

REGINALDO VIEIRA DE SENE

**RASTREAMENTO *IN VITRO* ATRAVÉS DE MÉTODOS BIOQUÍMICOS E BIOLÓGICOS
A APLICABILIDADE FARMACOLÓGICA E BIOTECNOLÓGICA DE DIFERENTES
POLISSACARÍDEOS SOBRE A LINHAGEM ENDOTELIAL (RAEC) EXPOSTA ÀS
TOXINAS DO VENENO DE *LOXOSCELES INTERMEDIA* (ARANHA MARROM)**

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 história tem um fim. Porém na vida, todo fim leva a um novo começo.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Aos meus pais, Eurides e Lúcia, e a minha irmã Anuana. Sei que a decisão de “abandonar o ninho” talvez não fosse exatamente o que esperassem de mim, ainda assim, apoiaram incondicionalmente em todos os momentos ao longo desta saga. Foram as poucas visitas ao longo desses anos que tornaram possível reconhecer a pouca capacidade humana em dar o devido valor ao que é mais precioso em suas vidas.

À Prof^a. Dr^a. Célia Regina, por todas as mil coisas maravilhosas que me ensinou seja durante as aulas ou ao longo da orientação. Sempre com entusiasmo, otimismo, afincos e alegria. Obrigado pela excelente oportunidade, pelas conquistas e vitórias que se seguirão.

Ao Prof. Dr. Edvaldo Trindade, apesar do relativo pouco tempo de convivência, foi de um inestimável zelo, apoio e orientação ao longo do semestre. Obrigado pela presença e ajuda sempre que necessário.

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

Ao Prof. Dr. Hugo Alexandre, pela grande colaboração, amizade e extrema boa vontade.

À Kátia Sabrina e Luiza Gremski, por toda a instrução, todas as técnicas ensinadas, todas as dúvidas sanadas, todos os favores, enfim, muito obrigado por serem verdadeiras “anjinhas da guarda”, que estavam sempre a olhar por sobre meus ombros nesta jornada.

À Jenifer Nowatski, pelo companheirismo, pela incrível e imensa ajuda em dias de semana, fins de semana e como se não fosse suficiente, em feriados também. Muito obrigado me emprestar tanto de seu tempo, esforço e ajuda.

A todos os amigos do Laboratório de Matriz Extracelular: Márcia, Olga, Rafael, Valéria, Rodrigo, Youssef, Dilza, Luciellen, Sandra, Daniele, Ana Carolina e Gabriel. Obrigado pelo apoio, ajuda, companheirismo, todos vocês se configuram como verdadeiros exemplos de sabedoria, perfeição, competência e dedicação.

A todos os alunos que hora ou outra doavam aranhas para que fosse possível a extração de veneno, ao LIPAPE e ao Prof. Oldemir.

Ao Fernando, muito obrigado pela ajuda em cima da hora com a impressão.

Aos amigos e amigas que tanto estimo, em especial ao pessoal do fórum. Foram anos de grande significado que ficarão para sempre marcados a ferro em brasas. Obrigado, e continuemos todos caminhando sob este mesmo céu azul.

À galera da faculdade, em especial a um seletto grupo de amigos que se tornou um tanto indispensável durante esses anos: Beatriz Borges, Tânia Mara, Danillo Augusto, Maria W. Pil, Maria Augusta, Letícia Larcher, Anelis Marin, Juliana Fabris e também Morgana! Apesar de que em muitos momentos vocês me fizeram ficar vermelho... praticamente roxo de vergonha, agradeço acima de tudo por fazerem com que este mineiro sempre se sentisse em casa. Serão inesquecíveis os ótimos momentos de companhia, risos, alegria...

Aos amigos remanescentes de Uberaba, Matheus e Tess. Quanto mais tempo passar, mais fortes serão os elos que unem nossas correntes da amizade.

Aos meus amigos caninos... Toquinho, Sadam e todo o resto da matilha: saudades.

Agradeço principalmente por ter nascido nesta época e ter compartilhado estes momentos únicos com pessoas e situações igualmente únicas, que por conseguinte, fazem com que eu, e todos ao meu redor sejam singularmente especiais.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE SIGLAS.....	ix
RESUMO.....	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. CARACTERÍSTICAS GERAIS DAS ARANHAS.....	1
1.2. O GÊNERO <i>Loxosceles</i>	2
1.3. DISTRIBUIÇÃO DO GÊNERO <i>Loxosceles</i>	3
1.4. <i>Loxosceles intermedia</i>	4
1.5. LOXOSCELISMO.....	5
1.5.1. QUADRO DERMONECRÓTICO OU CUTÂNEO.....	7
1.5.2. QUADRO CUTÂNEO-VISCERAL OU SISTÊMICO.....	8
1.6. CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DO VENENO LOXOSCÉLICO.....	9
1.6.1. AÇÃO DAS TOXINAS DO VENENO SOBRE A MATRIZ EXTRACELULAR.....	11
1.6.2. AÇÃO DAS TOXINAS DA ARANHA MARROM SOBRE AS CÉLULAS ENDOTELIAIS.....	11
1.7. POLISSACARÍDEOS SULFATADOS.....	12
1.7.1. GLICOSAMINOGLICANOS.....	12
1.7.2. FUCANAS.....	12
1.7.3. INTERAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS COM AS CÉLULAS ENDOTELIAIS	13
2. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS.....	16
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
3.1. ANIMAIS.....	18
3.2. EXTRAÇÃO DO VENENO LOXOSCÉLICO POR ELETROCHOQUE.....	18
3.3. DOSAGEM DE PROTEÍNAS DO VENENO.....	18
3.4. MANUTENÇÃO DA LINHAGEM CELULAR.....	18
3.5. POLISSACARÍDEOS SULFATADOS.....	19
3.6. AÇÃO DAS TOXINAS DO VENENO SOBRE AS CÉLULAS EM CULTURA, NA AUSÊNCIA OU PRESENÇA DOS POLISSACARÍDEOS SULFATADOS.....	19
3.7. ELETROFORESES EM GEL DE AGAROSE.....	19
3.8. ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR.....	20
3.9. ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR.....	21
3.10. ENSAIO DE ADESÃO CELULAR.....	21
3.11. CINÉTICAS DE DEGRADAÇÃO DE FIBRONECTINA.....	22
3.12. ENSAIO DE CITOMETRIA DE FLUXO.....	23
3.13. DETECÇÃO DA LIGAÇÃO DAS TOXINAS DO VENENO E DOS POLISSACARÍDEOS SULFATADOS NAS CÉLULAS EM CULTURA.....	23
3.14. ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	24
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
4.1. AÇÃO DAS TOXINAS DO VENENO SOBRE AS CÉLULAS EM CULTURA, NA AUSÊNCIA OU PRESENÇA DOS POLISSACARÍDEOS SULFATADOS.....	25
4.2. ELETROFORESES EM GEL DE AGAROSE.....	28
4.3. ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR.....	30
4.4. ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR.....	33

4.5 ENSAIO DE ADESÃO CELULAR.....	36
4.6 CINÉTICAS DE DEGRADAÇÃO DE FIBRONECTINA	48
4.7 ENSAIO DE CITOMETRIA DE FLUXO.....	53
4.8 DETECÇÃO DA LIGAÇÃO DAS TOXINAS DO VENENO E DOS POLISSACARÍDEOS SULFATADOS NAS CÉLULAS EM CULTURA.....	55
5. CONCLUSÕES.....	57
6. REFERÊNCIAS.....	58

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - DISTRIBUIÇÃO DAS PRINCIPAIS ESPÉCIES DO GÊNERO <i>Loxosceles</i>	03
FIGURA 2 - <i>Loxosceles intermedia</i>	05
FIGURA 3 - LESÃO DERMONECRÓTICA.....	07
FIGURA 4 - HEPARINA LIGA À COMPONENTES DA MATRIZ EXTRACELULAR.....	14
FIGURA 5 - CINÉTICA DE LIGAÇÃO DA HEPARINA BIOTINILADA PARA A MEC E CÉLULAS ENDOTELIAIS.....	15
FIGURA 6 - SELEÇÃO DO(S) POLISSACARÍDEO(S) QUE APRESENTE(M) MAIOR EFEITO PROTETOR.....	26
FIGURA 7 - FOTOS COMPARATIVAS DO EFEITO PROTETOR DOS POLISSACARÍDEOS SOBRE A AÇÃO DAS TOXINAS DO VENENO EM CÉLULAS ENDOTELIAIS.....	27
FIGURA 8 - CARACTERIZAÇÃO DAS FUCANAS A E B.....	28
FIGURA 9 - INTERAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS SULFATADOS COM O VENENO LOXOSCÉLICO.....	30
FIGURA 10 - PORCENTAGEM DE VIABILIDADE DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE FUCANA A.....	31
FIGURA 11 - PORCENTAGEM DE VIABILIDADE DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE FUCANA B.....	32
FIGURA 12 - PROLIFERAÇÃO DAS CÉLULAS ENDOTELIAIS DE AORTA DE COELHO QUANDO EXPOSTAS COM FUCANA A EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES POR 6 DIAS.....	34
FIGURA 13 - PROLIFERAÇÃO DAS CÉLULAS ENDOTELIAIS DE AORTA DE COELHO QUANDO EXPOSTAS COM FUCANA B EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES POR 6 DIAS.....	35
FIGURA 14 - ABSORBÂNCIA DAS CÉLULAS ADERIDAS SOBRE FIBRONECTINA DEGRADADA POR 2 HORAS.....	36
FIGURA 15 - PORCENTAGEM DA ADESÃO E INIBIÇÃO DE ADESÃO DAS CÉLULAS SOBRE FIBRONECTINA DEGRADADA POR 2 HORAS.....	37
FIGURA 16 - IMAGEM FOTOGRÁFICA DAS CÉLULAS DA LINHAGEM RAEC QUE PERMANECERAM ADERIDAS À MATRIZ DE FIBRONECTINA DEGRADADA POR 2 HORAS, NA PRESENÇA OU NÃO DOS POLISSACARÍDEOS.....	38

FIGURA 17 - ABSORBÂNCIA DA ADESÃO DAS CÉLULAS SOBRE FIBRONECTINA DEGRADADA POR 12 HORAS.....	39
FIGURA 18 - PORCENTAGEM DE ADESÃO E INIBIÇÃO DE ADESÃO DAS CÉLULAS SOBRE FIBRONECTINA DEGRADADA POR 12 HORAS.....	40
FIGURA 19 - IMAGEM FOTOGRÁFICA DAS CÉLULAS DA LINHAGEM RAEC QUE PERMANECERAM ADERIDAS À MATRIZ DE FIBRONECTINA DEGRADADA POR 12 HORAS, NA PRESENÇA OU NÃO DOS POLISSACARÍDEOS.....	41
FIGURA 20 - ABSORBÂNCIA DA ADESÃO DAS CÉLULAS TRATADAS COM VENENO E POLISSACARÍDEOS SULFATADOS SOBRE FIBRONECTINA INTACTA POR 2 HORAS.....	42
FIGURA 21 - PORCENTAGEM DA ADESÃO E INIBIÇÃO DE ADESÃO DAS CÉLULAS TRATADAS COM VENENO E POLISSACARÍDEOS SULFATADOS SOBRE FIBRONECTINA INTACTA POR 2 HORAS.....	43
FIGURA 22 - IMAGEM FOTOGRÁFICA DAS CÉLULAS DA LINHAGEM RAEC QUE PERMANECERAM ADERIDAS À MATRIZ DE FIBRONECTINA APÓS SEREM TRATADAS COM VENENO, NA PRESENÇA OU NÃO DOS POLISSACARÍDEOS POR 2 HORAS.....	44
FIGURA 23 - ABSORBÂNCIA DA ADESÃO DAS CÉLULAS TRATADAS COM VENENO E POLISSACARÍDEOS SULFATADOS SOBRE FIBRONECTINA INTACTA POR 12 HORAS.....	45
FIGURA 24 - PORCENTAGEM DA ADESÃO E INIBIÇÃO DE ADESÃO DAS CÉLULAS TRATADAS COM VENENO E POLISSACARÍDEOS SULFATADOS SOBRE FIBRONECTINA INTACTA POR 12 HORAS.....	46
FIGURA 25 - IMAGEM FOTOGRÁFICA DAS CÉLULAS DA LINHAGEM RAEC QUE PERMANECERAM ADERIDAS À MATRIZ DE FIBRONECTINA APÓS SEREM TRATADAS COM VENENO, NA PRESENÇA OU NÃO DOS POLISSACARÍDEOS POR 12 HORAS.....	47
FIGURA 26 - AMOSTRAS DE FIBRONECTINA INCUBADAS A 37°C POR 2 HORAS, COM VENENO NA PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE FUCANAS A E B.....	49
FIGURA 27 - AMOSTRAS DE FIBRONECTINA INCUBADAS A 37°C POR 4 HORAS, COM VENENO NA PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE FUCANAS A E B.....	50
FIGURA 28 - AMOSTRAS DE FIBRONECTINA INCUBADAS A 37°C POR 8 HORAS, COM VENENO NA PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE FUCANAS A E B.....	51

FIGURA 29 - AMOSTRAS DE FIBRONECTINA INCUBADAS A 37°C POR 12 HORAS, COM VENENO NA PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE FUCANAS A E B.....	52
FIGURA 30 - MARCAÇÃO DE VENENO DA SUPERFÍCIE DAS CÉLULAS RAEC.....	54
FIGURA 31 - DESLOCAMENTO DA MARCAÇÃO DE VENENO DA SUPERFÍCIE DAS CÉLULAS RAEC QUANDO EM PRESENÇA DA FUCANA A.....	54
FIGURA 32 - IMUNOCITOQUÍMICA DAS CÉLULAS RAEC INCUBADAS COM VENENO E POLISSACARÍDEOS E SUA COLOCALIZAÇÃO.....	56

LISTA DE SIGLAS

BSA	- bovine serum albumin
CS	- condroitim sulfato
Ctrl	- controle
DS	- dermatam sulfato
ELISA	- enzyme linked immunosorbent assay
FN	- fibronectina
FNf	- fibronectina fresca
FucA	- fucana A
FucB	- fucana B
GaGs	- glicosaminoglicanos
Hep	- heparina
MEC	- matriz extracelular
PBS	- phosphate buffer solution
PDA	- diamino propano acetato
RAEC	- rabbit aorta endothelial cell
SDS	- sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis
SFB	- soro fetal bovino
VN	- veneno

RESUMO

Acidentes envolvendo aranhas do gênero *Loxosceles*, comparados com outros animais peçonhentos, ocupam o primeiro lugar em termos de saúde pública no Paraná. O quadro clínico induzido pela picada da aranha da espécie *Loxosceles intermedia* pode evoluir para efeitos cutâneos e/ou sistêmicos. A compreensão da ação citotóxica e biomolecular do veneno ainda é bastante incompleta, não sendo conhecidos fármacos que vislumbrem neutralizar, minimizar ou mesmo inativar a potente ação das toxinas presentes no veneno. Sendo assim, foram empregados polissacarídeos sulfatados a fim de rastrear sua possível ação farmacológica. Fucana é o termo utilizado para definir uma família de polissacarídeos sulfatados sendo sua característica estrutural mais marcante a presença da L- Fucose sulfatada. Desta forma, apresenta semelhança estrutural com a heparina, um glicosaminoglicano altamente sulfatado empregado clinicamente por possuir atividade anticoagulante e antitrombótica. Neste trabalho, fucanas extraídas da alga marrom, denominadas Fucanas A e B, e a heparina, foram testadas como possíveis agentes atenuantes dos efeitos induzidos pelo veneno da aranha marrom. Tais fucanas (A e B), foram caracterizadas através da técnica de eletroforese em gel de agarose (PDA). Os resultados evidenciaram uma nítida interação do veneno da aranha marrom com tais fucanas, através do emprego do tampão Tris/Acetato para realizar a eletroforese em gel de agarose. Para avaliação do possível efeito protetor *in vitro* destas fucanas, foi empregada a linhagem de células endoteliais de aorta de coelho (RAEC). Primeiramente, o foco da abordagem foi o possível comprometimento destas fucanas ante as dinâmicas de viabilidade e a proliferação. Os resultados claramente demonstraram que a exposição às diferentes fucanas, não comprometeu a viabilidade e proliferação destas células. Pela análise bioquímica do perfil eletroforético em SDS-PAGE, da sabida degradação induzida pelo veneno sobre as moléculas da matriz extracelular, fibronectina, observou-se claramente o efeito protetor de ambos polissacarídeos sobre estas moléculas. Ensaios de adesão celular em células endoteliais de aorta de coelho (RAEC) sobre uma matriz de fibronectina foram posteriormente realizados para verificar se este efeito protetor aumentaria a adesão dessas células quando expostas a ação do veneno. Sabendo-se que as toxinas do veneno interagem com a superfície deste tipo celular, posteriormente investigou-se o possível efeito desacoplador desta interação, com o uso das fucanas, para tanto empregou-se a técnica de citometria de fluxo, onde foi notado uma tímida diminuição da marcação de veneno na superfície celular. E por fim, objetivando-se a localização ou possível colocalização dos polissacarídeos com as proteínas do veneno loxoscélico, foi feita imunocitoquímica, onde observou-se que uma nítida marcação dos polissacarídeos preferencialmente na matriz extracelular, exibindo pouca colocalização com o veneno sobre a superfície celular. Estes resultados mesmo que preliminares sugerem uma possível aplicação farmacológica e biotecnológica das fucanas contra os efeitos induzidos pelas toxinas presentes no veneno da aranha *Loxosceles intermedia*.

Palavras chave: *Loxosceles intermedia*, polissacarídeos sulfatados, fármacos.

1. INTRODUÇÃO

1.1. CARACTERÍSTICAS GERAIS DAS ARANHAS

Caracterizadas dentro do grupo dos Arthropoda, as aranhas da ordem Araneida constituem uma das maiores classes de Arachnida, com cerca de 40.000 espécies descritas e distribuídas mundialmente (RASH E HODGSON, 2002).

A classe Arachnida inclui todos os quelicerados terrestres (dentre os quais, aranhas, escorpiões, ácaros e carrapatos), e assim como outras conquistas evolutivas, a migração do ambiente aquático para o terrestre demandou algumas alterações morfológicas fundamentais. Sendo assim, a epicutícula destes animais se tornou cérea, reduzindo a perda de água; as brânquias laminares se modificaram para atuar em pleno ar, resultando em pulmões laminares e as traquéias dos aracnídeos; os apêndices se modificaram para uma melhor locomoção. Uma vez estabelecida a existência terrestre, muitas inovações exclusivas surgiram independentemente ao longo de linhagens diferentes, tais como o desenvolvimento de seda e glândulas de veneno (RUPPERT E BARNES, 1996). Graças a estas características, são exímios predadores, se alimentando principalmente de insetos. Contudo existem algumas espécies que podem capturar e se alimentar de sapos, lagartos, pequenos pássaros e roedores.

As aranhas possuem o corpo dividido em um prossoma (ou cefalotórax), não segmentado e no opistossoma (ou abdômen) segmentado, dividido em pré-abdômen e pós-abdômen. Entretanto, nas aranhas essas duas divisões não são evidentes e os segmentos comumente se encontram fundidos. Não apresentam antenas, constituindo o único subfilo de Arthropoda onde elas se encontram ausentes, sendo esta a característica mais peculiar do filo. Os apêndices surgem do opistossoma, sendo que o primeiro par é formado por estruturas voltadas à alimentação, denominadas quelíceras. O segundo par de apêndices é chamado de pedipalpos e podem encontrar-se modificados para realizar diferentes funções nas várias classes do grupo. Geralmente, os pedipalpos são seguidos por quatro pares de pernas e estes animais podem possuir até oito olhos (RUPPERT E BARNES, 1996).

As aranhas podem ser divididas em duas subordens mais importantes: as Orthognata ou Migalomorfa (aranha primitiva, ou aranha "trapdoor") que apresentam as quelíceras projetadas para frente, saindo do cefalotórax; e a subordem das Labidognatha

ou Araneomorfa, que apresentam as quelíceras posicionadas verticalmente sendo que se movem lateralmente como pinças (RASH E HODGSON, 2002).

Apesar do pavor que a maioria das pessoas sentem ao se deparar com qualquer aranha, apenas 100 das espécies descritas parecem oferecer riscos ao homem (BARBARO *et al.*, 1994; RUPPERT E BARNES, 1996), e de todas as espécies já descritas, apenas algumas dezenas apresentam o veneno bem estudado (GRISHIN, 1999).

Dentro da subordem das Labidognathas, muitas famílias são consideradas perigosas, tais como Segestriidae, Agelenidae, Salticidae, Gnaphosidae, Thomisidae, Heteropodidae, Clubionidae, Lycosidae, Theridiidae e Ctenidae. Dentre estas, as aranhas que oferecem maior perigo em casos de envenenamento e óbitos humanos estão distribuídas nos gêneros *Latrodectus* (viúva negra – Theridiidae), *Phoneutria* (aranha armadeira – Ctenidae) e *Loxosceles* (aranha marrom – Loxoscelidae) (ESCOUBAS *et al.*, 2000).

1.2. O GÊNERO *Loxosceles*

Aranhas do gênero *Loxosceles* possuem de 8 a 15 mm de comprimento do corpo e pernas medindo de 8 a 30 mm. A cor do animal pode variar em tons de marrom, desde mais pálido até mais escuro, podendo apresentar uma mancha clara (*L. gaucho*) ou mancha escura (*L. laeta*). Uma característica do gênero é o cefalotórax que é baixo, não ultrapassando em altura o abdômen (BÜCHERL, 1972), possuindo uma mancha na forma aproximada de um violino (FUTRELL, 1992), razão pela qual também é conhecida como aranha violino.

Estas aranhas podem viver de 3 até 7 anos (ANDRADE *et al.*, 2000) e suportam extremos de temperaturas desde 8 até 43°C, além de sobreviverem por diversos dias, e até meses sem água ou alimento (FUTRELL, 1992).

Todas as espécies do gênero *Loxosceles* possuem seis olhos dispostos em pares, sendo que a disposição dos pares dos olhos é um critério para identificação da espécie (VETTER E VISSCHER, 1998). Estas aranhas são sedentárias e noturnas (ANDRADE *et al.*, 1999), e possuem como hábito a construção de teias irregulares parecidas com chumaços de algodão (FUTRELL, 1992).

Ao contrário de muitos animais peçonhentos, as aranhas deste gênero não são agressivas, são bastante reclusas e por isso, a maior parte dos acidentes se dá devido à

compressão do animal contra o corpo (SUAREZ *et al.*, 1971; LUCAS, 1988; FUTRELL, 1992).

1.3. DISTRIBUIÇÃO DO GÊNERO *Loxosceles*

O gênero *Loxosceles* é amplamente distribuído ao redor do mundo, sendo que acidentes envolvendo humanos já foram reportados na América do Sul (SEZERINO *et al.*, 1998 e SCHENONE, 1998), América do Norte (FUTRELL, 1992 e ESCALANTE – GALINDO *et al.*, 1999), Europa (NICHOLSON E GRAUDINS, 2003), África (FUTRELL, 1992 e NICHOLSON E GRAUDINS, 2003) e Austrália (YOUNG, 2001 e NICHOLSON E GRAUDINS 2003), como pode ser visualizado na Figura 1. Recentemente foram notificados também acidentes no Oriente Médio e algumas partes da Ásia (NICHOLSON E GRAUDINS, 2003) e Israel (BORKKAN *et al.*, 1995 e COHEN *et al.*, 1999)

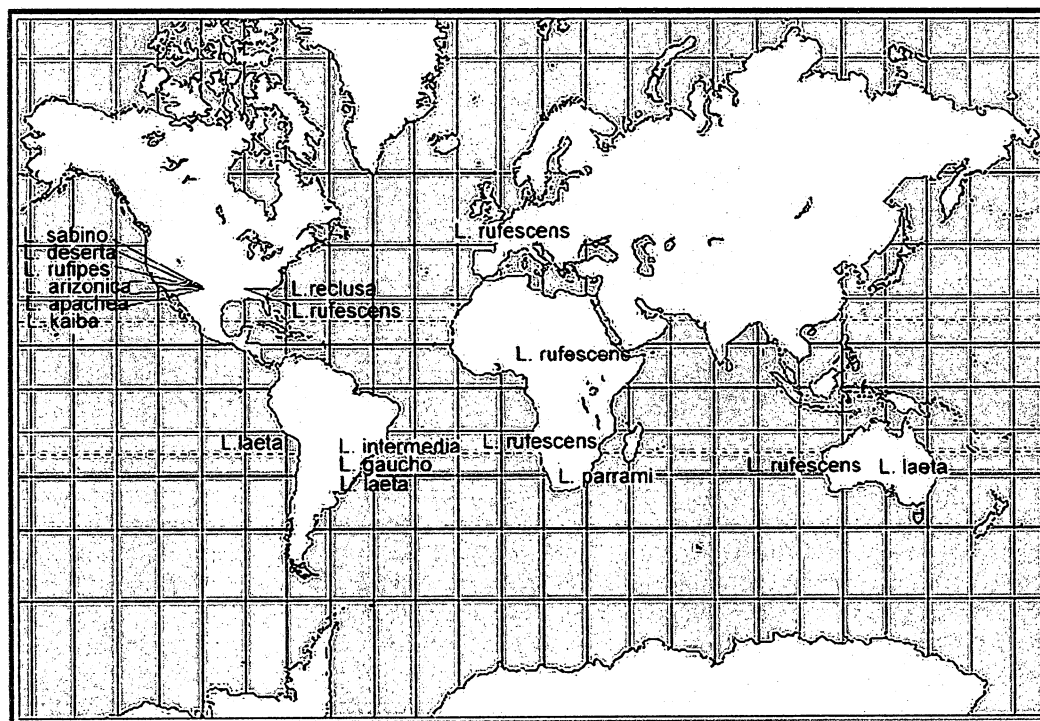


Figura 1 – Distribuição mundial das principais espécies do gênero *Loxosceles*

Existem mais de 50 espécies de *Loxosceles* no continente americano (FUTRELL, 1992; DA SILVA *et al.*, 2004).

