

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

EFEITOS INDUZIDOS PELAS TOXINAS PRESENTES NO VENENO DE *Loxosceles intermedia* (ARANHA MARROM) EM CÉLULAS ENDOTELIAS EM CULTURA

JENIFER NOWATZKI

CURITIBA
2006

JENIFER NOWATZKI

EFEITOS INDUZIDOS PELAS TOXINAS PRESENTES NO VENENO DE *Loxosceles intermedia* (ARANHA MARROM) EM CÉLULAS ENDOTELIAS EM CULTURA

Monografia apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Célia Regina Cavichilo Franco

Co-orientador: Prof. Dr. Edvaldo da Silva Trindade

CURITIBA
2006

“ Toda boa dádiva e todo dom perfeito vêm do céu, vêm de Deus, o Criador das luzes do céu, em quem não pode existir variação ou sombra de mudança. Pois, segundo o seu querer, ele nos gerou pela palavra da verdade, para que fôssemos como que primícias das suas criaturas.” Tiago 1: 17-18

AGRADECIMENTOS

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

Aos meus pais, Gerhard e Raquel Nowatzki por me apoiarem em todos os meus sonhos e pelo esforço e dedicação em sempre buscar me dar o melhor de cada um deles. 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!

Agradecimento especial para minha irmã Agnes (loira) por me compreender e ser a minha melhor amiga em todos os momentos, inclusive naqueles que eu estava insuportável.

À Prof (a) Dr (a) Célia Regina Cavichiolo Franco pela orientação e oportunidade e pelo crescimento profissional que me proporcionou. Foram momentos de muito aprendizado e de boas conversas científicas e não científicas, também.

Ao Prof. Dr. Edvaldo da Silva Trindade pela colaboração e disposição em sempre tirar dúvidas, fazer protocolos e dar sugestões. E também pela ajuda na correção desta monografia.

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

As colegas de laboratório, Kátia Sabrina Paludo e Luiza Helena Gremski, por todo apoio e por estarem sempre dispostas a tirar uma dúvida, quebrar um galho, ensinar alguma técnica, analisar mil lâminas no Confocal, enfim... Por ajudarem com a construção de tudo isso.

Ao colega e amigo Reginaldo Vieira de Sene por toda a ajuda no laboratório e também fora dele (quantos trabalhos da graduação copiados...). Obrigada pelo esforço em me ajudar na construção dessa monografia.

À todo o pessoal do LME (Laboratório de Matriz Extracelular e Biotecnologia de Venenos) Olga, Márcia, Dilza, Daniele, Rafael, Gabriel, Valéria, Ana Carolina, Luciellen, Sandra, Youssef (valeu pela ajuda no citômetro), Rodrigo, Josiana. Vocês foram exemplos de dedicação, esforço e competência. Obrigada pela ajuda, pelo companherismo, pelas conversas e risadas. Foram bons momentos que passamos juntos.

Ao LIPAPE, ao pessoal do Laboratório de Neurobiologia, e professores do Departamento.

À Ro, por todos os “galhos quebrados”, pela amizade e boas risadas, e pela dedicação em nos atender (inclusive com café e chá)... Sem ela nenhum aluno da Bio conseguiria de formar! Você foi uma mãezona para nos nesses quatro anos.

Ao seletto grupo de amigas, com as quais compartilhei os quatro anos da minha permanência nesse curso: Elaine Lopes Pereira Nunes, Jocieli Maschio e Makeli Garibotti Lusa. Vocês são os meus amores! Quantos momentos inesquecíveis, quantas histórias para contar, quantos micos para esconder, quantas risadas, e até alguns “estresses” em momentos de tensão. Vocês foram minha família (também passava mais tempo com vocês do que em casa...) ao longo desse tempo e agradeço muito por todo apoio, amizade e por poder contar com vocês em todas as horas. Foi muito bom poder formar o Quarteto Fantástico com vocês.

As minhas amigonas Natasha e Karryn, mesmo sem entender até hoje o que eu faço, vocês sempre estiveram dispostas a me ouvir e a orar por mim quando a situação estava “preta”. Amo vocês! Também todo o pessoal da igreja, vocês são amigos de verdade!!

À todos que estiveram a minha volta durante esse período, vocês foram blocos importantes para a construção da minha história.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	iii
LISTA DE FIGURAS E TABELAS.....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
RESUMO.....	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. ARANHAS.....	1
1.2. ARANHAS DO GÊNERO LOXOSCELES.....	2
1.3. EPIDEMIOLOGIA DO GÊNERO LOXOSCELES.....	4
1.4. LOXOSCELISMO.....	6
1.5. EFEITOS HISTOLÓGICOS E CELULARES PROVOCADOS PELO VENENO LOXOSCÉLICO.....	10
1.6. CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DO VENENO DE <i>Loxosceles</i> sp.....	12
2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....	15
3. MATERIAS E MÉTODOS.....	16
3.1. OBTENÇÃO DA <i>Loxosceles intermedia</i>	16
3.2. EXTRAÇÃO DE VENENO LOXOSCÉLICO POR ELETROCHOQUE.....	16
3.3. DOSAGEM DE PROTEÍNAS.....	16
3.4. OBTENÇÃO DAS LINHAGENS CELULARES.....	16
3.5. CULTIVO CELULAR.....	16
3.6. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE.....	17
3.7. LIGAÇÃO DO VENENO À SUPERFÍCIE CELULAR POR IMUNOFLOURESCÊNCIA E CITOMETRIA DE FLUXO NA PRESENÇA DE HEPARINA.....	17
3.8. ENSAIOS DE IMUNOFLOURESCÊNCIA.....	18
3.9. ENSAIOS DE CITOMETRIA DE FLUXO.....	20
3.10. PROLIFERAÇÃO CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	21
3.11. PROLIFERAÇÃO CELULAR BASEADO NO MÉTODO DO MTT.....	22
3.12. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO.....	22
3.13. COLORAÇÃO VITAL POR LARANJA DE ACRIDINA.....	23
3.14. MARCAÇÃO INTRACELULAR DO VENENO PELA CO-LOCALIZAÇÃO COM LISOSSOMOS.....	24
4 RESULTADOS.....	25
4.1. LIGAÇÃO DAS TOXINAS DO VENENO À SUPERFÍCIE CELULAR NA PRESENÇA DE HEPARINA.....	25
4.2. LIGAÇÃO ESPECÍFICA DAS TOXINAS DO VENENO DE <i>L. intermedia</i> SOBRE A SUPERFÍCIE CELULAR DE CÉLULAS ENDOTELIAIS EM CULTURA.....	29
4.3. INTERAÇÃO DAS TOXINAS DO VENENO COM RECEPTORES INTEGRÍNICOS PRESENTES EM CÉLULAS ENDOTELIAIS.....	32
4.4. ALTERAÇÕES INDUZIDAS PELO VENENO DE <i>L. intermedia</i> SOBRE O PROCESSO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR.....	37
4.5. ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DAS CÉLULAS ENDOTELIAIS TRATADAS COM VENENO DE <i>L. intermedia</i>	41
4.6. COLORAÇÃO VITAL DAS CÉLULAS ENDOTELIAIS COM LARANJA DE ACRIDINA NA AUSÊNCIA ou NA PRESENÇA DO VENENO DE <i>L. intermedia</i>	46
4.7. CO-LOCALIZAÇÃO DAS TOXINAS DO VENENO DE <i>L. intermedia</i> COM OS LISOSSOMOS DE CÉLULAS ENDOTELIAIS.....	48
5. DISCUSSÃO.....	50
6. CONCLUSÕES.....	55
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Dimorfismo sexual de <i>loxosceles intermedia</i>	4
Figura 2. Distribuição mundial das espécies com importância médica do gênero <i>loxosceles</i>	5
Figura 3. Lesão dermonecrotica induzida pelas toxinas presentes no veneno de <i>L. intermedia</i>	8
Figura 4. Interação da heparina com o veneno loxoscélico.....	26
Figura 5. Avaliação da possível perturbação da ligação do veneno de <i>L. intermedia</i> à superfície celular pela heparina.....	27
Figura 6. Ligação do veneno de <i>L. intermedia</i> na superfície celular endoteliais, na presença ou ausência de heparina e análise em citometria de fluxo.....	28
Figura 7. Imunodeteccção da ligação do veneno de <i>L. intermedia</i> na superfície celular e co-localização com a ligação da lectina WGA	30
Figura 8. Células endoteliais marcadas para lectina e veneno na presença ou na ausência das toxinas do veneno de <i>L. intermedia</i> e analisadas por citometria de fluxo.....	31
Figura 9. Co-localização das toxinas do veneno com a subunidade β_1 das integrinas presentes em células endoteliais em cultura.....	33
Figura 10. Avaliação da co-localização da ligação do veneno de <i>L. intermedia</i> com subunidade β_1 por citometria de fluxo	34
Figura 11. Co-localização das toxinas do veneno com a integrina $\alpha_5\beta_1$ presente em células endoteliais em cultura.....	36
Figura 12. Células endoteliais tratadas com veneno de <i>L. intermedia</i> e analisadas por técnica de citometria de fluxo.....	38
Figura 13. Efeito do veneno de <i>L. intermedia</i> sobre a proliferação de células endoteliais baseado no método do MTT.....	40
Figura 14. Análise ultraestrutural das células endoteliais não expostas ao veneno de <i>L. intermedia</i>	43
Figura 15. Análise ultraestrutural de células endoteliais tratadas por 24 horas com veneno de <i>L. intermedia</i>	44

Figura 16. Análise ultraestrutural de células endoteliais tratadas por 48 horas com veneno de <i>L. intermedia</i>	45
Figura 17. Coloração vital de células endoteliais com laranja de acridina.....	47
Figura 18. Co-localização das toxinas do veneno com lisossomos das células endoteliais.....	49
Tabela 1. Sumário dos maiores estudos sobre loxoscelismo nos estados brasileiros que apresentam maior incidência de casos.....	6
Tabela 2. Proliferação de células endoteliais após o tratamento com veneno de <i>L. intermedia</i> por 24 e 48 horas por citometria de fluxo.....	38

LISTA DE ABREVIATURAS

BSA - albumina de soro bovino (Bovine Serum Albumin)

CaCl₂ - cloreto de cálcio

Cg- complexo de Golgi

DAPI - 4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride

DNA - ácido Desoxirribonucleico

EDTA - EthyleneDiamineTetrAcetic acid (ácido etilenodiamino tetra-acético)

ELISA - Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

FITC - fluoresceína

GAG - glicosaminoglicano

Ht - heterocromatina

IgG - imunoglobulina G

kDA - kilo daltons

M - molar

Mt - mitocôndrias

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

N - núcleo

Nu - nucléolo

PBS - phosphate buffer saline

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

SFB - soro fetal bovino

Re - retículo endoplasmático

RNA - ácido ribonucléico

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

α alfa

β beta

μ micro

η nano

RESUMO

Acidentes envolvendo aranhas do gênero *Loxosceles spp* (aranhas marrons) são considerados de grande importância médica, constituindo um problema de saúde pública, principalmente no Estado do Paraná. O quadro clínico que caracteriza o loxoscelismo é a lesão dermonecrotica no local da picada, podendo evoluir para efeitos sistêmicos, incluindo hemorragia, hemólise, agregação plaquetária e insuficiência renal aguda (IRA). O estudo das conseqüências hemorrágicas induzidas pelas toxinas do veneno de *Loxosceles intermedia* tem demonstrado que células endoteliais em cultura expostas a esse, apresentam profundas alterações morfológicas com perda da adesividade da célula ao substrato. Além disso, foi demonstrado a ligação do veneno sobre a célula e uma ação sobre a matriz extracelular através da degradação da fibronectina produzida pela mesma. Este trabalho, com o emprego das mesmas linhagens endoteliais, buscou ampliar o conhecimento acerca do mecanismo molecular de ação das toxinas presentes no veneno. Com o emprego de Lectina (WGA) observou-se que as toxinas do veneno interagem especificamente com a superfície celular, tendo uma co-localização com os carboidratos de superfície celular, sendo o veneno capaz de reduzir sua expressão em quatro horas de exposição. As toxinas do veneno também interagem com receptores integrínicos de superfície celular (subunidade β_1), e em especial o receptor de fibronectina, a integrina $\alpha_5\beta_1$. Sobre a interação do veneno com os componentes da superfície celular, pode-se inferir sobre uma especificidade independente de cargas, uma vez que glicosaminoglicano de Heparina é capaz de interagir com as toxinas do veneno, todavia, não desloca a ligação do veneno com a superfície celular. Verificou-se, ainda, que o veneno é capaz de reduzir a proliferação das células expostas ao veneno por 24 ou 48 horas. Através de Microscopia Eletrônica de Transmissão, observou-se que essas células, após esses longos períodos de exposição apresentam inúmeros sinais de sofrimento celular, muitos indicando a morte da célula, principalmente em 48 horas. Além disso, essas células apresentaram um aumento expressivo de vesículas e vacúolos no citoplasma e pela técnica de laranja de acridina supõem-se que estes são compartimentos endossomais (ácidos). E através de imunomarcção do veneno e sua co-localização com lisossomas pode-se inferir que a marcação típica observada para as toxinas do veneno sobre as células endoteliais, não se refere à apenas uma marcação na superfície celular, mas a uma marcação intracelular do veneno. Com base nesse resultado sugere-se que alguma(s) das toxinas que compõe o veneno podem estar sendo internalizadas pela célula endotelial. Tais resultados sugerem que a ação deletéria do veneno sobre células endoteliais pode estar relacionada tanto com sua interação com moléculas da superfície celular, quanto com sua internalização.

1. INTRODUÇÃO

1.1. ARANHAS

As aranhas e os seres humanos têm compartilhado o mesmo hábitat desde que os homens existem sobre a Terra. Devido a essa convivência, as aranhas têm recebido um lugar especial nos mitos e folclores populares, principalmente por seus hábitos secretos, aspectos físicos, comportamento predatório e potencial de letalidade. Não obstante, embora sua diversidade biológica e ecológica seja imensa, poucas espécies representam um real problema médico (ESCOUBAS *et al.*, 2000).

São animais que dentro da classificação taxonômica estão incluídos no grupo dos artrópodes terrestres, compreendendo a ordem Araneae dentro da classe Arachnida, que, além das aranhas, incluem os escorpiões, pseudoescorpiões, carrapatos e ácaros. Constituem uns dos grupos mais antigos, com o fóssil mais velho encontrado datado de mais de 300 milhões de anos, o qual remete ao Período Carbonífero. Excluindo-se os insetos, as aranhas são os mais bem sucedidos invertebrados terrestres com mais de 40.000 espécies descritas por todo o globo terrestre, sendo que provavelmente existam espécies ainda não descritas (RASH & HODGSON, 2002).

Morfologicamente possuem o corpo dividido em dois segmentos, o prossoma/cefalotórax (união entre cabeça e tórax) e o opistossoma/abdômen; quatro pares de patas; apresentam quelíceras e pedipalpos e podem possuir até oito olhos (RUPPERT & BARNES, 1996).

Podem ser encontradas em praticamente todo hábitat terrestre, podendo-se estabelecer em uma grande variedade de ambientes naturais, tendo se adaptado também ao ambiente doméstico em associação íntima com o homem (RASH & HODGSON, 2002). Por serem carnívoras, alimentam-se principalmente de insetos, (RUPPERT & BARNES, 1996).

As aranhas podem ser divididas em dois grupos principais de acordo com a posição das quelíceras: o Orthognatha ou migalomorfa (aranha primitiva ou aranha "trapdoor") cuja quelícera se projeta à frente partindo do cefalotórax enquanto as presas posicionam-se para baixo. E o grupo Labdognatha ou araneomorfa, no qual os representantes possuem as quelíceras posicionadas verticalmente e que

conjuntamente com as presas se movem lateralmente como pinças (RASH & HODGSON, 2002). Dentro desse grupo, estão as aranhas mais perigosas envolvidas em acidentes com humanos, tendo destaque as: *Latrodectus*, família Theridiidae, popularmente conhecidas como viúva negra; *Loxosceles*, família Loxoscelidae, popularmente conhecidas como aranhas marrons e *Phoneutria*, família Ctenidae, popularmente conhecidas como aranha da banana ou armadeira. Muitas outras famílias são consideradas perigosas, embora a maioria das notificações de envenenamentos não seja adequadamente documentada, dentre elas podemos considerar as famílias Segestriidae, Agelenidae, Salticidae, Gnaphosidae, Thomisidae, Heteropodidae, Clubionida e Lycosidae. Podemos ainda relatar que os gêneros *Atrax* (do grupo Orthognatha, encontrada apenas na Austrália, são atualmente reconhecidas como as aranhas mais venenosas do mundo. As espécies *Latrodectus* e *Loxosceles* são apontados como as principais responsáveis por acidentes culminando em óbito em humanos (ESCOUBAS *et al.*, 2000).

1.2. ARANHAS DO GÊNERO *LOXOSCELES*

Aranhas do gênero *Loxosceles* são marrons, variando do marrom pálido (*L. laeta*) para o marrom escuro (*L. gaucho*), e por esse motivo recebem o nome popular de aranhas marrons. A característica estrutural que melhor representa o gênero é o cefalotórax em forma semelhante a de um violino. São aranhas pequenas apresentando o tamanho corporal variando de 8 a 15mm e o comprimento das patas variando de 8-30mm (FUTRELL, 1992; SILVA *et al.*, 2004). Possuem seis olhos arranjados em pares, sendo esta disposição dos olhos descrita como um dos melhores meios de identificar a aranha marrom (VETTER & VISCHERR, 1998).

São aranhas de hábito sedentário e noturno podendo viver de 3 a 7 anos (ANDRADE *et al.*, 1999). Constroem teias irregulares que se assemelham à linha de algodão esfiapado (FUTRELL, 1992). A composição das teias de *L. arizonica* e *L. laeta* é muito similar sendo rica em glicina e alanina (CODDINGTON *et al.*, 2001). Alimentam-se de pequenos insetos e se reproduzem com facilidade mesmo em

lugares pouco favoráveis, podendo sobreviver por diversos dias ou mesmo meses sem alimento ou água. Podem suportar temperaturas que variam de 8 a 43°C (LUCAS, 1998; FUTRELL, 1992). Possuem dimorfismo sexual, sendo que em *Loxosceles intermédia* a fêmea possui o corpo maior do que o macho, e este por sua vez, possui as patas mais delgadas e alongadas que a fêmea (FUTRELL, 1992) (FIGURA 01).

As glândulas de veneno de *L. intermedia* são compostas de duas camadas de fibras de músculo estriado, uma externa e outra interna em contato com uma estrutura subjacente que separa as células musculares das células epiteliais da glândula de veneno. As células epiteliais estão arranjadas de lado a lado e emitem projeções ao lúmen das glândulas, sendo esse lúmen rico em vesículas secretoras contendo o veneno. A morfologia e a aparência celular das glândulas de veneno sugerem um mecanismo holócrino controlando a secreção. O lamina basal, a qual contém glicoproteínas, resíduos de glicosaminoglicanos sulfatados, laminina e entactina, separa as células epiteliais secretoras que formam as glândulas das células musculares (SANTOS *et al.*, 2000).

No ambiente antrópico, as aranhas são abundantes em locais escuros e secos dentro das casas. Não são agressivas sendo que naturalmente seu veneno é utilizado para paralisar suas presas e também como um mecanismo de defesa. Contudo, devido a seus hábitos noturnos e ao fato de procurarem abrigo entre as roupas, toalhas penduradas, roupas de cama, sapatos, etc., os acidentes acontecem tipicamente quando uma aranha é ocasionalmente comprimida contra o corpo humano, onde essas picam o homem como forma de defesa (FUTRELL, 1992; MÁLAQUE *et al.*, 2002). A quantidade de veneno inoculado é mínima (cerca de 4µL) e contém de 65 à 100 µg de proteínas (SAMS *et al.*, 2001). Os acidentes com aranhas marrons ocorrem principalmente durante as estações mais quentes do ano, primavera e verão (SILVA *et al.*, 2004).

A classificação taxonômica de *Loxosceles* enquadra o gênero na família Loxoscelidae, sub-ordem Labidognatha, ordem Araneida, classe Arachnida e filo Arthropoda (RUPPERT & BARNES, 1996).



FIGURA 01. DIMORFISMO SEXUAL DE *Loxosceles intermedia*. À esquerda a fêmea e a direita o macho.

1.3. EPIDEMIOLOGIA DO GÊNERO *LOXOSCELES*

As aranhas do gênero *Loxosceles* encontram-se mundialmente distribuídas e acidentes têm sido descritos na América do Sul (SEZERINO *et al.*, 1998), América do Norte (FUTRELL, 1992), Europa, África, em algumas regiões da Ásia (NICHOLSON e GRAUDINS, 2003), Israel (COHEN *et al.*, 1999) e na Austrália. (FUTRELL, 1992). (FIGURA 02).

