração pela ACh e não pelo KCl enquanto a segunda causou diminuição significativa para ambos.

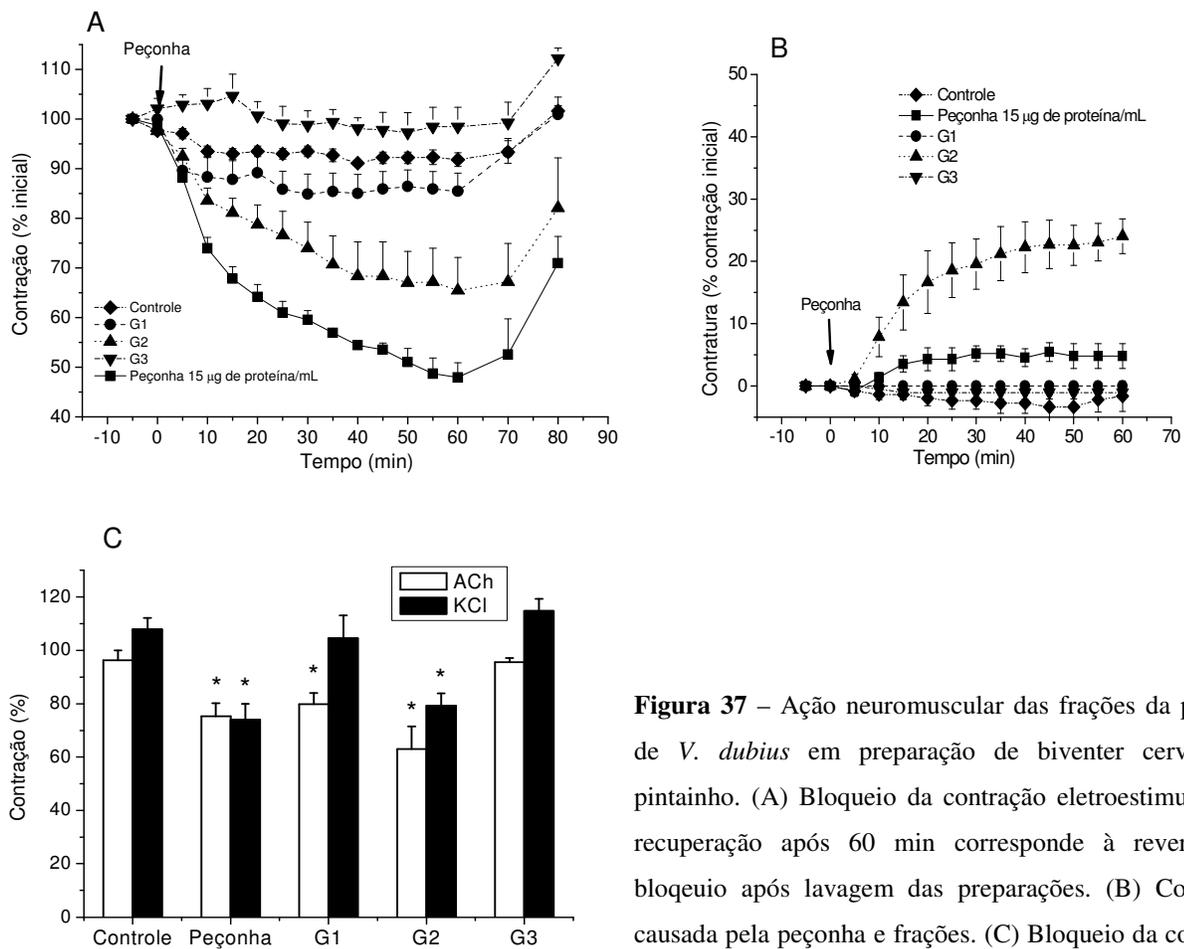


Figura 37 – Ação neuromuscular das frações da peçonha de *V. dubius* em preparação de biventer cervicis de pintainho. (A) Bloqueio da contração eletroestimulada. A recuperação após 60 min corresponde à reversão do bloqueio após lavagem das preparações. (B) Contratura causada pela peçonha e frações. (C) Bloqueio da contração causada por ACh (110 µM) e KCl (20 mM). Estes

resultados mostram diferentes ações das frações, onde G1 e G2 são responsáveis pelos efeitos observados na peçonha, sendo a primeira pelo bloqueio parcial de eletroestímulo e ACh, e a segunda por bloqueio parcial de eletroestímulo, ACh e KCl, além de preponderante contratura. Os pontos e as colunas representam a média±E.P.M. de 4 experimentos. * p < 0,05 comparado aos valores no início do experimento (ANOVA e teste de Tuckey).

DISCUSSÃO

GLÂNDULA E APARATO VENENÍFERO

Conforme demonstrado em nossos resultados, a quelícera consiste em uma estrutura de suporte para o ferrão e abrigo para a glândula. De fato, na quelícera encontram-se, além da glândula, várias estruturas constituídas de quitina e toda a musculatura necessária para o movimento da quelícera, ferrão e a compressão da glândula. A diversificada dieta de aranhas caranguejeiras, que pode variar de insetos a pequenos mamíferos (Foelix, 1982), requer mecanismos eficientes de captura e imobilização destas presas. Esta imobilização pode ser facilitada pelas saliências pontiagudas em forma de “dentes”, encontradas na face ventral externa do ferrão (figura 7B) que, com seu formato e orientação ao plano de corte, atuam como um arcabouço prênscil. Em *V. dubius* este aparato se apresenta bastante robusto, principalmente em relação a espécies araneomorfas. Enquanto o ferrão da espécie aqui estudada possui quase 1 cm de comprimento, com os dentes quelicerais chegando a 0,7 mm, Çavusoglu *et al.* (2004, 2005) e Yigit *et al.* (2004) descreveram ferrões de 1,5 a 2 mm e dentes quelicerais de 0,1 a 0,2 mm em *Larinioides cornutus*, *Allopecosa fabilis* e *Agelena labyrinthica*, todas araneomorfas de três diferentes famílias.

A glândula venenífera de *V. dubius* apresentou uma organização similar à de outras aranhas (Russell *et al.*, 1973; Santos *et al.*, 2000; Yigit e Guven, 2006), com musculatura revestindo-a externamente glândula, separada do epitélio secretor por uma membrana basal rica em colágeno e elastina. A presença de dobras na membrana basal talvez tenha a função de permitir aumento do volume da glândula quando cheia de peçonha. Russell *et al.* (1973) descreveram “uma grossa camada muscular” em torno do epitélio da glândula de duas espécies de caranguejeiras (*Aphonopelma* sp. e *Dugesiella echina*), e Santos *et al.* (2000) encontraram dupla camada muscular ao longo de toda a glândula de *Loxosceles intermedia*. Em *V. dubius*, foi observada uma monocamada oblíqua na porção distal e a bicamada helicoidal entrelaçada na porção proximal. Esta conformação parece estar otimizada para a extrusão da peçonha, considerando a forma alongada da glândula, ao invés de ter “forma de ampulheta” como em *Loxosceles*. Esta musculatura entrelaçada também foi descrita em *Agelena labyrinthica*, uma araneomorfa, que possui glândula de formato alongado (Yigit e Guven, 2006). Estudos similares

em *P. nigriventer* (Bücherl, 1971; Silva *et al.*, 2004) constataram a organização encontrada em *L. intermedia*. Esta diferença no formato geral da glândula pode estar relacionada ao fato de, em *V. dubius*, a glândula estar contida completamente na quelícera, enquanto nas duas outras espécies essa se localiza, em sua maior parte, no cefalotórax.

Em relação ao epitélio secretor, observamos uma organização diferente da descrita em *Loxosceles intermedia* (Santos *et al.*, 2000) e nas Theraphosidae *Aphonopelma* sp. e *Dugesiella echina* (Russell *et al.*, 1973). Em *V. dubius*, foi observado um epitélio estratificado com células lamelares extremamente alongadas, formando uma rede interconectada no lúmen da glândula, com a ocorrência de canálculos e “bolsas” de peçonha isoladas do lúmen (figuras 9 a 12), ao contrário de um epitélio com monocamada de células colunares ou paralelamente alongadas conforme descrito em *L. intermedia* e *Latrodectus tredecimguttatus* (Cavalieri *et al.*, 1990), respectivamente. Malli *et al.* (2000) descreveram o epitélio de glândula de peçonha de *C. salei* organizado em “unidades produtoras de peçonha (...) compostas por longas e interconectadas células secretoras, formando estruturas ovais compactas orientadas perpendicularmente à membrana basal”. Organização similar foi encontrada por Gopalakrishnakone *et al.* (1995) no escorpião asiático *Heterometrus longimanus*, um representante de outra ordem da classe dos quelicerados. Nesse trabalho, os autores descreveram as células epiteliais como “colunares e altas”, evidentes em microscopia de varredura, mas não detalharam a organização da musculatura. Estes dados indicam que a organização geral do epitélio secretor de glândula de peçonha de *V. dubius* difere tanto em relação a escorpiões quanto às aranhas *Loxosceles*, *Latrodectus* e *Phoneutria*.

Apesar das variações na organização estrutural, a ultraestrutura do epitélio secretor de glândulas de peçonha de aranhas em geral contém abundância de organelas relacionadas à síntese protéica, como retículo endoplasmático, aparato de Golgi, mitocôndrias e vesículas citoplasmáticas eletrondensas. Conforme observado para outras aranhas (Santos *et al.*, 2000), as células epiteliais de *V. dubius* contêm inúmeras interdigitações e intenso contato entre si.

Muitos fatores influenciam na produção de peçonha, tais como a idade e sexo do animal, alimentação, temperatura, estação climática, origem geográfica e frequência de retirada de peçonha (Atkinson and Walker, 1985, Vapenik and Nentwig, 2000; Binford, 2001; Herzig *et al.*, 2002, 2004), sendo até o tamanho da presa um fator determinante para o gasto de peçonha em

algumas espécies (Kuhn-Nentwig *et al.*, 2004). Por outro lado, pouco se sabe da biossíntese de peçonha propriamente dita e as alterações ultraestruturais necessárias para o reabastecimento da glândula de aranhas. De acordo com nossas observações, a estrutura do epitélio glandular parece preponderante no processo de produção de peçonha. A presença de vacúolos próximos ao núcleo (figuras 9 e 13) sugere que a produção ocorre no citoplasma basal das células epiteliais. No entanto, são observáveis bolsas de peçonha isoladas (figura 12) em toda a extensão dos prolongamentos celulares, além de porções de peçonhas de diferentes eletrodensidades isoladas entre si por extensões celulares com complexa organização interna (figura 14). É possível que a peçonha recém sintetizada seja transportada intracelularmente através de vacúolos que são subsequentemente liberadas nas lacunas do epitélio. Por outro lado, vacúolos autofágicos encontrados em células mais próximas ao lúmen indicam que a remodelação do epitélio possui papel preponderante a produção de peçonha. Yigit e Guven (2006) descrevem estrutura epitelial bastante similar em *Agelena labyrinthica*, que também apresentava compartimentalização de material granular de diferentes eletrondensidades. Neste contexto, Silva *et al.* (2004) descreveram ácinos com vesículas secretórias no epitélio glandular de *P. nigriventer*.

As alterações ultraestruturais indicam que a biossíntese de peçonha resulta em mudanças na eletrondensidade do citoplasma, na densidade e distribuição de organelas, na morfologia nuclear e, destacadamente, na abundância (aumentada) de retículo endoplasmático. As alterações mais evidentes ocorreram durante os três primeiros dias após a extração de peçonha, e estavam praticamente concluídas após sete dias, quando provavelmente a produção de peçonha atinge o auge. No décimo quinto dia, apesar de ainda conservar características de atividade sintética, o epitélio estava aparentemente mais homogêneo (menos variações regionais), talvez pela biossíntese ter entrado em um processo de desaceleração. Estas observações estão de acordo com Friedel e Nentwig (1989), que observaram que a extração de maior volume em *Brachypelma albopilosum* ocorria após quatro semanas de intervalo.