No Brasil ocorrem 7 espécies heterogeneamente distribuídas: *L. gauchoi*, encontrada em São Paulo e Rio Grande do Sul; *L. similis*, encontrada na Paraíba, São Paulo e Minas Gerais; *L. adelaide*, encontrada no Rio de Janeiro; *L. hirsuta*, encontrada no Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná; *L. intermedia*, encontrada do Rio Grande do Sul ao Rio de Janeiro; *L. amazonica*, encontrada no Amazonas e Ceará e *L. laeta*, encontrada nas regiões sul e leste (BÜCHERL, 1972; SOERENSEN, 1996). No Sul e Sudeste do Brasil as espécies *L. gauchoi*, *L. laeta* e *L. intermedia* são as predominantes, sendo que estas são as principais espécies envolvidas em acidentes.

1.4 *Loxosceles intermedia*

Conhecida popularmente como aranha marrom, ou aranha violino, é classificada sistematicamente por RUPERT E BARNES, 1996 e SOERENSEN, 1996 da seguinte maneira:

Filo: Arthropoda	Sub Ordem: Labdognatha
Subfilo: Chelicerata	Família: Loxoscelidae
Classe: Arachnida	Gênero: <i>Loxosceles</i>
Ordem: Araneida	Espécie: <i>Loxosceles intermedia</i>

Como as demais do gênero *Loxosceles*, trata-se de uma espécie cujos representantes são reclusos, não agressivos e de hábito noturno. Apresentam dimorfismo sexual, sendo que a fêmea possui abdômen maior que o do macho, e este possui pernas mais delgadas e alongadas que a fêmea (Figura 2) (BÜCHERL, 1972).



Figura 2 – *Loxosceles intermedia*: fêmea à esquerda e macho à direita.

São aranhas bem adaptadas às regiões urbanas, dentro das quais o ambiente domiciliar oferece um local seguro para os animais. Entretanto, essa aranha deixa a teia durante a noite à procura de alimento ou de um lugar no qual irá construir uma nova teia. Devido a este comportamento, inconvenientes contatos com vítimas humanas podem acontecer, e, em caso de acidentes, estes ocorrem não porque a aranha atacou o indivíduo, mas geralmente ocorre quando as vítimas pressionam a aranha marrom contra seus corpos, quando movem, seja durante o sono ou até mesmo ao vestir-se. Os acidentes com aranhas marrons ocorrem principalmente durante as estações mais quentes do ano, primavera e verão (SCHENONE E LETONJA, 1975).

A fêmea produz mais veneno que o macho e o volume médio inoculado por picada é de 4 μ l, numa concentração de 40 μ g/ml. Nas últimas décadas, houve um crescimento nos casos de envenenamento por *Loxosceles intermedia* na região Sul do Brasil, principalmente em ambiente domiciliar (RIBEIRO *et al.*, 1993).

1.5. LOXOSCELISMO

Loxoscelismo é o termo utilizado para representar os acidentes envolvendo aranhas do gênero *Loxosceles* (BARBARO *et al.*, 1994). Foi descrito pela primeira vez em 1872 e a reação cutânea em 1937, mas somente em 1957 o araneísmo necrótico foi

associado com a provável picada de aranhas do gênero *Loxosceles* (HUNTER *et al.*, 2001).

No Brasil, o loxoscelismo foi responsável por 36% das 17.781 picadas de aranha registradas pelo Ministério de Saúde entre 1990 e 1993 (SEZERINO *et al.*, 1998), tornando este acidente o mais importante dos casos de envenenamento relacionados com aranhas. Mais de 50% destes, estão no Estado do Paraná, particularmente em Curitiba e região metropolitana. Segundo dados da Secretaria de Saúde do Estado do Paraná, este número vem aumentando nos últimos quatro anos. Em 2002 foram registrados 4268 casos, em 2003, 5219, em 2004, 5416 e em 2005, 4423 (comunicação pessoal da 2ª Regional de Saúde do Estado do Paraná, que abrange Curitiba e Região Metropolitana).

As espécies *L. gaucho*, *L. laeta* e *L. intermedia* são encontradas principalmente nas regiões sul e sudeste do país, porém é a *Loxosceles intermedia* a aranha marrom que é proeminente na área urbana do Estado de Paraná (FISCHER, 1994, MATTOSINHO *et al.*, 1997 e ANDRADE *et al.*, 2000).

Os acidentes com *L. intermedia* representam hoje um sério problema de saúde para o Estado do Paraná, devido ao elevado índice de morbidade e às seqüelas estéticas e funcionais que podem advir dos acidentes. Há muita dificuldade no tratamento das lesões, o que provoca longos períodos de tratamento, com freqüente recorrência e/ou evolução do processo que pode culminar com perda do órgão afetado. Em casos onde o processo torna-se sistêmico, o quadro em geral evolui para uma insuficiência renal aguda (IRA), tendo sido registrado vários óbitos, principalmente entre crianças e/ou pessoas de saúde delicada ou idosos (BARBARO *et al.*, 1995), porém, não é somente o desenvolvimento de insuficiência renal aguda que pode levar a óbito, sendo que este também pode ser alcançado através de infecções secundárias no local da picada no caso do quadro dermonecrótico.

O quadro clínico provocado pelo loxoscelismo pode se dar de duas formas: o quadro cutâneo ou dermonecrótico e o quadro cutâneo-visceral ou sistêmico, compreendendo respectivamente a 84 - 97% e 3 - 16% dos casos de acidentes (BARBARO *et al.*, 1992). O desenvolvimento de um quadro clínico ou do outro, ou de ambos, vai depender de fatores relacionados com o indivíduo acidentado, como estado nutricional, idade, local da picada, susceptibilidade ao veneno e o tempo em que esse indivíduo levou para procurar um tratamento adequado (GAJARDO-TOBAR, 1966; SCHENONE *et al.*, 1989; BARBARO *et al.*, 1994), assim como dependerá de fatores pertinentes à espécie da aranha (Ministério da saúde, 1998), sexo do animal (OLIVEIRA

et al., 1999), seu estágio de desenvolvimento (ANDRADE et al., 1999) e quantidade de veneno inoculado (SEZERINO et al., 1998).

1.5.1. QUADRO DERMONECRÓTICO OU CUTÂNEO

O quadro cutâneo caracteriza-se por dermonecrose (Figura 3) no local da inoculação do veneno (REES et al., 1984). A picada inicial, por ser pouco dolorosa, geralmente passa despercebida pelo paciente sendo que após 2 a 8 horas, a dor pode variar de moderada a severa e é descrita como dor local do tipo “queimação” ou ardência. Pode ser acompanhada por prurido, edema, eritema, sensação de mal-estar geral e podendo em alguns casos ocorrer febre. Em seguida, pode surgir uma lesão de 1 a 30 cm de diâmetro, circundada por um halo vermelho e uma zona pálida, denominada placa marmórea (RODRIGUES et al., 1986; FUTRELL, 1992). Após 3 a 5 dias do acidente pode ocorrer acúmulo de leucócitos polimorfonucleares, necrose e formação de abscesso (SMITH E MICKS, 1970; FUTRELL, 1992). Em alguns casos a lesão cutânea necrótica evolui em 2 a 6 semanas, com formação de uma escara de difícil cicatrização e pode dar origem a seqüelas deformantes (PIZZI et al. 1957).



Figura 3 – Lesão dermonecrótica provocada pela picada de *L. intermedia*

O quadro dermonecrótico avançado caracteriza-se por morte celular e destruição dos constituintes intercelulares (matriz extracelular) na região lesionada. Sendo assim, tanto as atividades dermonecróticas como as hemorrágicas podem estar diretamente associadas a enzimas proteolíticas presentes no veneno, as quais têm a capacidade de degradar fibronectina, fibrinogênio, entactina, o *core* protéico do heparam sulfato e as cadeias de polissacarídeos de condroitim sulfato de células endoteliais (FEITOSA et al., 1998; VEIGA et al., 1999; VEIGA et al., 2000 a; VEIGA et al., 2000 b; VEIGA et al., 2001 a; VEIGA et al., 2001b).

Mudanças histopatológicas incluem edema e espessamento do endotélio dos vasos sanguíneos, presença de células inflamatórias, vasodilatação, coagulação intravascular, degeneração da parede dos vasos sanguíneos, hemorragia dérmica e até mesmo subcutânea (SMITH E MICKS, 1970; FUTRELL, 1992).

A necrose formada pode ser determinante para o advento de outros problemas, como por exemplo, a contaminação secundária da ferida por agentes bacterianos e fúngicos patogênicos. Estudos recentes têm mostrado que a contaminação da lesão dermonecrótica com microrganismos anaeróbios tais como *Clostridium perfringens*, presentes na própria quelícera da aranha, pode potencializar o efeito dermonecrótico do veneno.

1.5.2 QUADRO CUTÂNEO-VISCERAL OU SISTÊMICO

O loxoscelismo cutâneo-visceral é menos freqüente, atingindo de 3 a 16% dos casos e com as primeiras manifestações ocorrendo geralmente nas primeiras 24 horas pós- acidente (SCHENONE E LETONJA, 1975; MARTINEZ-VARGAS, 1987; SCHENONE *et al.*, 1989; COUTINHO, 1996). Dentro os sintomas incluem o desenvolvimento de astenia, febre, cefaléia, alterações sensoriais, insônia, podendo chegar eventualmente ao coma. As manifestações sistêmicas incluem alterações no quadro hematológico, podendo chegar a coagulação intravascular disseminada, agregação plaquetária e anemia hemolítica (FORRESTER *et al.*, 1978; BASCUR *et al.*, 1982; RESS *et al.*, 1988).

Estudos histopatológicos analisaram efeitos do veneno da aranha marrom, e nestes foram observados a oclusão de vênulas e artérias, tanto em lesões humanas como em coelhos. Além disso, nos pacientes que foram a óbito em consequência do loxoscelismo sistêmico, as autópsias realizadas, mostraram alterações degenerativas nos parênquimas de vários órgãos. Edema, congestão, hemorragia e erosões da mucosa digestiva, estavam presentes e associados a estas lesões, além de lesões tubulares renais do tipo nefrose hemoglobínúria (PIZZI, *et al.*, 1957; SCHENONE E LETONJA, 1975; SCHENONE *et al.*, 1989). PIZZI *et al.* (1957) verificaram que em órgãos como o pulmão, fígado e rins ocorriam efeitos sobre o sistema de vasos sanguíneos (vênulas e artérias). MARTINEZ-VARGAS, 1987 relata que em 62% dos casos de loxoscelismo cutâneo-visceral, o rim acha-se comprometido, atingindo o estado de insuficiência renal aguda (IRA).

A membrana basal glomerular age como uma barreira seletiva, regulando a filtração renal, tanto em carga quanto em tamanho de moléculas do plasma que passam pelo espaço urinário. Estas membranas são formadas tanto por constituintes glicoproteicos tais como laminina, colágeno tipo IV, entactina e fibronectina e estas se configuram como estruturas fundamentais dos glomérulos renais (estruturas envolvidas na formação da urina), assim como também as membranas basais glomerulares possuem seus os sítios aniônicos regularmente distribuídos e representados por proteoglicanos e glicosaminoglicanos, principalmente heparan sulfato e ácido hialurônico. Sabendo do efeito degradativo das toxinas do veneno em muitos destes constituintes da membrana basal, isto poderia explicar em parte, os problemas renais provocados pela picada da aranha marrom (VEIGA *et al.*, 1999; LUCIANO *et al.*, 2004), influenciando o processo de filtração renal, levando geralmente a um quadro de proteinúria.

1.6 CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DO VENENO LOXOSCÉLICO

O propósito do veneno das aranhas é paralisar e matar a presa, mas ele também pode ter papel na pré-digestão do suposto alimento. Acredita-se também que os venenos tenham função defensiva contra predadores. Na verdade, já foi sugerido que as aranhas não injetariam veneno durante a subjugação da caça, mas apenas em manobras defensivas. Qualquer que seja a função dos venenos, eles evolutivamente foram mais eficazes do que o uso da teia (RUPPERT E BARNES, 1996)

O veneno da “aranha-marrom”, gênero *Loxosceles*, é um líquido protéico, produzido por glândulas apócrinas situadas no cefalotórax do animal, as quais comunicam-se com o exterior através do aparelho inoculador, constituído por um par de quelíceras (GAJARDO-TOBAR, 1966; MARTINEZ-VARGAS, 1987; DOS SANTOS *et al.*, 2000).

A quantidade de veneno seco varia entre as espécies. Por exemplo, aranhas da espécie *L. rufescens*, secretam em média, 700 µg por extração (LUCAS, 1988); já um animal adulto da espécie *L. reclusa*, libera no volume total de veneno (que corresponde em média a 4 µl), de 65 a 100 µg de proteína (FORRESTER *et al.*, 1978).

A atividade biológica de três espécies de aranhas do gênero *Loxosceles* no sul do Brasil foi estudada por BARBARO *et al.* (1996), os quais observaram que o veneno de *L. intermedia* é o mais letal para camundongos, seguido do veneno de *L. gaucho* e finalmente o veneno de *L. laeta*.

Os componentes de venenos de aranhas podem ser divididos em três grupos majoritários segundo suas características bioquímicas: moléculas orgânicas de baixa massa molecular (menos de 1.000 Da), polipeptídeos (3.000 a 10.000 Da) e proteínas de alta massa molecular (mais de 10.000 Da) (ESCOUBAS *et al.*, 2000). As proteínas de venenos de aracnídeos incluem proteínas de alta massa molecular e oligopeptídeos com ações neurotóxicas ou enzimáticas variadas. No gênero *Loxosceles* a presença de proteases foi detectada no extrato de glândula de *L. intermedia* (DA SILVEIRA *et al.*, 2002).

Nas aranhas do gênero *Loxosceles* o veneno apresenta ação enzimática e por isso pode ser comparado a alguns venenos de cobras onde os estudos também demonstraram a presença de enzimas em sua composição (MARTINEZ-VARGAS, 1987). Entre estas enzimas foram descritas hialuronidases, metaloproteases, esfingomielinases D (de 32-35 KDa aparentemente envolvida na agregação plaquetária) e outras moléculas (de 33, 34 e 35 KDa) associadas com as atividades nocivas do veneno (GEREN *et al.*, 1976; KURPIEWSKI *et al.*, 1981; BARBARO *et al.*, 1992; TAMBOURGI *et al.*, 1995; FEITOSA *et al.*, 1998; VEIGA *et al.*, 1999).

As hialuronidases, presentes no veneno, podem ser potencializadoras de outros componentes, de forma a facilitar a penetração destes em compartimentos celulares e tecidos. Entretanto, a função exata da maior parte das enzimas ainda precisa ser elucidada. O veneno apresenta também fatores hemorrágicos, como por exemplo, uma metaloprotease de 20-28 KDa (loxolisina A) com atividades sobre a fibronectina e o fibrinogênio e uma metaloprotease gelatinotítica de 32-35 KDa (loxolisina B) com função desconhecida (FEITOSA, 1998).

Dentre as metaloproteases presentes no veneno da *L. intermedia*, destacam-se as endopeptidases que se caracterizam por clivar as moléculas da matriz extracelular (MEC). Podem atuar sobre a regulação e organização das moléculas da MEC, influenciando desta forma, nos processos nos quais estejam envolvidas.

Entretanto, é importante ressaltar que a ação tóxica do veneno de aranhas é o efeito combinado de todos os componentes presentes nele (GEREN *et al.*, 1976).

1.6.1. AÇÃO DAS TOXINAS DO VENENO SOBRE A MATRIZ EXTRACELULAR

Estruturalmente, a matriz extracelular está dividida em membrana basal, matriz conectiva e matriz sangüínea, correspondendo a uma estrutura complexa formada por proteínas secretadas e glico conjugados que interagem tridimensionalmente, originando uma rede molecular (YURCHENCO E SCHITTNY, 1990). A matriz extracelular ao interagir funcionalmente com moléculas receptoras na superfície celular participa como suporte na orientação dos processos biológicos onde ocorre adesão e locomoção celular, coordenando importantes fenômenos fisiológicos no funcionamento dos tecidos (MEREDITH *et al.*, 1993; VEIGA *et al.*, 1997).

A ação de constituintes moleculares encontrados no veneno da aranha marrom sobre membranas basais poderia explicar os efeitos nocivos presentes no loxoscelismo, principalmente nos processos hemorrágicos (membrana basal subendotelial venosa) e na insuficiência renal aguda (membrana basal glomerular). FEITOSA *et al.* (1998) identificaram e caracterizaram duas metaloproteases ligantes de gelatina, uma delas com atividades fibronectinolítica provavelmente envolvidas nos distúrbios hemostáticos desencadeados pelo veneno de *L. intermedia*.

Aparentemente o veneno de *L. intermedia* não tem atividade sobre laminina ou colágeno tipo IV. No entanto, ensaios bioquímicos mostraram sua ligação tanto com a laminina, quanto com o colágeno tipo IV. Entretanto, o veneno degrada o núcleo protéico do proteoglicano de heparam sulfato e hidrolisa entactina (molécula que age como ponte de organização da membrana basal), (VEIGA *et al.*, 2000b). Ainda, experimentos de imunomarcção com visualização em microscopia confocal, mostraram a ligação de toxinas do veneno à membrana basal glomerular de rins de camundongos tratados com veneno (LUCIANO *et al.*, 2004), o que mais uma vez reforça a idéia da participação da MEC no comprometimento renal nos casos de loxoscelismo cutâneo-visceral.

1.6.2 AÇÃO DAS TOXINAS DA ARANHA MARROM SOBRE AS CÉLULAS ENDOTELIAIS

A nível celular e molecular a compreensão do loxoscelismo ainda é bastante incompleta. Mantém-se ainda obscuro o mecanismo pelo qual as toxinas presentes no veneno loxoscélico atuam sobre o endotélio e no subendotélio dos vasos sangüíneos induzindo vasodilatação, coagulação intravascular, degeneração da parede dos vasos sangüíneos, hemorragia dérmica e até mesmo subcutânea.

A ação do veneno de *L. intermedia* sobre as células endoteliais em cultura foi investigada por Veiga *et al.*, (2001a). Os dados mostraram que ao longo do tempo de exposição, as células foram perdendo a adesão sobre a placa de cultura, sugerindo morte celular. No entanto, a viabilidade das células soltas mostrou ser superior a 95%. Então, quando as estas células foram lavadas e recolocadas em cultura, com meio livre de veneno, foi observado que as mesmas foram capazes de aderir novamente, mostrando que as enzimas do veneno atuam sobre a matriz extracelular (Veiga *et al.*, 2001a).

A sugestão da ação das toxinas do veneno da aranha marrom atuarem sobre a matriz extracelular das células endoteliais nos levou a investigar a possibilidade de que fármacos que liguem na MEC poderiam minimizar ou até mesmo levar à inibição da ação destas toxinas. Buscamos investigar o papel de polissacarídeos sulfatados, os quais são descritos a seguir:

1.7. POLISSACARÍDEOS SULFATADOS

1.7.1. GLICOSAMINOGLICANOS

Os glicosaminoglicanos (GAGs) são polímeros lineares de açúcares constituídos por unidades dissacarídicas repetitivas, que por sua vez são formadas alternadamente por uma hexosamina (D-glucosamina ou D-galactosamina) unida por ligação glicosídica a um ácido urônico (D-glucurônico ou L-idurônico) ou a um açúcar neutro (D-galactose).

Em tecidos de mamíferos ocorrem seis tipos de GAGs: heparina, heparam sulfato, condroitim 4-sulfato, condroitim 6-sulfato, dermatam sulfato, queratam sulfato e ácido hialurônico (DIETRICH, 1976), definidos com base em seus constituintes.

Todos são polímeros de natureza ácida e, com exceção do ácido hialurônico, carregam grupamentos sulfatos, ligados a várias posições. Desta forma, estes devem sua carga negativa à carboxila (ácido hialurônico), a grupamentos sulfatos (queratam sulfato) ou a ambos (condroitins, dermatam, queratam e heparam sulfatos e, heparina). Esta alta densidade de cargas negativas tem influência sobre funções fisiológicas e também propriedades farmacológicas.

1.7.2. FUCANAS

Fucana é uma denominação utilizada para polissacarídeos sulfatados, lineares ou não, que tem como característica estrutural mais marcante a presença de L-fucose

sulfatada. As fucanas são observadas em algas marrons (Phaeophyceae) e em equinodermos (ouriços e pepinos do mar). Nas algas elas estão localizadas na matriz mucilagenosa e devido ao seu caráter altamente higroscópico, acredita-se que protejam a alga da desidratação quando essa é submetida a longos períodos de exposição ao sol durante as marés baixas. A natureza mucilagenosa destes compostos, também parece contribuir para tornar a alga flexível o bastante para crescer em ambiente líquido e rígida o suficiente para permanecer estendida, e assim, melhor captar a luz e os nutrientes existentes (PERCIVAL E MACDOWELL, 1967).

As fucanas têm sido avaliadas com relação as suas possíveis atividades farmacológicas através de diversos modelos experimentais. O grande interesse pelas fucanas pode ser relacionado com a sua semelhança estrutural com a heparina, o que daria a esses polissacarídeos atividades semelhantes as dos GAGs, ainda por serem de origem vegetal elas poderiam apresentar menores riscos de contaminações por vírus e partículas, como "prions", quando comparados com a heparina; além do fato das algas serem recursos naturais renováveis.

Diversos autores têm reportado diferentes atividades para as fucanas, como: atividade angiogênica (SOEDA et al., 2000), anticoagulante, antitrombótica (MAURAY et al., 1998, ROCHA et al., 2006); antimigratória (GIRAUX et al., 1998); anti-adesiva (ROCHA et al., 2001); anti-oxidante (RUPEREZ et al., 2002), entre outras.

A presença de xilofucanas em três espécies de algas marrom foi demonstrada por Dietrich e col. (1995). As algas *Padina gymnospora*, *Dictyota mertensis* e *Sargassum vulgare*, apresentavam três fucanas, que poderiam ser reunidas em três grupos de acordo com a sua mobilidade eletroforética e assim denominadas de fucanas A, B e C por ordem crescente de mobilidade eletroforética. As fucanas A corresponderam a xilofucoglucuronanas e as fucanas B e C a xilofucanas com diferentes graus de sulfatação.

1.7.3. INTERAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS COM AS CELULAS ENDOTELIAIS

Os polissacarídeos são freqüentemente investigados quanto a suas propriedades farmacológicas.