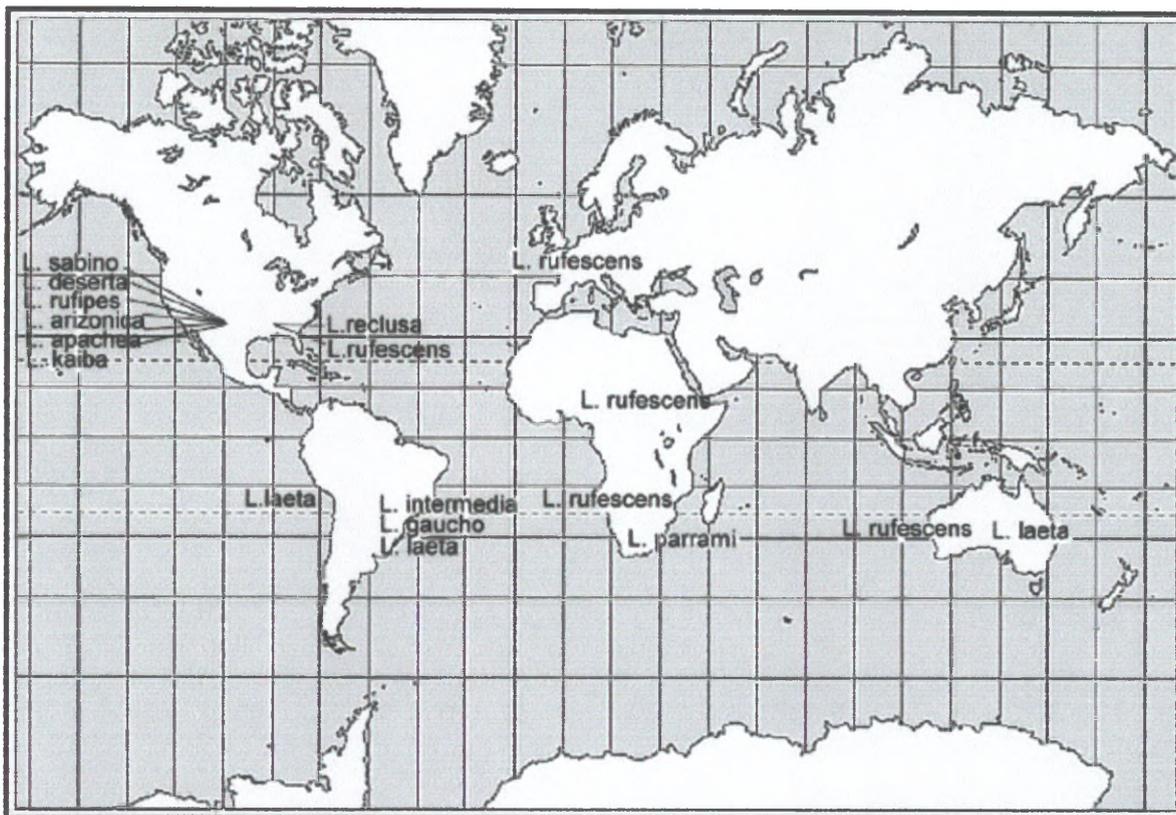


FIGURA 02. DISTRIBUIÇÃO MUNDIAL DAS ESPÉCIES COM IMPORTÂNCIA MÉDICA DO GÊNERO *Loxosceles*.

No Brasil, sete espécies têm sido identificadas, a maioria delas nas regiões sul e sudeste (SEZERINO *et al.*, 1998), todavia, dentre essas, apenas três espécies (*L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta*) estão envolvidas nos casos de envenenamento humano (MÁLAQUE *et al.*, 2002). No Brasil, o loxoscelismo (quadro clínico provocado pela picada de aranhas do gênero *Loxosceles*) representa o envenenamento envolvendo aranhas que desenvolve o quadro clínico mais severo, sendo responsável por 36% das 17.781 picadas de aranhas notificadas pelo Ministério da Saúde entre 1990 e 1993 (SEZERINO *et al.*, 1998). Existe uma ampla variação dos perfis de envenenamento entre os estados, onde o Paraná apresenta maior incidência de casos (TABELA 01).

Segundo dados referentes à 2ª Regional de Saúde, em todo estado do Paraná, entre os anos de 2000 e 2004, a média de casos registrados por ano foi de aproximadamente 3.730. Na região metropolitana de Curitiba o loxoscelismo é bastante expressivo, com cerca de 2000 casos registrados por ano (MÁLAQUE *et*

al., 2002) sendo a espécie *L. intermedia* a mais comumente encontrada em ambiente urbano, e possivelmente a maior responsável por estes acidentes (SILVA *et al.*, 2004).

TABELA 01 - SUMÁRIO DOS MAIORES ESTUDOS SOBRE LOXOSCELISMO NOS ESTADOS BRASILEIROS QUE APRESENTAM MAIOR INCIDÊNCIA DE CASOS

ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS	PARANÁ (%) (1) (n= 923)	SANTA CATARINA (%) (2) (n= 267)	SÃO PAULO (%) (3) (n=359)
Sexo			
Masculino	35	43	52
Feminino	65	57	48
Idade (% dos pacientes, idade)			
	10 (0-10)	33 (0-14)	6 (0-12)
	75 (10-50)	60 (15-59)	75 (13-49)
	15 (>50)	6 (>59)	19 (>49)
Local da picada			
Pernas	12	15	35
Tronco	12	11	15
Braços e mãos	27	30	15
Outros	49	44	35
Tempo para notificação			
<12 h	12	9	10
12-48 h	36	45	41
>48 h	29	36	49
desconhecido	23	10	ND
Circunstâncias			
Vestindo	NR	22	42
Dormindo	NR	17	18
Outros	NR	61	40

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

NOTA: NR (não registrado); ND (não disponível).

(1) Ribeiro *et al.*, 1993; (2) Sezerino *et al.*, 1998; (3) Málaque *et al.*, 2002.

1.4. LOXOSCELISMO

Loxoscelismo é o termo utilizado para descrever as lesões e as reações induzidas pela picada das aranhas do gênero *Loxosceles* (FUTRELL, 1992).

O primeiro caso documentado de envenenamento pelo gênero foi em 1879, onde um homem norte americano apresentava um quadro clínico caracterizado por febre e hematúria após a picada de uma aranha. Dados mais definitivos e

consistentes começaram a serem publicados 50 anos depois, quando a primeira associação entre a aranha do gênero *Loxosceles* e a lesão necrótica na pele foi descrita no Chile, logo após no Brasil e nos Estados Unidos (HOGAN *et al.*, 2004).

O quadro clínico provocado por acidentes envolvendo aranhas do gênero *Loxosceles* pode ser de dois tipos: o quadro cutâneo ou dermonecrotico (que representa 84 – 97% dos casos) e o quadro cutâneo visceral ou sistêmico (que representa 3 – 16% dos casos) presentes nos casos mais severos (BARBARO *et al.*, 1992).

O desenvolvimento de um quadro ou outro, ou de ambos e a gravidade do acidente vai depender de alguns fatores relacionados, tais como: a espécie da aranha, sexo do animal, quantidade de veneno inoculado, assim como as características gerais do indivíduo acidentado tais como: a idade, o estado nutricional, local da picada, susceptibilidade ao veneno e o tempo em que este indivíduo levou para procurar um tratamento adequado (BARBARO *et al.*, 1994; GUILHERME *et al.*, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 1999;).

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 (SILVA *et al.*, 2004). 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 uma cor azul-violeta com um distinto e característico espalhamento 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 escarra de difícil cicatrização entre 3 a 7 dias. Após uma semana, a lesão começa a endurecer principalmente o centro. A escarra pode cair, levando a formação de uma úlcera que cicatriza entre 6 a 8 semanas e normalmente requer um enxerto (FUTRELL, 1992).

(FIGURA 03). O ferimento crônico produzido pela picada apresenta vasculite mediada por leucócitos, que pode produzir lesões gangrenosas. Tal lesão pode ser agravada pela presença de microrganismos, a bactéria *Clostridium perfringens*, oriunda das quelíceras, que no ato da picada, é injetada juntamente com o veneno (MONTEIRO *et al.*, 2002). 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).

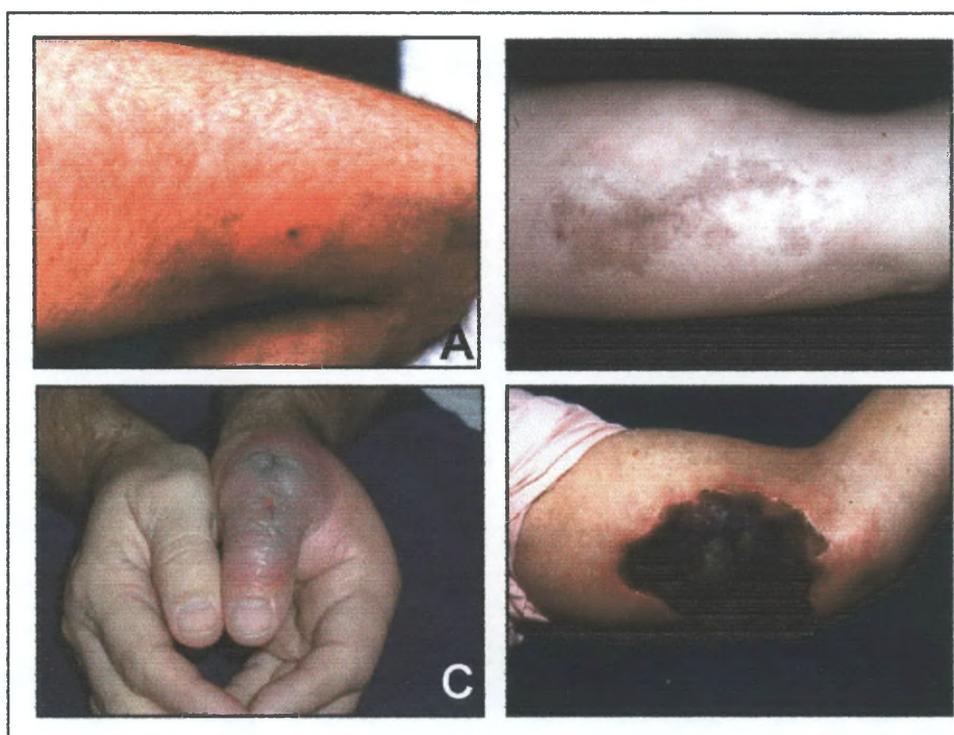


FIGURA 03. LESÃO DERMONECRÓTICA INDUZIDA PELAS TOXINAS PRESENTES NO VENENO DE *L. intermedia*. Em (A) a aparência da pústula formada no local da picada estando circundada por um halo de tecido isquêmico avermelhado. Em (B) aparência da zona pálida denominada placa marmórea, característica da evolução do quadro dermonecrótico. Em (C) uma lesão em processo de necrose, apresentando uma cor azul-violeta com um distinto e característico espraiamento gravitacional. Em (D) um quadro clínico bastante evoluído com a formação de uma úlcera de difícil cicatrização.

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 associada à morte, especialmente em crianças, nos casos mais severos (FUTRELL, 1992 e ZANETTI *et al.*, 2002). As primeiras manifestações aparecem após 24 horas e os sintomas incluem, além da reação local, astenia, febre, episódios eméticos, alterações sensoriais, cefaléias, insônia, podendo ocorrer em casos mais graves convulsões e coma, que sugerem algum efeito sobre o sistema nervoso. Pode haver também prurido generalizado e petéquias (FUTRELL, 1992). Todavia o envolvimento sistêmico é menos comum que as lesões cutâneas e ocorre na minoria dos casos (SILVA *et al.*, 2004).

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 a exclusão de outras etiologias (SILVA *et al.*, 2004). O teste diagnóstico mais preciso em caso de envenenamento é a detecção tanto do veneno propriamente dito, quanto de anticorpos circulantes contra o veneno (HOGAN *et al.*, 2004). O veneno de *L. reclusa* pode ser detectado nas lesões até cinco dias após o envenenamento (dados experimentais em coelhos). A presença do veneno nas lesões de pacientes e no soro podem ser detectadas usando o ensaio de ELISA e embora tenha se mostrado alta sensibilidade e especificidade, seu uso ainda não foi clinicamente difundido (CHAVEZ- OLORTEGUI *et al.*, 1998).

Uma variedade de terapias tem sido descritas para o loxoscelismo, todavia as terapias já estabelecidas citam: corticóides, ácido acetilsalicílico, antibióticos, gelo, evitar atividades que gerem estresse e calor e, quando necessário, cirurgia reparadora. Em Curitiba, tem-se utilizado corticóides (prednisona e dapsona) e a terapia com anti-soro do veneno em casos severos de loxoscelismo viscerocutâneo (SILVA *et al.* 2004). Todavia, o melhor tratamento para picadas de aranhas do gênero *Loxosceles* ainda é a prevenção, que inclui medidas simples, como a checagem de roupas, calçados, roupas de cama antes de usá-los entre outros (FUTRELL, 1992).

1.5. EFEITOS HISTOLÓGICOS E CELULARES PROVOCADOS PELO VENENO LOXOSCÉLICO

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 tanto da epiderme quanto da derme (FUTRELL, 1992; SILVA *et al.*, 2004). Os dados histopatológicos descritos em modelos animais usando veneno extraído de diferentes espécies de *Loxosceles spp* suportam os dados patológicos acima mencionados (SILVA *et al.*, 2004).

PIZZI *et al.* (1997) realizaram o primeiro estudo sistemático e detalhado das lesões histopatológicas produzidas experimentalmente pelo veneno de *Loxosceles* demonstrando a existência precoce de intensas alterações vasculares. A permeabilidade do endotélio desempenha um papel crucial em muitos processos fisiológicos e patológicos. Tal função, que é crítica para muitos tecidos, depende da integridade da adesão celular, bem como da organização do citoesqueleto e das moléculas da matriz extracelular que dão suporte para a adesão da célula (SHOLLEY *et al.*, 1977).

As conseqüências histopatológicas dos efeitos a uma exposição aguda ao veneno de *L. intermedia* em coelhos foi descrita por OSPEDAL *et al.* (2002). Os primeiros sinais de injúria começam a aparecer entre uma a quatro horas após a injeção de veneno. A partir de quatro horas de exposição ao veneno, os autores retratam eventos relacionados à derme como edema intersticial, exudação 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. Com 12 horas de tratamento foi verificada necrose de folículos capilares, hemorragias, trombose necrótica com oclusão de vaso, degeneração da parede dos vasos sanguíneos, edema muscular e miólise. A partir de 24 horas de tratamento, começa a ser observado o comprometimento da epiderme sendo que as alterações vasculares encontram-se bastante acentuadas. Com 48 horas de tratamento, tanto a derme como a epiderme apresentam necrose acentuada, e outros efeitos incluem hemorragia massiva na derme e mionecrose.

Molecularmente as conseqüências hemorrágicas do loxoscelismo parecem ser complexas e os mecanismos pelos quais o veneno da aranha marrom age estão sobre investigação.

Tem-se demonstrado que 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 complemento, intensa migração de leucócitos polimorfonucleares, liberação de enzimas proteolíticas, liberação de citocinas, agregação plaquetária, e alterações na hemostase (HOGAN *et al.*, 2004, SILVA *et al.*, 2004).

A ação do veneno sobre células endoteliais também tem sido investigada com estudos *in vitro* utilizando-se células endoteliais da aorta de coelho em cultura. Nesses experimentos, observou-se perda da adesão das células ao substrato, 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). PALUDO *et al.* (2006) demonstraram que há ligação do veneno tanto na superfície de células endoteliais em cultura, quanto uma ação sobre a matriz extracelular, através da degradação da fibronectina produzida por estas células. Esses autores também demonstraram que células endoteliais após tratamento com veneno sofrem retração progressiva do citoplasma e uma diminuição na adesão célula-célula, apresentando profundas alterações morfológicas. Além disso, essas células reorganizam seu citoesqueleto e os pontos de adesão à matriz extracelular (contatos focais).

Como anteriormente citado, o veneno de *Loxosceles* apresenta efeitos sobre a estrutura das membranas basais e matriz extracelular. O veneno de *L. intermedia* parece não apresentar nenhuma atividade sobre o colágeno tipo IV purificado ou laminina, contudo, apresenta atividade hidrolítica sobre entactina, tanto na molécula isolada quanto quando complexada com laminina. Além disso, o veneno degrada o core protéico do proteoglicano de heparam sulfato e as cadeias polissacarídicas de condroitim sulfato (VEIGA *et al.*, 2000a e 2001b). O estudo da atividade do veneno sobre moléculas da matriz extracelular plasmática tem demonstrado que esse possui atividade degradativa nas cadeias A e B da

fibronectina, digestão parcial do fibrinogênio e nenhuma atividade proteolítica sobre vitronectina solúvel (FEITOSA *et al.*, 1998; VEIGA *et al.*, 1999).

Análises histopatológicas de alguns órgãos de camundongos após envenenamento com doses seqüenciais do veneno de *L. intermedia*, revelam alterações marcantes restritas aos rins (SILVA *et al.*, 2004). Os efeitos patológicos sobre os rins podem ser reflexo dos distúrbios hematológicos, como a hemólise intravascular e a coagulação intravascular disseminada (LUNG & MALLORY, 2000). A ação entactinolítica do veneno bem como sua ação degradativa sobre o core protéico do proteoglicano de heparam sulfato, constituintes importantes também encontrados nas membranas basais, estruturas fundamentais dos glomérulos renais, poderia explicar, em parte, os problemas renais provocados pelo veneno (VEIGA *et al.*, 2000a; LUCIANO *et al.*, 2004). Além disso, foi demonstrada a ligação direta das toxinas do veneno as estruturas renais, sugerindo que as toxinas do veneno de *Loxosceles* são agentes diretos e potenciais da nefrotoxicidade associada à insuficiência renal aguda apresentada nos casos mais severos. Devido as suas propriedades bioquímicas e fisicoquímicas, como a carga positiva e o baixo peso molecular, as toxinas do veneno podem atuar como antígenos ao longo das estruturas renais, provocando a nefrotoxicidade (LUCIANO *et al.*, 2004; CHAIM *et al.*, 2006).

Ainda não há nenhuma explicação para o fato de ratos e camundongos não desenvolverem dermonecrose, enquanto que tanto coelhos e porcos da Índia quanto humanos a desenvolvem (SILVA *et al.*, 2004).

1.6. CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DO VENENO DE *Loxosceles sp*

O veneno da *Loxosceles intermedia* é rico em proteínas de baixo peso molecular variando entre 5-40kDa e, em uma menor extensão, proteínas de alto peso molecular, 60-850kDa (VEIGA *et al.*, 2000a). Diversas toxinas têm sido identificadas e caracterizadas bioquimicamente no veneno loxoscélico. Entre elas, podemos incluir fosfatases alcalinas, uma variedade de proteases, collagenases, esterases, ribonucleases e desoxoribonucleases (HOGAN *et al.*, 2004). O veneno

não contém glicosaminoglicanos, proteoglicanos, resíduos de galactose ou ácido siálico como estruturas complexas (VEIGA, *et al.*, 1999).

Os venenos de *Loxosceles gaucho*, *L. laeta* e *L.intermedia* apresentam um perfil eletroforético bastante similar em gel de SDS, sendo que as toxinas podem ser separadas em três frações principais (A, B e C) em cromatografia de gel filtração. As atividades dermonecrótica e letal são encontradas apenas na fração A (componentes de maior massa molecular), com proteínas de massa molecular de cerca de 35 kDa em *L. intermedia* (BÁRBARO *et al.*, 1996).

Um componente chave bem caracterizado bioquimicamente no veneno é a Esfingomelinase-D (32 kDa) que, além de ser o principal componente do veneno, tem se mostrado o fator responsável por induzir a dermonecrose em humanos e coelhos, por essa razão também conhecida como toxina dermonecrótica. Além disso, experimentalmente esse componente conduz a hemólise de células vermelhas sanguíneas e a agregação plaquetária, podendo resultar em morte (FUTRELL, 1992). A esfingomelinase-D causa a lise celular por hidrolisar o fosfolipídio de membrana esfingomielina no sítio da colina, resultando na liberação de ceramida fosfatada. Enquanto a clivagem de fosfolipídios é um fenômeno comum e necessário para a atividade celular, a clivagem no sítio D (entre a colina e fosfato) dessas moléculas é rara. O mecanismo pelo qual a clivagem da esfingomielina leva a uma necrose tecidual severa em humanos ainda é pouco compreendido, mas envolve uma resposta imune complexa. A atividade da esfingomelinase D é atualmente desconhecida para outros organismos venenosos do reino Animal, apenas para as aranhas do gênero *Loxosceles* (BINFORD *et al.*, 2005).

CHAIM *et al.* (2006) e SILVEIRA *et al.* (2006) clonaram, expressaram e purificaram três diferentes isoformas dessa toxina dermonecrótica a partir da glândula de veneno de *L. intermedia*, que foram capazes de reproduzir a dermonecrose, resposta inflamatória e distúrbios renais em diferentes proporções. Pelo menos 11 isoformas dessa toxina são reconhecidas pela técnica de proteômica no veneno de *L. gaucho* (MACHADO *et al.*, 2005). Acredita-se que cada isoforma da toxina dermonecrótica causa efeitos nocivos isoladamente, e o efeito induzido pelo veneno total representa um sinergismo de família (CHAIM *et al.*, 2006).

