

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JENIFER NOWATZKI

CÉLULAS ENDOTELIAIS EXPOSTAS AO VENENO DE *L. intermedia* SÃO  
INDUZIDAS À APOPTOSE PELO DESALOJAMENTO CELULAR (*ANOIKIS*)  
SENDO QUE A AÇÃO DIRETA DAS TOXINAS É INIBIDA PELO PROTEOGLICANO  
DE HEPARAM SULFATO

CURITIBA

2009

Nowatzki, Jenifer

**Células endoteliais expostas ao veneno de *L. intermedia* são induzidas a apoptose pelo desalojamento celular (*anoikis*) sendo que a ação direta das toxinas é inibida pelo proteoglicano de heparam sulfato.**

Curitiba, 2009. 110p.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná- UFPR

1. *Loxosceles intermedia*. 2. Células endoteliais. 3. Endocitose. 4. *Anoikis*. 5. Heparan sulfato.

JENIFER NOWATZKI

CÉLULAS ENDOTELIAIS EXPOSTAS AO VENENO DE *L. intermedia* SÃO  
INDUZIDAS À APOPTOSE PELO DESALOJAMENTO CELULAR (*ANOIKIS*)  
SENDO QUE A AÇÃO DIRETA DAS TOXINAS É INIBIDA PELO PROTEOGLICANO  
DE HEPARAM SULFATO

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular

Orientador: Prof. Dr. Edvaldo da Silva Trindade

Co-orientadora: Profa. Dra. Célia Regina Cavichiolo Franco

CURITIBA

2009

*À minha família por me apoiarem em todos os meus sonhos e pelo esforço e dedicação em sempre buscar me dar o melhor de cada um de vocês. Em todos os momentos da minha vida acreditaram no meu potencial, me incentivando a lutar pelos meus ideais. Vocês simplesmente me ensinaram a viver... Amo muito vocês!*

*À meu amado príncipe Willian Dantas por todo apoio, carinho, amor, incentivo, cuidado, obrigada por ser o melhor de Deus na minha vida e me fazer a mulher mais feliz do mundo todos os dias. Amo você!*

## **AGRADECIMENTOS**

Acima de tudo agradeço a Deus, é Ele quem tem me capacitado e me conduzido, é Dele que vêm a minha força e a minha segurança. Porque, Dele por Ele, para Ele são todas as coisas, inclusive minha vida.

À Profa. Dra. Célia Regina Cavichiolo Franco pela oportunidade e pelo crescimento profissional que me proporcionou ao longo desses anos.

Ao Prof. Dr. Edvaldo da Silva Trindade pelo grande aprendizado proporcionando ao longo desse período, pela agradável convivência e pela disposição em sempre sugerir experimentos, tirar dúvidas, fazer protocolos e no final corrigir a dissertação.

Ao Prof. Dr. Silvio Sanches Veiga pelo exemplo de seriedade, disciplina e competência. Obrigado por todo o suporte estrutural, físico e financeiro.

À Profa. Dra. Constance Oliver pela grandiosa contribuição para os experimentos de endocitose, obrigada pela disposição e simpatia.

À agora doutora Kátia Sabrina Paludo por todo apoio, sempre disposta a compartilhar seus conhecimentos e habilidades, sempre disposta há salvar o dia! Vocês é exemplo de dedicação, esforço e competência. A vida no Anexo seria muito mais dura sem a sua companhia nesse tempo. Além disso, obrigada pela amizade, episódios de Lost, atualizações acerca da Bolsa de Valores, almoços no Anexo, corridas no final da tarde, caronas até o centro, enfim, você é uma pessoa fantástica!!!

Ao colega e amigo Reginaldo Vieira de Sene por toda a ajuda no laboratório e companheirismo. Foram bons momentos de trabalho, de conversas, de congressos. Quando pensar nesse tempo, sempre lembrarei de você como meu amigo mineiro que sempre me fazia rir das situações mais inusitadas e estava presente em todos os momentos, até nos domingos às sete da manhã quando eu esquecia a chave do laboratório.

À todo o pessoal do laboratório conhecido como “Anexo”. A Jeniffer 2, pela amizade e boas conversas dentro e fora do laboratório, sem falar nas muitas risadas. Ao Leandro (Luigi), o melhor estagiário do mundo. Ao Gabriel, Fernanda, Adriano, Stelley pelo companheirismo.

Ao pessoal do LME (Laboratório de Matriz Extracelular e Biotecnologia de Venenos) pela constante ajuda em todos os momentos e por sempre me considerarem como “da

casa”. Poderia agradecer nominalmente cada um por algum “grande detalhe” que fez diferença, mas não quero correr o risco de esquecer ninguém. Vocês são sensacionais!

Ao pessoal do Laboratório de Neurobiologia, em especial o Luis com sua ajuda nos mil Westerns que não davam certo. Obrigado por me fazerem companhia em janeiro quando todo mundo estava de férias, menos vocês.

Ao Fernando e o pessoal do Laboratório da Profa. Dra. Dorly por todos os galhos quebrados.

Aos colegas e professores e funcionários do Departamento de Biologia Celular.

À Alessandra de Mello Aguiar do IBMP pela disposição em me encaixar no concorrido uso do citometro de vocês e ler as amostras comigo.

Ao pessoal da UNIFESP que foi muito solícito em me ajudar sempre que precisava.

À querida amiga Nani pela constante amizade, pelas boas conversas em tempos de alegria e de estresse, por compartilhar do sofrimento e das alegrias da vida de mestrando.

À querida amiga Makeli pela amizade e pelos abraços apertados, você também é um exemplo de guerreira nessa vida acadêmica.

Às meninas da minha célula por sempre ouvirem meus pitis acadêmicos e ainda assim continuarem me amando e fingindo que sou uma pessoa normal.

Aos muitos amigos especiais que estão sempre por perto para proporcionar bons momentos.

À CAPES, CNPq e Fundação Araucária pelo apoio financeiro.

*A experiência não é o que nos acontece; é o que fazemos com aquilo que nos acontece.*

*Aldous Huxley*

## RESUMO

Loxoscelismo é o termo tipicamente utilizado para descrever o quadro clínico, lesões e reações, desenvolvido após os acidentes envolvendo aranhas do gênero *Loxosceles*. É considerado um sério problema de saúde pública, principalmente no Sul e Sudeste do Brasil, sendo o Paraná o estado que mais notifica acidentes provocados por aranhas do gênero. A análise histopatológica do desenvolvimento da lesão dermonecrotica, induzida em animais expostos ao veneno, inclui inúmeras alterações vasculares, tais como, a formação de *blebs* subendoteliais e a degeneração da parede dos vasos sangüíneos, bem como a deposição de fibrina e a formação de trombos. O estudo com células endoteliais em cultura tem demonstrado que tais alterações resultam de uma atividade direta e primária do veneno sobre as mesmas. O presente trabalho demonstra evidências adicionais do mecanismo de ação das toxinas do veneno de *L. intermedia* sobre células endoteliais. Identificou-se que a interação do veneno com a superfície celular é mediada pela integrina  $\alpha_5\beta_1$ , bem como por carboidratos. Além disso, o veneno é capaz de causar uma redução desses carboidratos da superfície da célula. A possibilidade da internalização do veneno foi verificada, demonstrando-se que as células endoteliais são capazes de endocitar toxinas do veneno, que tem como destino intracelular os lisossomos. Além disso, esta dinâmica envolve um mecanismo endocítico específico, a pinocitose de fase fluída, processo este não observado em linhagens musculares e epiteliais de ovário, sugerindo que a internalização do veneno pode ser específica para células endoteliais. Adicionalmente, verificou-se os efeitos do veneno sobre as células endoteliais após longos períodos de exposição. As análises morfológicas revelaram que a partir de 24 horas de exposição, as células apresentam sinais de morte celular. Ultra - estruturalmente, essas alterações foram determinadas como características do processo de apoptose. A indução desse mecanismo de morte foi confirmada pelo aumento na expressão da proteína pró-apoptótica Bax nas células expostas ao veneno. A avaliação da apoptose nas células tratadas com veneno por longos períodos, demonstrou que o processo de morte celular, propriamente dito, é desencadeado apenas nas células em suspensão. Quando as células em suspensão foram expostas ou não ao veneno, ficou evidente que a morte celular é desencadeada pelo desalojamento das células, mecanismo conhecido por *anoikis*. A observação da ação do veneno em células normais e em deficientes na síntese de proteoglicano de heparam sulfato apontam para o papel protetor desse composto característico da superfície destas células, sugerindo que a sua presença impede uma ação direta das toxinas do veneno sobre as mesmas.

Palavras chaves: *Loxosceles intermedia*, células endoteliais, endocitose, *anoikis*, heparam sulfato.

## ABSTRACT

Loxoscelism is the term used to describe the lesions and clinical manifestations caused by bites of *Loxosceles* spiders. This is considered a serious public health problem, mainly in Brazil southern and southeastern, being Parana the State that notifies the largest number of accidents caused by spiders of the genus. Histological findings of dermonecrotic lesions in animals treated by venom have shown numerous vascular alterations, like subendothelial blebs and the degeneration of blood vessel walls, as well as fibrin and thrombus formation. Studies using culture endothelial cells have been demonstrated that this morphological alterations result of a direct and primary activity of venom on these cells. In this work we reported additional evidence of the action mechanism of *L. intermedia* venom toxins upon endothelial cells. We observed that the venom interaction with the cellular surface is mediated by integrin  $\alpha_5\beta_1$  as well as by carbohydrates. Also, the venom is able to cause a reduction of these cellular surface carbohydrates. The possible venom internalization was verified, and was observed that the endothelial cells are able to endocytose the venom toxins, that have the lysosomes as intracellular target. Besides, this dynamic involves a specific endocytic mechanism, the phase fluid pinocytosis, process not observed by muscular and ovary epithelial cells, suggesting that the venom internalization should be specific to endothelial cells. Additionally, was observed the effects of venom on endothelial cells after long periods of exposition. The morphological analyses revealed that after 24 hours of exposure, the cells present signs of cellular death. Ultrastructural findings showed that these alterations are characteristic of apoptosis. The induction of this mechanism of death was confirmed by the increased expression of pro-apoptotic protein Bax on cells exposed to the venom. The assessment of apoptosis on cells treated with venom for long periods, demonstrated that the process of cellular death itself is triggered only in suspension cells. When cells in suspension were exposed or not to the venom, was evident that the cellular death is triggered by the detachment of the cell, mechanism known as anoikis. Exposure of normal and deficient cells on the synthesis of heparan sulfate proteoglycan to the venom, point to the protective role of this compound, suggesting that the presence of heparan sulfate prevent the direct action of the venom toxins upon endothelial cells.

Key words: *Loxosceles intermedia*, endothelial cells, endocytosis, *anoikis*, heparan sulfate.

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                          |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>FIGURA 1</b> - Aranhas do gênero <i>Loxosceles</i> .....                                                                              | 17 |
| <b>FIGURA 2</b> - Lesão dermonecrótica na pele de coelho após 24 horas de exposição às toxinas do veneno.....                            | 21 |
| <b>FIGURA 3</b> - Desenvolvimento do quadro clínico após acidente com aranha do gênero <i>Loxosceles</i> .....                           | 22 |
| <b>FIGURA 4</b> - Ação proteolítica do veneno de <i>L. intermedia</i> sobre moléculas purificadas da matriz extracelular .....           | 28 |
| <b>FIGURA 5</b> - Ação do veneno de <i>L. intermedia</i> sobre o endotélio vascular.....                                                 | 31 |
| <b>FIGURA 6</b> - Replaquamento de células endoteliais soltas pela ação do veneno.....                                                   | 32 |
| <b>FIGURA 7</b> - Co-localização das toxinas do veneno com a integrina $\alpha_5\beta_1$ presente em células endoteliais em cultura..... | 42 |
| <b>FIGURA 8</b> - Toxinas do veneno de <i>L. intermedia</i> co-localizam com glicoconjugados presentes na superfície celular .....       | 44 |
| <b>FIGURA 9</b> - Veneno de <i>L. intermedia</i> degrada glicoconjugados da superfície celular .....                                     | 45 |
| <b>FIGURA 10</b> - Co-localização das toxinas do veneno com lisossomos das células endoteliais .....                                     | 47 |
| <b>FIGURA 11</b> – A internalização das toxinas do veneno envolve endocitose .....                                                       | 48 |
| <b>FIGURA 12</b> - As toxinas do veneno de <i>L. intermedia</i> são internalizadas via endocitose de fase fluída.....                    | 49 |
| <b>FIGURA 13</b> – Esquema dos principais eventos moleculares que ocorrem durante a apoptose .....                                       | 57 |

|                                                                                                                                                                    |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>FIGURA 14</b> - Alterações morfológicas em células endoteliais após 24 e 48 horas de exposição às toxinas do veneno.....                                        | 69 |
| <b>FIGURA 15</b> - . As toxinas do veneno de <i>L. intermedia</i> induzem morte celular.....                                                                       | 71 |
| <b>FIGURA 16</b> – Análise ultra-estrutural de células endoteliais expostas ao veneno de <i>L. intermedia</i> .....                                                | 73 |
| <b>FIGURA 17</b> – Cinética de expressão de Bax em células endoteliais tratadas com o veneno .....                                                                 | 74 |
| <b>FIGURA 18</b> - Apoptose induzida pelas toxinas do veneno de <i>L. intermedia</i> em células endoteliais .....                                                  | 76 |
| <b>FIGURA 19</b> - Efeito do veneno de <i>L. intermedia</i> sobre células endoteliais em suspensão .....                                                           | 78 |
| <b>FIGURA 20</b> - Reorganização do padrão de marcação de integrina $\alpha_5\beta_1$ e de E-caderina em células expostas às toxinas de <i>L. intermedia</i> ..... | 79 |
| <b>FIGURA 22.</b> Células deficientes de glicosaminoglicanos são mais susceptíveis à ação do veneno .....                                                          | 81 |
| <b>FIGURA 23.</b> Menor expressão de sindecam-4 aumenta a susceptibilidade da célula endotelial à desadesão provocada pelo veneno .....                            | 83 |

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS**

BOD – Demanda bioquímica de oxigênio

BSA - Albumina de soro bovino (Bovine Serum Albumin)

CHO – Célula do ovário do hamster chinês (Chinese hamster ovary)

CPP- Peptídios que penetram nas células (cell penetrating peptides)

DAPI - 4',6-diamidino-2-fenilindole, dicloridrato

DMSO - Dimetil sulfóxido

EBSS - Solução salina Balanceada de Earle (Earle's Balanced Salt Solution)

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético (EthyleneDiamineTetrAcetic acid)

ELISA - Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

FITC – Isotiocianato de fluoresceína

GAG - Glicosaminoglicano

HaCaT - Linhagem humana de queratinócitos

HeLa – Célula de câncer cervical (extraídas da paciente Henrietta Lacks)

HS – Heparan sulfato

HUVEC - Células endoteliais do cordão umbilical humano (Human Umbilical Vein Endothelial Cells)

IgG - Imunoglobulina G

LY- Lucifer Yellow

MEC- Matriz Extracelular

MET – Microscopia Eletrônica de Transmissão

MTT - 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil brometo tetrazolium

MDCK – Célula epitelial do rim canino (Madin-Darby canine kidney)

PBS – Solução salina fosfatada (phosphate buffer saline)

PGHS – Proteoglicano de heparam sulfato

PI – Iodeto de propídio (propidium iodide)

PS – fosfatidilserina (phosphatidylserine)

PMSF – Fluoreto de fenilmetilsulfonil (phenylmethanesulphonyl fluoride)

RAEC – Célula endotelial de aorta de coelho (Rabbit Aorta Endothelial Cell)

RI – Célula subendotelial de aorta de coelho

iRNA – RNA de interferência

SDS - Dodecil sulfato de sódio (sodium dodecyl sulfate)

SVMP – Metaloproteases do veneno de cobra (snake venom metalloproteinases)

SFB - Soro fetal bovino

TRIS- HCl - Trisaminometano hidroclorado (tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride)

WGA – Aglutinina de germem de trigo (Wheat Germ Agglutinin)

$\alpha$  alfa

$\beta$  beta

kDA - kilo daltons

M- molar

m- mili

$\mu$  micro

$\eta$  nano

## SUMÁRIO

|                                                                                                      |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO .....</b>                                                                           | <b>15</b> |
| 1.1. AS ARANHAS.....                                                                                 | 16        |
| 1.2. O GÊNERO <i>Loxosceles</i> .....                                                                | 16        |
| 1.3. LOXOSCELISMO .....                                                                              | 19        |
| 1.3.1. Caracterização.....                                                                           | 19        |
| 1.3.2. Diagnóstico e tratamento .....                                                                | 23        |
| 1.4. CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DO VENENO DE <i>Loxosceles spp</i> .....                            | 24        |
| 1.5. CONSEQÜÊNCIAS TECIDUAIS E CELULARES APÓS A EXPOSIÇÃO AO<br>VENENO DE <i>L. intermedia</i> ..... | 26        |
| 1.6. ATIVIDADES DO VENENO DE <i>L. intermedia</i> SOBRE CÉLULAS<br>ENDOTELIAIS .....                 | 29        |
| <b>2. CAPÍTULO I .....</b>                                                                           | <b>33</b> |
| 2.1. INTRODUÇÃO.....                                                                                 | 34        |
| 2.1.1. Endocitose .....                                                                              | 34        |
| 2.2. OBJETIVOS .....                                                                                 | 36        |
| 2.3. MATERIAIS E MÉTODOS .....                                                                       | 37        |
| 2.3.1. Obtenção da <i>Loxosceles intermedia</i> .....                                                | 37        |
| 2.3.2. Extração de veneno loxoscélico por eletrochoque.....                                          | 37        |
| 2.3.3. Dosagem de proteínas .....                                                                    | 37        |
| 2.3.4. Cultura celular.....                                                                          | 37        |
| 2.3.5. Reações de imunomarcacão ou detecção citoquímica.....                                         | 38        |

|                                                                                                            |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.3.6. Citometria de Fluxo.....                                                                            | 40        |
| 2.4. RESULTADOS .....                                                                                      | 41        |
| 2.4.1. Interação das toxinas do veneno de <i>L. intermedia</i> com componentes da superfície celular ..... | 41        |
| 2.4.2. Internalização das toxinas do veneno de <i>L. intermedia</i> pelas células endoteliais .....        | 46        |
| 2.4.3. A internalização das toxinas do veneno envolve pinocitose de fase fluída.....                       | 49        |
| 2.5. DISCUSSÃO .....                                                                                       | 50        |
| <b>3. CAPÍTULO II .....</b>                                                                                | <b>55</b> |
| 3.1. INTRODUÇÃO.....                                                                                       | 56        |
| 3.1.1. Morte celular programada – apoptose .....                                                           | 56        |
| 3.1.2. Mecanismo de morte celular por desalojamento – <i>anoikis</i> .....                                 | 58        |
| 3.1.3. Proteoglicanos de heparam sulfato da superfície celular .....                                       | 59        |
| 3.2. OBJETIVOS .....                                                                                       | 62        |
| 3.3. MATERIAIS E MÉTODOS.....                                                                              | 63        |
| 3.3.1. Cultura celular.....                                                                                | 63        |
| 3.3.2. Análise por citometria de fluxo.....                                                                | 63        |
| 3.3.3. Microscopia eletrônica de transmissão .....                                                         | 64        |
| 3.3.4. Detecção da apoptose pela exposição da fosfatidilserina .....                                       | 65        |
| 3.3.5. <i>Western blotting</i> .....                                                                       | 66        |
| 3.3.6. Ensaios de imunofluorescência .....                                                                 | 66        |
| 3.3.7. Microscopia eletrônica de varredura.....                                                            | 67        |
| 3.3.8. Análise estatística.....                                                                            | 68        |

|                                                                                                                                |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.4. RESULTADOS .....                                                                                                          | 69        |
| 3.4.1. Veneno de <i>L. intermedia</i> causa morte nas células endoteliais após longo período de exposição .....                | 69        |
| 3.4.2. Análise ultra-estrutural das células expostas às toxinas do veneno de <i>L. intermedia</i> .....                        | 70        |
| 3.4.3.O veneno de <i>L. intermedia</i> causa apoptose nas células endoteliais .....                                            | 74        |
| 3.4.4. Alterações no padrão de marcação de integrinas e caderinas em células expostas às toxinas de <i>L. intermedia</i> ..... | 77        |
| 3.4.5. Papel do proteoglicano de heparam sulfato como protetor da ação do veneno nas células endoteliais.....                  | 80        |
| 3.5. DISCUSSÃO .....                                                                                                           | 84        |
| <b>4. CONCLUSÕES .....</b>                                                                                                     | <b>91</b> |
| <b>REFERÊNCIAS.....</b>                                                                                                        | <b>93</b> |

---

## 1. INTRODUÇÃO

---

---

## 1.INTRODUÇÃO

---

### 1.1. AS ARANHAS

Excluindo os insetos, as aranhas são os invertebrados terrestres mais bem sucedidos, com mais de 40.000 espécies descritas por todo o globo, sendo que provavelmente existam inúmeras outras espécies ainda não caracterizadas (ESCOUBAS; DIOCHORT; CORZO, 2000).

Todas as aranhas são predadoras e, com exceção da família Uloboridae, todas possuem glândula de veneno. O veneno é utilizado para matar ou paralisar a presa. Diferente de outros animais venenosos, as aranhas não são capazes de ingerir a presa inteira, sendo assim, sua digestão é externa, com a prévia liquefação da presa por enzimas digestivas. As enzimas responsáveis por essa função não são as do veneno, mas enzimas produzidas no intestino médio das aranhas, que são regurgitadas sobre a presa depois da mesma de ter sido paralisada (RASH; HODGSON, 2002).

Embora a diversidade biológica e ecológica das aranhas seja imensa, poucas espécies estão relacionadas com acidentes envolvendo humanos. Dentre essas espécies que apresentam importância médica, as que estão mundialmente distribuídas são as do gênero *Latrodectus spp.*, popularmente conhecidas como viúvas negras e as do gênero *Loxosceles spp.*, popularmente conhecidas como aranhas marrons. Com distribuição geográfica menor estão as do gênero *Phoneutria spp.*, endêmicas no Brasil, popularmente conhecidas como armadeiras e as do gênero *Atrax spp.* e *Hadronyche spp.*, endêmicas da Austrália (ISBISTER; WHITE, 2004).

### 1.2. O GÊNERO *Loxosceles*

Conforme apresentado, o gênero *Loxosceles* representa aranhas popularmente conhecidas como aranhas marrons. Esta denominação é devida a sua coloração típica que varia do marrom pálido ao marrom escuro. Ainda, são conhecidas também por aranhas violinos, devido à forma da região dorsal do cefalotórax semelhante à de um violino (FIGURA 1A). Possuem seis olhos organizados em pares que se arranjam formando um “U”, sendo esta disposição característica, um dos melhores meios de identificar a aranha marrom (FIGURA 1B) (VETTER; VISSCHER, 1998). O padrão de distribuição dos olhos é invariável entre

## 1.INTRODUÇÃO

as espécies do gênero, enquanto que o formato de violino pode variar de acordo com o tamanho e coloração das diferentes espécies (SWANSON; VETTER, 2006). Em geral, são aranhas pequenas, apresentando o tamanho corporal variando de 8 a 15 mm e o comprimento das patas variando de 8 a 30 mm (FUTRELL, 1992). Possuem dimorfismo sexual, sendo que em *Loxosceles intermedia* a fêmea possui o corpo maior do que o macho, e este por sua vez, possui as patas mais delgadas e alongadas que as da fêmea (FIGURA 1C). As fêmeas produzem maior quantidade de veneno, e a concentração protéica nesse é maior quando comparado com o veneno dos machos, sendo, portanto, mais venenosas que os machos. Todavia, a composição dos venenos dos machos e das fêmeas é semelhante (OLIVEIRA *et al.*, 1999).

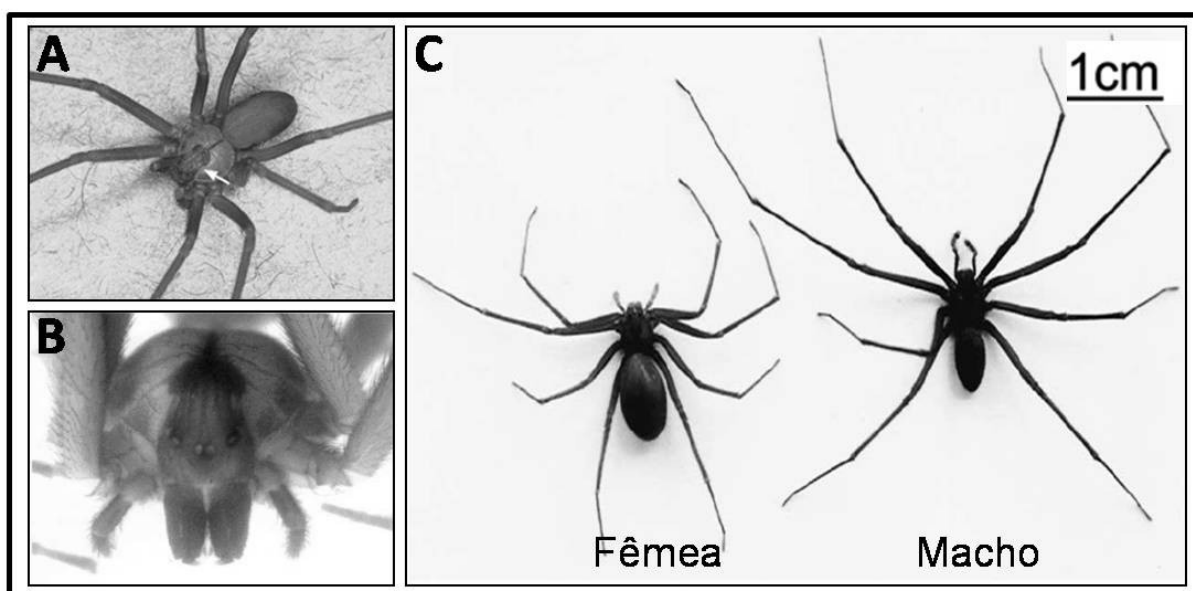


**FIGURA 1** - ARANHAS DO GÊNERO *Loxosceles*. **A** - Vista do cefalotórax evidenciando a região dorsal com formato semelhante ao de um violino (seta). **B** - Vista anterior demonstrando o padrão de distribuição dos 6 olhos arranjados em pares formando um "U". **C** - Dimorfismo sexual da espécie *Loxosceles intermedia*. ADAPTADO DE: (A) DIAZ; LEBRANC; 2007; (B) SWANSON; VETTER, 2006; (C) da SILVA *et al.*, 2004.

As aranhas do gênero *Loxosceles* podem viver de 3 a 7 anos (GONÇALVES-de-ANDRADE *et al.*, 1999), não são agressivas, e possuem hábito sedentário e noturno e alimentam-se de pequenos insetos, tendo preferência por presas mortas. Reproduzem-se com facilidade, mesmo em lugares pouco favoráveis (FUTRELL, 1992). Embora sejam mais facilmente encontradas durante as estações de calor, podem suportar temperaturas que variam de 8 a 43°C e podem sobreviver sem alimento ou água por diversos dias ou mesmo por meses (FUTRELL, 1992). Essa

## 1.INTRODUÇÃO

---

facilidade de se adaptarem a diferentes condições climáticas e de alimentação, associada com sua grande capacidade reprodutiva, permite que as aranhas do gênero *Loxosceles* se adaptem em uma grande diversidade de ambientes, inclusive no ambiente antrópico (GONÇALVES-de-ANDRADE; TAMBOURGI, 2003). Devido ao seu hábito noturno, durante o dia as aranhas do gênero *Loxosceles* preferem se esconder em cavidades e outros lugares de refúgio. No ambiente natural, elas são encontradas embaixo de pedras ou em tocas de outros animais. Dentro das casas, são abundantes em locais escuros e secos (SWANSON; VETTER, 2006).

O veneno loxoscélico é usado para paralisar suas presas e também como um mecanismo de defesa, motivo pelo qual picam o homem quando são ocasionalmente comprimidas (MÁLAQUE et al., 2002). A quantidade de veneno inoculado é mínima (cerca de 4µL) e contém de 65 a 100 µg de proteínas (SAMS et al., 2001), a qual, conforme será descrito posteriormente, é suficiente para causar graves problemas ao acidentado.

O gênero *Loxosceles* é cosmopolita, possuindo mais de 100 espécies descritas que têm como centro de origem a África e as Américas (MARQUES-DA-SILVA; FISCHER, 2005). Muitas dessas espécies são conhecidas apenas por poucos espécimes ou têm uma distribuição altamente restrita, e, portanto, apresentam interesse apenas taxonômico. Dentre as espécies restantes com uma distribuição ampla, muitas vivem em áreas com pouca densidade demográfica ou têm seu número populacional bastante reduzido, devido à destruição de seu hábitat. Dessa maneira, poucas espécies possuem um real interesse médico (SWANSON; VETTER, 2006).

No Brasil ocorrem oito espécies de *Loxosceles*, sendo quatro endêmicas do país: *L. similis* (PA, SP, MG e MS), *L. gauchoi* (RS e SP), *L. amazonica* (AM, MG e MA) e *L. puerto* (TO) e quatro ocorrendo também em países vizinhos: *L. laeta* (RS, SP, RJ, MG e PR); *L. intermedia* (PR, DF, RJ, SP e RS); *L. hirsuta* (RS e PR) e *L. adalaida* (RJ) (MARQUES-DA-SILVA; FISCHER, 2005). Dentre essas, apenas três espécies (*L. intermedia*, *L. gauchoi* e *L. laeta*) estão envolvidas nos casos de envenenamento humano, justamente pela facilidade em se adaptar ao ambiente antrópico, e por serem sinantrópicas, isto é, adaptadas ao ambiente intradomiciliar (MÁLAQUE et al., 2002). As espécies *L. intermedia* e *L. laeta* estão tão bem adaptadas a esse microambiente, que não são encontradas em ambiente natural, apenas em ambientes urbanos, predominantemente nas casas, com preferência por

## 1.INTRODUÇÃO

---

esconderijos como mobília, quadros e roupas (FISCHER; VASCONCELLOS-NETO, 2005).

A caracterização do veneno de espécies que ocorrem apenas em ambiente natural, tais como a *L. similis* e a *L. adelaida*, demonstrou que essas também são capazes de causar envenenamento com o mesmo grau de severidade que o envenenamento provocado pelas espécies sinantrópicas (PETREL *et al.*, 2005; SILVESTRE *et al.*, 2005).

### 1.3. LOXOSCELISMO

#### 1.3.1. Caracterização

O termo loxoscelismo é tipicamente utilizado para descrever os sinais e sintomas resultantes de acidentes envolvendo aranhas do gênero *Loxosceles* (da SILVA *et al.*, 2004). Acidentes com aranhas do gênero têm sido descritos na América do Sul (SEZERINO *et al.*, 1998; SOUZA *et al.*, 2008), América do Norte (FUTRELL, 1992; SWANSON; VETTER, 2006), Europa, África, em algumas regiões da Ásia (NICHOLSON; GRAUDINS, 2002); Israel (COHEN *et al.*, 1999) e na Austrália (FUTRELL, 1992; HOGAN; BARBARO; WINKEL, 2004).

O primeiro caso documentado de envenenamento pelo gênero foi descrito em 1879, quando um homem norte americano apresentava um quadro clínico caracterizado por febre e hematúria, após a picada de uma aranha (HOGAN; BARBARO; WINKEL, 2004). No Brasil, acidentes com o gênero *Loxosceles* têm sido reconhecidos desde 1891, todavia apenas em 1954 a lesão dermonecrótica foi associada com a picada de aranhas desse gênero (PAULI *et al.*, 2006). Principalmente no Sul e Sudeste do Brasil, o loxoscelismo é considerado um sério problema de saúde pública, com mais de 3.000 casos registrados anualmente pelo Ministério de Saúde (HOGAN; BARBARO; WINKEL, 2004). De fato, o loxoscelismo está classificado como a terceira maior incidência de acidentes envolvendo animais venenosos no país (PAULI *et al.*, 2006). O Paraná é o estado brasileiro que mais notifica acidentes provocados por aranhas do gênero, com uma média anual de 2.577 casos, sendo a espécie *L. intermedia* a mais comumente encontrada em

## 1.INTRODUÇÃO

---

ambiente urbano, e possivelmente a maior responsável por estes acidentes (MARQUES-DA-SILVA; FISCHER, 2005).