Os mecanismos que regulam a biossíntese, além do estímulo mecânico de esvaziamento da glândula, são desconhecidos. Russell *et al.* (1973) e Jälfors *et al.* (1969) descreveram uma íntima associação entre o epitélio da glândula de peçonha e neurônios em caranguejeiras e Moon (1996) e Yigit e Guven (2006) descreveram a junção neuromuscular e axônios presentes em glândulas de peçonha de espécies de aranha *Agelena* sp. Contudo, ainda não está claro se há

regulação neural da produção de peçonha, como ocorre em serpentes, onde foi relatada regulação autonômica (Yamanouye *et al.*, 2000; Kerchove *et al.*, 2004).

Outro fator ainda pouco entendido é a renovação de células epiteliais durante os estados de repouso e biossíntese da glândula. Foi descrito em *Latrodectus mactans* (Smith and Russell, 1966) uma regeneração epitelial que foi associada à produção de α -latrotoxin em *L. tredecimguttatus* (Cavalieri *et al.*, 1990). Neste contexto, o *debris* celular observado nas lacunas do arcabouço epitelial, juntamente com as alterações morfológicas sugerem morte celular como um processo comum em glândula de peçonha (figura 18).

Em resumo, o epitélio glandular de *V. dubius*, apesar de conservar estrutura similar ao de outras aranhas, possui peculiaridades que podem estar relacionadas especificamente a este grupo de aranhas.

EXTRAÇÃO DA PEÇONHA

Vários métodos de extração de peçonha têm sido relatados. O estímulo ao ataque foi utilizado por Brazil e Vellard (1926) para conseguir peçonha da agressiva *P. nigriventer*. Outro método é o isolamento e homogeneização de glândulas (Balaji, *et al.*, 2000) que, embora tenha a vantagem de evitar a contaminação do material com fluidos gástricos, envolve o sacrifício dos animais e resulta na contaminação da peçonha com tecido glandular e moléculas que não fazem parte da peçonha.

Atualmente o eletroestímulo é um dos métodos mais utilizados (Kuhn-Nentwig *et al.*, 2004; Yuan *et al.*, 2007), apesar das caranguejeiras possuírem carapaça espessa, o que dificultando a propagação do estímulo. A adaptação do método de Schanbacher *et al.* (1973) para caranguejeiras (Grothaus and Howell, 1967) consistiu em utilizar uma solução de eletrólitos para umedecer o cefalotórax, juntamente com o posicionamento de tubos de polietileno para a coleta da peçonha. Este método permitiu uma diminuição da voltagem [Smith e Micks (1968) e Morris e Russel (1975) utilizaram respectivamente 200 V e 60 V para extrair peçonha de espécies de *Loxosceles*], além de evitar a mistura com fluidos gástricos que poderia contaminar a peçonha com proteases (Rash and Hodgson, 2002). Dessa forma, Friedel e Nentwig (1989) utilizaram descargas elétricas facilitadas por uma solução de eletrólitos no cefalotórax para obter peçonha de *Brachypelma albopilosum*. Celerier *et al.* (1993) descreveram um método de coleta pela

superfície lateral de um tubo adequadamente posicionado (“lure-biting”), que aumentou o rendimento de peçonha e diminuiu a injúria causada pela eletroestímulo. A tabela 2 apresenta uma comparação do rendimento obtido com algumas espécies e métodos diferentes.

Aranha	Método	Rendimento	Referência
<i>B. albopilosum</i>	Eletroestímulo em cefalotórax	16 ± 5 µL (s.n.d.)	Friedel e Nentwig (1989)
<i>E. californicum</i>	Eletroestímulo com solução eletrolítica	10-20 µL (f)	Savel-Niemann (1989)
<i>S. grisipeis</i>	“Lure-biting”	11,8 ± 8,6 mg (f) 7,8 ± 7,2 mg (m)	Celerier <i>et al.</i> (1993)
<i>V. dubius</i>	Eletroestímulo com reposicionamento de eletrodo	23 ± 2 mg (21 ± 2 µL) (f) 13 ± 1 mg (12 ± 1 µL) (m)	Este trabalho

Tabela 2 – Comparação entre quatro métodos de extração de peçonha por eletroestimulação. Os valores representam a média ± E.P.M./aranha/extração. f – fêmeas, m – machos, s.n.d. – sexo não discriminado.

No presente trabalho, utilizamos uma adaptação do método de eletroestímulo para obter a peçonha de *V. dubius*, apesar de ser aplicável para outras caranguejeiras, bem como araneomorfas maiores. O uso de uma solução de eletrólitos aumentou a condução de corrente e dispersou o estímulo de forma imprevisível, ou seja, sem reprodutibilidade constante em todos os indivíduos, e acarretou danos aos animais. A não utilização desta solução, associada ao posicionamento dos eletrodos nos permitiu manter uma baixa voltagem e aplicá-la exatamente sobre a região de interesse, sem injúria aos animais. Este método, que permite a obtenção de peçonha sem contaminação com outros fluidos, não se apresentou ofensivo aos animais, dada a não alteração da taxa de mortalidade em nosso biotério (aproximadamente 10% ao ano, principalmente de machos), e a extração regular de alguns indivíduos por mais de dois anos. Outra vantagem da metodologia aqui descrita é a possibilidade de manipular as aranhas sem a ajuda de terceiros, usando apenas pinças, evitando assim contato com pêlos urticantes que podem causar injúrias como oftalmia nodosa (Bertani e Marques, 1995/1996; Bernardino e Rapuano, 2000).

Durante extrações consecutivas houve redução no rendimento de peçonha, principalmente entre a primeira e segunda extrações (ver figura 19). A observação de que houve correlação direta

entre o volume de peçonha obtida e a quantidade de proteína sugere que a queda no rendimento com sucessivas extrações não foi devida à desidratação das aranhas ou deterioração no estado fisiológico geral. Nentwig e Vapenik (2000) descreveram a influência de fatores como alimentação e temperatura na produção de peçonha de *C. salei*.

O fato de machos fornecerem um pouco mais de peçonha que fêmeas em relação ao tamanho corporal pode estar relacionado ao fato dos machos serem menores, com quelíceras menos robustas em relação às fêmeas. Desta forma, precisariam de mais peçonha para imobilizar uma presa que pode ser mais facilmente imobilizada mecanicamente pelo robusto aparato das fêmeas. A queda na quantidade de peçonha produzida por fêmeas após atingirem o tamanho adulto talvez seja um reflexo da idade das aranhas, mas esta sugestão precisa ser confirmada. Uma diminuição na produção de peçonha com a idade tem sido relatada em serpentes (Klauber, 1972; Minton, 1975).

CARACTERIZAÇÃO DA PEÇONHA

A concentração de proteína na peçonha total de *V. dubius* (18.3 ± 2.4 mg/ml) foi menor que as descritas para *Dugesiella hentzi* (~200 mg/ml) (Schanbacher *et al.*, 1973), *Eurypelma californicum* (65 mg/ml) (Savel-Niemann, 1989) e *Scodra grisipeis* (34.2 ± 5.3 e 79.9 ± 10 mg/ml para fêmeas e machos, respectivamente) (Célrier *et al.*, 1993). Friedel e Nentwig (1989) encontraram 120 ± 20 mg de proteína/mL em *Brachypelma albopilosum*. Esta variabilidade pode ser um reflexo do método utilizado para a dosagem protéica, uma vez que os três primeiros utilizaram o reagente fenólico de Folin (método de Lowry *et al.*, 1951) e o último o método “amido black”, enquanto no presente trabalho utilizamos o reagente azul brilhante de Coomassie (Bradford, 1976). Enquanto este último se baseia na ligação do corante desprotonado a resíduos de aminoácidos, o primeiro método tem como princípio a redução do Cu^{2+} para Cu^+ por aminas. A presença de poliaminas já descritas para peçonhas de caranguejeiras (Skinner *et al.*, 1990; Lange *et al.*, 1992) pode ser responsável por superestimar esta dosagem. Para checar, fizemos em nosso laboratório a dosagem de uma solução aquosa de peçonha liofilizada de *V. dubius* 1 mg/mL, pelo método do ácido bicinconínico, que segue o mesmo princípio do método de Lowry. O resultado indicou a concentração de proteínas nesta solução em 1,25 mg/mL, ou seja, maior

que a concentração da própria peçonha. Com isso, entendemos que pode ter ocorrido um artefato metodológico que superestimou as dosagens anteriores.

Na peçonha de *V. dubius* não foram encontradas atividades colagenase e elastase, o que está de acordo com as observações de alguns autores (Perret, 1977; Kuhn-Nentwig e Nentwig, 1997) que colocam atividades proteolíticas como presentes apenas em secreções gástricas. Trabalhos envolvendo proteases em peçonhas de aranhas consideram a presença destas como promotoras de ação local da peçonha, como dermonecrose (Young e Pincus, 2001; Veiga *et al.*, 2000) e coagulação (Joo *et al.*, 2001).

A quantidade reduzida de bandas protéicas de alta massa molecular vista no perfil eletroforético da peçonha de *V. dubius* está de acordo com as poucas atividades enzimáticas encontradas nesta peçonha. No entanto, a atividade hialuronidásica foi proeminente, conforme já descrito para outras caranguejeiras, com a enzima consistindo em uma proteína de aproximadamente 45 kDa, evidenciada por zimografia. Esta atividade tem sido relacionada com ações locais da peçonha, como dermonecrose (Young e Pincus, 2001; Veiga *et al.*, 2000b). A massa molecular estimada por zimografia está uma pouco acima daquela obtida por Schambacher *et al.* (1973b) (~39 kDa) para uma hialuronidase da caranguejeira *Dugesiella hentzi*, mas muito próxima à das hialuronidases de *Loxosceles intermedia* (da Silveira *et al.*, 2007) e *Hippasa partita* (Nagaraju *et al.*, 2007) (~43 kDa para ambas).

Ainda em relação à composição enzimática da peçonha, durante a dosagem da atividade colagenásica, foi observada uma reação forte entre ninidrina e concentrações crescentes de peçonha, sugerindo a presença de aminas e/ou aminoácidos livres na peçonha. De fato, vários trabalhos já relataram aminoácidos livres (alanina, arginina, asparagina, glicina, glutamina, leucina, lisina, histidina, serina e treonina) em peçonha de aranhas (Rash e Hodgson, 2002). Além disso, Palma *et al.* (1998) e Hisada *et al.* (1998) descreveram a presença de poliaminas associadas à neurotoxicidade nas peçonhas de *Nephila clavata* e *Nephilengys cruentata*, respectivamente.

Caracterização imunológica

A caracterização imunológica da peçonha de *V. dubius* revelou reatividade cruzada com o soro antiaracnídico do Instituto Butantan. Este soro é preparado a partir de cavalos imunizados

com peçonhas de *Loxosceles* spp., *P. nigriventer* e *Tityus serrulatus* (Cardoso *et al.*, 2003). A diferença de reatividade observada no teste de ELISA entre as peçonhas de *V. dubius*, *P. nigriventer* e *T. serrulatus*, revelada pela concentração maior de imunoglobulinas usada com *V. dubius* pode indicar menor imunogenicidade em relação à peçonha da caranguejeira. Toro *et al.* (2007) demonstraram que imunoglobulinas purificadas do mesmo soro possuem afinidades e potenciais de neutralização diferentes para cada uma das peçonhas contra as quais o soro foi produzido, indicando que uma menor reatividade seria um resultado esperado. Isto foi confirmado com o immunoblotting (figura 23), onde as moléculas da peçonha de *V. dubius* menores de 30 kDa não reagiram com as imunoglobulinas, ao contrário das outras duas espécies.

Além disso, uma banda de aproximadamente 65 kDa não visível em eletroforese comum, se destacou na revelação do immunoblotting da peçonha de *V. dubius*, com correspondentes nas peçonhas de *P. nigriventer* e *T. serrulatus*. No entanto, como os principais compostos tóxicos descritos para estas duas últimas peçonhas são moléculas pequenas (Becerril *et al.*, 1997; Gomez *et al.*, 2002), sugerimos que esta banda de elevado massa molecular possa ser um (ou mais) componente(s) não-tóxico(s) das peçonhas que mantém similaridades dentre estes três táxons.