Entretanto, o mecanismo pelo qual o veneno causa a dermonecrose ainda não foi desvendado visto que o veneno é composto de uma mistura de vários componentes diferentes atuando sinergicamente (VEIGA *et al.*, 2000a).

Algumas atividades nocivas do veneno também podem ser atribuídas a toxinas proteolíticas que degradam fibrinogênio, fibronectina, entactina e o proteoglicano de heparan sulfato desorganizando a arquitetura da membrana basal e resultando em hemorragias locais, espalhamento gravitacional das lesões cutâneas bem como reações sistêmicas como a coagulação intravascular e a insuficiência renal (FEITOSA *et al.*, 1998; LUCIANO *et al.*, 2004 e VEIGA *et al.*, 2001a).

A primeira evidencia da presença de proteases no veneno loxoscélico foi descrita por ESKATI e NORMENT (1976) estudando o veneno de *L. reclusa*.

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. (FEITOSA *et al.*, 1998). A ação do veneno de *L. Intermedia* sobre o fibrinogênio mostra uma degradação parcial sobre a molécula de fibrinogênio intacta e uma clivagem completa sobre a molécula desnaturada, suportando a idéia de uma susceptibilidade dependente da conformação no fibrinogênio nativo. Essa atividade fibrinogenolítica é bloqueada por EDTA e 1,10-fenantrolina, sugerindo que um íon metálico divalente é crítico para a atividade enzimática da metaloproteína (FEITOSA, *et al.*, 1998 e ZANETTI, *et al.*, 2002).

Também foram descritas no veneno de *L. intermedia* duas serino-proteases 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.*, 200b).

A presença de hialuronidases no veneno que degradam o ácido hialurônico e resíduos do proteoglicano de condroitin sulfato pode estar relacionada ao espalhamento gravitacional da dermonecrose, atuando como um fator de espalhamento sistêmico, facilitando a difusão de outras toxinas do veneno (SILVEIRA, *et al.*, 2006).

2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Esse trabalho propõe-se a dar continuidade a linha de estudo desenvolvida que busca desvendar o mecanismo e ação do veneno loxoscélico sobre linhagens celulares. Para tanto, empregamos como modelo experimental células endoteliais de aorta de coelho (RAEC) em cultura, na tentativa de elucidar a forma, o local, e os mecanismos de ação e interação das toxinas presentes do veneno sobre a superfície celular através de ensaios *in vitro*.

Dessa maneira, nossos objetivos específicos foram:

- Avaliar o efeito do veneno de aranha marrom da espécie *L. intermedia* sobre a proliferação de células endoteliais de aorta de coelho.
- Verificar a ação das toxinas presentes do veneno de *L. intermedia* sobre a superfície das células através do marcador Lectinas (WGA).
- Verificar a interação das toxinas do veneno de *L. intermedia* com específicos receptores de superfície celular -integrinas.
- Verificar a possível interação das toxinas presentes no veneno com a integrina $\alpha_5\beta_1$, receptor de fibronectina, presentes na superfície das células.
- Observar se a incubação com a Heparina é capaz de deslocar a ligação das toxinas do veneno de *L. intermedia* sobre as células endoteliais.
- Analisar ultraestruturalmente, por Microscopia Eletrônica de Transmissão, as células endoteliais expostas ou não ao veneno de *L. intermedia*.
- Observar os compartimentos ácidos após tratamento das células endoteliais com veneno da aranha marrom da espécie *L. intermedia*.
- Investigar a possível internalização (endocitose) das toxinas do veneno de *L. intermedia*.

3. MATERIAS E MÉTODOS

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.

3.2. EXTRAÇÃO DE VENENO LOXOSCÉLICO POR ELETROCHOQUE

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

3.3. DOSAGEM DE PROTEÍNAS

A estimativa da concentração de proteínas presentes nas toxinas do veneno e das proteínas purificadas de matriz extracelular foi realizada pelo método de Bradford (Bradford, 1976).

3.4. OBTENÇÃO DAS LINHAGENS CELULARES

A linhagem celular empregada para este estudo foi células endoteliais de Aorta de Coelho (RAEC - Buonassisi, 1973) cedida pela Profa Dr^a Helena Bonciani Nader – UNIFESP.

3.5. CULTIVO CELULAR

A linhagem celular acima mencionada foi mantida em meio HAM - F₁₂ (Cultilab, Campinas, SP) com L-glutamina, desprovido de bicarbonato de sódio acrescido com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, Campinas, SP) e de sulfato de gentamicina (GARAMICINA). O crescimento das células foi em estufa a 37°C, com uma atmosfera de úmida de 5% CO₂. As trocas de meio foram impostas a cada dois dias.

3.6. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

Alíquotas de Heparina (50µg/mL) foram pré-incubadas com as toxinas do veneno (50µg/mL) por 1 hora, sendo posteriormente submetidas à eletroforese em gel de agarose (0,6%) preparado em tampão Tris/Acetato 0,05M pH 8,0, o qual permite a separação das moléculas de acordo com suas cargas líquidas. Alíquotas de 5 µl foram aplicadas em canaletas no gel e submetidas à eletroforese, em caixa resfriada a 4°C (5 V/cm durante 1 hora). A origem corresponde ao pólo negativo (Dietrich & Dietrich,1976). Foram utilizados como referência de mobilidade eletroforética, os padrões de glicosaminoglicanos sulfatados (5 µg cada GAG, sendo estes heparam sulfato, dermatam sulfato e condroitim 4-sulfato). Ao final da corrida eletroforética, os polissacarídeos foram precipitados no gel de agarose pela incubação em solução de Cetavlon 0,1%, por um tempo mínimo de duas horas, à temperatura ambiente, e as proteínas foram precipitadas no gel pela incubação em solução de formol:metanol (20:80) por 30 minutos. Em seguida o gel foi seco à temperatura ambiente e foi realizada dupla coloração. Os polissacarídeos foram corados com azul de toluidina 0,1%, numa solução de ácido acético 1% e etanol 50% por 15 minutos, sendo o excesso de corante removido pela solução na ausência do corante. E as proteínas do veneno foram coradas com negro de amido 0,1% em ácido acético 7% por 15 minutos, sendo o excesso de corante também removido pela solução na ausência do corante.

3.7. LIGAÇÃO DO VENENO À SUPERFÍCIE CELULAR POR IMUNOFLOURESCÊNCIA E CITOMETRIA DE FLUXO NA PRESENÇA DE HEPARINA.

Nesses experimentos, utilizou-se o carboidrato Heparina para ensaiar se esse ao interagir com o veneno seria capaz de deslocar a ligação com a superfície celular. Assim, foram utilizados três tratamentos distintos. 1- Veneno (40µg/mL) e Heparina (100µg/mL) foram postos juntos para incubar sobre a célula por quatro horas. 2- As células foram pré-incubadas com Heparina por uma hora, e então incubadas com o

veneno por quatro horas. E 3- veneno e Heparina foram pré-incubados por uma hora e então postos sobre a célula por quatro horas.

Para a imunofluorescência, as células endotélias foram processadas conforme o item 3.8., incubadas conforme tratamentos acima, e as toxinas do veneno foram reveladas também seguindo o mesmo protocolo.

Para a citometria de fluxo, células endoteliais foram processadas conforme o item 3.9., incubadas conforme os tratamentos acima, e as toxinas do veneno foram reveladas também seguindo o mesmo protocolo.

3.8. ENSAIOS DE IMUNOFLUORESCÊNCIA

Células endoteliais foram plaqueadas em lamínulas circulares de 13 mm de diâmetro (5×10^3 células por lamínulas) e mantidas em cultura (37°C a 5% de CO_2) por 4 dias. As células foram expostas ou não (controle) às toxinas do veneno de aranha marrom ($40\mu\text{g/ml}$) diluído em meio F12 na ausência de soro fetal bovino, por 4 horas.

Para a marcação de lectina, da subunidade β_1 das integrinas e da integrina $\alpha_5\beta_1$, após o período de incubação, as células foram lavadas três vezes com PBS e fixadas com solução de paraformaldeído 2% , diluído em PBS, por 30 minutos. Posteriormente, foram lavadas com PBS, por mais dez vezes. Os radicais aldeídicos foram bloqueados com solução de glicina 0,1 M por dois minutos, e a seguir, as células foram lavadas com PBS, por dez vezes. Após isso, as células foram expostas aos diferentes anticorpos (anti-lectina, anti-subunidade β_1 ou anti integrina $\alpha_5\beta_1$).

Para a marcação da lectina, as células tratadas ou não com o veneno de *L. intermedia* foram incubadas com Lectina conjugada com Alexa Fluor 488 , na concentração de $4\mu\text{g/mL}$ em PBS, por 40 minutos à temperatura ambiente. Após a incubação, as células foram lavadas dez vezes com PBS.

Para a marcação da subunidade β_1 das integrinas, as células tratadas ou não com o veneno, foram incubadas com anticorpo anti- β_1 (1:100) em PBS/BSA1% por uma hora. Após esse período, as células foram lavadas 10 vezes com PBS e bloqueadas novamente com PBS/BSA1% por 20 minutos. As células foram então incubadas com anticorpo anti-IgG de cabra, conjugado com Texas Red (1:250) em

PBS por 40 minutos, sendo posteriormente lavadas por dez vezes com PBS. Como controle da reação, foram utilizadas células tratadas com o veneno e incubadas apenas com o anti-IgG de cabra (controle do secundário).

Para a marcação da integrina $\alpha 5\beta 1$, novamente as células tratadas ou não tratadas com o veneno, foram incubadas com anticorpo anti $\alpha 5\beta 1$ (1:100) em PBS/BSA 1% por uma hora. Sendo o procedimento posterior realizado de forma idêntica para a marcação da subunidade $\beta 1$ da integrina, descrita anteriormente.

Na marcação das toxinas do veneno, após o período de incubação com o veneno, as células foram lavadas três vezes com F12 e o anticorpo policlonal IgG anti toxinas do veneno de *L. intermedia* produzido em camundongo (1:1000) foi incubado nas células antes de sua fixação diluído em meio F12 por uma hora no gelo. Após esse período de incubação, as células foram fixadas como descrito anteriormente.

Em seguida, as células foram bloqueadas com PBS/ BSA 1% por 20 minutos e incubadas com anticorpo anti-IgG de camundongo, produzido em cabra, conjugado com FITC (1:100 em PBS) (para a marcação para a subunidade $\beta 1$ das integrinas e para a marcação da integrina $\alpha 5\beta 1$) ou com anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com Texas Red (1:250 em PBS) (para a marcação de lectina) , sendo posteriormente lavadas por dez vezes com PBS. Como controle da reação, as células tratadas com o veneno foram incubadas apenas com o anticorpo secundário anti-IgG de cabra (omissão do primário) e células não tratadas com o veneno foram incubadas com o anticorpo anti-veneno e com o anticorpo anti-IgG de camundongo (controles negativos do veneno e do secundário).

Após as incubações dos anticorpos, as células foram novamente lavadas com PBS e então coradas com solução de DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride - Molecular Probes, Eugene, OR, EUA), 3 μ 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 - Ft. Washington, PA, EUA). Parte do material foi analisado em microscopia de fluorescência utilizando o microscópio acoplado com sistema de captura de imagem pertencente ao Setor de Ciências Biológicas da UFPR. E parte do material foi analisado em Microscópio

Confocal (Confocal Radiance 2100, Bio Rad Hercules, CA, USA) acoplado a Nikon-Eclipse E800 com objetivas Plan-Apochromatic (Sciences and Technologies Group Instruments Division, Melville, NY, USA) e analisadas com software específico (Laser Sharp 2000).

3.9. ENSAIOS DE CITOMETRIA DE FLUXO

Células endoteliais foram removidas das garrafas de cultivo com pancreatina (Sigma, EUA), ressuspendidas em meio F12, contadas e separadas em eppendorfs (10^6 células/mL). Alguns lotes de células foram incubados com F12 na ausência de soro fetal bovino, contendo $40\mu\text{g/mL}$ de veneno de *L. intermedia* por 4 horas à 37°C , e outros lotes permaneceram incubados apenas com F12 (grupos controle). Após o período de incubação as células foram lavadas com PBS dez vezes e bloqueadas com PBS/ BSA 1% por 20 minutos. As células endoteliais foram então incubadas com diferentes anticorpos, dependendo do ensaio, e a partir desse momento todo o procedimento foi realizado no gelo. Após a incubação com os diferentes anticorpos primários, as células foram lavadas 10 vezes em PBS e fixadas em solução de paraformaldeído 1% em PBS por 30 minutos. Os radicais aldeídicos foram bloqueados com incubação por cinco minutos com solução de Glicina 0,1M e novamente as células foram lavadas dez vezes em PBS. Então novamente as células são bloqueadas com PBS/ BSA 1% por 20 minutos e incubadas com os diferentes anticorpos secundários em PBS.

Para as marcações do veneno, as células expostas e não expostas ao o mesmo foram incubadas com anticorpo policlonal IgG anti toxinas do veneno de *L. intermedia* produzido em camundongo (1:1000) diluído em PBS/BSA 1% por uma hora. Após as lavagens e a fixação, as células foram incubadas com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com FITC (1:100) em PBS por 40 minutos, sendo posteriormente lavadas por dez vezes em PBS.

Para a detecção das lectinas presentes na superfície das células endoteliais, estas impostas ou não as toxinas do veneno, foram incubadas com Lectina, $4\mu\text{g/mL}$ em PBS, conjugada com Alexa Fluor 488 por 40 minutos, sendo posteriormente lavadas por dez vezes com PBS.

Para a quantificação da subunidade $\beta 1$ das integrinas da célula endotelial na ausência e na presença do veneno as células, não tratadas e tratadas com o veneno, foram incubadas com anticorpo anti- $\beta 1$ (1:100) em PBA/BSA1% por uma hora. Após as lavagens e a fixação, as células foram então incubadas com anticorpo anti-IgG de cabra, conjugado com Alexa Fluor 488 (1:250) em PBS por 40 minutos, sendo posteriormente lavadas por dez vezes com PBS. Como controle da reação, foram utilizadas células tratadas com o veneno e incubadas apenas com o anti-IgG de cabra (controle do secundário).

Foram analisados 10.000 eventos para cada amostra no citômetro de fluxo FACScalibur (Becton-Dickinson Imunocitometria Systems, San Jose, CA, USA – análise em programa Cell Quest). Os dados apresentados correspondem à distribuição da frequência de fluorescência em histogramas (número relativo de células versus intensidade relativa da fluorescência expressa como unidades arbitrárias em escala logarítmica).

3.10. PROLIFERAÇÃO CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO

Células endoteliais de aorta de coelho (RAEC) foram mantidas em cultura nas condições especificadas no item 3.5. Quando a cultura de células endoteliais atingiu a sub-confluência, as células foram soltas com pancreatina (Sigma, USA) diluída em meio F12, contadas e acondicionadas em placas de 24 poços. Em cada poço foram plaqueadas 30.000 células (3×10^4). Após 24 horas de plaqueamento, a cultura foi carenciada de soro fetal bovino (SFB), o qual possui os fatores de crescimento que estimulam a proliferação celular, com isso, todas as células entraram no estágio de G-0 do ciclo celular (quiescência). Depois de 24 horas de carenciamento, meio F12 suplementado com 10% soro fetal bovino foi adicionado por um período de 6 horas. A partir disso, parte dos poços contendo as células foi tratado com 20 μg por ml de veneno em meio com SFB por 24 horas e outra parte por 48 horas. Para cada variável foi empregada triplicata. Após o período de tratamento, as células foram tratadas com pancreatina, acondicionadas em tubos e contadas em citômetro de fluxo. As células que estavam soltas devido ao tratamento com o veneno também foram coletadas.

3.11. PROLIFERAÇÃO CELULAR BASEADO NO MÉTODO DO MTT.

Células endoteliais de aorta de coelho (RAEC) foram mantidas em cultura como já descrito e acondicionadas em placas de 96 poços, numa quantidade de 500 células por poço. Após dois dias, as células foram submetidas, durante 24 horas, à ausência de soro fetal bovino, para que entrem em sua totalidade na fase de quiescência (G-0). Posteriormente, as células foram mantidas por 6 horas novamente em meio com 10% SFB, para que pudessem retomar ao ciclo celular (G-1). Vale ressaltar que essa etapa foi necessária já que experimentos anteriores mostraram que a célula não voltava a multiplicar-se quando a próxima etapa era realizada. Em seguida, o meio foi aspirado e uma solução de meio com 10% SFB com 20 µg/ml do veneno foi adicionado aos poços. Uma das placas foi mantida à 37°C, 5% de CO₂ durante 24 horas e outra por 48 horas.

Como controle negativo de reação, as células foram processadas da mesma maneira, mas as incubações por 24 ou 48 horas foram realizadas com meio acrescido de 10% SFB na ausência do veneno. Já nos poços utilizados como "branco", nenhuma célula foi plaqueada, no entanto as outras etapas foram iguais às aquelas realizadas para o controle. Cada variável foi realizada em oituplicatas (8 poços para cada variável).

Após o término dos tratamentos, cada poço recebeu 10µL da solução de MTT (Sigma, USA) e as placas foram incubadas durante 3 horas à 37°C, 5% de CO₂ para que o MTT pudesse ser metabolizado pelas células viáveis. Posteriormente foi adicionado 100µL do diluente específico para eluir os cristais de formazam, e, após 1 hora, efetuou-se leitura em leitor de ELISA no comprimento de onda de 570nm. Quanto maior a leitura da absorbância, mais MTT foi metabolizado e mais células estavam presentes no poço.

3.12. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Células endoteliais foram mantidas em garrafas de cultura de 150mL por 5 dias à 37°C, 5% de CO₂ e tratadas com 20µg/mL de veneno de *L. intermedia* por 24 e 48 horas. Células endoteliais sem o tratamento com o veneno permaneceram em cultura sob as mesmas condições. Após o período de incubação com o veneno, as células foram lavadas em tampão cacodilato de sódio (0,1M - pH7,2- 5% sacarose).

As células foram então fixadas por 2 horas em solução fixadora de Karnovsky (glutaraldeído 2,0%, paraformaldeído 4%, CaCl_2 1mM em tampão cacodilato 0,1M, pH 7,2-7,4), na própria garrafa de cultivo em temperatura ambiente. As células foram então raspadas das garrafas de cultivo e transferidas para tubos de centrifuga onde foram lavadas em tampão cacodilato 0,1M por 3 vezes de 10 minutos cada. O pellet de células foi então transferido para eppendorfs onde se processou a pós-fixação durante 1 horas, no escuro em temperatura ambiente, com Tetróxido de Ósmio 1%, Ferricianeto de Potássio (0,8%) e CaCl_2 1mM 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. Seguiu-se a desidratação em acetona, iniciando o processo em acetona 70% 2 vezes, acetona 90% e acetona 100% 2 vezes. Cada troca foi realizada num período aproximado de 12 horas, sendo o pellet, em cada etapa, centrifugado e ressuspenso na próxima concentração. Na última troca, transferiu-se o pellet para cápsulas been onde processou-se 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) e emblocagem feita em epon. Todo o material utilizado foi siliconizado para evitar a perda de células. Após a polimerização do epon em estufa à 60°C, os blocos foram cortados em ultramicrótomo. Os cortes foram ainda contrastados, no escuro, com Uranila por 20 minutos e solução de Reynolds (nitrato de chumbo e citrato de sódio) por 10 minutos e então observados no Microscópio Eletrônico de transmissão Jeol 1200 EXII, do Centro de Microscopia Eletrônica (CME) da UFPR.

3.13 COLORAÇÃO VITAL POR LARANJA DE ACRIDINA

Células endoteliais de aorta de coelho (RAEC) foram mantidas em cultura nas condições especificadas anteriormente e quando estavam atingindo confluência, foram tratadas com pancreatina (Sigma, USA) diluída em meio F12, contadas e plaqueadas em lamínulas acondicionadas em placas de 24 poços. Em cada lamínula foram adicionadas 30.000 células. As células consideradas como controle foram mantidas em meio F12 por 3, 6, 24 e 48 horas. Outro grupo de células foi tratado com 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de veneno da *L. intermedia* por 3, 6, 24 e 48 horas. No

término de cada período de tratamento, as células foram lavadas e uma solução contendo 5 μ M de laranja de acridina foi adicionada tanto nas células tratadas quanto nos controles. Após 10 minutos, as células foram então observadas em microscópio confocal.