O loxoscelismo é caracterizado por duas variantes clínicas bem definidas: o loxoscelismo cutâneo ou dermonecrótico (que representa 84 – 97% dos casos) e o loxoscelismo visceral ou sistêmico (que representa 3 – 16% dos casos) (FUTRELL, 1992; PAULI *et al.*, 2006). O desenvolvimento de um quadro ou outro, ou de ambos e a gravidade do acidente depende de alguns fatores relacionados, tais como: a espécie da aranha, sexo do animal, quantidade de veneno inoculado, bem como características gerais do indivíduo acidentado, tais como: a idade; o estado nutricional; o local da picada; susceptibilidade ao veneno e, o tempo em que este indivíduo levou para procurar um tratamento adequado (GONÇALVES-de-ANDRADE *et al.*, 1999; GUILHERME; FERNANDES, BARBARO, 2001; de OLIVEIRA *et al.*, 1999, 2005).

O veneno loxoscélico induz um mecanismo inflamatório que é indireto, logo, a difusão do veneno define a extensão e a magnitude da lesão dermonecrótica (GOMEZ *et al.*, 2001). A região das nádegas, coxas e abdômen, que são regiões de maior concentração de tecido adiposo, geralmente resultam nas piores lesões e cicatrizes (FUTRELL, 1992). Além disso, a lesão é agravada pela presença de microrganismos, a bactéria *Clostridium perfringens*, oriunda das quelíceras, a qual é injetada juntamente com o veneno no ato da picada (MONTEIRO *et al.*, 2002).

De maneira geral, a lesão cutânea é caracterizada por dermonecrose local, que aparece algumas horas após a picada, e o espalhamento gravitacional da lesão, sendo essas as manifestações que melhor definem e caracterizam o envenenamento (FIGURA 2) (da SILVA *et al.*, 2004). FUTRELL (1992) descreve clinicamente o desenvolvimento da lesão, relatando que a picada é relativamente indolor, motivo pelo qual normalmente não é percebida. Após 2 a 8 horas, surge a dor que pode variar de moderada a severa e é caracterizada por ser local, do tipo “queimação” ou “ardência”, podendo ser acompanhada de prurido, edema, mal-estar geral e febre. Esses sinais são geralmente seguidos (12- 24 horas) pela formação de uma bolha ou pústula circundada por um halo de tecido isquêmico que fica avermelhado e uma zona pálida denominada placa marmórea. A região circundante com eritema adquire uma coloração violácea característica desse tipo de envenenamento. Em poucos dias, a lesão entra em processo de necrose e adquire

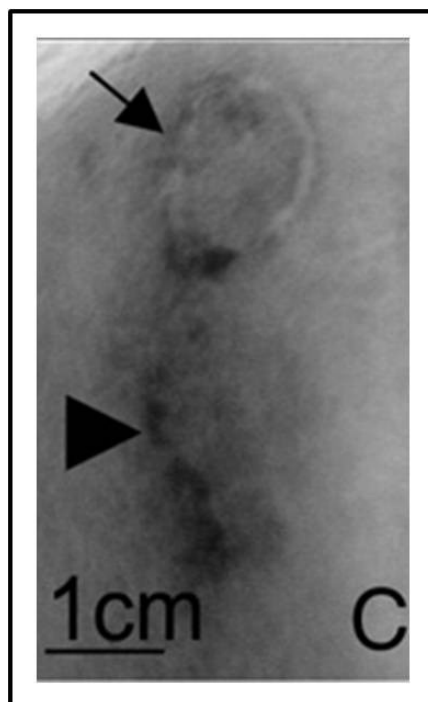


**FIGURA 2-** LESÃO DERMONECRÓTICA NA PELE DE COELHO APÓS 24 HORAS DE EXPOSIÇÃO ÀS TOXINAS DO VENENO. Seta indica o local da inoculação das toxinas, e é possível observar a característica escara preta e branca denominada placa marmórea no local da inoculação. A cabeça de seta mostra o espalhamento gravitacional da lesão. ADAPTADO DE: SENFF-RIBEIRO *et al.*, 2008.

uma cor azul-violeta com um distinto e característico espreadimento gravitacional. A região azulada começa a se estender e as bordas da lesão tornam-se irregulares e no centro da lesão forma-se uma depressão. Além disso, pode haver a formação de abscesso ou escara de difícil cicatrização entre 3 a 7 dias. Após uma semana, a lesão começa a endurecer, principalmente na região central. A escara pode cair, levando a formação de uma úlcera que cicatriza entre 6 a 8 semanas e normalmente requer um enxerto (FIGURA 3). Descrições semelhantes têm sido feitas por diversos autores (SEZERINO *et al.*, 1998, MÁLAQUE *et al.*, 2002; HOGAN; BARBARO; WINKEL, 2004).

A nível sistêmico o veneno pode levar à hemólise, coagulação intravascular disseminada, trombocitopenia, agregação plaquetária além de apresentar uma nefrotoxicidade que pode levar à insuficiência renal aguda (FUTRELL, 1992; ZANETTI *et al.*, 2002). Casos mais graves, tipicamente em crianças pequenas, podem levar a morte (SWANSON; VETTER, 2006). As primeiras manifestações

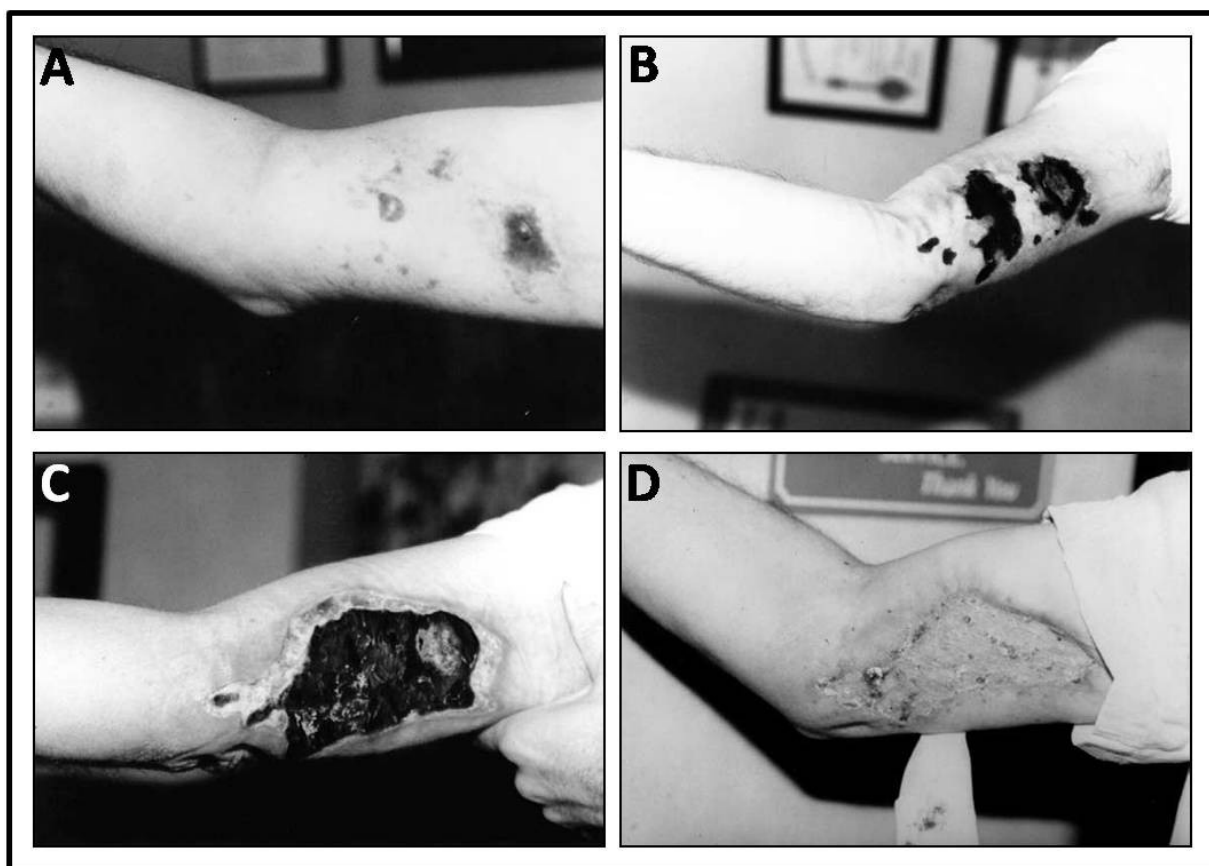


**FIGURA 3** - DESENVOLVIMENTO DO QUADRO CLÍNICO APÓS ACIDENTE COM ARANHA DO GÊNERO *Loxosceles*. **A** - Duas picadas na parte superior do braço cerca de 20 horas após o acidente. **B** - Duas semanas após, a necrose está mais evidente. **C** - Após sete semanas, a necrose está bem demarcada e a lesão apresenta bordas irregulares e uma depressão no centro. **D** - Em dez semanas, o processo de cicatrização está quase completo. ADAPTADO DE: NUNNELEE, 2006.

aparecem 24 horas após a picada e os sintomas incluem, além da reação local, astenia (sensação de fraqueza), náuseas, vômitos, febre, alterações sensoriais, cefaléias, insônia, podendo ocorrer convulsões e coma em casos mais graves, sugerindo algum efeito sobre o sistema nervoso. Pode haver também prurido generalizado e petéquias (lesões puntiformes de cor escura na pele, semelhante a picadas de insetos) (FUTRELL, 1992). Rash cutâneo (exantema) também tem sido observado em alguns casos (ROBB; HAYES; BOYD, 2007). Recentemente foi descrito um caso clínico onde o paciente apresentou um processo hemolítico grave, evidenciado por hemoglobinúria, elevada concentração de bilirrubina e lactato desidrogenase e reticulocitose (de SOUZA *et al.*, 2008). Todavia, como já descrito, o envolvimento sistêmico é menos comum que as lesões cutâneas e ocorre na minoria dos casos (da SILVA *et al.*, 2004).

## 1.INTRODUÇÃO

---

### 1.3.2. Diagnóstico e tratamento

O diagnóstico do loxoscelismo é raramente baseado na identificação da aranha, visto que os pacientes geralmente não percebem que foram picados, mas em sinais clínicos, sintomas característicos, achados histológicos e na exclusão de outras etiologias (da SILVA *et al.*, 2004). O teste diagnóstico mais preciso em caso de envenenamento seria a detecção tanto do veneno propriamente dito, quanto de anticorpos circulantes contra o veneno (HOGAN; BARBARO; WINKEL, 2004). Um teste do tipo ELISA foi desenvolvido para a detecção de proteínas do veneno de *Loxosceles spp.*, e além de identificar de amostras provenientes de camundongos injetados com o veneno de *L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta*, é também capaz de detectar antígenos circulantes no soro de pacientes envenenados por *L. intermedia* (CHÁVEZ-OLÓRTEGUI *et al.*, 1998). Segundo os autores, usando essa técnica, o veneno pode ser detectado nas amostras analisadas até 4 dias após o envenenamento. Embora esse teste laboratorial tenha uma aplicação clínica potencial, ainda não está comercialmente disponível. Alternativamente, pode ser realizada uma biópsia da pele lesionada, e com base nas descrições histopatológicas publicadas, constatar o quadro como uma picada de aranhas do gênero *Loxosceles* (da SILVA *et al.*, 2004).

No caso do loxoscelismo sistêmico, alguns sinais clínicos e laboratoriais podem ser úteis em determinar a sua presença e severidade. Evidência de hemólise, reticulocitose e o aumento nos níveis de haptoglobina, lactato desidrogenase ou bilirrubina podem sugerir um possível comprometimento sistêmico, indicando a necessidade de uma investigação mais aprofundada (HOGAN; BARBARO; WINKEL, 2004).

Várias intervenções têm sido propostas e utilizadas para o tratamento do loxoscelismo. Todavia, não há um critério unânime para qual seja a melhor terapia, havendo grande controvérsia sobre a efetividade do uso de drogas, soro anti-veneno ou sua combinação (PAULI *et al.*, 2006). Uma variedade de terapias como corticóides, ácido acetilsalicílico, antibióticos, heparina, gelo, oxigenioterapia hiperbárica e outras substâncias têm sido utilizadas, apresentando pouco ou nenhum benefício, e em alguns casos, efeitos colaterais indesejáveis (MOLD; THOMPSON, 2004). A baixa eficiência no tratamento esta diretamente associada com o fato do mecanismo de ação do veneno loxoscélico ainda não ser

## 1.INTRODUÇÃO

---

completamente compreendido (PAIXÃO-CAVALCANTE *et al.*, 2007). Em relação a todas as intervenções avaliadas, os soros anti-venenos específicos são mencionados como os que possuem melhor potencial terapêutico, quando administrados nas primeiras horas após o envenenamento, todavia ainda faltam estudos clínicos para comprovar esses dados (PAULI *et al.*, 2006). No Brasil, o uso do soro anti-loxoscélico associado com corticóides constitui a intervenção mais utilizada na prática médica (GUILHERME; FERNANDES, BARBARO, 2001).

Diante deste quadro, o melhor tratamento para picadas de aranhas do gênero *Loxosceles* ainda é a prevenção, que inclui medidas simples, como a checagem de roupas, calçados e roupas de cama antes de usá-los, entre outros (FUTRELL, 1992; da SILVA *et al.*, 2004).

### 1.4. CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DO VENENO DE *Loxosceles spp.*

O veneno de *Loxosceles intermedia* é um líquido incolor e cristalino formado por uma mistura heterogênea de proteínas, sendo rico em proteínas de baixo peso molecular variando entre 5-40kDa e, expressando, em menor extensão, proteínas de alto peso molecular de 60 a 850kDa (VEIGA *et al.*, 2000a). Diversas toxinas têm sido identificadas e caracterizadas bioquimicamente no veneno loxoscélico, entre elas as mais estudadas são as fosfolipases D (TAMBOURGI *et al.*, 1995; BARBARO *et al.*, 1996; CUNHA *et al.*, 2003; CHAIM *et al.*, 2006; da SILVEIRA *et al.*, 2006; da SILVEIRA *et al.*, 2007a; APPEL *et al.*, 2008), metaloproteases e serinoproteases (FEITOSA *et al.*, 1998; VEIGA *et al.*, 2000a; da SILVEIRA *et al.*, 2007b) e hialuronidases (FUTRELL, 1992; YOUNG; PINCUS, 2001; BARBARO *et al.*, 2005; da SILVEIRA *et al.*, 2007c). O veneno não contém proteoglicanos, glicosaminoglicanos, resíduos de galactose ou ácido siálico como estruturas complexas. No entanto é rico em proteínas contendo resíduos de açúcares N-ligados (VEIGA, *et al.*, 1999).

O grupo de toxinas que causa grande parte dos efeitos nocivos do veneno é conhecido como toxinas dermonecróticas (30-35kDa), que são as moléculas melhores caracterizadas bioquimicamente em diferentes venenos loxoscélicos. Apesar da grande quantidade de toxinas descritas no veneno, a família das toxinas

## 1.INTRODUÇÃO

---

dermonecróticas é capaz de induzir a dermonecrose, hemólise, agregação plaquetária (da SILVA *et al.*, 2004; SWANSON; VETTER, 2006), distúrbios renais (CHAIM, *et al.*, 2006), aumento na permeabilidade vascular e resposta inflamatória (PALUDO *et al.*, 2008). Essas toxinas foram previamente caracterizadas como esfingomielinases D, baseado na hidrólise do fosfolípido esfingomielina no sítio da colina, resultando na liberação de ceramida fosfatada (FUTRELL, 1992). Todavia, baseado em estudos bioquímicos, LEE e LYNCH (2005) demonstraram que essas enzimas têm uma especificidade de substrato mais ampla, hidrolisando glicerofosfolípidios e esfingolípídios que geram ácido lisofosfatídico ou ceramida 1-fosfato. Assim, tem sido sugerido que essas toxinas sejam melhor denominadas de fosfolipases D, devido a essa grande gama de substratos lipídicos (KUSMA *et al.*, 2008). Atualmente, sabe-se que as fosfolipases D formam uma família de toxinas presentes no veneno de diversas espécies do gênero *Loxosceles* e existem em diversas isoformas (MACHADO *et al.*, 2005; KALAPHOTAKIS *et al.*, 2007; CHAIM *et al.*, 2006; da SILVEIRA *et al.*, 2007a). Surpreendentemente, a atividade esfingomielinásica dessas enzimas é atualmente desconhecida para outros organismos venenosos do reino animal, apenas para as aranhas do gênero *Loxosceles* (BINFORD; MATTHEW; CORDES, 2005).

Algumas das atividades nocivas do veneno também podem ser atribuídas a proteases. No veneno de *L. intermedia* foram descritas duas metaloproteases denominadas Loxolisina A (20-28 kDa) e Loxolisina B (32-35 kDa). A primeira possui atividade fibronectinolítica e fibrinogenolítica e a segunda gelatinolítica estando provavelmente associadas aos efeitos necróticos e hemorrágicos do veneno e também distúrbios renais e coagulação intravascular disseminada (FEITOSA *et al.*, 1998; ZANETTI *et al.*, 2002). Também foram descritas no veneno de *L. intermedia* duas serinoproteases de 85kDa e 95 kDa, com atividade gelatinolítica entre pH 7,0-8,0, demonstrando-se sua atividade em condições normais da fisiologia humana, no pH entre 7,2 -7,3 (VEIGA *et al.*, 2000a). Mais recentemente, através da utilização de uma biblioteca de cDNA do veneno de *L. intermedia*, foi clonada e expressa uma metaloprotease do veneno recombinante. A caracterização estrutural desta enzima revelou que pertence à família das astacinas, característica nunca antes conferida a nenhuma metaloprotease presente em secreção venenosa animal (da SILVEIRA *et al.*, 2007b).

## 1.INTRODUÇÃO

---

A presença de hialuronidases no veneno que degradam o ácido hialurônico e resíduos de condroitim sulfato pode estar relacionada ao espalhamento gravitacional da dermonecrose atuando como um fator de espalhamento sistêmico, facilitando a difusão de outras toxinas do veneno (da SILVEIRA *et al.*, 2006). Com o uso de reação colorimétrica foi observado que a hialuronidase é uma endo- $\beta$ -N-acetil-D-hexosaminidase. Experimentos de zimograma com veneno de *L. intermedia* demonstraram proteínas com massa molecular aparente de 41 e 43KDa, com atividade glicolítica sobre o ácido hialurônico (da SILVEIRA *et al.*, 2007c).

Embora diversos estudos recentes enfoquem a caracterização de algumas das toxinas presentes no veneno das aranhas do gênero *Loxosceles*, principalmente devido ao advento de técnicas de biologia molecular que permitem a purificação e produção dessas toxinas, muitas das atividades induzidas pela picada ainda não estão relacionadas com toxinas específicas e muitas toxinas ainda não foram caracterizadas. Assim, a avaliação bioquímica do veneno e a associação desses dados ao quadro clínico desenvolvido ainda é um amplo campo de estudo. Recentemente, o estudo do transcriptoma da espécie *L. laeta* demonstrou que as glândulas de veneno da espécie produzem uma grande quantidade de moléculas com características estruturais e funcionais. Vários transcritos apresentaram seqüências semelhantes a seqüências depositadas no GenBank podendo ser caracterizadas como neurotoxinas, hialuronidases, fosfolipases D, metaloproteases, lipases, serinoproteases, lectinas, inibidores enzimáticos, alérgenos, dentre outros. Curiosamente 25% dos transcritos não apresentaram nenhuma similaridade significativa com qualquer seqüência no GenBank, o que reforça a amplitude de informações que ainda não foram descobertas para elucidar o mecanismo molecular de ação desses venenos (FERNANDES-PEDROSA *et al.*, 2008).

### 1.5. CONSEQUÊNCIAS TECIDUAIS E CELULARES APÓS EXPOSIÇÃO AO VENENO DE *L. intermedia*.

Dados clínicos e biopsias de pacientes humanos após a picada por aranhas do gênero *Loxosceles* mostram infiltrado inflamatório, trombose, hemorragia, dermatite, inflamação aguda, endurecimento da área lesionada, eritema e necrose

## 1.INTRODUÇÃO

---

tanto da epiderme quanto da derme (FUTRELL, 1992; da SILVA *et al.*, 2004). Dados histopatológicos descritos em modelos animais usando veneno extraído de diferentes espécies de *Loxosceles* spp. suportam os dados patológicos acima mencionados (da SILVA *et al.*, 2004). Uma descrição detalhada dos efeitos, após uma exposição aguda (entre 1 hora de exposição, onde se observa os primeiros sinais evidentes de injúria, até 48 horas) ao veneno de *L. intermedia* em coelhos foi apresentada por OSPEDAL e colaboradores (2002). Os autores demonstram a existência de edema intersticial, exsudação do plasma (indicando uma deposição de fibrina no tecido conjuntivo), uma acumulação massiva de leucócitos dentro e ao redor dos vasos sanguíneos e uma evidente diapedese de infiltrado inflamatório tanto nas estruturas intersticiais como no tecido muscular, necrose de folículos capilares, hemorragias, trombose necrótica com oclusão de vaso, degeneração da parede dos vasos sanguíneos, edema muscular, miólise e mionecrose (OSPEDAL *et al.*, 2002; ZANETTI *et al.*, 2002). Análises histopatológicas da escara após 14 dias de envenenamento demonstram, principalmente, um denso infiltrado de células inflamatórias, necrose tecidual coagulativa e vasculite (ELSTON *et al.*, 2000).

O veneno da *L. intermedia* apresenta efeito nocivo direto sobre o endotélio, agindo tanto nas células endoteliais da parede dos vasos sanguíneos (VEIGA *et al.*, 2001a) como na membrana basal subendotelial, estrutura de extrema importância para a integridade dos vasos (ZANETTI *et al.*, 2002). A interação do veneno com o tecido implica em ativação do sistema do complemento, intensa migração de leucócitos polimorfonucleares, liberação de enzimas proteolíticas, liberação de citocinas, agregação plaquetária, e alterações na hemostase (PATEL, *et al.*, 1994; da SILVA *et al.*, 2004; van der BERG *et al.*, 2007).

Além da dermonecrose característica no local da picada, análises histopatológicas de alguns órgãos de camundongos após envenenamento com veneno de *L. intermedia* revelam alterações marcantes nos rins (LUCIANO *et al.*, 2004; CHAIM *et al.*, 2006) e fígado (de OLIVEIRA CHRISTOFF *et al.*, 2008). Tanto para os rins, quanto para o fígado, foi demonstrada a ligação direta do veneno sobre as estruturas teciduais, sugerindo que as toxinas do veneno de *Loxosceles* são agentes diretos e potenciais da nefrotoxicidade e hepatotoxicidade observadas (LUCIANO *et al.*, 2004; de OLIVEIRA CHRISTOFF *et al.*, 2008). Além disso, os efeitos patológicos sobre os rins também estão associados à distúrbios

## 1.INTRODUÇÃO

hematológicos, como a hemólise intravascular e a coagulação intravascular disseminada (LUNG; MALLORY, 2000).

O veneno de *L. intermedia* apresenta efeitos sobre as biomoléculas de membrana basal e da matriz extracelular. O veneno parece não apresentar nenhuma atividade sobre laminina, colágeno tipo IV ou I purificados (FIGURAS 4A – C), contudo, apresenta atividade hidrolítica sobre a entactina, tanto na molécula isolada quanto, quando complexada com laminina (FIGURA 4G). Além disso, é descrita a degradação do core protéico do proteoglicano de heparam sulfato e das cadeias polissacarídicas de condroitim sulfato (VEIGA *et al.*, 2000b, 2001a). O estudo da atividade do veneno sobre moléculas da matriz extracelular plasmática tem demonstrado que possui atividade degradativa nas cadeias A e B da fibronectina, digestão parcial do fibrinogênio e nenhuma atividade proteolítica sobre vitronectina solúvel (FIGURAS 4 D- F) (FEITOSA *et al.*, 1998; VEIGA *et al.*, 2001b).

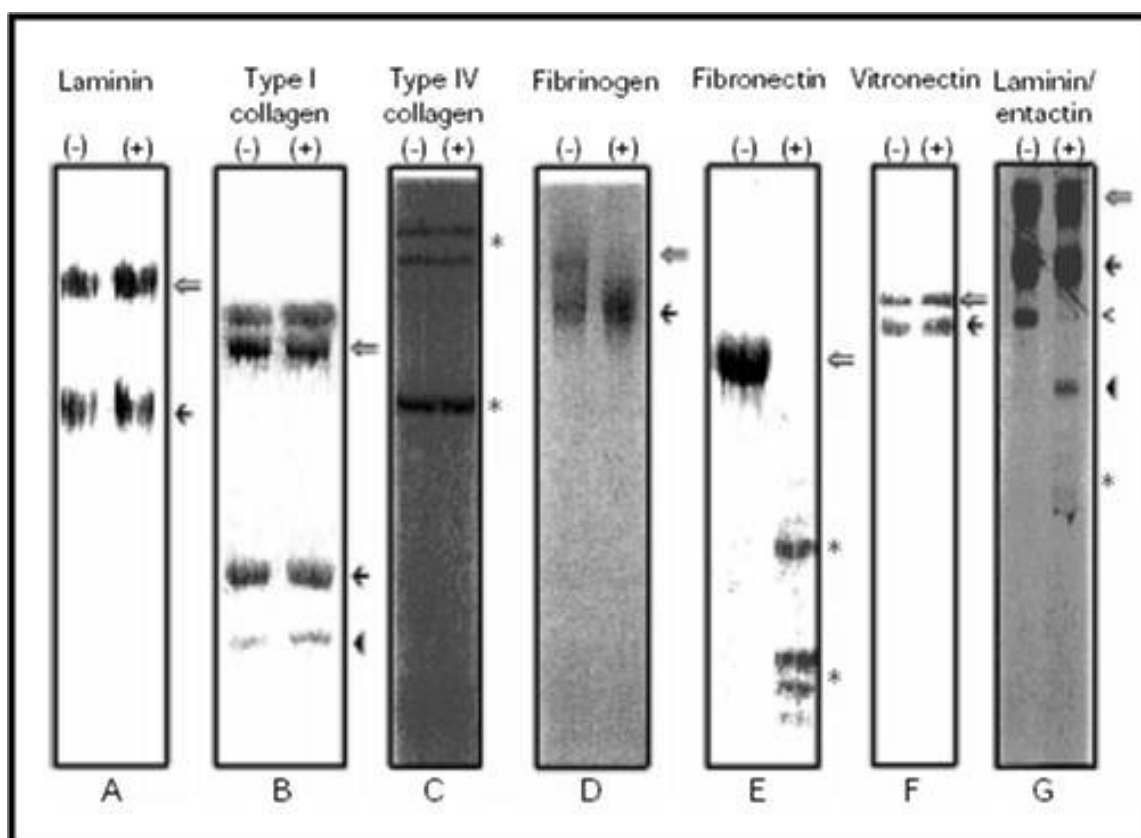


**FIGURA 4** – AÇÃO PROTEOLÍTICA DO VENENO DE *L. intermedia* SOBRE MOLÉCULAS PURIFICADAS DA MATRIZ EXTRACELULAR. As diferentes moléculas de matriz foram incubadas na ausência (-) ou na presença (+) do veneno e analisadas em gel de SDS-PAGE. **A** - Laminina extraído do tumor de EHS. **B** - Colágeno do tipo I extraído do tendão de rato. **C** - Colágeno do tipo IV de placenta humana. **D** - Fibrinogênio humano. **E** - Fibronectina humana. **F** - Vitronectina humana. **G** - Dímero de laminina e entactina extraídos de tumor de EHS. FONTE: VEIGA *et al.*, 2001b.

## 1.INTRODUÇÃO

---

Diante dos inúmeros achados histológicos após exposição *in vivo* às toxinas do veneno, estudos utilizando linhagens celulares têm demonstrado que este contribui direta ou indiretamente para a citotoxicidade em diferentes células. As toxinas do veneno de *L. intermedia* possuem atividade hemolítica em eritrócitos pela ativação do complemento, tanto pela via clássica quanto pela via alternativa, clivando glicoforinas da superfície celular pela ativação de metaloproteases endógenas e também causando a externalização de fosfatidilserina na membrana (TAMBOURGI *et al.*, 2000, 2002). O veneno possui um efeito inibitório direto na quimiotaxia de neutrófilos (MAJESTIK *et al.*, 1977). Citotoxicidade direta tem sido observada após o tratamento de células epiteliais renais (linhagem MDCK) com o veneno, com uma diminuição da viabilidade celular tempo e dose dependentes (CHAIM *et al.*, 2006; RIBEIRO *et al.*, 2007). O veneno provoca a morte celular por apoptose em queratinócitos (linhagem HaCaT) por um processo indireto que envolve aumento na expressão de metaloproteases endógenas (PAIXÃO-CAVALCANTE *et al.*, 2006). Ainda, o veneno possui atividade também sobre linhagens de células endoteliais (VEIGA *et al.*, 2001a; PALUDO *et al.*, 2006) . Como estas são o foco do presente trabalho, uma revisão mais detalhada sobre os efeitos das toxinas do veneno sobre as células endoteliais faz-se necessária.

### 1.6. ATIVIDADES DO VENENO DE *Loxosceles intermedia* SOBRE CÉLULAS ENDOTELIAIS

Células endoteliais, anteriormente conceituadas como uma camada de célula do interior dos vasos sanguíneos que formavam uma simples barreira passiva são, atualmente, consideradas constituintes teciduais metabólicos que regulam uma variedade de respostas biológicas e funções fisiológicas (BACHETTI; MORBIDELLI, 2000). Através da sua capacidade de expressar moléculas pro e anticoagulantes, vasoconstritores e vasodilatadores, citocinas, bem como moléculas chaves para a adesão celular, o endotélio tem surgido como um dos elementos essenciais para a regulação da hemostasia (WAKEFIELD; MYERS; HENKE, 2008).

Visto que uma das principais características da dermonecrose induzida por aranhas do gênero *Loxosceles* é a acumulação de células inflamatórias,

## 1.INTRODUÇÃO

---

especialmente leucócitos polimorfonucleares ao redor dos vasos sanguíneos, inicialmente acreditava-se que as consequências hemorrágicas provocadas pelo veneno fossem principalmente devido a essa massiva infiltração de polimorfonucleares (FUTRELL, 1992). Todavia, experimentos *in vitro* demonstraram que o veneno é incapaz de provocar ativação leucocitária direta, ao invés disso, induz um efeito inibitório direto sobre leucócitos e também na quimiotaxia de neutrófilos (MAJESKI *et al.*, 1977). Esse aparente paradoxo foi resolvido pela observação de que uma das primeiras alterações após exposição ao veneno é o dano seletivo ao endotélio vascular. Análises histológicas de secções da pele de coelho tratadas com veneno e processadas para microscopia eletrônica de transmissão, demonstram a formação de vacúolos subendoteliais e a degeneração da parede dos vasos após 4 horas de exposição ao veneno (FIGURAS 5 A-C) (VEIGA *et al.*, 2001a). Assim, a massiva reação inflamatória observada é primariamente dependente da ativação das células endoteliais. De acordo com a literatura, a resposta inflamatória e a participação dos neutrófilos são dependentes do efeito do veneno como agonista sobre as células endoteliais, que ao induzir a expressão de moléculas envolvidas com eventos inflamatórios, conduz a uma ativação indireta e desregulada de neutrófilos envolvidos com a dermonecrose (PATEL *et al.*, 1994).

Essas evidências levam à suposição de que as desordens envolvendo a degeneração da parede dos vasos sanguíneos observadas após exposição ao veneno de *L. intermedia* resultam da degradação de moléculas da matriz extracelular, tais como fibronectina e fibrinogênio, da degradação na estrutura da membrana basal, com a clivagem de entactina, e também da atividade direta e primária do veneno sobre células endoteliais (VEIGA *et al.*, 2001a; ZANETTI *et al.*, 2002; PALUDO *et al.*, 2006).