ATIVIDADES BIOLÓGICAS

Hemólise

Várias investigações têm demonstrado que as peçonhas de algumas espécies de aranhas possuem atividade hemolítica (Kuhn-Nentwig *et al.*, 2002; Yan e Adams, 1998), embora tenha sido estudado detalhadamente apenas no gênero *Loxosceles* (Tambourgi *et al.*, 1998; Barreto *et al.*, 2003; Oliveira *et al.*, 2005; Pretel *et al.*, 2005; Silvestre *et al.*, 2005) por se tratar de um fenômeno com implicações clínicas diretas. A ação hemolítica de peçonhas de aranhas tem sido atribuída principalmente à presença de esfingomielinases e peptídeos (Tambourgi *et al.*, 1998; Kuhn-Nentwig *et al.*, 2002b; Yan e Adams, 1998). Por outro lado, Sosa *et al.* (1979) não encontraram atividade hemolítica em peçonhas de caranguejeiras e espécies de *Latrodectus*. A ausência de atividade hemolítica na peçonha de *V. dubius* está de acordo com os achados destes últimos autores.

Citotoxicidade

A ação citotóxica de peçonhas de aranhas tem sido pouco estudada. Veiga *et al.* (2000b) descreveram ação da peçonha de *Loxosceles intermedia* na membrana basal de sarcoma de camundongo, propondo posteriormente a interação da peçonha com componentes da matriz extracelular de células epiteliais de coelhos (Veiga *et al.*, 2001). Por outro lado, a peçonha de *L. gaucho* provocou apenas modificações morfológicas temporárias em culturas de macrófagos de camundongos (Domingos *et al.*, 2003). Corzo *et al.* (2002) demonstraram que a ação da peçonha de *Oxyopes kitabensis* sobre células de insetos cultivadas ocorre pela interação de peptídeos com a membrana celular, alterando sua permeabilidade. Gao *et al.* (2005) em um importante passo para o estudo *in vivo*, demonstraram a atividade antitumoral da peçonha de *Macrothele raven* sobre células tumorais em cultivo. No mesmo trabalho, observaram que a peçonha desta migalomorfa reduziu significativamente tumores sólidos em animais.

Os nossos resultados também indicam que a peçonha de *V. dubius* pode conter componentes com ação antitumoral (antileucêmica). O fato da cultura de células K562 ter atingido o limiar de citotoxicidade na presença da peçonha, o que não aconteceu com o quimioterápico, sugere uma possível atividade de interesse farmacológico. A citotoxicidade observada aqui foi comparável à encontrada em *Phidippus ardens* (Salticidae), onde concentrações de 1 a 8 µg da peçonha/mL foram citotóxicas em quatro linhagens de células cultivadas (uma de insetos, duas de camundongos e uma humana) (Cohen e Quistad, 1998). Por outro lado, Le Sueur *et al.* (2005) não observaram citotoxicidade em células epiteliais e endoteliais em cultura incubadas com até 292 µg de peçonha de *P. nigriventer*/mL. Com os dados que temos, ainda não é possível afirmar se a atividade citotóxica é específica para células leucêmicas ou cancerígenas (comparado com células normais), e nem se há seletividade para células cultivadas em suspensão (como nas duas linhagens testadas) comparado com linhagens de células aderentes (não testadas).

Ação local da peçonha

As peçonhas de algumas espécies de aranhas, tais como *Atrax infensus* (Atkinson, 1986), *P. nigriventer* (Costa *et al.*, 1997) e *Scaptocosa raptoria* (Ferreira *et al.*, 1998) são capazes de aumentar a permeabilidade vascular, e esta ação tem sido atribuída à degranulação de mastócitos

(*A. infensus*), à estimulação de receptores NK₁ de taquicinina (*P. nigriventer*) e à presença de cininas na peçonha (*S. raptoria*). Costa *et al.* (1997) descreveram extravasamento de 25 a 60 µL de plasma em pele de ratos, em sítios injetados com 1 a 10 µg de peçonha de *P. nigriventer*. Estes dados são semelhantes aos nossos, onde observamos que entre 10 e 30 µg de peçonha de *V. dubius* provocou extravasamento de 50 a 100 µL de plasma. Nossos resultados sugerem a ativação da via do óxido nítrico, visto que o tratamento com L-NAME, um inibidor da enzima óxido nítrico sintase, reduziu o edema causado pela peçonha de *V. dubius* em mais de 50%. Os mecanismos envolvidos nesta ativação ainda são desconhecidos, mas aparentemente não envolvem a via cininérgica, uma vez que o HOE-140, antagonista dos receptores B₂ da bradicinina, não afetou o edema causado pela peçonha. Esta conclusão contrasta com a demonstração de uma via de calicreína tissular e o envolvimento de cininas na atividade edematogênica da peçonha de *P. nigriventer* (Marangoni *et al.*, 1993; Costa *et al.*, 2001).

A inibição da permeabilidade vascular provocada pela peçonha observada após a administração de ciproheptadina, associada à ausência de efeito da mepiramina, também indicou o envolvimento de receptores 5-HT₂ de serotonina neste edema. Este resultado difere dos achados de Costa *et al.* (2000), onde o edema provocado em pele de ratos pela peçonha de *P. nigriventer* não foi reduzido por antagonistas serotoninérgicos, sendo a ação atribuída à ativação de receptores purinérgicos e vanilóides (Esquisatto *et al.* 2001). Por outro lado, a peçonha de *P. nigriventer* é capaz de ativar receptores 5-HT₄ em preparação de nervo vago de ratos (Costa *et al.*, 2003). Este estudo, associado aos nossos resultados, aponta para a ativação de receptores serotoninérgicos por peçonhas de aranhas, o que pode estar relacionado à dor no local da picada, através do estímulo de fibras nervosas nociceptivas.

Ação sobre músculo liso

As peçonhas de algumas aranhas contraem músculo liso vascular e não-vascular (Schenberg e Pereira, 1970; Costa *et al.*, 1996; Santos *et al.*, 1999; Romero *et al.*, 2003; Pimenta *et al.*, 2004). Assim, da peçonha de *P. nigriventer* têm sido identificados e caracterizados polipeptídeos com ação vasoconstritora (Bento *et al.*, 1993; Marangoni *et al.*, 1993).

A peçonha de *V. dubius* não contraiu o músculo liso de íleo de cobaia, o que indica a ausência de agonistas como acetilcolina, e aminas como histamina e serotonina, além de

peptídeos com atividade contrátil (por exemplo, cininas) ou que ativam canais de cálcio. A presença de histamina e/ou serotonina foi demonstrada em peçonhas de aranhas Theraphosidae (Welsh and Batty, 1963) e em *P. nigriventer* (Fisher and Bohn, 1957; Schenberg e Pereira, 1970).

A não interferência da peçonha de *V. dubius* sobre as respostas à acetilcolina, serotonina e bradicinina indica a ausência de compostos que poderiam atuar como antagonistas sobre os receptores correspondentes. As peçonhas de caranguejeiras contêm uma variedade de bloqueadores de canais de cálcio, sódio e potássio, com alta especificidade para subfamílias de receptores (Takeuchi *et al.*, 2002; Bosmans *et al.*, 2006; Swartz, 2007). A ausência de antagonismo das contrações induzidas por acetilcolina e outros agonistas sugere a possível ausência de bloqueadores de canais de cálcio (em especial) nesta peçonha, embora esta falta de efeito possa indicar também que o íleo de cobaio não seja o melhor modelo para detectar tais toxinas.

Vários estudos têm usado a preparação de músculo anococcígeo de rato como modelo de músculo liso para investigar a ação de peçonhas de artrópodes e suas toxinas sobre a contração muscular (Nirathanan *et al.*, 2002; Teixeira *et al.*, 2003). Conforme demonstrado aqui, a peçonha de *V. dubius* foi incapaz de contrair o músculo anococcígeo, tampouco relaxou tecido pré-contráido com fenilefrina. No entanto, o bloqueio observado em tecidos eletroestimulados confirmou a presença de toxinas atuantes. Os resultados obtidos posteriormente com fenilefrina, um agonista pós-sináptico, e tiramina, um precursor que estimula a liberação de norepinefrina em nível sináptico, ambos não sendo bloqueados pela peçonha, sugerem uma ação pré-sináptica da mesma. Caso se confirme, este resultado estará de acordo com dados da literatura, que descrevem bloqueadores de canais de sódio (Yuan *et al.*, 2007), potássio (Phillips *et al.*, 2005) e cálcio (Bourinet *et al.*, 2001), todos envolvidos na transmissão do potencial de ação pré-sináptico.

Ação neuromuscular

O bloqueio neuromuscular total observado em nervo-frênico diafragma de camundongo foi obtido com uma concentração bastante elevada de peçonha de *V. dubius* (80 µg/mL), aproximadamente dez vezes maior que àquela da peçonha de *Theraphosa blodii* (7,5 µg/mL) (Fontana *et al.*, 2002) para a mesma preparação. No entanto, ainda em nervo frênico-diafragma, Shu e Liang (1999) obtiveram bloqueio total com as toxinas puras HwTx-1 e HwTx-2 (da

caranguejeira chinesa *Selenocosmia huwena*) nas concentrações de 10 e 50 µg/mL, respectivamente. Para economizar no estoque de peçonha, optamos estudar este bloqueio em músculo biventer cervicis de pintainho, onde testes preliminares revelaram que a concentração para obtenção de 90% de bloqueio foi de 25 µg/mL. Isto revela uma diferença de sensibilidade à peçonha entre classes de vertebrados; também observadas para peçonhas ofídicas.

No biventer cervicis de pintainho, a peçonha de *V. dubius* produziu dois efeitos diferentes: o bloqueio da contração muscular resultante de estímulos elétricos indiretos e uma contratura estável do músculo. Também foi observada a diminuição da contratura induzida tanto por acetilcolina quanto por KCl. Estes dados sugerem que a peçonha de *V. dubius* atua em nível pós-sináptico, em receptores e/ou canais iônicos (redução na resposta à acetilcolina) e diretamente em estrutura das células musculares (redução na resposta ao KCl). O bloqueio a estímulos indiretos nesta preparação também foi descrito para as peçonhas de *Macrothele raveni* (Zeng *et al.*, 2003) e *Missulena bradleyi* (Rash *et al.*, 2000b). No entanto a unidade utilizada para expressar a concentração (em µmol de toxina purificada/mL para a primeira e µL de peçonha líquida/mL para a segunda) não permite comparar as peçonhas em termos de potência de bloqueio.

Contraturas em biventer cervicis de pintainho foram descritas para as peçonhas de *Latrodectus hasselti* e *Steatoda grossa*, onde o efeito observado para a segunda peçonha era consequência de uma ação pós-sináptica da peçonha, reversível com soro produzido contra a primeira (Graudins *et al.*, 2002). Ao contrário, Gunning *et al.* (2003) descreveram que a contratura causada por peçonha de *M. bradleyi* foi abolida pela tetrodotoxina, um bloqueador de canais de sódio neuronais, e d-tubocurarina, um antagonista de receptores nicotínicos, revelando a ação pré-sináptica da peçonha desta aranha. Da mesma forma, Rash *et al.* (2000b) demonstraram que o bloqueio a estímulos indiretos causado pela peçonha de machos de *M. bradleyi* foi revertido quando pré-incubada com antisoro contra aranhas *funnel-web*, causadoras de acidentes fatais na Austrália.

Embora nenhuma destas aranhas mencionadas seja Theraphosidae, estes resultados indicam que a investigação sobre o mecanismo de ação da peçonha de *V. dubius* pode levar a novas toxinas com sítio de ação pré- e/ou pós-sináptico, ambos comuns dentre as aranhas.

Fracionamento da peçonha

Em relação à separação dos componentes de peçonha por fase reversa, encontramos na peçonha de *V. dubius* um padrão semelhante ao observado em cromatogramas de *Brachypelma angustum* e *Aphonopelma* sp. (Escoubas *et al.*, 2002a) onde houve separação dos componentes em três grupos de picos com menor, intermediária e maior hidrofobicidade.

Os resultados obtidos ao testarmos as frações nas atividades biológicas revelaram a presença de duas frações biologicamente ativas. O grupo 1, primeiro a ser eluído, apresentou atividade edematogênica e bloqueio de contrações por estímulos indiretos na preparação de biventer cervicis de pintainho. O grupo 2, segundo na ordem de eluição, também promoveu edema e foi responsável por contratura juntamente com o bloqueio de contrações por estímulos indiretos na preparação de biventer cervicis de pintainho. Estes resultados indicam que há pelo menos duas toxinas responsáveis pelo edema e bloqueio neuromuscular da peçonha. Já o grupo 3 estava destituído de atividade em ambos estes testes.