3.14 MARCAÇÃO INTRACELULAR DO VENENO PELA CO-LOCALIZAÇÃO COM LISSOSSOMOS

Células endoteliais foram mantidas nas mesmas condições para os demais ensaios de imunofluorescência. O tratamento com o veneno (40 μ g/mL) também se deu por 4 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. A revelação para as toxinas do veneno se deu da mesma maneira que nos demais experimentos, apenas se introduziu um novo passo. Igualmente, as células foram lavadas e incubadas no gelo com o anticorpo policlonal IgG anti as toxinas do veneno (1:1000) por 1 hora e então fixadas como descrito no item 3.8. . Após, as células foram permeabilizadas com PBS/ BSA 1%/ Saponina 0,01% por 20 minutos e incubadas novamente com o anticorpo anti-veneno 1:1000 diluído em PBS/ BSA 1%/ Saponina 0,01% por uma hora a 4°C. Posteriormente, processou da mesma maneira que nas marcações anteriores, com a incubação do anti- igG de camundongo conjugado com FITC (1:100) e as sucessivas lavagens.

A marcação dos lisossomos se deu com o marcador fluorescente Lyso-tracker-Red, que foi adicionado as células por uma hora estando elas ainda vivas para sua endocitose, sendo essa adição realizada na última hora da incubação de quatro horas com o veneno.

Após as incubações dos anticorpos, as células foram novamente lavadas com PBS e então coradas com solução de DAPI por 15 minutos.

As lamínulas foram montadas da mesma maneira descrita no item 3.8 e a observação do material se deu em microscopia de fluorescência utilizando o microscópio acoplado com sistema de captura de imagem pertencente ao Setor de Ciências Biológicas da UFPR.

4 RESULTADOS

4.1. LIGAÇÃO DAS TOXINAS DO VENENO À SUPERFÍCIE CELULAR NA PRESENÇA DE HEPARINA.

A heparina é um polissacarídeo linear, altamente sulfatado, composto principalmente de um hexassacarídeo contendo ácido idurônico 2-O-sulfatado, glucosamina 2-6-disulfatada e ácido glucurônico não sulfatado, conferindo a molécula uma grande carga altamente negativa. Células endoteliais expostas a heparina aumentam a síntese de heparan sulfato, presente na superfície celular (NADER *et al.*, 2001).

Inicialmente, buscou-se verificar se esse polissacarídeo (altamente negativo) apresenta interação com as toxinas do veneno de *L. intermedia*. Para tal finalidade, foi utilizado o gel de agarose em Tampão Tris-acetato, o qual permite a separação das moléculas de acordo com suas cargas líquidas. Assim, pode-se perceber neste ensaio (Fig. 4) a presença da banda do veneno quando este foi aplicado sozinho no gel, porém, quando em presença da heparina, a banda de migração do veneno aumenta seu arrasto (alteração no perfil eletroforético) e diminui sua intensidade, mostrando uma possível interação deste polissacarídeo com o veneno. Contudo, não podemos afirmar, apenas com esse ensaio, se essa interação é unicamente por cargas ou se existe alguma especificidade.

Visto a existência de uma interação entre heparina e veneno, empregou-se a Heparina para verificar se essa interação seria capaz de deslocar a ligação do veneno com a superfície celular. Utilizamos três tratamentos distintos: Veneno e Heparina foram simultaneamente expostos para as células endoteliais. Em outro lote de experimento, as células foram pré-incubadas com Heparina por uma hora, e então incubadas com o veneno. Ainda, um terceiro "set" experimental, o veneno e Heparina foram pré-incubados por uma hora e então expostos à célula. Em todas as incubações, as células foram mantidas na presença ou ausência dos compostos por 4 horas a 37°C, 5% de CO₂.

Quando estas variáveis foram avaliadas por ensaios de imunofluorescência (Fig. 5), não se observou alterações aparentes, sobre a marcação das toxinas do veneno na superfície celular, indicando que a heparina não desloca a ligação do veneno com os componentes da superfície celular.

Da mesma maneira, o ensaio de citometria de fluxo não foi observada nenhuma alteração significativa (Fig. 6).



FIGURA 4 – INTERAÇÃO DA HEPARINA COM O VENENO LOXOSCÉLICO. Aliquotas de Heparina (50 μ g/mL) foram pré-incubadas com as toxinas do veneno (50 μ g/mL) por 1 hora, sendo posteriormente submetidas à eletroforese em gel de agarose (0,6%). Os polissacarídeos são corados em violeta e o veneno em azul. (1) Foram utilizados como referência de mobilidade eletroforética, os padrões de glicosaminoglicanos sulfatados (CS, DS e HS, sendo que CS e DS migram em conjunto). (2) Heparina (3) veneno; (4) Interação entre Heparina e veneno.

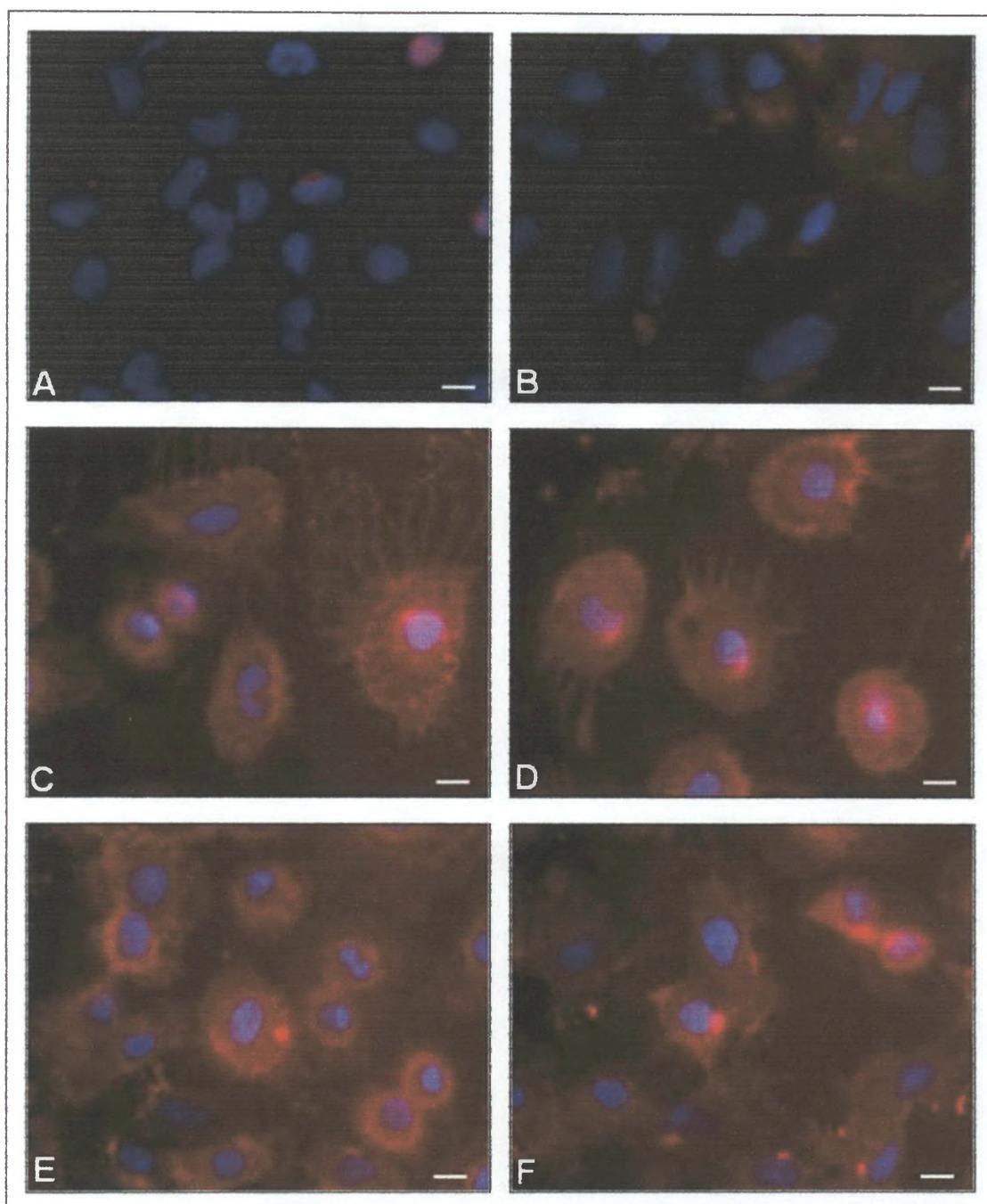


FIGURA 5- AVALIAÇÃO DA POSSÍVEL PERTURBAÇÃO DA LIGAÇÃO DO VENENO DE *L. intermedia* À SUPERFÍCIE CELULAR PELA HEPARINA.

Células endoteliais após 4 dias de plaquetamento foram tratadas com veneno de *L. intermedia* (40µg/mL) por 4 horas a 37°C, 5% de CO₂ na ausência e na presença de Heparina em diferentes condições. Apenas a marcação para o veneno foi revelada (vermelho). Controles negativos (A) células tratadas com veneno e incubadas apenas com anticorpo anti-IgG de camundongo (que reconhece o anticorpo para o veneno). (B) células não tratadas com veneno e incubadas com anticorpo IgG anti-veneno e com o anticorpo anti-IgG de camundongo, conjugado com marcador fluorescente em vermelho. Em (C) a marcação para o veneno em células tratadas apenas com o veneno. (D) marcação para as células que foram expostas ao veneno e Heparina simultaneamente. (E) marcação das células que foram pré-incubadas com Heparina por uma hora, e então incubadas com veneno por quatro horas. (F) marcação para o grupo onde veneno e heparina foram pré-incubados por uma hora e então expostos às células. Nenhuma alteração é observada no padrão de marcação do veneno em nos tratamentos submetidos. O núcleo foi corado em azul com DAPI. Barra = 10µm.

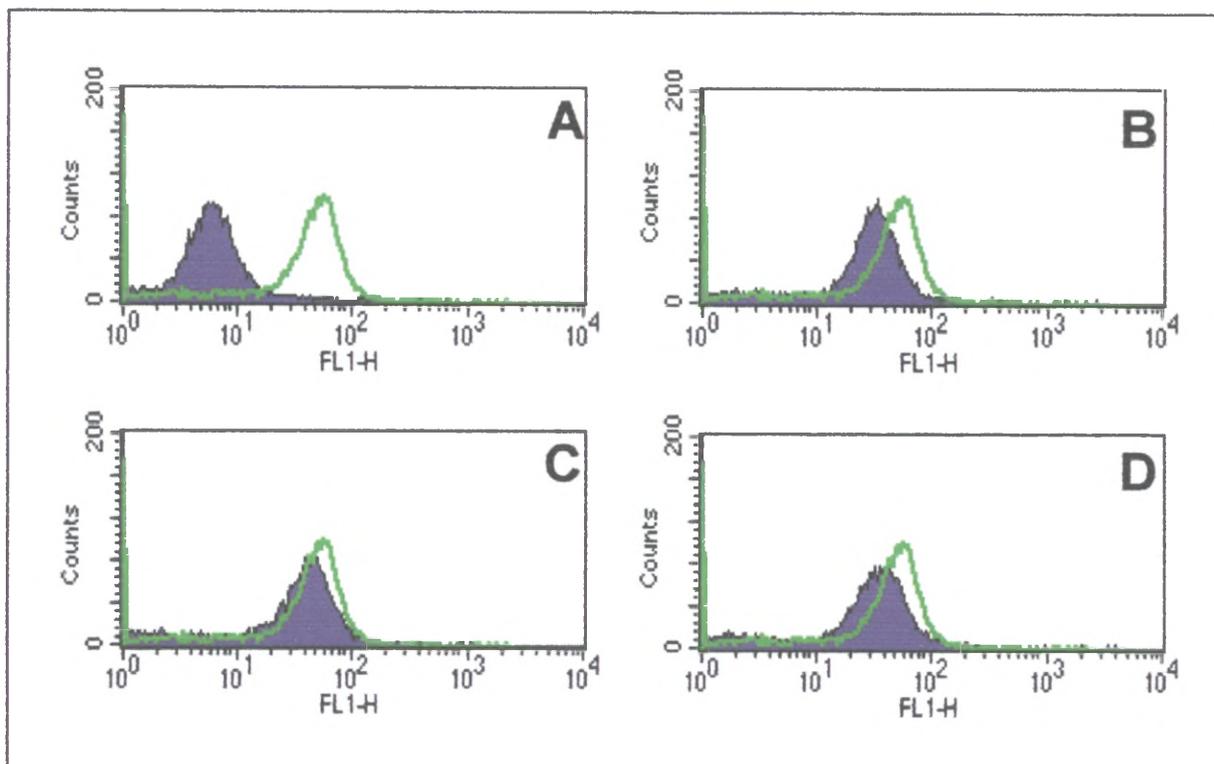


FIGURA 6 –LIGAÇÃO DO VENENO DE *L. intermedia* NA SUPERFÍCIE CELULAR DAS CÉLULAS ENDOTELIAIS, NA PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE HEPARINA E ANÁLISE EM CITOMETRIA DE FLUXO.

Células endoteliais após 4 dias de plaqueamento foram mantidas na ausência ou na presença do veneno de *Loxosceles intermedia* (40µg/µL) por 4 horas a 37°C, 5% de CO₂ na presença ou ausência de Heparina em diferentes situações. Apenas a marcação para o veneno foi revelada. (A) o histograma roxo representa a intensidade de fluorescência das células endoteliais sem o tratamento com o veneno e incubadas com anticorpo secundário conjugado com marcador fluorescente (que reconhecem as toxinas do veneno - controle negativo). O histograma das células tratadas com veneno por 4 horas está sobreposto como um histograma verde e representa 88% das células imunomarcadas. Nos demais gráficos o histograma roxo representa a marcação para o veneno e o histograma verde, a marcação para o veneno incubado na presença da heparina, em diferentes condições. (B) histograma verde representa a marcação à ligação do veneno, nas células que foram expostas simultaneamente ao veneno e heparina. Células imunomarcadas representam 83%. (C) histograma preto representa a ligação do veneno, onde as células foram pré-incubadas com heparina por uma hora, em então incubadas com veneno. Células imunomarcadas representam 79%. (D) histograma preto representa marcação para a ligação do veneno, onde o mesmo foi pré-incubado com heparina por uma hora e então expostos para as células. Células imunomarcadas representam 83%. Os gráficos foram representativos de triplicata.

4.2. LIGAÇÃO ESPECÍFICA DAS TOXINAS DO VENENO DE *L. intermedia* SOBRE A SUPERFÍCIE CELULAR DE CÉLULAS ENDOTELIAIS EM CULTURA

Lectinas são proteínas não pertencentes ao sistema imunológico, porém capazes de reconhecer sítios específicos em moléculas e ligar-se reversivelmente a carboidratos específicos, sem alterar a estrutura covalente das ligações glicosídicas dos sítios (ETZLER, 1985). A especificidade das lectinas com relação a diferentes carboidratos possibilita a sua utilização como marcadores para a investigação da superfície de células (KENNEDY *et al.*, 1995). Essas moléculas são produzidas a partir da superfície de diferentes bactérias e plantas, o que lhes confere especificidade para diferentes carboidratos. A lectina utilizada no presente estudo foi a WGA (Wheat Germ Agglutinin), obtida de *Triticum vulgare*, específica para resíduos de N-acetilglicosamina, marcando assim carboidratos da superfície celular, como os glicosaminoglicanos, glicoproteínas e glicolipídios que formam o glicocálix.

Na figura 7C podemos observar a marcação para lectinas em células controles, mostrando a morfologia típica de uma célula endotelial em cultura: células altamente espalhadas com numerosos processos laterais projetando-se do corpo celular, permitindo uma perfeita adesão sobre a superfície da lamínula. Na imagem ampliada (Fig. 7D), observa-se que essa marcação é bastante pontual, indicando agrupamentos desses carboidratos em sítios específicos sobre a superfície celular.

Após o tratamento com as toxinas do veneno por quatro horas (Fig. 7E), há uma marcante alteração morfológica evidenciada pela retração citoplasmática, percebida pela relação núcleo-citoplasma, quando se compara as células controles e as tratadas, com as células adquirindo um formato arredondado. Observa-se uma mudança no padrão de marcação na distribuição dos carboidratos da superfície da célula, que acompanha as alterações morfológicas. Quando são sobrepostas as marcações para a lectina (Fig. 7E) e para o veneno (Fig. 7F) nas células endoteliais tratadas, observa-se uma co-localização destas marcações (Fig. 7G), indicando que o veneno interage especificamente com estruturas ou moléculas presentes sobre a superfície celular. Na imagem ampliada (Fig. 7H), percebemos que essa co-localização é parcial, há tanto marcação para a lectina quanto ligações do veneno que não estão co-localizados.

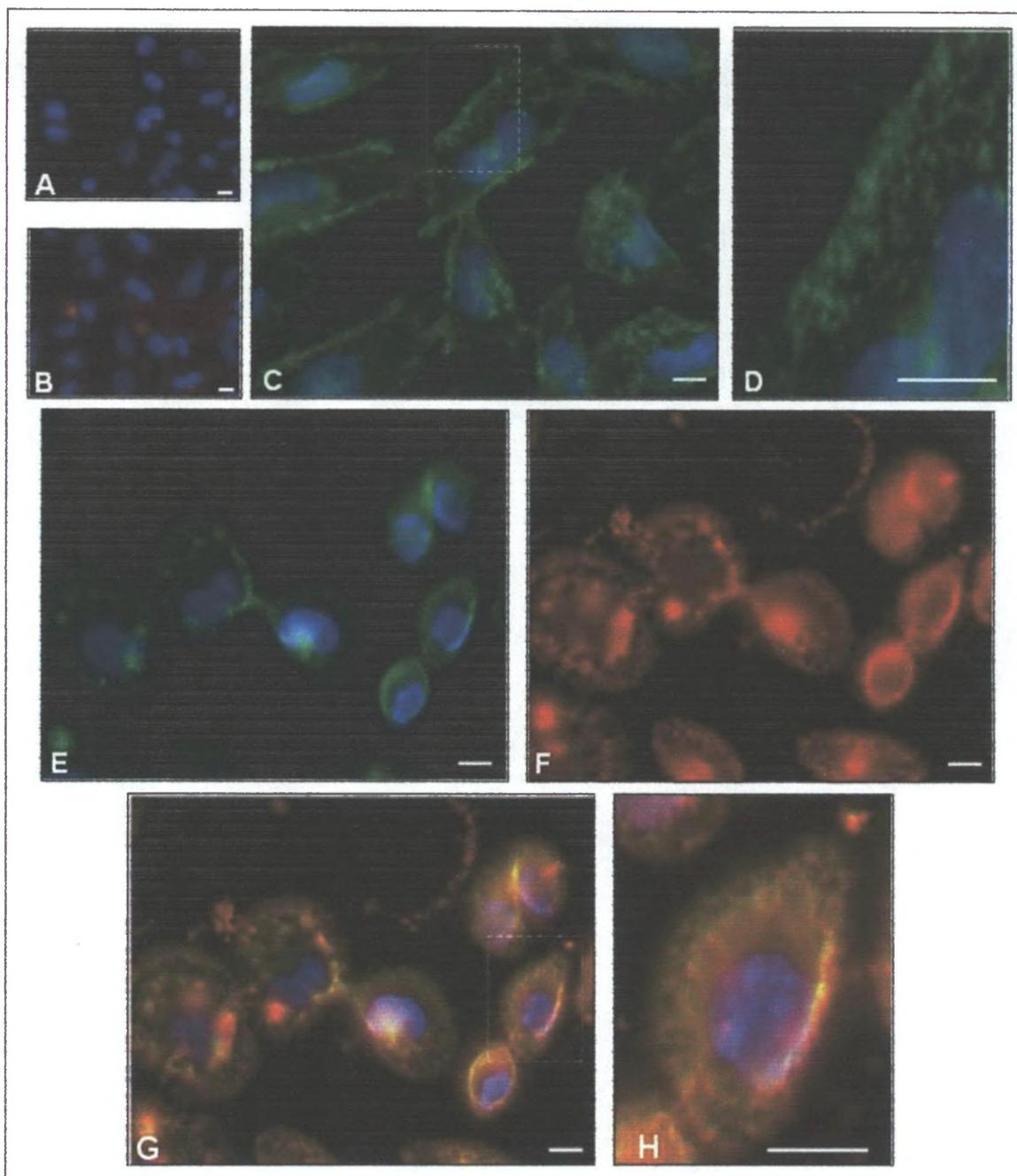


FIGURA 7. IMUNODETECCÃO DA LIGAÇÃO DO VENENO DE *L. intermedia* NA SUPERFÍCIE CELULAR E CO-LOCALIZAÇÃO COM A LIGAÇÃO DA LECTINA WGA

Células endoteliais após 4 dias de plaqueamento foram mantidas na ausência ou na presença do veneno de *Loxosceles intermedia* (40 μ g/ μ L) por 4 horas a 37°C, 5% de CO₂. Controles negativos: (A) células tratadas com veneno, mas incubadas apenas com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com marcador fluorescente (na ausência do anticorpo primário); (B) células não tratadas com veneno, incubadas com o anticorpo anti-veneno e com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com marcador fluorescente. Em (C) células não tratadas com veneno foram incubadas com a Lectina WGA conjugada com FITC (verde) (4 μ g/mL). Note a morfologia típica das células endoteliais em cultura e o padrão de marcação para lectina (D). Em (E) células tratadas com o veneno, mostrando alterações morfológicas como retração celular e mudança padrão de distribuição de carboidratos na célula. Em (F) a marcação típica para as toxinas do veneno (vermelho), que co-localiza parcialmente com a marcação para lectina (G e H). O núcleo foi corado em azul com DAPI. Imagens obtidas em microscopia de fluorescência. Barra indica 10 μ m.