Muitas das propriedades funcionais dos GAGs dependem da interação entre o polissacarídeo e proteínas (KJELLEN E LINDAHL, 1991, LINDAHL et al., 1994). Esta interação, geralmente, é de natureza eletrostática. Heparina e heparam sulfato são

capazes de se ligar a várias proteínas da MEC como fibronectina (YAMADA, 1983), vitronectina (HAYMAN et al., 1983, UNDERWOOD et al., 2002), laminina, trombospondina (BERGE et al., 1999), colagenos tipo I, III and V (DELACOUX et al., 1998) e tenascina (LANE, 1989)

Trindade et al. (2006) demonstraram que a atividade antitrombótica da heparina é mediada pelo estímulo da síntese de heparan sulfato nas células endoteliais e, a MEC é o local de ligação para desencadear tal estímulo (Figura 4 – A-D) (TRINDADE et al., 2006 – artigo submetido). Ainda, estes autores foram capazes de mostrar que a interação da heparina com a MEC é dose e tempo dependentes (Figura 5). Por outro lado, fucana B demonstrou ser mais eficiente que a heparina ao estimular a síntese de HS (ROCHA et al., 2005) e este estímulo também é mediado pela sua interação com a matriz extracelular (ROCHA, TRINDADE & NADER - artigo em elaboração).

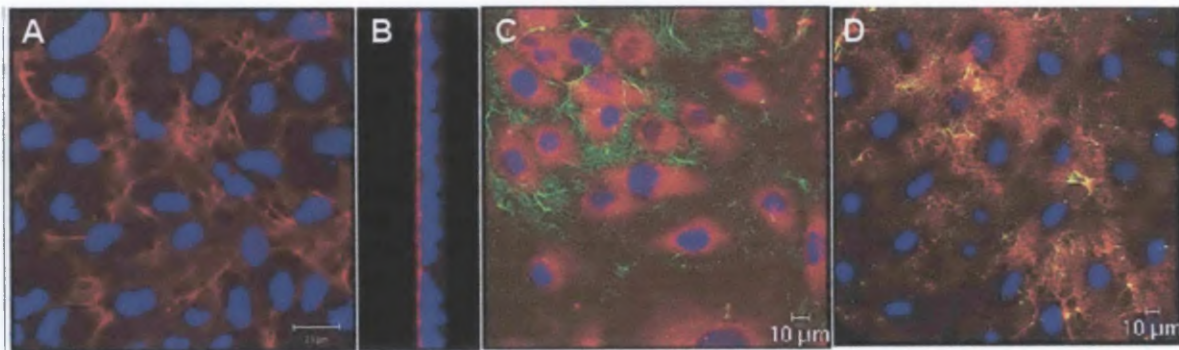


Figura 4 – Heparina liga à componentes da Matriz Extracelular.

A-D - imagens obtidas em microscopia confocal. **A** - Heparina biotinizada ligada à matriz em vermelho. **B** – Projeção da imagem A deslocada 90°; **C** – Heparina biotinizada ligada à matriz em verde e anticorpo anti-sindecam-4 (proteoglicano de superfície celular) revelado em vermelho; **D**-colocalização da ligação da heparina biotinizada corada em vermelho com a imunomarcação para fibronectina revelada em verde. Núcleo celular corado em azul com DAPI.

Assim, como o sítio de ligação dos polissacarídeos sulfatados é a MEC, buscamos, com o presente projeto, investigar o possível papel protetor destes compostos sobre a ação do veneno da aranha marrom, utilizando como modelo de estudo, células endoteliais em cultura.

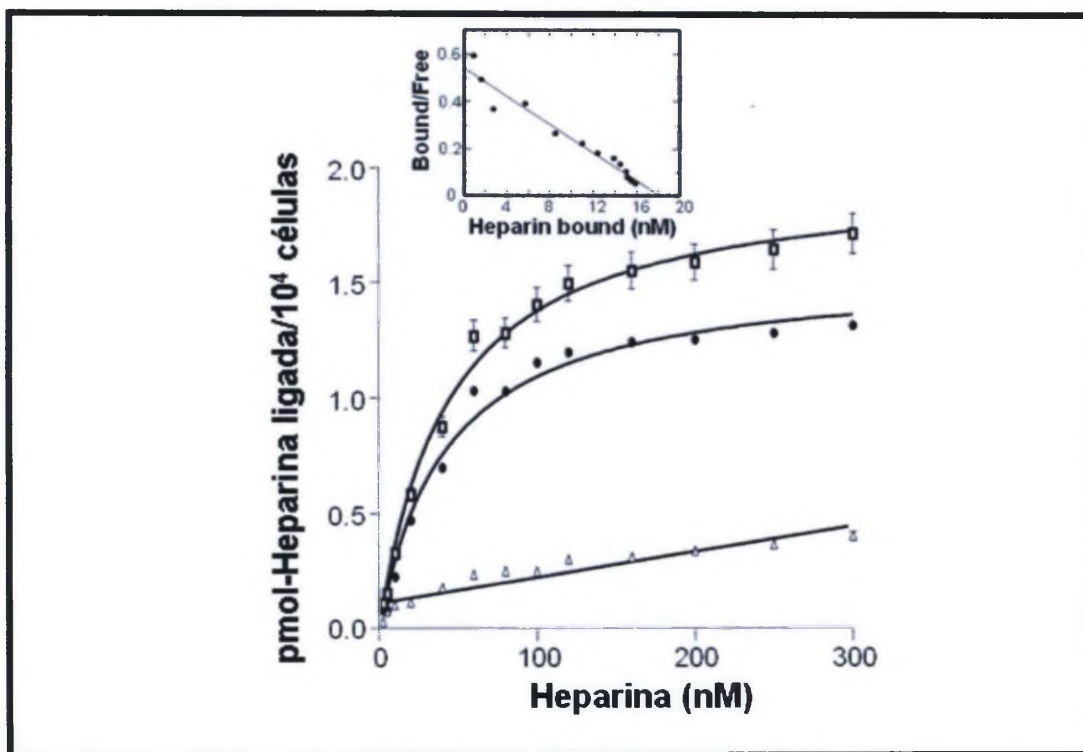


Figura 5 – Cinética de ligação da heparina biotilada para a MEC de células endoteliais.

As células (1×10^4) foram crescidas por 3 dias em multiwell de 96 poços. A heparina biotilada ligada foi detectada com estreptavidina conjugada com Európio e quantificado em leitor de ELISA para fluorescência. O inserto representa o plot de Scatchard plots. □, ligação total; ●, ligação específica; △, ligação inespecífica.

2. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS

Considerando a necessidade de aprofundar os estudos sobre a ação do veneno loxoscélico, sabendo-se que este atua sobre o endotélio dos vasos sanguíneos induzindo a degeneração da parede de suas paredes, vasodilatação, coagulação intravascular, hemorragia dérmica e até mesmo subcutânea, apresentando característico quadro dermonecrótico. Acrescido a isso, a obscuridade até o presente momento do real mecanismo de ação destas toxinas, bem como a não existência de uma estratégia ou mesmo a existência de um fármaco eficiente para que os quadros clínicos referentes à picada da aranha marrom sejam minimizados, ou mesmo para que a progressão deste quadro seja revertida. E tendo conhecimento dos efeitos causados pelas toxinas presentes neste veneno em linhagens endoteliais de aorta de coelho (RAEC), pretende-se direcionar os estudos para desvendarmos possíveis biomoléculas que possam ter uma ação atenuante sobre as toxinas deste veneno. Para tanto serão empregados polissacarídeos sulfatados, dentre os quais as fucanas (A e B), heparina, codroitin sulfato e dermatan sulfato, devido às próprias características bioquímicas, biológicas e farmacológicas destas substâncias as quais se fazem promissoras para os objetivos aqui propostos.

Os objetivos específicos são:

- Distinguir qual ou quais dos polissacarídeos sulfatados apresentam uma ação atenuante contra os efeitos induzidos pelo veneno de *Loxosceles intermedia* sobre células endoteliais de aorta de coelho;
- Caracterizar e verificar possível interação do(s) polissacarídeo(s) sulfatado(s) com o veneno de *L. intermedia*, possibilitando minimizar a potencialidade deste.
- Avaliar se o uso deste(s) polissacarídeo(s) sulfatado(s) sobre a linhagem celular em questão possam comprometer os processos normais de viabilidade e proliferação celular;
- Verificar se o efeito protetor do(s) polissacarídeo(s) sulfatado(s) atuam apenas sobre a própria linhagem celular ou também tem uma ação protetora frente a degradação da matriz extracelular (MEC - Fibronectina);

- Analisar o processo de adesão celular quando em presença de veneno, e a possível ação restauradora desta adesão quando que na presença do(s) polissacarídeo(s) sulfatado(s);
- Verificar a localização do veneno e dos polissacarídeos e possível co-localização destas biomoléculas quando incubadas com a linhagem endotelial de aorta de coelho através de ensaio imunocitoquímico.
- Distinguir se há deslocamento da ligação do veneno sobre a superfície celular com o tratamento do(s) polissacarídeo(s) sulfatado(s) através de ensaio de citometria de fluxo.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

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

3.2 EXTRAÇÃO DO VENENO LOXOSCÉLICO POR ELETROCHOQUE

O veneno de *Loxosceles intermedia* foi obtido de aranhas adultas em condições apropriadas e submetidas a eletrochoque de 15 volts no cefalotórax como descrito por Feitosa *et al.* (1998). Para as diferentes metodologias, foi utilizado uma dose de 40µg/ml representando uma concentração aproximada do veneno injetado na picada dos acidentados.

3.3 DOSAGEM DE PROTEÍNAS DO VENENO

A dosagem da concentração de proteínas presentes no veneno foi realizada pelo método de Bradford (Bradford, 1976).

3.4 MANUTENÇÃO DA LINHAGEM CELULAR

A linhagem celular utilizada no presente estudo foram células endoteliais obtidas de aorta torácica de coelho as quais foram gentilmente cedidas pela Prof^a. Dr^a. Helena Bonciani Nader (UNIFESP/EPM) e foram estabelecidas em cultura pelo Prof. Vincenzo Buonassisi (Buonassisi, 1973). Assim, as células endoteliais de aorta de Coelho (RAEC) foram mantidas em cultura com mistura de nutriente HAM-F12 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, Campinas, SP) e 40mg/L de garamicina. O crescimento das células foi realizado a 37°C em atmosfera úmida e 5% de CO₂.

3.5 POLISSACARÍDEOS SULFATADOS

Dentre os polissacarídeos utilizados, os glicosaminoglicanos dermatam sulfato e condroitim sulfato foram cedidos pela Prof^a. Dr^a. Helena Bonciani Nader (UNIFESP/EPM) assim como as amostras de heparina e fucanas biotiniladas. Já as fucanas A e B (não biotiniladas) foram cedidas pelo Prof. Dr. Hugo Alexandre Rocha, da UFRN.

3.6 AÇÃO DAS TOXINAS DO VENENO SOBRE AS CÉLULAS EM CULTURA, NA AUSÊNCIA OU PRESENÇA DOS POLISSACARÍDEOS SULFATADOS

Células endoteliais foram plaqueadas em *multiwell* (Nunc, Naperville, IL, EUA) de 24 poços (15.000 células/poço) e mantidas em cultura (6 dias a 37° C e 5% de CO₂) até atingirem a confluência. Então, as células foram expostas para 40µg/ml de toxinas do veneno (correspondente à quantidade média de veneno inoculado quando da picada) em HAM-F₁₂, sendo mantido por 24 horas. Passadas as primeiras 2 horas, foi adicionado 100µg/ml de polissacarídeos sulfatados (de Glicosaminoglicano ou de fucana), sendo mantido tanto o veneno, quanto o carboidrato pelo restante do tempo. Ao final do ensaio, o meio foi removido, as células foram lavadas por 3 vezes com PBS 0,1M e então fixadas com metanol por 10 min (Temperatura ambiente). Após a fixação as células foram fotografadas em microscópio invertido Leica MPS30 (Leica Microscopy System Ltd., Heerbrugg, Switzerland) e então, coradas com cristal violeta (0,5%) em etanol (20%).

Após lavagem exaustiva com PBS, o corante foi eluído com 0,1M de citrato de sódio em etanol (50%), sendo posteriormente medido a absorbância a 550nm em leitor de ELISA. Assim, a ação protetora dos polissacarídeos pôde ser observadas (fotografada) e também quantificada. Com base nos resultados obtidos, os compostos que melhor apresentaram efeito protetor foram novamente ensaiados, para avaliar se tal efeito é dose dependente, à fim de se determinar a quantidade mínima capaz de promover tal efeito. Assim, diferentes concentrações desses polissacarídeos sulfatados (1, 5, 10, 25, 50, 100 µg/ml) foram testados.

3.7 ELETROFORESES EM GEL DE AGAROSE

O gel de agarose (0,6%) preparado em tampão 1,3 diamino propano acetato (PDA) 0,05M, pH 9,0 é colocado sobre lâminas de vidro medindo (7,5 x 5,0 x 0,2) e (7,5 x

10 x 0,2 cm). Alíquotas de 5 µl de polissacarídeo 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 heparam sulfato, dermatam sulfato e condroitim 4 sulfato). Ao final da corrida eletroforética, os compostos foram precipitados no gel de agarose pela incubação em solução de Cetavlon 0,1%, por um tempo mínimo de duas horas, à temperatura ambiente.

Em seguida o gel foi seco sob à temperatura ambiente e corado com azul de toluidina 0,1%, numa solução de ácido acético 1% e etanol 50%, sendo o excesso de corante removido pela solução na ausência do corante. A seguir o gel foi deixado para secar à temperatura ambiente.

Para verificar a interação do veneno com os polissacarídeos escolhidos, foi realizado uma eletroforese em gel de agarose, porém, em tampão Tris/Acetato 0,05M pH 8,00, o qual permite a separação das moléculas de acordo com suas cargas líquidas.

Assim, as alíquotas dos polissacarídeos foram pré-incubadas com as toxinas do veneno por 1 hora, sendo posteriormente submetidas à eletroforese, conforme descrito acima, buscando no perfil migratório dos mesmos a possível interação do compostos testados, com as toxinas presentes no veneno. Para esta visualização, foi realizada dupla coloração, sendo que após o emprego do azul de toluidina para corar os polissacarídeos (como descrito anteriormente), foi utilizado o corante negro de amido (0,1% em ácido acético 7% por 15min) para corar as proteínas do veneno loxoscélico.

3.8 ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR

As células expostas ou não aos polissacarídeos nas concentrações de 100, 500 e 1000µg/ml, foram analisadas quanto à viabilidade celular. Para tanto, após o período de incubação de 24, 48 e 72h, as células soltas foram coletadas, e seu volume posteriormente reunido com as células que permaneceram aderidas, as quais foram subsequenteiramente soltas com pancreatina. A estimativa do número total de células presentes em cada poço foi realizada por contagem em hemocítômetro. A seguir, o corante Azul de Tripán foi adicionado à suspensão de células na proporção de 1:10 (corante:suspensão de células) e a proporção de células viáveis e não viáveis realizado

em hemocítômetro pelo método de exclusão, no qual as células com a membrana plasmática comprometida coram-se tornando-se azuladas.

3.9 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR

As células da linhagem em questão foram plaqueadas (5×10^4 células) em placas de 24 poços, sendo o volume de cada poço completado para 500ul de meio F₁₂ acrescido de 10% de Soro Fetal Bovino. Após 12h, o meio foi aspirado, as células foram lavadas duas vezes com meio F₁₂ sem soro e foram deixadas nesse meio por 24h para o carenciamento celular e para que todas as células se mantivessem sincronizadas no mesmo período de ciclo celular. O estímulo à proliferação foi dado trocando-se o meio sem soro fetal bovino, por meio F₁₂ complementado com 10% de soro, na presença ou ausência (controle) dos polissacarídeos (fucana A e B), nas concentrações de 10, 50, 100 e 500 µg/ml. A cada 24 horas, meio foi removido, os poços lavados duas vezes com meio F₁₂, as células foram soltas com pancreatina e contadas ao longo de 6 dias.

3.10 ENSAIO DE ADESÃO CELULAR

Placas de multiwell de 24 poços, foram previamente sensibilizadas por 2 horas (37°C, 5% CO₂), com fibronectina diluída em PBS estéril numa concentração de 10µg/ml. Posteriormente, a solução de proteína foi removida dos poços, e estes foram então lavados com PBS estéril. A seguir, os sítios inespecíficos foram então bloqueados com BSA 1%, diluído em PBS estéril por 1 hora (37°C, 5% CO₂) Para controle experimental, foram utilizados poços pré-tratados com BSA 1%. Em duas das placas foi verificado o efeito do veneno sozinho e em presença dos polissacarídeos sulfatos sobre o revestimento de fibronectina, para isso, parte dos poços foram incubados com uma solução de veneno de aranha marrom com uma concentração de 40µg/ml diluído em PBS estéril, outros poços foram incubados tanto com o veneno quanto com os polissacarídeos em questão, e ainda, houve poços incubados somente com os polissacarídeos sulfatados.

O grupo controle foi adicionado somente de meio de cultura, sendo que estas condições foram mantidas por 2 e 12 horas 37°C numa atmosfera de 5% de CO₂. Então, os poços foram lavados com PBS estéril e 4×10^4 células foram soltas e plaqueadas sobre estes poços, sendo mantidas em estufa por 2 horas (tempo suficiente para que as células

consigam aderir ao substrato). Após este período, as células foram lavadas com PBS e submetidas à fixação em metanol por 10 minutos.

Em outras placas, foi observado o efeito do veneno em presença dos polissacarídeos sobre as células em si, para isso, ao invés de fazer o tratamento do revestimento de fibronectina, foi realizado o tratamento das células. Assim, 4×10^4 células foram soltas e ressuspensas em *ependorfs*. Nestes recipientes, as células receberam o tratamento com veneno (40 μ g/ml), ou com veneno e polissacarídeos sulfatados (100 μ g/ml) em conjunto, ou somente com polissacarídeos sulfatados. As células foram deixadas sob leve agitação, à 37°C por 2 ou 12 horas. Após este período, as células foram lavadas com PBS e plaqueadas em placas com o revestimento de fibronectina intacto, onde foram deixadas em estufa por 2 horas e então lavadas com PBS e submetidas à fixação por metanol por 10 minutos.

Depois de serem fixadas, as células foram coradas com Cristal Violeta 0,5% dissolvido em metanol 20% por 20 minutos à temperatura ambiente e só então lavadas 10 vezes com PBS. O corante foi eluído tratando as células com 500 μ l de citrato de sódio 0,1M, 50% em metanol, por 30 minutos. A concentração de corante de cada poço foi quantificada por leitura de absorbância a 550nm, adquiridas em leitor de ELISA. As absorbâncias dos corantes contidos nas células aderidas em cada poço foram expressas em relação ao grupo controle (adesão sobre o BSA). Cada variável foi processada em quintuplicata.

3.11 CINÉTICAS DE DEGRADAÇÃO DE FIBRONECTINA

Os experimentos de cinética de degradação foram realizados pela incubação *in vitro* de soluções de uma proteína de matriz extracelular purificada, na presença de veneno loxoscélico, ou veneno e polissacarídeos sulfatados ou somente polissacarídeos sulfatados. Na análise da degradação de fibronectina, a proporção de enzima/substrato foi 1:100. As incubações foram realizadas nos tempos de 2, 4, 8 e 12 horas a 37°C. O perfil protéico das soluções incubadas foi obtido por experimentos de eletroforese em gel de poliácridamida (SDS-PAGE) sob condições redutoras (Laemmli, 1970). Após a corrida eletroforética, o perfil de degradação das proteínas foi observado por coloração dos géis com corante Azul de Coomassie (Laemmli, 1970).

3.12 ENSAIO DE CITOMETRIA DE FLUXO

Alíquotas de células endoteliais (1×10^6 células/ml) foram separadas em tubos *eppendorfs* somente com meio de cultura F_{12} na presença ou ausência (grupo controle) veneno de aranha marrom ($40 \mu\text{g/ml}$) e de fucana A ou fucana B ($100 \mu\text{g/ml}$). As células foram mantidas sob agitação branda por 2h (37°C a 5% de CO_2). A seguir, as células foram incubadas com anticorpo policlonais IgG anti-toxinas do veneno de *L. intermedia*, produzido em camundongo (1:1000 em PBS contendo 1% de BSA) por 1 hora. Após lavagens com PBS (5 vezes), as células foram incubadas com anticorpo anti-IgG de camudongo, produzido em cabra conjugado FITC (1:250 em PBS-40 mim), sendo posteriormente lavadas por 5 vezes com PBS então submetidas à análise em citometria de fluxo.

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), foi utilizado equipamento da PUC-PR.

3.13 DETEÇÃO DA LIGAÇÃO DAS TOXINAS DO VENENO E DOS POLISSACARÍDEOS SULFATADOS NAS CÉLULAS EM CULTURA

Células endoteliais foram plaqueadas em lamínulas circulares de 13 mm de diâmetro (1×10^4 células por lamínulas), as quais foram mantidas em cultura (37°C a 5% de CO_2) por 3 dias.

Após o período necessário de cultivo celular, as células foram expostas ou não (controle) às toxinas do veneno de aranha marrom ($40 \mu\text{g/ml}$) por 1 hora. Após este período, as células foram expostas simultaneamente aos polissacarídeos sulfatados biotinilados por mais 1 hora em cultura.

Posteriormente, as células foram lavadas com PBS e fixadas com uma solução de paraformaldeído 2% diluído em PBS por 30 minutos e então foram lavadas novamente com PBS, por mais 5 vezes. Os radicais aldeídicos foram bloqueados com uma solução de glicina 0,1 M por 2 minutos, e à seguir, as células foram lavadas com PBS (5 vezes). Após isso, as células foram expostas a anticorpos policlonais IgG anti-toxinas do veneno de *L. intermedia*, produzido em camundongo (1:1000 em PBS contendo 1% de BSA) por 1 hora. Após lavagens com PBS (5 vezes). As células foram incubadas com anticorpo anti-IgG de camudongo, produzido em cabra conjugado FITC (1:250 em PBS).

Ensaio onde as células foram expostas simultaneamente para polissacarídeos sulfatado biotilado, foram também realizados a revelação da ligação destes compostos, pela incubação com estreptavidina conjugada com Texas Red (1:500 em PBS) por 30 minutos. À seguir, 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). O 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.

3.14 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas dos parâmetros de adesão e os dados da contagem absoluta foram realizados utilizando análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey para comparações entre as médias. A análise dos dados de viabilidade do método Trypan também foi realizada utilizando análise de variância (ANOVA), porém, para comparação entre as médias o teste T de Student foi utilizado. O programa GraphPad InStat versão 3.00 para Windows 2000 foi utilizado. Os valores \pm erro padrão da média (EPM) foram utilizados. A significância foi determinada como $P \leq 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 AÇÃO DAS TOXINAS DO VENENO SOBRE AS CÉLULAS EM CULTURA, NA AUSÊNCIA OU PRESENÇA DOS POLISSACARÍDEOS SULFATADOS

Trabalhos do nosso grupo demonstraram claramente a interação das toxinas presentes no veneno de *Loxosceles intermedia* sobre a superfície celular e também a sua ação direta sobre os constituintes da matriz extracelular. Foi demonstrado ainda neste trabalho, que as células expostas ao veneno sofreram progressiva retração e diminuição da adesão célula-célula, evoluindo para evidentes alterações morfológicas (PALUDO *et al.*, 2006). Ainda nesta linha de raciocínio, o grupo também demonstrou em trabalhos anteriores com análise histológica de pele de coelhos inoculados com o veneno de *L. intermedia*, que a parede de seus vasos sofria a perda de adesividade das células endoteliais, sem o comprometimento da viabilidade celular (VEIGA *et al.*, 2001b).

Diante da notória ação destas toxinas do veneno sobre a dinâmica de adesão celular das células endoteliais, e da conhecida interação dos polissacarídeos sulfatados com componentes da matriz extracelular, propusemos neste trabalho investigarmos *in vitro* em células (RAEC), a possível ação protetora destes compostos, frente primeiramente a esta perda de adesividade. Para tanto se faz necessário rastreamos dentre os polissacarídeos existentes e de fácil acesso do grupo, qual ou quais teriam uma possível ação protetora ou atenuante sobre esta ação citotóxica do veneno estes efeitos induzidos pelo veneno.

Para isso, foi realizado um *screening* onde os polissacarídeos sulfatados que apresentassem melhores resultados, seriam escolhidos para a condução deste estudo. Tendo em vista estes efeitos do veneno, foi possível viabilizar um ensaio onde fosse verificado uma possível ação protetora ou atenuante de alguns compostos sobre a perda de adesão das células.

A Figura 6 apresenta os resultados obtidos após os ensaios de adesão celular, e leitura da absorbância do eluente das placas (correspondendo ao número de células aderidas), após exposição ao veneno de *L. intermedia* e aos diferentes polissacarídeos.