Sobre a ação das frações na preparação neuromuscular, a separação das toxinas revelou indícios de seus respectivos mecanismos de ação. A(s) toxina(s) presente(s) na primeira fração (grupo 1) bloqueou(aram) a contração a estímulos elétricos indiretos, sem provocar contratura, e ainda diminuíram significativamente a contratura induzida pela aplicação da Ach, reversível após lavagens, sem alterar significativamente a contratura induzida por KCl. Este resultado foi similar ao observado para toxinas isoladas da peçonha da migalomorfa *M. raveni* (Zeng *et al.*, 2003), e sugerem a possibilidade da presença de um antagonista reversível de receptores nicotínicos na peçonha de *V. dubius*.

As toxinas da segunda fração (grupo 2) apresentaram efeito sobre a contração a estímulos elétricos indiretos, mas também afetaram a tensão basal da preparação, induzindo contratura muscular. O mecanismo envolvido na contratura provocada pela peçonha de machos de *M. bradleyi* aparentemente consiste na interação de toxinas com canais de sódio pré-sinápticos (Rash *et al.*, 2000b). Além disso, as respostas a Ach e KCl foram irreversivelmente diminuídas. Estes resultados evidenciam que esta fração contém ao menos uma toxina com ação pós-sináptica, que provavelmente danifica a estrutura funcional do músculo, mas que não necessariamente é responsável pela contratura.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A aranha *V. dubius* possui um robusto aparato de captura de suas presas, assim como peçonha com ao menos duas toxinas. Os resultados indicam que a peçonha desta espécie pode ser voltada para ação em vertebrados, ao invés de insetos. Isto faz sentido, uma vez que, em nossas observações durante a alimentação de nossas aranhas, um artrópode de tamanho médio capturado é subjugado imediatamente pelas quelíceras sendo, muitas vezes, morto durante este processo. Por outro lado, a peçonha sendo capaz de causar edema local e bloqueio neuromuscular, pode ser útil durante a captura de um animal de maior porte, ou até mesmo em situação de defesa. Nesta situação, apesar de caranguejeiras exibirem o comportamento de espalhar pêlos urticantes (Bertani e Marques, 1995/96), durante a manipulação destes animais observamos diversas vezes o comportamento de ataque com deposição de peçonha, reforçando um possível papel defensivo para a mesma.

CONCLUSÕES

Baseados nos resultados obtidos neste trabalho, concluímos que a aranha *V. dubius* possui um robusto aparato venenífero, que a permite imobilizar mecanicamente suas presas e que a glândula de peçonha possui estrutura e ultraestrutura que seguem o padrão de aranhas. No entanto as alterações epiteliais observadas durante a produção de poçonha sugerem o remodelamento ultra-estrutural do tecido epitelial por autofagia, processo ainda não descrito para produção de peçonha em aracnídeos.

A peçonha, de acordo com dados de trabalhos anteriores, possui poucas atividades enzimáticas, mas uma diversidade de peptídeos e moléculas de baixo peso molecular que exercem ações biológicas principalmente locais e neuromusculares, mas também citotóxicas. Dessa forma, está clara a presença de ao menos duas toxinas atuantes em cada uma destas atividades, que poderão gerar futuros trabalhos envolvendo purificação e caracterização detalhada de suas estruturas e mecanismos de ação.

REFERÊNCIAS

- Antunes, E., Marangoni, R.A., Brain, S.D., De Nucci, G. (1992). *Phoneutria nigriventer* (armed spider) venom induces increased vascular permeability in rat and rabbit skin *in vivo*. *Toxicon* **30**, 1011-1016.
- Antunes, E., Marangoni, R.A., Borges, N.C., Hyslop, S., Fontana, M.D., de Nucci, G. (1993a). Effects of *Phoneutria nigriventer* venom on rabbit vascular smooth muscle. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **26**, 81-91.
- Antunes, E., Marangoni, R.A., Giglio, J.R., Brain, S.D., de Nucci, G. (1993b). Activation of tissue kallikrein-kininogen-kinin system in rabbit skin by a fraction isolated from *Phoneutria nigriventer* (armed spider) venom. *Toxicon* **31**, 1385-1391.
- Atkinson, R.K. (1986). Some studies of the oedematogenic action of the venom of funnel-web spiders (*Atrax* species). *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* **64**, 453-464.
- Atkinson, R.K., Walker, P. (1985) The effects of season of collection, feeding, maturation and gender on the potency of funnel-web spider (*Atrax infensus*) venom. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* **63**, 555-561.
- Bachmann, M. (1982). Isolation and partial characterization of a toxin from the venom of the East African orthognath spider *Pterinichilius* sp. *Toxicon* **20**, 547-552.
- Balaji, R.A., Sasaki, T., Gopalakrishnakone, P., Sato, K., Kini, R.M., Huat, B.B. (1999). Isolation and characterization of a novel myotoxic peptide (covalitoxin-I) from *Corecnemius validus* (Singapore tarantula) venom. Proceedings of the 5th Asia-Pacific Congress on Animal, Plant and Microbial Toxins, p. 39.
- Balaji, R.A., Sasaki, T., Gopalakrishnakone, P., Sato, K., Kini, R.M., Bay, B.H. (2000). Purification, structure determination and synthesis of covalitoxin-II, a short insect-specific neurotoxic peptide from the venom of the *Coremiocnemis validus* (Singapore tarantula). *FEBS Lett.* **474**, 208-212.
- Barretto, O.C.O., Satake, M., Nonoyama, K., Cardoso J.L.C. (2003). The calcium-dependent protease of *Loxosceles gaucho* venom acts preferentially upon red cell band 3 transmembrane protein. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **36**, 309-313.
- Baumann, M., Gersch, M. (1982). Purification and identification of neurohormone D, a heart accelerating peptide from the corpora cardiaca of the cockroach *Periplaneta americana*. *Insect Biochem.* **12**, 7-14.
- Bdolah, A. (1979). The venom glands of snakes and venom secretion. In: *Snake Venoms. Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol. 52. (Lee CY, ed.). pp. 41-57. Springer-Verlag: Berlin.
- Becerril, B., Marangoni, S., Possani, L. D. (1997). Toxins and genes isolated from scorpions of the genus *Tityus*. *Toxicon* **35**, 821-835.
- Bento, A.C., Novello, J.C., Marangoni, S., Antunes, E., Giglio, J.R., Oliveira, B., de Nucci, G. (1993). Identification of a new vascular smooth muscle contracting polypeptide in *Phoneutria nigriventer* spider venom. *Biochem. Pharmacol.* **46**, 1092-1095.
- Bento, A.C., Rego, E., Pedroso-Mariani, S.R., Mancuso, L.C., Giglio, J.R., Novello, J.C., Marangoni, S., Caracelli, I., Oliveira, B., Antunes, E., de Nucci, G. (1995). Isolation of a peptide from *Phoneutria nigriventer* spider venom responsible for the increased vascular permeability in rabbit skin. *Toxicon* **33**, 171-178.
- Bernardino, C.R., Rapuano, C. (2000). Ophthalmia nodosa caused by casual handling of a tarantula. *CLAO J.* **26**, 111-112.

- Bertani, R., Marques, O.A.V. (1995/96). Defensive behaviors in Mygalomorph spiders: release of urticating hairs by some Aviculariinae (Araneae, Theraphosidae). *Zool. Anz.* **234**, 161-165.
- Bertani, R. (2001). Revision, cladistic analysis, and zoogeography of *Vitalius*, *Nhandu* and *Proshapalopus*, with notes on other Theraphosinae genera (Araneae, Theraphosidae). *Arq. Zool.* **36**, 265-356.
- Binford, G.J. (2001). An analysis of geographic and intersexual chemical variation in venom of the spider *Tegenaria agrestis* (Agelenidae). *Toxicon* **39**, 955-968.
- Bode, F., Sachs, F., Franz, M.R. (2001). Tarantula peptide inhibits atrial fibrillation. *Nature* **409**, 35-36.
- Bosmans, F., Rash, L., Zhu, S., Diochot, S., Lazdunski, M., Escoubas, P., Tytgat, J. (2006). Four novel tarantula toxins as selective modulators of voltage-gated sodium channel subtypes. *Mol. Pharmacol.* **69**, 419-429.
- Bourinet, E., Stotz, S.C, Spaetgens, R.L., Dayanithi, G., Lemos, J., Nargeot, J., Zamponi, G.W. (2001). Interaction of SNX482 with domains III and IV inhibits activation gating of α_{1E} (CaV2.3) calcium channels. *Biophys. J.* **81**, 79-88.
- Bowman, C. L., Gottlieb, P. A., Suchyna, T. M., Murphy, Y. K. and Sachs, F. (2007). Mechanosensitive ion channels and the peptide inhibitor GsMTx-4: History, properties, mechanisms and pharmacology. *Toxicon* **49**, 249-270.
- Bradford M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Brazil, V., Vellard, J. (1926). Contribuição ao estudo do veneno das aranhas: 2a. Memória. *Mem. Inst. Butantan*, **2**, 243-299.
- Bücherl, W. (1971). Spiders. In: *Venomous Animals and their Venoms*. Vol. III (Bücherl, W., Buckley, E.E., eds.). pp. 197-277. Academic Press: New York.
- Bücherl, W., Buckley, E.E., Deulofeu, V. (1971). The venom apparatus of spiders. In: *Venomous Animals and their Venoms*, chapter 51 Vol. III (Bücherl, W., Buckley, E.E., eds.). Academic Press: New York.
- Bülbring, E. (1946). Observations on the isolated phrenic-nerve diaphragm preparation of the rat. *Br. J. Pharmacol.* **1**, 38-61.
- Cabiness, S.G., Gehrke, C.W., Kuo, K.C., Chan, T.K., Hall, J.E., Hudiburg S.A., Odell, G.V. (1980). Polyamines in some tarantulas venoms. *Toxicon* **18**, 681-683.
- Cardoso, D.F., Yamaguchi, I.K. (2003). Produção de soros antitoxinas e perspectivas de modernização por técnicas de biologia molecular. In: Cardoso, J.L.C., França, F.O.S., Wen, F.H., Málaque, C.M.S., Haddad Jr., V. (Eds.), *Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes*. Sarvier/FAPESP, São Paulo, pp. 367-379.
- Catterall, W.A., Perez-Reyes, E., Snutch, T.P. and Striessnig, J. (2005a). International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacol. Rev.* **57**: 411-425.
- Catterall, W.A., Goldin, A.L. and Waxman, S.G. (2005b). International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated sodium channels. *Pharmacol. Rev.* **57**, 397-409.
- Cavalieri, M., Corvaja, N., Grasso, A. (1990). Immunocytological localization by monoclonal antibodies of α -latrotoxin in the venom gland of the spider *Latrodectus tredecimguttatus*. *Toxicon* **28**, 341-346.