Quando foi realizado o mesmo experimento em citometria de fluxo, pode-se comprovar a interação do veneno com a superfície da célula (Fig. 8A). Ao analisar a intensidade da fluorescência para a marcação da lectina em células não tratadas e tratadas (Fig 8B e 8C, respectivamente) com o veneno de *L. intermedia*, observa-se um deslocamento para a esquerda da marcação para as células tratadas (Fig. 8D). Esse deslocamento indica que nas células tratadas há uma redução de carboidratos componentes da superfície celular.

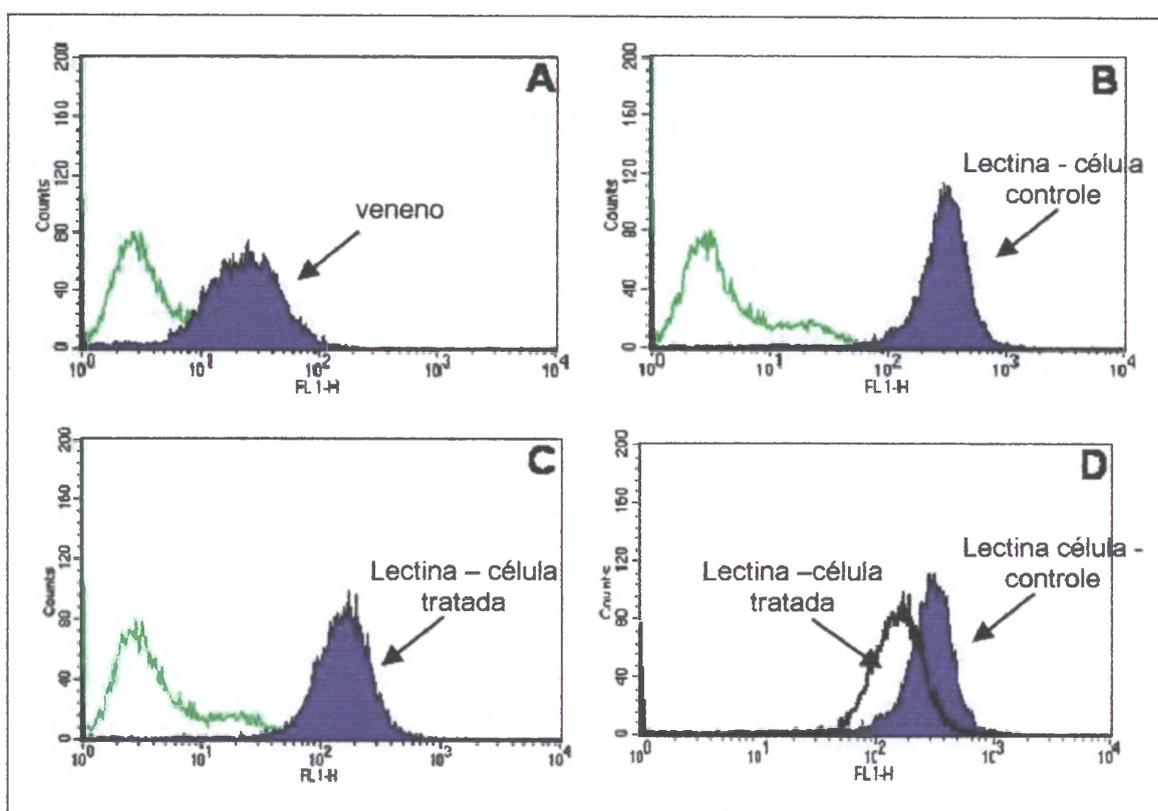


FIGURA 8 - CÉLULAS ENDOTELIAIS MARCADAS PARA LECTINA E VENENO NA PRESENÇA OU NA AUSÊNCIA DAS TOXINAS DO VENENO DE *L. intermedia* E ANALISADAS POR CITOMETRIA DE FLUXO. Células endoteliais em suspensão (1×10^6 células/mL) foram mantidas na ausência ou na presença do veneno ($40 \mu\text{g/mL}$) por 4 horas a 37°C sob agitação branda e após o período de incubação, foram expostas ou não ao anticorpo anti-veneno e revelado com anticorpo secundário conjugado com marcador fluorescente em vermelho, e/ou expostas à lectina WGA FITC. (A) O histograma verde representa a intensidade de fluorescência das células endoteliais que não foram tratadas com o veneno, mas foram expostas apenas ao anticorpo secundário (controle negativo). O histograma das células tratadas com veneno por 4 horas esta em roxo e representa 89% das células imunomarcadas. (B) O histograma roxo representa a intensidade de fluorescência para a marcação de lectina em células controle, isto é, na ausência do veneno. Em (C) o histograma roxo representa a intensidade de fluorescência para a marcação de lectina em células tratadas com as toxinas do veneno. Em (D) com a sobreposição dos dois histogramas para a fluorescência da lectina pode-se observar que há um deslocamento da fluorescência para a esquerda quando as células são tratadas com o veneno (histograma preto) em comparação com o histograma para as células controle (histograma roxo), mostrando uma diminuição da marcação, sugerindo uma menor quantidade de carboidratos resultantes do tratamento com o veneno.

4.3. INTERAÇÃO DAS TOXINAS DO VENENO COM RECEPTORES INTEGRÍNICOS PRESENTES EM CÉLULAS ENDOTELIAIS

Integrinas são receptores heterodiméricos de superfície celular sendo formadas por duas subunidades de glicoproteínas associadas não-covalentemente, subunidades α e β . Existem 18 subunidades α e 18 subunidades β que se associam para formar 24 heterodímeros diferentes. Essas subunidades consistem de grandes domínios extracelulares, um único domínio transmembranar e um pequeno domínio citosólico (HYNES, 1992). A sinalização mediada pelas integrinas é essencial para vários mecanismos celulares, como a adesão, migração, proliferação, sobrevivência, espraiamento e diferenciação celular. Entretanto, as integrinas não possuem atividade enzimática intrínseca, e para transduzir sinais, elas dependem do recrutamento de estruturas citoplasmáticas e de proteínas sinalizadoras (SCHWARTZ, 2001). São os elementos chaves que permitem a célula interagir com o ambiente sendo os mais importantes receptores para as proteínas da matriz extracelular, como fibronectina, lamininas, colágenos ou vitronectina, podendo uma integrina se ligar a diferentes ligantes, ou várias integrinas diferentes se ligarem a apenas um ligante (RÜEGG, *et al.*, 2004).

As células endoteliais expressam, pelo menos, 13 diferentes integrinas, dependendo do seu estágio de desenvolvimento, diferenciação e função, que se ligam a diferentes moléculas da matriz extracelular. São elas: integrinas $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$, $\alpha_6\beta_4$, $\alpha_8\beta_1$, $\alpha_9\beta_1$, $\alpha_V\beta_1$, $\alpha_V\beta_3$, $\alpha_V\beta_5$ e $\alpha_V\beta_8$ (RÜEGG, *et al.*, 2004). Note que nove dessas integrinas presentes em células endoteliais possuem a subunidade β_1 , demonstrando sua importância para os processos que as integrinas medeiam nesse tipo celular.

Através de imunomarcagem com uso de anticorpo contra a subunidade β_1 das integrinas, observou-se o seu perfil de expressão destas tanto em células endoteliais não tratadas (Fig. 9C e 9D), quanto tratadas com as toxinas do veneno de *L. intermedia* (Fig. 9F). E pela sobreposição com a marcação típica para as toxinas do veneno (Fig. 9E), pode-se inferir sobre a interação do veneno com esses receptores (Fig. 9G). A imagem ampliada dessa co-localização (Fig. 9H) permite visualizar com clareza essa sobreposição, sendo que provavelmente o veneno não interage sobre

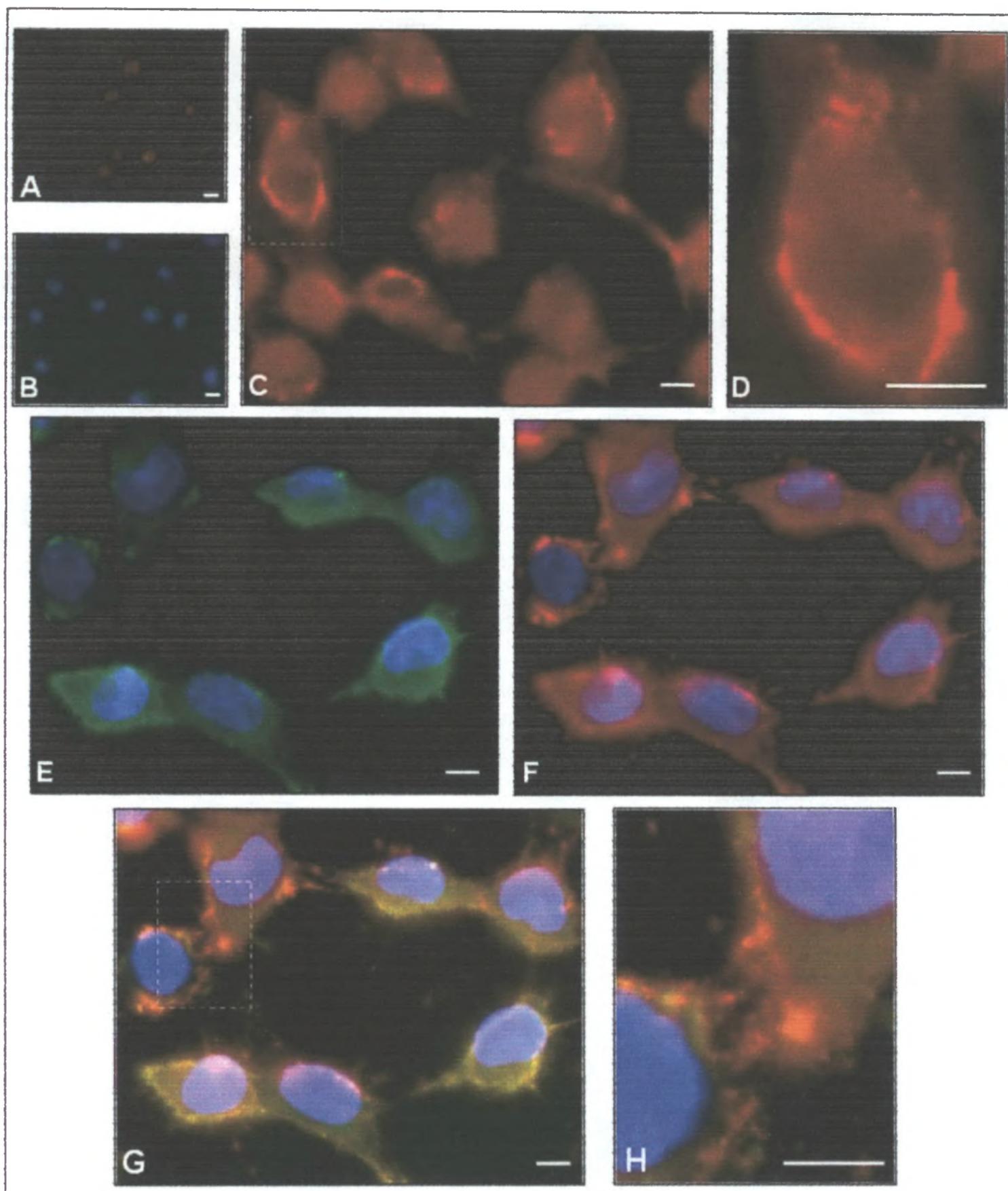


FIGURA 09- CO-LOCALIZAÇÃO DA LIGAÇÃO DO VENENO COM A SUBUNIDADE β_1 DAS INTEGRINAS PRESENTES EM CÉLULAS ENDOTELIAIS EM CULTURA

Células endoteliais após 4 dias de plaqueamento foram mantidas na ausência ou na presença do veneno de *Loxosceles intermedia* (40 μ g/uL) por 4 horas a 37°C, 5% de CO₂. Controles negativos: (A) células tratadas com veneno incubadas apenas com anticorpo secundário anti-IgG (que reconhece o anticorpo anti- β_1) conjugado com marcador fluorescente em vermelho. (B) células tratadas com veneno e incubadas apenas com anticorpo (secundário) anti-IgG de mouse (que reconhece o anticorpo para o veneno) conjugado com marcador fluorescente em verde. (C) marcação para a subunidade β_1 em células endoteliais não tratadas com o veneno (vermelho) e um célula em detalhe é visualizada em D. Em (E) marcação típica do veneno sobre a superfície da célula (verde). (F) marcação da subunidade β_1 em células tratadas com veneno. (G) a co-localização das marcações do veneno e da subunidade β_1 das integrinas. O núcleo foi corado em azul com DAPI. Imagens obtidas em microscopia de fluorescência. Barra = 10 μ m.

todas as integrinas, pois há nítida região de β_1 (marcação vermelha) sem nenhuma co-localização.

Quando imunomarcou-se as subunidades β_1 das integrinas em células endoteliais por citometria de fluxo, percebe-se um deslocamento da marcação para a esquerda quando comparam-se as células controle e as células tratadas (Fig. 10). Tal resultado pode estar indicando uma ação do veneno de *L. intermedia* sobre essas subunidades dos receptores integrínicos.

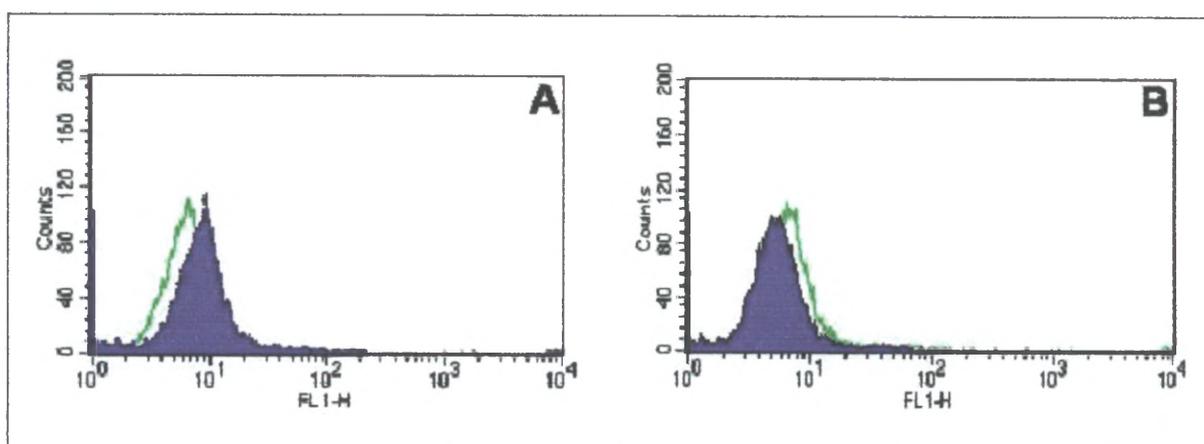


FIGURA 10- AVALIAÇÃO DA CO-LOCALIZAÇÃO DA LIGAÇÃO DO VENENO DE *L. intermedia* COM SUBUNIDADE β_1 POR CITOMETRIA DE FLUXO.

Células endoteliais em suspensão (1×10^6 células/mL) foram mantidas na ausência e na presença do veneno ($40 \mu\text{g/mL}$) por 4 horas a 37°C sob agitação branda e após o período de incubação, foram marcadas com anticorpos que reconhecem a subunidade β_1 de integrinas. (A) o histograma verde representa a intensidade de fluorescência das células endoteliais sem o tratamento com o veneno e incubadas com anticorpos secundário que reconhecem o anticorpo anti- β_1 (controle secundário). O histograma roxo indica a intensidade de fluorescência das células endoteliais sem o tratamento com o veneno, imunomarcadas para a subunidade β_1 . As células marcadas representam 39%. (B) o histograma roxo indica a intensidade de fluorescência das células endoteliais tratadas com o veneno de *L. intermedia* marcadas para a subunidade β_1 . Podemos observar um deslocamento para a esquerda da marcação, sendo que as células imunomarcadas representam cerca de 7% do total.

Dentre os diferentes tipos de integrinas presentes em células endoteliais, a integrina $\alpha_5\beta_1$ é conhecida como o receptor de fibronectina. Embora outras integrinas também reconheçam fibronectina, sua expressão é ubíqua em múltiplos tipos celulares e sua interação com fibronectina permite inúmeros processos de dinâmicas celulares: a adesão e proliferação celular, a saída do ciclo celular, a morte ou a diferenciação (MILLIANO & LUXON, 2003).

De maneira semelhante a imunomarcção para a subunidade β_1 , quando utilizamos anticorpos que reconhecem a integrina específica $\alpha_5\beta_1$, observamos uma co-localização da marcação para as toxinas do veneno com esta integrina (Fig. 11G e em maior aumento Fig. 11H), indicando que o veneno de *L. intermedia* interage com esses receptores da superfície celular. Além disso, as imagens da marcação para a integrina em células controles (Fig 11C e 11D) e células tratadas (Fig 11F), confirmam, mais uma vez, as alterações morfológicas induzidas pelo veneno, com as células sofrendo retração citoplasmática e perda do espraiamento, indicando uma perda da adesão celular, cujas dinâmicas estão diretamente vinculada a este receptor.

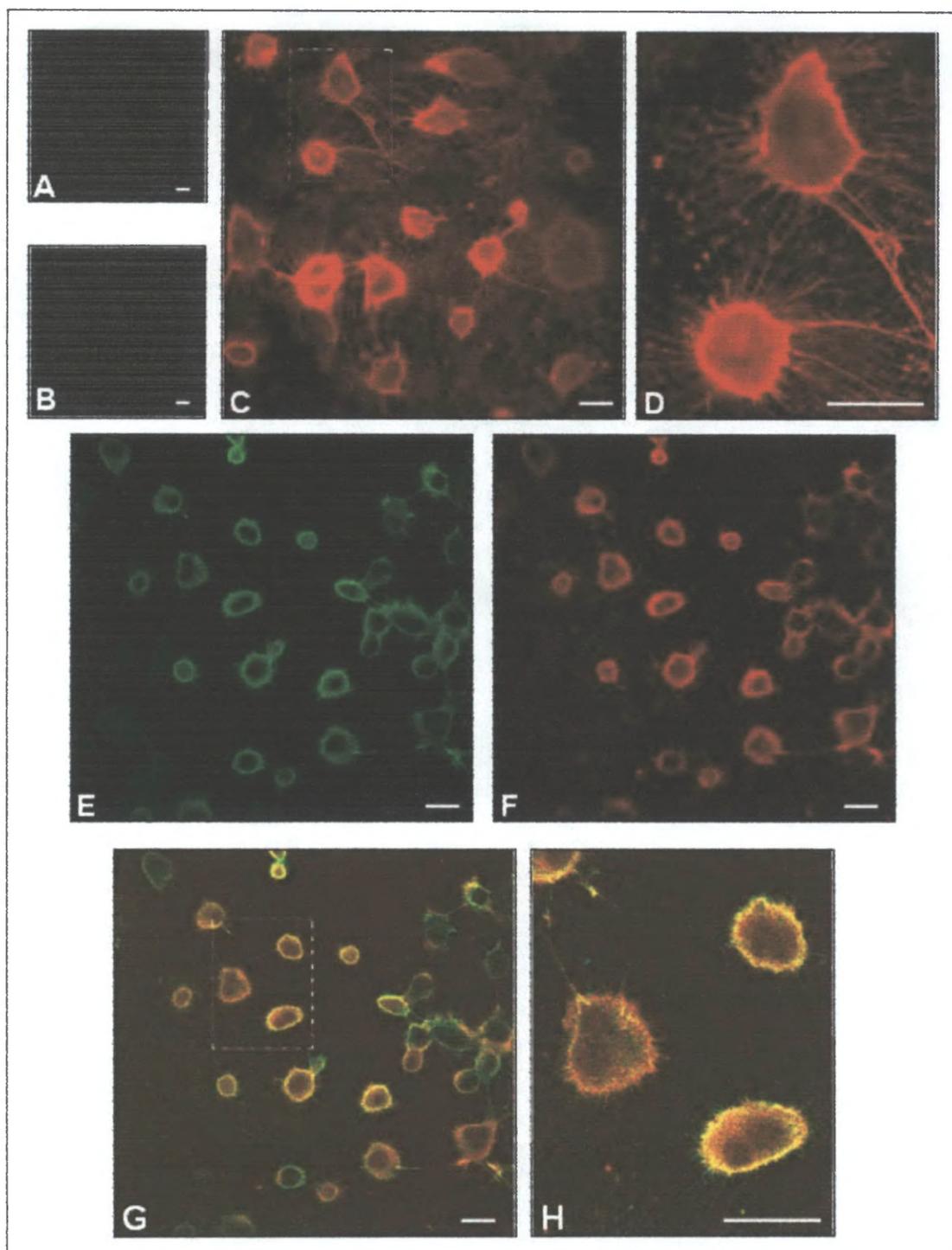


FIGURA 11. CO-LOCALIZAÇÃO DAS TOXINAS DO VENENO COM A INTEGRINA $\alpha 5\beta 1$ PRESENTE EM CÉLULAS ENDOTELIAIS EM CULTURA. Células endoteliais com 4 dias de plaqueamento foram mantidas na ausência e na presença do veneno de *L. intermedia* (40ug/mL) por 4 horas a 37°C, 5% de CO₂. Controles negativos: (A) células tratadas com veneno incubadas apenas com anticorpo IgG anti-goat que reconhece o anticorpo anti $\alpha 5\beta 1$. (B) células tratadas com veneno incubadas apenas com anticorpo IgG anti-mouse que reconhece o anticorpo para o veneno. Em (C) e (D) o padrão de marcação para a integrina $\alpha 5\beta 1$ em células endoteliais não tratadas com o veneno (vermelho). Em (E) marcação típica do veneno sobre a superfície da célula (verde). (F) marcação da integrina $\alpha 5\beta 1$ em células tratadas com veneno. (G) e (H) co-localização das marcações do veneno e da integrina $\alpha 5\beta 1$, evidenciada pela coloração amarela resultante da sobreposição das duas marcações individuais da integrina e do veneno. Imagens capturadas em microscópio confocal. Barra indica 10 μ m.