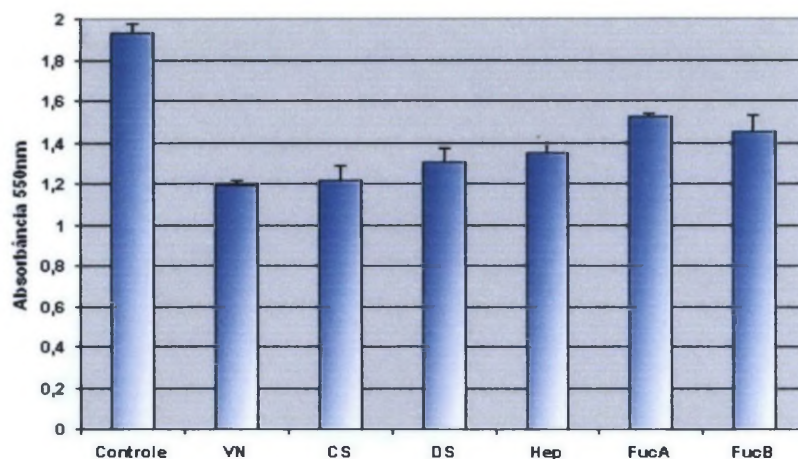


Figura 6 – Seleção do(s) polissacarídeo(s) que apresente(m) maior efeito protetor.

O gráfico representa a absorbância das células que mantiveram aderidas na placa, após 24 horas de incubação com o veneno com os diferentes polissacarídeos.

Como pode ser visualizado na Figura 6, o grupo controle que representa células que não foram incubadas com veneno nem com os polissacarídeos possuem uma alta absorbância, o que significa que muitas células estavam aderidas à placa, sendo este o controle positivo. Observa-se ainda nesta Figura a absorbância representada por VN (equivale a prévia incubação das células com veneno). Note também que (VN) é a absorbância mais baixa aqui observada, indicando a grande perda de adesão imposta pela ação do veneno. Posteriormente quando as células eram tratadas com veneno e após incubadas com os polissacarídeos sulfatados, verifica-se sempre um aumento da quantidade de célula que mantinham-se aderidas à placa, porém, este aumento se deu em diferentes intensidades. Para o condroitin sulfato (CS), por exemplo, o aumento foi pouco expressivo. Este perfil de absorbância semelhante a da absorbância do veneno (VN), pode ter sido obtida devido, ao veneno ter possivelmente hidrolisado a cadeia polissacarídica do condroitin sulfato.

Já para o Dermatom Sulfato (DS) e para a heparina (Hep), dentre os glicosaminglicanos aqui empregados (CS/DS/Hep) foram os que apresentaram maior perfil protetor, demonstrando manter um aumento de adesão celular, quando comparado com o grupo exposto apenas às toxinas do veneno (VN). Ainda para este trabalho lançamos mão além dos glicosaminoglicanos, o emprego de demais polissacarídeos, estes extraídos de algas, as fucanas. Ao compararmos os resultados da possível ação protetora destes polissacarídeos, sem dúvida fica evidente que as fucanas se mostraram bem mais efetivas quanto a esta ação protetora, mantendo uma ordem crescente de ação protetora (aumento da adesividade) primeiramente para a Fucana A (FucA) e posteriormente para a Fucana B (FucB). Todas estas afirmações se tornam mais

concretas quando observa-se as fotos da Figura 7, onde uma comparação visual do efeito protetor destes polissacarídeos pode ser estabelecida.

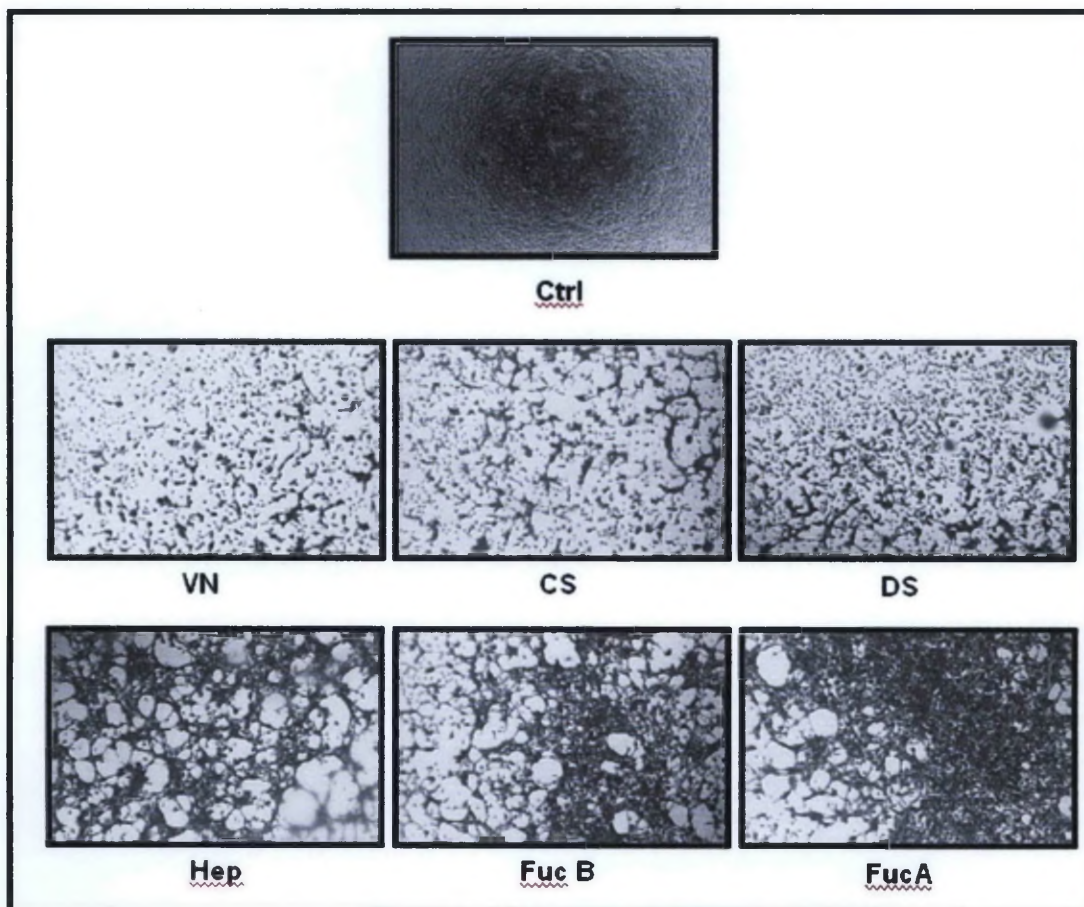


Figura 7 – Fotos comparativas que ilustram o efeito protetor dos polissacarídeos sobre a ação das toxinas do veneno em células endoteliais. Aumento 100x.

Sendo assim percebe-se uma possível ação protetora ou inibitória destes polissacarídeos sobre as ações enzimáticas do veneno, sendo que estas serão as substâncias que nortearão os posteriores ensaios aqui descritos.

Escolhidos os polissarídeos que foram os mais efetivos em atenuar os efeitos induzidos pelo veneno (FucA, FucB e Hep) é imprescindível padronizar a dose ideal de uso destes polissacarídeos a partir da qual estes efeitos protetores sejam expressivos.

Sendo assim foram testadas doses de 1, 5, 10, 25, 50 e 100 μ g/ml dos polissacarídeos em questão. Observamos que a dose de 100 μ g/ml foi a mais efetiva para os objetivos propostos a seguir (dados não mostrados).

4.2 ELETROFORESES EM GEL DE AGAROSE

Após a seleção da melhor dose dos polissacarídeos sulfatados com ação protetora sobre as toxinas do veneno de *L. intermedia*, se fez necessário nesta fase do trabalho caracterizá-los quanto às suas propriedades eletroforéticas (Figura 8) e posteriormente passamos a verificar se existe interação entre os mesmos e o veneno loxoscélico (resultados posteriores Figura 9).

Dados da literatura demonstram que após a extração e purificação de polissacarídeos sulfatados de algas *Padina gymnospora*, *Dictyota mertenis* e *Sargassum vulgare* estes representam três populações distintas de fucanas, denominadas fucanas A, B ou C de acordo com sua mobilidade eletroforética em tampão de PDA, pH 9,0 (ROCHA, 2002). Em 1998, foram extraídos os polissacarídeos da alga *Spatoglossum schroederi*, onde foi demonstrada a existência das três populações de fucanas: A, B e C. Sendo que, em eletroforese de gel de agarose (PDA), a migração das bandas relativas a estas fucanas obedecem ao padrão crescente de fucana A, B e C. Na Figura 8 apresentamos o perfil eletroforético em gel de agarose, tampão PDA das fucanas A e B empregadas para os ensaios a serem realizados. Não apresentamos aqui o perfil eletroforético da fucana C pois não foi utilizada para o presente este estudo.

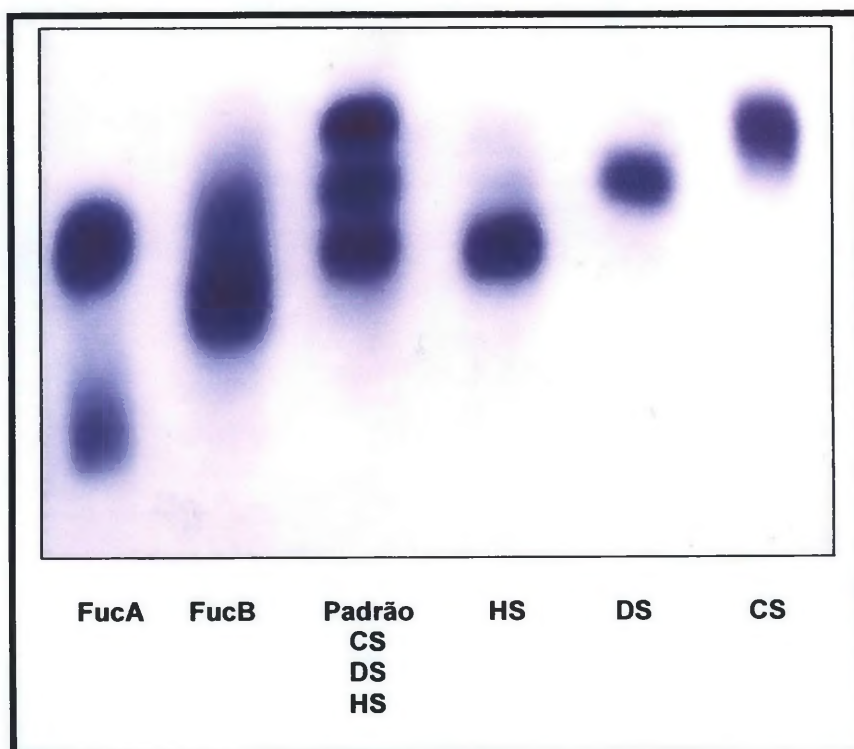


Figura 8 – Caracterização das Fucanas A e B

A revelação das bandas de migração aqui demonstradas e separadas pela eletroforese, é obtida pela atividade metacromática característica de cada composto. Os compostos ricos em sulfato, desenvolvem uma coloração roxa característica.

Pode-se observar a migração das bandas A e B, características das fucanas de *Spatoglossum schroederi* as quais recebem tais denominações.

A literatura descreve que muitas das propriedades funcionais e farmacológicas destes polissacarídeos sulfatados, dependem da interação dos polissacarídeos com diferentes proteínas (KJELLÉN E LINDAHL, 1991). Esta interação, geralmente, é de natureza eletrostática. A Heparina e o heparam sulfato, por exemplo, são capazes de se ligar a várias proteínas da matriz extracelular como fibronectina, vitronectina, trombospondina (BERGE *et al.*, 1999), colagenos tipo I, III and V (DELACOUX *et al.*, 1998) e tenascina (LANE, 1989). Nos últimos anos, a maioria dos trabalhos publicados sobre fucanas se detiveram nas atividades farmacológicas daquelas que apresentavam características estruturais mais conhecidas, como os “fucoidans” de *A. nodosum* e *F. vesiculosus*, ou as que apresentassem atividade anticoagulante. Sendo esta característica de extrema relevância para este projeto, visto que o veneno de *L. intermedia* induz um quadro maciço de coagulação intravascular disseminada. Contudo, alguns trabalhos ainda apresentam dados relevantes frente a sua ação farmacológica com relação a características químicas e estruturais de fucanas extraídas de diversas algas. Os dados indicaram também, que as atividades farmacológicas das fucanas estudadas não estão simplesmente relacionadas com as suas massas moleculares e grau de sulfatação mas também, com a posição e quantidade dos resíduos de sulfato nesta molécula (Medeiros, Trindade, Rocha, Nader – artigo em elaboração).

Visto que a carga predominante das toxinas presentes no veneno de *L. intermedia* são quase que na sua totalidade positivas, somente pelo fato de serem as fucanas altamente negativas, como mencionado acima, estas poderiam por si só se acoplarem a estas toxinas, e serem passíveis de atenuar os característicos quadros clínicos, pela simples interação entre estas cargas.

A Figura 9 ilustra a interação que foi observada entre os polissacarídeos utilizados neste estudo e o veneno de aranha marrom.

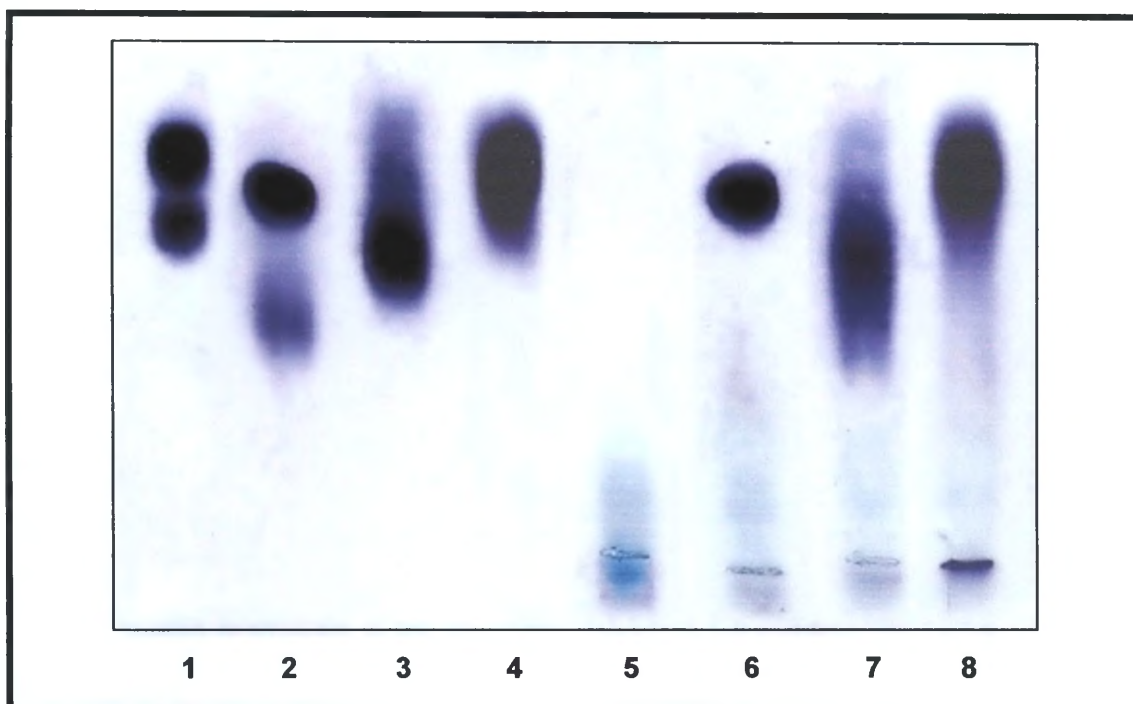


Figura 9 – Interação dos polissacarídeos sulfatados com o veneno loxoscélico.

Os polissacarídeos são corados em violeta e o veneno em azul. (1) padrão (CS, DS e HS, sendo que CS e DS migram em conjunto); (2) Fucana A; (3) fucana B; (4) Heparina; (5) veneno; (6) Fucana A e veneno; (7) Fucana B e veneno; (8) Heparina e veneno

Pode-se perceber neste ensaio a presença da banda do veneno quando este foi aplicado sozinho no gel, porém, quando em presença de algum dos polissacarídeos sulfatados, a banda de migração do veneno aumentava seu arrasto (alteração no perfil eletroforético) e diminuição de intensidade, mostrando uma possível interação deste com os polissacarídeos em especial para fucana B e veneno (7) e heparina (8). Visto esta propriedade dos polissacarídeos, não se sabe se a interação se dá unicamente por cargas ou se existe alguma especificidade, o que poderá ser revelado com estudos mais aprofundados. Em todo caso, a possibilidade de interação entre o veneno e outra substância que possui potencial de ser utilizado como fármaco, abre grandes possibilidades científicas que maximizam o interesse deste estudo.

4.3 ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR

Nesta fase do trabalho passamos a investigar a possível ação citotóxica das fucanas, pois, de nada adiantaria utilizar um fármaco que trouxesse uma possível ação benéfica frente a uma investigação qualquer (sendo no nosso caso, o efeito específico desta sobre a dinâmica de adesão celular) mas que este possível fármaco fosse ao

mesmo tempo citotóxico na dose ideal de uso. Tendo isto em vista, buscou-se verificar a possível ação de citotoxicidade das fucanas, a fim de viabilizar seu uso como fármaco.

Apesar do fato de que atualmente mais e mais propriedades farmacológicas têm sido atribuídas as fucanas, não se sabe se tal substância terá qualquer efeito colateral sobre a linhagem empregada para este estudo. Assim, foi feito o ensaio de viabilidade pelo método de azul de Tripán. Com este ensaio preliminar, foi possível constatar a não citotoxicidade das fucanas quando incubadas com as células endoteliais de aorta de coelho, tanto frente às doses ou tempos de emprego, como é demonstrado nas Figuras abaixo.

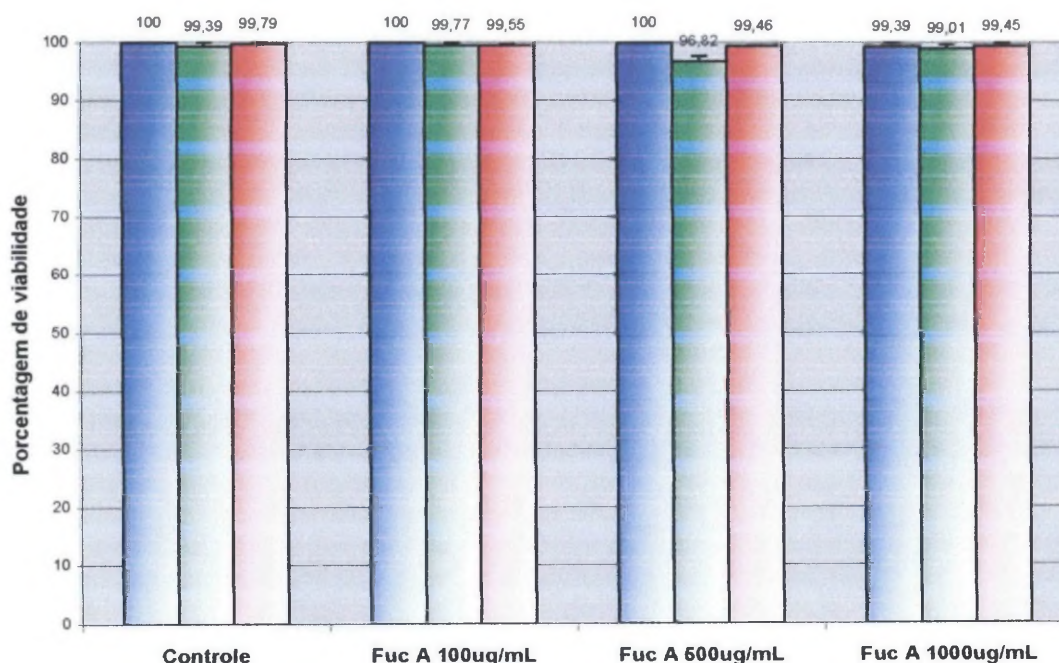


Figura 10 – Porcentagem de viabilidade de diferentes concentrações de fucana A. (24h) representado pelas barras azuis; (48h) pelas barras verdes; e (72h) pelas barras vermelhas.

A Figura acima demonstra a viabilidade das células endoteliais de aorta de coelho quando incubadas com Fucana A por 24, 48 e 72 horas. Como pode se observar, a viabilidade do grupo controle sofreu uma inexpressiva baixa com o desenrolar das 72 horas, sendo que no período de 48 horas foi observada a viabilidade mínima (99,39%), ou seja, não há citotoxicidade celular.

Em relação às fucanas, a porcentagem de viabilidade foi mantida quase sempre em torno de 100%. Quando as células foram tratadas com 100 µg/ml de fucana A, foi

observado a viabilidade mínima em 72h, mas ainda assim, havia 99,55% de células viáveis. Em relação ao tratamento com 500 $\mu\text{g/ml}$ do polissacarídeo, observou-se a menor viabilidade em 48h, com um total de 96,82% de células viáveis. Esta foi a viabilidade mais baixa em todo o ensaio, entretanto, no tempo de 72h nesta mesma concentração de polissacarídeo, a viabilidade aumenta em relação às 48h, alcançando 99,46% de células viáveis. O esperado seria uma diminuição da viabilidade com o passar o tempo, pois teoricamente deve haver mais células mortas em 72h que em 48h. Porém, este mesmo evento foi observado no grupo controle, onde a viabilidade de 48h é menor que em 72 h.

Em relação à concentração de 1000 $\mu\text{g/ml}$, a viabilidade das células ainda se manteve alta. A mais baixa porcentagem de viabilidade nesta concentração se deu em 48h, com um total de 99,01% de células viáveis, desta forma e para os padrões de segurança deste método, e aceitos na literatura (>90%) não há nenhum resquício de citotoxicidade com estas doses e tempos aqui propostos.

Em relação à fucana B, a Figura abaixo determina quais foram as porcentagens de viabilidade das células endoteliais quando em presença de diferentes concentrações de fucana B em diferentes tempos.

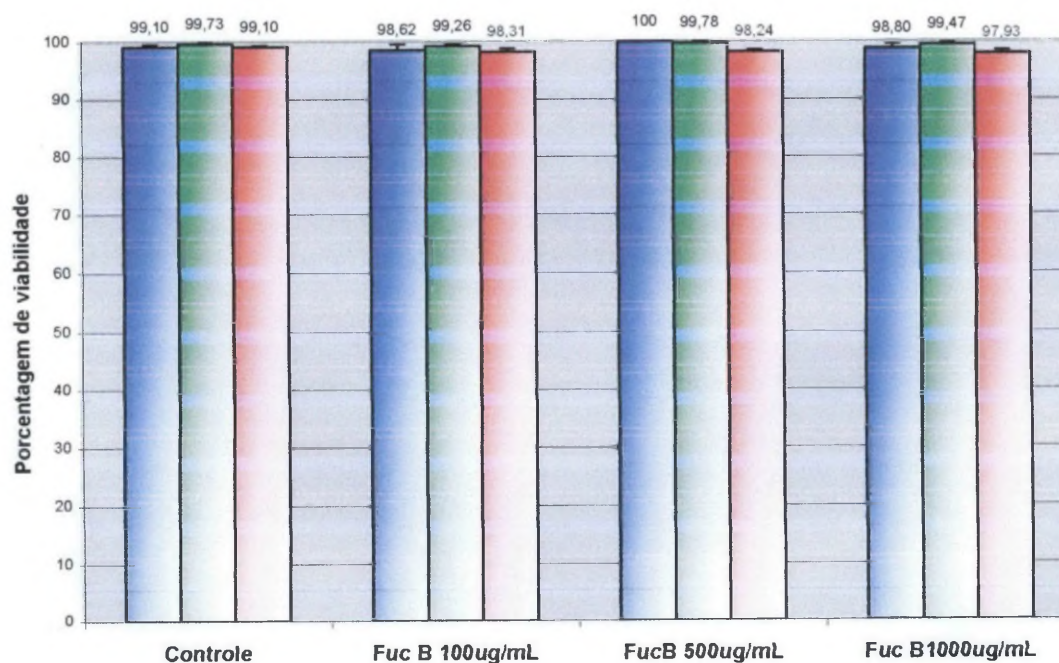


Figura 11 – Porcentagem de viabilidade de diferentes concentrações de fucana B. (24h) representado pelas barras azuis; (48h) pelas barras verdes; e (72h) pelas barras vermelhas.