O estudo dos mecanismos de ação do veneno sobre células endoteliais isoladas tem sido realizado *in vitro* com o uso de uma linhagem da aorta de coelho em cultura (linhagem RAEC). Com o emprego dessa linhagem, observou-se que a exposição das células ao veneno de *L. intermedia* induz perda da adesão das células ao substrato tempo dependente, degradação de componentes da matriz extracelular e a liberação de proteoglicanos da matriz extracelular e da superfície da célula para o meio de cultura (VEIGA *et al.*, 2001a). Verificou-se que há interação

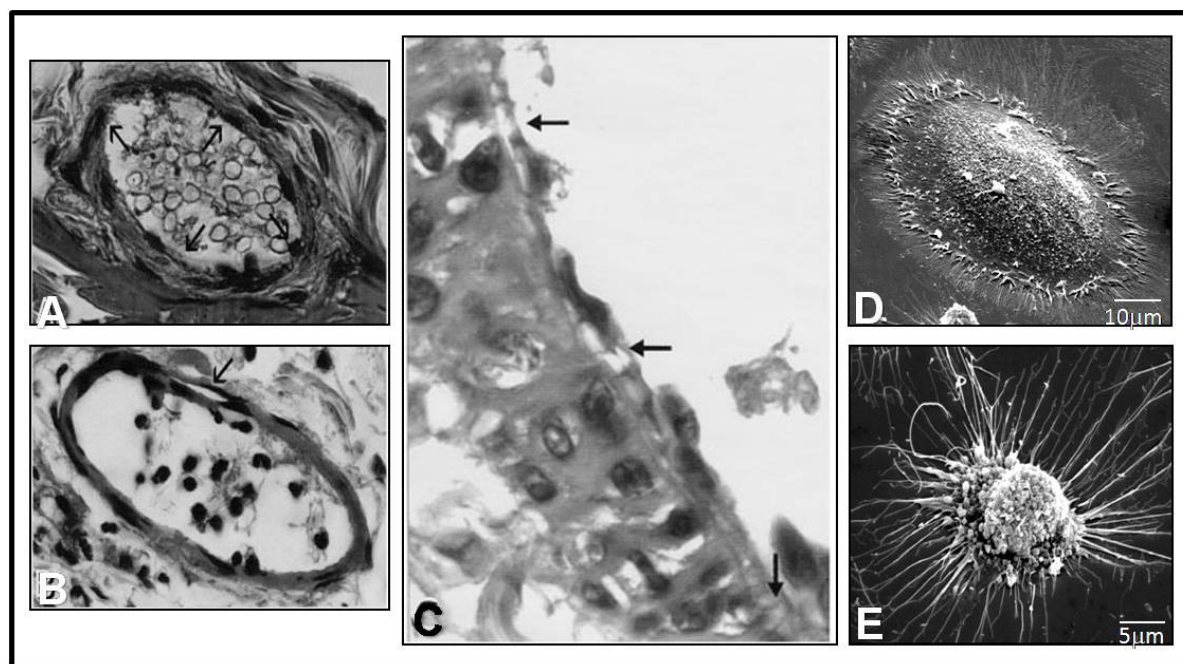


**FIGURA 5-** AÇÃO DO VENENO DE *L. intermedia* SOBRE O ENDOTÉLIO VASCULAR. **A** - Vaso sanguíneo normal da pele de coelho (setas indicam células endoteliais). **B** - Vaso sanguíneo da pele de coelho exposta ao veneno de *L. intermedia* por 3 horas mostrando blebs subendoteliais (seta). **C** - Em maior magnificação é possível observar vários blebs subendoteliais e vacúolos (setas). Imagens em microscopia de luz. **D** - Célula endotelial em cultura com morfologia típica de células controles. **E** - Célula exposta ao veneno por 3 horas, percebe-se uma redução citoplasmática e o aumento de projeções membranares. Imagens em microscopia eletrônica de varredura. ADAPTADO DE: VEIGA *et al.*, 2001; PALUDO *et al.*, 2006.

das toxinas do veneno tanto na superfície de células endoteliais em cultura, quanto uma ação e interação sobre a matriz extracelular. Estas toxinas degradam tanto a fibronectina exógena (VEIGA *et al.*, 2001a), como também a fibronectina sintetizadas por estas células (PALUDO, *et al.*, 2006). Os resultados também demonstram que células endoteliais após tratamento com o veneno sofrem retração progressiva do citoplasma e uma diminuição na adesão célula-célula, apresentando profundas alterações morfológicas (FIGURAS 5 D e E). Além disso, essas células reorganizam seu citoesqueleto e desorganizam e perdem os pontos de adesão à matriz extracelular (contatos focais) (PALUDO *et al.*, 2006). Tais alterações não são associadas à indução de morte celular, uma vez que células tratadas com o veneno por 18 horas, quando lavadas e postas para readerir, crescem normalmente aderidas ao substrato da cultura (FIGURA 6) (VEIGA *et al.*, 2001a).

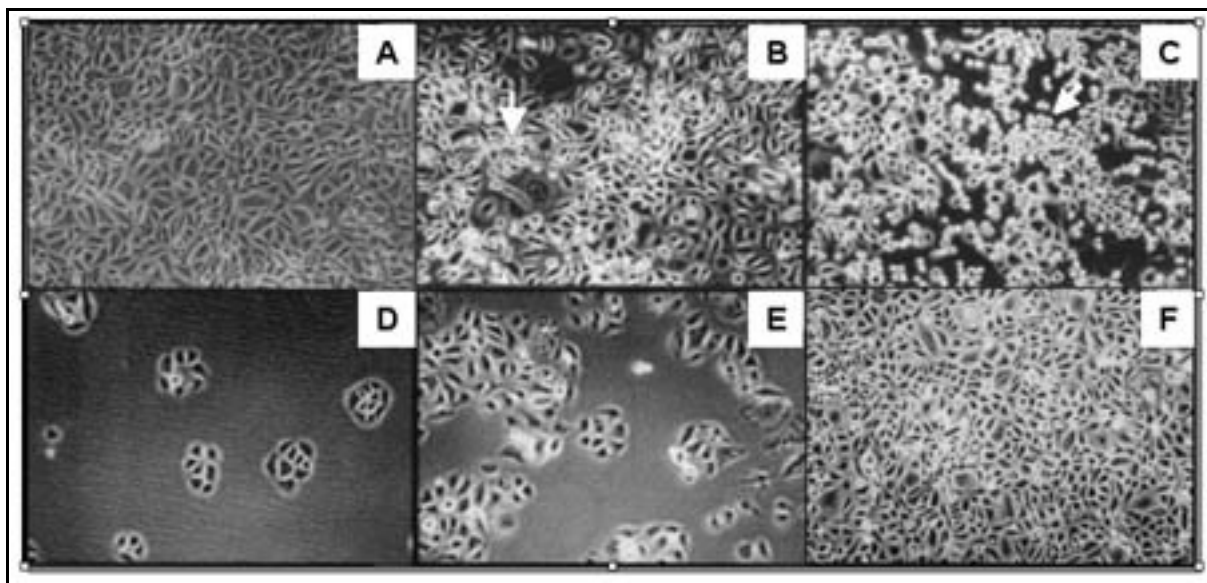


**FIGURA 6-** REPLAQUEAMENTO DE CÉLULAS ENDOTELIAIS SOLTAS PELA AÇÃO DO VENENO. **A-** células controles não expostas as toxinas do veneno. **B-** Células expostas ao veneno por 6 horas. **C-** Células expostas ao veneno por 18 horas. As células em suspensão após o tratamento por 6 e 18 horas foram coletadas e lavadas duas vezes com F12 e plaqueadas novamente, **D** e **E**, respectivamente. **F-** Células na ausência do veneno foram removidas da placa de cultivo com enzima proteolítica apenas como controle experimental. Todas as células replaqueadas foram mantidas por 72 horas com F12 suplementado com 10% de SFB e então fotografadas. ADAPTADO: VEIGA *et al.*, 2001a.

O presente trabalho tem como objetivo, ampliar os conhecimentos acerca dos efeitos das toxinas do veneno de *L. intermedia* sobre células endoteliais. Diante dos dados na literatura, o trabalho desenvolvido subdivide-se em dois focos principais. Para uma melhor compreensão dos mesmos, optou-se por apresentá-los como capítulos distintos dentro da dissertação. Resumidamente, o capítulo I refere-se a caracterização da interação das toxinas do veneno com a superfície das células endoteliais e a descrição de sua internalização. Já, o capítulo II diz respeito ao estudo do mecanismo de morte celular induzido em células endoteliais após exposição às toxinas do veneno e ao papel de um proteoglicano de heparam sulfato de superfície celular como molécula protetora da ação direta das toxinas do veneno.

---

## 2. CAPÍTULO I

---

---

## 2. CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO

---

### 2.1. INTRODUÇÃO

#### 2.1.1. Endocitose

Células eucarióticas possuem a capacidade de internalizar fluídos ou partículas a partir do ambiente extracelular, utilizando uma variedade de processos diferentes. O conjunto de mecanismos, pelos quais as células internalizam macromoléculas e partículas dentro de vesículas de transporte, derivadas da membrana plasmática, é denominado de endocitose (CARDELLI, 2001). Uma gama heterogênea de processos celulares estão envolvidos com a endocitose, incluindo: a captação de nutrientes, a reciclagem de vesículas sinápticas, a regulação da expressão de receptores de superfície, o remodelamento da membrana plasmática e a geração de polaridade na célula. Para satisfazer as diferentes necessidades desses processos, as vias endocíticas possuem considerável diversidade em termos de regulação, especificidade de diferentes cargas e destino final no interior das células (NICHOLS; LIPPINCOTT-SCHWARTZ, 2001).

Independente do processo utilizado para a internalização na célula a partir da invaginação da membrana para a formação das vesículas endocíticas, essas possuem um destino intracelular específico que incluem os lisossomos, o Complexo de Golgi ou a reciclagem para a membrana plasmática (JONES, 2007). A organização espacial do sistema de endomembranas e também do transporte pelas vias endocíticas é controlada pelo citoesqueleto, que tipicamente controla o movimento das vesículas para a região perinuclear que contém lisossomos, endossomos de reciclagem, o centro organizador de microtúbulos e o Complexo de Golgi (SOLDATI; SCHLIWA, 2006) .

Os vários mecanismos de endocitose podem ser classificados em duas grandes categorias que são a “fagocitose”, que envolve a captação de grandes partículas, e a “pinocitose”, que constitui a absorção de fluídos e pequenos solutos.

A fagocitose, em mamíferos, é normalmente restrita a algumas células especializadas, como macrófagos, monócitos e neutrófilos, enquanto que a pinocitose ocorre em todas as células (CONNER; SCHMID, 2003).

A pinocitose pode ocorrer de maneira receptor-dependente ou por fase fluída. A pinocitose mediada por receptor exige uma interação específica entre o receptor e o ligante que será internalizado, e é saturável no que diz respeito à concentração externa do ligante. Na endocitose de fase fluída não existe a interação com um receptor específico na membrana para que os compostos possam ser endocitados (WOLKERS *et al.*, 2003). Assim, na endocitose de fase fluída, a sinalização para a internalização não é realizada pelas moléculas que revestem as vesículas, como no caso da endocitose dependente de clatrina, mas é mediada pela composição da membrana plasmática e os diversos mecanismos específicos envolvem a heterogeneidade de lipídios e proteínas das mesmas, bem como a utilização de microdomínios estruturais de membrana, conhecidos como lipid-rafts, que brotam para o interior das células (KIRCHHAUSEN, 2000).

Potencialmente, os mecanismos que envolvem a endocitose de fase fluída podem desempenhar papéis vitais na reciclagem, remodelamento e regulação da composição lipídica da membrana plasmática, na captação de toxinas e vírus, e na regulação da transdução de sinais (NICHOLS; LIPPINCOTT-SCHWARTZ, 2001) .

## 2. CAPÍTULO I – OBJETIVOS

---

### 2.2. OBJETIVOS

Como as proteínas do veneno de *L. intermedia* apresentam interação com a superfície das células endoteliais, esta parte do trabalho buscou verificar em quais moléculas ocorre esta interação e se estes compostos podem ser endocitados.

Assim, os objetivos deste capítulo foram:

- Identificar moléculas chaves na interação das toxinas do veneno de *L. intermedia* com a superfície celular.
- Verificar se as células endoteliais são capazes de internalizar as moléculas do veneno.

Caso ocorresse a internalização, seria objeto de estudo também:

- Verificar por qual processo de endocitose ocorre a internalização destes compostos, seja mediada por receptor ou por fase fluída.

## 2. CAPÍTULO I – MATERIAIS E MÉTODOS

---

### 2.3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 2.3.1. Obtenção da *Loxosceles intermedia*

Foram utilizados indivíduos adultos de *Loxosceles intermedia* coletados na cidade de Curitiba e região metropolitana e mantidos no Laboratório de Matriz Extracelular e Biotecnologia de Venenos da UFPR.

#### 2.3.2. Extração de veneno loxoscélico por eletrochoque

O veneno de *L. intermedia* foi obtido de aranhas adultas mantidas em condições apropriadas e submetidas à eletrochoque de 15 volts no cefalotórax conforme descrito por FEITOSA *et al.* (1998).

#### 2.3.3. Dosagem de proteínas

A estimativa da concentração de proteínas presentes nas toxinas do veneno foi realizada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). A leitura do produto das reações colorimétricas foi feita através de leitor de ELISA em placa de 96 poços (microensaio).

#### 2.3.4. Cultura celular

Células endoteliais de aorta de coelho (linhagem RAEC) (BUONASSISI, 1973), células subendoteliais da musculatura lisa de aorta de coelho (linhagem RI) (BUONASSISI; VENTER, 1976) e células do ovário de hamster chinês (linhagem CHO) foram mantidas em meio F12 (mistura de nutrientes Ham's F12) (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) com L-glutamina, suplementado com bicarbonato de sódio (14mM), 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, Campinas, SP, Brasil), antibiótico (100IU/mL de penicilina) e antimicótico (100µg/mL de estreptomicina) ambos provenientes da Sigma (Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, EUA). Essas linhagens celulares foram gentilmente cedidas pela Profa Dra Helena Bonciani Nader – UNIFESP.

## 2. CAPÍTULO I – MATERIAIS E MÉTODOS

---

As células foram mantidas em incubadora de CO<sub>2</sub> (SANYO, modelo MCO-1SAC, Japão) à 37°C, com uma atmosfera úmida, sob tensão de 5% CO<sub>2</sub>. As trocas de meio foram realizadas a cada dois dias e os subcultivos, realizados quando as células atingiam a confluência.

Para subcultivar as células, as mesmas foram primeiramente lavadas com solução de EBSS (solução salina balanceada de Earl) sendo posteriormente, adicionado solução de pancreatina diluída em EBSS (0,25% w/v). O complexo enzimático de pancreatina (também conhecida como viocase) é composto por collagenases, elastases, esterases, nucleases e peptidases. Este complexo é extraído do pâncreas suíno e foi adquirido da Gibco (Life Technologies Rockville, MD, EUA). As células permaneceram sob ação enzimática por um período de 20 minutos. A seguir, a suspensão de células foi diluída em meio F12 contendo 10% de SFB, para inibir ação enzimática. A seguir, as células foram coletadas por centrifugação e ressuspensas novamente em meio F12 contendo 10% de SFB. Dependendo do objetivo do ensaio, as células foram cultivadas em frascos, placas de Petri ou de “multiwell” provenientes da TPP (Trasadingen, Switzerland).

Estoques celulares foram mantidos no nitrogênio líquido, armazenados em tubos adequados, em solução de congelamento (50% de soro fetal bovino e 10 % de DMSO (Sigma–Aldrich) em F12).

### 2.3.5. Reações de imunomarcacão ou detecção citoquímica

Células endoteliais e musculares foram plaqueadas em lamínulas circulares de 13 mm de diâmetro (5 x 10<sup>3</sup> células por lamínulas) e mantidas em cultura (37°C a 5% de CO<sub>2</sub>) por 4 dias. As células foram expostas ou não (controle) às toxinas do veneno de aranha marrom (40µg/ml) diluído em meio F12, sendo mantido por 1 ou 3 horas, a 37°C ou a 4°C, dependendo do ensaio.

Após o período de tratamento, as células foram lavadas com PBS e fixadas em solução de paraformaldeído (Electron Microscopy Sciences, Washington, NY, USA) (2% em PBS) por 30 min. A seguir, foram lavadas com PBS, seguido de bloqueio dos radicais aldeídicos livres, pela incubação com solução de glicina 0,1M por 2 minutos (Merck, Darmstadt, Alemanha). Após a lavagem novamente com PBS,

## 2. CAPÍTULO I – MATERIAIS E MÉTODOS

---

as células foram incubadas com solução de albumina (1% em PBS) por 20 minutos, para bloquear os sítios de interação inespecífica para proteínas.

Para a marcação da superfície celular foi utilizado anticorpo monoclonal anti-integrina  $\alpha 5\beta 1$  (1:100) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA) e lectina conjugada com FITC (4 $\mu$ g/mL) (Sigma, USA), diluídos em PBS contendo 1% de BSA, por 1 hora. Após o período de incubação, as células foram lavadas 5 vezes em PBS. No caso da marcação da integrina, as células foram submetidas a um novo bloqueio com PBS contendo 1% de BSA por 20 minutos. A seguir, as células foram então incubadas com anticorpo anti-IgG de cabra, conjugado com Texas Red (1:250 em PBS) por 40 minutos (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, EUA), sendo posteriormente lavadas por dez vezes com PBS.

Para a identificação da ligação das toxinas do veneno, foi utilizado anticorpo policlonal que reconhece as moléculas do veneno, o qual é produzido em camundongo (IgG) pelo laboratório do Prof. Dr. Silvio Sanches Veiga. Para tanto foi incubado por 1 hora, na diluição de 1:1000 (em PBS contendo 1% de BSA). Quando o experimento envolvia a internalização das toxinas, as células foram previamente permeabilizadas, pela incubação por 20 minutos, com 0,01% de saponina (Sigma-Aldrich) em PBS contendo 1% de BSA. A seguir, o anticorpo anti-veneno foi incubado por 1 hora no mesmo tampão de permeabilização. Após a incubação, as células foram lavadas 10 vezes com PBS. As células foram então incubadas com anticorpo anti-IgG de camundongo, conjugado com Alexa 488 ou Texas Red (1:250) (Jackson ImmunoResearch) em PBS contendo 0,01 de saponina, por 40 minutos e, subseqüentemente, foram lavadas por dez vezes com PBS.

Para a identificação dos lisossomos foi adicionado ao meio de cultura (na presença ou não de veneno) 500nM de Lyso-Tracker Red (Invitrogen, Molecular Probes, Camarillo, CA, EUA), o qual foi mantido por 1 hora (37°C, 5% de CO<sub>2</sub>).

A identificação de pinocitose por fase fluída foi realizada pela incubação do composto Lucifer Yellow (1mg/ml) (Sigma-Aldrich), o qual foi adicionado ao meio de cultura, sendo incubado de maneira semelhante ao Lyso - tracker conforme descrito anteriormente.

Os controles para os experimentos de imunomarcação foram realizados pela omissão do anticorpo primário. Para as células não tratadas com o veneno, o controle foi obtido pela incubação com o anticorpo anti-veneno, seguido pelo anticorpo secundário, conforme descrito anteriormente.

Ao final das reações de imunomarcacão ou detecção citoquímica, as células foram novamente lavadas com PBS e então coradas com soluão de DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride) (Molecular Probes, Eugene, OR, EUA) a 3µM em PBS por 15 minutos. Após a incubação, as células foram lavadas com PBS por 5 vezes e lavadas com água milli-Q e então montadas em lâminas histológicas com Fluoromont G (2:1 em PBS) (Electron Microscopy Science). O material foi analisado em microscopia de fluorescência convencional ou confocal. Para a fluorescência convencional foi utilizado o microscópio Axiophot (Carl Zeiss, Jena, Alemanha) e para a fluorescência confocal foi utilizado o modelo Radiance 2100 da Bio Rad (Bio Rad Hercules, Richmond, CA, EUA).

#### 2.3.6. Citometria de fluxo

As células endoteliais em suspensão ( $10^6$  células/mL) (previamente removidas com viocase) foram expostas ou não (controle) para as toxinas do veneno (40µg/mL em F12 na ausência de SFB) por 3 horas à 37°C sob agitaão branda. Após o período de incubação, as células foram lavadas com PBS, por cinco vezes e coletadas por centrifugaão. Então, os sítios inespecíficos de interaão para proteínas foram bloqueados pela incubação com PBS contendo 1% de BSA, por 20 minutos. Para a detecção dos carboidratos presentes na superfície celular, as células foram incubadas com Lectina conjugada com Alexa Fluor 488 (4µg/mL em PBS) por 40 minutos, sendo posteriormente lavadas por cinco vezes com PBS.

Foram analisados 10.000 eventos para cada amostra no citômetro de fluxo, utilizando o aparelho FACScalibur da Becton-Dickinson (Becton Dickison, Mountain View, CA, EUA). Os resultados obtidos foram analisados no programa Cell Quest.

## 2.4. RESULTADOS

### 2.4.1. Interação das toxinas do veneno de *L. intermedia* com componentes da superfície celular

Como apresentado anteriormente, as toxinas do veneno são capazes de interagir com componentes da superfície celular das células endoteliais. Assim, inicialmente buscamos avaliar se esta interação é mediada por integrinas e/ou carboidratos.

Para tanto, foi utilizado ensaios de dupla marcação, utilizando a marcação específica para reconhecer toxinas do veneno ligadas nas células, juntamente com a imunomarcação da integrina  $\alpha_5\beta_1$  ou com a detecção citoquímica de glicoconjugados específicos, pela utilização de Lectina WGA, conforme descrito em Métodos.

A marcação obtida para a integrina  $\alpha_5\beta_1$  nas células controles está mostrada na FIGURA 7A. A ampliação desta imagem (FIGURA 7B) evidencia a morfologia típica de células endoteliais em cultura: células bem espalhadas com numerosos processos laterais projetando-se do corpo celular, permitindo a adesão da célula sobre a superfície da lamínula.

As células que foram expostas ao veneno por 3 horas ainda apresentam marcação positiva para a integrina  $\alpha_5\beta_1$  (FIGURA 7C). Fica evidente que ocorre uma profunda alteração morfológica, mostrando agora células arredondadas. A presença de toxinas do veneno ligadas na superfície das células é evidenciada na FIGURA 7D, como descrito previamente por trabalhos do nosso grupo de pesquisa (PALUDO *et al.*, 2006). A sobreposição das imagens C e D (FIGURAS 7E e F) mostra que ocorre uma co-localização da marcação obtida para as integrinas  $\alpha_5\beta_1$  com a obtida para o veneno, sugerindo que toxinas loxoscélicas são capazes de interagir com integrinas.

Já com o estudo de glicoconjugados da superfície celular pode-se observar a marcação positiva para a Lectina WGA FITC, indicando que as células controles (não expostas para as toxinas do veneno) são ricas em *N*-Acetil-Glucosamina (FIGURAS 8A e B). Na imagem ampliada (FIGURA 8B) observa-se que a marcação é bastante pontual, indicando que diferentemente das integrinas, estes glicoconjugados possuem uma distribuição bastante irregular.

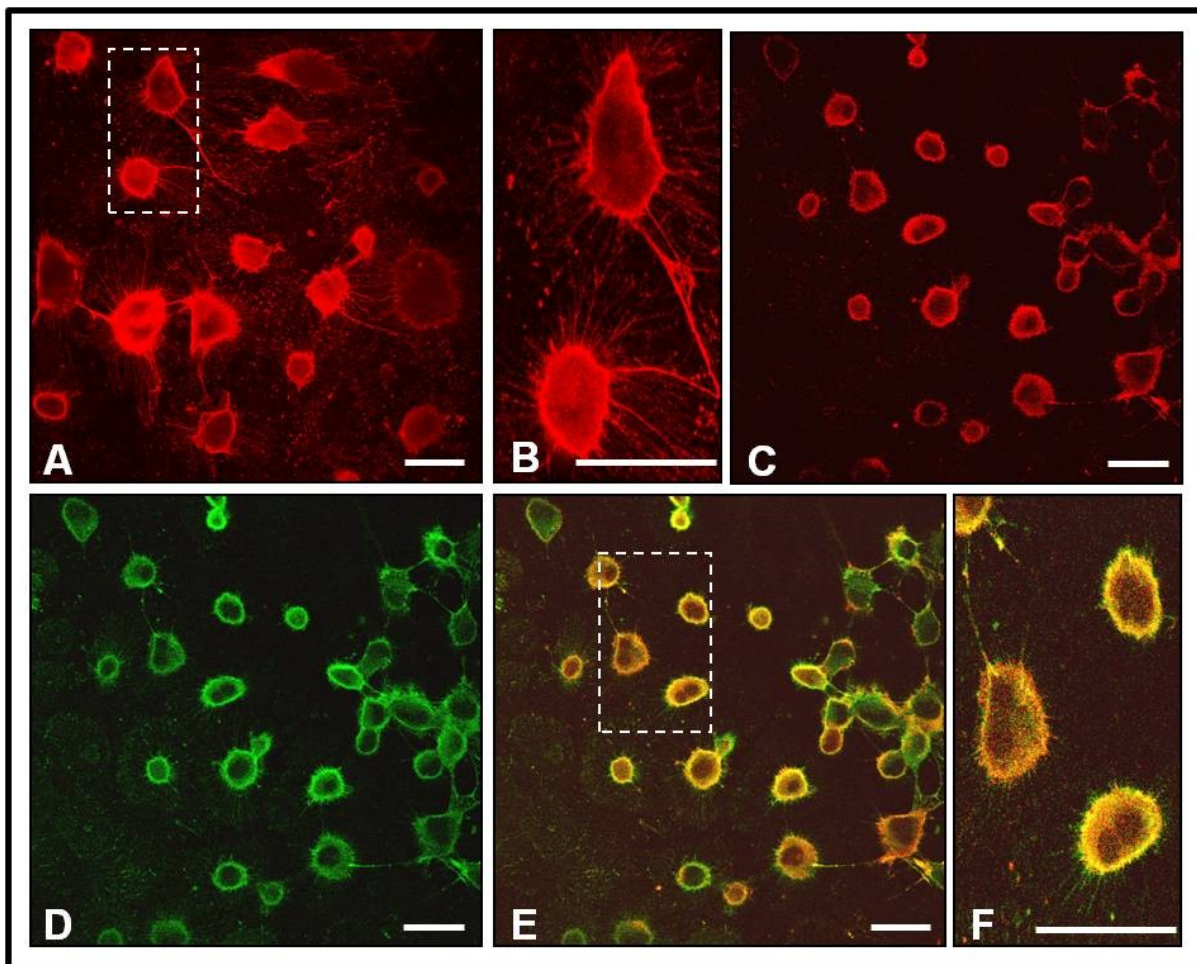


**FIGURA 7 - CO-LOCALIZAÇÃO DAS TOXINAS DO VENENO COM A INTEGRINA  $\alpha_5\beta_1$  PRESENTE EM CÉLULAS ENDOTELIAIS EM CULTURA.** Células endoteliais com 4 dias de plaqueamento foram mantidas na ausência e na presença do veneno de *L. intermedia* (40 ug/mL) por 3 horas a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>. **A** - Padrão de marcação para a integrina  $\alpha_5\beta_1$  em células endoteliais não tratadas com o veneno (vermelho). **B** - Região ampliada. **C** - Marcação da integrina  $\alpha_5\beta_1$  em células tratadas com veneno. **D** - Marcação típica do veneno sobre a superfície da célula (verde). **E e F** - Sobreposição das imagens C e D, evidenciada pela coloração amarela resultante da sobreposição das duas marcações individuais da integrina e do veneno. Imagens capturadas em microscópio confocal. Barra = 10  $\mu$ m.

Após o tratamento com o veneno por três horas (FIGURA 8C), com a marcação obtida para a Lectina WGA ficam mais evidentes as alterações morfológicas causadas nas células. Observa-se retração citoplasmática e uma alteração da relação núcleo-citoplasma, quando comparada com as células controles (FIGURA 8A). Fica também evidente que as células tratadas possuem agora, um formato arredondado, como observado anteriormente nas FIGURAS 8 C e D. Com a marcação obtida, também é possível observar uma mudança no padrão de distribuição dos carboidratos na superfície da célula (FIGURA 8C).

Quando a imagem da ligação das toxinas do veneno (FIGURA 8D) é sobreposta com a imagem obtida para a marcação com Lectina WGA (FIGURA 8C), observa-se que ocorre uma co-localização parcial destas marcações, indicando que o veneno interage com glicoconjugados da superfície de células endoteliais (FIGURAS 8 E e F).

Para confirmar a interação de toxinas do veneno com a superfície das células e verificar possível efeito sobre glicoconjugados do glicocálice, foi utilizada a técnica de citometria de fluxo. Assim, quando as células foram expostas para a Lectina WGA e observadas em citometria de fluxo, pode-se verificar uma diminuição na intensidade de fluorescência obtida para as células tratadas (FIGURAS 9B e C), quando comparadas com as células controles (FIGURA 9A). Esse deslocamento da fluorescência indica que após a exposição às toxinas do veneno, ocorre uma redução de glicoconjugados da superfície celular.

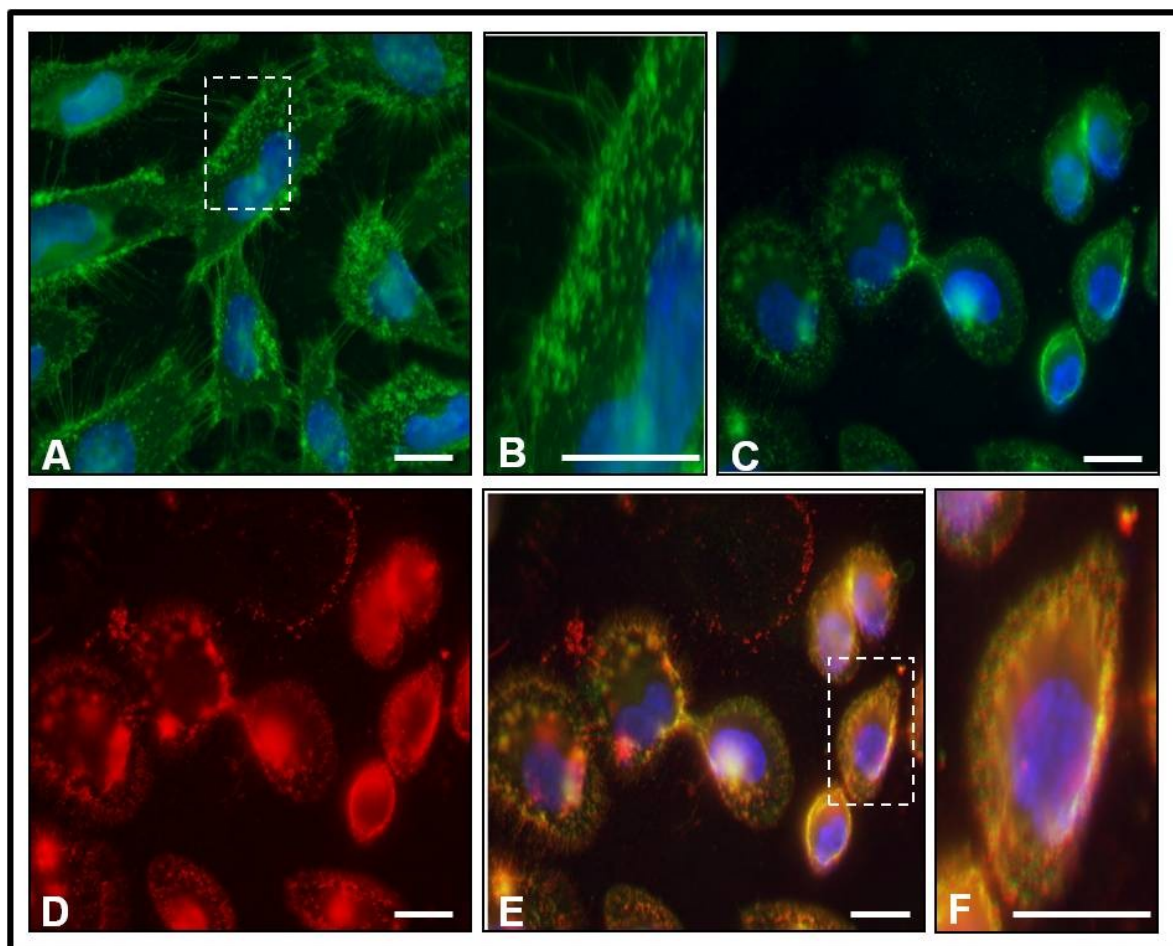


**FIGURA 8** - TOXINAS DO VENENO DE *L. intermedia* CO-LOCALIZÃO COM GLICOCONJUGADOS PRESENTES NA SUPERFÍCIE CELULAR. Células endoteliais cultivadas em lamínulas por 4 dias foram mantidas na ausência ou na presença do veneno de *Loxosceles intermedia* (40µg/mL) por 3 horas a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>. **A** - Células não tratadas com veneno incubadas com Lectina WGA conjugada com FITC (verde). **B** - Região ampliada. **C** - Células tratadas com o veneno. **D** - Marcação típica para as toxinas do veneno (vermelho). **E e F** - Sobreposição das imagens C e D, colocalização evidenciada pela coloração amarela resultante da sobreposição das duas marcações individuais da lectina e do veneno. O núcleo foi corado em azul com DAPI. Imagens obtidas em microscopia de fluorescência. Barra=10µm.