- Çavusoglu, K.L., Maras, M., Bayram, A. (2004). A morphological study of the venom apparatus of the spider *Allopecosa fabilis* (Araneae, Lycosidae). *Turk. J. Zool.* **28**, 79-83.
- Çavusoglu, K.L., Bayram, A., Maras, M., Kirindi, T., Çavusoglu, K. (2005). A morphological study on the venom apparatus of Spider *Larinioides cornutus* (Araneae, Araneidae). *Turk. J. Zool.* **29**, 351-356.
- Célérier, M.L., Paris, C., Lange, C. (1993) Venom of an aggressive African theraphosidae (*Scodra grisipes*): milking the venom, a study of its toxicity and its characterization. *Toxicon* **31**, 577-590.
- Cesar, L.M.M., Mendes, M.A., Tormena, C.F., Marques, M.R., De Souza, B.M., Saidemberg, D.M., Bittencourt, J.C. and Palma, M.S. (2005). Isolation and chemical characterization of PwTx-II: A novel alkaloid toxin from the venom of the spider *Parawixia bistriata* (Araneidae, Araneae). *Toxicon* **46**, 786-796.
- Chagot, B., Escoubas, P., Villegas, E., Bernard, C., Ferrat, G., Corzo, G., Lazdunski, M. and Darbon, H. (2004). Solution structure of phrixotoxin 1, a specific peptide inhibitor of Kv4 potassium channels from the venom of the theraphosid spider *Phrixotrichus auratus*. *Protein Sci.* **13**, 1197-1208.
- Chan, T.K., Geren, C.R., Howell, D.E., Odell, G.V. (1975). Adenosine triphosphate in tarantula spider venoms and its synergistic effect with the venom toxins. *Toxicon* **13**, 61-66.
- Chen, X., Kalbacher, H., Grunder, S. (2006). Interaction of acid-sensing ion channel (ASIC) 1 with the tarantula toxin psalmotoxin I is state dependent. *J. Gen. Physiol.* **127**, 267-276.
- Choi, S.J., Parent, R., Guillaume, C., Deregnacourt, C., Delarbre, C., Ojcius, D.M., Montagne, J.J., Celerier, M.L., Phelipot, A., Amiche, M., Molgo, J., Camadro, J.M., Guette, C. (2004). Isolation and characterization of psalmopeotoxin I and II: two novel antimalarial peptides from the venom of the tarantula psalmopoeus cambridgei. *FEBS Letters* **572**, 109-117.
- Clement, H., Odell, G., Zamudio, F.Z., Redaelli, E., Wanke, E., Alagón, A., Possani, L.D. (2007). Isolation and characterization of a novel toxin from the venom of the spider *Grammostola rosea* that blocks sodium channels. *Toxicon* **50**, 65-74.
- Cohen E., Quistad, G.B. (1998). Cytotoxic effects of arthropod venoms on various cultured cells. *Toxicon* **36**, 353-358.
- Corzo, G., Villegas, E., Gomez-Lagunas, F., Possani, L.D., Belokoneva, O.S., Nakajima, T. (2002). Oxyopinins, large amphipathic peptides isolated from the venom of the wolf spider *Oxyopes kitabensis* with cytolytic properties and positive insecticidal cooperativity with spider neurotoxins. *J. Biol. Chem.* **28**, 23627-23637.
- Corzo, G., Escoubas, P., Stankiewicz, M., Pelhate, M., Kristensen, C.P. and Nakajima, T. (2000). Isolation, synthesis and pharmacological characterization of delta-palutoxins IT, novel insecticidal toxins from the spider *Paracoelotes luctuosus* (Amaurobiidae). *Eur. J. Biochem.* **267**, 5783-5795.
- Costa, S.K.P., Moreno, H., Brain, S.D., de Nucci, G., Antunes, E. (1996). The effect of *Phoneutria nigriventer* (armed spider) venom on arterial blood pressure of anaesthetised rats. *Eur. J. Pharmacol.* **298**, 113-120.
- Costa, S.K.P., de Nucci, G., Antunes, E., Brain, S.D. (1997). *Phoneutria nigriventer* spider venom induces oedema in rat skin by activation of capsaicin sensitive sensory nerves. *Eur. J. Pharmacol.* **339**, 223-226.
- Costa, S.K.P., de Nucci, G., Antunes, E., Brain, S.D. (2000). Involvement of vanilloid receptors and purinoceptors in the *Phoneutria nigriventer* spider venom-induced plasma extravasation in rat skin. *Eur. J. Pharmacol.* **391**, 305-315.
- Costa, S.K.P., Esquisatto, L.C.M., Camargo, E., Gambero, A., Brain, S.D., de Nucci, G.D., Antunes, E. (2001). Comparative effect of *Phoneutria nigriventer* spider venom and capsaicin on the rat paw oedema. *Life Sci.* **69**, 1573-1585.

- Costa, S.K.P., Brain, S.D., Antunes, E., de Nucci, G., Docherty, R.J. (2003). *Phoneutria nigriventer* spider venom activates 5-HT₄ receptors in rat-isolated vagus nerve. *Br. J. Pharmacol.* **139**, 59–64.
- Costa S.K.P., Starr A., Hyslop S., Gilmore D., Brain S.D. (2006). How important are NK1 receptors for influencing microvascular inflammation and itch in the skin? Studies using *Phoneutria nigriventer* venom. *Vascul. Pharmacol.* **45**, 209-214.
- De Roodt, A. R., Estevez, R., Judith, Litwin, S., Magaña, P., Olvera, A., Alagón, A. (2007). Toxicity of two North American *Loxosceles* (brown recluse spiders) venoms and their neutralization by antivenoms. *Clin. Toxicol.* **45**, 678 - 687.
- Desai, A., Lankford, H.A., Warren, J.S. (2000). *Loxosceles deserta* spider venom induces the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in keratinocytes. *Inflammation* **24**, 1-9.
- Di Ferrante, N. (1956). Turbidimetric measurement of acid mucopolysaccharides and hyaluronidase activity. *J. Biol. Chem.* **220**, 303-306.
- Diefenbach, C.O., Vozari-Hampe, M.M., Jaeger, C.P. (1969). Biologically active non-proteic components from *Grammostola mollicoma* Ausserer, 1875 Poison. *Rev. Brasil. Biol.* **29**, 75-80.
- Diniz, M.R.V., Paine, M.J.I., Diniz, C.R., Theakston, R.D.G., Crampton, J.M. (1993). Sequence of the cDNA coding for the lethal neurotoxin Tx-I from the Brazilian “armed” spider *Phoneutria nigriventer* predicts the synthesis and processing of a preprotoxin. *J. Biol. Chem.* **268**, 15340-15342.
- Domingos, M.O., Tynan, W., Barbaro, K.C., Penny, J., Lewis, D.J., New, R.R. (2003). Effect of *Loxosceles gaucho* venom on cell morphology and behaviour in vitro in the presence and absence of sphingomyelin. *Toxicon* **42**, 439-445.
- Donevan, S.D., Rogawski, M.A. (1996). Multiple actions of arylalkylamine arthropod toxins on the N-methyl-D-aspartate receptor. *Neuroscience* **70**, 361-375.
- Ebbinghaus, J., Legros, C., Nolting, C., Guette, C., Celerier, M.L., Pongs, O., Bähring, R. (2004). Modulation of Kv4.2 channels by a peptide isolated from the venom of the giant bird-eating tarantula *Theraphosa leblondi*. *Toxicon* **43**, 923-932.
- Escoubas, P., Celerier, M.L., Nakajima, T. (1997). High-performance liquid chromatography matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry peptide fingerprinting of tarantula venoms in the genus *Brachypelma*: chemotaxonomic and biochemical applications. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **11**, 1891-1899.
- Escoubas, P., Whiteley, B.J., Kristensen, C.P., Célérier, M.L., Corzo, G., Nakajima, T. (1998) Miltidimensional peptide fingerprinting by high performance liquid chromatography, capillary zone electrophoresis and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for the identification of tarantula venom samples. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **12**, 1075-1084.
- Escoubas, P., Chamot-Rooke, J., Stocklin, R., Whiteley, B.J., Corzo, G., Genet, R., Nakajima, T. (1999). A comparison of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight and liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry methods for the analysis of crude tarantula venoms in the *Pterinochilus* group. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **13**, 1861-1868.
- Escoubas, P., Diochot, S., Corzo, G. (2000). Structure and pharmacology of spider venom neurotoxins. *Biochimie* **82**, 893-907.
- Escoubas, P., De Weille, J.R., Lecoq, A., Diochot, S., Waldmann, R., Champigny, G., Moinier, D., Ménez, A., Lazdunski, M. (2000b). Isolation of a tarantula toxin specific for a class of proton-gated Na⁺ channels. *J. Biol. Chem.* **275**, 25116-25121.

- Escoubas, P., Diochot, S., Célérier, M.S., Nakajima, T., Lazdunski, M. (2002). Novel tarantula toxins for subtypes of voltage-dependent potassium channels in the Kv2 and Kv4 subfamilies. *Mol. Pharmacol.* **62**, 48–57.
- Escoubas, P., Corzo, G., Whiteley, B.J., Celerier, M.L., Nakajima, T. (2002b). Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and high-performance liquid chromatography study of quantitative and qualitative variation in tarantula spider venoms. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **16**, 403-413.
- Escoubas, P., Rash, L. (2004). Tarantulas: eight legged pharmacists and combinatorial chemists. *Toxicon* **43**, 555-574.
- Escoubas, P. (2006). Molecular diversification in spider venoms: A web of combinatorial peptide libraries. *Molecular Diversity* **10**, 545-554.
- Esquisatto, L. C. M., Costa, S. K. P., Camargo, E. A., Ribela, M. T. C. P., Brain, S. D., De Nucci, G. and Antunes, E. (2001). The plasma protein extravasation induced by adenosine and its analogues in the rat dorsal skin: evidence for the involvement of capsaicin sensitive primary afferent neurones and mast cells. *Br J Pharmacol* **134**, 108-115.
- Estató, V., Antunes, E., Machado, B., De Nucci, G., Tibiriçá, E. (2000). Investigation of the haemodynamic effects of *Phoneutria nigriventer* venom in anaesthetized rabbits. *Toxicon* **38**, 841-853.
- Esteso, S.C., de Arguello, N., de Mischis, C.C. (1984). Cutaneous reaction due to spider pollito (*Grammostola doeringi*). *Rev. Fac. Cienc. Med. Univ. Nac. Cordoba.* **42**, 35-38.
- Fenton, A.W., West, P.R., Odell, G.V., Hudiburg, S.M., Ownby, C.L., Mills, J.N., Scroggins, B.T., Shannon, S.B. (1995). Arthropod venom citrate inhibits phospholipase A₂. *Toxicon* **33**, 763-770.
- Ferreira, L.A.F., Alves, W.E., Lucas, M.S., Habermehl, G.G. (1996). Isolation and characterization of a bradykinin potentiating peptide (BPP-S) isolated from *Scaptocosa raptoria* venom. *Toxicon* **34**, 599-603.
- Ferreira, L.A.F., Lucas, S.M., Alves, E.W., Hermann, V.V., Reichl, A.P., Habermehl, G., Zingali, R.B. (1998). Isolation, characterization and biological properties of two kinin-like peptides (peptide-S and peptide-R) from *Scaptocosa raptoria* venom. *Toxicon* **36**, 31-39.
- Fischer, F.G., Bohn, H. (1957). Die Giftesekrete der Brasilianischen Tarantel *Lycosa erythrognatha* und der Wanderspinnne *Phoneutria fera*. *Hoppe-Seyley's Z. Physiol. Chem.* **306**, 265-268.
- Foelix, R.F. (1982). *Biology of Spiders*. Harvard University Press: Cambridge.
- Fontana A.C., de Oliveira Belebóni R., Wojewodzc M.W., Santos W.F., Coutinho-Netto J., Grutle N.J., Watts S.D., Danbolt N.C., Amara S.G. (2007). Enhancing glutamate transport: mechanism of action of Parawixin1, a neuroprotective compound from *Parawixia bistriata* spider venom. *Mol Pharmacol.* **72**, 1228-1237.
- Fontana, M.D., Lucas, H.S.M., Vital Brazil, O. (2002). Neuromuscular blocking action of the *Theraphosa blondii* spider venom. *J. Venom. Anim. Toxins* **8**, 317-323.
- Friedel, T., Nentwig, W., (1989). Immobilizing and lethal effects of spider venoms on the cockroach and the common mealbeetle. *Toxicon* **27**, 305-316.
- Gao, L., Shan, B.E., Chen, J., Liu, J.H., Song, D.X., Zhu, B.C. (2005). Effects of spider *Macrothele raven* venom on cell proliferation and cytotoxicity in HeLa cells. *Acta Pharmacol. Sin.* **26**, 369-376.
- Ginsborg, B.L., Warriner, J.N. (1960). The isolated chick biventer cervicis nerve muscle preparation. *Br. J. Pharmacol.* **15**, 410-415.