Como podem ser observadas na Figura acima, as viabilidades do grupo controle se mantiveram em torno de 99,10% nas primeiras 24h e nas 72h. Houve um aumento de viabilidade no grupo das 48h, caracterizando 99,73%. Quando as células foram incubadas com fucana B na concentração de 100 µg/ml, a viabilidade se manteve alta, sendo que a menor porcentagem se mostrou em 72h, ainda assim com um total de 98,31%. Igualmente, em relação à viabilidade das células incubadas com fucana B na concentração de 500 µg/ml, se manteve alta, mostrando também a menor viabilidade em 72h, com um total de 98,24%. E ainda assim, quando as células foram incubadas com fucana B na concentração de 1000 µg/ml, a viabilidade das células também se manteve relativamente alta, mostrando um mínimo no tempo de 72h, com uma porcentagem de 97,93% de células viáveis.

O ensaio determinou que as fucanas A e B não apresentam qualquer risco em relação a viabilidade das células endoteliais de aorta de coelho. A viabilidade não foi alterada, se mantendo quase sempre em torno de 100%. A dose de fucana empregada, mesmo quando esta dose é extremamente alta, e o tempo que estes polissacarídeos agem sobre as células parecem não ter qualquer influência de toxicidade neste tipo celular.

4.4 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR

Resultados preliminares do nosso grupo demonstraram que veneno de *Loxosceles intermedia* não apresenta ação sobre a dinâmica de proliferação celular frente as linhagens até o momento estudadas. Para verificar a possível atividade das fucanas sobre a proliferação deste tipo celular, células endoteliais de aorta de coelho foram expostas continuamente a diferentes concentrações de fucanas (10, 100 e 500 µg/ml) durante 6 dias. Posteriormente, as células eram soltas sob ação enzimática (pancreatina) e submetidas à contagens diárias (1º dia, 2º dia, 3º dia e assim em diante). Os nossos resultados demonstraram o que pode ser visualizado nos gráficos abaixo (Figuras 12 e 13).

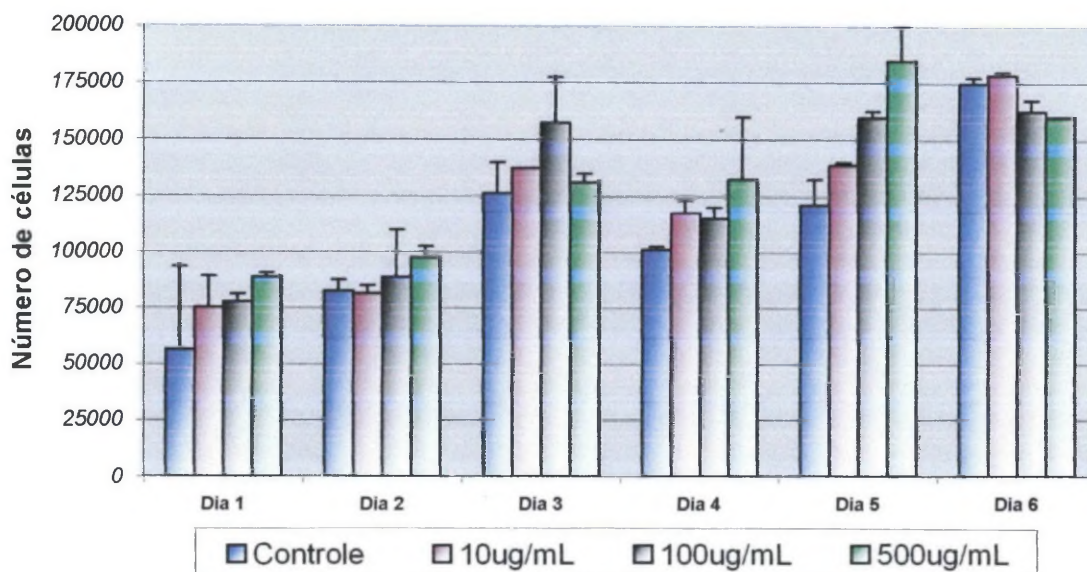


Figura 12 – Proliferação das células endoteliais de aorta de coelho quando expostas com Fucana A em diferentes concentrações por 6 dias.

Em relação a fucana A, de acordo com os resultados obtidos na Figura acima, não se verificou a ocorrência de um possível efeito anti proliferativo quando as células foram expostas a diferentes concentrações de fucana. Durante o 1º, 3º e 5º dias pode-se perceber uma maior proliferação das células que foram incubadas com fucana (em relação aos grupos controle), no entanto, não é verificado qualquer indicio de que esse possível aumento na proliferação das células tenha relação com a concentração utilizada de fucana, já que no 3º dia por exemplo, o grupo de células incubado com 100 µg/ml de fucana apresentou uma maior proliferação que o grupo incubado com 500 µg/ml. Não existe um padrão estabelecido ou que seja identificável. Assim como no 2º e 6º dia, os grupos controle apresentaram uma proliferação maior que os seus respectivos grupos que foram incubados com fucana. Desta forma percebe-se pelos resultados da Figura acima exposta, que mesmo em doses elevadas, a incubação das células endoteliais de aorta de coelho com fucana A não mostra ação inibitória ou estímulo da proliferação celular.

Quando as células endoteliais foram expostas à fucana B em condições semelhantes às apresentadas para a fucana A, obteve-se o seguinte resultado, observe a Figura abaixo.

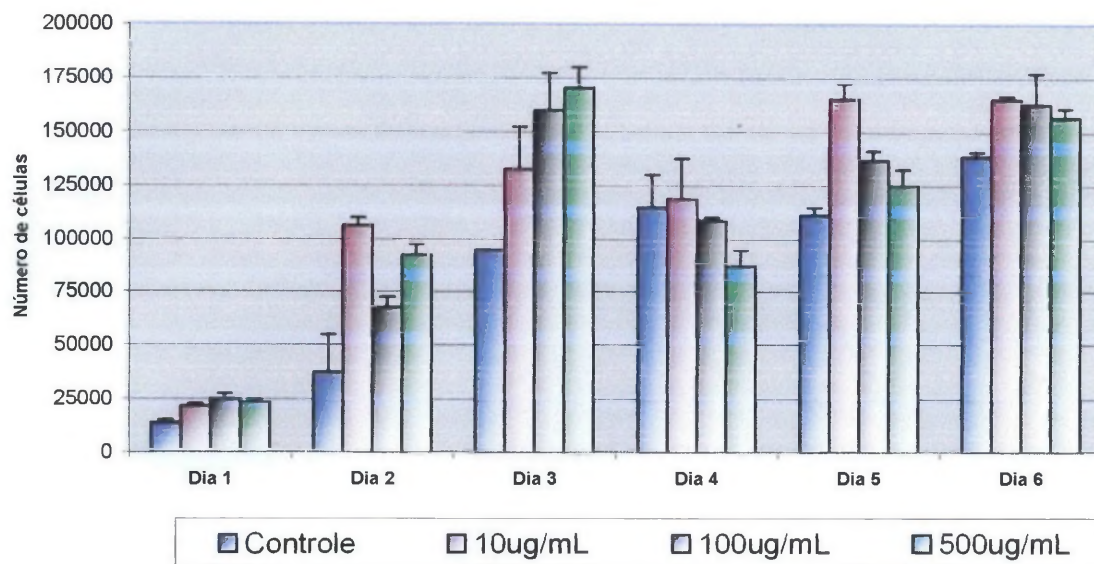


Figura 13 – Proliferação das células endoteliais de aorta de coelho quando expostas com Fucana B em diferentes concentrações por 6 dias.

Novamente, observa-se que não houve qualquer efeito anti proliferativo da fucana B em relação às células endoteliais de aorta de coelho. Os grupos controle mostraram um aumento gradual na proliferação das células com o passar dos dias, assim como nos grupos que foram incubados com fucana B em diferentes concentrações. Neste caso também não foi possível distinguir qualquer padrão nítido de proliferação das células quando incubadas com esta fucana, pois não existe relação com a dosagem de polissacarídeo empregada.

As duas fucanas não apresentaram atividades antiproliferativa frente as células endoteliais de aorta de coelho. Sabe-se que a fucana B apresenta um efeito estimulatório da síntese de heparan sulfato (ROCHA, 2002), e que este sabidamente tem ação direta sobre inúmeras dinâmicas celulares, e que com isso este poderia atuar nesta dinâmica. Nossos resultados claramente indicam que esta estimulação de liberação de heparan sulfato não está relacionado com uma possível alteração da proliferação celular. Sendo assim, percebe-se que ao longo dos 6 dias houve um aumento na proliferação celular, em todos os grupos, tanto nos grupos controle quanto nos grupos que foram incubados com fucana A e B, sendo que o uso destes polissacarídeos em ensaios *in vitro* não atua sobre o processo de proliferação celular, o que seria crucial pois o possível fármaco com estas possíveis características em muito poderia comprometer a homeostase tecidual quando empregado *in vivo* (degeneração ou câncer).

4.5 ENSAIO DE ADESÃO CELULAR

Para verificarmos se a perda de adesividade das células RAEC eram decorrentes de uma ação direta das toxinas do veneno sobre a superfície celular ou sobre a ação degradativa da matriz extracelular ou de ambas, passamos a investigar através dos seguintes ensaios: ensaios de adesão celular na presença e na ausência dos polissacarídeos sulfatados sobre uma matriz de fibronectina (quando exposta ao veneno). Para tanto, os ensaios de adesão enfocaram não só a ação do veneno sobre a molécula de matriz, mas também uma possível ação direta sobre as próprias células induzindo a perda de adesividade. Estas variáveis certamente esclarecem em parte o efeito observado histologicamente da perda de adesividade das células endoteliais dos vasos depois de expostas as toxinas, e desta forma passaremos a partir deste resultado termos esclarecido ou elucidado a real ação protetora ou inibitória destes polissacarídeos sobre esta adesão celular. Com isso, é possível obter subsídios para relacionar a ação do veneno sobre a molécula de matriz extracelular utilizada (fibronectina), ou se há ação destas toxinas diretamente sobre a própria superfície celular ou sobre ambas (superfície e matriz extracelular), e se os próprios polissacarídeos realmente possuem um possível efeito atenuador ou mesmo bloqueador sobre estas efetivas ações de perda de adesão.

De acordo com os resultados, pode ser comprovado o efeito protetor das fucanas e da heparina sobre a característica perda de adesão induzida pelo veneno nas células endoteliais de aorta de coelho. As Figuras abaixo demonstram tais resultados.

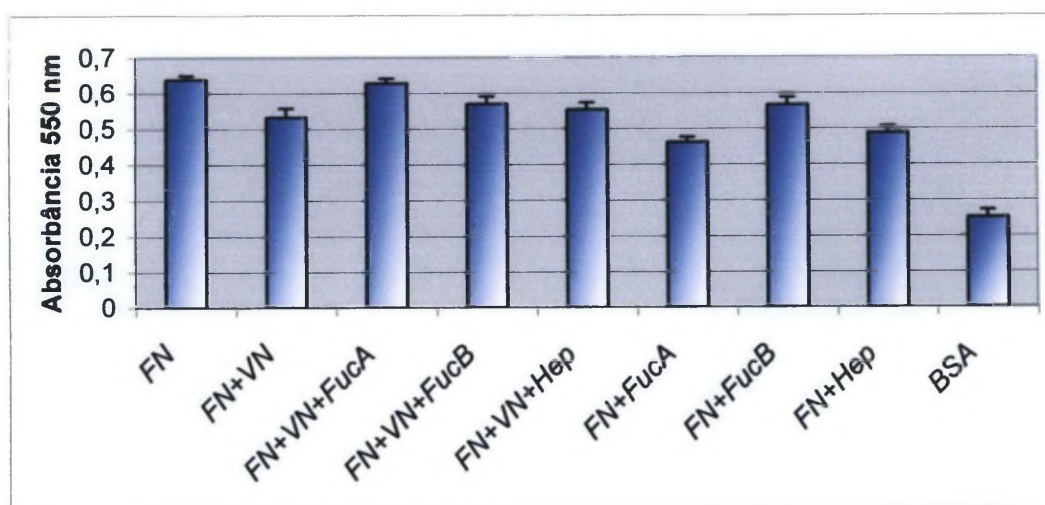


Figura 14 – Absorvância das células aderidas sobre fibronectina degradada por 2 horas.

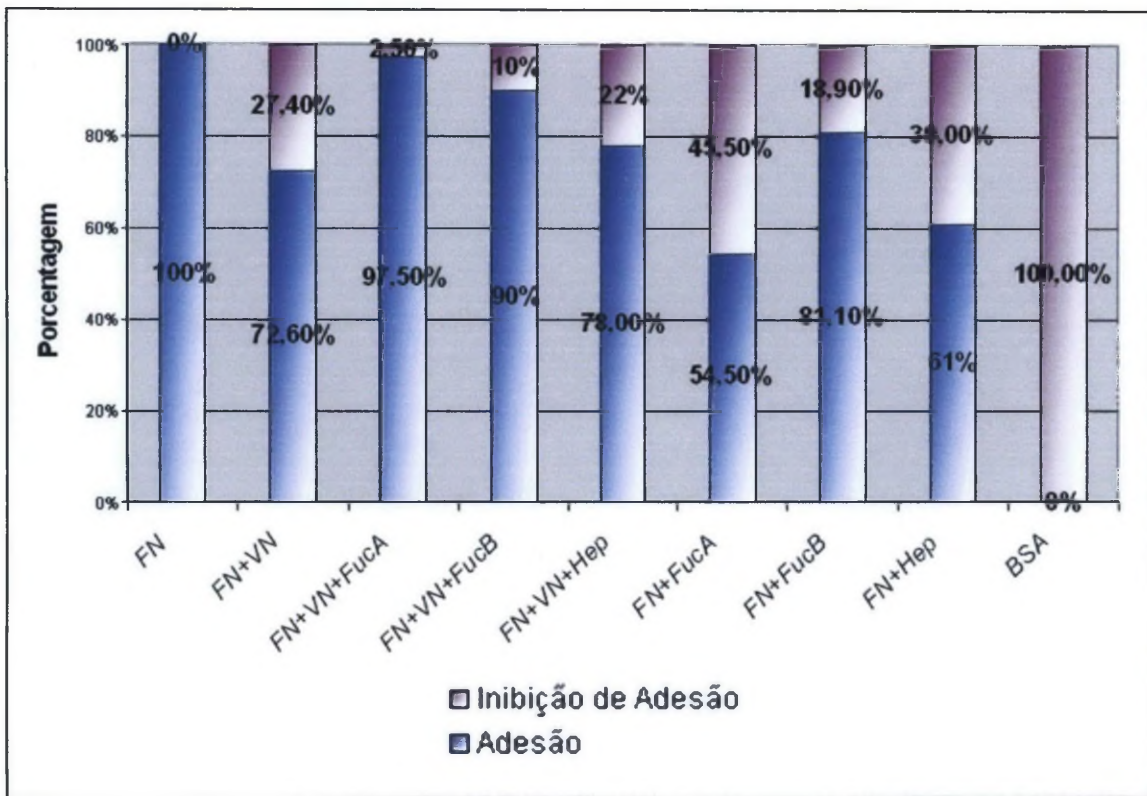


Figura 15 – Porcentagem da adesão e inibição de adesão das células sobre fibronectina degradada por 2 horas.

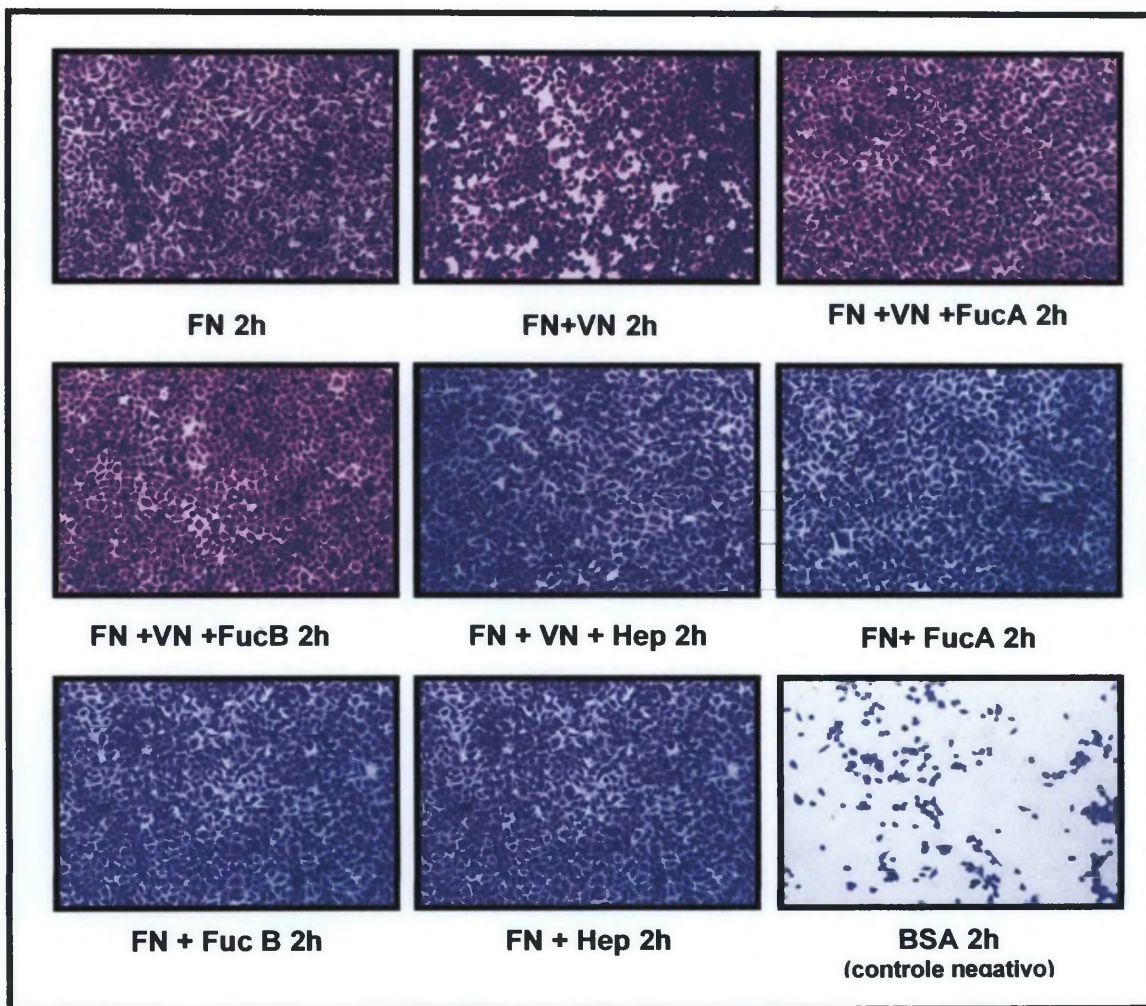


Figura 16 – Imagem fotográfica das células da linhagem RAEC que permaneceram aderidas à matriz de fibronectina degradada por 2 horas, na presença ou não dos polissacarídeos. Aumento 100x.

As Figuras mostram que houve uma inibição de 27,40% da adesão das células quando a matriz de fibronectina era exposta ao veneno por 2 horas. Porém, quando esta degradação era feita pelo veneno em presença de fucana A, por exemplo, houve uma significativa diminuição da inibição de adesão, sendo que a fucana A proporcionou um aumento da adesão das células em relação ao grupo que havia sido exposto somente ao veneno (Figura 15). Tal efeito protetor manteve-se presente para os três polissacarídeos em estudo (Fuc A, B e Hep): todos mostraram um aumento da adesão das células em relação ao grupo que havia sido colocado para aderir sobre a fibronectina degradada. A fucana A foi a que apresentou um efeito protetor mais intenso, evidenciando uma inibição

de adesão de apenas 2,5%, enquanto a fucana B exibiu uma inibição de 10% e a heparina mostrou uma inibição de 22% respectivamente.

Pode-se observar também, que quando a matriz de fibronectina era incubada somente com os polissacarídeos, houve um aumento da inibição de adesão das células, mais intenso até mesmo que a inibição de adesão proporcionada pelo próprio veneno de aranha marrom, no caso da Fuc A e Hep (inibição de 45,5% e 30% respectivamente). Este fato é explicado pelo local onde estes compostos se ligam, que é a matriz extracelular. Provavelmente, após 2 horas de incubação destes compostos numa matriz de fibronectina, muitos dos sítios de ligação usados por estes polissacarídeos sobre a fibronectina estavam ocupados, sendo que quando as células endoteliais foram colocadas para aderir nesta mesma matriz, uma menor proporção de células puderam aderir, devido a esta prévia ocupação dos sítios de ligação para adesão celular.

Em 12 horas, os efeitos observados foram semelhantes, porém, em menor intensidade, como pode ser visualizado nas seguintes figuras:

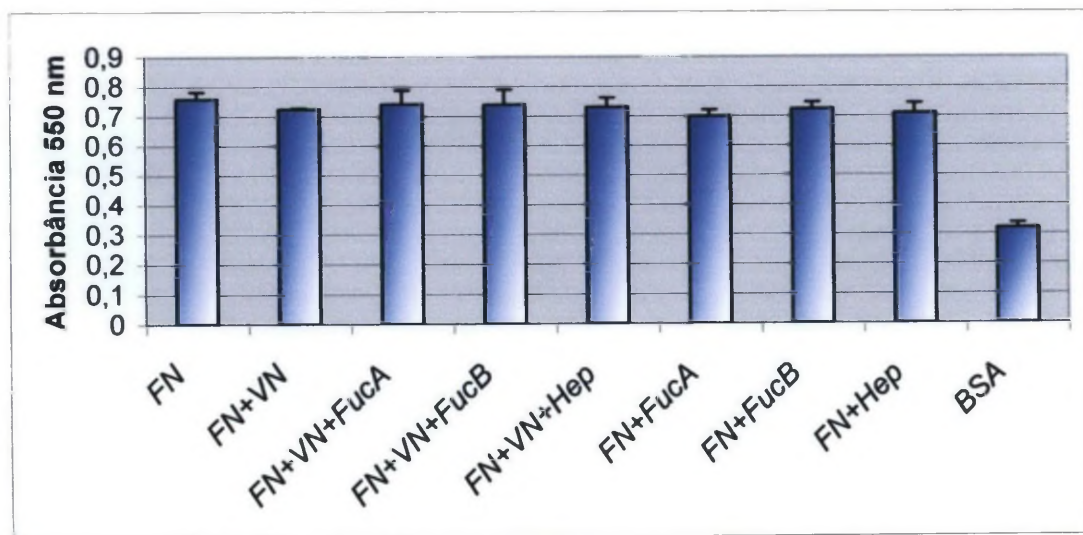


Figura 17 – Absorbância da adesão das células sobre fibronectina degradada por 12 horas.

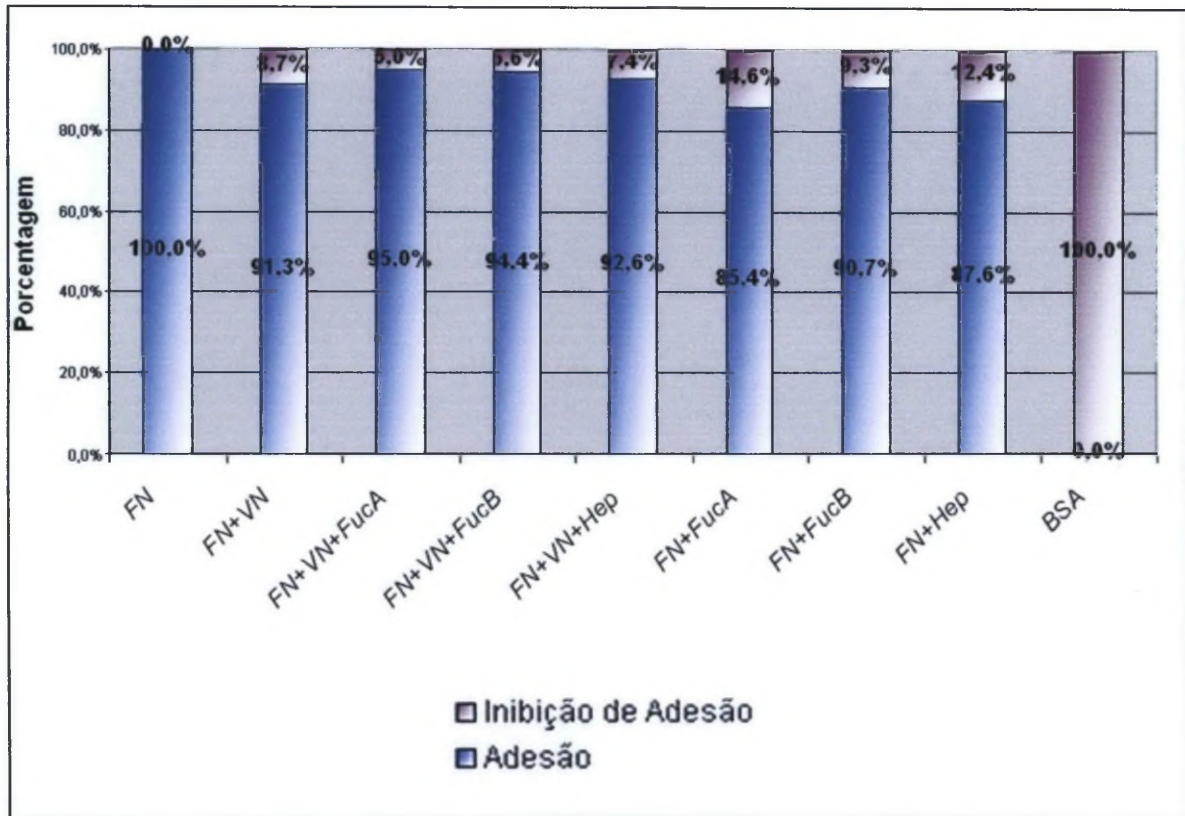


Figura 18 – Porcentagem de adesão e inibição de adesão das células sobre fibronectina degradada por 12 horas.