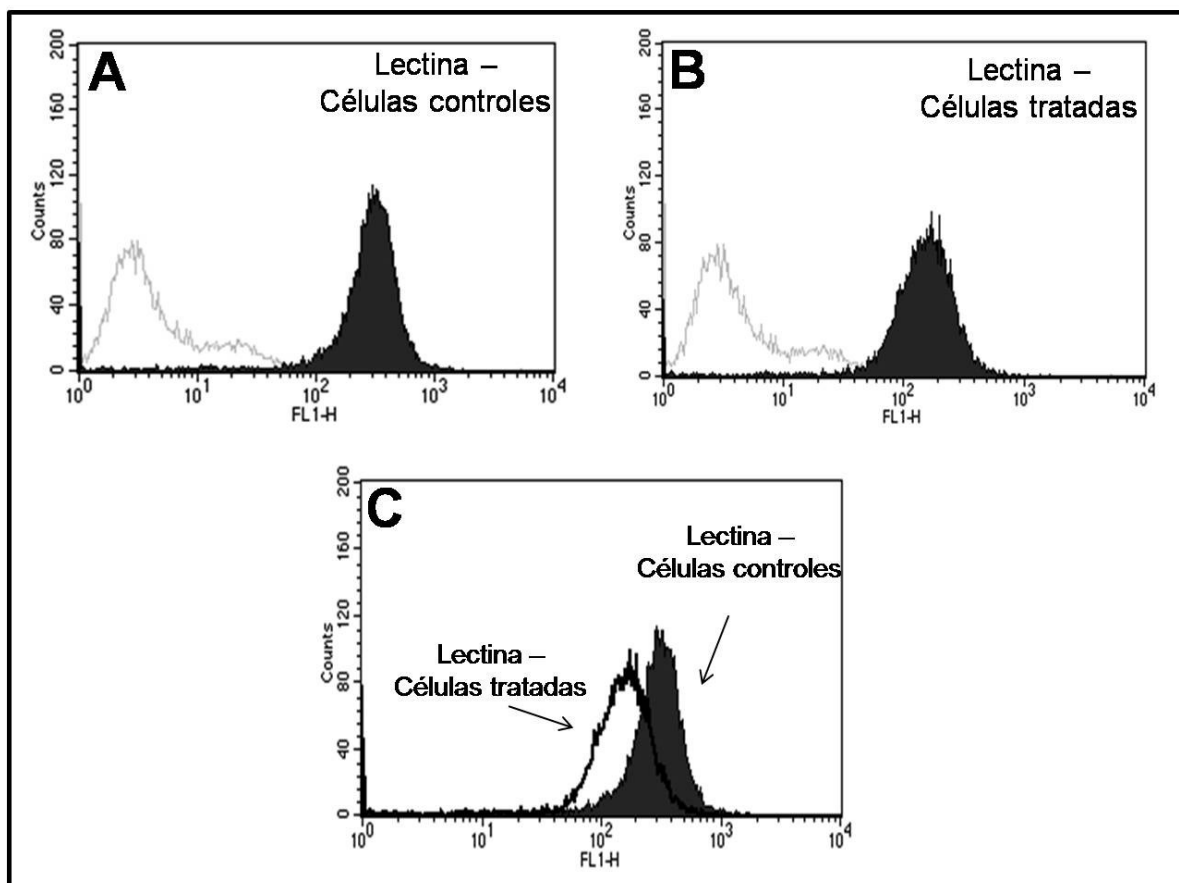


**FIGURA 9** - VENENO DE *L.intermedia* DEGRADA GLICOCONJUGADOS DA SUPERFÍCIE CELULAR. Análise por citometria de fluxo das células em suspensão após tratamento na ausência (controle) e na presença do veneno (40 $\mu$ g/mL) por 3 horas a 37°C sob agitação branda. Após o período de incubação, as células foram expostas para a lectina WGA FITC. O pico em cinza mostra a quantificação do controle (“background”). **A** - Intensidade de fluorescência para a marcação de lectina em células controles. **B** - Intensidade de fluorescência para a ligação de lectina em células tratadas. **C** - Sobreposição da quantificação obtida para as células controles e as células tratadas com veneno, mostrando uma diminuição na intensidade da fluorescência, sugerindo uma menor quantidade de carboidratos resultantes do tratamento com o veneno.

#### 2.4.2. Internalização das toxinas do veneno de *L. intermedia* pelas células endoteliais

Para verificar a possível internalização das toxinas loxoscélias, células confluentes foram incubadas por 3 horas na presença do veneno. A revelação do anticorpo policlonal que reconhece toxinas do veneno de *L. intermedia* se deu em condições onde as células foram permeabilizadas para permitir o acesso do anticorpo ao interior das mesmas. Como marcador intracelular utilizou-se o composto acidotrópico fluorescente Lyso-Tracker Red, empregado para marcar os lisossomos em células vivas. A análise das imagens obtidas por microscopia confocal (FIGURAS 10B e C) permite visualizar que ocorre co-localização para a marcação das toxinas do veneno com o marcador lisossomal, indicando que o veneno é internalizado pelas células endoteliais e segue para a degradação celular em lisossomos. Nem toda a marcação do veneno co-localiza com aquela obtida para os lisossomos. Este dado sugere que, dado o tempo de incubação, existem quantidades de toxinas do veneno que ainda estão em vesículas iniciais de endocitose, como os endossomos primários, os quais, devido ao pH ainda não serem ácidos o suficiente, não são marcados pelo Lyso-Tracker. Além disso, comparando a marcação dos lisossomos nas células controles (FIGURA 10A) e nas células tratadas é possível verificar que a quantidade de lisossomos aumenta nas células tratadas, indicando que o tratamento com o veneno gera um estímulo de endocitose pelas células. Essa é a primeira evidência na literatura da ocorrência de internalização das toxinas do veneno de *L. intermedia* por linhagens celulares.

A confirmação de que as células endoteliais são capazes de internalizar as toxinas do veneno, foi realizada pelo ensaio no qual as células foram incubadas com o veneno por apenas 1 hora, tanto a 37°C, quanto à baixa temperatura (4°C). Após a incubação, o meio foi removido, as células lavadas, e um meio novo contendo Lyso-Tracker Red, porém na ausência de veneno foi adicionado (FIGURA 11). Fica evidente que as células que foram inicialmente expostas ao veneno a 37°C apresentam co-localização do veneno com lisossomos (FIGURA 11A), enquanto que nas células expostas ao veneno a 4°C não é possível observar essa co-localização (FIGURA 11B), mostrando que de fato o veneno detectado na FIGURA 11A havia sido internalizado.

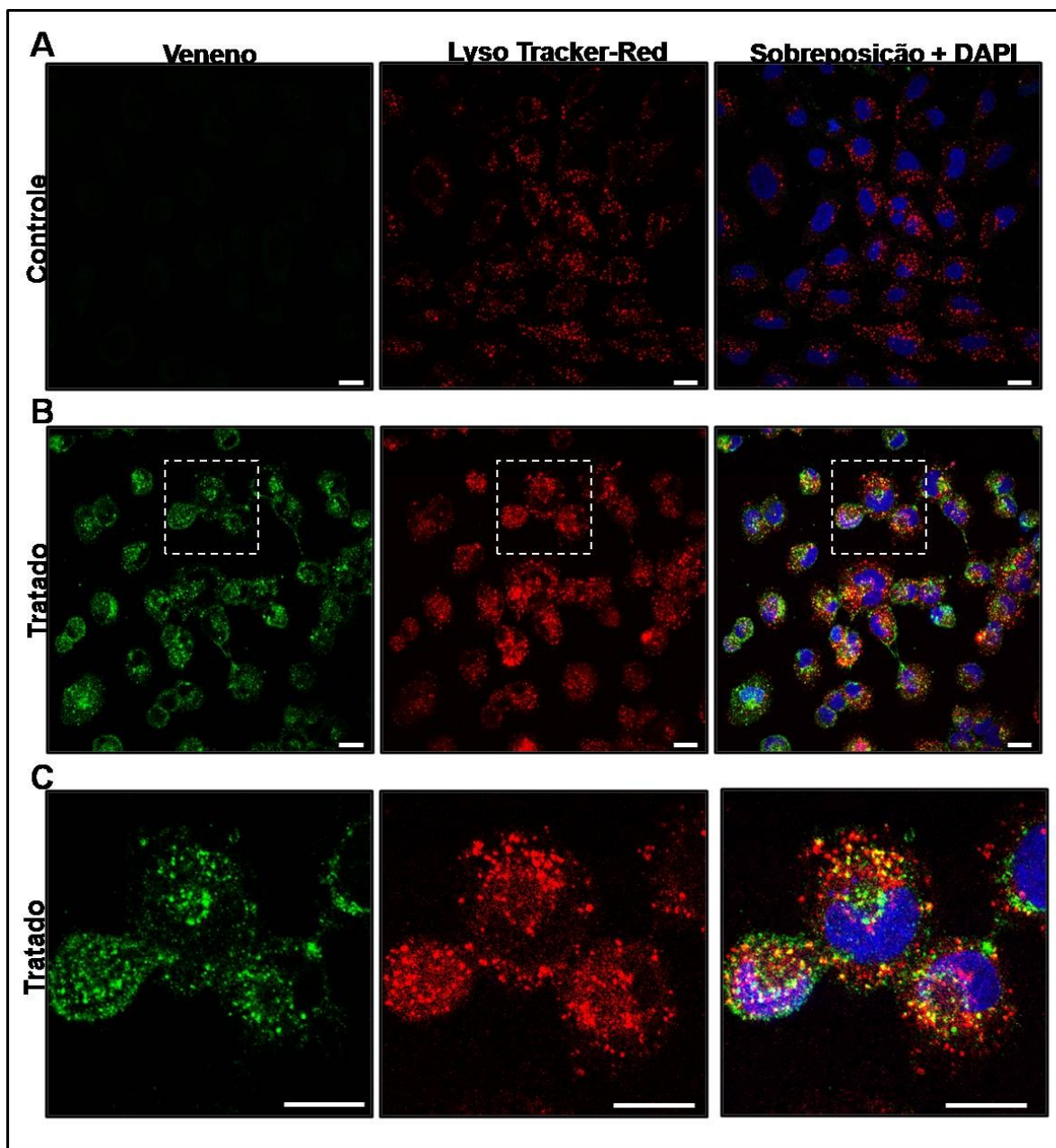


**FIGURA 10 - CO-LOCALIZAÇÃO DAS TOXINAS DO VENENO COM LISOSSOMOS DAS CÉLULAS ENDOTELIAIS.** Células endoteliais foram expostas ao veneno (40 $\mu$ g/ml) por 2 horas a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Em seguida, foi adicionado ao meio de cultura Lyso-Tracker Red (500nM) e foram mantidos por mais uma hora em cultura. Após o período de incubação, as células foram processadas para a detecção da internalização do veneno, conforme descrito em Métodos e então visualizadas em microscópio confocal. **A**- Células controle, não expostas ao veneno. **B** - Células expostas ao veneno por 3 horas, demonstrando o padrão de distribuição da marcação das toxinas do veneno sobre a célula (em verde), a marcação do Lyso-Tracker (em vermelho) e a internalização evidenciada pela co-localização de ambas as marcações (em amarelo). **C** - Região ampliada. O núcleo foi corado em azul com DAPI. Barra = 10 $\mu$ m.

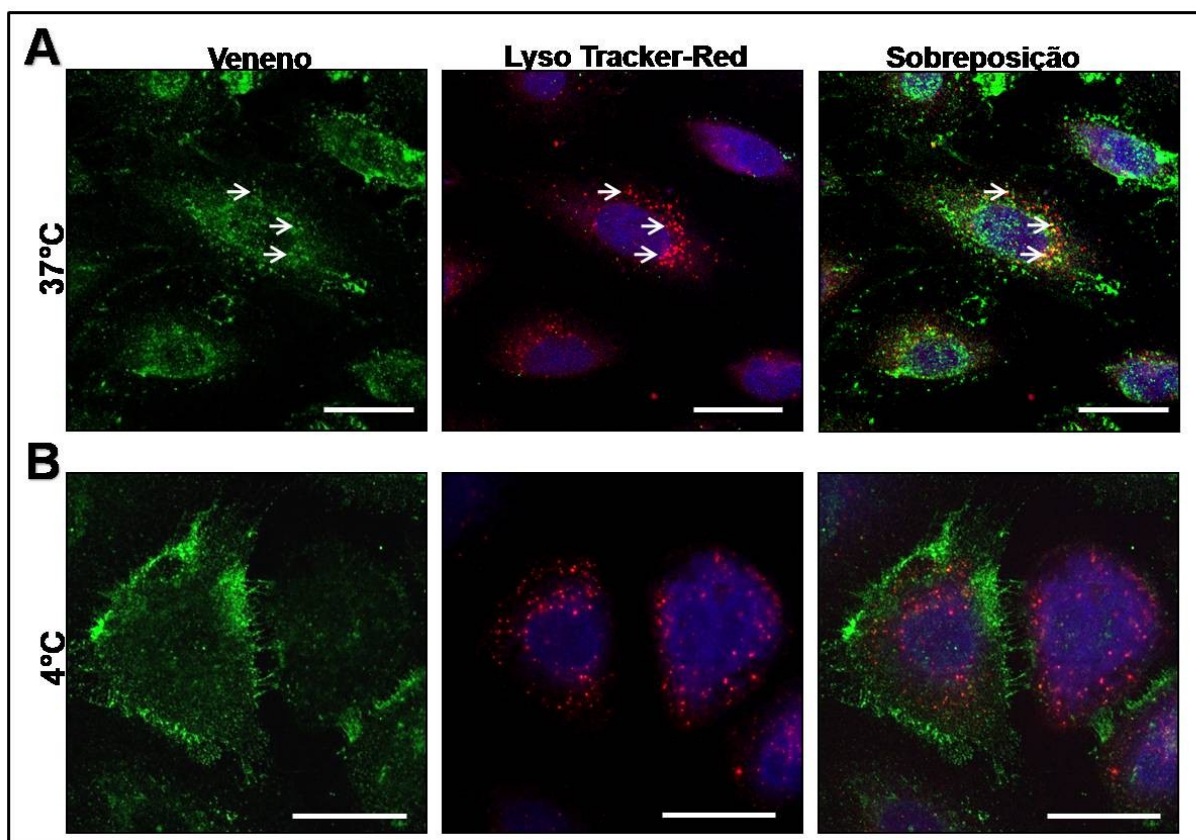


**FIGURA 11 - A INTERNALIZAÇÃO DAS TOXINAS DO VENENO ENVOLVE ENDOCITOSE.** Células endoteliais foram expostas ao veneno (40µg/ml) por 1 hora a 37°C ou a 4°C. Após esse período de incubação o meio foi removido, as células lavadas e meio F12 na ausência de veneno foi adicionado na presença de Lyso-Tracker Red (500nM) por 1 hora a 37°C. Após o período de incubação, as células foram processadas para a detecção da internalização do veneno conforme descrito em Métodos e então foram visualizadas em microscópio confocal. **A** - Células expostas ao veneno a 37°C. É possível observar co-localização do veneno com os lisossomos (setas). **B** - Células expostas ao veneno a 4°C. Não há evidência de co-localização. O núcleo foi corado em azul com DAPI. Barra = 10µm.

## 2.4.3. A internalização das toxinas do veneno envolve pinocitose de fase fluída

Diante da evidência da existência de endocitose das toxinas do veneno de *L. intermedia*, procurou-se investigar acerca do mecanismo de entrada dessa(s) toxina(s) na célula. Para tanto, utilizou-se o composto Lucifer Yellow (LY), que é empregado como marcador de pinocitose de fase fluída, uma vez que fica aprisionado nas vesículas endocíticas formadas por esse tipo de endocitose. Como observado na FIGURA 12, após a incubação das toxinas do veneno juntamente com o LY por 1 hora, é observado co-localização. Este dado indica claramente que a internalização de toxinas do veneno nas células endoteliais, ocorre por pinocitose de fase fluída.

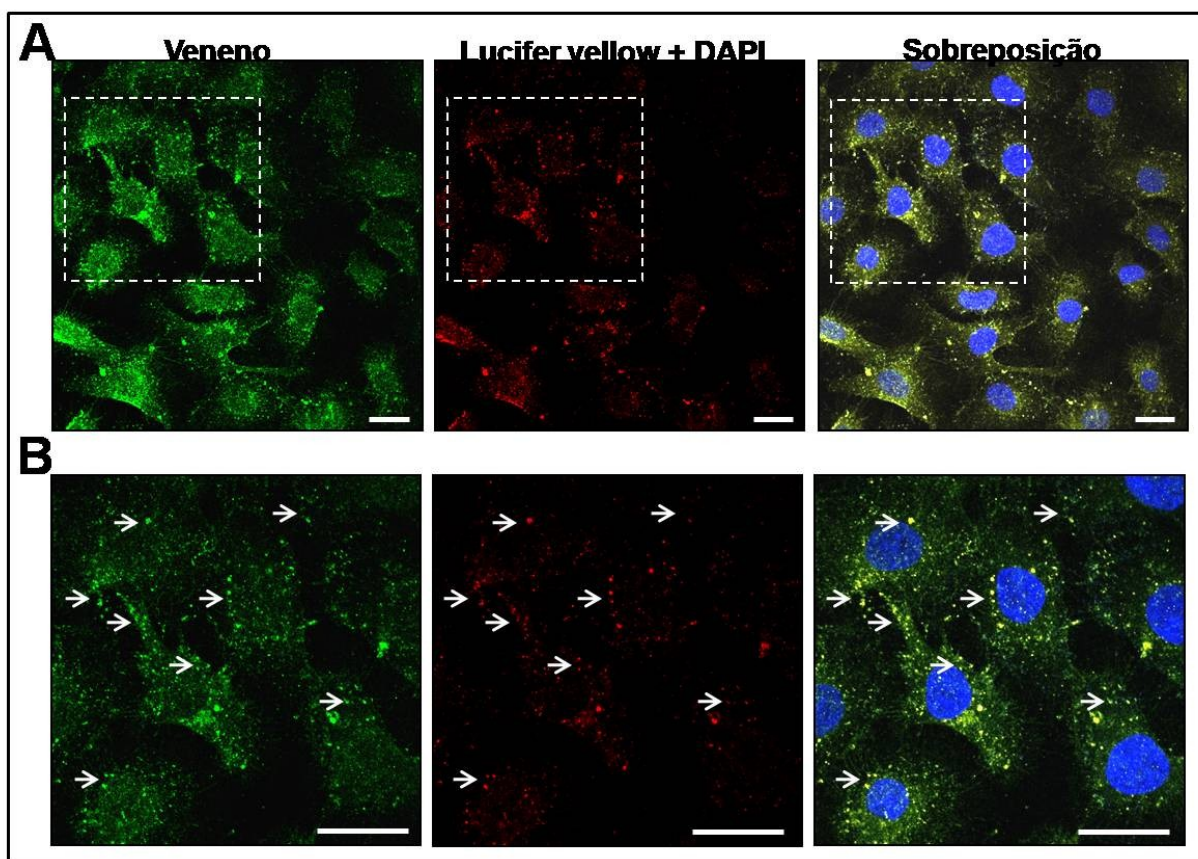


**FIGURA 12** – AS TOXINAS DO VENENO DE *L. intermedia* SÃO INTERNALIZADAS VIA ENDOCITOSE DE FASE FLUÍDA. Células endoteliais foram expostas ao veneno (40μg/ml) por 1 hora juntamente com o corante fluorescente Lucifer Yellow (1mg/mL) a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Após o período de incubação, as células foram processadas para a detecção da internalização do veneno, conforme descrito em Métodos e então foram visualizadas em microscópio confocal. **A** - Células expostas ao veneno e ao Lucifer Yellow. É possível observar co-localização do veneno com os as vesículas de pinocitose de fase fluída (setas). **B** - Região ampliada. O núcleo foi corado em azul com DAPI. Barra = 10μm

## 2.5. DISCUSSÃO

Após o envenenamento acidental ou experimental por venenos de animais peçonhentos, pouco se sabe sobre as interações com receptores celulares e sobre a distribuição destas toxinas nos tecidos. Muito menos, sobre a possível penetração destes compostos através da membrana celular. Dados sobre a habilidade de toxinas de venenos penetrarem em tecidos e células específicas e, por outro lado, de interagirem com estruturas intracelulares, certamente proporcionam importantes indícios sobre os mecanismos envolvidos nos efeitos citotóxicos desses venenos. Esses dados não apenas complementam nossa compreensão sobre os mecanismos de ação das toxinas do veneno a nível tecidual e celular, mas também contribuem para complementar o conhecimento atual sobre o funcionamento fisiológico dos diferentes tipos celulares (HAYASHI *et al.*, 2008).

O endotélio vascular, em virtude da sua localização estratégica entre o plasma e o tecido subjacente, é dotado de uma ampla variedade de funções que são vitais para a homeostase do organismo, destacando-se sua capacidade endocítica. Sob condições fisiológicas, as células endoteliais monitoram o transporte de moléculas do plasma, empregando mecanismos bidirecionais de transcitose e endocitose dependentes e independentes de receptores. Esses mecanismos são importantes para a regulação do tônus vascular e para a síntese e segregação de uma grande variedade de fatores. Além disso, as células endoteliais estão envolvidas na regulação do colesterol e lipídios, na transdução de sinais, imunidade, inflamação e hemostasia (MEHTA; MALIK, 2006; SIMA; STANCU; SIMIONESCU, 2009).

Como apresentado anteriormente, o veneno da aranha *L. intermedia* causa efeito nocivo sobre o endotélio dos vasos sangüíneos, o que tem sido verificado tanto *in vivo* quanto *in vitro*. As desordens observadas, que envolvem a degeneração da parede dos vasos sangüíneos são resultantes, não apenas da clivagem de componentes da matriz extracelular e da membrana basal ou da massiva infiltração leucocitária, mas de um efeito direto e inicial sobre as células endoteliais (VEIGA *et al.*, 2001a; ZANETTI *et al.*, 2002; PALUDO *et al.*, 2006). Paludo e colaboradores (2006) mostraram que o veneno loxoscélico, quando exposto para as células

endoteliais da aorta de coelho em cultura (linhagem RAEC), é capaz de ligar na superfície celular. Estes autores também verificaram que a adesão das células sobre a fibronectina foi significativamente inibida, quando houve um pré-tratamento celular com o veneno.

Estes dados nos levaram a estudar se as toxinas do veneno são capazes de interagirem com o receptor específico da fibronectina, a integrina  $\alpha_5\beta_1$ . Os resultados mostraram que de fato o veneno é capaz de interagir com a integrina  $\alpha_5\beta_1$  (FIGURA 7).

Este dado é interessante, tendo em vista que a matriz extracelular (MEC) influencia diversos mecanismos celulares, como a adesão, migração, proliferação, sobrevivência, espreadimento e diferenciação celular, os quais são sinalizados através da interação dos componentes da MEC com receptores celulares, conhecidos como integrinas (SCHWARTZ, 2001). Este dado leva a suposição de que as alterações celulares que culminam na morte das células, podem ser em decorrência da ligação de toxinas do veneno com a integrina  $\alpha_5\beta_1$ .

Outra abordagem nos levou a investigar se o veneno também pode-se ligar à glicoconjugados da superfície celular. Os dados mostram que o veneno liga-se a glicoconjugados que são co-localizados com lectina WGA (FIGURA 8). Esta importante família de componentes da superfície celular, como constituintes de glicoproteínas, glicolipídios, proteoglicanos e glicosaminoglicanos, fazem parte do glicocálix da célula, o revestimento da membrana plasmática carregado negativamente, que contribui com diversas funções do endotélio, especialmente na permeabilidade, limitando a passagem de macromoléculas (MEHTA; MALIK, 2006). Além disso, por citometria de fluxo foi possível demonstrar que há uma redução desses carboidratos de superfície após a exposição às toxinas do veneno (FIGURA 9). Foi demonstrado *in vivo* que o veneno de *L. intermedia* é capaz de causar um aumento da permeabilidade vascular a partir de 10 minutos após a injeção do veneno (PALUDO *et al*, 2008). As alterações no padrão de distribuição e a redução de glicoconjugados de superfície observadas podem estar contribuindo para esse aumento de permeabilidade observado *in vivo*.

Visto a observação da interação das toxinas loxoscélicas com estruturas específicas da superfície, buscou-se verificar se estas se apresentam restritas a superfície, ou se o veneno pode ser internalizado por essas células. Utilizando a técnica de detecção citoquímica e análise em microscopia confocal, com as células

permeabilizadas, foi possível observar que, além da interação com a superfície celular, as toxinas do veneno são internalizadas pelas células endoteliais (FIGURA 10).

Como marcador intracelular utilizou-se o composto LysoTracker Red, um composto acidotrópico que consiste em um fluoróforo ligado a uma base fraca que é parcialmente protonada apenas em pH neutro, penetrando facilmente pela membrana plasmática, concentrando-se tipicamente em organelas esféricas com pH ácido, especificamente lisossomos.

Com base nesse resultado, podemos sugerir que as toxinas que compõem o veneno podem ser internalizadas pelas células endoteliais. No entanto, sabendo que o veneno total é uma mistura complexa de toxinas bioquímica e biologicamente diferentes, não é possível afirmar qual toxina ou que proporção de toxinas é internalizada através dessa marcação.

A sugestão da existência de um mecanismo específico de endocitose mediando essa internalização do veneno pôde ser feita a partir da análise da ocorrência de internalização das toxinas do veneno a 37°C mas não há 4°C (FIGURA 11). Sabidamente, independente do mecanismo de internalização, a endocitose é fortemente dependente da temperatura (PADRÓN; BIZEAU; HAZEL, 2000).

Quanto ao mecanismo de entrada das toxinas do veneno na célula, nossos resultados demonstram que as toxinas do veneno de *L. intermedia* são internalizadas por endocitose de fase fluída (FIGURA 12). Como marcador desse tipo de endocitose foi utilizado a molécula fluorescente Lucifer Yellow (LY). O LY é um ácido disulfônico fluorescente que é internalizado por endocitose de fase fluída e entregue em endossomos iniciais onde se acumula com o passar do tempo; as duas cargas negativas impedem que a molécula atravesse a membrana por difusão (STEWART, 1981). As propriedades que fazem do LY um marcador de fase fluída incluem a alta quântica de rendimento, a resistência ao fotoapagamento (*Photobleaching*), a ausência de toxicidade para as células nas concentrações empregadas e a ausência de metabolismo celular (BALLATORI *et al*, 1999). O significado funcional da endocitose de fase fluída é sugerido pelo achado de que, quando a endocitose dependente de clatrina é inibida em células HeLa, a atividade

de caminhos alternativos aumenta de forma compensatória para restaurar taxas similares de captação de membrana (DAMKE *et al*, 1995) .

As células podem realizar endocitose de fase fluída por diversas vias, entre elas por macropinocitose e também por mecanismos independentes tanto de clatrina ou cavéolas (CONNER; SCHMID, 2003). A compreensão das especificidades do mecanismo de endocitose das toxinas do veneno de *L. intermedia* nas células endoteliais ainda precisa ser desvendada.

Ao longo dos últimos anos, vários peptídeos presentes no veneno de serpentes e escorpiões têm sido caracterizados pela sua capacidade de atravessar a membrana plasmática (FEOFANOV *et al*, 2005; WANG *et al.*, 2005; RAM *et al.*, 2008). Tanto a marocalcina quanto a crotamina, toxinas do veneno de escorpião e serpentes, respectivamente, descritas como pertencentes à família dos peptídeos que penetram nas células - CPPs (do inglês: cell-penetrating peptides) possuem a habilidade de entrarem eficientemente em diferentes tipos celulares, sugerindo que o processo de internalização das mesmas é independente da natureza biológica das membranas ou do tipo de receptores expressos na superfície das diferentes células (ESTÉVE *et al.*, 2005; HAYASHI *et al.*, 2008). Considerando que a internalização do veneno parece envolver características específicas das células endoteliais, uma vez que não foi possível verificar a sua internalização em células musculares lisas e epiteliais do ovário do hamster chinês - CHO (dados não mostrados), é interessante investigar as singularidades do processo endocítico dessas células.

Ainda, outro dado que precisa ser analisado é se a endocitose das toxinas do veneno de *L. intermedia* contribui de alguma forma para o desenvolvimento dos efeitos citotóxicos induzidos sobre as células endoteliais ou se apenas faz parte de um processo constitutivo da própria célula endotelial. Apesar da internalização do veneno ser observada já uma hora após a exposição, é importante observar que VEIGA e colaboradores (2001a) mostram que células que foram soltas da placa, pela exposição ao veneno por 18 horas, estavam viáveis e, quando eram submetidas ao replaqueamento, livre de veneno, voltavam a aderirem. O fato de o veneno colocalizar com os lisossomos sugere que o mesmo esteja seguindo para uma via de degradação. Trabalhando com a mesma linhagem endotelial, TRINDADE e colaboradores (2008) demonstraram que a heparina é endocitada por essas células e segue para degradação em lisossomos. Dados adicionais do grupo de

pesquisa coordenado pela Profa. Helena Nader têm mostrado que outros glicosaminoglicanos, como Condroitim 4 e 6-sulfato, Dermatan sulfato, além de Fucanas obtidas de alga marrons, são internalizadas por estas células (dados ainda não publicados). Assim, este conjunto de dados reforça a idéia de que a internalização do veneno nas células endoteliais não seja um mecanismo mediado por receptor e que faz parte de um processo constitutivo da célula endotelial.

Os estudos acerca dos mecanismos de entrada de toxinas nas células apontam para a existência de três passos fundamentais: (i) a interação com a membrana plasmática, (ii) o processo de entrada *per se* e (iii) o destino subsequente no citoplasma (RAM *et al.*, 2008).

É conhecido que as toxinas do veneno são encontradas depositadas sobre a superfície das células endoteliais e que as fosfolipases D presentes no veneno interagem com lipídios específicos (PALUDO *et al.*, 2006; CHAIM *et al.*, artigo em fase de submissão). Nossos resultados demonstram que as toxinas do veneno de *L. intermedia* interagem com carboidratos da superfície da célula endotelial, sendo capazes de diminuir a proporção dessas moléculas na célula, bem como com receptores integrínicos relacionados com o mecanismo de adesão celular. De maneira pioneira sugere-se, que além da interação, ocorre a endocitose das toxinas do veneno loxoscélico pelas células endoteliais via endocitose de fase fluída, e que as toxinas seguem, no processo endocítico, para a fusão com os lisossomos.

---

### 3. **CAPÍTULO II**

---

---

### 3. CAPÍTULO II – INTRODUÇÃO

---

#### 3.1. INTRODUÇÃO

##### 3.1.1. Morte celular programada – apoptose

Em organismos multicelulares a homeostasia é mantida pelo balanço entre proliferação e morte celular. Muitos mecanismos de morte celular têm sido descritos entre eles, os mais bem estudados são, a apoptose, a morte celular associada a autofagia e a necrose (KROEMER *et al.*, 2005). A apoptose é reconhecida como uma morte desencadeada por uma seqüência ordenada de inúmeras clivagens guiadas por enzimas hidrolíticas específicas, que degradam estruturas macromoleculares, como o DNA e o citoesqueleto, induzindo mudanças morfológicas características (MARTIN; GREEN, 1995).

A apoptose pode ser dividida em fases bioquímica e morfológicamente distintas. Na primeira, um estímulo pró-apoptótico aciona a ativação da maquinaria molecular central da apoptose (fase de sinalização). Na segunda, que é a fase de comprometimento, a maquinaria molecular de execução torna-se completamente ativada. Apenas posteriormente a isso, na terceira fase, a fase de degradação, as características padrão da apoptose tornam-se evidentes. Estas incluem as alterações morfológicas e a fragmentação do DNA. O tempo decorrido entre cada fase até o desencadeamento total da apoptose é variável de acordo com cada tipo celular (SARASTE; PULKKI, 2000; VERMES; HAANEN; REUTELINGSPERGER, 2000). A FIGURA 13 apresenta um esquema dos acontecimentos envolvidos na apoptose de maneira seqüencial.