- Goldstein, S.A.N., Bayliss, D.A., Kim, D., Lesage, F., Plant, L.D. and Rajan, S. (2005). International Union of Pharmacology. LV. Nomenclature and molecular relationships of two-P potassium channels. *Pharmacol. Rev.* **57**, 527-540.
- Gomez, M.V., Kalapothakis, E., Guatimosim, C., Prado, M.A. (2002). *Phoneutria nigriventer* venom: a cocktail of toxins that affect ion channels. *Cell Mol. Neurobiol.* **22**, 579-588.
- Gopalakrishnakone, P., Gwee, M.C.E., Wong P.T.H. (1995). The black scorpion *Heterometrus longimanus*: structure of the venom secreting apparatus. *J. Nat. Toxins* **4**, 1-18.
- Graudins, A., Padula, M., Broady, K. W. and Nicholson, G. M. (2001). Red-back spider (*Latrodectus hasselti*) antivenom prevents the toxicity of widow spider venoms. *Ann. Emerg. Med.* **37**, 154-160.
- Graudins, A., Gunja, N., Broady, K., Nicholson, G. (2002a). Clinical and in vitro evidence for the efficacy of Australian red-back spider (*Latrodectus hasselti*) antivenom in the treatment of envenomation by a Cupboard spider (*Steatoda grossa*). *Toxicon* **40** (6), 767-775.
- Graudins, A., Wilson, D., Alewood, P. F., Broady, K. W. and Nicholson, G. M. (2002b). Cross-reactivity of Sydney funnel-web spider antivenom: neutralization of the in vitro toxicity of other Australian funnel-web (*Atrax* and *Hadronyche*) spider venoms. *Toxicon* **40** (3), 259-266.
- Grothaus, R.H., Howell, D.E. (1967). A new technique for the recovery of spider venoms. *J. Kans. Ent. Soc.* **40**, 37.
- Guilherme, P., Fernandes, I., Bárbaro, K.C. (2001). Neutralization of dermonecrotic and lethal activities and differences among 32-35 kDa toxins of medically important *Loxosceles* spider venoms in Brazil revealed by monoclonal antibodies. *Toxicon* **39**, 1333-1342.
- Gunning, S.J., Chong, Y., Khalife, A.A., Hains, P.G., Broady, K.W., Nicholson, G. M. (2003). Isolation of N-missulenatoxin-Mb1a, the major vertebrate-active spider N-toxin from the venom of *Missulena bradleyi* (Actinopodidae). *FEBS Lett.* **554**, 211-218.
- Gutman, G.A., Chandy, K.G., Grissmer, S., Lazdunski, M., Mckinnon, D., Pardo, L.A., Robertson, G.A., Rudy, B., Sanguinetti, M.C., Stuhmer, W., Wang, X. (2005). International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacol. Rev.* **57**, 473-508.
- Harvey A.L, Barfaraz A., Thomson E., Faiz A., Preston S., Harris J.B. (1994). Screening of snake venoms for neurotoxic and myotoxic effects using simple in vitro preparations from rodents and chicks. *Toxicon* **32**, 257-65.
- Herrero, M.V., Gutiérrez, J.M. (1984). The myonecrotic effect of the venom of *Aphonopelma seemanni* (Araneae: Theraphosidae) of Costa Rica in the white mouse. *Rev. Biol. Trop.* **32**, 173-175.
- Herrero, M.V., Odell, G.V. (1988). Characteristics of the venoms and digestive secretions of *Aphonopelma seemanni* and *Sphaerobothria hoffmani* (Araneae: Theraphosidae) of Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.* **36**, 241-246.
- Herzig, V., Ward, R.J., dos Santos, W.F. (2002). Intersexual variations in the venom of the Brazilian "armed" spider *Phoneutria nigriventer* (Keyserling, 1891). *Toxicon* **40**, 1399-1406.
- Herzig, V., Ward, R.J., Santos, W.F. (2004). Ontogenetic changes in *Phoneutria nigriventer* (Araneae, Ctenidae) spider venom. *Toxicon* **44**, 635-640.
- Hink, W.F., Pappas, P.W., Jaworski, D.C. (1994). Partial biochemical characterization of venom from the ant, *Pseudomyrmex triplarinus*. *Toxicon* **32**, 763-772.

- Hisada, M., Fujita, T., Naoki, H., Itagaki, Y., Irie, H., Miyashita, M., Nakajima, T. (1998). Structures of spider toxins: hydroxyindole-3-acetylpolyamines and a new generalized structure of type-E compounds obtained from the venom of the joro spider, *Nephila clavata*. *Toxicon* **36**, 1115-1125.
- Huang, P.-T., Shiau, Y.-S., Lou, K.-L. (2007). The interaction of spider gating modifier peptides with voltage-gated potassium channels. *Toxicon* **49**, 285-292.
- Hurwitz, C.G., Hu, V.Y., Segal, A.S. (2002). A machanogated nonselective cation channel in proximal tubule that is ATP sensitive. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **283**, F93-F104.
- Isbister, G.K., Seymour, J.E., Gray, M.R., Ravend, R.J. (2003). Bites by spiders of the family Theraphosidae in humans and canines. *Toxicon* **41**, 519-524.
- Isbister G.K., Gray, M.R., Balit, C.R., Raven, R.J., Stokes, B.J., Porges, K., Tankel, A.S., Turner, E., White, J., Fisher, M. McD. (2005). Funnel-web spider bite: a systematic review of recorded clinical cases. *Med. J. Aust.*, **182**, 407-411.
- Jälfors, U., Smith, D.S., Russel, F.E. (1969). Nerve endings in the venom gland of the spider *Latrodectus mactans*. *Toxicon* **7**, 263-265.
- Joo, H.S., Park, G.C., Cho, W.R., Tak, E., Paik, S.R., Chang, C.S. (2002). Purification and characterization of a prothrombin-activating protease in *Nephila clavata*. *Toxicon* **40**, 289-296.
- Kaiser, I.I., Griffin, P.R., Aird, S.D., Hudiburg, S., Shabanowitz, J., Francis, B., John, T.R., Hunt, D.F., Odell, G.V. (1994). Primary structures of two proteins from the venom of the Mexican red knee tarantula (*Brachypelma smithii*). *Toxicon* **32**, 1083-1093.
- Kalapothakis, E., Kushmerick, C., Gusmão, D.R., Favaron, G.O., Ferreira, A.J., Gomez, M.V., Pinto de Almeida, A. (2003). Effects of the venom of a mygalomorph spider (*Lasiadora* sp.) on the isolated rat heart. *Toxicon* **41**, 23-28.
- Keith, R. A., Mangano, T. J., Lampe, R. A., Defeo, P. A., Hyde, M. J. and Donzanti, B. A. (1995). Comparative actions of synthetic omega-grammotoxin SIA and synthetic omega-Aga-IVA on neuronal calcium entry and evoked release of neurotransmitters in vitro and in vivo. *Neuropharmacology* **34**, 1515-1528.
- Kerchove, C.M., Carneiro, S.M., Markus, R.P., Yamanouye, N. (2004) Stimulation of the α -adrenoceptor triggers the venom production cycle in the venom gland of *Bothrops jararaca*. *J. Exp. Biol.* **207**, 411-416.
- King, G.F. (2004). Editorial. *Toxicon* **43**, 471-475.
- Klauber LM (1972) *Rattlesnakes: their Habits, Life Histories and Influence on Mankind*. 2 Vol. University of California Press: Berkley.
- Klowden, M.J., Vitale, A.J., Trumble, M.J., Wessan, C.R., Trumble, W.R. (1992). A bioassay for cobra cardiotoxin activity using semi-isolated cockroach heart. *Toxicon*. **30**, 295-301.
- Kochva, E. (1978). Oral glands of the Reptilia. In: *Biology of the Reptilia. Vol. 8. Physiology B*. (Gans C, Gans KA, eds.). pp. 43-94. Academic Press, New York.
- Kochva, E. (1987). The origin of snakes and evolution of the venom apparatus. *Toxicon* **25**, 65-106.
- Korszniak, N.V., Story, D.F. (1993). α - and β -adrenoceptor agonist activity in the venom of the Australian huntsman spiders, *Delena cancerides* and *Isopeda montana*. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **20**, 127-134.
- Kovoor, J., Zylberg, L. (1971). Histologie et infrastructure de la glande chelicérienne de *Pholcus phalangoides* Fuessl, a divers stades du cycle sécrétoire. *Arch. Zool. Exp. Gen.* **112**, 117-134.

- Kubo, Y., Adelman, J.P., Clapham, D.E., Jan, L.Y., Karschin, A., Kurachi, Y., Lazdunski, M., Nichols, C.G., Seino, S., Vandenberg, C.A. (2005). International Union of Pharmacology. LIV. Nomenclature and molecular relationships of inwardly rectifying potassium channels. *Pharmacol. Rev.* **57**, 509-526.
- Kuhn-Nentwig, L., Dathe, M., Walz, A., Schaller, J., Nentwig, W. (2002a). Cupiennin 1: the cytolytic activity depends on the hydrophobic N-terminus and is modulated by the polar C-terminus. *FEBS Lett.* **527**, 193-198.
- Kuhn-Nentwig, L., Muller, J., Schaller, J., Walz, A., Dathe, M., Nentwig, W. (2002b). Cupiennin 1, a new family of highly basic antimicrobial peptides in the venom of the spider *Cupiennius salei* (Ctenidae). *J. Biol. Chem.* **277**, 11208-11216.
- Kuhn-Nentwig, L., Nentwig, W., 1997. Venom of the hunting spider *Cupiennius salei* (Ctenidae). *Toxicon* **35**, 813.
- Kuhn-Nentwig, L., Schaller, J., Nentwig, W. (2004). Biochemistry, toxicology and ecology of the venom of the spider *Cupiennius salei* (Ctenidae). *Toxicon* **43**, 543-553.
- Kunitz, M. (1947). Crystalline soybean trypsin inhibitor II. General properties. *J. Gen. Physiol.* **32**, 291-310.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lampe, B.A. (1993). Isolation and pharmacological characterization of ω -grammotxin SAI, a novel peptide inhibitor of neuronal voltage sensitive calcium channel responses. *Mol. Pharmacol.* **44**, 451-460.
- Lang, J., Ushkaryov, Y., Grasso, A., Wollheim, C.B. (1998). Ca^{2+} -independent insulin exocytosis induced by α -latrotoxin requires latrophilin, a G protein-coupled receptor. *EMBO J.* **17**, 648-657.
- Lange, C., Paris, C., Celerier, M.L. (1992). The components of the venom of a spider *Scodra griseipes*. 2. Structural information on biogenic amines using tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **6**, 517-519.
- Le Sueur, L.P., Collares-Buzato, C.B., Kalapothakis, E. e Cruz-Höfling, M.A. (2005). In vitro effect of the *Phoneutria nigriventer* spider venom on cell viability, paracellular barrier function and transcellular transport in cultured cell lines. *Toxicon* **46**, 130-141.
- Lee, C.W., Kim, S., Roh, S.H., Endoh, H., Kodera, Y., Maeda, T., Kohno, T., Wang, J.M., Swartz, K.J. and Kim, J.I. (2004). Solution structure and functional characterization of SGTx1, a modifier of Kv2.1 channel gating. *Biochemistry* **43**, 890-897.
- Lee, C.K., Chan, T.K., Ward, B.C., Howell, D.E., Odell, G.V. (1974). The purification and characterization of a necrotoxin from tarantula, *Dugesia hentzi*, venom. *Arch. Biochem. Biophys.* **164**, 341-350.
- Liang, S. (2004). An overview of peptide toxins from the venom of the Chinese bird spider *Selenocosmia huwena* Wang [= *Ornithoctonus huwena* (Wang)]. *Toxicon* **43**, 575-585.
- Liao, Z., Yuan, C., Peng, K., Xiao, Y., Liang, S. (2007). Solution structure of Jingzhaotoxin-III, a peptide toxin inhibiting both Nav1.5 and Kv2.1 channels. *Toxicon* **50**, 135-143.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
- Lucas, S. (1988). Spiders in Brazil. *Toxicon* **26**, 759-772.
- Lucas, S., da Silva Jr, E., Bertani, R. (1993). *Vitalius*, a new genus of the subfamily Theraphosinae Thorell, 1870 from Brazil (Aranae, Theraphosidae). *Spixiana Zeitsch. Zool.* **16**, 241-245.