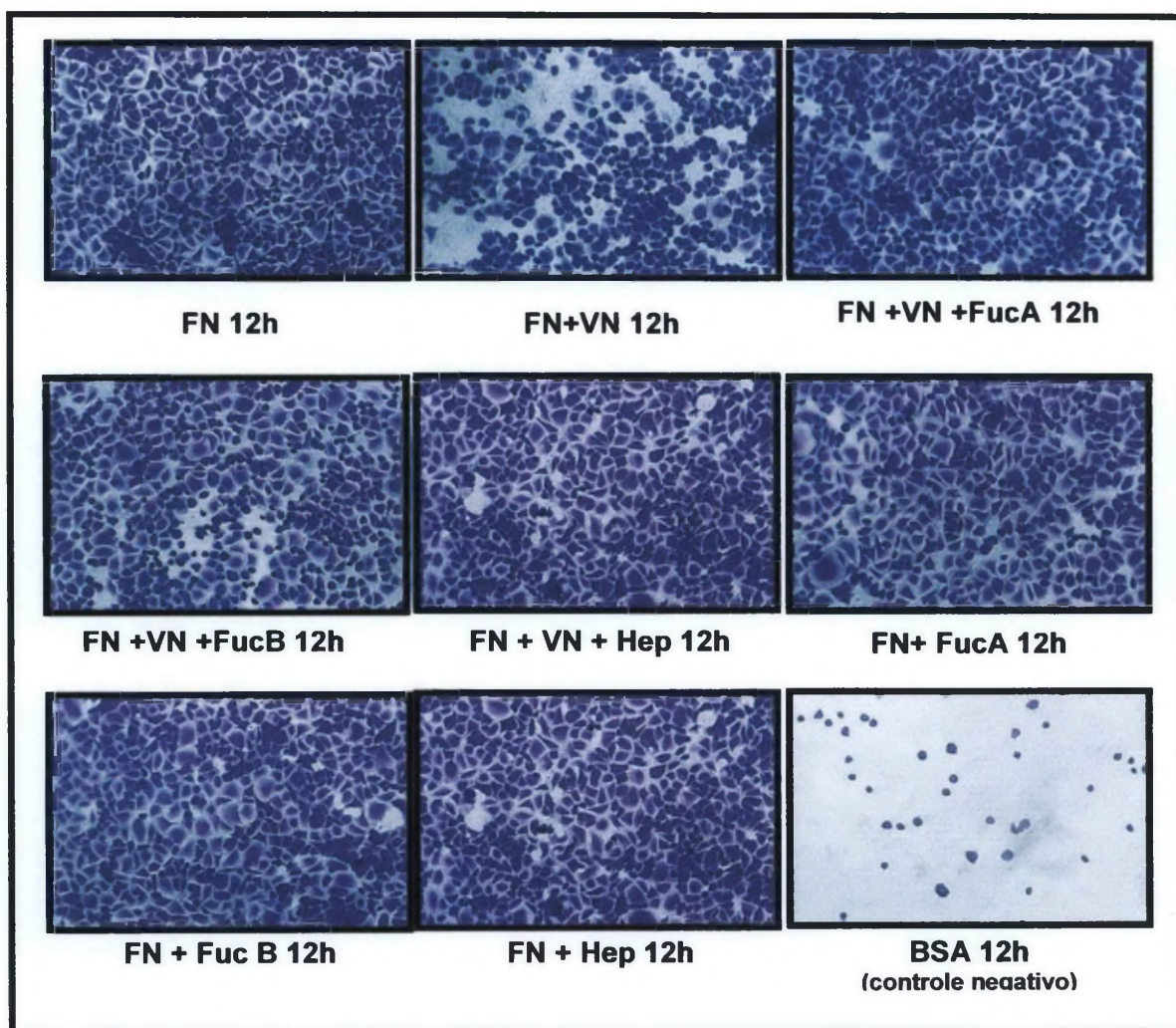


Figura 19 – Imagem fotográfica das células da linhagem RAEC que permaneceram aderidas à matriz de fibronectina degradada por 12 horas, na presença ou não dos polissacarídeos. Aumento 100x.

Novamente foi possível constatar que a matriz de fibronectina incubada com veneno na presença dos polissacarídeos permitiu uma maior adesão de células em relação à matriz incubada somente com o veneno. Apesar da discreta variação, pois quando foi verificada a ação do veneno sozinho, houve uma inibição de adesão de 8,7%, ainda assim, a FucA mostrou a maior ação minimizadora desta perda de adesão, exibindo 5,0%, seguida da FucB 5,6% e Hep 7,4%.

Novamente observou-se uma ação mais intensa da inibição de adesão quando a matriz de fibronectina era incubada somente com os polissacarídeos em questão. Tal fato se deve aos mesmos motivos já explicados anteriormente.

Isso mostra que os polissacarídeos possuem um efeito protetor sobre a adesão em fibronectina, a qual é uma molécula da matriz extracelular presente *in vivo* e é também sintetizada pela linhagem endotelial de aorta de coelhos. Logo, é possível de se imaginar que o papel protetor destes polissacarídeos seja devido à interação do veneno com os polissacarídeos em si, diminuindo a ação destas toxinas sobre a matriz extracelular ou uma ligação destes polissacarídeos diretamente sobre a matriz de fibronectina, impedindo ou minimizando a ação também das toxinas do veneno de forma a termos um impedimento físico.

Por sabermos que há uma interação direta do veneno sobre a superfície celular, passamos aqui a investigar se estes polissacarídeos restabelecem uma ação protetora frente a esta dinâmica. Desta forma, submetemos a linhagem endotelial ao seguinte ensaio: as células eram incubadas previamente com veneno e com os respectivos polissacarídeos e então colocadas para aderir sobre uma matriz de fibronectina “intacta”. Desta forma, a ação protetora seria sobre a “célula” e não uma ação protetora da degradação da fibronectina como apresentado nos resultados anteriores.

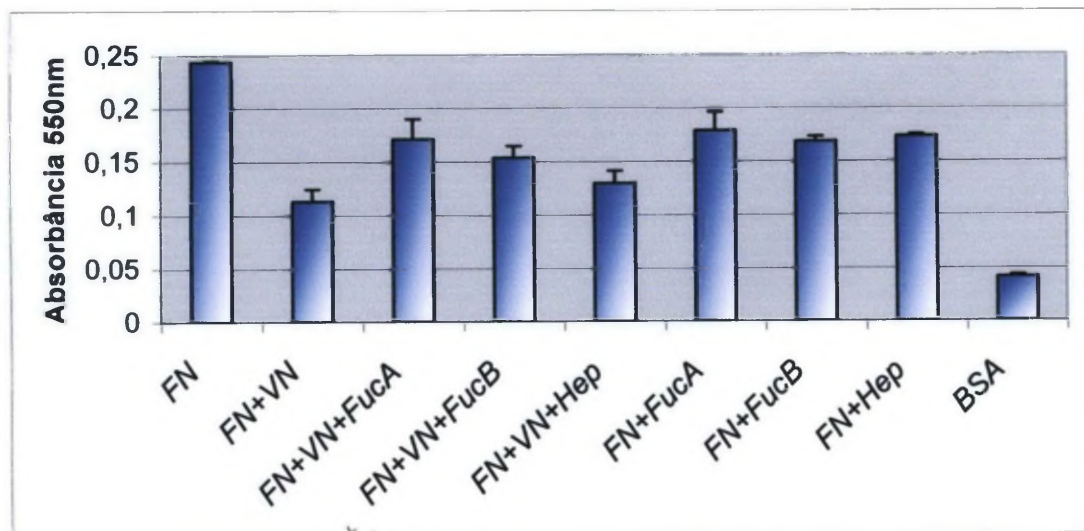


Figura 20 – Absorbância da adesão das células tratadas com veneno e polissacarídeos sulfatados sobre fibronectina intacta por 2 horas.

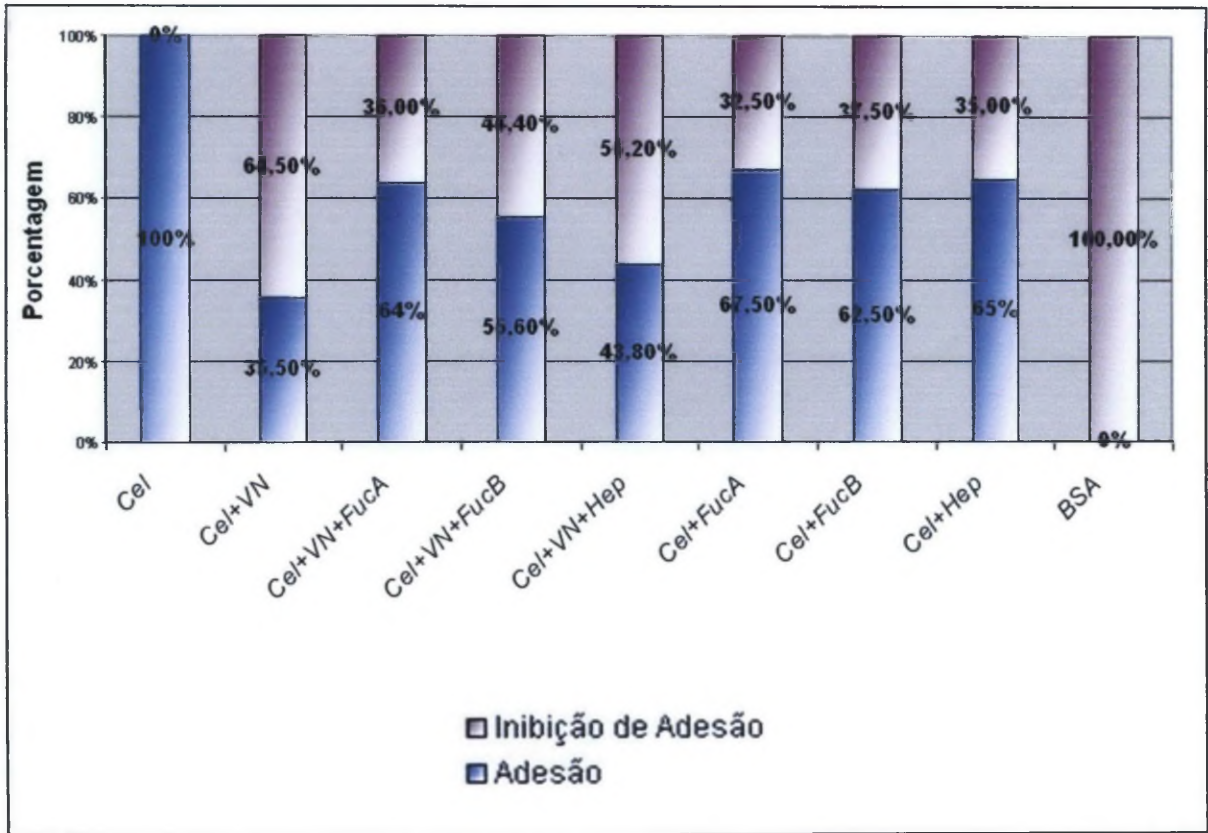


Figura 21 – Porcentagem da adesão e inibição de adesão das células tratadas com veneno e polissacarídeos sulfatados sobre fibronectina intacta por 2 horas.

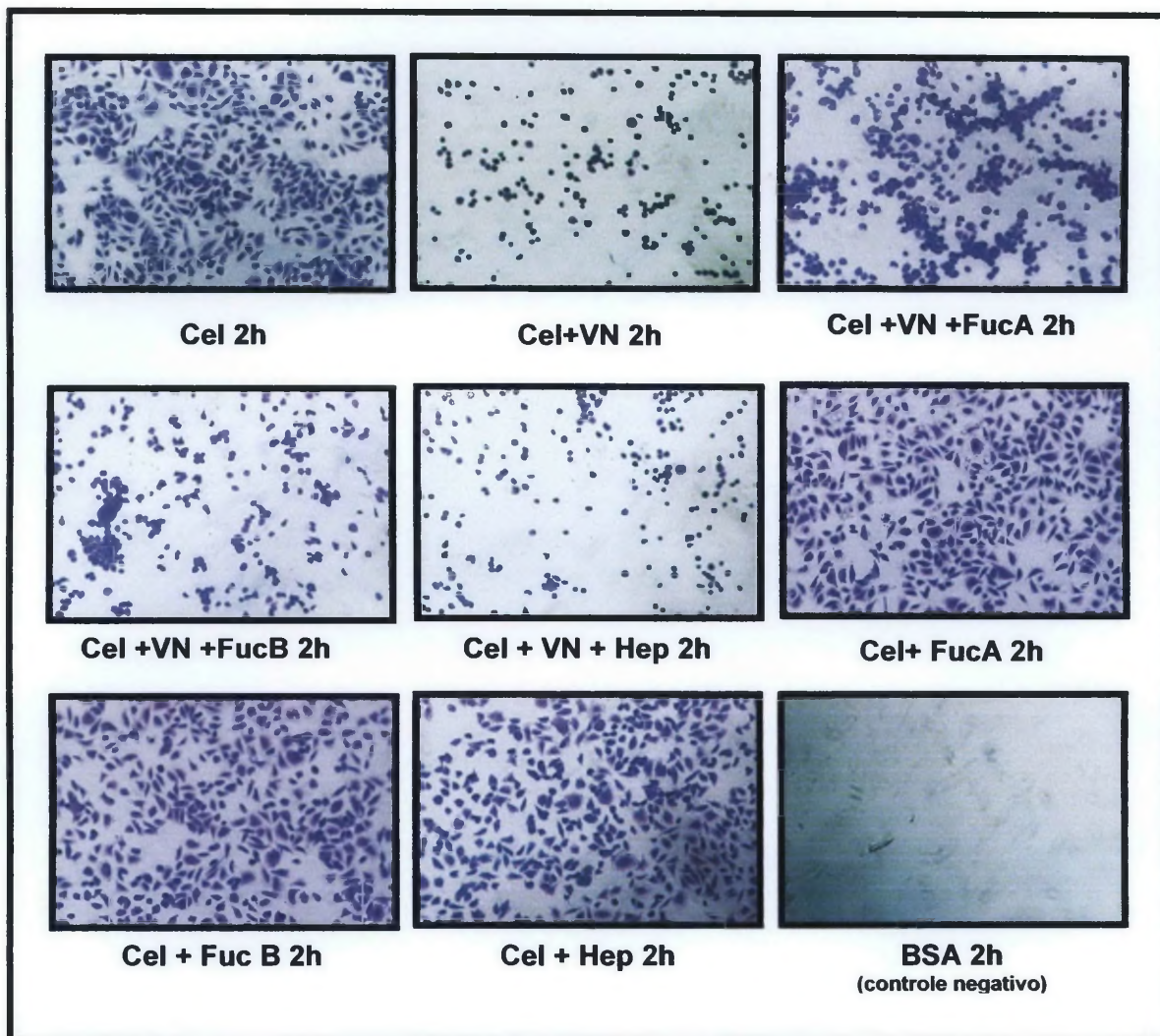


Figura 22 – Imagem fotográfica das células da linhagem RAEC que permaneceram aderidas à matriz de fibronectina após serem tratadas com veneno, na presença ou não dos polissacarídeos por 2 horas. Aumento 100x.

Constata-se pelas Figuras acima, que quando as células são tratadas diretamente com o veneno, uma menor parcela de adesão é observada mesmo no grupo controle. Neste ensaio de 2 horas, percebeu-se que a FucA foi capaz de aumentar a adesão das células em relação ao grupo das células tratadas somente com veneno em quase metade, exibindo uma inibição de adesão de 36,0%, visto que o grupo tratado com veneno mostrou uma baixa quantidade de células aderidas, com uma inibição de 64,5%.

Obervou-se também que quando as células foram tratadas somente com os polissacarídeos em questão por 2 horas, a inibição de adesão foi menor, indicando uma maior adesão de células. Isso se explica pelo motivo de que tais polissacarídeos

estimulam a biossíntese de heparam sulfato em células endoteliais. Este glicosaminoglicano está diretamente associado em diversos processos celulares, entre eles, a adesão celular, através de proteoglicanos. Logo, a maior adesão das células neste caso pode ser explicada pelo estímulo da síntese de heparam sulfato.

Em relação às células incubadas com veneno na presença ou ausência dos polissacarídeos por 12 horas, pode-se observar as figuras a seguir:

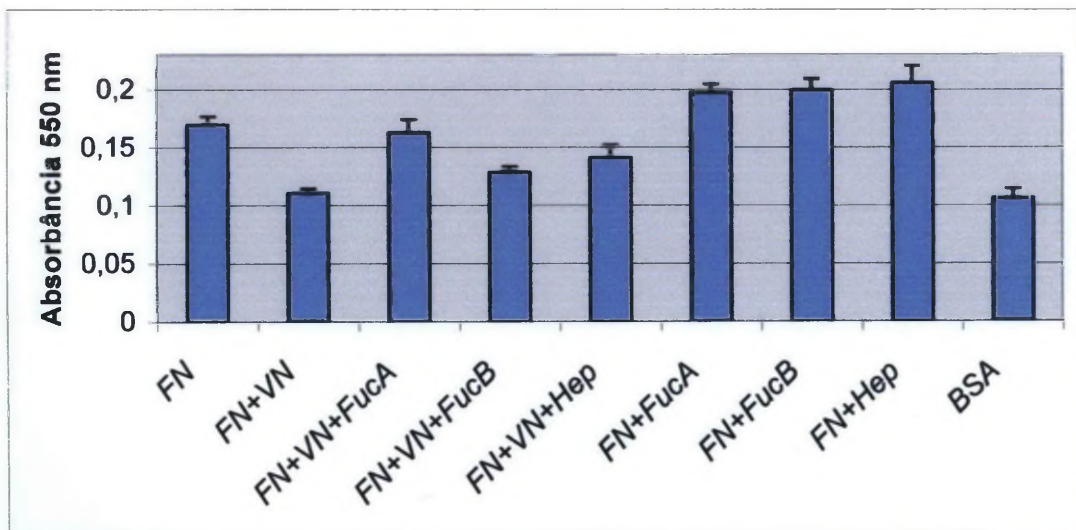


Figura 23 – Absorbância da adesão das células tratadas com veneno e polissacarídeos sulfatados sobre fibronectina intacta por 12 horas.

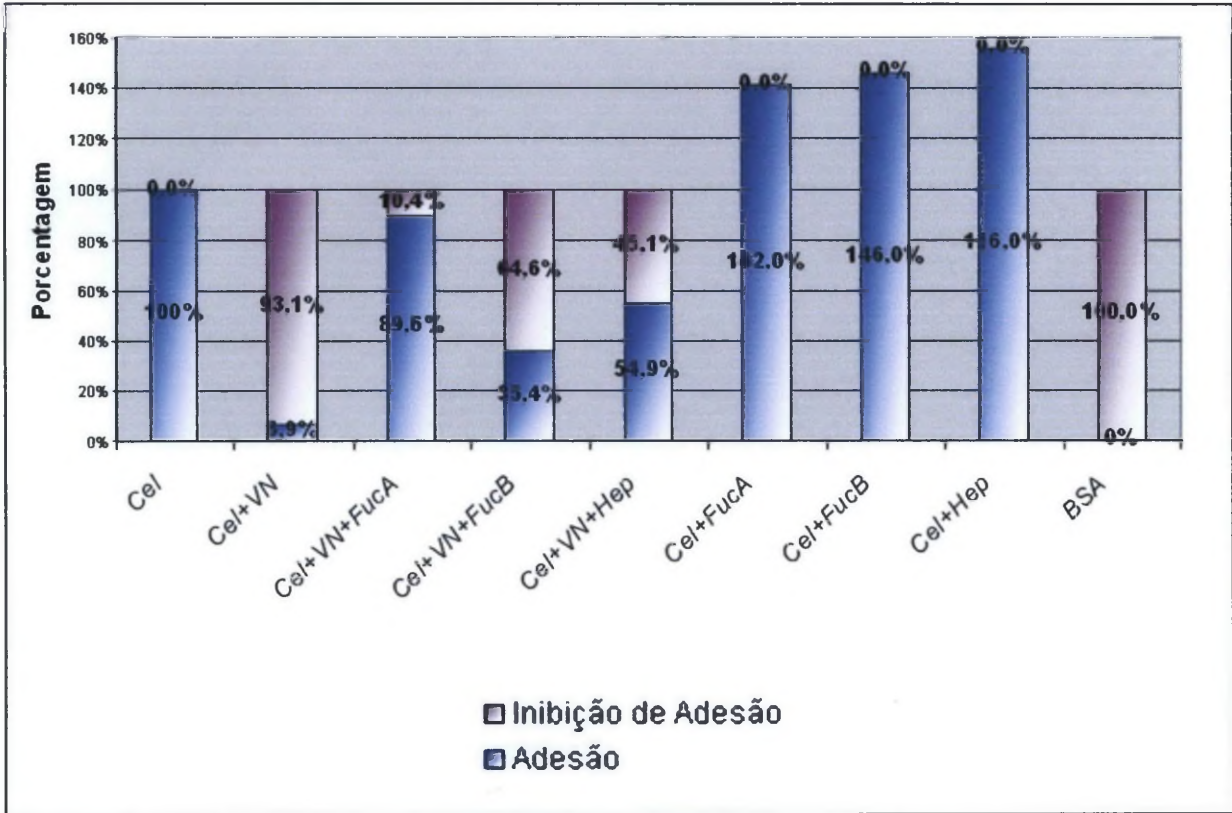


Figura 24 – Porcentagem da adesão e inibição de adesão das células tratadas com veneno e polissacarídeos sulfatados sobre fibronectina intacta por 12 horas.