A partir da sinalização, que pode acontecer através de diferentes acionadores que geram estímulos pró-apoptóticos para as células, um dos eventos centrais da fase de comprometimento ocorre em consequência da permeabilização da membrana mitocondrial. Esse mecanismo é regulado pela família de proteínas Bcl-2 (formada pelas proteínas do tipo BH3, do tipo Bax, e do tipo Bcl-2) (VALENTIJN; ZOUQ; GILMORE, 2004). O processo é iniciado por proteínas pro-apoptóticas da família BH3 (Bad, Bim, Bmf) que atuam como sentinelas, transmitindo o sinal de “stress” vindo das diferentes fontes através de um estímulo para a translocação de membros do tipo Bax (Bax, Bak e Bok) para a membrana externa da mitocôndria. Isso conduz para a permeabilização da membrana e conseqüente liberação do

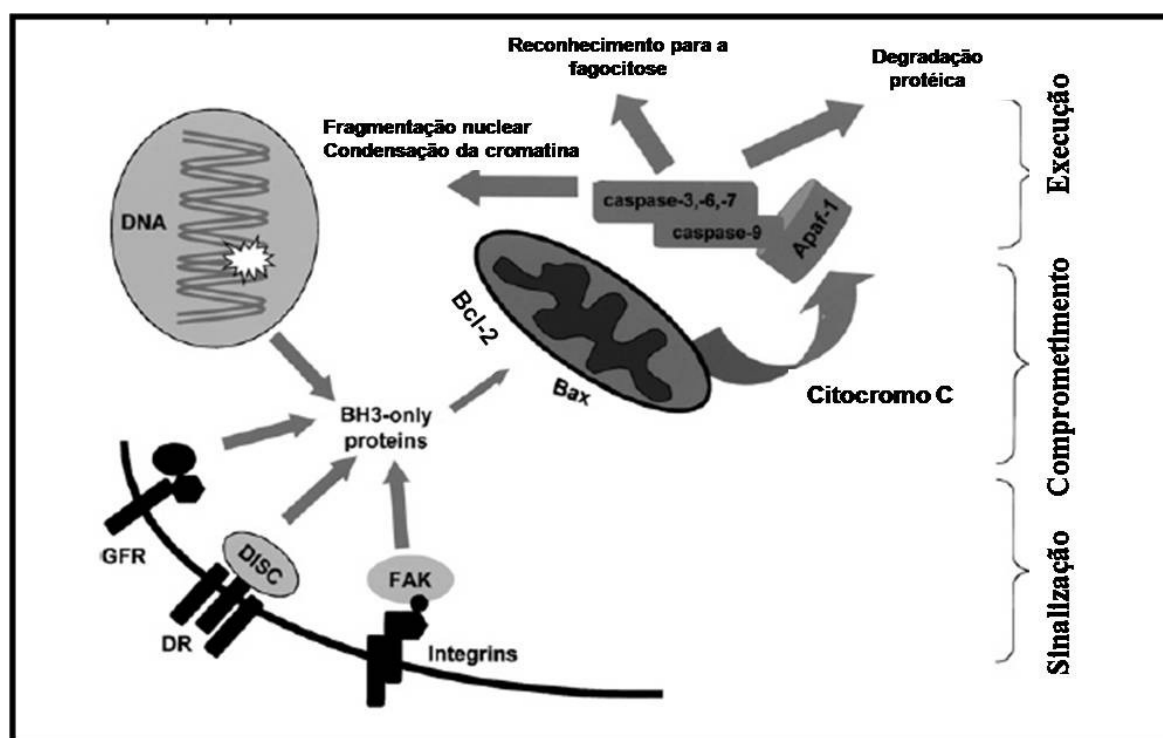


**FIGURA 13.** ESQUEMA DOS PRINCIPAIS EVENTOS MOLECULARES QUE OCORREM DURANTE A APOPTOSE. A sinalização para os eventos que desencadeiam a apoptose são originadas por: dano no DNA; sinalização via receptor de fator de crescimento (GFR); ligantes extracelulares de morte (DR) como FasL ou TNFRn; ou a adesão via integrinas. Estas diferentes moléculas levam para sinalização celular que, influenciam na expressão ou atividade das proteínas da família BH3 (que incluem a Bax e a Bcl-2). Estas atuam como sensores que transduzem esse sinal de dano e integram as respostas induzindo a permeabilização da membrana externa mitocondrial e, conseqüentemente, a liberação de fatores, como o citocromo c. Essa liberação induz a ativação da cascata de caspases, resultando na fase de execução da apoptose, com a degradação de proteínas, fragmentação do DNA e reconhecimento por fagócitos, culminando na morte celular. ADAPTADO DE: VALENTIJN; ZOUQ; GILMORE, 2004.

citocromo c e outros fatores pró-apoptóticos. Uma vez no citoplasma, o citocromo c interage com o complexo Apaf-1 que recruta e ativa as caspases (GILMORE, 2005).

As proteínas do tipo Bcl-2 atuam bloqueando o desencadeamento da cascata de caspases pela manutenção da integridade da membrana, prevenindo a formação de poros. Essas proteínas anti-apoptóticas estão superexpressas em células endoteliais quando essas estão aderidas a fibronectina, via integrina  $\alpha 5 \beta 1$ . Assim, a liberação do citocromo c pela mitocôndria é desencadeada pela alteração nas proporções de membros pró-apoptóticos e anti-apoptóticos da família de proteínas Bcl-2 (GROSSMANN, 2002).

Concomitantemente a esse processo, uma das modificações moleculares mais importantes ocorridas durante a apoptose é a reorganização da arquitetura da membrana plasmática, que envolve a redistribuição do fosfolípido fosfatidilserina

### 3. CAPÍTULO II – INTRODUÇÃO

---

para a porção externa da membrana (BEVERS *et al.*, 1982; KRYSKO; D'HERDE; VANDENABEELE, 2006). Tal evento é de extrema importância para o reconhecimento e fagocitose da célula morta (KRYSKO *et al.*, 2008).

As alterações morfológicas características que são desencadeadas na fase de execução são resultado da ativação de cisteíno-proteases que clivam suas proteínas-alvo em resíduos de aspartato específicos, denominadas caspases (do inglês: Cystein dependent ASPartate cleaving proteASE) (REED, 2000). Dentre essas alterações incluem-se a perda característica da integridade da membrana plasmática, com a formação de *blebs*, a condensação da cromatina, a fragmentação nuclear, a vacuolização citoplasmática e a formação de corpos apoptóticos (SARASTE; PULKKI, 2000).

#### 3.1.2. Mecanismo de morte celular por desalojamento – *anoikis*

Conforme apresentado anteriormente, a execução da apoptose, pode ser induzida por diferentes acionadores. A perda da adesão da célula ou uma adesão celular inadequada é um dos fatores que desencadeia apoptose.

Cabe salientar que em organismos multicelulares, as células não existem de maneira isolada, elas apresentam-se associadas com células vizinhas e com o ambiente extracelular. A matriz extracelular (MEC) circunda a célula e fornece um suporte físico para a adesão celular. A ancoragem da célula na MEC não é meramente estrutural, tendo em vista que essa ligação estimula cascatas de transdução de sinais que medeiam a sinalização requerida para a proliferação, migração, diferenciação e sobrevivência da célula (VALENTIJN; ZOUQ; GILMORE, 2004).

As primeiras observações de que a adesão celular é requerida para a sobrevivência celular surgiram no início da década de 90, com o estudo em células epiteliais e células endoteliais (MEREDITH; FAZELI; SCHWARTZ, 1993; FRISCH; FRANCIS, 1994). Esse tipo de apoptose foi então denominado de “*anoikis*”, cujo termo origina-se do grego, que significa estado de desalojamento. A morte por *anoikis* descrita nesses tipos celulares previne que essas células, quando desaderidas do substrato, possam colonizar outros locais (FRISCH; RUOSLAHTI, 1997).

### 3. CAPÍTULO II – INTRODUÇÃO

---

Atualmente, o papel da ancoragem para a sobrevivência celular é amplamente distribuído, sendo descrito e estudado em inúmeros tipos celulares aderentes como fibroblastos, células endoteliais, células epiteliais de brônquios, de fígado, de intestino, da próstata e também em queratinócitos (GROSSMANN, 2002).

A adesão celular é um mecanismo complexo que envolve diversas moléculas adesivas, que interagem com a MEC (ancoragem célula-matriz extracelular, principalmente por integrinas) e também com células homotípicas ou heterotípicas da vizinhança (ancoragem célula-célula, principalmente por glicoproteína da superfamília das caderinas). Assim, o processo de perda de adesão da célula envolve a desestabilização de diferentes tipos de interação célula-célula e célula-matriz extracelular, sendo *anoikis* o resultado final desse processo (GROSSMANN, 2002). Além disso, o formato da célula também desempenha papel importante, tendo sido demonstrado que apenas a adesão à MEC não é suficiente para prevenir *anoikis* (ZANETTI *et al.*, 1994). O formato da célula é controlado pelo citoesqueleto e suas conexões extracelulares, que são estabelecidas pelos diferentes ligantes de membrana, principalmente por integrinas e caderinas. Mudanças nessas forças mecânicas podem alterar a sinalização associada com a adesão celular, influenciando, assim, a sobrevivência da célula (GILMORE, 2005).

Apesar da definição única, *anoikis* é essencialmente apoptose. Todas as alterações que caracterizam a apoptose, incluindo a fragmentação nuclear e o blebbing da membrana, são observadas durante a *anoikis* (VALENTIJN; ZOUQ; GILMORE, 2004).

#### 3.1.3. Proteoglicanos de heparam sulfato da superfície celular

A molécula de heparam sulfato faz parte de um grupo estruturalmente complexo de polissacarídeos, pertencentes à família dos glicosaminoglicanos. Estes são heteropolissacarídeos lineares formados por unidades dissacarídicas constituídas por uma hexosamina (D-glucosamina ou D-galactosamina) unida por ligação glicosídica a um açúcar não nitrogenado, que pode ser um ácido urônico (D-glucurônico ou L-idurônico) ou um açúcar neutro (D-galactose). A maioria desses polissacarídeos apresenta grupamentos sulfatados que, juntamente com os

### 3. CAPÍTULO II – INTRODUÇÃO

---

carboxílicos dos ácidos urônicos, conferem uma alta densidade aniônica a esses compostos (MATHEWS, 1975).

Os glicosaminoglicanos, com exceção do ácido hialurônico, são sintetizados na forma de proteoglicanos, nos quais as cadeias sacarídicas estão ligadas covalentemente a um esqueleto (*core*) protéico (DIETRICH, 1984; KJELLÉN; LINDAHL, 1991). Os proteoglicanos estão presentes na matriz extracelular, membrana basal, superfície celular, como também intracelularmente em grânulos secretórios (POOLE, 1986; NADER *et al.*, 1989; ESKO, 1991; IOZZO, 1998). A atividade biológica de cada proteoglicano depende das propriedades do seu esqueleto protéico, da estrutura química do(s) seu(s) glicosaminoglicano(s) covalentemente ligado(s) e sua localização. No entanto, o tipo de cadeia de glicosaminoglicano ligada exerce uma grande influência na sua função biológica (DIETRICH, 1984; ESKO, 1991; BERFIELD *et al.*, 1999).

Uma grande variedade de proteoglicanos, especialmente proteoglicanos de heparam sulfato, estão associados à superfície celular. Existem 16 proteínas diferentes que carregam cadeias de heparam sulfato, sendo que a maioria é de superfície celular (sindecans ou glipicans) (TUMOVA; WOODS; COUCHMANN, 2000).

Tem sido mostrado, que os proteoglicanos de heparam sulfato estão envolvidos com importantes funções celulares, incluindo: reconhecimento celular, proliferação celular, adesão célula-matriz extracelular e célula-célula, bem como na hemostasia (DIETRICH *et al.*, 1977; PORCIONATTO; NADER; DIETRICH, 1999; WOODS, 2001; NAKATO; KIMATA, 2002; NADER *et al.*, 2004). Os sindecans podem, também, atuar como co-receptores juntamente com as integrinas, modulando as interações entre o citoesqueleto e a matriz extracelular (OH; WOODS; COUCHMAN, 1997; WOODS, 2001). Experimentos utilizando drogas que interferem na síntese das cadeias de heparam sulfato têm demonstrado o requerimento desta molécula para o desenvolvimento dos pontos de contatos focais, (WOODS; COUCHMAN, 1998).

Muitas das propriedades funcionais do heparam sulfato dependem da interação entre o glicosaminoglicano e várias proteínas da MEC, como fibronectina (YAMADA, 1983; WIERZBICKA-PATYNOWSKI; SCHWARZBAUER, 2003), vitronectina (HAYMAN *et al.*, 1983; UNDERWOOD; KIRKPATRICK.; MITCHELL,

### 3. CAPÍTULO II – INTRODUÇÃO

---

2002), laminina (SAKASHITA; ENGVALL; ROUSLAHTI, 1980; SASAKI; FASSLER; HOHENESTER, 2004), trombospondina (BERGE et al., 1999), colágenos (tipo I, III e V) (DELACOUX *et al.*, 1998) e tenascina (JANG *et al.*, 2004).

A presença de heparam sulfato na superfície de células endoteliais em cultura foi primeiramente observada por BUONASSISI (1973). Posteriormente, verificou-se que este heparam sulfato apresentava um efeito inibitório na coagulação sangüínea (BUONASSISI; COLBURN, 1983). A análise da estrutura da cadeia sacarídica deste proteoglicano mostrou que, na realidade, trata-se de um copolímero de heparam sulfato e heparina, em que regiões características da molécula de heparina estão intercaladas entre regiões típicas de heparam sulfato (NADER *et al.*, 1987).

### 3. CAPÍTULO II – OBJETIVOS

---

#### 3.2. OBJETIVOS

Sabendo que o veneno de *L. intermedia* age na matriz extracelular e provoca inúmeras alterações morfológicas, observadas até 18 horas de exposição, esta parte do trabalho foi focada em um estudo do efeito prolongado de tratamento, verificando se ocorre morte celular por ação direta ou indireta das toxinas loxoscélias.

Assim, utilizando células expostas ou não (controle) às toxinas do veneno de *L. Intermedia*, por tempos de exposição prolongados (até 48 horas), os objetivos deste capítulo foram:

- Avaliação morfológica e ultra-estrutural das células;
- Determinação do mecanismo de morte celular que é desencadeado;
- Verificação de possíveis alterações em biomoléculas importantes para a adesão célula-célula e célula-matriz extracelular;
- Avaliação de compostos que podem proteger as células, caso o veneno tenha uma ação indireta.

### 3. CAPÍTULO II – MATERIAIS E MÉTODOS

---

#### 3.3. MATERIAS E MÉTODOS

##### 3.3.1. Cultura celular

Células endoteliais de aorta de coelho (linhagem RAEC) (BUONASSISI, 1973), células de ovário de hamster chinês (CHO), sendo uma linhagem selvagem (CHO-K1) e uma variante mutante (CHO-745), deficiente na enzima xilosiltransferase, a qual está envolvida na biossíntese dos glicosaminoglicanos (ESKO; STEWART; TAYLOR, 1985), foram mantidas em meio F12 (Invitrogen) com L-glutamina, suplementado de bicarbonato de sódio (14mM), 10% de SFB (Cultilab), antibiótico (100IU/mL de penicilina) e antimicótico (100µg/mL estreptomicina), ambos provenientes da Sigma (Sigma–Aldrich). Foi utilizado também uma linhagem celular deficiente do proteoglicano de heparam sulfato de superfície (Sindecam-4), obtida utilizando técnicas de iRNA, nas células endoteliais RAEC. Esta linhagem denominada de 10+ e foi mantida em meio F12 suplementado de 10% de SFB e antibiótico (100µg/mL de higromicina). Essas linhagens celulares foram gentilmente cedidas pela Profa. Dra Helena Bonciani Nader – UNIFESP.

A manutenção e subcultivo das mesmas foram semelhantes à descrição realizada no item 2.3.4.

Em determinados ensaios, as diferentes linhagens celulares foram plaqueadas em placas de 24 poços e incubadas com veneno (40µg/mL) por diferentes períodos de tratamento. Após os períodos específicos, as células foram fotografadas com câmera digital acoplada a um Microscópio de fase Invertida Leica MPS30 (Leica Microscopy System Ltd. Heerbrugg, Switzerland). Posteriormente, o meio foi removido, placa de cultura foi lavada e as células que permaneceram aderidas ao tratamento com veneno foram soltas com pancreatina, coletadas em tubos de centrifuga e contadas em Câmara de Neubauer.

##### 3.3.2. Análise por citometria de fluxo

Células endoteliais foram plaqueadas em placas de 24 poços na proporção de  $3 \times 10^4$  cél/poço e mantidas por 5 dias em cultura. A seguir, as células foram tratadas com 40µg/mL de veneno em meio F12, por 24 horas ou 48 horas, sendo cada variável realizada em triplicata. Após o período de tratamento, as células que estavam soltas, devido à ação do veneno, foram coletadas e as células ainda

### 3. CAPÍTULO II – MATERIAIS E MÉTODOS

---

aderidas foram soltas da placa, utilizando pancreatina e, então acondicionadas em tubos e analisadas em citometro de fluxo FACScalibur da Becton-Dickinson (Becton Dickison, Mountain View, CA, EUA).

#### 3.3.3. Microscopia eletrônica de transmissão

Células endoteliais foram mantidas em garrafas de cultura de 150mL por 5 dias a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> e tratadas com 40µg/mL de veneno de *L. intermedia* por 6, 18, 24 ou 48 horas. Para controle experimental, um lote paralelo de células foi utilizado, porém sem o tratamento com o veneno, mas mantidas sob as mesmas condições. Após o período de incubação com o veneno, as células foram lavadas em tampão cacodilato de sódio (Sigma-Aldrich) (0,1M – pH 7,4). As células foram então fixadas por 2 horas em solução fixadora de Karnovsky (2,0% de glutaraldeído, 4% de paraformaldeído (ambos adquirido da Electron Microscopy Sciences), 1mM de cloreto de cálcio em tampão cacodilato sódio 0,1M, pH 7,2-7,4), na própria garrafa de cultural em temperatura ambiente. Após a fixação, as células foram lavadas em tampão cacodilato 0,1M por 3 vezes de 10 minutos cada. Processou-se então a pós-fixação durante 1 hora, no escuro em temperatura ambiente, com 1% de tetróxido de ósmio (Electron Microscopy Sciences), 0,8% de ferricianeto de potássio e 1mM de CaCl<sub>2</sub> em tampão cacodilato de sódio 0,1M – pH 7,2-7,4. Após a pós-fixação, novamente as células foram lavadas 3 vezes em tampão cacodilato de sódio 0,1M. As células foram então raspadas das garrafas de cultura e transferidas para tubos de centrifuga. Posteriormente foram submetidas à desidratação em acetona (Merck) iniciando pela incubação duas vezes 70%, uma vez em 90% e duas vezes em acetona 100%. Cada troca foi realizada num período aproximado de 12 horas, sendo o *pellet* de células, em cada etapa, centrifugado e ressuspenso na próxima concentração. Na última incubação, transferiu-se o *pellet* para cápsulas *BEEN* (Electron Microscopy Sciences), na qual foi realizada a infiltração do material em mistura de Epon:Acetona, em série decrescente (acetona: epon 2:1, 1:1, 1:2), por períodos aproximados de 12 horas, seguida pela emblocagem realizada na resina Epon 812 (Electron Microscopy Sciences). Após a polimerização da resina, em estufa a 60°C por 5 dias, os blocos foram cortados em ultramicrótomo (Leica, UltraCut R, Hidelberg, Alemanha). Os cortes ultrafinos foram contrastados, no escuro, com Acetato de Uranila (Electron Microscopy Sciences) por 20 minutos,

seguido de solução de Reynolds (nitrato de chumbo e citrato de sódio) por 10 minutos e então observados no Microscópio Eletrônico de Transmissão Jeol 1200 EXII (Jeol, Peabody, MA, EUA), do Centro de Microscopia Eletrônica (CME) da UFPR.

#### 3.3.4. Detecção da apoptose pela exposição da fosfatidilserina

O Kit para detecção de apoptose, contendo anexina V conjugada com FITC e iodeto de propídio (BD, Becton Dicksons, Franklin Lakes, NY, EUA), foi utilizado para detectar a exposição da fosfatidilserina e da ligação ao DNA, respectivamente. Resumidamente, células endoteliais foram plaqueadas em Frascos 75 cm<sup>2</sup> e mantidas até a confluência. A seguir, as células foram expostas às toxinas do veneno de *L. intermedia* (40µg/mL) por 6, 18, 24 ou 48 horas. Após a incubação, as células soltas pela ação do veneno foram coletadas separadamente e as que ainda permaneciam aderidas foram removidas com pancreatina e então coletadas. Alíquotas de 1x10<sup>6</sup> células provenientes dos diferentes tempos de incubação, foram incubadas com 1mg/mL de anexina V conjugada com FITC, por 15 minutos, à temperatura ambiente. Após a incubação, foi adicionado iodeto de propídio (5 µg/mL) (PI) e suspensão celular foi analisada em citometro de fluxo, utilizando FACScalibur. Esse ensaio discrimina células viáveis (anexina V-/ PI-) de células com apoptose inicial (anexina V+/PI-), células em estágios tardios de apoptose (anexina V+/PI+) e células em necrose (anexina V-/PI+). Um total de 30.000 eventos foram analisados com cada variável em triplicata e os dados analisados no software Cell Quest. Foram realizados três ensaios independentes.

Outro ensaio, utilizando a exposição do veneno para as células em suspensão, foi também realizado. Para tanto, as células foram soltas com 1mM de EDTA, centrifugadas, coletadas em tubos de centrifuga. Alíquotas de 1x10<sup>6</sup> células/tubo foram mantidas em suspensão em estufa BOD (demanda bioquímica de oxigênio- Quimis- Diadema, SP, Brasil), sob agitação branda a 37°C, na ausência (controle) ou na presença de veneno por 24 ou 48 horas. Após a incubação, as células foram lavadas e processadas de forma semelhante à descrição acima.

### 3.3.5. *Western blotting*

A expressão da Bax foi analisada por *Western Blotting* nas células tratadas com veneno por 0 (controle), 3, 6, 18, 24 ou 48h. Após os períodos de incubação, as células foram raspadas das placas de cultura, lavadas com PBS e o pellet foi incubado com tampão de lise (50mM de Tris HCl, pH 7,3, 150mM de NaCl, 1% de Triton X100, 1mM de EDTA, 1mM de PMSF, 5mM de Iodocetamina, 5mM de Benzamidina) por 30 minutos. A seguir, as células foram centrifugadas a 10.000g por 10 minutos e o sobrenadante foi coletado, sendo que o pellet foi descartado. Alíquotas contendo 80µg proteínas celulares foram submetidas à corrida eletroforética em gel de SDS PAGE a 12%, sendo que as amostras previamente tratadas com tampão de amostra em condição redutora (contendo β-mercaptoetanol), sendo fervidas por 5 minutos a 100°C. Após a corrida eletroforética, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose, a qual foi bloqueada por uma hora com solução de TBST (20mM de Tris-HCl, pH 7,7, 500mM de NaCl e 0,1% Tween-20) contendo 5% de leite desnatado (Molico, Nestlé). Após o bloqueio, a membrana foi incubada com anticorpo IgG anti-Bax (BD) (na diluição de 1:250 em TBST, contendo 5% de leite desnatado) *overnight*. Após a incubação, a membrana foi lavada três vezes por 5 minutos com TBST, e incubada por 1 hora com anticorpo IgG anti-mouse conjugado com peroxidase (na diluição de 1:3000 em TBST, contendo 5% de leite desnatado). Após a incubação, a membrana foi novamente lavada por três vezes de 5 minutos cada, com TBST e a reação foi revelada por quimioluminescência, após incubação da membrana com substrato para a peroxidase por 5 minutos e exposição do filme de Raio-X.

### 3.3.6. Ensaio de imunofluorescência

Células endoteliais foram plaqueadas em lamínulas circulares de 13 mm de diâmetro ( $5 \times 10^3$  células por lamínulas) e mantidas em cultura (37°C a 5% de CO<sub>2</sub>) por 4 dias. As células foram expostas ou não (controle) às toxinas do veneno de aranha marrom (40µg/ml) diluído em meio F12, sendo mantidas por 3 horas a 37°C.

Após o período de tratamento, as células foram lavadas com PBS e fixadas em solução de paraformaldeído (Electron Microscopy Sciences, EUA) (2% em PBS)

### 3. CAPÍTULO II – MATERIAIS E MÉTODOS

---

por 30 min. A seguir, foram lavadas com PBS, seguido de bloqueio dos radicais aldeídicos livres, pela incubação com solução de glicina 0,1M por 2 minutos (Merck, Alemanha). Após a lavagem novamente com PBS, as células foram incubadas com solução de albumina (1% em PBS) por 20 minutos, para bloquear os sítios de interação inespecífica para proteínas.

Para a imunomarcação foi utilizado anticorpo monoclonal anti-integrina  $\alpha 5\beta 1$  (1:100) (Santa Cruz, EUA) e anticorpo monoclonal anti-E-caderina (1:250) diluídos em PBS contendo 1% de BSA, por 1 hora. Após o período de incubação, as células foram lavadas 5 vezes em PBS. As células foram, então, submetidas a um novo bloqueio com PBS contendo 1% de BSA por 20 minutos. A seguir, as células foram então incubadas com anticorpo anti-IgG de cabra, conjugado com Texas Red (1:250 em PBS) por 40 minutos (Jackson ImmunoResearch, EUA), sendo posteriormente lavadas por dez vezes com PBS.

Após as incubações dos anticorpos as células foram novamente lavadas com PBS e então coradas com solução de DAPI (Molecular Probes, EUA), 3  $\mu$ M em PBS por 15 minutos. Ao final da incubação, as células foram lavadas com PBS por 5 vezes e lavadas com água bidestilada e então montadas em lâminas histológicas com Fluoromont G (2:1 em PBS) (Electron Microscopy Sciences, EUA). O material foi analisado em Microscópio Confocal Radiance 2100 da Bio Rad (Bio Rad Hercules, Richmond, CA, EUA).

#### 3.3.7. Microscopia eletrônica de varredura

As diferentes linhagens celulares foram plaqueadas em lamínulas circulares de 13mm de diâmetro e expostas ou não (controle) às toxinas do veneno (40 $\mu$ g/mL) em diferentes intervalos de tempos a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Após o período de incubação, as células foram lavadas com meio F12 e posteriormente com tampão cacodilato 0,1M, pH 7,4 e então fixadas à temperatura ambiente por 2 horas em 2,5% de glutaraldeído em tampão cacodilato 0,1M. Após as lavagens com tampão cacodilato, as células foram pós-fixadas com 1 % de tetróxido de ósmio em tampão cacodilato 0,1M por uma hora. As lamínulas foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol a partir do etanol 30% até etanol absoluto (Merck) em incubações de 10 minutos cada. A seguir, foram subtidas ao ponto crítico do CO<sub>2</sub>

### 3. CAPÍTULO II – MATERIAIS E MÉTODOS

---

(Modelo CPD-030 Critical Point Dryer, Bal Tec, Alemanha) e metalizadas com ouro (Modelo: SCD030 – Balzers Union FL 9496, Balzers, Alemanha). As imagens foram obtidas em um Microscópio Eletrônico de Varredura (JEOL J.S.M-6360 L.V., EUA) no Centro de Microscopia Eletrônica (CME) da UFPR.

#### 3.3.8. Análise estatística

Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  o erro padrão da média e analisados por ANOVA de uma via. A diferença estatística foi confirmada pelo pós-teste de Tukey. Foi considerado estatisticamente significativo  $p < 0,05$ .

### 3. CAPÍTULO II - RESULTADOS

#### 3.4. RESULTADOS

##### 3.4.1. Veneno de *L. intermedia* causa morte nas células endoteliais após longo período de exposição

Com o propósito de verificar os possíveis efeitos citotóxicos do veneno loxoscélico por longos períodos de exposição, as células endoteliais foram expostas por 24 e 48 horas com as toxinas de *L. intermedia*. Como demonstrado na FIGURA 14, após a incubação do veneno por 24 horas, ocorre uma diminuição na densidade celular, bem como alterações marcantes na morfologia das células. As células diminuem a adesão ao substrato, tornando-se arredondadas e agrupadas em agregados. Verifica-se a presença tanto de células ainda aderidas como células soltas.

Já em 48 horas, essas alterações tornam-se ainda mais pronunciadas, onde se observa que praticamente a maioria das células se soltou da placa. Ainda, nota-se, que as poucas células aderidas apresentam-se com a forma arredondada, mostrando claramente que estão em processo de desadesão.

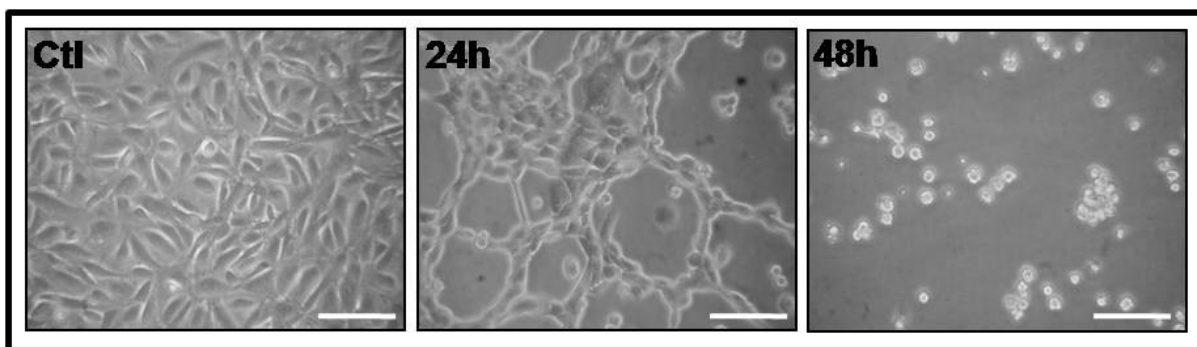


**FIGURA 14** - ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS EM CÉLULAS ENDOTELIAIS APÓS 24 E 48 HORAS DE EXPOSIÇÃO ÀS TOXINAS DO VENENO. Células endoteliais foram plaqueadas em placas de 24 poços na densidade de  $5 \times 10^3$  cel/poço e mantidas em cultura por 5 dias. Sob as mesmas condições, as células foram expostas à  $40 \mu\text{g/mL}$  de toxinas do veneno de *L. intermedia*, por 24 ou 48 horas. Nota-se que, com o passar do tempo o veneno provoca a desadesão das células. Barra= $100 \mu\text{m}$ .

Como o veneno agiu soltando as células, buscou-se avaliar, dentre a população celular que foi exposta às toxinas (células soltas e aderidas), a integridade das células, a qual foi realizada por citometria de fluxo. As análises dessas células, sem auxílio de marcação, utilizando apenas o tamanho (FSC-

scatter) e a granulosidade celular (SSC- scatter), revelam que tanto após 24 quanto 48 horas, há duas populações distintas (FIGURA 15). Através destes parâmetros, pode distinguir R3 como sendo uma população de células íntegras e R2 uma população composta de debris celulares.

Comparando os gráficos obtidos do tratamento por 24 horas, com aqueles na ausência do veneno, não é possível visualizar nenhuma diferença significativa aparente na localização das células dentro das duas populações (FIGURA 15). Este dado foi confirmado através dos valores gerados pelo software CellQuest (dados não mostrados).

Após exposição ao veneno por 48 horas, a quase totalidade das células encontra-se na população R2, isto é, juntamente com os debris celulares (FIGURA 15). Com este dado pode-se supor que aquela pequena fração de células aderidas, observadas na microscopia de luz, são estas detectadas em R3. Assim, os dados sugerem também que as células de 48 horas em R2 são as células que soltam e, possivelmente estão em processo de morte celular.

#### 3.4.2. Análise ultra-estrutural das células expostas às toxinas do veneno de *L. intermedia*

Para uma melhor caracterização das alterações morfológicas induzidas nas células endoteliais expostas ao veneno de *L. intermedia* e observadas em microscopia de luz, foi empregada a análise ultra-estrutural por microscopia eletrônica de transmissão (FIGURA 16).

Observa-se que as células controles apresentam um aspecto alongado refletindo sua aderência ao substrato. Essas células apresentam núcleo muito ativo, acompanhando a morfologia celular, com predomínio de eucromatina e nucléolo grande e bem evidente. No citoplasma foi possível observar as organelas intactas com arquitetura ultra-estrutural característica. Além disso, o contorno celular e a membrana plasmática apresentam-se preservados e não mostram sinais de alterações ultraestruturais (FIGURA 16- ctr).