4.4. ALTERAÇÕES INDUZIDAS PELO VENENO DE *L. intermedia* SOBRE O PROCESSO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR.

Tradicionalmente, a determinação da proliferação celular é feita pela contagem de células viáveis após o tratamento com um corante vital. Métodos alternativos incluem a mensuração da incorporação de um radioisótopo, como a medição da síntese de DNA, contadores de células automáticos e outras técnicas para revelar corantes específicos e a atividade celular. Neste trabalho, foram empregados dois métodos distintos para o estudo da proliferação de células endoteliais: contagem automatizada (citometria de fluxo) e método baseado na metabolização do MTT.

A análise pela técnica de citometria de fluxo revelou que culturas de células endoteliais apresentam duas populações distintas (Fig. 12). Observando o tamanho celular e sua granulosidade, ou seja, a complexidade das organelas apresentada, pode-se distinguir à R3 como sendo uma população de células íntegras e à R2 uma população composta de fragmentos celulares. O tratamento por 48 horas apresenta um número maior de células porque essas tiveram um tempo maior para se multiplicar. Comparando os gráficos de tratamento por 24 horas, para células controle (Fig. 12A) e para células tratadas com veneno (Fig. 12C), não foi encontrada uma diferença significativa aparente na localização das células dentro das duas populações, porém ao analisar o número de eventos encontrados antes e depois do tratamento após esse período (Tab. 2) obteve-se uma redução do número de células ($p < 0.05$), ou seja, uma diminuição na proliferação celular após a exposição ao veneno por 24 horas. Após 48 horas de tratamento, o número de eventos contados pelo citômetro teve um aumento significativo (Tab. 1), entretanto, a quase totalidade dos eventos encontra-se na população R2 (Figuras 12B para o controle e 12D para o tratado). Baseando-se no fato de que a população R2 é composta por fragmentos celulares, podemos sugerir que após 48 horas de tratamento o veneno observa-se morte celular.

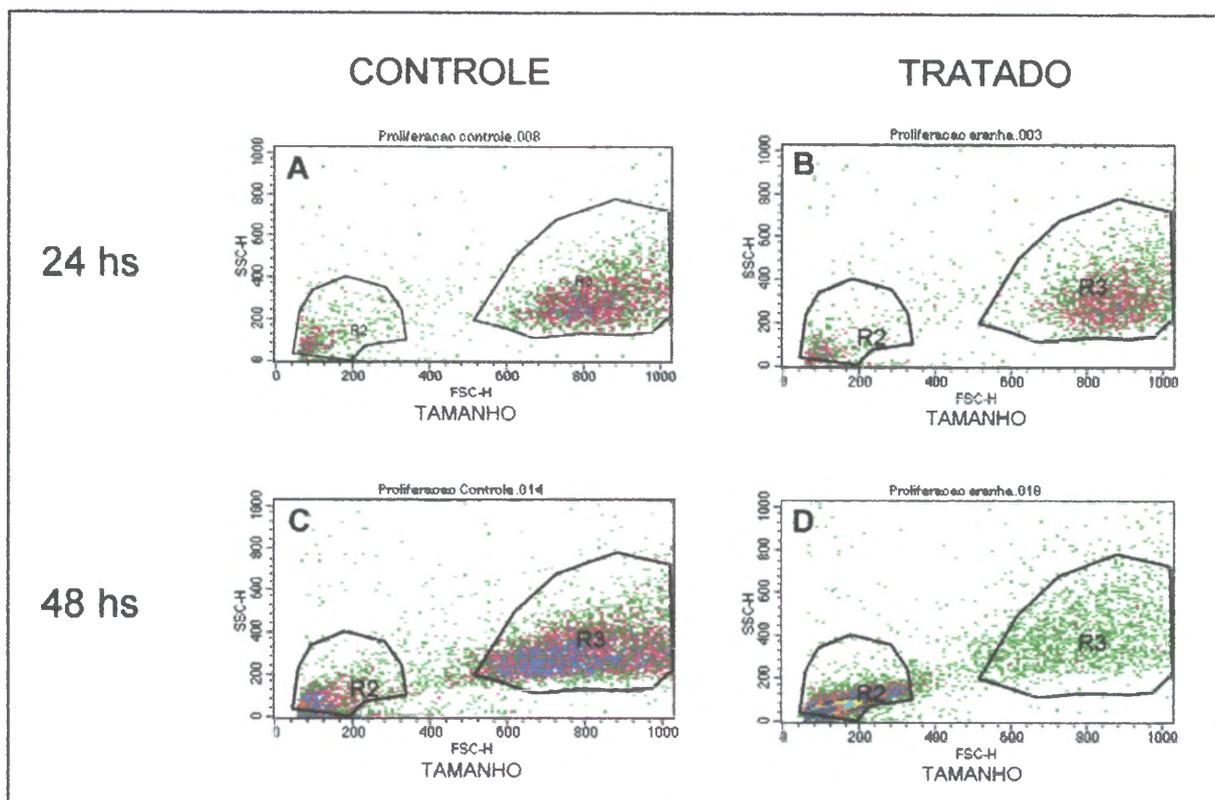


FIGURA 12- CELULAS ENDOTELIAIS TRATADAS COM VENENO DE *L. intermedia* E ANALISADAS POR TÉCNICA DE CITOMETRIA DE FLUXO. Culturas de células endoteliais apresentam duas populações distintas quando analisadas por citometria de fluxo. R3 representa uma população de células íntegras e R2 é composta de fragmentos celulares. Comparando a localização das células controle e tratadas nos seus respectivos tempos de tratamento, conclui-se que após 24 horas há uma discreta redução na proliferação celular e que após 48 horas o veneno pode induzir a morte celular, com grande aumento do número de fragmentos celulares dentro da população de R2. Gráficos representativos de três experimentos.

	Proliferação de células endoteliais por citometria de fluxo			Proliferação de células endoteliais por citometria de fluxo		
	24 horas			48 horas		
	Total	R2	R3	Total	R2	R3
Controle	3240	406	2366	7095	1161	5587
Tratado	2865	599	2227	57700	45176	1409

TABELA 02- PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS ENDOTELIAIS APÓS O TRATAMENTO COM VENENO DE *L. intermedia* POR 24 E 48 HORAS POR CITOMETRIA DE FLUXO. Após 24 horas o número total de eventos diminui significativamente ($p < 0,05$). Em 48 horas, há um aumento expressivo na população R2, que é representada por fragmentos celulares. Esse resultado mostra que 48 horas após de exposição do veneno, evidencia-se que a maioria das células estão mortas.

A análise da proliferação celular pelo método do MTT também foi realizada após o tratamento das células com o veneno da *L. intermedia* por 24 e 48 horas. A técnica do MTT mede a atividade das células viáveis através da atividade da desidrogenase mitocondrial. O componente chave é o 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil brometo tetrazolium ou MTT. O MTT solubilizado no meio de cultura têm uma cor amarelada. Porém, a desidrogenase mitocondrial das células viáveis cliva o anel de tetrazolium do composto, formando cristais púrpuras de formazam que são insolúveis em soluções aquosas e, portanto, são dissolvidos em isopropanol acidificado. A solução púrpura resultante é medida em espectrofotometro. Um aumento do número de células resulta num aumento da quantidade dos cristais de formazam formados e num aumento da absorbância. Após 24 horas de tratamento das células endoteliais com o veneno de *L. intermedia* (Fig. 13A), observou-se que a absorbância da cultura de células tratadas era metade em comparação com as células controle, indicando que o veneno causa uma redução na proliferação celular nesse período de tratamento. Esse dado confere com a redução observada no experimento de proliferação em citometro de fluxo. Após 48 horas de tratamento (Fig. 13B), observa-se da mesma maneira uma redução da proliferação das células porém de maneira menos acentuada. Todavia, esse resultado deve ser interpretado com cuidado, uma vez que no experimento utilizando citometria de fluxo houve o aparecimento de muitos fragmentos, em 48 horas, sugerindo morte celular. Além disso, o método do MTT tem algumas limitações influenciadas pelo estado fisiológico das células e pela variação da atividade da desidrogenase mitocondrial nos diferentes tipos celulares. Assim, se após 48 horas ocorre morte celular obtem-se um número menor de células para metabolização do MTT.

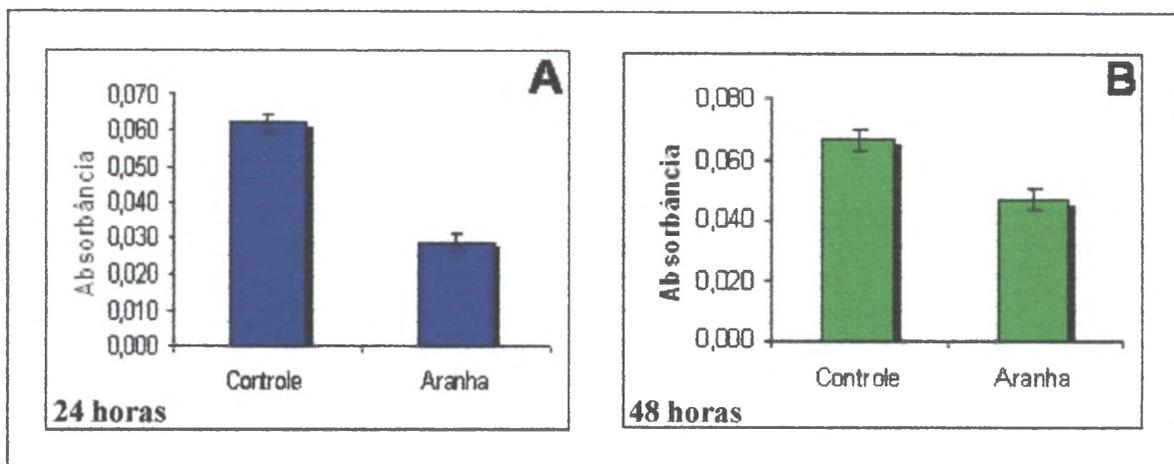


FIGURA 13 - EFEITO DO VENENO DE *L. intermedia* SOBRE A PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS ENDOTELIAIS BASEADO NO MÉTODO DO MTT. No gráfico (A), as células endoteliais foram tratadas por 24 horas com o veneno de *L. intermedia*. Observa-se que as células endoteliais tratadas apresentam metade da absorbância das não tratadas, indicando que o veneno causa uma diminuição na proliferação celular. No gráfico (B), as células foram tratadas por 48 horas mostrando assim como o gráfico de 24 horas que o veneno reduz a proliferação celular todavia, de maneira menos acentuada.

4.5. ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DAS CÉLULAS ENDOTELIAIS TRATADAS COM VENENO DE *L. intermedia*

Células endoteliais em cultura foram tratadas por 24 ou 48 horas com as toxinas do veneno de *L. intermedia*, numa concentração de 20µg/mL. Optou-se por trabalhar com uma menor concentração que a inoculada (40µg/mL), tanto nesse ensaio, quanto no da proliferação, para poder avaliar os efeitos do veneno por um período de tempo mais longo de exposição.

Após 24 horas de exposição às toxinas presentes no veneno, observa-se que as células apresentam morfologia bastante alterada, todavia, ainda permanecem aderidas ao substrato (dados não mostrados). Já após 48 horas de tratamento, aproximadamente mais da metade das células perderam o contato com o substrato. Foi possível observar que estas células apresentam um citoplasma com aspecto de corpos vesiculares (bolhoso), o que nos levou a investigar qual seria a origem destes, empregando para tanto análise ultraestrutural por Microscopia Eletrônica de Transmissão.

Com as análises ultraestruturais, pode-se observar a morfologia típica de células endoteliais nos grupos controles, isto é, sem tratamento com o veneno (Fig. 14). Nesta condição, as células têm aspecto alongado (Fig.14A), refletindo sua aderência ao substrato. O núcleo apresenta-se oval acompanhando a morfologia celular. Apresenta-se muito ativo com predomínio de eucromatina e nucléolo grande e bem evidente. Observa-se pouca heterocromatina e quando presente, é visualizada junto ao envoltório nuclear (Fig. 14B). Há presença de característicos poros nucleares e complexos de Golgi bem desenvolvido, organizado em pilhas (Fig. 14C e D). O citoplasma apresenta corpos elétrondensos semelhantes a lisossomos (Fig. 14C), retículo endoplasmático bem desenvolvido, mitocôndrias (Fig. 14E) e vesículas pinocíticas ao longo de toda a membrana plasmática (Fig. 14F). Essa é uma dinâmica típica dessa linhagem celular, visto sua localização e função na formação do endotélio dos vasos, onde ela transporta ativamente solutos de um lado a outro da sua membrana.

Nas células expostas ao veneno por 24 horas podemos observar, nas imagens da Figura 15, nítidas alterações na ultraestrutura da célula. Após esta exposição, as células perdem parte da adesividade ao substrato, como conseqüência, há uma

efetiva redução do corpo celular, onde as células assumem uma morfologia menor e arredondada (Fig. 15A). Ainda nessa imagem, podemos evidenciar característicos corpos vesiculares, projeções membranares semelhantes a "blebs". Tais estruturas, quando em maior magnitude (Fig. 15F), demonstram em seu interior restos celulares, formados por material elétron-denso e membranas celulares. Possivelmente, essas estruturas são decorrentes do sofrimento celular após exposição a estas toxinas, com as células excretando seus conteúdos citoplasmáticos, estratégia empregada por células que morrem pelo mecanismo de necrose. Podemos ainda observar que o contorno do núcleo celular assume bordos irregulares com inúmeras reentrâncias. Neste, observa-se predomínio de eucromatina e nucléolo bem evidente (Fig. 15B). As imagens 15C, 15D, 15E e 15F evidenciam depósitos elétron-densos no citoplasma celular. O complexo de Golgi apresenta-se com arquitetura típica (Fig. 15C). Na figura 15E, observam-se mitocôndrias sem integridade ultraestrutural e é possível, na figura 15F, notar que estas estão envolvidas por membranas, mecanismo este semelhante ao processo autofágico desenvolvido pelas membranas do retículo endoplasmático. Há ainda poucos, mas amplos, corpos vacuolares no citoplasma destas células (Fig. 15E).

Após o tratamento por 48 horas na presença das toxinas do veneno loxoscélico, as células endoteliais apresentam alterações ainda mais pronunciadas. Estas apresentam-se menores e há sobre a superfície celular característicos corpos vesiculares e projeções globulares ao redor de toda a superfície celular. Ainda é possível observar células com núcleo picnótico, evidenciando morte celular (Fig. 16A). Todavia, há células que mesmo após 48 horas de exposição ao veneno apresentam apenas o núcleo com contornos irregulares, mantendo-se com predomínio de eucromatina e nucléolo bem evidente (Fig. 16B). Após este período de exposição, o que mais chama atenção é o aumento de corpos elétron-densos semelhantes a lisossomos (Fig. 16C e E). O citoplasma apresenta inúmeros espaços vacuolares (Fig. 16D) e o complexo de Golgi mantém-se ultraestruturalmente preservado (Fig. 16F).

FIGURA 14. ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DAS CÉLULAS ENDOTELIAIS NÃO EXPOSTAS AO VENENO DE *L. intermedia*

Células endoteliais foram mantidas em cultura até atingirem a confluência e então, foram submetidas ao processamento para microscopia eletrônica de transmissão, conforme descrito em Métodos. (A) imagem panorâmica das células. (B) detalhe do núcleo, com destaque para o nucléolo. (C) detalhe do citoplasma dessa célula, mostrando sua organização ultraestrutural. Setas pretas vazadas indicam organelas semelhantes a lisossomos; seta branca cheia poro nuclear. (D) detalhe do complexo de Golgi. (E) duas mitocôndrias com cristas mitocôndrias bem organizadas e retículo endoplasmático rugoso bem evidente, sendo possível observar os ribossomos. (F) detalhe da região próxima a membrana celular, com as setas indicando vesículas de micropinocitose. (N) núcleo celular; (Nu) nucléolo; (Ht) heterocromatina; (Cg) complexo de Golgi; (Re) retículo endoplasmático; (Mt) mitocôndrias;

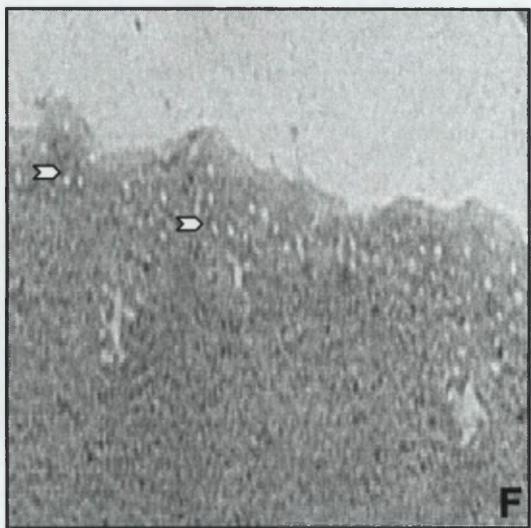
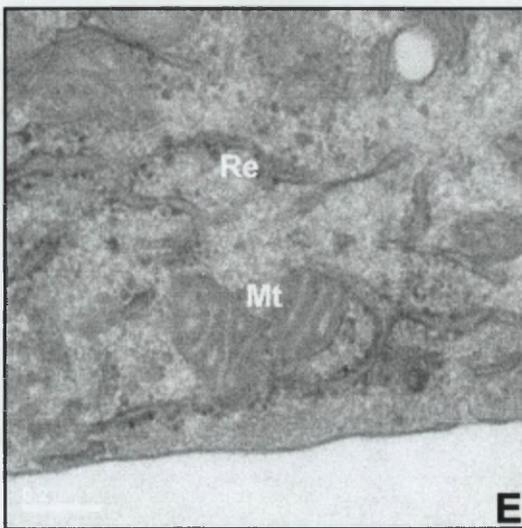
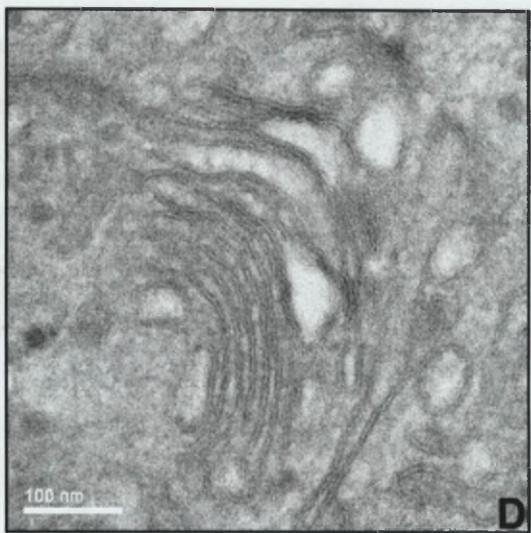
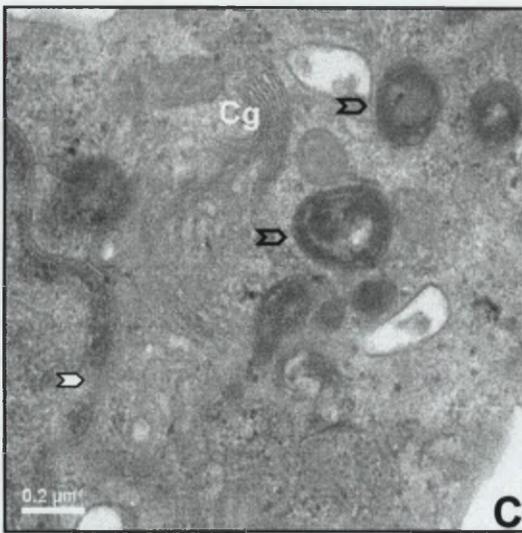
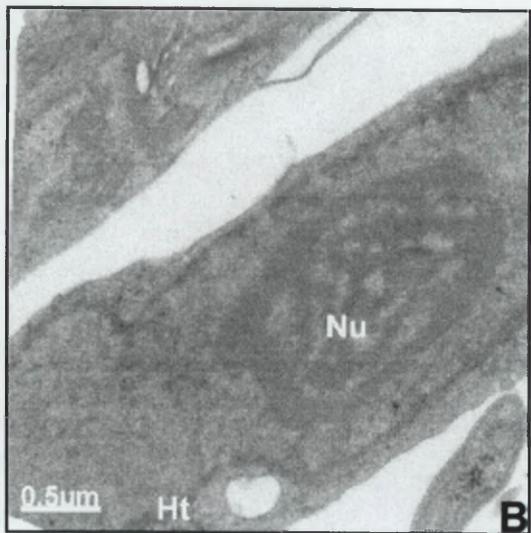
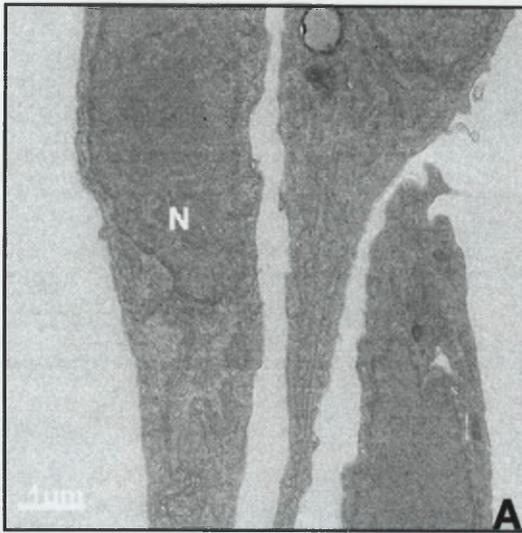


FIGURA 15. ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DE CÉLULAS ENDOTELAIS TRATADAS POR 24 HORAS COM VENENO DE *L. intermedia*.