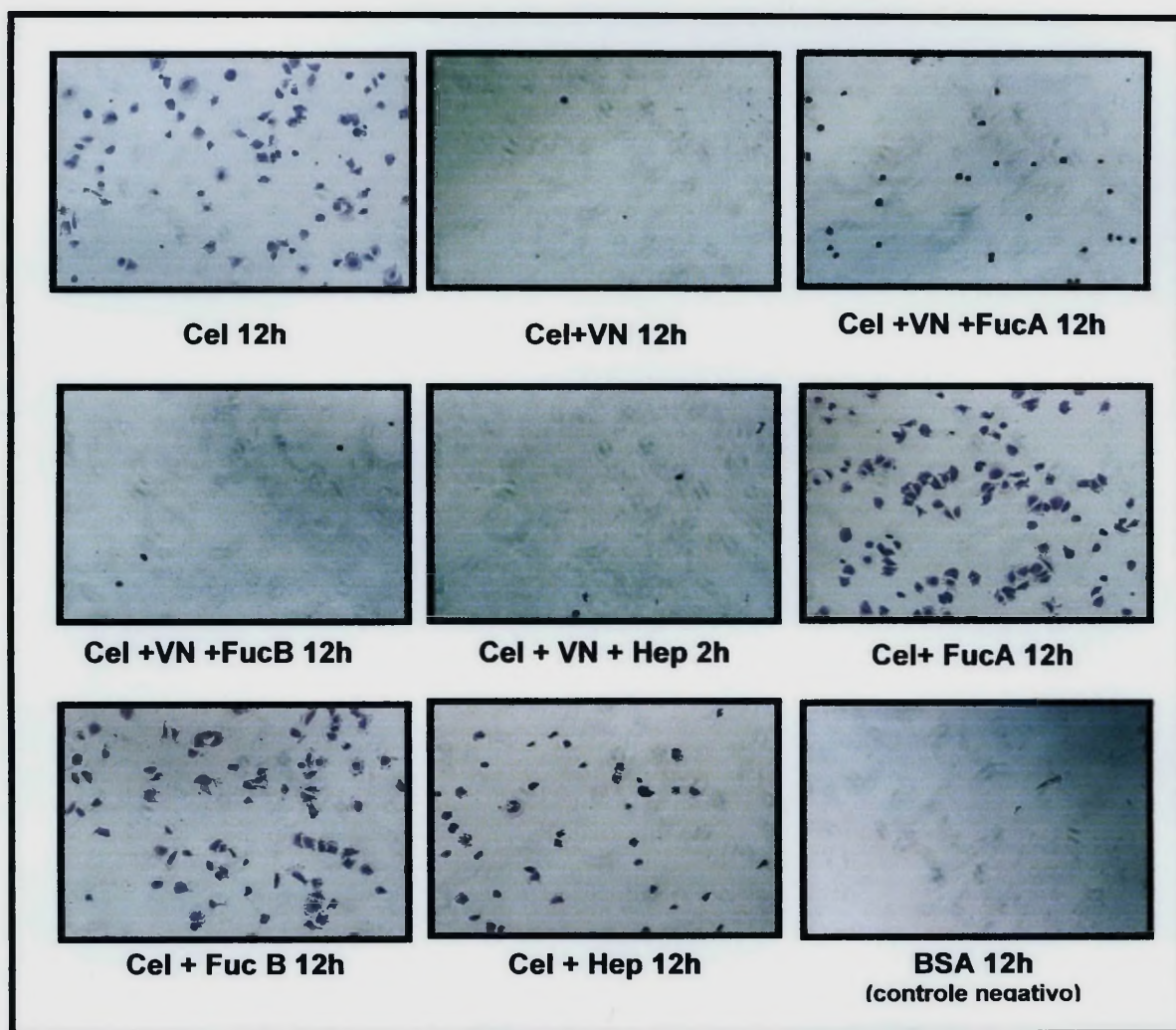


Figura 25 – Imagem fotográfica das células da linhagem RAEC que permaneceram aderidas à matriz de fibronectina após serem tratadas com veneno, na presença ou não dos polissacarídeos por 12 horas. Aumento 100x.

A inibição da porcentagem de adesão da FucA foi extremamente baixa, atingindo 10,4%, ou seja, houve um alto restabelecimento de adesão das células incubadas por 12 horas com veneno e fucana A. A inibição de adesão do veneno em 12 horas foi muito alta, configurando 93,1%, chegando a quase 100% de perda de adesão. Aqui fica bastante evidente o efeito protetor ou minimizador dos polissacarídeos ante o processo de adesão celular.

Excepcionalmente, quando as células foram incubadas somente com os polissacarídeos houve um extrapolamento de porcentagem, ultrapassando inclusive a porcentagem de adesão do grupo controle. Não foi observado inibição de adesão neste

caso. Novamente, isto se deu devido a propriedade dos polissacarídeos em estimular a síntese de heparan sulfato em células endoteliais. Neste caso, o tempo de incubação foi bastante extenso (12h), sendo este um intervalo de tempo suficiente para alta síntese do glicosaminoglicano, contribuindo para a alta adesão celular observada.

Nossos resultados são claros e evidenciam diretamente os efeitos atenuantes em relação à adesão celular tanto quando a fibronectina ou as próprias células são expostas ao veneno e aos polissacarídeos. Frente a esse resultado, buscou-se uma visão bioquímica para confirmar esta ação protetora dos polissacarídeos. Estes ensaios bioquímicos enfatizaram a degradação de fibronectina *in vitro* pelo veneno em presença ou não dos polissacarídeos. Análise do perfil degradativo da fibronectina em SDS-PAGE. Acrescido ainda a estes resultados de adesão celular, maximizou o nosso interesse em procurar um possível efeito desacoplador da interação do veneno sobre a superfície celular quando que m presença dos polissacarídeos, podendo ser este efeito o restabelecedor dos resultados vistos de aumento da adesão celular. Para investigarmos esse possível efeito desacoplador das fucanas sobre as toxinas do veneno da superfície celular, empregamos nesta fase do trabalho ensaios de citometria de fluxo, onde rastreamos a interação do veneno sobre a superfície celular, na presença ou ausência de fucanas (resultados estes também apresentados a seguir).

4.6 CINÉTICAS DE DEGRADAÇÃO DE FIBRONECTINA

Tanto as atividades dermonecróticas, como as hemorrágicas, podem estar diretamente associadas com enzimas proteolíticas presentes no veneno, as quais têm a capacidade de degradar fibronectina, fibrinogênio, entactina e heparan sulfato de células endoteliais (FEITOSA *et al.*, 1998; VEIGA *et al.*, 1999; VEIGA *et al.*, 2000a; VEIGA *et al.*, 2000b; VEIGA *et al.*, 2001a ; VEIGA *et al.*,2001b).

Para isso, amostras de fibronectina foram incubadas a 37°C por diferentes intervalos de tempo com o veneno total de aranha marrom, na presença ou ausência das fucanas. As amostras foram, então submetidas à corrida em SDS-PAGE 7,5% sob condições redutoras. Os resultados podem ser visualizados nos géis que se seguem.

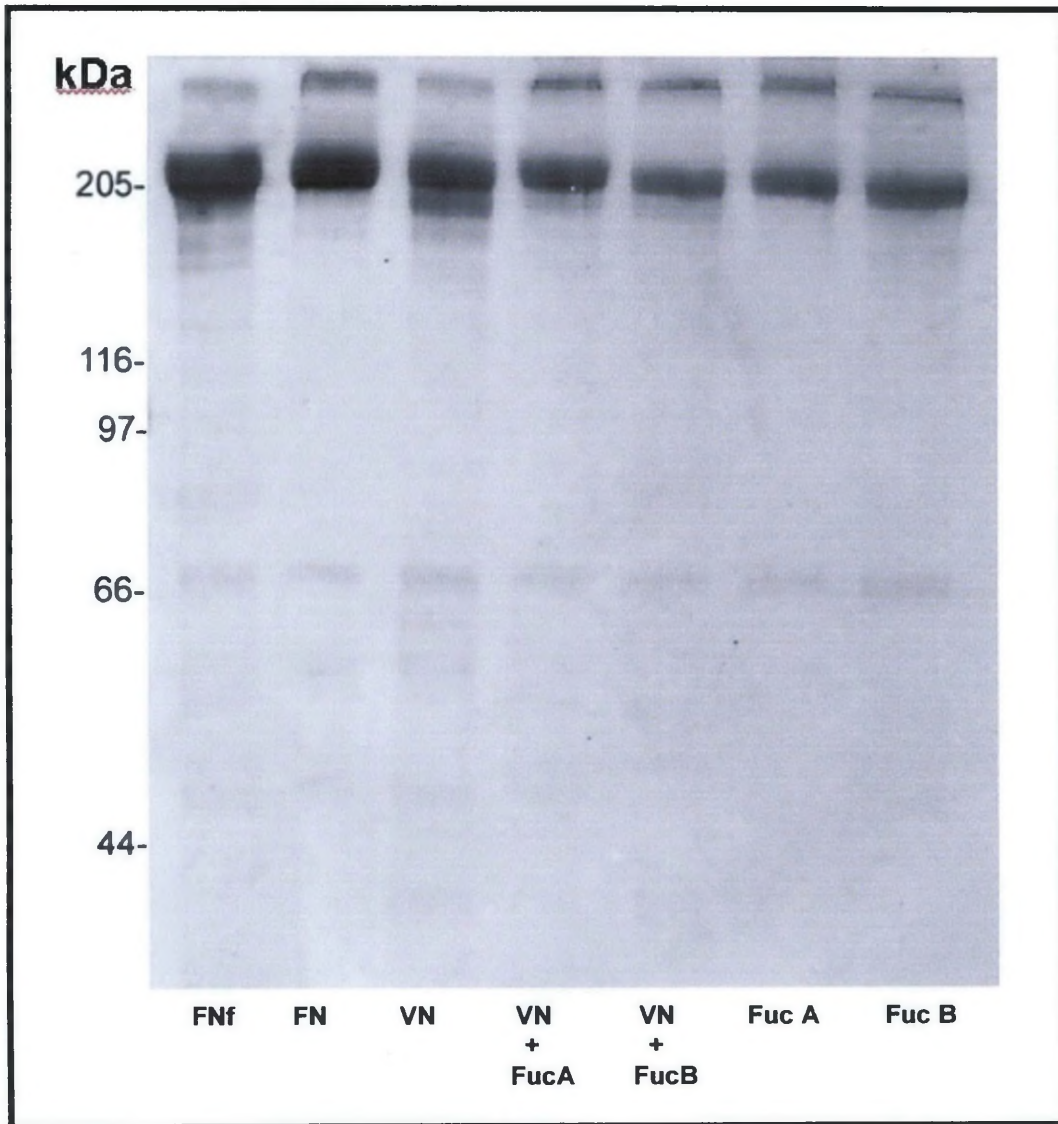


Figura 26 – Amostras de fibronectina incubadas a 37°C por 2 horas, com veneno na presença ou ausência de fucanas A e B.

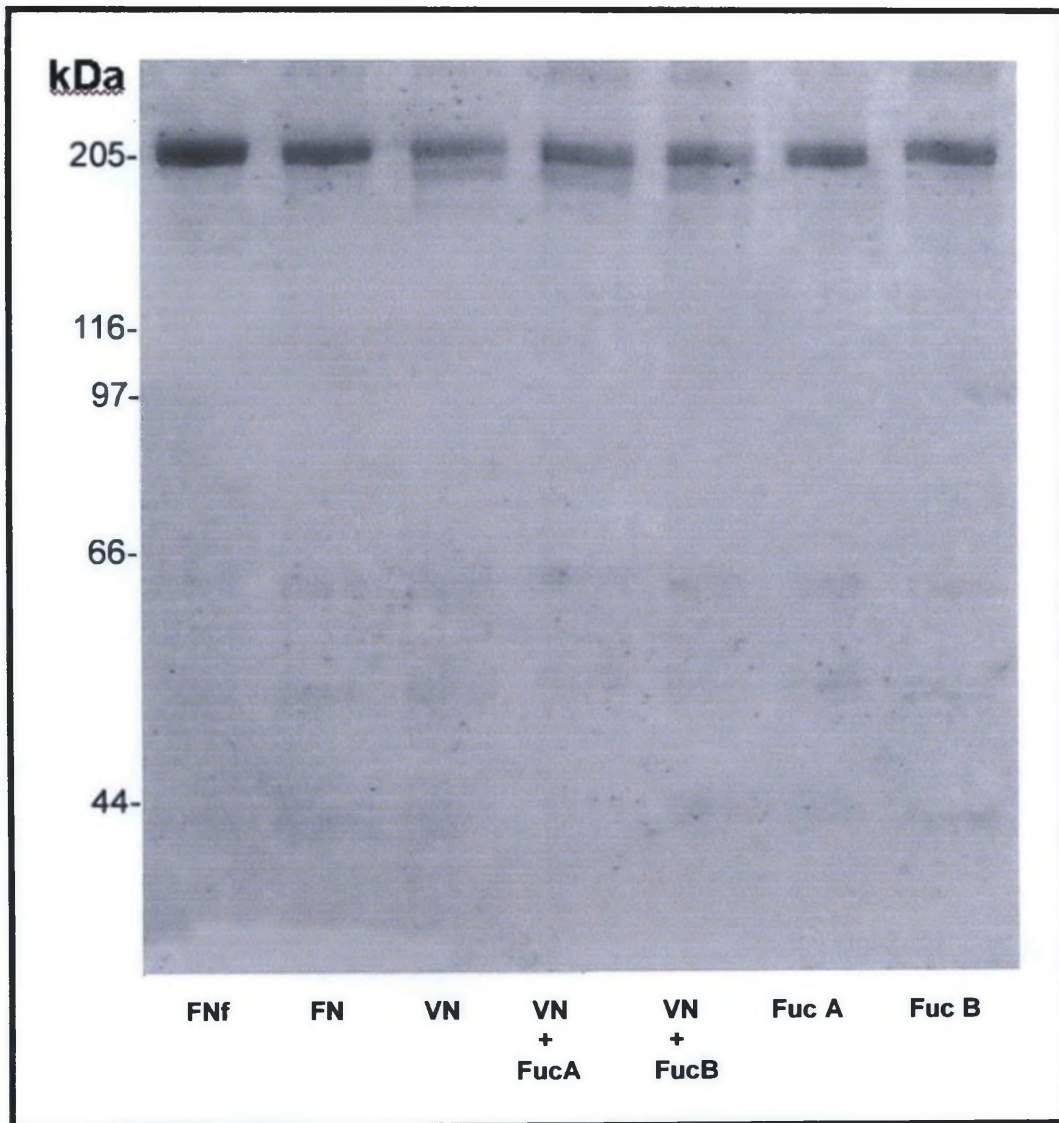


Figura 27 – Amostras de fibronectina incubadas a 37°C por 4 horas, com veneno na presença ou ausência de fucanas A e B.

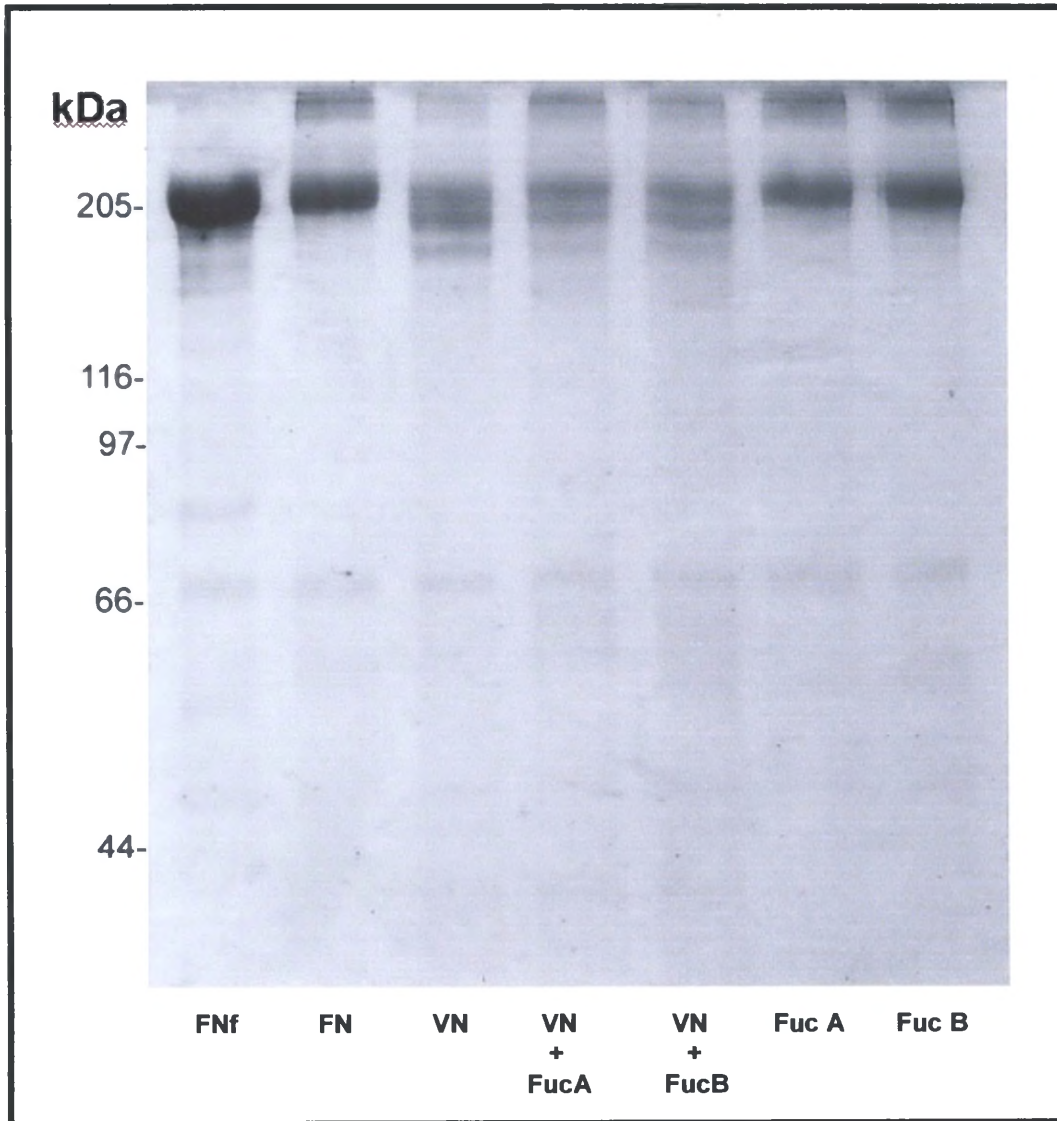


Figura 28 – Amostras de fibronectina incubadas a 37°C por 8 horas, com veneno na presença ou ausência de fucanas A e B.

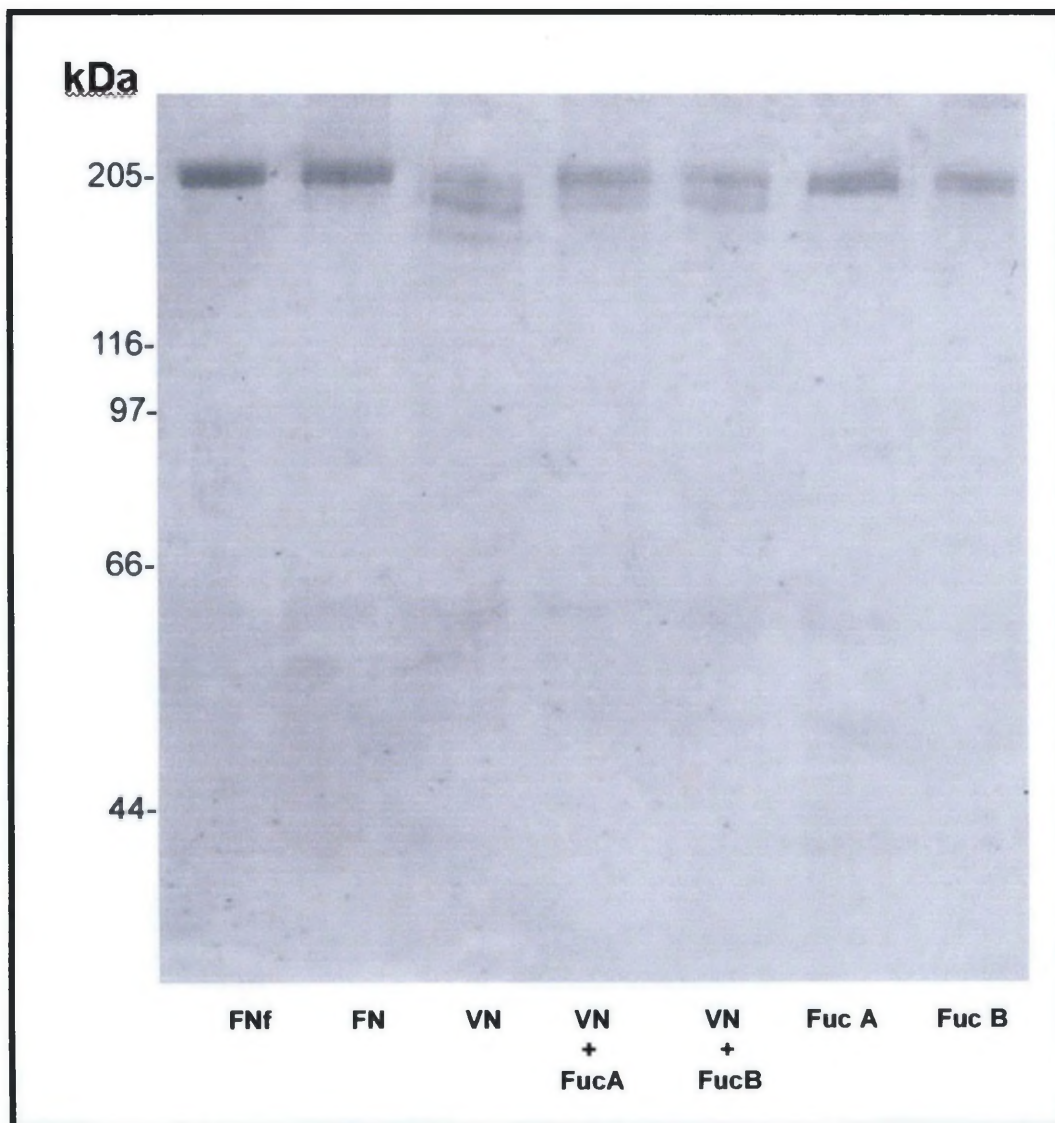
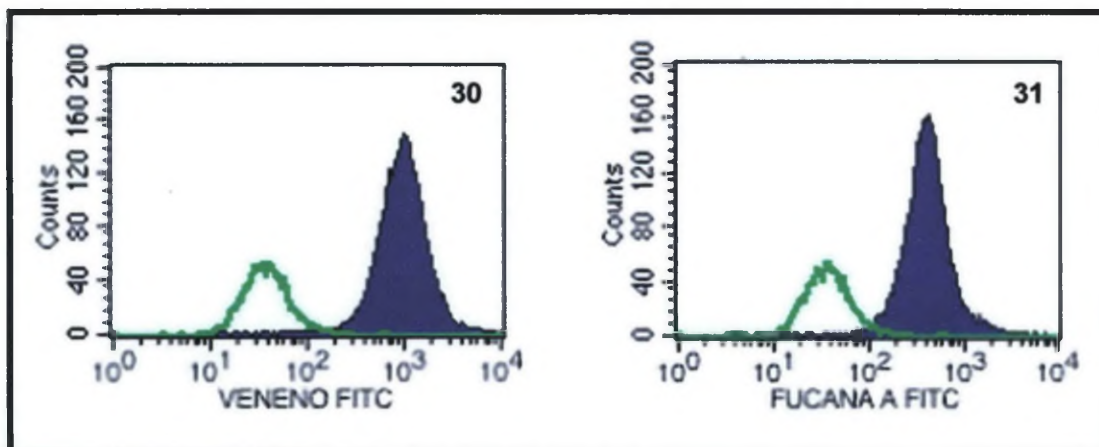


Figura 29 – Amostras de fibronectina incubadas a 37°C por 12 horas, com veneno na presença ou ausência de fucanas A e B.

De acordo com esta cinética de degradação, percebe-se que o efeito protetor das fucanas sobre a ação degradativa do veneno de aranha marrom sobre a fibronectina apresenta vestígios de proteção até 12 horas de incubação. Para o ensaio, tomou-se o cuidado de usar o mesmo lote de fibronectina utilizado para a incubação com o veneno e as fucanas, sendo que este foi denominado FNf (fibronectina fresca), aqui queríamos avaliar se não há mudanças no perfil eletroforético da molécula quando esta era incubada por diferentes tempos (sem nenhum outro eluente). (FN, fibronectina incubada), como controle do experimento. A ação do veneno sozinho sobre a fibronectina pode ser visualizada por diferentes tempos: indicado como VN. A ação do veneno quando em presença de fucana A (onde é retratado o efeito protetor) está denominado por VN+Fuça. Quando que para a fucana B foi denominado VN+FucB. Também foram realizados controles, onde a fibronectina era incubada somente com as respectivas fucanas, o que demonstrou que a presença das fucanas não interferem no perfil eletroforético da fibronectina (FucA e FucB).

4.7 ENSAIO DE CITOMETRIA DE FLUXO

Estudos anteriores do grupo mostraram que o veneno de aranha marrom liga-se preferencialmente sobre a superfície celular das células endoteliais de aorta de coelho, sendo que há uma menor interação sobre a matriz extracelular. Tendo isso em mente, e de acordo com os resultados obtidos no ensaio de adesão, onde as células tratadas com veneno e fucana obtiveram um aumento de adesão quando comparadas com as células incubadas somente com veneno. Buscou-se investigar um possível deslocamento da marcação de veneno da superfície celular, quando este era incubado simultaneamente com os polissacarídeos. Para efetivar este experimento, foi feita uma análise de citometria de fluxo, e os resultados são mostrados à seguir (Figuras 30 e 31):



Figuras 30 e 31 – Deslocamento da marcação de veneno da superfície das células RAEC, quando em presença de Fucana A.