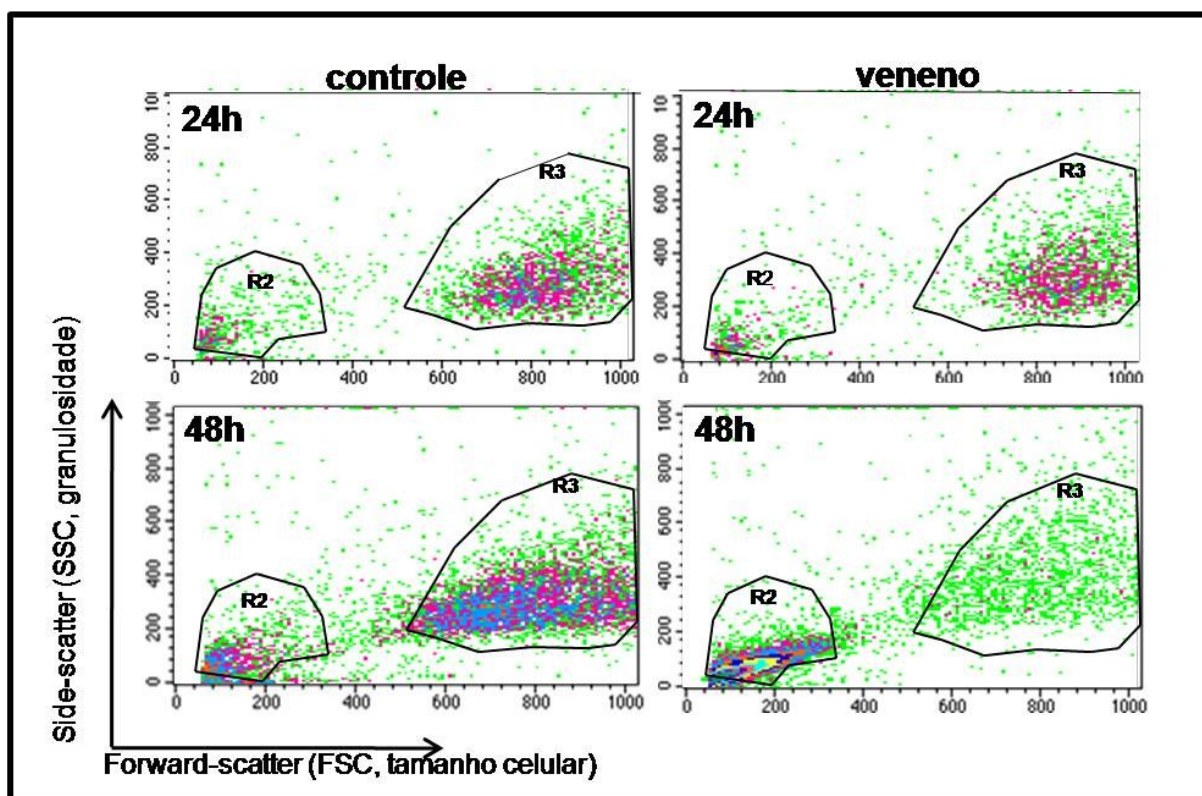


**FIGURA 15** - AS TOXINAS DO VENENO DE *L. intermedia* INDUZEM MORTE CELULAR. Após a exposição ou não (controle) ao veneno, as células endoteliais foram agrupadas (células aderidas com as soltas) e analisadas em citometria de fluxo. Para verificar a estabilidade celular, duas populações foram distinguidas, sendo R3 como uma população de células íntegras e R2 como população composta de debris celulares. Após 48 horas de exposição, observa-se um número maior de células na população R2, indicando morte celular. Resultados representativos de três experimentos realizados isoladamente.

### 3. CAPÍTULO II - RESULTADOS

---

Já, as células expostas às toxinas do veneno demonstram nítido comprometimento morfológico. Com exposição de apenas 6 horas, estas tornam-se arredondadas com uma retração do volume, bem como do corpo celular (FIGURA 16-6h). Essas alterações ficam ainda mais evidentes após períodos maiores de exposição.

Após 18 horas de tratamento, as células exibem inúmeras projeções membranares (*blebs*) contendo fragmentos de constituintes celulares (organelas) no seu interior. Também é possível observar a condensação da cromatina com a sua marginalização para a membrana nuclear (FIGURA 16 -18h). Essas alterações indicam sofrimento celular.

Alterações ultra-estruturais características de células apoptóticas são evidentes nas células tratadas com veneno por 24 e 48 horas (FIGURA 16 -24h e 48h). Tais alterações envolvem: a) encolhimento das células e do núcleo (núcleo picnótico); b) membrana nuclear formando bordas irregulares com inúmeras reentrâncias; c) condensação da cromatina em massas granulares uniformes; d) vacuolização citoplasmática abundante e e) perda característica da integridade da membrana plasmática. Essas alterações ultraestruturais são indicativas de apoptose e são claramente diferentes daquelas exibidas por células necróticas. Assim, esses resultados sugerem que o mecanismo de morte celular induzido pelo veneno de *L. intermedia* sobre células endoteliais é apoptose.

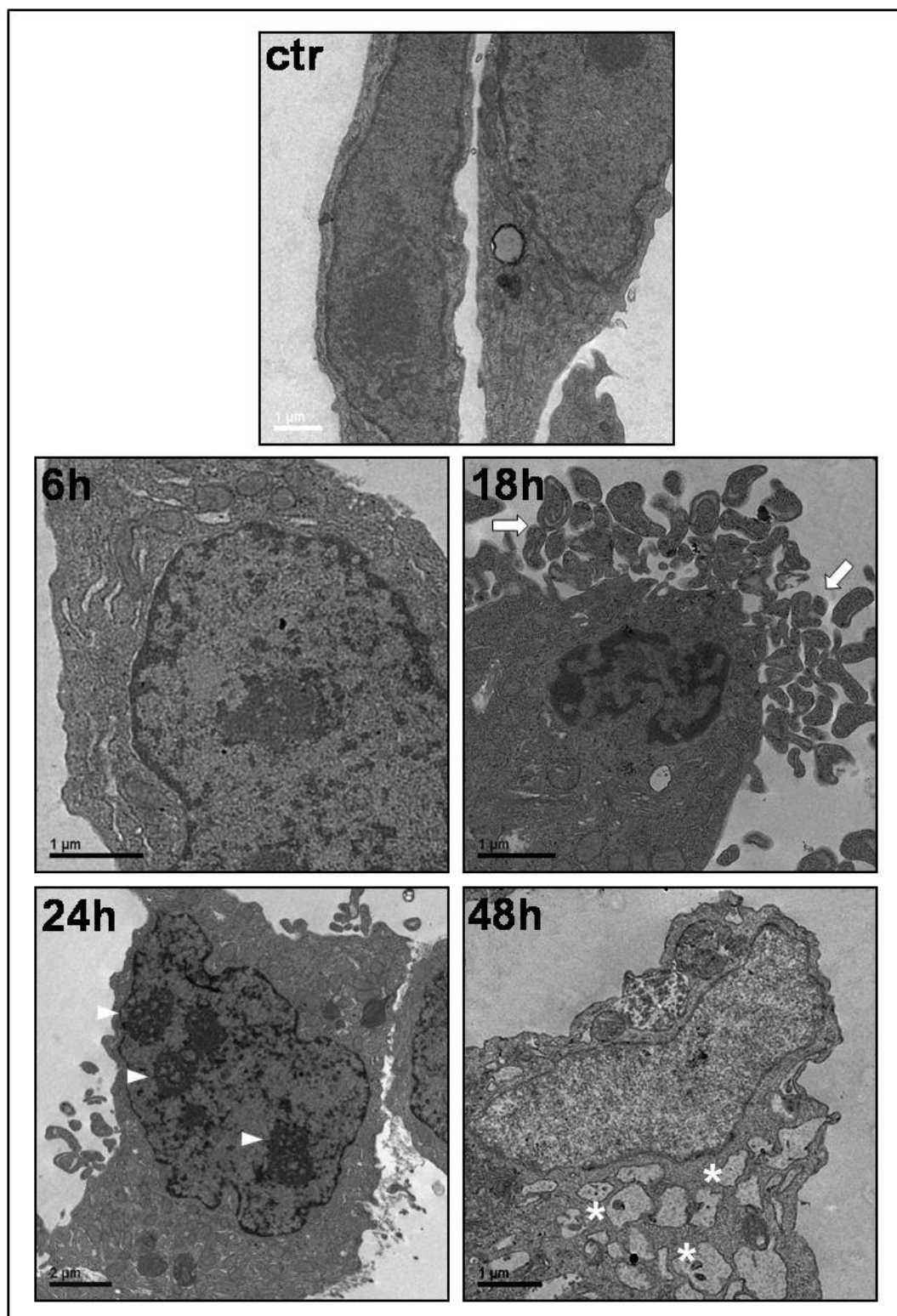


**FIGURA 16** - ANÁLISE ULTRA-ESTRUTURAL DE CÉLULAS ENDOTELIAIS EXPOSTAS AO VENENO DE *L. intermedia*. Células endoteliais foram mantidas em cultura até a confluência e então foram expostas às toxinas do veneno por 0 (controle – Ctr) 6, 18, 24 e 48 horas. Podem ser evidenciadas profundas alterações morfológicas, as quais são visíveis de maneira tempo dependente. Após 18 horas de exposição fica evidente a formação de *blebs* (setas). Note em 24 horas a condensação da cromatina em massas uniformes (cabeças de setas) e em 48 horas a vacuolização do citoplasma (asteriscos).

### 3. CAPÍTULO II - RESULTADOS

#### 3.4.3. O veneno de *L. intermedia* causa apoptose nas células endoteliais

Os dados mostram que o veneno solta as célula e, leva a uma perda da integridade celular, e demais características, que sugerem um processo de apoptose. Para confirmar este dado, buscou-se avaliar por *Western blotting* a expressão da proteína pro-apoptótica Bax. A FIGURA 17 mostra que a expressão da Bax aumenta já após 6 horas de tratamento com as toxinas do veneno, o que confirma nossos dados de que o veneno de *L. intermedia* induz apoptose em células endoteliais.

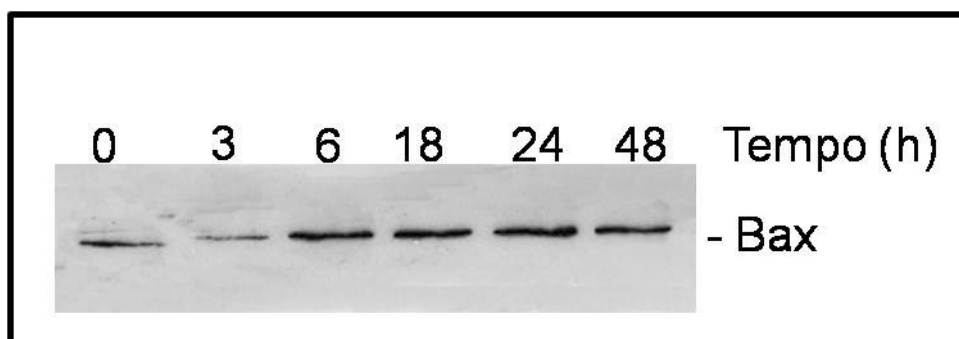


**FIGURA 17-** CINÉTICA DA EXPRESSÃO DE BAX EM CÉLULAS ENDOTELIAIS TRATADAS COM O VENENO. Culturas de células endoteliais foram incubadas com o veneno (40µg/mL) pelos períodos indicados. O conteúdo de Bax das células lisadas foi analisado por *Western Blotting* pela reação com anticorpo específico como descrito em Métodos. A expressão da Bax aumenta a partir de 6 horas de exposição às toxinas do veneno, indicando que houve um estímulo para a apoptose a partir desse tempo de exposição ao veneno.

Adicionalmente, buscou-se avaliar se este mecanismo de morte celular foi resultante da ação direta do veneno ou em decorrência da desadesão celular.

Para tanto, foi utilizado em conjunto Anexina V (composto que liga-se especificamente à fosfatidilserina) e iodeto de propídio (PI) (composto que intercala-se com o DNA celular, propriedade esta que é observada apenas nas células que não possuem integridade de membrana), que permite diferenciar o processo de necrose com a apoptose. Ainda, em caso deste último, é possível determinar em qual período de apoptose as células se encontram.

A interpretação dos resultados se baseia na distinção de células em: a) condição normal (ausência de marcação); b) apoptose inicial (marcação positiva apenas para anexina V); c) apoptose tardia (marcação positiva para anexina V e PI) e d) necróticas (marcação positiva para PI e negativa para anexina V).

### 3. CAPÍTULO II - RESULTADOS

---

Os resultados estão ilustrados na FIGURA 18 A. Observa-se que células expostas por 6 horas mostram ausência de marcação para ambos os marcadores, mostrando que ainda são viáveis, tais como as células controles. Este dado confirma os resultados avaliados ultraestruturalmente (FIGURA 16).

Para os tempos 18 e 24 horas de tratamento, foi avaliado separadamente tanto as células em suspensão, como aquelas que ainda permaneciam aderidas.

Observa-se que aproximadamente 80% das células que foram expostas por 18 horas, mas que ainda estavam aderidas, encontram-se em apoptose inicial (marcação apenas para a Anexina V). Já as células soltas, cerca de 30% apresentam sinais de apoptose tardia (marcadas tanto para anexina V, quanto para o PI).

Nas células tratadas por 24 horas, observa-se que quase a totalidade daquelas que apresentavam-se aderidas (aproximadamente 95%) encontram-se em apoptose inicial. No caso das células soltas, observa-se sinais de apoptose tardia em cerca de 50% delas.

Como mostrado anteriormente, após 48 horas de exposição praticamente todas as células estão em suspensão, logo, neste caso, apenas células soltas foram avaliadas. Observa-se que a fração de células em apoptose tardia é superior a 60% (FIGURA 18 A).

Este conjunto de dados foi plotado em um gráfico, para avaliar comparativamente a porcentagem de células presente nos diferentes estágios de apoptose. Nota-se com mais clareza que a apoptose tardia e a apoptose total (apoptose inicial mais apoptose tardia) aumentam de maneira tempo dependente (FIGURA 18B).

Em todos os casos que foram avaliados células em suspensão, retirou-se uma alíquota e estas foram lavadas e, posteriormente, replaqueadas. Curiosamente, as células expostas por 18 horas aderem e retomam o processo de proliferação celular, de forma similar às células normais. Para as células expostas por 24 horas, apenas uma pequena parcela volta a aderir e aquelas expostas por 48 horas não se observa mais a readesão (resultados não mostrados).

Com base nesses resultados, pode-se sugerir que a sinalização para a morte celular observada nas células endoteliais após exposição às toxinas do veneno de *L. intermedia* é iniciada durante o processo de desadesão celular. Todavia, o desencadeamento da morte celular propriamente dito é iniciado apenas nas células

## 3. CAPÍTULO II - RESULTADOS

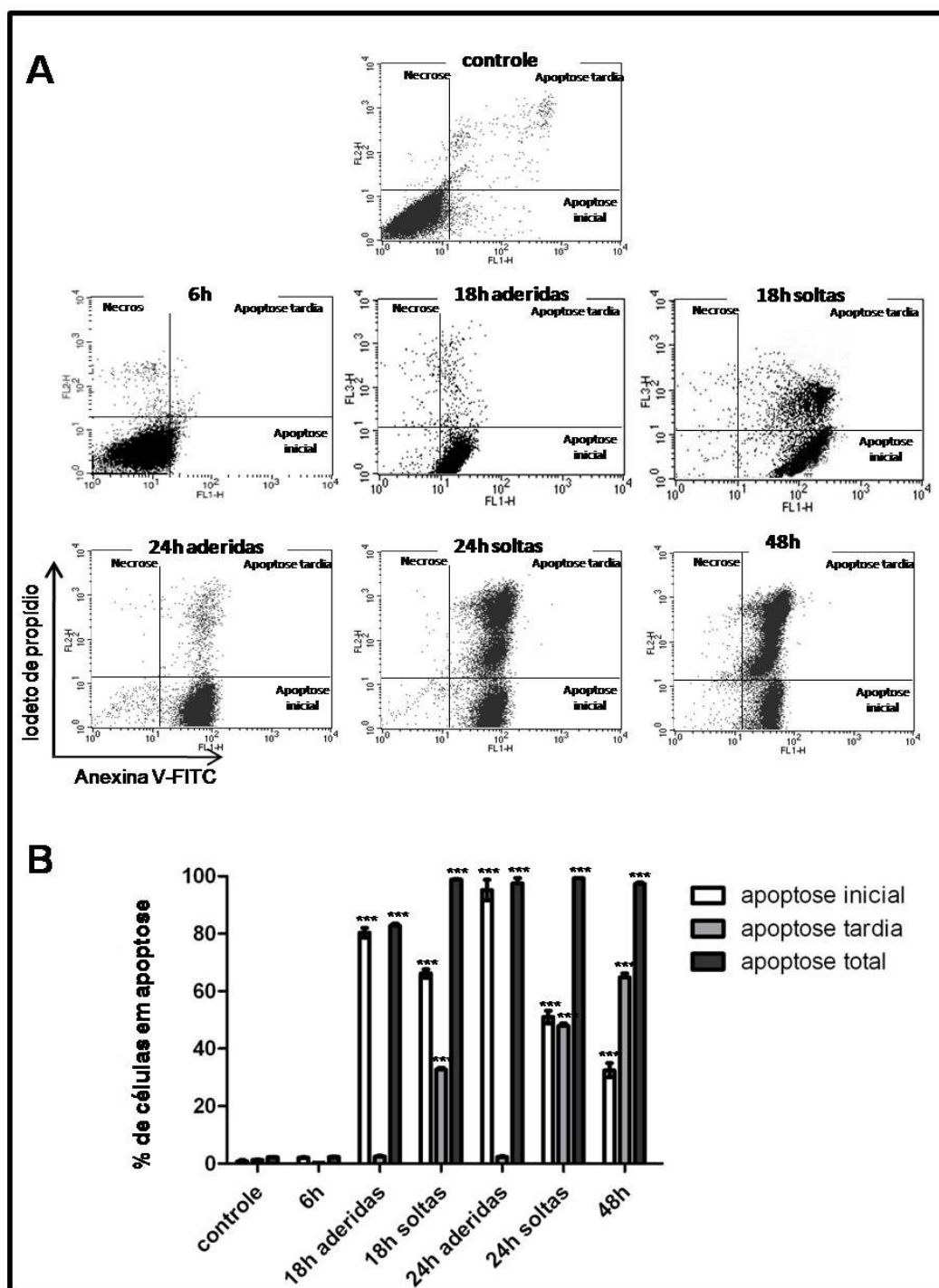


**FIGURA 18** - APOPTOSE INDUZIDA PELAS TOXINAS DO VENENO DE *L. intermedia* EM CÉLULAS ENDOTELIAIS. Células endoteliais foram expostas ao veneno por 0 (controle) 6, 18, 24 e 48 horas. Após a incubação, as células foram coletadas e processadas para a detecção de apoptose utilizando anexina V e iodeto de propídio e análise em citometria de fluxo. Nos tempos de 18 e 24 horas foram coletadas separadamente as células aderidas e as em suspensão. **A** - Distribuição das células controle e tratadas nos respectivos quadrantes de marcação para a anexina V (FL1-H) e iodeto de propídio (FL2-H). **B** - A porcentagem de células em apoptose inicial, apoptose tardia e a apoptose total (inicial + tardia) foram plotadas em um gráfico onde evidencia que o aumento da apoptose é tempo dependente. Cada barra representa a média +/- o desvio padrão de um experimento significativo realizado em triplicata. \*\*\*  $p < 0,001$  comparado com os controles nos respectivos tempos.

### 3. CAPÍTULO II - RESULTADOS

---

soltas, após longo períodos de exposição (24 horas ou mais). Estes dados sugerem que o mecanismo de morte celular pode ser por *anoikis* (morte por desalojamento).

Para confirmar se a apoptose foi induzida pelo veneno ou pela desadesão das células endoteliais (*anoikis*) utilizou-se uma condição que não permitisse a adesão das células. Para esse propósito, as células foram soltas da placa de cultura com EDTA e mantidas em tubos de centrifuga, em incubadora BOD a 37°C sob leve agitação. A quantificação das células apoptóticas foi realizada conforme apresentado no ensaio anterior (anexina V / iodeto de propídio).

Os resultados estão ilustrados na FIGURA 19, e verifica-se que o número de células apoptóticas para a condição controle é maior em condição não aderente, do que nas aderidas. Este resultado certamente era esperado, tendo em vista que o processo de sinalização celular mediado pela adesão à matriz extracelular (MEC) é de extrema importância para o crescimento e sobrevivência de células aderentes. O dado surpreendente foi aquele obtido para as células expostas para o veneno, tendo em vista que não há alteração no número de células apoptóticas, quando comparada ao grupo controle, tanto em 24 horas, quanto em 48 horas de exposição.

Esse conjunto de resultados mostra claramente que as células não morrem em decorrência da ação direta do veneno, mas sim, pelo desalojamento causado pelo mesmo, portanto morrem por *anoikis*.

#### 3.4.4 Alterações no padrão de marcação de integrinas e caderinas em células expostas às toxinas de *L. intermedia*

Visto que a ação das toxinas do veneno induz a desadesão das células endoteliais desencadeando a morte celular, procurou-se investigar possíveis alterações na distribuição de proteínas envolvidas nesse processo. Como discutido anteriormente, a adesão celular é um mecanismo complexo que envolve diversas moléculas de adesão interagindo com a MEC (ancoragem célula-matriz) e também com células homotípicas ou heterotípicas da vizinhança (ancoragem célula-célula). Os principais receptores de superfície celular envolvidos com a adesão célula-matriz são as integrinas, e os de adesão célula-célula são as caderinas.

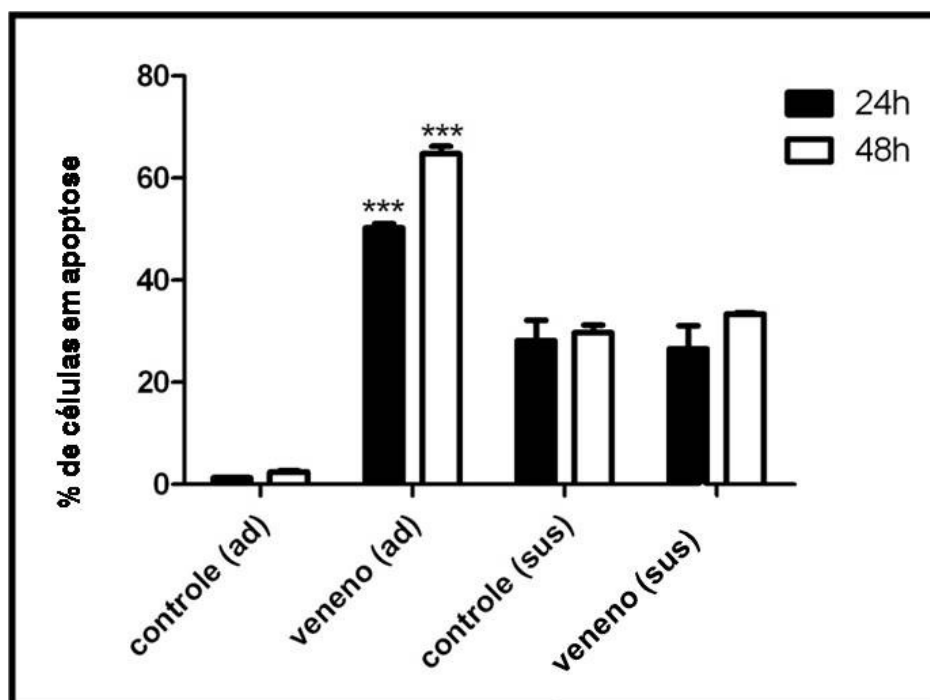


**FIGURA 19** - EFEITO DO VENENO DE *L. intermedia* SOBRE CÉLULAS ENDOTELIAIS EM SUSPENSÃO. Células endoteliais foram tratadas com veneno (40µg/mL) por 24 e 48 horas em condições aderentes (ad) ou em suspensão (sus). No tratamento em suspensão, as células foram soltas com EDTA e mantidas em estufa BOD sob leve agitação a 37°C. A indução de apoptose foi avaliada por citometria de fluxo pela marcação com anexina V/iodeto de propídio. Foram analisados 30.000 eventos para cada amostra. As células quando em suspensão não apresentam diferença no número de células apoptóticas após o tratamento com o veneno, indicando que o mecanismo de morte celular induzido é por anoikis, estando relacionado com a desadesão da célula ao substrato. Cada barra representa a média +/- o desvio padrão de um experimento significativo realizado em triplicata. \*\*\* p<0,001 comparado com os controles nos respectivos tempos.

Assim, buscou-se avaliar se 3 horas de exposição ao veneno já seria suficiente para provocar alterações nestas importantes moléculas adesivas. Por microscopia confocal, observa-se que o tratamento com o veneno induz profundas alterações no padrão de marcação desses dois receptores da superfície da célula (FIGURA 20).

A marcação da integrina  $\alpha_5\beta_1$ , mostra que as células perdem o espreadimento e a adesão celular, tornando-se arredondadas. De maneira semelhante, nos resultados da imunomarcação para a E-caderina observa-se que as células perdem o contato célula-célula, tornando-se menores e arredondadas (FIGURA 20). Tais resultados suportam a evidência de que o veneno provoca a perda de adesão das células endoteliais do substrato, induzindo a morte celular por *anoikis*.

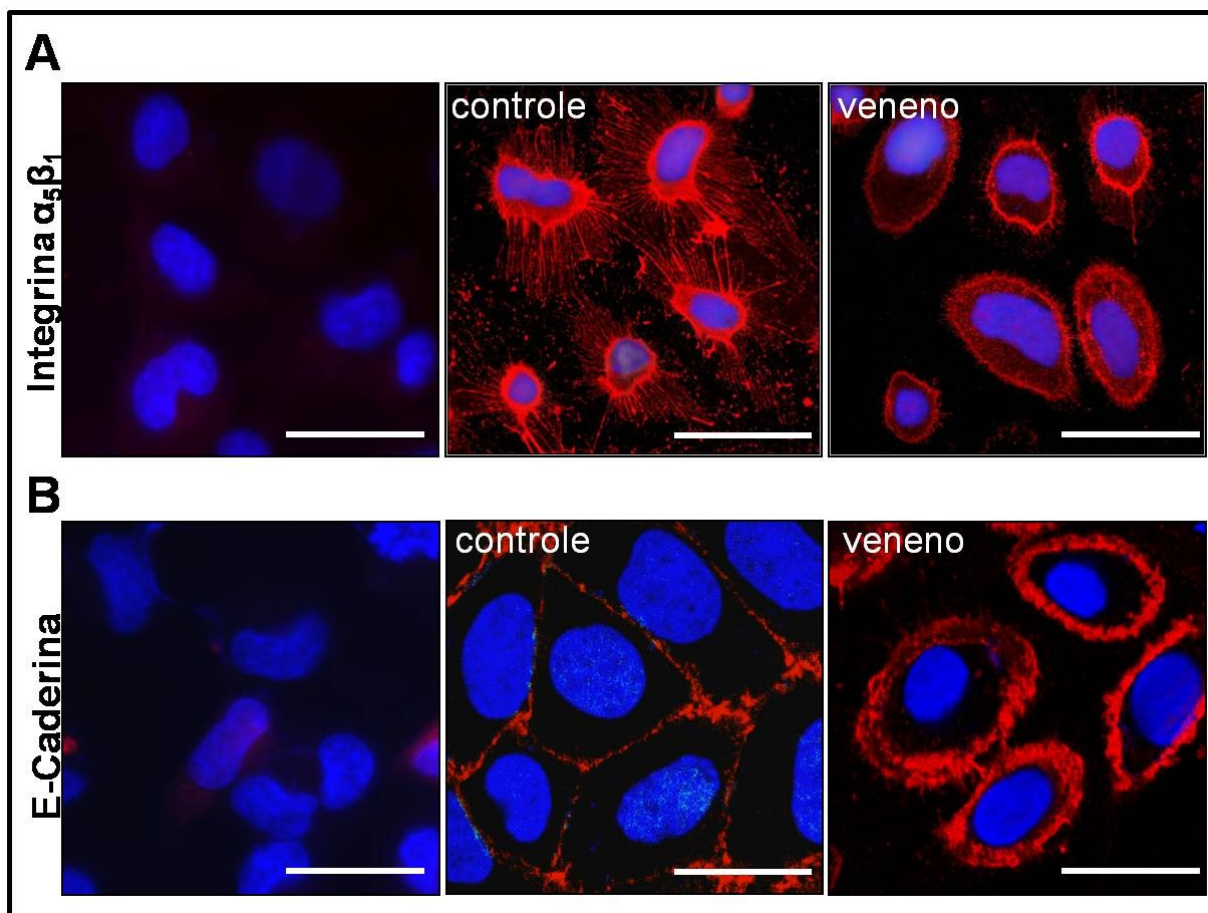


**FIGURA 20-** REORGANIZAÇÃO DO PADRÃO DE MARCAÇÃO DE INTEGRINA  $\alpha_5\beta_1$  E DE E CADERINAS EM CÉLULAS EXPOSTAS AS TOXINAS DE *L. intermedia*. Células endoteliais foram expostas ao veneno (40 $\mu$ g/ml) por 3 horas. Após o período de incubação, as células foram processadas para detecção da integrina  $\alpha_5\beta_1$  e da E-caderina, conforme descrito em Métodos. **A** - Padrão de marcação da integrina  $\alpha_5\beta_1$  em células controles e em células tratadas com o veneno. **B** - Imunomarcação para E-Caderina em células controles e tratadas com veneno. Barra =18  $\mu$ m.

### 3. CAPÍTULO II - RESULTADOS

---

#### 3.4.5. Papel do proteoglicano de heparam sulfato como protetor da ação do veneno nas células endoteliais

Como os dados mostraram que o veneno não age diretamente nas células endoteliais, buscou-se possíveis compostos que poderiam agir protegendo-as. Como os proteoglicanos são importantes moléculas envolvidas no processo de adesão celular, inicialmente utilizamos como ferramenta de estudo, as linhagens de células do ovário de hamster chinês – CHO, selvagem (CHO-K1), bem como uma linhagem deficiente da enzima xilosiltransferase (CHO-745), que é chave para o início da biosíntese de glicosaminoglicanos (GAG). Esta linhagem sintetiza apenas 5% de GAGs, quando comparada com a linhagem selvagem.

A exposição dessas linhagens CHO às toxinas do veneno, por diferentes tempos de tratamento, demonstrou claramente que as células mutantes CHO-745 são mais susceptíveis à desadesão ao substrato induzida pelo veneno (FIGURA 21A).

Ambas as células apresentam morfologia alterada, com a redução do espalhamento celular, evidenciada pelo arredondamento das células e a perda da adesão célula-célula, conforme evidencia as imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (FIGURA 21B). Essa observação fica bem evidente nas imagens após três horas de incubação com o veneno, quando pode-se observar que a linhagem CHO-K1 ainda apresenta-se espalhada e aderida ao substrato, enquanto que a CHO-745, neste mesmo tempo, já perdeu praticamente toda sua interação com o substrato.

Quando foi quantificado o número de células remanescentes na placa de cultura, observou-se que há uma nítida redução de células ainda aderidas. Esta redução é estatisticamente significativa apenas para a linhagem CHO-745, tanto em 3, quanto em 6 horas de tratamento, em comparação com as células selvagens (FIGURA 21C).

Estes dados mostram que glicosaminoglicanos podem interferir com a ação das toxinas do veneno.