Células endotélias foram mantidas em cultura até atingirem a confluência e então, foram expostas ao veneno de *L. intermedia* por 24 horas. (A) imagem panorâmica das células, mostrando profunda alteração morfológica. (B) detalhe do núcleo, com destaque para o nucléolo. Setas indicam reentrâncias na membrana nuclear (C) detalhe do complexo de Golgi alterado e a presença de três corpos multivesiculares, estruturas comuns nas células tratadas, espalhados por todo o citoplasma. (D) evidência de material eletrondenso acumulado por todo o citoplasma da célula (E) grande vesícula formada no interior do citoplasma (F) detalhe da região próxima à membrana celular, com destaque para vesículas que as células parecem estar lançando para fora, contendo material celular. Note também algumas mitocôndrias com as cristas mitocôndrias desorganizadas. (N) núcleo celular; (Nu) nucléolo; (Cg) complexo de Golgi; (Mt) mitocôndrias; (V) vacúolo.

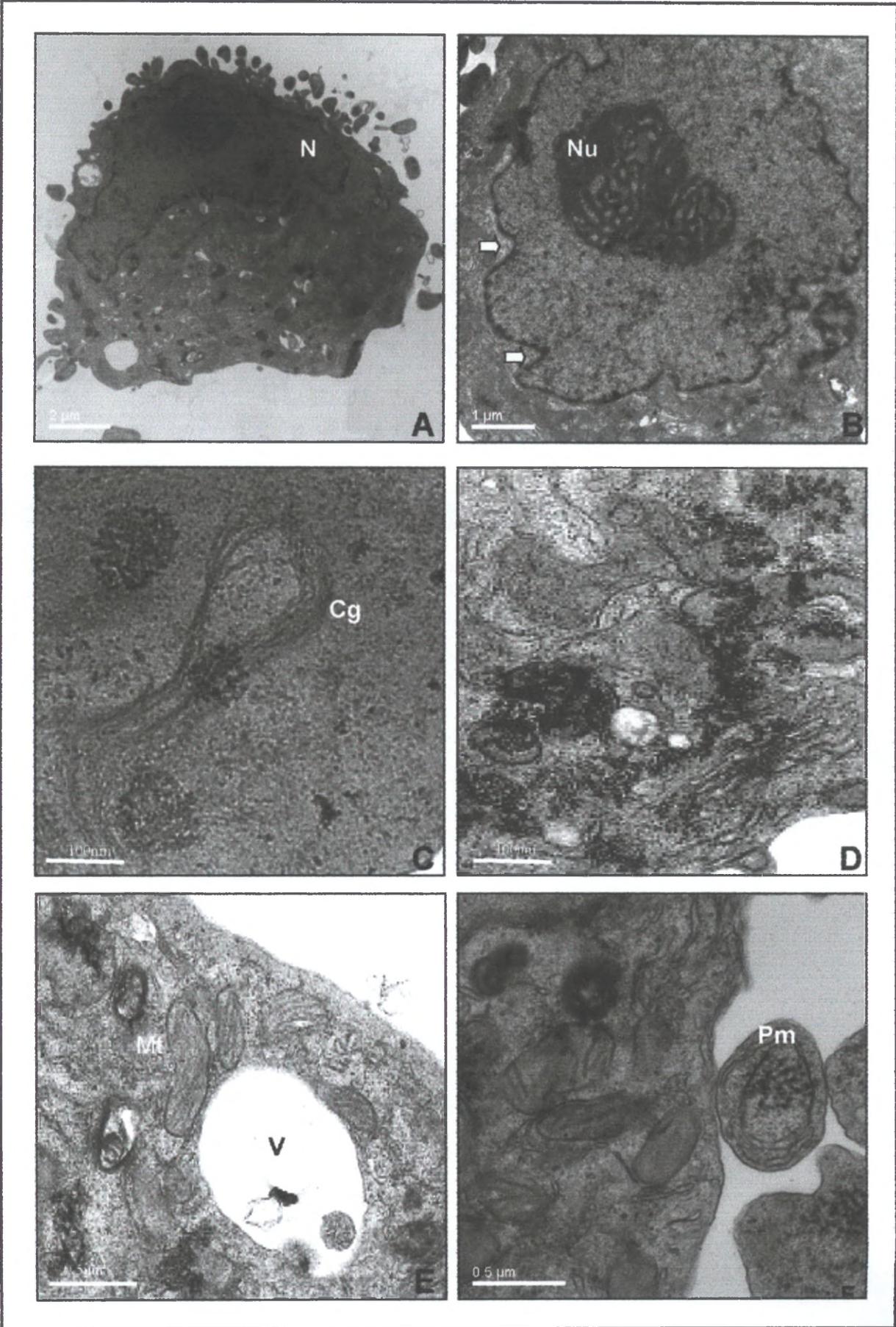
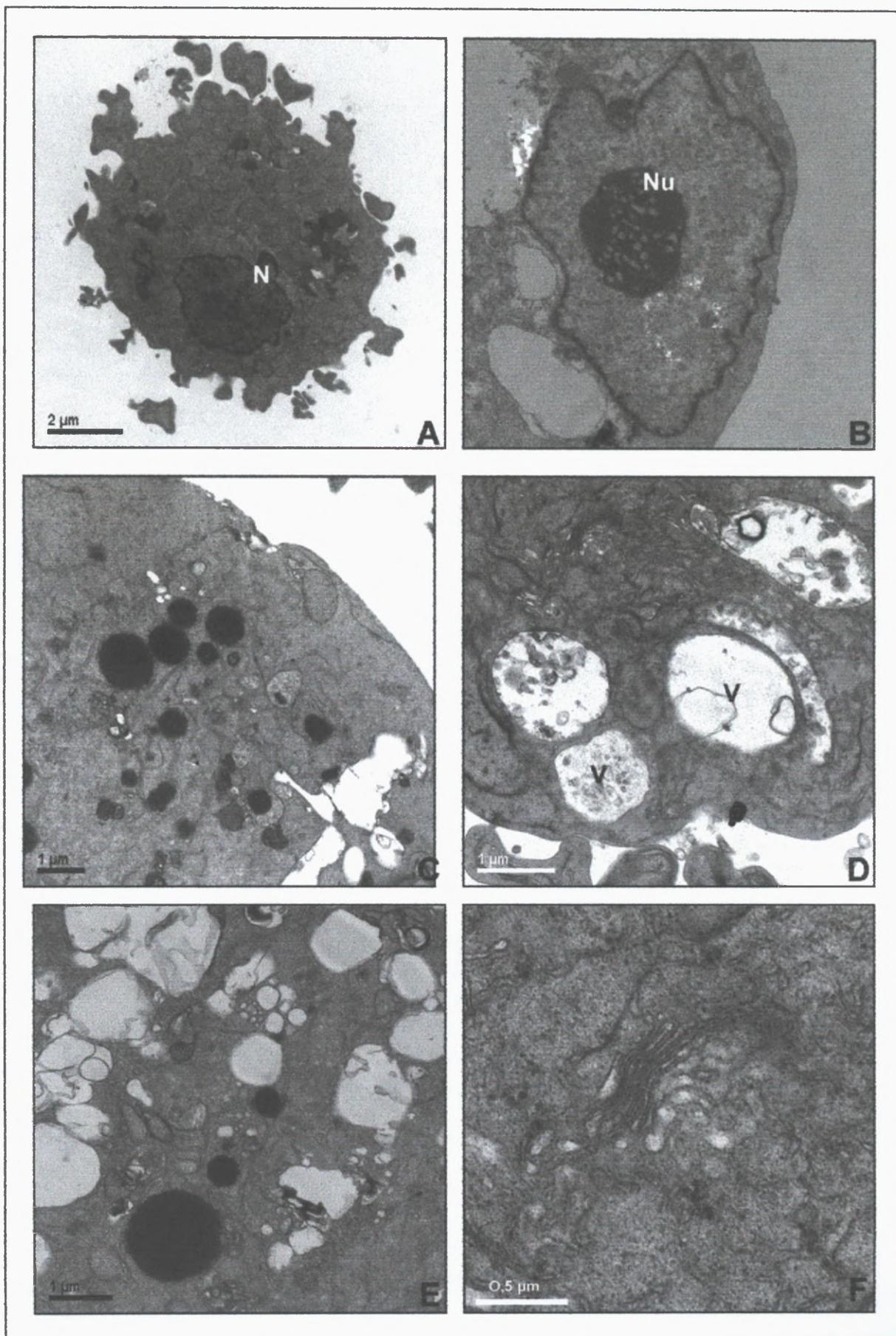


FIGURA 16. ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DE CÉLULAS ENDOTELAIS TRATADAS POR 48 HORAS COM VENENO DE *L. intermedia*.

Células endotéliais foram mantidas em cultura até a confluência e então, foram incubadas veneno de *L. intermedia* por 48 horas. (A) imagem panorâmica das células, mostrando alteração morfológica ainda mais pronunciada. (B) detalhe do núcleo, com destaque para o nucléolo (C) detalhe do citoplasma, mostrando aumento da presença de lisossomos (D) e (E) detalhe das grandes vesículas formadas no interior do citoplasma das células (F) detalhe do complexo de Golgi. (N) núcleo; (Nu) nucléolo; (V) vacúolos.



4.6. COLORAÇÃO VITAL DAS CÉLULAS ENDOTELIAIS COM LARANJA DE ACRIDINA NA AUSÊNCIA ou NA PRESENÇA DO VENENO DE *L. intermedia*

A coloração vital com laranja de acridina baseia-se na interação do corante tanto com o DNA quanto com compartimentos ácidos (endossomos e lisossomos) e RNA citoplasmáticos. Trata-se de um corante fluorescente que atravessa facilmente as membranas biológicas. Ao intercalar-se com o DNA, o corante emite fluorescência verde, quando excitado em azul. Por possuir propriedades básicas, ele é acumulado nos lisossomos que, devido à presença de bombas de prótons dependentes de ATP, apresentam um pH baixo em seu interior. Uma vez dentro do compartimento, o corante é protonado e fica aprisionado na organela, sendo a fluorescência vermelha emitida em reflexo do menor pH. Quanto a sua interação com o RNA, ela se deve ao fato do RNA (em células em crescimento que estão sintetizando proteínas) ser responsável pela propriedade basófila do citoplasma, que permite a esse ser corado com corantes básicos como o laranja de acridina através de uma interação eletrostática. A emissão de fluorescência verde ou vermelha pelo laranja de acridina promove uma boa estimativa do conteúdo celular de DNA e de RNA, sendo, também, um método útil para detectar gradientes intracelulares de pH.

Na figura 17 estão as imagens obtidas para as células endoteliais tratadas com veneno (20µg/mL) por 3, 6, 24 e 48 horas, e expostas para o corante vital – laranja de acridina. Como esperando, nos grupos controles não observamos nenhuma alteração (Fig.17A-D). Para os grupos tratados, é possível observar alterações evidentes, desde 24 horas de tratamento, onde a retração citoplasmática é bastante acentuada, uma vez que praticamente não é mais possível observarmos a marcação vermelha nas células. Após 48 horas de tratamento podemos observar sinais de morte celular tais como a redução citoplasmática e a condensação da cromatina.

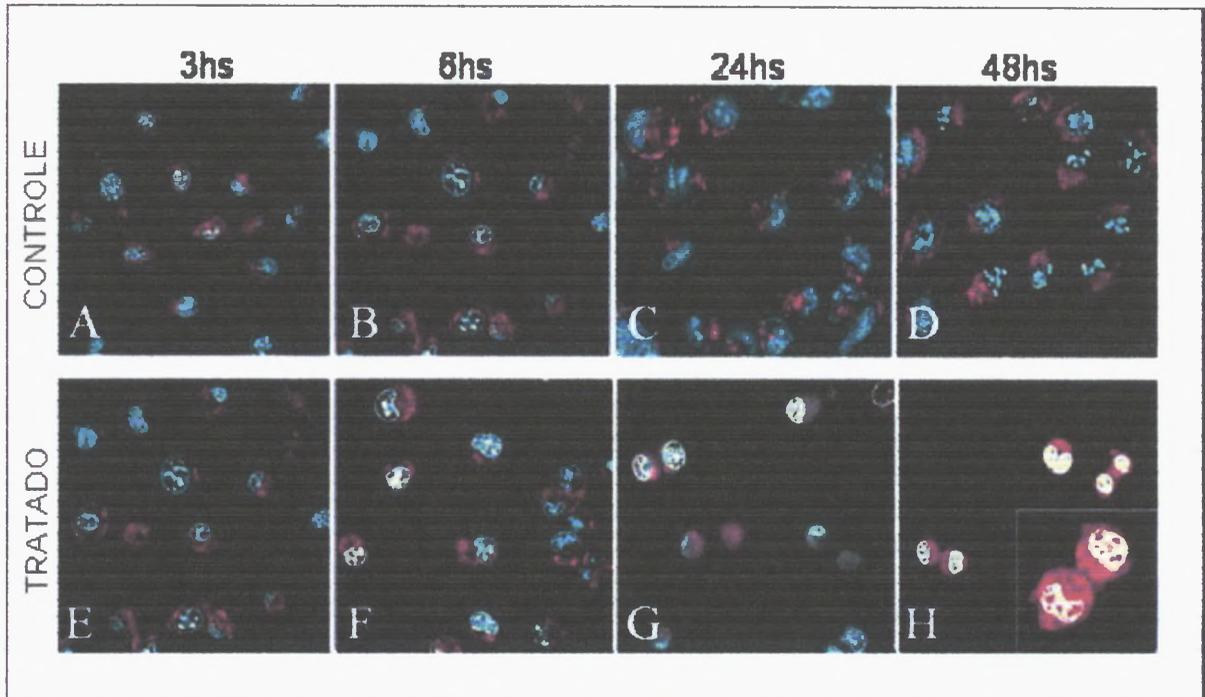


FIGURA 17. COLORAÇÃO VITAL DE CÉLULAS ENDOTELIAIS COM LARANJA DE ACRIDINA. (A-D) representam células endoteliais incubadas com meio F12 durante 3, 6, 24 e 48 horas, respectivamente. (E-H) representam células endoteliais em cultura tratadas com veneno de *L. intermedia* (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$), também durante 3, 6, 24 e 48 horas respectivamente. Nas células consideradas como controles, não foi observado nenhuma alteração. Contudo, nas células tratadas por 48 horas pode-se observar sinais de morte celular, tais como condensação da cromatina e contração do citoplasma (H).

4.7. CO-LOCALIZAÇÃO DAS TOXINAS DO VENENO DE *L. intermedia* COM OS LISOSSOMOS DE CÉLULAS ENDOTELIAIS.

O composto LysoTracker é acidotrópico e por isso é empregado para marcar organelas ácidas em células vivas. A molécula consiste de 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.

Após 4 horas de tratamento com as toxinas do veneno de *L. intermedia* pode-se visualizar uma co-localização da marcação do veneno com os lisossomos das células endoteliais marcados pelo LysoTracker (Fig 18). Comparando as imagens da marcação para o veneno com a marcação para os lisossomos, observa-se que nem todos os lisossomos co-localizam com a marcação do veneno (Fig. 18C e D), contudo isso pode refletir no tempo de incubação do veneno.

Com base nesse resultado podemos sugerir que alguma(s) das toxinas que compõe o veneno podem estar sendo endocitadas pela célula endotelial. Essa é a primeira evidência na literatura de que pode ocorrer endocitose das toxinas do veneno por linhagens celulares.

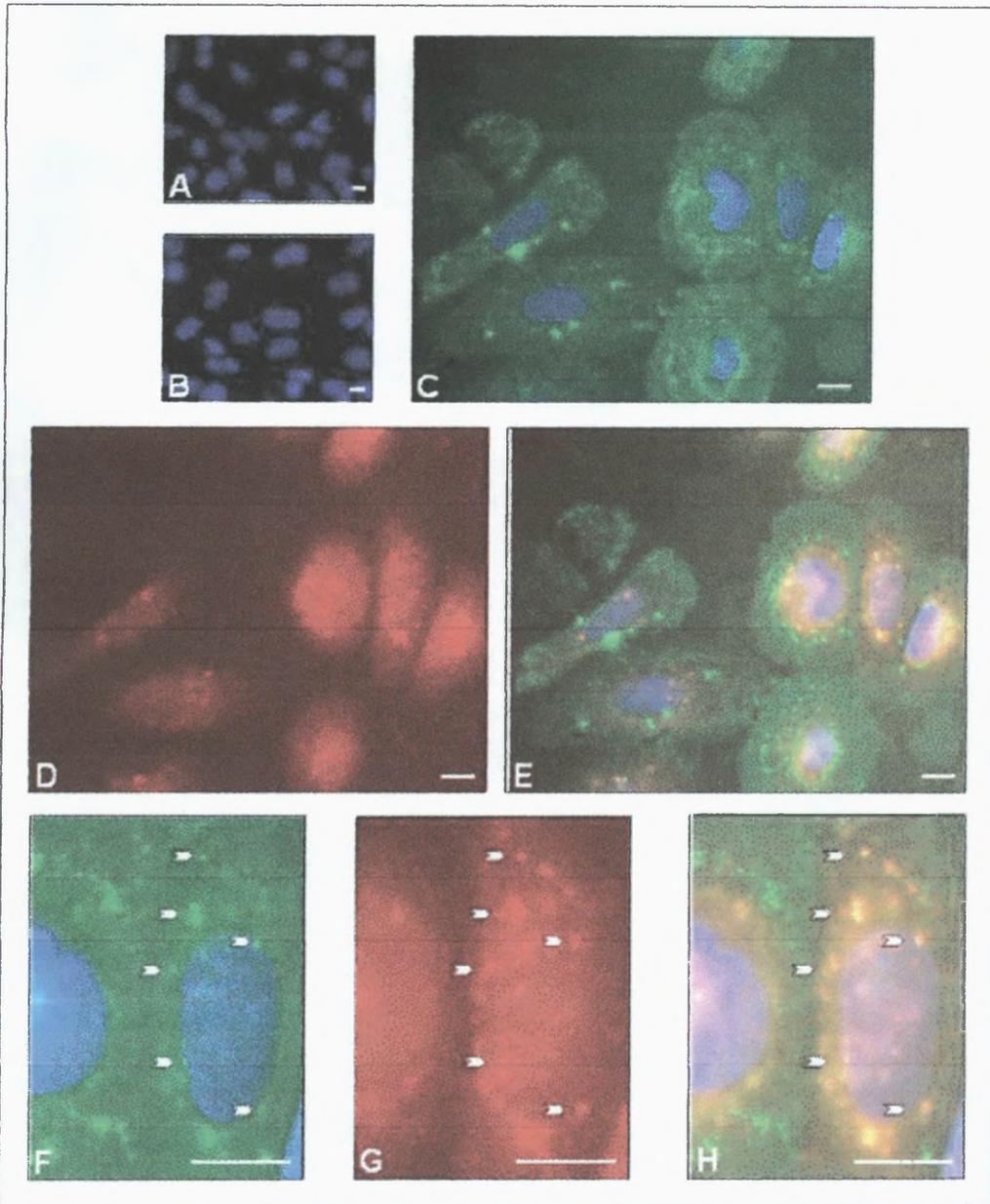


FIGURA 18 - CO-LOCALIZAÇÃO DAS TOXINAS DO VENENO COM LISOSSOMOS DAS CÉLULAS ENDOTELIAIS. Células endoteliais foram expostas ao veneno ($40\mu\text{g/ml}$) por 24 horas. Na última hora restante da incubação, foram expostas simultaneamente com LysoTracker Red (500nM). Após o período de incubação, as células foram processadas para a detecção da ligação do veneno, conforme descrito em Métodos e então foram visualizadas em microscopia de fluorescência. Em (A) células tratadas com veneno e incubadas apenas com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo (que reconhece o anticorpo para as toxinas do veneno) conjugado com marcador fluorescente em verde. (B) Células não tratadas com o veneno, mas incubadas com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo (que reconhece o anticorpo para as toxinas do veneno) conjugado com marcador fluorescente em verde. Em (C) o padrão de distribuição da marcação das toxinas do veneno sobre a célula (em verde), demonstrando sua distribuição sobre a superfície celular e sua internalização, evidenciada pela co-localização (E) com lisossomos marcados pelo LysoTracker (D) (em vermelho). Em (F), (G) e (H) imagens ampliadas; as setas indicam co-localização. O núcleo foi corado em azul com DAPI. Barra = $10\mu\text{m}$.