- Lucas, S., da Silva Jr, E., Bertani, R., Cardoso, J.L. (1994). Mygalomorph spider bites: a report on 91 cases in the state of São Paulo, Brazil. *Toxicon* **32**, 1211-1215.
- Malli, H., Kuhn-Nentwig, L., Imboden, H., Moon, M.J., Wyler, T. (2000). Immunocytochemical localization and secretion process on the toxin CSTX-1 in the venom gland of the wandering spider *Cupiennius salei* (Araneae: Ctenidae). *Cell Tissue Res* **299**, 417-426.
- Marangoni, R.A., Antunes, E., Brain, S.D., de Nucci, G. (1993). Activation by *Phoneutria nigriventer* armed spider venom of tissue kallikrein-kininogen-kinin system in rabbit skin *in vivo*. *Br. J. Pharmacol.* **109**, 539-543.
- Marangoni, S., Borges, N.C., Marangoni, R.A., Antunes, E., Vieira, C.A., Novello, J.C., Domont, G.B., Giglio, J.R., Oliveira, B., de Nucci, G. (1993). Biochemical characterization of a vascular smooth muscle contracting polypeptide purified from *Phoneutria nigriventer* (armed spider) venom. *Toxicon* **31**, 377-384.
- Martinez, M., Rael, E.D., Maddux, N.L. (1990). Isolation of a hemorrhagic toxin from Mojave rattlesnake (*Crotalus scutulatus scutulatus*) venom. *Toxicon* **28**, 685-694.
- Mazzuca, M., Heurteaux, C., Alloui, A., Diocot, S., Baron, A., Voilley, N., Blondeau, N., Escoubas, P., Gelot, A., Cupo, A., Zimmer, A., Zimmer, A. M., Eschaliere A., M. Lazdunski (2007). A tarantula peptide against pain via ASIC1a channels and opioid mechanisms. *Nat Neurosci* **10**, 943-945.
- McCormik, K.D., Meinwald, J. (1993). Neurotoxic acylpolyamines from spider venoms. *J. Ecol. Chem.* **19**, 2411-2451.
- McDonough, S.I., Lampe, R.A., Keith, R.A., Bean, B.P. (1997). Voltage-dependent inhibition of N- and P-type calcium channels by the peptide toxin ω -grammotoxin-SIA. *Mol. Pharmacol.* **52**, 1095-1104.
- Milescu, M., Vobecky, J., Roh, S. H., Kim, S. H., Jung, H. J., Kim, J. I. and Swartz, K. J. (2007). Tarantula toxins interact with voltage sensors within lipid membranes. **130**, 497-511.
- Minton, S.A. (1975) A note on the venom of an aged rattlesnake. *Toxicon* **13**, 73-74.
- Moon, M.J. (1996). Fine structural analysis of the neuromuscular junction in the venomous organ of the spider, *Agelena limbata* (Araneae: Ageleneidae). *Korean J. Zool.* **39**, 223-230.
- Morgans, D., Carroll, P.R. (1976). A direct acting adrenergic component of the venom of the Sydney funnel-web spider, *Atrax robustus*. *Toxicon* **14**, 185-189.
- Morris, J.J., Russel, R.L. (1975). The venom of brown recluse spider *Loxosceles reclusa*: composition, properties and an improved method of procurement. *Fed. Proc.* **34**, 225.
- Nagaraju, S., Devaraja, S., Kemparaju, K. (2007). Purification and properties of hyaluronidase from *Hippasa partita* (funnel web spider) venom gland extract. *Toxicon* **50**, 383-393.
- Newcomb, R., Szoke, B., Palma, A., Wang, G., Chen, X., Hopkins, W., Cong, R., Miller, J., Urge, L., Tarczy-Hornoch, K., Loo, J.A., Dooley, D.J., Nadasdi, L., Tsien, R.W., Lemos, J., Miljanich, G. (1998). Selective peptide antagonist of the class E calcium channel from the venom of the tarantula *Hysterocrates gigas*. *Biochemistry* **37**, 15353-15362.
- Nicholson, G.M. (2007). Insect-selective spider toxins targeting voltage-gated sodium channels. *Toxicon* **49**, 490-512.
- Nirathanan, S., Joseph, J.S., Gopalakrishnakone, P., Khoo, H. E., Cheah, L. S., Gwee, M. C. (2002). Biochemical and pharmacological characterization of the venom of the black scorpion *Heterometrus spinifer*. *Biochem. Pharmacol.* **63**, 49-55.

- Nishikawa, A.K., Caricati, C.P., Lima, M.L., Dos Santos, M.C., Kipnis, T.L., Eickstedt, V.R., Knysak, I., Da Silva, M.H., Higashi, H.G. and Da Silva, W.D. (1994). Antigenic cross-reactivity among the venoms from several species of Brazilian scorpions. *Toxicon* **32**, 989-998.
- Oliveira, K.C., Andrade R.M.G., Piazza, R.M.F., Ferreira Jr, J.M.C., van den Berg, C.W., Tambourgi, D.V. (2005). Variations in *Loxosceles* spider venom composition and toxicity contribute to the severity of envenomation. *Toxicon* **45**, 421-429.
- Oswald, R.E., Suchyna, T.M., McFeeters, R., Gottlieb, P., Sachs, F. (2002). Solution structure of peptide toxins that block mechanosensitive ion channels. *J. Biol. Chem.* **277**, 34443-34450.
- Ownby, C.L., Odell, G.V. (1983). Pathogenesis of skeletal muscle necrosis induced by tarantula venom. *Exp. Mol. Pathol.* **38**, 283-296.
- Palma, M.S., Itagaki, Y., Fujita, T., Naoki, H., Nakajima, T. (1998). Structural characterization of a new acylpolyamine toxin from the venom of Brazilian garden spider *Nephilengys cruentata*. *Toxicon* **36**, 485-493.
- Pascarel, C., Cazorla, O., Le Guennec, J.Y., Orchard C.H., White, E. (1997). The effect of the venom of a Chilean tarantula, *Phrixotrichus spatulatus*, on isolated guinea pig ventricular myocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **147**, 363-371.
- Perret, B.A. (1977). Proteolytic activity of tarantula venoms due to contamination with saliva. *Toxicon* **15**, 505-510.
- Phillips, L.R., Milesescu, M., Li-Smerin, Y., Mindell, J.A., Kim, J.I., Swartz, K.J. (2005). Voltage-sensor activation with a tarantula toxin cargo. *Nature* **436**, 857-860
- Pimenta, A.M.C., Rates, B, Bloch Jr., C., Gomes, P.C., Santoro, M.M., Lima, M.E., Richardson, M., Cordeiro, M.N. (2005). Electrospray ionization quadrupole time-of-flight and matrix-assisted laser desorption/ionization tandem time-of-flight mass spectrometric analyses to solve micro-heterogeneity in post-translationally modified peptides from *Phoneutria nigriventer* (Aranea, Ctenidae) venom. *Rapid Commun Mass Spectrom* **19**, 31-37.
- Piser, T.M., Lampe, R.A., Keith, R.A., Thayer, S.A. (1994). Omega-grammotxin blocks action-potential-induced Ca^{2+} influx and whole-cell Ca^{2+} current in rat dorsal-root ganglion neurons. *Pflugers Arch.* **426**, 214-220.
- Platnik, N.I. (2007). The World Spider Catalog, Version 8.0. American Museum of Natural History. <http://research.amnh.org/entomology/spiders/catalog/INTRO1.html>
- Predel, R., Kellner, R., Rapus, J., Nachman, R., Gäde, G. (1999). Post-translational modifications of the insect sulfakinins. *Eur. J. Biochem.* **263**, 552-560.
- Pretel, F., Gonçalves-de-Andrade, R.M., Magnoli, F.C., da Silva, M.E., Ferreira, J.M. Jr, van den Berg, C.W., Tambourgi, D.V. (2005). Analysis of the toxic potential of venom from *Loxosceles adelaida*, a Brazilian brown spider from karstic areas. *Toxicon* **45**, 449-458.
- Priest, B.T., Blumenthal, K.M., Smith, J.J., Warren, V.A., Smith, M.M. (2007). ProTx-I and ProTx-II: gating modifiers of voltage-gated sodium channels. *Toxicon* **49**, 194-201.
- Ramos-Cerrillo, B., Olvera, A., Odell, G.V., Zamudio, F., Paniagua-Solís, J., Alagón, A., Stock, R.P. (2004). Genetic and enzymatic characterization of sphingomyelinase D isoforms from the North American fiddleback spiders *Loxosceles boneti* and *Loxosceles reclusa*. *Toxicon* **44**, 507-514.
- Rash, L.D., Hodgson, W.C. (2002). Pharmacology and biochemistry of spider venoms. *Toxicon* **40**, 225-254.

- Rash, L.D., Birinyi-Strachan, L.C., Nicholson, G.M., Hodgson, W.C. (2000b). Neurotoxic activity of venom from the Australian Eastern mouse spider (*Missulena bradleyi*) involves modulation of sodium channel gating. *Br. J. Pharmacol.* **130**, 1817-1824.
- Rego, E., Bento, A.C., Lopes-Martins, R.A., Antunes, E., Novello, J.C., Marangoni, S., Giglio, J.R., Oliveira, B., De Nucci, G. (1996). Isolation and partial characterization of a polypeptide from *Phoneutria nigriventer* spider venom that relaxes rabbit corpus cavernosum in vitro. *Toxicon* **34**, 1141-1147.
- Romero, F., Altieri, E., Urrutia, M., Jara, J. (2003). Venom of *Latrodectus mactans* from Chile (Araneae, Theridiidae): effect on smooth muscle. *Rev. Biol. Trop.* **51**, 305-312.
- Ruppert, E.E., Barnes, R.D. (1996). *Zoologia dos Invertebrados*. 6ª Edição, Ed. Roca. São Paulo.
- Russell, F.E., Jarlfors, U., Smith, D.S. (1973). Preliminary report on the fine structure of the venom gland of the tarantula. *Toxicon* **11**, 439-440.
- Santos, R.G., Diniz, C.R., Cordeiro, M.N. and Lima, M.E.D. (1999). Binding sites and actions of Tx1, a neurotoxin from the venom of the spider *Phoneutria nigriventer*, in guinea pig ileum. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **32**, 1565-1569.
- Santos, V.L.P. dos, Franco, C.R.C., Viggiano, R.L.L., Silveira, R.B. da, Cantão, M.P., Manglini, O.C., Veiga, S.S., Gremski, W. (2000). Structural and ultrastructural description of the venom gland of *Loxosceles intermedia* (brown spider). *Toxicon* **38**, 265-285.
- Savel-Niemann, A. (1989). Tarantula (*Eurypelma californicum*) venom, a multicomponent system. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* **370**, 485-498.
- Schanbacher, F.L., Lee, C.K., Hall, J.E., Wilson, I.B., Howell, D.E., Odell, G.V. (1973a). Composition and properties of the tarantula *Dugesia hentzi* (Girard) venom. *Toxicon* **11**, 21-29.
- Schanbacher, F.L., Lee, C.K., Wilson, I.B., Howell, D.E., Odell, G.V. (1973b). Purification and characterization of tarantula, *Dugesia hentzi* (Girard) venom hyaluronidase. *Comp. Biochem. Physiol. B* **44**, 389-396.
- Shotton, D.M. (1970). Elastase. *Meth. Enzymol.* **19**, 113-117.
- Shu, Q., Liang, S.P. (1999). Purification and characterization of huwentoxin-II, a neurotoxic peptide from the venom of the Chinese bird spider *Selenocosmia huwena*. *J. Pept. Res.* **53**, 486-491.
- Siemens, J., Zhou, S., Piskorowski, R., Nikai, T., Lumpkin, E. A., Basbaum, A. I., King, D., Julius, D. (2006). Spider toxins activate the capsaicin receptor to produce inflammatory pain. *Nature* **444** (9), 208-212.
- Silva, L.M., Pimenta, P.F.P., Secundino, N.F.C., Diniz, M.R.V., Fortes-Dias, C.L. (2004). Structural analysis of the venom gland of the armed spider *Phoneutria nigriventer*. VIII Symposium of the Pan American Section of the International Society on Toxinology, Programme and abstracts, p.139.
- Silveira, R.B.D., Chaima, O.M., Mangilic, O.C., Gremski, W., Dietricha, C.P., Nadera, H.B. and Veiga, S.S. (2007). Hyaluronidases in *Loxosceles intermedia* (Brown spider) venom are endo-b-N-acetyl-D-hexosaminidases hydrolases. *Toxicon* **49**, 758-768.
- Silveira, R.B., Santos-Filho, J.S, Mangili, O.C., Veiga, S.S., Gremski, W., Nader, H.B., von Dietrich C.P. (2002). Identification of proteases in the extract of venom glands from brown spiders. *Toxicon* **40**, 815-822.
- Silvestre, F.G., de Castro, C.S., de Moura, J.F., Giusta, M.S., De Maria, M., Alvares, E.S., Lobato, F.C., Assis, R.A., Goncalves, L.A., Gubert, I.C., Chavez-Olórtegui, C., Kalapothakis, E. (2005). Characterization of the venom from the brazilian brown spider *Loxosceles similis* Moenkhaus, 1898 (Araneae, Sicariidae). *Toxicon* **46**, 927-936.