Conforme discutido anteriormente, as células endoteliais sintetizam um proteoglicano de heparam sulfato (PGHS) peculiar, rico em ácido idurônico 2-O-sulfatado, o qual é característico da molécula de heparina. Adicionalmente, dados

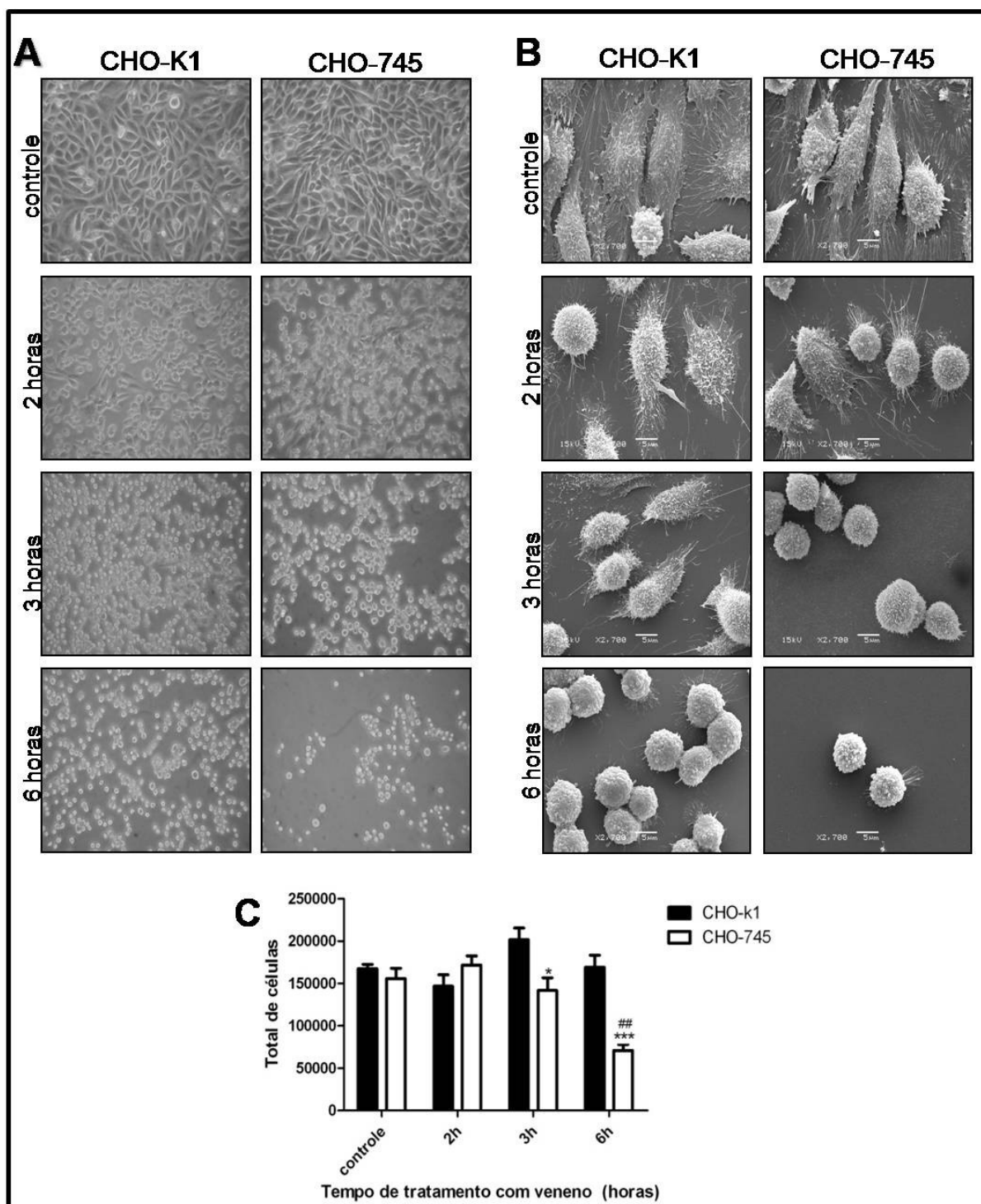


**FIGURA 21** - CÉLULAS DEFICIENTES DE GLICOSAMINOGLICANO SÃO MAIS SUSCEPTÍVEIS À AÇÃO DO VENENO. Células CHO-K1 (selvagens) e CHO-745 (deficientes de glicosaminoglicanos) foram expostas ao veneno de *L. intermedia* (40µg/mL) por diferentes tempos (0 (controle) 2, 3 e 6 horas). **A** - Imagens obtidas por microscopia de luz. **B** - Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura. Note que a morfologia das células é claramente distinta após a ação do veneno. **C** - Após o tratamento com o veneno, o meio foi removido e a placa de cultura foi lavada. Posteriormente, as células que permaneceram aderidas foram soltas com pancreatina e contadas. Cada variável foi realizada em quadruplicata. \* $p < 0,05$  e \*\*\* $p < 0,001$  para comparação entre cada grupo de CHO-745 com cada grupo de CHO-K1 respectivamente, e ## $p < 0,01$  em comparação com CHO-745 controle tempo 0. Resultados representativos de três experimentos realizados isoladamente.

### 3. CAPÍTULO II - RESULTADOS

---

recentes do nosso laboratório mostraram que heparina exógena pode atuar como protetor da ação do veneno nas células endoteliais (SENE *et al.*, manuscrito em elaboração). Assim, buscou-se investigar se este proteoglicano peculiar poderia ser o agente protetor.

Os resultados utilizando microscopia ótica e eletrônica de varredura de células endoteliais normais e clone 10+ (nome dado a uma linhagem mutante endotelial que expressa apenas 60% dos de PGHS), expostas ou não (controle) ao veneno, por 6 ou 24 horas, estão ilustrados na FIGURA 22.

As células 10+ já com 6 horas de exposição apresentam redução significativa da adesão à placa de cultura, enquanto que no mesmo período, nas células normais, os efeitos provocados pelo veneno ainda são pouco visíveis (FIGURA 22A).

Estes achados são ainda mais evidentes, quando se observa as células expostas ao veneno por 24 horas. A maioria das células 10+ já sofreram o processo de perda de adesão ao substrato, enquanto que nas normais, essa perda de adesão só é visualizada em tempos após 48 horas de exposição, como mostrado anteriormente (FIGURA 14).

Tais evidências são mais bem observadas com a técnica de microscopia eletrônica de varredura (FIGURA 22B), onde é possível verificar que após 6 horas de exposição, as células normais encontram-se espreiadas e aderidas ao substrato, apresentando inúmeras projeções laterais a partir do corpo celular (filopódios), demonstrando evidente adesão celular. Por outro lado, as células 10+ demonstram uma maior retração citoplasmática, com nítido arredondamento com uma intensa redução da área do corpo celular. Em 24 horas de exposição estes efeitos são mais pronunciados, sendo que todas as células 10+ estão arredondadas, diferentemente das células normais que, apesar de alteradas, ainda apresentam espreiamento celular.

Novamente, a análise do dado quantitativo, onde foi avaliado o número de células que permaneciam aderidas à placa, mostra que as a linhagem deficiente de PGHS (10+) é muito mais susceptíveis à ação do veneno que as normais (FIGURA 22C).

Estes dados sugerem que dentre os glicosaminoglicanos, o heparam sulfato da superfície da célula endotelial (presente no proteoglicano Sindecam-4), atua como uma molécula protetora destas células, minimizando e retardando o efeito de

## 3. CAPÍTULO II - RESULTADOS

desadesão das mesmas ao substrato, quando expostas às toxinas do veneno de *L. intermedia*.

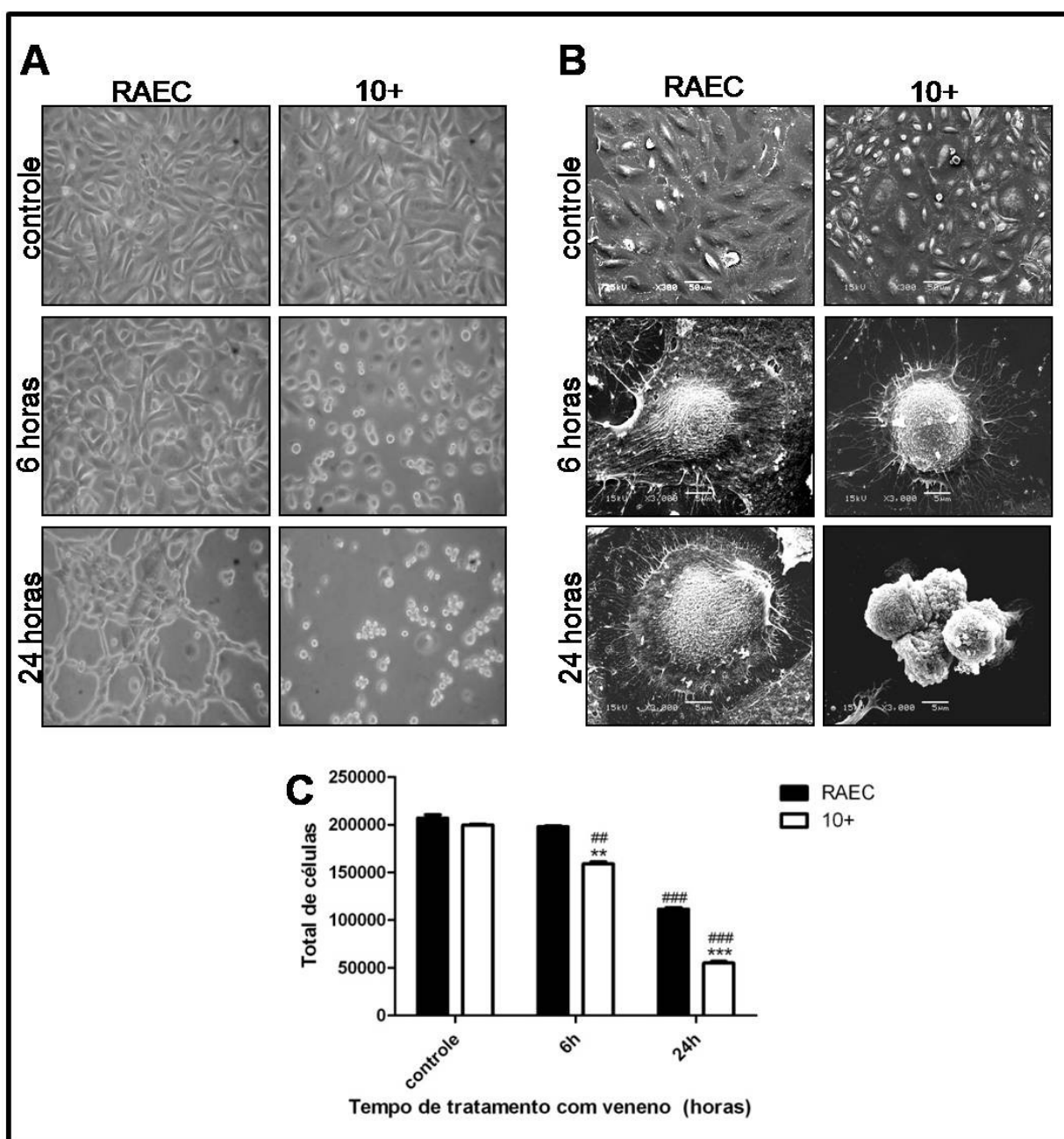


**FIGURA 22** - MENOR EXPRESSÃO DE SINDECAM-4 AUMENTA A SUSCEPTIBILIDADE DA CÉLULA À DESADESÃO PROVOCADA PELO VENENO. Células endoteliais normais (RAEC) e deficientes na biosíntese de Sindecam-4 (proteoglicano de heparam sulfato) (10+) foram expostas ao veneno (40µg/mL) por 6 ou 24 horas, e então foram processadas para microscopia ótica (**A**) ou para microscopia eletrônica de varredura (**B**). **C** - Após o tratamento com o veneno, o meio foi removido e a placa de cultura foi lavada. Posteriormente, as células que permaneceram aderidas foram soltas com pancreatina e contadas. Cada variável foi realizada em quadruplicata. \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  para comparação entre cada grupo de 10+ com cada grupo de RAEC respectivamente, e ## $p < 0,01$  e ### $p < 0,001$  em comparação com RAEC controle e 10+ controle. Resultados representativos de três experimentos realizados isoladamente.

### 3.5. DISCUSSÃO

Como apresentado anteriormente, estudos utilizando linhagens celulares têm demonstrado que o veneno de *L. intermedia* contribui direta ou indiretamente para a citotoxicidade em diferentes modelos celulares estudados, como em eritrócitos (TAMBOURGI *et al.*, 2000, 2002), neutrófilos (MAJESTIK *et al.*, 1977), células epiteliais renais (CHAIM *et al.*, 2006, RIBEIRO *et al.*, 2007) e queratinócitos (PAIXÃO-CAVALCANTE *et al.*, 2006).

As células endoteliais também foram analisadas. PATEL e colaboradores (1994) mostraram que ocorre a citotoxicidade do veneno nas células endoteliais de cordão umbilical humano (HUVEC), demonstrando que o veneno age como agonista sobre estas células, induzindo a expressão de moléculas envolvidas com eventos inflamatórios. Adicionalmente, VEIGA e colaboradores (2001a) e PALUDO e colaboradores (2006) descreveram efeitos deletérios do veneno sobre células endoteliais da aorta de coelho.

PALUDO e colaboradores (2006) demonstram que após 3 horas de exposição ao veneno de *L. intermedia*, inicia-se o processo de perda de adesão da célula ao substrato, através de alterações nas estruturas adesivas de contato célula-célula concomitantemente com a redistribuição dos pontos de contato focal. Ainda, mostraram que induz a desorganização do citoesqueleto de actina causando o desaparecimento das fibras de estresse.

Tais alterações morfológicas não foram relacionadas como indicativos de morte celular, uma vez que VEIGA *et al.* (2001a) mostraram que células desaderidas pela ação do veneno por até 18 horas de tratamento, quando lavadas e colocadas novamente em cultura, foram capazes de readir ao substrato, mostrando crescimento e proliferação semelhantes às células controles (não tratadas com veneno).

Adicionalmente, é detalhadamente descrito na literatura que alterações na forma e no espriamento celular, controlados pelo citoesqueleto e sua conexão com a matriz extracelular, via receptores do tipo integrinas e, ainda, pelas junções célula-célula, podem alterar a sinalização celular associada com a adesão, influenciando assim na sobrevivência da célula (CHEN *et al.*, 1997). Também, tem sido demonstrada a habilidade do citoesqueleto de controlar a sobrevivência de células endoteliais através da regulação da expressão de proteínas da família Bcl-2 bem

### 3. CAPÍTULO II – DISCUSSÃO

---

como pela fosforilação da proteína quinase AKT (FLUSBERG; NUMAGUCHI; INGBER, 2001).

Diante desses dados, e para determinar os efeitos da exposição do veneno em tempos maiores do que haviam sido descritos (até as 18 horas), o presente capítulo deste trabalho, reporta evidências adicionais da atividade citotóxica do veneno de *L. intermedia* em células endoteliais e descreve o possível mecanismo que conduz à morte dessa célula.

Os resultados mostraram que as células alteram a forma celular, passando a apresentar um formato arredondado, seguido pela agregação entre elas e, por fim, a desadesão das células ao substrato. Estes eventos são tempo dependente. Ao final do tempo avaliado (48 horas de exposição), quase todas as células encontram-se em suspensão (FIGURA 14).

O espalhamento do laser nas células endoteliais, realizada no citometro de fluxo, pode ser mensurado nos fotomultiplicadores de detecção do espalhamento frontal (FSC) ou no lateral (SSC). Tais parâmetros foram examinados para as células tratadas por 24 ou 48 horas. Estes parâmetros de espalhamento de luz, FSC e SSC, são utilizados para indicar o tamanho e a complexidade celular, respectivamente (GREMSKI *et al.*, 2007). Utilizando conjuntamente ambos os parâmetros, pode-se separar as células em duas populações, uma para as células normais e outras para *debris* ou fragmentos celulares (FIGURA 15).

O tratamento com o veneno indicou um aumento significativo, após 48 horas de exposição, na população referente aos fragmentos celulares, indicando que nesse tempo de tratamento, as células endoteliais são susceptíveis a morte, devido à ação do veneno (FIGURA 15).

Para uma melhor caracterização das alterações morfológicas das células endoteliais expostas as toxinas do veneno de *L. intermedia*, foram realizadas análises por microscopia eletrônica de transmissão (MET). A análise por MET é considerada a “técnica ouro” no estudo sobre morte celular, sendo considerada como o método mais preciso para distinguir células em apoptose, daquelas em necrose (KRYSKO *et al.*, 2008). Células apoptóticas apresentam alterações morfológicas típicas e bem definidas. Um dos primeiros sinais ultra-estruturais clássicos detectável na apoptose é a formação de massas densas uniformes de cromatina distribuídas ao redor do envoltório nuclear (SARASTE; PULKKI, 2000). Esse sinal foi observado a partir de 18 horas de tratamento com o veneno. As

### 3. CAPÍTULO II – DISCUSSÃO

---

células expostas ao veneno por 24 e 48 horas apresentam alterações ainda mais pronunciadas, características de células em apoptose (FIGURA 16).

As várias alterações biológicas que ocorrem na célula durante o processo de apoptose realizam-se em uma seqüência ordenada de eventos. Um padrão típico de apoptose inclui alterações bioquímicas, fragmentação do DNA e mudanças morfológicas (VERMES; HAANEN; REUTELINGSPERGER, 2000).

Para confirmar se nas células endoteliais já havia, de fato, iniciado o processo de apoptose, foi avaliado a expressão da proteína pró-apoptótica Bax, ao longo dos diferentes tempos de exposição ao veneno. Foi observado que, houve um aumento de Bax a partir de 6 horas de exposição (FIGURA 17). Embora esteja claro que a apoptose pode ocorrer na ausência de síntese protéica, a superexpressão de proteínas pró-apoptóticas como a Bax, Noxa ou a PUMA, são fundamentais para o dano no DNA mediado pela apoptose (SCHULER; GREEN, 2001).

Para verificar bioquimicamente a participação da apoptose como mecanismo de morte celular acionado pelas toxinas do veneno, utilizou-se, também, o método da externalização da fosfatidilserina (PS), pela marcação das células com anexina V. A externalização de PS é um dos primeiros eventos ativados pela cascata apoptótica (ZHANG *et al.*, 1997). Este fosfolípido de membrana está restrito a camada interna da membrana em células viáveis. Durante os eventos que levam a apoptose, ocorre a sua externalização ativamente para a camada externa da membrana plasmática, onde sua presença é requerida para o reconhecimento e fagocitose da célula morta (KRYSKO *et al.*, 2008). A externalização da PS é tradicionalmente detectada pela anexina V, uma proteína com grande afinidade por esse fosfolípido (ZHANG *et al.*, 1997). Esta técnica combinada com o uso iodeto de propídio, o qual intercala com a molécula de DNA em células que possuem a membrana danificada, permite a distinção de células em apoptose inicial, apoptose tardia e necrose (VERMES; HAANEN; REUTELINGSPERGER, 2000).

É possível verificar sinais de apoptose inicial nas células aderidas que foram tratadas por 18 horas. No entanto, as células soltas apresentam sinais de apoptose tanto inicial, quanto tardia (FIGURA 18). Estes dados corroboram as análises em MET, onde foi possível observar alterações associadas a apoptose em células tratadas por 18 horas (FIGURA 16). Todavia, a porcentagem de células em apoptose tardia é relativamente pequena, assim, quando essas células são lavadas e recolocadas em cultivo, elas voltam a readquirir normalmente na placa de cultura, o

que mostra que este processo é reversível. Estes dados estão de acordo com aqueles obtidos anteriormente pelo grupo (VEIGA *et al.*, 2001a).

Resultados similares foram obtidos para as células tratadas por 24 horas. No entanto, houve uma menor porcentagem de células que voltaram a aderir à placa. Esta baixa adesão das células soltas, certamente está em decorrência do aumento de células em apoptose tardia, em relação às células expostas por 18 horas ao veneno.

Após 48 horas de exposição ao veneno, quase que a totalidade de células está soltas da placa. A quantidade de células em apoptose tardia é consideravelmente maior (FIGURA 18B), sendo que estas células não são capazes de reestabelecer a adesão novamente ao substrato da cultura.

Estes dados mostram que, embora a sinalização para a apoptose já estivesse presente nas células aderidas, somente as células soltas, que estão em apoptose tardia, deixam de aderir. Isto sugere que este mecanismo de apoptose poderia ter sido resultante da desadesão celular e não da ação citotóxica do veneno.

Esta hipótese foi confirmada quando foi avaliada a ação do veneno nas células em suspensão, a qual não mostrou diferença na porcentagem de células em apoptose, daquelas não expostas ao veneno (FIGURA 19). Esse resultado demonstra que a morte celular foi desencadeada pela desadesão das células, mecanismo conhecido como *anoikis*.

Cabe lembrar que a ancoragem da célula aos componentes da MEC é principalmente mediada pelas integrinas (GROSSMANN, 2002). Esses receptores transmembrânicos de superfície são heterodímeros compostos por uma cadeia beta, unida a uma cadeia alfa. As células endoteliais expressam pelo menos 13 integrinas diferentes (RÜEGG; DORMOND; MARIOTTI, 2004). Estas células são protegidas de *anoikis* quando apresentam a molécula de integrina  $\alpha_5\beta_1$  ligada à fibronectina (GROSSMANN, 2002). PALUDO e colaboradores (2006) mostram que a fibronectina produzida pelas células endoteliais é um dos alvos de ação do veneno. Conforme demonstrado na FIGURA 20, as toxinas do veneno são capazes de causar a desorganização do ligante da fibronectina, a integrina  $\alpha_5\beta_1$ .

Outra abordagem que leva à desadesão celular é observada pela perda da interação entre as células, as quais são mantidas principalmente por caderinas, uma superfamília de glicoproteínas transmembranares, que ligam-se homofilicamente (GROSSMANN, 2002). Essas glicoproteínas permitem tanto uma ancoragem entre

células homotípicas (mediadas por E-caderina) como entre células heterotípicas (realizadas por N-caderina) (ABERLE; SCHWARTZ; KEMLER, 1996). Tem sido demonstrado que diferentes tipos celulares são capazes de superar a *anoikis* apesar da perda de adesão à MEC quando os contatos célula-célula são mantidos (FOUQUET *et al.*, 2004 e HOFMANN *et al.*, 2007). Por outro lado, o bloqueio da ligação entre E-caderinas induz a *anoikis* (GROSSMANN, 2002), confirmando que a perda da interação célula-célula é um indutor deste mecanismo de morte celular. Conforme demonstrado na FIGURA 20, as toxinas do veneno de *L. intermedia* são capazes de causar a desorganização das interações celulares, observadas pela marcação da E-caderina.

Assim, as alterações precoces induzidas pelas toxinas do veneno nas células endoteliais, observadas para a marcação da  $\alpha_5\beta_1$  e da E-caderina após 3 horas de tratamento com o veneno, podem estar relacionadas com o início da transdução de sinal para desencadear *anoikis*. Adicionalmente, tem sido descrito, que um aumento na expressão da Bax ocorre em células endoteliais em resposta a ação de várias metaloproteases de veneno de serpentes (SVMPs) como a jararagina, a halisase e a gramalisina, e os autores relacionam esse aumento com alterações provocadas por essas toxinas em estruturas relacionadas à adesão, como pontos de contato focal, citoesqueleto e proteínas de adesão a MEC, eventos esses, iniciais na ação das toxinas sobre as células (TANJONI *et al.*, 2005; YOU *et al.*, 2003; WU; HUANG, 2003).

No entanto, as células soltas pela ação do veneno por 18 ou 24 horas de tratamento podem voltar a readesirem à placa de cultura. Este fenômeno não é observado para as células tratadas com veneno por 48 horas, mostrando que este, pelo menos até 24 horas, poderia ser reversível.

De fato, os dados da literatura confirmam esta hipótese, uma vez que a perda da interação das células com a MEC estimula a translocação da Bax para a mitocôndria, cerca de 15 minutos após o sinal de desadesão. Entretanto, as células não morrem imediatamente, o que pode ocorrer várias horas depois de estar em suspensão. Se as células são replaqueadas rápido o suficiente, a Bax sai da mitocôndria e, assim, mantém as células viáveis (REDDING; JULIANO, 2005). Enquanto *anoikis* é completamente executado em 4 horas em células epiteliais do intestino, em outros tipos celulares são necessárias muitas horas ou mesmo dias até que o mecanismo de transdução de sinais complete a morte celular programada

(GROSSMANN, 2002). Em células endoteliais humanas são necessárias 48 horas para a execução de *anoikis* em 75% das células (AUODIJIT; VUORI, 2001). Tais dados reforçam a explicação do por que as células soltas pela ação do veneno por 18 ou 24 horas, podem voltar a aderir e não morrem.

Embora neste trabalho foi utilizado o veneno total, não sendo possível afirmar qual(is) toxina(s) do veneno esta(ão) envolvida(s) no processo de morte celular observado, é descrito na literatura que uma metaloprotease isolada do veneno de *L. Intermedia*, denominada LALP (*Loxosceles* astacin-like protease), é capaz de induzir a perda de adesão de células subendoteliais em cultura (da SILVEIRA *et al.*, 2007b). Na literatura há relatos de várias metaloproteases do veneno de serpentes que induzem morte das células endoteliais, por diferentes mecanismos de ação (ARAKI *et al.*, 2002; YOU *et al.*, 2003; WU; HUANG, 2003). Um exemplo é a jararagina, que induz *anoikis* através da ruptura dos contatos de adesão focal (TANJONI *et al.*, 2005).

Os resultados indicam claramente que o processo de morte celular observado nas células endoteliais expostas ao veneno loxoscélico é desencadeado por uma ação indireta, isto é, cliva componentes da MEC, levando à perda da adesão das células e, conseqüentemente, a *anoikis*. No entanto, conforme discutido anteriormente, diversos modelos celulares sofrem ação direta de toxinas de *L. intermedia*. Como no modelo estudado não foi observada esta ação direta, nossa atenção voltou-se para a busca de um possível(is) agente(s) protetor(es).

Como os proteoglicanos são importantes moléculas envolvidas no processo de adesão celular, inicialmente utilizamos como ferramenta de estudo, uma linhagem celular deficiente da biossíntese de glicosaminoglicanos. As células do ovário de hamster chinês – CHO, linhagem 745 foram obtida por ESKO; STEWART e TAYLOR (1985) sendo deficientes da enzima xilosiltransferase, a qual é chave para o início da biossíntese de alguns glicosaminoglicanos (GAGs), incluindo o HS. Esta linhagem sintetiza apenas 5% do total de GAGs, em comparação com a linhagem selvagem (CHO-K1). Quando foi avaliada a ação do veneno nestas células e comparado com a linhagem selvagem, verificou-se claramente que a diminuição de GAGs deixa a célula mais susceptível à desadesão celular induzida pelo veneno (FIGURA 21).

O grupo de pesquisa coordenado pela Profa Dra Helena Nader desenvolveu um modelo de estudo deficiente de PGHS, utilizando técnicas de iRNA direcionada

### 3. CAPÍTULO II – DISCUSSÃO

---

contra o Sindecam-4 (PGHS de superfície celular de célula endotelial). Com esta ferramenta conseguiram desenvolver uma linhagem celular que expressa cerca de 60% deste PGHS, a qual foi batizada de 10+.

Quando foi avaliada a ação do veneno nas células endoteliais selvagens, com sua variante, deficiente de PGHS, observou-se que a perda de parte deste composto é suficiente para alterar o perfil de ação do veneno (FIGURA 22). Este dado aponta para o heparam sulfato endotelial como sendo o agente protetor.

O modelo celular que foi utilizado, células endoteliais da aorta de coelho, é uma ferramenta de estudo bastante utilizada para analisar a ação de agentes que atuam sobre o endotélio vascular. Estas células, por serem endoteliais, exibem compatibilidade com o sangue, isto é, não desencadeiam mecanismo de coagulação. Este efeito inibitório na cascata da coagulação sangüínea é atribuído ao heparam sulfato (BUONASSISI; COLBURN, 1983), um glicosaminoglicano que normalmente possui baixa atividade anticoagulante. Este efeito somente foi entendido quando foi obtida a seqüência dissacarídica deste glicosaminoglicano da célula endotelial. NADER e colaboradores (1987) observaram que este heparam sulfato é rico em ácido L-idurônico 2-O-Sulfatado (cerca de 20% do total), intercalados entre regiões contendo ácido D-glucurônico. Ou seja, esse composto possui regiões características da molécula de heparina (que sabidamente é um potente agente anticoagulante), as quais estão intercaladas entre regiões típicas de heparam sulfato.

Dados recentes do nosso laboratório mostraram que polissacarídeos sulfatados, em especial fucanas obtidas de alga marrom e heparina podem atuar como protetores da ação do veneno nas células endoteliais (SENE et al., manuscrito em elaboração). Assim, este conjunto de dados confirma a importância de glicosaminoglicano como agente protetor das células e, aponta para o heparam sulfato como forte candidato a realizar esta tarefa. Como as células endoteliais possuem um heparam sulfato peculiar, que atua como um “heparin-like” e, por outro lado, a heparina inibe ação do veneno, é possível que seja esse o composto que pode agir protegendo as células endoteliais da ação direta do veneno.

Ensaio adicionais serão necessários para confirmar se as células que possuem menos HS são realmente susceptíveis à ação direta das toxinas de *L. intermedia*.

---

#### **4. CONCLUSÃO**

---

---

#### 4. CONCLUSÃO

---

Quanto à ação das toxinas do veneno de *L. intermedia* em células endoteliais (RAEC) estabelecidas em cultura, podemos concluir que:

- Interagem com componentes extracelulares importantes da membrana plasmática, como o receptor para a fibronectina (integrina  $\alpha_5\beta_1$ ) e com carboidratos ricos em *N*-Acetil-Glucosamina.
- Promovem uma diminuição destes carboidratos de superfície celular, que pode ser importante no mecanismo de permeabilidade vascular;
- É internalizado por mecanismo de endocitose de fase fluída e segue para possível degradação celular em lisossomos.

Após longos períodos de exposição do veneno, as células endoteliais apresentam:

- Profundas alterações morfológicas, com características de células apoptóticas.
- Estado de apoptose tardia, que é observado apenas nas células soltas;
- Morte celular por *anoikis* – morte celular causada por desalojamento, mostrando que o veneno apresenta uma ação indireta.
- Os glicosaminoglicanos interferem na ação das toxinas do veneno sobre a adesão celular e aponta para o heparan sulfato endotelial como o protetor da ação direta do veneno.

---

## REFERÊNCIAS

---

---

ABERLE, H.; SCHWARTZ, H.; KEMLER, R. Cadherin-catenin complex: Protein interactions and their implications for cadherin. **Journal of cellular biochemistry**, United States, v.61, p.514-523, 1996.

AOUDJIT, F.; VOURI, K. Matrix attachment regulates Fas-induced apoptosis in endothelial cells: a role for c-flip and implications of *anoikis*. **The Journal of Cell Biology**, United States, v.152, p.633-643, 2001.

APPEL, M.H.; da SILVEIRA R.B.; CHAIM, O.M.; PALUDO, K.S.; SILVA, D.T.; CHAVES, D.M.; da SILVA, P.H.; MANGILI, O.C.; SENFF-RIBEIRO, A.; GREMSKI, W.; NADER, H.B.; VEIGA, S.S. Identification, cloning and functional characterization of a novel dermonecrotic toxin (phospholipase-D) from brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. **Biochimica et Biophysica Acta**, Netherlands, v.1780, p.167-178, 2008.

ARAKI, S.; MASUDA, S.; MAEDA, H.; YING, M.J.; HAYASHI, H. Involvement of specific integrins in apoptosis induced by vascular apoptosis-inducing protein 1. **Toxicon**, England, v.40, p.535-542, 2002.

BACHETTI, T.; MORBIDELLI, L. Endothelial cells in culture: a model for studying vascular functions. **Pharmacological Research**, England, v.42, p.9-19, 2000.

BALLARORI, N.; HAGER, D.V.; NUNDY, S.; MILLER, D.S. BOYER, J.L. Carrier-mediated uptake of Lucifer yellow in skate and rat hepatocytes: a fluid-phase marker revisited. **The American journal of physiology**, United States, v.40, p.986-904, 1999.

BARBARO, K.C.; SOUSA, M.V.; MORHY, L.; EICKSTEDT, V.R.; MOTA, I. Compared chemical properties of dermonecrotic and lethal toxins from spiders of the genus *Loxosceles* (Araneae). **Journal of protein chemistry**, United States, v.15, p.337-343, 1996.

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

BERGE, N.; LOGANADANE, L.D.; VASSY, J.; MONNET, E.; LEGRAND, C.; FAUVEL-LAFEVE, F. Adhesion-induced intracellular signalling in endothelial cells

## REFERÊNCIAS

depends on the nature of the matrix. **Cell adhesion and communication**, Switzerland, v. 7, p. 29-41, 1999.

BERNFELD, M.; GÖTTE, M.; PARK, P. W.; REIZES, O.; FITZGERALD, M. L.; LINCECUM, J.; ZAKO, M. Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. **Annual review of biochemistry**, United States, v.68, p.729-77, 1999.

BEVERS, E.M.; TILLY, R.H.J.; SENDEN, J. M.G.; COMFURIUS, P.; ZWALL, R.F.A. Exposure of endogenous phosphatidylserine at the outer surface of stimulated platelets is reversed by restoration of aminophospholipid translocase activity. **Biochemistry**, United States, v.28, p.2382, 1982.

BINFORD, G.J.; MATTHEW, H.J.; CORDES, M.A.W. Shingomyelinase D from venom of *Loxosceles* spiders: evolutionary insights from cDNA sequences and gene structure. **Toxicon**, England, v.45, p. 547-560, 2005.

BOUNASSISI, V. Sulfated mucopolysaccharide synthesis and secretion in endothelial cell cultures. **Experimental Cell Research**, United States, v.76, p.363-368, 1973.

BOUNASSISI, V.; COLBURN, P. Antibodies to the heparan sulfate proteoglycans synthesized by endothelial cell cultures. **Biochimica et. Biophysica Acta**, Netherlands, v 760, p. 1- 12, 1983.

BOUNASSISI, V.; VENTER, J.C. Hormone and neurotransmitter receptors in an established vascular endothelial cell line. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, United States, v.73. p.1612-1616, 1976.

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

CARDELLI, J. Phagocytosis and Macropinocytosis in *Dictyostelium*: Phosphoinositide-based processes, biochemically distinct. **Traffic**, Denmark, v.2, p.311-320, 2001.