5. DISCUSSÃO

As conseqüências hemorrágicas observadas após o envenenamento com aranhas do gênero *Loxosceles spp.* parecem ser molecularmente complexas. Problemas hemostáticos induzidos pelas toxinas do veneno loxoscélico como desordens na agregação plaquetária, coagulação vascular disseminada, e hemorragia na derme, podem ser associados com a presença dessas toxinas alterando a integridade da parede dos vasos, especialmente no nível das células endoteliais e da matriz subendotelial (VEIGA *et al.*, 2001a).

PALUDO *et al.* (2006) demonstraram que alterações envolvendo a degeneração na parede dos vasos sangüíneos observados após acidentes envolvendo *L. intermedia* resultam não apenas ao efeito degradativo do veneno sobre moléculas da matriz extracelular ou da massiva infiltração leucocitária, mas também de uma atividade direta e primária das toxinas sobre as células endoteliais.

No presente trabalho, demonstramos evidências adicionais da ação deletéria direta do veneno de aranha marrom sobre células endoteliais em cultura em um sistema livre de leucócitos.

Quanto à interação das toxinas do veneno de *L. intermedia* sobre a superfície das células endoteliais, PALUDO *et al.* (2006) as detectaram como "planted antigens", isto é, depositados sobre a superfície celular e sobre a matriz extracelular subendotelial. Baseados nos nossos resultados podemos inferir que essa ligação possui uma especificidade independente de cargas, visto que a incubação tanto das células com o veneno, na presença da heparina, um glicosaminoglicano altamente negativo, não foi capaz de deslocar a ligação do veneno à superfície da célula (Fig. 5 e 6). Tal ensaio foi realizado uma vez que a heparina é um polissacarídeo altamente sulfatado, razão pela qual é uma molécula com carga negativa (NADER *et al.*, 2001), e por outro lado, o veneno é composto por diferentes proteínas com carga líquida positiva (SILVA, *et al.* 2004), o que poderia induzir interação entre estes dois compostos. De fato, em ensaios "in vitro" (Fig. 4) as toxinas presentes no veneno, são capazes de interagir com esse polissacarídeo. No entanto, não foi observada nenhuma perturbação da ligação do veneno com a superfície celular.

Através da co-localização da marcação para o veneno, com a ligação da Lectina WGA, foi possível demonstrar que o veneno interage especificamente com a

superfície celular, especialmente com os carboidratos, nos quais podemos incluir glicoproteínas, glicolipídeos, proteoglicanos e glicosaminoglicanos (Fig. 7). Essas e outras moléculas formam o glicocálix, um revestimento da superfície celular carregado negativamente que contribui em todas as funções do endotélio, especialmente na permeabilidade, limitando a passagem de macromoléculas (MEHTA & MALIK, 2006). Pelo ensaio em citometria de fluxo onde revelamos a marcação para lectina em células na ausência e na presença das toxinas do veneno, percebemos uma redução na expressão desses polissacarídeos de superfície celular nas células tratadas com o veneno (Fig. 8). Esse ensaio pode estar relacionado com os dados na literatura, os quais demonstram que dentre as toxinas que compõem o veneno loxoscélico estão hialuronidases, que degradam o ácido hialurônico e resíduos do proteoglicano de condroitim sulfato (SILVA *et al.*, 2004). Além disso, o veneno é capaz de clivar o proteoglicano de heparam sulfato de células endoteliais (VEIGA *et al.*, 2001a). Entretanto, não sabemos se o veneno é capaz de degradar ainda outros polissacarídeos que compõem a superfície celular.

Também através de imunomarcação verificamos que o veneno de *L. intermedia* interage com receptores integrínicos da superfície celular, em especial aqueles formados pela subunidade β_1 (Fig. 9) e com o receptor específico, a integrina $\alpha_5\beta_1$ (Fig. 11). Através da análise de citometria de fluxo para a marcação da subunidade β_1 das células endoteliais podemos demonstrar que o veneno de *L. intermedia* apresenta ação sobre esses receptores, fazendo com que células expostas ao veneno diminuam significativamente sua expressão (Fig. 10).

Como anteriormente descrito esses receptores de superfície são importantes mediadores de vários processos celulares, incluindo a adesão celular dentre outras dinâmicas. Como previamente discutido, a subunidade β_1 está presente em nove tipos de integrinas diferentes nas células endoteliais e esses receptores medeiam a interação dessa célula com várias moléculas, dentre elas colágenos, laminina, vitronectina e fibronectina (RÜEGG *et al.*, 2004). Em especial a integrina $\alpha_5\beta_1$ interage especificamente com a fibronectina, e várias alterações provocadas pelo veneno loxoscélico envolvendo essa glicoproteína têm sido descritas. FEITOSA *et al.* (1998) demonstraram que o veneno possui metaloproteínases capazes de clivar essa molécula em solução e PALUDO *et al.* (2006) demonstraram que o veneno

degrada a fibronectina sintetizada pela própria célula endotelial *in vivo*. Esses autores também verificaram que a adesão das células sobre a fibronectina foi significativamente inibida quando essas foram diretamente expostas ao veneno.

Ainda,

VEIGA *et al.* (2001a) demonstraram que células endoteliais tratadas com o veneno por até 18 horas, embora desadesidas do substrato, permanecem viáveis, sendo capazes de restabelecer suas características normais, quando colocadas para aderir novamente, na ausência do veneno. Estudando o mecanismo de proliferação celular, observamos que, após a exposição ao veneno por 24 horas, é observado uma redução na proliferação das células endoteliais. Ainda, a ação deste sobre as células por 48 horas, demonstra que é capaz de induzir a morte celular. (Fig. 12 e 13). Esta é a primeira evidência das lesões induzidas pelo veneno após uma exposição prolongada.

Evidência adicional de que o veneno leva a morte celular foi observada nos ensaios com coloração vital com laranja de acridina (Fig. 17), onde observa-se que nas células tratadas por 48 horas, é evidente os sinais de morte celular como a condensação da cromatina e a retração citoplasmática.

Estes resultados não demonstram por qual mecanismo as células endoteliais estão sendo induzidas à morte, todavia podemos inferir que está associado aos efeitos do veneno sobre a desadesão das células ao substrato, visto que após 48 horas de tratamento com o veneno as células estão, quase que em sua maioria, em suspensão. A adesão celular é importante para a promoção da sobrevivência, uma vez que, as células que perdem a sua adesividade estão condicionadas a morrer por desalojamento, processo denominado de "anoikis" (RÜEGG, *et al.*, 2004), sendo que o citoesqueleto desempenha um papel essencial para a manutenção desta dinâmica. Um colapso no citoesqueleto seguido de desadesão resulta em uma ruptura de padrões de sinalizações de sobrevivência conduzindo a morte celular (KULMS *et al.*, 2002). PALUDO *et al.* (2006) demonstraram que o tratamento por três horas com as toxinas do veneno já é capaz de provocar uma desorganização dos filamentos de actina das células endoteliais, todavia por esse período de tratamento as células permanecem viáveis.

A ação das toxinas do veneno de *L. intermedia* sobre células endoteliais em cultura tratadas por três horas conduz a alterações morfológicas incluindo retração

citoplasmática com reorganização dos processos laterais, perda da adesão célula - célula e da adesão ao substrato, que vai se tornando mais evidente com incubações mais longas com o veneno (PALUDO *et al.*, 2006). A ligação da lectina WGA após o tratamento com o veneno (Fig. 7) também nos permitiram afirmar acerca dessas alterações morfológicas. Além disso, a análise por microscopia eletrônica de transmissão nos permitiu descrever as alterações ultraestruturais induzidas pelas toxinas do veneno em células endoteliais expostas a tempos prolongados, 24 e 48 horas (Fig. 14, 15 e 16). As células expostas às toxinas do veneno por 24 horas apresentam inúmeros sinais de sofrimento celular, como invaginações na membrana nuclear e alterações nas estruturas de mitocôndrias. Além disso, o citoplasma destas células encontra-se bastante desorganizado, e é possível observar a presença de inúmeros corpos multivesiculares, deposições elétron-densas e o surgimento de algumas vesículas e corpos vacuolares. Após 48 horas de exposição ao veneno, o número de vesículas ao longo do citoplasma aumenta e a célula passa a apresentar grande quantidade de lisossomos. Um outro dado interessante, é que as células passam a apresentar projeções globulares em torno da sua membrana plasmática, as quais aparentam conter restos celulares, sugerindo que a célula está sofrendo autofagia e liberação por exocitose de seu conteúdo citoplasmático.

Processos de morte celular envolvendo alterações morfológicas, como comprometimento da arquitetura nuclear, evidenciado por contornos irregulares, núcleo picnótico com compactação da cromatina, são evidentes após a exposição às toxinas do veneno. Outra característica encontrada nas células expostas às toxinas do veneno é a presença de projeções membranares ("blebs") ao redor da superfície celular. Estes processos são descritos em vários mecanismos que induzem o sofrimento celular evoluindo para a morte (MAJANO, 1995 & KIMURA *et al.*, 2000). Estes são descritos como processos de autofagia de parte dos conteúdos celulares, com extrusão destes corpos vesiculares por mecanismo de exocitose. Pela técnica de laranja de acridina (Fig. 17) supõem-se que estes são compartimentos endossomais (compartimentos ácidos). A presença de vacúolos no interior de células em sofrimento também é descrito na literatura como indicativo de apoptose. Todavia, para se ter a real função, destes e do seu conteúdo, há a necessidade de uma investigação com técnicas mais específicas.

Através do ensaio de imunomarcção do veneno em células permeabilizadas, e sua co-localização com os lisossomos da célula (Fig. 18), podemos concluir que, além marção típica observada para as toxinas do veneno na superfície das células endoteliais, quando observado em células não permeabilizadas, ocorre também a sua internalização, evidente apenas quando as células são permeabilizadas e, desta forma sendo possível acessar o interior da célula para a devida revelação com o anticorpo secundário. Com base nesse resultado podemos sugerir que alguma(s) das toxinas que compõe o veneno pode(m) estar sendo internalizadas pelas células endoteliais. Essa é a primeira evidência de que ocorre endocitose das toxinas do veneno loxoscélico por linhagens celulares, as quais tem na sua via endocítica, a fusão com os lisossomos. Tal resultado sugere que a ação deletéria do veneno sobre as células endoteliais pode ser mediada tanto pela sua interação com a superfície celular, quanto pela sua internalização pelas células endoteliais.

6. CONCLUSÕES

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

- O glicosaminoglicano de Heparina não tem a capacidade de deslocar ou impedir a ligação das toxinas do veneno sobre a superfície celular da linhagem endotelial, embora aja uma interação das toxinas com esta biomolécula in vitro. Assim, a interação do veneno com a superfície celular pode ser considerada independente de cargas.
- As toxinas interagem especificamente com a superfície celular, evidenciado pela co-localização do veneno com a Lectina WGA, demonstrando a interação do veneno com carboidratos da superfície.
- Ainda, o veneno pode induzir uma lise destes componentes, uma vez que, é observada sua diminuição quando as células são incubadas com as toxinas do veneno.
- As toxinas do veneno de *L. intermedia* interagem com a subunidade β_1 dos receptores integrínicos de superfície celular.
- Através da citometria de fluxo, nota-se uma redução da expressão dessa subunidade integrínica sobre a superfície celular, indicando uma possível ação deletéria do veneno sobre esses receptores.
- Há também uma interação destas toxinas com o receptor integrínico específico para a molécula de fibronectina, a integrina $\alpha_5\beta_1$, uma molécula importante envolvida nos processos de adesão, migração e diferenciação celular.
- Ocorre uma diminuição da proliferação das células, quando são expostas ao veneno por 24 horas.
- Após 48 horas de exposição, a proliferação das células também é diminuída e possivelmente o veneno esteja induzindo a morte das células endoteliais de aorta de coelho em cultura.

- O ensaio com laranja de acridina com as células expostas por 48 horas na presença do veneno revelaram sinais de morte celular tais como condensação da cromatina e retração citoplasmática.
- A incubação da linhagem RAEC com as toxinas do veneno por 24 e 48 horas induz visíveis alterações ultraestruturais tais como: arredondamento da morfologia celular; alterações na morfologia nuclear e presença de núcleo picnótico; presença de corpos vesiculares e "blebs" na superfície celular, presença de corpos elétrondensos dispersos sobre os constituintes celulares; presença de grande compartimentos vacuolares e aumento no número de organelas semelhantes à lisossomos.
- Exposição às toxinas do veneno de *L. intermedia* induz o aumento de compartimentos ácidos.
- As toxinas do veneno podem estar sendo endocitadas pelas células RAEC, tendo seu destino em lisossomos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

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

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*, v.15, p.337-343, 1996.

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*, v.45, p. 547-560, 2005.

BRADFORD, M.A. A rapid sensitive method for the quantitations of microgram quantities of protein utilizing the principle of Protein-Dye-Binding. *Analytical biochemistry*, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRASIL, Ministério Da Saúde. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. *Fundação Nacional de Saúde*, Brasília, 1998.

CHAIM, O.M.; SADE, Y.B.; 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*, v.221, p. 64-77, 2006.

CHÁVEZ-OLÓRTEGUR, 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 envenomation by *Loxosceles intermedia* spider. *Toxicon*, v.36, p. 563-569, 1998.

CODDINGTON, J.A.; CHNZY, H.D.; JACKSON, C.L.; RATY, G.; GARDNER, K.C.H. The unique ribbon morphology of the major ampullate of spiders from the genus *Loxosceles* (recluse spider). *Biomacromolecules*, v.3.; p.3-8-, 2001,

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*, v.18, p.75-83, 1999.

DIETRICH, C. P.; DIETRICH, S. M. C. Eletrophoretic behaviour of acidic mucopolysaccharides in diamine buffers. *Analytical biochemistry*, v.70, p. 645-647, 1976.

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

ESKATI, F.M., NORMENT, B.R. Physiological action of *Loxosceles reclusa* (G&M) venom on insect larvae. *Toxicon*, v.14, p.7-17, 1976.

ETZLER, M.E. Plant lectins: molecular and biological aspects. *Annual Review Plant Physiology*, v.36, p.209-234, 1985.

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

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

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*, v.39, p.817-824, 2001.

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*, v.39, p. 1333-1342, 2001.

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

HYNES, R.O. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*, v.69, p. 11-25, 1992).

KENNEDY, J.F., PALVA, P.M.G., CORELLA, M.T.S., CAVALCANTI, M.S.M., COELHO, L.C.B.B. Lectins, versatile proteins of recognition: a review. *Carbohydrate Polymers*, v.26, n.3, p.219-230, 1995.

KIMURA, K.S.; SHIMOSEGAWA, T.; MOCHIZIKI, S.N. TOYOTA, T. Ultrastructure of cells undergoing apoptosis. *Vitamins and hormones*, v.58, p.257-266, 2000.

KULMS, D.; DUSSMANN, H.; POPPELMANN, B.; STANDER, S.; SCHWARZ, A; SCHWARZ, T. Apoptosis induced by disruption of the actin cytoskeleton is mediated via activation of CD95 (Fas/APO-1). *Cell death and differentiation*, v.9, p. 598-608, 2002.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T-4. *Nature*, v.277, p. 680-685, 1970.

LUCAS, S. Spiders in Brazil. *Toxicon*, v. 26, p.759-772, 1998.

LUCIANO, M.N.; SILVA, P.H.; CHAIM, O.M.; SANTOS, V.P.; FRANCO, C.R.C.; SOARES, M.F.S.; ZANATA, S.M.; MANGILI, O.; GREMSKI, O.C. VEIGA, S.S.

Experimental evidence for a direct cytotoxicity of *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom on renal tissue. **Journal of Histochemica**, 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**, 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. Proeome analysis of Brown spider venom: identification of loxnecrogin isoforms in *Loxosceles gaucho* venom. **Proteomics**, v.5., p.2167-2176, 2005.

MAJANO, G.J. Apoptosis, oncosis and necrosis. An overview of the cell death. **The American journal of pathology**, v.146, p.3-15, 1995.

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**, p. 44, 2002.

MEHTA, D. & MALIK, A . B. Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. **Physiological reviews**, v.86, p.279-367, 2006.

MILLIANO, M.T. & LUXON, B.A. Inicial signaling of the fibronectin receptor ($\alpha 5 \beta 1$ integrin) in hepatic stellate cells is independent of tyrosine phosphorylation. **Journal of Hepatology**, v.36, p. 32-37, 2003.

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 os *Loxosceles intermedia* (brown spider): enhancement of the dermonecrotic lesionn in loxoscelism. **Toxicon**, v.40, p. 409-418, 2002.

NADER, H.B.; PINHAL, M.A.S.; BAU, E.C.; CASTRO, R.A.B.; MEDEIROS, G.F.; CHAVANTE, S.F.; LEITE, E.L.; TRINDADE, E.S.; SHINJO, S.K.; ROCHA, H.A.O., TERSARLOL, I.L.S.; MENDES, A.; DIETRICH, C.P. Desenvolpente of new heparin-like compouns and other antithrombotic drugs and their interaction with vascular

endothelial cells. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 34, p. 699-709, 2001.

NICHOLSON, G.M. & GRAUDINS, A. Antivenoms for the treatment of spider envenomation. **Journal of toxicology. Toxin reviews**, v. 22, p.35-59, 2003.

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

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**, v.84, p.287-294, 2002.

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**, v.44, p. 844-853, 2006.

PIZZI, T.; ZACARIAS, J.;SCHENONE, E.H. Estudio histopatológico experimental en el envenenamiento por *Loxosceles laeta*. **Pathologica**, p.23-33, 1957.

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

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

RUPPERT, E.E. & BARNES, R.D. Zoologia dos invertebrados. Ed. Roca, São Paulo, 6ª ed., 1996

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

SANTOS, V.L.P.; FRANCO, C.R.C.; VIGGIANO, R.L.L.; SILVEIRA, R.B.; CANTÃO, M.P.; MANGILI, O.C.; VEIGA, S.S.; GREMSKI, W. Structural and ultrastructural description of the venom gland of *Loxosceles intermedia* (Brown spider). **Toxicon**, v.38, p.265-285, 2000.

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

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**, v. 92, p. 546–548, 1998.

SHOLLEY, M.M.; GIMBRONE, M.A.; COTRAN, R.S.; Cellular migration in endothelial regeneration—study using irradiated endothelial cultures. **Laboratory Investigation**, v. 36, p.18–25, 1977.

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

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**, v.88, p.1241-1253, 2006.

VEIGA, S.S.; GREMSKI, W.; 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**, v.37, p. 587-607, 1999.

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*, v. 32, p. 397-408, 2000a.

VEIGA, S.S.; SILVEIRA, R.B.; DREYFUSS, J.L.; HAOACH, J.; PEREIRA, A.M.; MANGILI, O.C.; GREMSKI, W. Identification of high molecular weight serine-proteases in *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. *Toxicon*, v. 38, p. 825-839, 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. *Trombosis Research*, 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*, v. 34, p.843-850, 2001b.

VETTER, R.S. & VISSHER, P.K. Bites and stings of medicallu important venomous arthropods. *Int Journal Drmatol*, v.37, 9.481-496, 1998.

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