- Skinner, W.S., Dennis, P.A., Lui, A., Carney, R.L., Quistad, G.B. (1990). Chemical characterization of acylpolyamine toxins from venom of a trap-door spider and two tarantulas. *Toxicon* **28**, 541-546.
- Smith, C.W., Micks, D.W. (1968). A comparative study of the venom and other compounds of three species of *Loxosceles*. *Am. J. Med. Hyg.* **17**, 651.
- Smith, D.S., Russell, F.E. (1966). Structure of the venom gland of the black widow spider *Latrodectus mactans*. A preliminary light and electron microscopic study. In: *Animal Toxins*. (Russell, F.E., Saunders, P.R., eds). pp. 1-15. Pergamon Press: Oxford.
- Sosa, B.P., Alagón, A.C., Possani, L.D., Juliá, J.Z. (1979). Comparison of phospholipase activity with direct and indirect lytic effects of animal venoms upon human red cells. *Comp. Biochem. Physiol. Part B* **64**, 231-234.
- Spraul, C.W., Wagner, P., Lang, G.E., Lang, G.K. (2003). Ophthalmia nodosa caused by the hairs of the bird spider (family Theraphosidae) of hairy megalomorph (known in the US as tarantula)—case report and review of the literature. *Klin. Monatsbl. Augenheilkd.* **220**, 20-23.
- Stoscheck, C. (1990). Quantitation of protein. *Meth. Enzymol.* **182**, 50-69.
- Suchyna, T.M., Johnson, J.H., Hamer, K., Leykam, J.F., Gage, D.A., Clemo, H.F., Baumgarten, C.M., Sachs, F. (2000). Identification of a peptide toxin from *Grammostola spatulata* spider venom that blocks cation-selective stretch-activated channels. *J. Gen. Physiol.* **115**, 583-598.
- Suchyna, T.M., Tape, S.E., Koeppe, R.E., Andersen, O.S., Sachs, F., Gottlieb, P.A. (2004). Bilayer-dependent inhibition of mechanosensitive channels by neuroactive peptide enantiomers. *Nature* **430**, 235-240.
- Swanson, D. L. e Vetter, R. S. (2006). Loxoscelism. *Clinics in Dermatology* **24** (3), 213-221.
- Swartz, K.J., MacKinnon, R. (1995). An inhibitor of the Kv2.1 potassium channel isolated from the venom of a Chilean tarantula. *Neuron*. **15**, 941-949.
- Swartz, K.J., MacKinnon, R. (1997). Hanatoxin modifies the gating of a voltage-dependent K⁺ channel through multiple binding sites. *Neuron* **18**, 665-673.
- Swartz, K. J. (2007). Tarantula toxins interacting with voltage sensors in potassium channels. *Toxicon* **49**, 213-230.
- Takaoka, M., Nakajima, S., Sakae, H., Nakamura, T., Tohma, Y., Shiono, S., Tabuse, H. (2001). Tarantulas bite: two case reports of finger bite from *Haplopelma lividum*. *Chudoku Kenkyu* **14**, 247-250.
- Takeuchi, K., Park, E.J., Lee, C.W., Kim, J.I., Takahashi, H., Swartz, K.J. and Shimada, I. (2002). Solution structure of omega-grammotoxin SIA, a gating modifier of P/Q and N-type Ca²⁺ channel. *J. Mol. Biol.* **321**, 517-526.
- Tambourgi, D.V., Magnoli, F.C., van den Berg, C.W., Morgan, B.P., Araujo, P.S., Alves, E.W., Silva, W.D. (1998). Sphingomyelinases in the venom of the spider *Loxosceles intermedia* are responsible for both dermonecrosis and complement-dependent hemolysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **251**, 366-373.
- Teixeira C.E, Priviero F.B.M., Okuyama C.E., de Nucci G., Antunes E. (2003). Pharmacological characterization of the presynaptic activity of *Tityus serrulatus* venom in the rat anococcygeus muscle. *Toxicon* **42**, 451-460.
- Teixeira, C.E., Corrado, A.P., De Nucci G., Antunes E. (2004a). Role of Ca²⁺ in vascular smooth muscle contractions induced by *Phoneutria nigriventer* spider venom. *Toxicon* **43**, 61-68.
- Teixeira, C.E., de Oliveira, J.F., Baracat, J.S., Priviero F.B., Okuyama, C.E., Rodrigues Netto, N. Jr, Fregonesi, A., Antunes, E., De Nucci, G. (2004b). Nitric oxide release from human corpus cavernosum induced by a purified scorpion toxin. *Urology* **63**, 184-189.

- Teixeira, C.E., Baracat, J.S., Arantes, E.C., De Nucci, G., Antunes, E. (2005). Effects of beta-adrenoceptor antagonists in the neural nitric oxide release induced by electrical field stimulation and sodium channel activators in the rabbit corpus cavernosum. *Eur. J. Pharmacol.* **519**, 146-153.
- Tenkin, S., Hansen, P.J. (1998). Use the Bradford protein assay in a microtiter plate format. On line: <http://www.animal.ufl.edu/hansen/protocols/minibradford.htm>
- Tertyshnikova, S., Matson, J.A., Thalody, G., Lodge, N.J. (2003). Partially purified *Grammostola spatulata* venom inhibits stretch activated calcium signaling in bladder myocytes and improves bladder compliance in an in vitro rat whole bladder model. *J. Urol.* **169**, 756-760.
- Toro, A.F., Malta, M.B., Soares, S.L., Da Rocha, G.C., Da Silva Lira, M., De Oliveira, T.A., Takehara, H.A., Lopes-Ferreira, M., Santoro, M.L., Guidolin, R., Gondo Higashi, H., Fernandes, I. and Barbaro, K.C. (2006). Role of IgG(T) and IgG_a isotypes obtained from arachnidic antivenom to neutralize toxic activities of *Loxosceles gaucho*, *Phonetreria nigriventer* and *Tityus serrulatus* venoms. *Toxicon* **48**, 649-661.
- Tu, A.T. (1977). *Venoms: Chemistry and Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc. NY.
- Usherwood, P.N., Blagbrough, I.S. (1991). Spider toxins affecting glutamate receptors: polyamines in therapeutic neurochemistry. *Pharmacol. Ther.* **52**, 245-268.
- Usherwood, P.N., Blagbrough, I.S., Brackley, P.T.H., Kerry, C.J., Sudan, A.L., Nakanishi, K. (1992). Polyamines and polyamine containing toxins, modulators and antagonists of excitatory amino acids receptors. In: Kawai, N., Nakajima, T., Barnard, E., (Eds.). *Neuroceptors, Ion channels, and the Brain*. Elsevier, Amsterdam, p. 11-20.
- Vapenik, Z. e Nentwig, W. (2000). The influence of hunger and breeding temperature on the venom production of the spider *Cupiennius salei* (Araneae, Ctenidae). *Toxicon*, **38**, 293-298.
- Veiga, S.S., Silveira, R.B., Dreyfuss, J.L., Haoach, J., Pereira, A.M., Mangili, O.C., Gremski, W. (2000). Identification of high molecular weight serine-proteases in *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. *Toxicon* **38**, 825-839.
- Veiga, S.S., Feitosa, L., dos Santos, V.L., de Souza, G.A., Ribeiro, A.S., Mangili, O.C., Porcionatto, M.A., Nader, H.B., Dietrich, C.P., Brentani, R.R., Gremski, W. (2000). Effect of brown spider venom on basement membrane structures. *Histochem. J.* **32**, 397-408.
- Veiga, S.S., Zanetti, V.C., Braz, A., Mangili, O.C., Gremski, W. (2001). Extracellular matrix molecules as targets for brown spider venom toxins. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **34**, 843-850.
- Veiga, S.S., Zanetti, V.C., Franco, C.R., Trindade, E.S., Porcionatto, M.A., Mangili, O.C., Gremski, W., Dietrich, C.P., Nader, H.B. (2001). In vivo and in vitro cytotoxicity of brown spider venom for blood vessel endothelial cells. *Thromb. Res.* **102**, 229-237.
- Vetter, R.S., Cushing, P.E., Crawford, R.L., Royce, L.A. (2003). Diagnoses of brown recluse spider bites (loxoscelism) greatly outnumber actual verifications of the spider in four western American states. *Toxicon* **42**, 413-418.
- Vilaplana, L., Maestro, J.L., Piulachs, M.D., Bellés, X. (1999). Modulation of cardiac rhythm by allostatins in the cockroach *Blattella germanica* (L.) (Dictyoptera, Blattellidae). *J. Insect Physiol.* **45**, 1057-1064.
- Waldmann, R., Lazdunski, M. (1998). H⁺-gated cation channels: neuronal acid sensors in the NaC/DEG family oh ion channels. *Curr. Opin. Neurobiol.* **8**, 418-424.

- Wei, A.D., Gutman, G.A., Aldrich, R., Chandy, K.G., Grissmer, S., Wulff, H. (2005). International Union of Pharmacology. LII. Nomenclature and molecular relationships of calcium-activated potassium channels. *Pharmacol. Rev.* **57**, 463-472.
- Welsh, J.H., Batty, C.S. (1963). 5-Hydroxytryptamine content of some arthropod venoms and venom containing parts. *Toxicon* **1**, 165-173.
- Williams, K. (1997) Interactions of polyamines with ion channels. *Biochem. J.* **325**, 289-297.
- Wullschleger, B., Nentwig, W. (2002) Influence of venom availability on a spider's prey-choice behaviour. *Funct. Ecol.* **16**, 802-807.
- Xiao, Y., Li, J., Deng, M., Dai, C., Liang, S. (2007). Characterization of the excitatory mechanism induced by jingzhaotoxin-I inhibiting sodium channel inactivation. *Toxicon* **50**, 507-517.
- Yamanouye, N., Carneiro, S.M., Scrivano, C.N., Markus, R.P. (2000) Characterization of β -adrenoceptors responsible for venom production in the venom gland of the snake *Bothrops jararaca*. *Life Sci.* **67**, 217-226.
- Yan, L., Adams, M.E. (1998). Lycotoxins, antimicrobial polypeptides from venom of the wolf spider *Lycosa carolinensis*. *J. Biol. Chem.* **273**, 2059-2066.
- Yigit, N. Guven, T. (2006). Functional structure of *Agelena labyrinthica*'s (Araneae:Agelenidae) venom gland and electrophoresis of venom. *Toxicon* **47**, 58-67.
- Yigit, N., Güven, T., Bayram, A. and Çavusoglu, K. (2004). A morphological study on the venom apparatus of the spider *Agelena labyrinthica* (Araneae, Agelenidae). *Turk. J. Zool.* **28**, 149-153.
- Young, A.R., Pincus, S.J. (2001). Comparison of enzymatic activity from three species of necrotising arachnids in Australia: *Loxosceles rufescens*, *Badumna insignis* and *Lampona cylindrata*. *Toxicon* **39**, 391-400.
- Yuan C., Yang S., Liao Z., Liang S. (2007). Effects and mechanism of Chinese tarantula toxins on the Kv2.1 potassium channels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **352**, 799-804.
- Zanchet, E.M., Cury, Y. (2003). Peripheral tachykinin and excitatory amino acid receptors mediate hyperalgesia induced by *Phoneutria nigriventer* venom. *Eur. J. Pharmacol.* **467**, 111-118.
- Zeng, X.Z., Xiao, Q.B. and Liang, S.P. (2003). Purification and characterization of raventoxin-I and raventoxin-III, two neurotoxic peptides from the venom of the spider *Macrothele raveni*. *Toxicon* **41**, 651-656.
- Zhou, P.A., Xie, X.J., Li, M., Yang, D.M., Xie, Z.P., Zong, X., Liang, S.P. (1997). Blockade of neuromuscular transmission by huwentoxin-I, purified from the venom of the Chinese bird spider. *Toxicon* **35**, 39-45.