CHAIM, O.M.; SADE, Y.B.; da SILVEIRA, R.B.; TOMA, L.; KALAPOTHAKIS, E.; CHAVEZ-OLORTEGUI, C.; MANGILI, O.C.; GREMSKI, W.; DIETRICH, C.P.; NADER, H.B.; VEIGA, S.S.; Brown spider dermonecrotic toxin directly induces

nephrotoxicity. **Toxicology and applied pharmacology**, United States, v.221, p. 64-77, 2006.

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

CHEN, C.S.; MRKISCH, M.; HUANG, S.; WHITESIDES, G.M.; INGBER, D.E. Geometric control of cell life and death. **Science**, United States, v.276, p.1425-1428, 1997.

COHEN, N.; SARAFIAN, D.A.; ALON, I.; GORELIK, O.; ZAIDENSTEIN, R. ; SIMANTOW, R.; BLATT, A.; LITINSKY, I.; MODAI, D.; GOLIK, A. Dermonecrotic loxoscelism in the Mediterranean region. **Journal of toxicology. Cutaneous and ocular toxicology**, United States, v.18, p.75-83, 1999.

CONNER, S.D. SCHMID, S.L. Regulated portals of entry into the cell. **Nature**, England, v.422- p. 37-44, 2003.

CUNHA, R.B.; BARBARO, K.C.; MURAMATSU, D.; PORTARO, F.C.V.; FONTES, W.; SOUSA, M.V. Purification and characterization of Loxnecrogin, a dermonecrotic toxin from *Loxosceles gaucho* brown spider venom. **Journal of protein chemistry**, United States, v.22, p.135–146, 2003.

DAMKE, H.; BABA, T.; van der BLIEK, A.M.; SCHMID, S.L. Clatrin-independent pinocytosis is induced in cells overexpressing a temperature-sensitive mutant of dynamim. **The Journal of Cell Biology**, United States, v.131, p.69-80, 1995.

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

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

## REFERÊNCIAS

da SILVEIRA, R.B.; ROMINE, B.P. CHAIM, O.M.; APPEL, M.H.; SILVA, D.T.; DREYFUSS, J.L. TORNA, L.; DIETRICH, C.P.; NADER, H.B.; VEIGA, S.S.; GREMSKI, W. Two novel dermonecrotic toxins LiRecDT4 and LiRecDT5 from Brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom: From cloning to functional characterization. **Biochimie**, France, v.59, p. 289-300, 2007a.

da SILVEIRA, R. B.; WILLE, A. C. M.; CHAIM, O. M.; APPEL, M. H.; SILVA, D. T.; FRANCO, C. R. C.; TOMA, L.; MANGILI, O. C.; GREMSKI, W.; DIETRICH, C. P.; NADER, H. B.; VEIGA, S. S. Identification, cloning, expression and functional characterization of an astacin-like metalloprotease from *Loxosceles intermedia* (Brown spider) venom. **Biochemical Journal**, England, v.406, p.355-363, 2007b.

da SILVEIRA, R.B.; CHAIM, O.M.; MANGILI, O.C.; GREMSKI, W.; DIETRICH, C.P.; NADER, H.B.; VEIGA, S.S. Hyauronidases in *Loxosceles intermedia* (Brown spider) venom are endo-b-N-acetyl-D-hexosaminidases hydrolases. **Toxicon**, England, v.49, p.758-768, 2007c.

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

de OLIVEIRA, K.C. GONÇALVES-de-ANDRADE, R.M.; PIAZZA, R.M.F.; FERREIRA JR., J.M.C.; van der BERG, C.W.; TAMBOURGI, D.V. Variations in *Loxosceles* spider venom composition and toxicity contribute to the severity of envenomation. **Toxicon**, England, v.45, p.421-429, 2005.

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

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

DELACOUX, F.; FICHARD, A.; GEOURJON, C.; GARRONE., R.; RUGGIERO, F. Molecular features of the collagen V heparin binding site. **The Journal of biological chemistry**, United States, v.273, p. 15069-15076,1998.

DIAZ, J.H.; LEBLANC, K.E. Commom Spider Bites. **American Family Physician**, United States, v. 75, p. 869-873, 2007.

DIETRICH, C. P.; SAMPAIO, L. O.; TOLEDO, O. M. S.; CÁSSARO, C. M. F. Cell recognition and adhesiveness. A possible biological role for the sulfated mucopolysaccharides. **Biochemical and biophysical research communications**, United States, v.75, p. 329-336, 1977.

DIETRICH, C. P. A model for cell-cell recognition and control of cell growth mediated by sulfated glycosaminoglycans. **Brazilian journal of medical and biological research**, Brasil, v.17, p. 5-15, 1984.

ELSTON, D.M.; EGGERS, J.S.; SCHMIDT, W.E.; STORROUW, A.B.; DOE, R.H.; McGLASSON, D.; FISCHER, J.R. Histological findings after brown recluse spider envenomation. **The American Journal of dermatopathology**, United States, v.22, p.242-246, 2000.

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

ESTÉVE, E.; MABROUK, K.; DUPUIS, A.; SMIDA-REZGUI, S.; ALTAFAJ, X.; GRUNWALD, D.; PLATEL, J.C.; ANDREOTTI, N.; MARTY, I.; SABATLER, J.M.; RONJAT, M.; de WAARD, M. Transduction of the scorpion toxin maurocalcine into cells- evidence that the toxin crosses the plasma membrane. **The Journal of Biological Chemistry**, United States, v.280, p.12833-12839, 2005.

ESKO, J.D.; STEWART, T.E.; TAYLOR, W.H. Animal cell mutants defective in glycosaminoglycan biosynthesis. **Proceedings of the Academy of Political Science**, United States, v.82, p.3197-3201, 1985.

ESKO, J. D. Genetic analysis of proteoglycan structure, function and metabolism. **Current Opinion in Cell Biology**, England, v.3, p. 805-16, 1991.

FEITOSA, L.; GREMSKI, W.; VEIGA, S.S.; ELIAS, M.C.Q.B.; GRANER, E.; MANGILI, O.C.; BRENTANI, R.R. Detection and characterization of metalloproteinases with gelatinolytic, fibronectinolytic and fibrinogenolytic activities in brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. **Toxicon**, England, v. 36, p. 1039-1051, 1998.

FERNANDES-PEDROSA, M.F.; JUNQUEIRA-de-AZEVEDO, I.L.M.; GONÇALVES-de ANDREDE, R.M.; KOBASHI, L.S.; ALMEIDA, D.D.; HO, P.I.; TAMBOURGI, D.V. Transcriptome analysis of *Loxosceles laeta* (Araneae, Sicaridae) spider venomous gland using expressed sequence tags. **BMC Genomics**, England, v.9, p.1-12, 2008.

## REFERÊNCIAS

FEOFANOV, A.V.; SHARONOV, G.V.; ASTAPOVA, M.V.; RODIONOV, D.I.; UTKIN, Y.N.; ARSENIIEV, A.S. Cancer cell injury by cytotoxins from cobra venom is mediated through lysosomal damage. **The Biochemical Journal**, England, v.390, p.11-18, 2005.

FISCHER, M.L.; VASCONCELLOS-NETO, J. Microhabitats occupied by *Loxosceles intermedia* and *Loxosceles laeta* (Araneae: Sicariidae) in Curitiba, Paraná, Brazil. **Journal of medical entomology**, United States, v. 42, p. 756-765, 2005.

FLUSBERG, D.A.; NUMAGUCHI, Y.; INGBER, D.E. Cooperative control of Akt phosphorylation, bcl-2 expression and apoptosis by cytoskeletal microfilaments and microtubules in capillary endothelial cell. **Molecular Biology of the Cell**, United States, v.12, p.3087-3094, 2001.

FOUQUET, S.; LUGO-MARTÍNEZ, V.H.; FAUSSAT, A.M.; RENAUD, F.; CARDOT, P.; CHAMBAZ, J.; PINÇON-RAYMOND, M.; THENET, S. Early loss of E-cadherin from cell-cell contacts is involved in the onset of *anoikis* in Enterocytes. **The Journal of Biological Chemistry**, United States, v.279, p.43061-43069, 2004.

FRISCH, S.M.; FRANCIS, H. Disruption of epithelial cell-matrix interaction induces apoptosis. **The Journal of Cell Biology**, United States, v. 124, p. 619-626, 1994.

FRISCH, S.M.; ROUSLAHTI, E. Integrins and anoikis. **Current Opinion in Cell Biology**, England, v.9, p. 701-706, 1997.

FUTRELL, J. M. Loxoscelism. **The American journal of the medical sciences**, United States, v. 304, p.261-267, 1992.

GILMORE, A.P. Anoikis. **Cell Death and Differentiation**, England, v.12, p.1473-1477, 2005.

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

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

GONÇALVES-de-ANDRADE, R.M.; TAMBOURGI, D.V. First record on *Loxosceles laeta* (Nicolet, 1849) (Araneae, Sicariidae) in the West Zone of São Paulo City, São Paulo, Brazil, and considerations regarding its geographic distribution. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasil, v.36, p.425-426, 2003.

GREMSKI, L.H.; CHAIM, O.M.; PALUDO, K.S.; SADE, Y.B.; OTUKI, M.F.; RICHARDSON, M.; GREMSKI, W.; SANCHEZ, E.F.; VEIGA, S.S. Cytotoxic, thrombolytic and edematogenic activities of leucorolysin-a, a metalloproteinase from *Bothrops leucurus* snake venom. **Toxicon**, England, v.50, p.120-134, 2007.

GROSSMANN, J. Molecular mechanisms of "detachment-induced apoptosis-anoikis". **Apoptosis**, United States, v.7, p.247-260, 2002.

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

HAYASHI, M.A. NASCIMENTO, F.C.; KERKIS, A.; OLIVEIRA, V.; OLIVEIRA, E.B.; PEREIRA, A.; RÁDIS-BAPTISTA, G.; NADER, H.B.; YAMANE, T.; KERKIS, I.; TERSARIOL, I.L. Cytotoxic effects of crostamine are mediated through lysosomal membrane permeabilization. **Toxicon**, England, v.52, p.508-517, 2008.

HAYMAN, E. G.; PIERSCHBACHER, M. D.; OHGREN, Y.; RUOSLAHTI, E. Serum spreading factor (vitronectin) is present at the cell surface and in tissues. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, United States, v.80, 4003-4007, 1983.

HOFMANN, C.; OBERMEIER, F.; ARTINGER, M.; HAUSMANN, M.; FALK, W.; SCHOELMERICH, J.; ROGLER, G.; GROSSMANN, J. Cell-cell contacts prevent anoikis in primary human colonic epithelial cells. **Gastroenterology**, United States, v.132, p. 587-600, 2007.

HOGAN, C. J.; BARBARO, K. C.; WINKEL, K. Loxoscelism: Old obstacles, new directions. **Annals of Emergency Medicine**, United States, v. 44, p.608-624, 2004.

IOZZO, R. V. Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. **Annual review of biochemistry**, United States, v.67, p.609-652, 1998.

ISBISTER, G.K.; WHITE, J. Clinical consequences of spider bites: recent advances in our understanding. **Toxicon**, England, v.43, p.477-492, 2004.

JANG, J.H.; HWANG, J.H.; CHUNG, C.P.; CHOUNG, P.H. Identification and kinetics analysis of a novel heparin-binding site (KEDK) in human tenascin-C. **The Journal of biological chemistry**, United States, v.279. p. 25562–25566, 2004.

JONES, A.T. Macropinocytosis: searching for an endocytic identity and a role in the uptake of cell penetrating peptides. **Journal of cellular and molecular medicine**, Romania, v.11, p.670-684, 2007.

KALAPOTHAKIS, E.; CHATZAK, M. GONÇALVES-DORNEL, H. de CASTRO, C.S.; SILVESTRE, F.G.; LABORNE, F.V.; de MOURA, J.F.; VEIGA, S.S. CHÁVES-OLO, C.; GRANIER, C.; BARBARO, K.C. The Loxtox protein family in *Loxosceles intermedia* (Mello-Leitão) venom. **Toxicon**, England, v.50, p.938-946, 2007.

KIRCHHAUSEN, T. Three ways to make a vesicle. **Nature reviews. Molecular cell biology**, England, v.1, p.187-193, 2000.

KJELLÉN, L.; LINDAHL, U. Proteoglycans: structures and interactions. **Annual review of biochemistry**, United States, v.60, p.443-75, 1991.

KROEMER, G.; EL-DEIRY, W.S.; GOLSTEIN, P.; PETER, M.E.; VAYX, D.; VANDENABEELE, P.; ZHIVOTOVSKY, B.; BLAGOSKIONNYM, M.V.; MALORNI, W.; KNIGHT, R.A.; PIACENTINI, M.; NAGATA, S.; MELINO, G. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on cell death. **Cell death and differentiation**, England, v.12, p.1463-1467, 2005.

KRYSKO, D.V.; D'HERDE, K.D.; VANDENABEELE, P. Clearance of apoptotic and necrotic cells and its immunological consequences. **Apoptosis**, United States, v.11, p.1709-1726, 2006.

KRYSKO, D.V.; BERGHE, T.V.; D'HERDE, K.; VANDENABEELE, P. Apoptosis and necrosis: Detection, discrimination and phagocytosis. **Methods**, United States, v.44, p.205-221, 2008.

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

## REFERÊNCIAS

LEE, S. & LYNCH, K.R. Brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*) venom phospholipase D (PDL) generates lysophosphatidic acid (LPA). **Biochemistry Journal**, England, v. 391, p. 317-323, 2005.

LUCIANO, M.N.; da SILVA, P.H.; CHAIM, O.M.; SANTOS, V.P.; FRANCO, C.R.C.; SOARES, M.F.S.; ZANATA, S.M.; MANGILI, O.; GREMSKI, O.C. VEIGA, S.S. Experimental evidence for a direct cytotoxicity of *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom on renal tissue. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, United States, v. 52, p.455-467, 2004.

LUNG, J.M.; MALLORU, S.B. A child with spider bite and glomerulonephritis: a diagnostic challenge. **International journal of dermatology**, United States, v. 39, p.287-289, 2000.

MACHADO, L.F.; LAUGESSEN, S.; BOTELHO, E.D.; RICART, C.A.; FONTES, W.; BARBARO, K.C.; ROEPSTORFF, P.; SOUSA, M.V. Proteome analysis of Brown spider venom: identification of loxnecrogin isoforms in *Loxosceles gaucho* venom. **Proteomics**, Germany, v.5., p.2167-2176, 2005.

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

MÁLAQUE, C.M.S.; CASTRO-VALENCIA, J.E.; CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, F.O.S.; BARBARO, K.C.; FAN, H.W. Clinical and epidemiological features of definitive and presumed loxoscelism in São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, Brasil, v. 44, p.139-143, 2002.

MARQUES-DA-SILVA, E.; FISCHER, M.L. Distribuição das espécies do gênero *Loxosceles* Heineken & Lowe, 1835 (Araneae; Sicariidae) no Estado do Paraná. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasil; v.38, p. 331-335, 2005.

MARTIN, S.J.; GREEN, D.R. Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts? **Cell**, United States, v.82, 349-352, 1995.

MATHEWS, M. B. Molecular biology, biochemistry and biophysics of connective tissue. Macromolecular structure and evolution. **Molecular biology, biochemistry, and biophysics**, Germany, v.19, p.1-318, 1975.

MEHTA, D.; MALIK, A. Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. **Physiological reviews**, United States, v.86, p.279-367, 26.

MEREDITH, J.E.; FAZELI, B.; SCHWARTZ, M.A. The extracellular matrix as a cell survival factor. **Molecular Biology of the Cell**, United States, v.4, p.953-961, 1993.

MOLD, J.W.; THOMPSON, D.M. Management of brown recluse spider bites in primary care. **The Journal of the American Board of Family Practice**, United States, v.17, p.347-352, 2004.

MONTEIRO, C.L.B.; RUBEL, R.; COGO, L.L.; MANGILI, O.C.; GREMSKI, W.; VEIGA, S.S. Isolation and identification of *Clostridium perfringens* in the venom and fangs of *Loxosceles intermedia* (brown spider): enhancement of the dermonecrotic lesion in loxoscelism. **Toxicon**, England, v.40, p. 409-418, 2002.

NADER, H. B.; DIETRICH, C. P.; BUONASSISI, V.; COLBURN, P. Heparin sequences in the heparan sulfate chains of an endothelial cell proteoglycan. **Proceedings of the Academy of Political Science**, United States, v. 84, p. 3565-3569. 1987.

NADER, H. B.; BUONASSISI, V.; COLBURN, P.; DIETRICH, C. P. Heparin stimulates the synthesis and modifies the sulfatation pattern of heparan sulfate proteoglycan from endothelial cells. **Journal of cellular physiology**, United States, v.140, p. 305-10, 1989.

NADER, H. B.; LOPES, C. C.; ROCHA, H. A. O.; SANTOS, E. A.; DIETRICH, C. P. Heparins ad heparinoids: occurrence, structure and mechanism of antithrombotic and hemorrhagic activities. **Current pharmaceutical design**, Netherlands, v.10, p.951-966, 2004.

NAKATO, H.; KIMATA, K. Heparan sulfate fine structure and specificity of proteoglycan functions. **Biochimica et biophysica acta**, Netherlands, v.1573, p.312-318, 2002.

NICHOLS, B.J.; LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J. Endocytosis without clathrin coats. **Trends in Cell Biology**, England, v.11, p. 406-412, 2001.

NICHOLSON, G.M.; GRAUDINS, A. Spiders of medical importance in the asia-pacific: atracotoxin, latrotoxin and related spider neurotoxins. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, Australia, v.29, p.785-794, 2002.

NUNNELLE, J.D. Brown reclusa spider bites: a case report. **Journal of Perianesthesia Nursing**, United States, v.21, p.12-15, 2006.

OH, E. S.; WOODS, A.; COUCHMAN, J. R. Syndecan-4 proteoglycan regulates the distribution and activity of protein kinase C. **The Journal of biological chemistry**, United States, v.272, p.8133-8136, 1997.

OSPEDAL, K.Z.; APPEL, M.H.; NETO, J.F.; MANGILI, O.C.; VEIGA, S.S.; GREMSKI, W. Histopathological findings in rabbits after experimental acute exposure to the *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. **International journal of experimental pathology**, England, v.84, p.287-294, 2002.

PADRÓN, D.; BIZEAU, M.E.; HAZEL, J.F. Is fluid-phase endocytosis conserved in hepatocytes of species acclimated and adapted to different temperatures? **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, United States, v.278, p.529-536, 2000.

PAIXÃO-CAVALCANTE, D.; van der BERG, C.W.; de FREITAS FERNANDES-PEDROSA, M.; GONÇALVES-de-ANDRADE, R.M.; TAMBOURGI, D.V. Role of matrix metalloproteinases in HaCaT keratinocytes apoptosis induced by *Loxosceles* venom sphingomyelinase D. **Journal of Investigative Dermatology**, United States, v.126, p.61-68, 2006.

PAIXÃO-CAVALCANTE, D.; van der BERG, C.W.; GONÇALVES-de-ANDRADE, R.M.; FERNANDES-PEDROSA, M.F.; OKAMOTO, C.K. TAMBOURGI, D.V. Tetracycline Protects against dermonecrosis induced by *Loxosceles* spider venom. **Journal of Investigative Dermatology**, United States, v.127, p.1410-1418, 2007.

PALUDO, K.S.; GREMSKI, L.H.; VEIGA, S.S.; CHAIM, O.M.; GREMSKI, W.; BUCHI, D.F.; NADER, H.B.; DIETRICH, C.P. FRANCO, C.R.C. The effect of Brown spider venom on endothelial cell morphology and adhesive structures. **Toxicon**, England, v.44, p. 844-853, 2006.

PALUDO, K.S.; BISCAIA, S.M.; CHAIM, O.M.; OTUKI, M.F.; NALIWAIKO, K.; DOMBROWSKI, P.A.; FRANCO, C.R.C.; VEIGA, S.S. Inflammatory events induced by brown spider venom and its recombinant dermonecrotic toxin: A pharmacological investigation. **Comparative Biochemical Physiology**, Germany, *in press*, 2008.

PATEL, K.D.; MODUR, V.; ZIMMERMANN, G.A.; PRESCOTT, S.M.; MCINTRY, T.M. The necrotic venom of the brown recluse spider induces dysregulated endothelial cell-dependent neutrophil activation. Differential induction of GM-CSF, IL-8 and E-selectin expression. **Journal of Clinical Investigation**, United States, v.94, p.631-642, 1994 .

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

PETREL, F.; GONÇALVES-de-ANDRADE, R.M.; MAGNOLI, F.C.; da SILVA, M.E.R.; FERREIRA JR., J.M.C.; van der BERG, C.W. ; TAMBOURGI, D.V. Analysis of the toxic potential of venom from *Loxosceles adelaida* a Brazilian brown spider from karstic areas. **Toxicon**, England, v. 45, p. 449-458, 2005.

POOLE, A. R. Proteoglycans in health and disease: structures and functions. **The Biochemical journal**, England, v.236, p.1-14, 1986.

PORCIONATTO, M. A.; NADER H. B. & DIETRICH, C. P. Heparan sulfate and cell division. **Brazilian journal of medical and biological research**, Brasil, v.32, p. 539-44, 1999.

RAM, N.; AROUI, S.; JAUMAIN,E.; BICHRAOUI, H.; MABROUK, K.; RONJAT, M.; LORTAT-JACOB, H.; DE WAARD, M. Direct peptide interaction with surface glycosaminoglycans contributes to the cell penetration of maurocalcine. **The Journal of Biological Chemistry**, United States, v.283, p.24274-24284, 2008.

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

REDDIG, P.J.; JULIANO, R.L. Clinging to life: cell to matrix adhesion and cell survival. **Cancer and Metastasis Reviews**, Netherlands, v.24, p.425-439, 2005.

REED, J.C. Mechanisms of apoptosis. **American Journal of Patology**, United States, v.157, p. 1415-1530, 2000.

RIBEIRO, R.O.; CHAIM, O.M.; SILVEIRA, B.S.; GREMSKI, L.H.; SADE, Y.B.; PALUDO, K.P.; SENFF- RIBEIRO, A.; MOURA, J.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C.; GREMSKI, W.; NADER, H.B.; VEIGA, S.S. Biological and structural comparison of recombinant phospholipase D toxins from *Loxosceles intermedia* (Brown spider) venom. **Toxin**, England, v.50, p.1162-1174, 2007.

## REFERÊNCIAS

ROBB, C.W.; HAYES, B.B.; BOYD, A.S. Generalized vasculitic exanthema following *Loxosceles reclusa* envenomation. **Journal of Cutaneous Pathology**, Denmark, v.34. p. 513-514, 2007.

RÜEGG, C.; DORMOND, O.; MARIOTTI, A. Endothelial cell integrins and COX-2: mediators and therapeutic targets of tumor angiogenesis. **Biochimica et. Biophysica Acta**, Netherlands, v. 1654, p. 51-67, 2004.

SAKASHITA, S.; ENGVALL, E.; ROUSLAHTI, E. Basement membrane glycoprotein laminin binds to heparin. **FEBS Letters**, Netherland, v.116, p. 243-246, 1980.

SAMS, H.H.; DUNNICK, C.A.; SMITH, M.L.; KING JR., L.E. Necrotic arachnidism. **Journal of the American Academy of Dermatology**, United States, v. 44, p.561-73, 2001.

SARASTE, A.; PULKKI, K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. **Cardiovascular Research**, England, v.45, p.528-537, 2000.

SASAKI, T.; FÄSSLER, R.; HOHENESTER, E. Laminin: The crux of basement membrane assembly. **The Journal of cell biology**, United States v. 164, p. 959–963, 2004.

SCHULER, M.; GREEN, D.R. Mechanisms of p53- dependent apoptosis. **Biochemical Society Transaction**, England, v.29, p. 684-688, 2001.

SCHWARTZ, M.A. Integrin signaling revisited. **Trends in cell biology**, England, v.11, p.466-470, 2001.

SENFF-RIBEIRO A, da SILVA, P.H.; CHAIM, O.M.; GREMSKI, L.H.; PALUDO, K.S.; da SILVEIRA, R.B; GREMSKI, W.; MANGILI, O.C.; VEIGA, S.S. Biotechnological applications of brown spider (*Loxosceles* genus) venom toxins. **Biotechnology advances**, England, v.26, p. 210-218, 2008.

SEZERINO, U.M.; ZANNIN, M.; COELHO, L.K.; GONÇALVES, J.; GRANDO, M.; MATTOSINHO, S.G.; BARBARO, K.C. A clinical and epidemiological study of *Loxosceles* spider envenoming in Santa Catarina, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, England, v.92, p.546–548, 1998.

## REFERÊNCIAS

SILVESTRE, F.G.; CASTRO, C.S.; de MOURA, J.F.; GIUSTA, M.S.; de MARIA, M.; ÁLVARES, É.S.S.; LOBATO, F.C.F.; ASSIS, R.A.; GONÇALVES, L.A.; GUBERT, I.C.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C.; KALAPOTHAKIS, E. Characterization of the venom from the Brazilian Brown Spider *Loxosceles similis* Moenkhaus, 1898 (Araneae, Sicariidae). **Toxicon**, England, v.46, p.927-936, 2005.

SIMA, A.V.; STANCU, C.S.; SIMIONESCU, M. Vascular endothelium in atherosclerosis. **Cell and Tissue Research**, England, v.335, p.191-203, 2009.

SOLDATI, T.; SCHLIWA, M. Powering membrane traffic in endocytosis and recycling. **Nature reviews. Molecular cell biology**, England, v.7. p.897-908, 2006.

STEWART, W.W. Lucifer dyes- highly fluorescent dyes for biological tracing. **Nature**, England, v.292, p.17-21, 1981.

SWANSON, D.L.; VETTER, R.S. Loxoscelism. **Clinics in Dermatology**, United States, v.24, p. 213-221, 2006.

TAMBOURGI, D.V.; MAGNOLI, F.C.; von EICKSTEDT, V.R.; BENEDETTI, Z.C.; PETRICEVICH, V.L.; da SILVA, W. D. Incorporation of a 35-kilodalton purified protein from *Loxosceles intermedia* spider venom transforms human erythrocytes into activators of autologous complement alternative pathway. **Journal of Immunology**, United States, v.155, p.4459– 4466, 1995.

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

TAMBOURGI, D.V.; de SOUSA da SILVA, M.; BILLINGTON, S.J.; GONÇALVES-de-ANDRADE, R.M.; MAGNOLI, F.C.; SONGER, J.G.; van der BERG, C.W. Mechanism of induction of complement susceptibility of erythrocytes by spider and bacterial sphingomyelinases. **Immunology**, England, v.107, p.93-101, 2002.

TANJONI, I.; WEINLICH, R.; DELLA-CASA, M.S.; CLISSA, P.B.; SALDANHA-GAMA, R.F.; de FREITAS, M.S.; BARJA-FIDALGO, C.; AMARANTE-MENDES, G.P.; MOURA-da-SILVA, A.M. Jararhagin, a snake venom metalloproteinase, induces a specialized form of apoptosis (*anoikis*) selective to endothelial cells. **Apoptosis**, United States, v.10, p.851-861, 2005.

TRINDADE, E.S.; BOUÇAS, R.I.; ROCHA, H.A.; DOMINATO, J.A.; PAREDES-GAMERO, E.J.; FRANCO, C.R.; OLIVER, C.; JAMUR, M.C.; DIETRICH, C.P.; NADER, H.B. Internalization and degradation of heparin is not required for stimulus of heparan sulfate proteoglycan synthesis. **Journal of Cellular Physiology**, United States, v.271, p.360-366, 2008.

TUMOVA, S.; WOODS, A.; COUCHMAN, J. R. Heparan sulfate chains from glypican and syndecans bind the Hep II domain of fibronectin similarly despite minor structural differences. **The Journal of biological chemistry**, United States, v.275, p. 9410-9417, 2000.

UNDERWOOD, P.A.; KIRKPATRICK, A.; MITCHELL, S.M New insights into heparin binding to vitronectin: Studies with monoclonal antibodies. **The Biochemical journal**, England, v. 365, p.57–6, 2002.

VALENTIJN, A.J.; ZOUQ, N.; GILMORE, A.P. Anoikis. **Biochemical Society Transactions**, England, v.32, p. 421-425, 2004.

van der BERG, C.W.; GONÇALVES-de-ANDRADE, R.M.; MAGNOLI, F.C.; TAMBOURGI, D.V. *Loxosceles* spider venom induces the release of thrombomodulin and endothelial protein C receptor: implications for the pathogenesis of intravascular coagulation as observed in loxoscelism. **Journal of thrombosis and haemostasis**, England, v.5. p.989-995, 2007.

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

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

VEIGA, S.S.; FEITOSA, L.; SANTOS, V.L.P.; SOUZA, G.A.; RIBEIRO, A.S.; PORCIONATTO, M.A.; NADER, H.B.; DIETRICH, C.P.; BRENTANI, R.R.; GREMSKI, W. Effect of brown spider venom on basement membrane structures. **The histochemical journal**, Netherlands, v. 32, p. 397-408, 2000b.

VEIGA, S.S.; ZANETTI, V.C.; FRANCO, C.R.C.; TRINDADE, E.S.; PORCIONATTO, M. A.; MANGILI, O.C.; GREMSKI, W.; NADER, H.B.; DIETRICH, C.P. *In vivo* and *in*

*vitro* cytotoxicity of brown spider venom for blood vessel endothelial cells. **Thrombosis Research**, United States, v. 102, p. 229-237, 2001a.

VEIGA, S.S.; ZANETTI, V.C.; BRAZ, A.; MANGILI, O.C.; GREMSKI, W. Extracellular matrix molecules as targets for brown spider venom toxins. **Brasilian Journal of medical and biological research**, Brazil, v. 34, p.843-850, 2001b.

VERMES, I.; HAANEN, C.; REUTELINGSPERGER, C. Flow cytometry of apoptotic cell death. **Journal of Immunological Methods**, Netherlands, v.243, p.167-190, 2000 .

VETTER, R.S.; VISSHER, P.K. Bites and stings of medically important venomous arthropods. **International Journal of Dermatology**, United States, v.37, p. 481-496, 1998.

WANG, C.; MONETTE, R.; LEE, S.; MORLEY, P.; WU, W. Cobra cardiotoxin-induced cell death in fetal rat cardiomyocytes and cortical neurons: different pathway but similar cell surface target. **Toxicon**, England, v.46, p.430-440, 2005.

WAKEFIELD, T.W.; MYERS, D.D.; HENKE, P,K. Mechanisms of venous thrombosis and resolution. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology** , United States, v.28, p.387-391, 2008.

WIERZBICKA-PATYNOWSK, I.; SCHWARZBAUER, J.E. The ins and outs of fibronectin matrix assembly. **Journal of cell science**, England, v. 116, p.3269–3276, 2003.

WOLKERS, W.F.; LOOPER, S.A.; FONTANILA, R.A.; TSVETKOVA, N.M.; TABLIN, F.; CROWE, J.H. Temperature dependence of fluid phase endocytosis coincides with membrane properties of pig platelets. **Biochimica et Biophysica Acta**, Netherlands, v.1612, p. 154-163, 2003.

WOODS, A.; COUCHMAN, J. R. Syndecans: synergistic activators of cell adhesion. **Trends in Cell Biology**, England, v.8, p.189-192, 1998.

WOODS, A. Syndecans: transmembrane modulators of adhesion and matrix assembly. **The Journal of clinical investigation**, United States, v.107, v.935-41, 2001.

WU, W.B.; HUANG, T.F. Activation of MMP-2, cleavage of matrix proteins, and adherens junctions during a snake venom metalloproteinase-induced endothelial cell apoptosis. **Experimental Cell Research**, United States, v.288, p.143-157, 2003.

YAMADA, K. M. Cell surface interactions with extracellular materials. **Annual review of biochemistry**, United States, v.52, p.761-79, 1983.

YOU, W.K.; SEO, H.J.; CHUNG, K.H.; KIM, D.S. A novel metalloprotease from *Gloydiu halys* venom induces endothelial cell apoptosis through its protease and desintegrin-like domains. **Journal of biochemistry**, Japan, v.134, p.739-749, 2003.

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

ZANETTI, M.; SIRONI, N.; POLENTARUTTI, L.; LANFRANCONE, E.; DEJANA, E.; COLOTTA, F. Innibition of anchorage-dependent cell spreading triggers apoptosis in cultures human endothelial cells. **The Journal of Cell Biology**, United States, v.127, p. 537-546, 1994.

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

ZHANG, X.; MINALE, L.; ZAMPELLA, A.; SMITH, C.D. Microfilament depletion and circumvention of multiple drug resistance by shinxolides. **Cancer Research**, United States, v.57. p.3751-3758, 1997.