O histograma verde indica o grupo controle (células que não foram expostas às toxinas do veneno), ou seja, a fluorescência das células endoteliais incubadas com anticorpos anti-veneno (primário) e anticorpo anti-mouse (secundário) respectivamente.

O histograma azul representa o grupo de células tratadas somente com veneno por um período de 1 hora (Figura 30) e posteriormente incubadas com os anticorpos primário e secundário. Já na Figura 31, o histograma azul representa as células tratadas com veneno na presença de fucana A por um período de 1 hora, e depois incubadas com os respectivos anticorpos.

Percebe-se uma intensidade de fluorescência para veneno na superfície celular em torno de 10^3 para as células que foram tratadas somente com veneno. Porém, quando se observa a fluorescência obtida da superfície das células incubadas com veneno e fucana A, nota-se que essa intensidade diminuiu em relação ao grupo de células tratadas somente com veneno.

Sendo assim, pode-se perceber uma nítida retração na fluorescência das células expostas ao veneno quando em presença de Fucana A., indicando um sutil deslocamento da interação de veneno sobre a superfície celular. Esta não explica mas ajudaria a explicar este aumento de adesão quando que na presença destes polissacarídeos. O que nós podemos propor e que estes polissacarídeos não conseguem efetivamente impedir a interação do veneno sobre as células (visto estes resultados) o mesmo a sua ação sobre a matriz extracelular. O que estes polissacarídeos devem estar fazendo é despotencializar

de alguma forma a ação enzimática das toxinas presentes neste veneno, sendo este o próximo passo a ser investigado nos próximos trabalhos.

4.8 DETEÇÃO DA LIGAÇÃO DAS TOXINAS DO VENENO E DOS POLISSACARÍDEOS SULFATADOS NAS CÉLULAS EM CULTURA

Ainda a fim de evidenciar a possível interação dos polissacarídeos empregados neste estudo com as toxinas presentes no veneno, além visualizar os sítios de ligação de tais moléculas, foi realizado um ensaio imunocitoquímico.

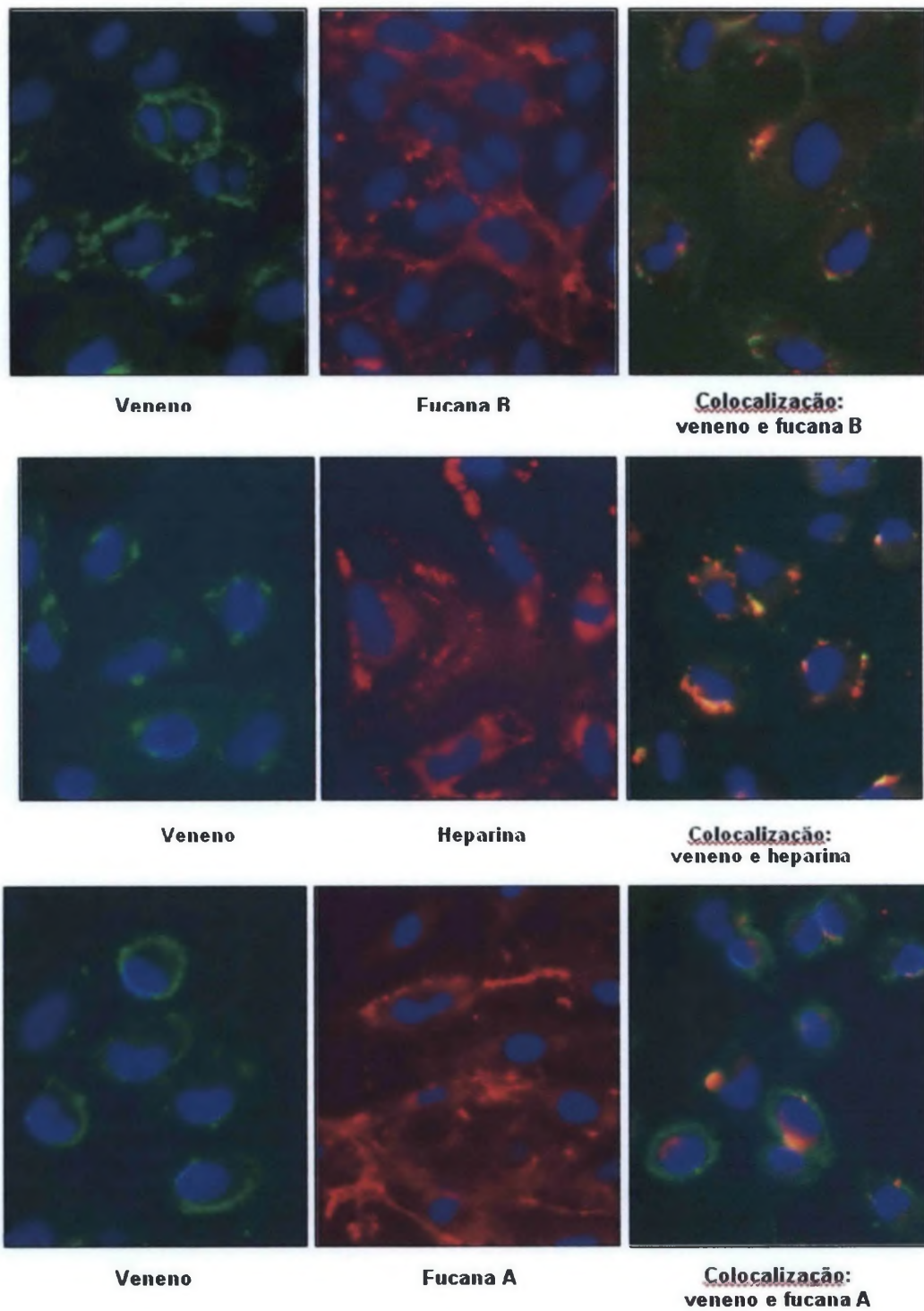


Figura 32 – Imunocitoquímica das células RAEC incubadas com veneno e polissacarídeos e sua colocalização.

Através destas marcações, como pode ser observado na Figura 32, fica nítida a predominância da ligação do veneno à superfície celular. Em relação à fucana A, B e heparina, existe uma maior interação com as moléculas da matriz extracelular, e quando presentes na superfície celular estas se mostram na forma de *clusters*.

Em relação à localização simultânea das marcações de ambas as fucanas e o veneno, evidenciou-se pouca marcação conjunta.

Já em relação à heparina, verificou-se que esta age tanto na matriz extracelular quanto na superfície celular. Quanto a colocalização desta molécula com o veneno, mostrou-se mais efetiva sobre a superfície das células.

5. CONCLUSÕES

Observamos que fucana A, B e heparina foram os polissacarídeos que apresentaram maior efeito protetor frente as toxinas presentes no veneno de *L. intermedia*.

Vimos que a concentração de 100 µg/ml foi a concentração ótima para realizarmos os experimentos previstos neste trabalho.

Pela eletroforese em gel de agarose comprovamos que as fucanas para nós cedidas para realização deste trabalho certamente são as fucanas A e B.

Frente a interação das fucanas com os respectivos polissacarídeos testados vimos que há uma maior interação do veneno com a fucana B e posteriormente com a heparina.

Observamos que em nenhuma das concentrações e tempos de incubação utilizando as fucanas (A e B), não houve comprometimento da viabilidade ou proliferação das células endoteliais de aorta de coelho.

Observamos que há um efeito protetor (aumento de adesão) de ambas as fucanas e da heparina no processo de perda de adesão imposto pelo veneno de *Loxosceles intermedia*.

As fucanas exibiram um efeito protetor frente a cinética de degradação *in vitro* da fibronectina.

A fucana A mostrou um tímido deslocamento da interação das toxinas do veneno sobre a superfície celular da linhagem RAEC.

Podemos observar por imunofluorescência que há um predomínio de marcação das fucanas sobre a matriz extracelular, que quando presentes na superfície celular se mostram na forma de *clusters*.

Há um predomínio de marcação para as toxinas do veneno sobre a superfície celular. Quanto à colocação das fucanas com o veneno mostrou-se quase que inexistente, sendo que para a heparina, esta colocação foi mais efetiva sobre a superfície das células.

A heparina interage nitidamente sobre a matriz e também sobre a superfície celular.

6. REFERÊNCIAS

- ANDRADE, R. M. G.; OLIVEIRA, K. C.; GIUSTI, A. L.; SILVA, W. D.; TAMBOURGI, D. V. **Ontogenetic development of *Loxosceles intermedia* spider venom.** *Toxicon*. 1999; 37:627-632.
- ANDRADE, R. M. G.; OLIVEIRA, K. C.; GIUSTI, A. L.; SILVA, W. D.; TAMBOURGI, D. V. **Comparison of the fertility between *Loxosceles intermedia* and *Loxosceles laeta* spiders,** *J. Arachnol.* 2000; 28:245-247.
- BARBARO, K.C.; CARDOSO, J.L.; EICKSTEDT, V.R.D.; MOTA, I. **Dermonecrotic and lethal components of *Loxosceles gaucha* spider venom.** *Toxicon*, v. 30, p. 331-338, 1992.
- BARBARO, K. C.; EICKSTEDT V. R. D.; MOTA I. **Antigenic cross-reactivity of venom from medically important *Loxosceles* (araneae) species in Brazil.** *Toxicon*. 1994; 32:113-120
- BARBARO, KC; FERREIRA, ML; CARDOSO, DF; EICKSTEDT, VRD; MOTA, I. **Identification and neutralization of biological activities in the venoms of *Loxosceles* spiders.** *Braz. J. Med. Biol. Res.* 1995 ; 29:1491-1497.
- BERGE, N.; LOGANADANE, L. D.; VASSY, J. **Adhesion-induced intracellular signalling in endothelial cells depends on the nature of the matrix** *Cell Adhe. Comm.* v.7, n.1, p.29-41, 1999.
- BORKKAN J.; GROSS E.; LUBIN Y.; ORYAN I. **An outbreak of venomous spider bites in a citrus grove.** *Ann. J. Trop. Med. Hyg.* 1995; 52:228-230.
- BÜCHERL, W. **As aranhas.** In *Invertebrados*. 1ª ed., Edtart, São Paulo, 1972.
- COHEN N.; SARAFIAN D. A.; ALON I.; GORELIK O.; ZAIDENSTEIN R.; SIMANTOV R.; BLATT A.; LITINSKY I. MODAI D.; GOLIK A.; **Dermonecrotic loxoscelism in the Mediterranean region.** *J. Toxicol. Cut. Ocul. Toxicol.* 1999;18:75-83.
- DA SILVA, P. H.; DA SILVEIRA, R. B.; APPEL, M. H.; MANGILI, C. O.; GREMSKI, W.; VEIGA, S. S. **New insights into the loxoscelism.** *Toxicon*.2004; 42–49.

- DA SILVEIRA, R. B., DOS SANTOS, V. L., FRANCO, C. R. C., VIGGIANO, R. L. L., 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*. v38, n.2, p.265-285. 2000.
- DELACOUX, F.; FICHARD, A.; GEURJON, C.; GARRONE, R.; RUGGIOERO, F. **Molecular features of the collagen V heparin binding site** . *J Biol. Chem.* v.273, n.24, p.15069-15076, 1998.
- DIETRICH, C. P.; DIETRICH, S. M. C. **Eletrophoretic behaviour of acidic mucopolysaccharides in dyamine buffers**. *Anal Biochem.* v70, p645-647,1976.
- DIETRICH, C. P.; FARIAS, G. G. M.; ABREU, L. R. D.; LEITE, E. L.; SILVA, L. F.; NADER, H. B. **A new approach for characterization of polysaccharides from algae: Presence of four main acidic polysaccharides in three species of the class *Phaeophyceae***. *Plant Science.* v.108, p.143-153, 1995.
- DOS SANTOS, V. L. P.; FRANCO, C. R. C.; VIGGIANO, R. L. L.; DA SILVEIRA, R. B.; CANTÃO, M. P.; MANGILI, O.C; VEIGA, S.S.; GREMSKI, W. **Structural and ultrastructural description of the venon gland of *Loxosceles intermedia* (brown spider)**. *Toxicon*. 2000; 38:265-285.
- ESCALANTE-GALINDO P.; MONTOYA-CABRERA M. A.; TERROBA-LARIOS V. M.; NAVA-JUARÉZ A. R.; ESCALANTE-FLORES I. **Local dermonecrotic loxoscelism in children bitten by the spider *Loxosceles reclusa* (the violin spider)**, *Gac. Med. Mex.* 1999; 135:423-426.
- 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*. 1998; 36:1039-1051.
- FISHER M. L.; **Levantamento das espécies de *Loxosceles* Heinecken and Lowe, 1832 no município de Curitiba, Paraná, Brasil**, *Estudos de Biologia* 1994; 3:63-88.
- FORRESTER, L.J.; BARRET, J.T.; CAMPBELL, B.L. **Red blood cell lysis induced by the venom of the brown reclusa spider. The role of sphingomyelinase D**. *Arch. Biochem. Biophys.* 1978; 187:335-365.

- FRANCO, C. R. C. **A avaliação da adesão, migração e proliferação da linhagem celular CHO-K₁ frente à mutante CHO-745 deficiente na biossíntese de glicosaminoglicanos sulfatos. Mostra que a integrina $\alpha\beta_1$ é um proteoglicano envolvido na migração celular.** São Paulo, 2002. 219f. Tese (Doutorado em Biologia Molecular)- Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo.
- FUTRELL, J. M.; **Loxoscelism.** Am. J. Med. Sci. 1992; 304:261-267.
- GAJARDO-TOBAR, R. R. **Minha experiência sobre loxoscelismo.** Mem. Inst. Butantan. 1966; 33:689-698.
- GEREN, C.R.; CHAN, T.K.; HOWELL, D.E.; ODELL, G.V. **Isolation and characterization of toxins from brown recluse spider venom (*Loxosceles reclusa*).** Archs. Biochem. Biophys. 1976; 174:90-99.
- GIRAUX, J.; MATOU, S.; BROS, A.; TAPON-BRETAUDIÈRE, J.; LETOURNEUR, D.; FISCHER, A. **Modulation of human endothelial cell proliferation and migration by fucoidan and heparin.** Eur. J. Cell Biol. n.77, p.352-359, 1998.
- GRISHIN, E. **Polipeptide neurotoxins from spider venoms.** Eur. J. Biochem. 1999;264:276-280.
- HAYMAN, E. G.; PIERSCHBACHER, M. D.; OHGREN, Y.; RUOSLAHTI, E. **Vitronectin (serum spreading factor) is present at the cell-surface and in tissues).** J. Cell Biol. v.97, n.5, p96, 1983.
- HOGAN, C. J.; BARBARO, K. C.; WINKEL, K. **Loxoscelism: Old obstacles, new directions.** Annals of Emergency Medicine, v. 44, p. 608-624, 2004.
- HUNTER H. S.; CORY A. D.; SMITH M. L. **Necrotic arachnidism.** J Am Acad. Dermatol 2001;44:561-73.
- KJELLÉN, L.; LINDAHL, U. **Proteoglycans: structures and interactions.** Annu. Rev. Biochem. v.60, p.443-475,1991.
- KURPIEWSKI, G.; FORRESTER, L.J.; BARRETT, J.T.; CAMPBELL, B.J. **Platelet aggregation and sphingomyelinase D activity of a purified toxin from the venom of *Loxosceles reclusa*.** Biochem. Biophys. Acta 1981; 678:467-476.

- LANE, D. A. **Heparin binding and neutralising proteins**. In: Lane D. A., Lindahl U, eds. Heparin - Chemical and biological properties, clinical applications. Edward Arnold Publishers. 363-391. London-UK. 1989.
- LUCAS, S. **Spiders in Brazil**. *Toxicon*. 1988; 26:759-772.
- LUCIANO, M.N.; DA SILVA, P.H.; CHAIM, O.M.; DOS SANTOS, V. L. P.; FRANCO, C. R. C.; SOARES, M. F. S.; ZANATA, S. M.; MANGILI, O.C.; GREMSKI, W.; VEIGA, S. S. **Experimental Evidence for Direct Cytotoxicity of *Loxosceles intermedia* (Brown Spider) Venon in Renal Tissue**. *Journal of Histochem. Cytochem.* 2004; 52: 1-13.
- MÁLAQUE C. M. S.; CASTRO-VALENCIA J. L. C.; CARDOSO F. O. S.; FRANÇA K. C.; BARBARO and H.W. Fan, **Clinical and epidemiological features of definitive and presumed loxoscelism in São Paulo, Brazil**, *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*. 2002; 44.
- MARTINEZ-VARGAS, A.Z. **Loxoscelismo, um problema de salud en el Perú**. *Bol. San. Panam.* 1987; 103:378-386.
- MATTOSINHO S. G.; SEZERINO U. M.; ZANNIN M.; GRANDO M.; CARDOSO J. L. C.; EICKSTEDT V. R. D.; FRANÇA F. O. S.; **Geographic distribution of loxoscelism in Santa Catarina (Brazil) and species of *Loxosceles* sp involved and existent in the state**, *J. Ven. Anim. Tox.* 1997; 3:99.
- MAURAY, S.; RAUCOURT, E.; CHAUBET, F.; MAIGA-RAVEL, O; STERNBERG, H.; FISHER, M. **Comparative anticoagulant activity and influence on thrombin generation of dextran derivates and of fucoidan fraction**. *J. Biomater. Sci. Polymer Edn.* v.9, n.4, p.373-387, 1998.
- MEREDITH, J.E. Jr. E SCHWARTZ, M.A. **The extracellular matrix as a cell survival factor**. *Mol. Biol. Cell.* 1993; 4:953-961.
- NICHOLSON G. M.; GRAUDINS A.; **Antivenoms for the treatment of spider envenomation**, *J. Toxicol. Tox.* 2003; 22:35-59.
- OLIVEIRA, K.C.; ANDRADE, R.M.G.; GIUSTI, A. L.; SILVA, W. D.; TAMBOUGI, D.V. **Sex-linked variation of *Loxosceles intermedia* spider venoms**. *Toxicon*, v. 37, p.217-221, 1999.
- PALUDO, K.S., GREMSKI, L.H., VEIGA, S.S., CHAIM, O.M., GREMSKI, W., DE FREITAS BUCHI, D., NADER, H.B., VON DIETRICH, C.P., FRANCO, C.R.C. **The Effect of**

- Brown Spider Venom on Endothelial Cell Morphology and Adhesive Structures**, *Toxicon*; 47:844-853; 2006.
- PERCIVAL, E. G. V. & MC DOWELL, R. H. **Chemistry and enzymology of marine algal polysaccharides**. London: Academic Press, p.219, 1967.
- PIZZI, T.; ZACARIAS, J.; SCHENONE, E. H. **Estudio histopatológico experimental en el envenenamiento por *Loxosceles laeta***. *Pathologica* 1957; 23:33.
- RASH, D.; L.; HODGSON, C.; W. **Pharmacology and biochemistry of spider venoms**. *Toxicon*; 40:225-254;2002
- REES, RS; FIELDS, JP; KING, LE. **Do brown recluse spider bites induce pyoderma gangrenosum?** *South Med. J.* 78:283-287, 1984.
- RIBEIRO L. A.; EICKSTEDT V. R. D.; RUBIO G. B.; KONALSAISSEN J. F.; HANDAR Z.; ENTRES M.; CAMPOS V. A. F. P.; JORGE M. T. **Epidemiologia do acidente por aranhas do gênero *Loxosceles* Heinecken. Lowe no Estado do Paraná (Brasil)**, *Mem. Inst. But.* 1993; 55:19-26.
- ROCHA, H. A. O. **Caracterização de uma fucana da alga *Spatoglossum schroederi* e análise de suas atividades anti adesiva, anti migratória, anti proliferativa e anti trombótica**. Natal, 2002. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) – Escola Paulista de Medicina, Universidade Federa de São Paulo.
- RODRIGUES, CJH; PARAS, ZMS; NOBREGA, MM; TORRES, JB. **Acidentes com aracnídeos**. *Revista HCPA*, v.6, n.2, p.91-96, 1986.
- RUPEREZ, P.; AHRAZEM, O.; LEAL, J. A. **Potential antioxidant capacity of sulfated polysaccharides from the edible marine brown seaweed *Fucus vesiculosus***. *J Agric. Food Chem.* v.50, n.4. p.840-845, 2002.
- RUPPERT, E.E. E BARNES, R.D. **Zoologia dos invertebrados**. Ed. Roca, São Paulo, 6ª ed., 1996
- SCHENONE, H.; LETONJA, T. **Notas sobre la biologia y distribucion geográfica de las aranas del género *Loxosceles***. *Bol. Chil. Parasitol.* 1975; 30:27-29.
- SCHENONE H.; SAAVENDRA T.; ROJAS A.; VILLARROEL F. **Loxoscelismo en Chile. Estudios epidemiológicos, clínicos y experimentales**. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*; 1989; 31:403-415.

- SEZERINO U. M.; COELHO L. K.; GONÇALVES J.; GRANDO M.; MATTOSINHO S. G.; CARDOSO J. L. C.; EICKSTEDT V. R.; FRANÇA F. O. S.; BARBARO K. C.; FAN H. W.; **A clinical and epidemiological study of *Loxosceles* spider envenoming in Santa Catarina, Brazil.** Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 1998; 92:46-548.
- SMITH, W. C.; MICKS, W. D. **The role of polymorphonuclear leukocytes in the lesion caused by the venom of the brown spider, *Loxosceles reclusa*.** Lab. Invest. 1970;22:90-93
- SOEDA, S.; KOZAKO, T.; IWATA, K.; SHIMENO, H. **Oversulfated fucoidan inhibits the basic fibroblast growth factor-induced tube formation by human umbilical vein endothelial cells: its possible mechanism of action.** Biochem. Biophys. Acta. v.1497, p.127-134, 2000.
- SOERENSEN, B. **Acidentes por animais peçonhentos: reconhecimento, clínica e tratamento.** Editora Atheneu, 1996.
- SUAREZ, G.; BIGGERMANN, U.; SCHENONE, H. **Estudios bioquímicos del veneno de *Loxosceles laeta* y sus mecanismos de acción.** Bol. Chil. Parasitol. 1971; 26:60-62.
- TAMBOURGI, D.V., MAGNOLI, F.C., EICKSTEDT, V.R.D., BENEDETTI, Z.C., PETRICEVICH, V.L., SILVA, W.D. **Incorporation of a 35-kilodalton purified protein from *Loxosceles intermedia* spider venom transforms human erythrocytes into activators of autologous complement alternative pathway.** J. Immunol. 1995; 155:4459-4466.
- TRINDADE E. S., ROCHA H. A.; MORAES F. A.; FRANCO C. R.; TORQUATO R. J.; VEIGA S. S.; VALENTE A. P.; MOURAO P.A.; LEITE E.L.; NADER, H. B.; DIETRICH, C. P. **Structural and haemostatic activities of a sulfated galactofucan from the brown alga *Spatoglossum schredleri*. An ideal antithrombotic agent?** J Biol. Chem. v.280, n.50, p.41278-41288, 2005.
- UNDERWOOD, P. A.; KIRKPATRICK, A.; MITCHELL, S. M. **New insights into heparin binding to vitronectin: studies with monoclonal antibodies.** Biochem. J. v.365, p.57-67, 2002.
- VEIGA, S.S., ELIAS, M.C.Q.B., GREMSKI, W., PORCIONATTO, M.A. SILVA, R., NADER, H.B., BRENTANI, R.R. **Post translational modifications of $\alpha_5\beta_1$ integrin by glycosaminoglycan chains. The $\alpha_5\beta_1$ integrin is a facultative proteoglycan.** J. Biol. Chem. 1997; 272:12529-12535.

- 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 of glycosylation for dermonecrotic activity.** *Toxicon*. 1999; 37:587-607.
- 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, 2000a.
- VEIGA, S.S., FEITOSA, L., SANTOS, V.L.P., DE SOUZA, G.A., RIBEIRO, A.S., MANGILI, O.C., PORCIONATTO, M.A., NADER, H.B., DIETRICH, C.P., BRENTANI, R.R. and GREMSKI, W. **Effect of *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom on basement membrane structures.** *Histochem. J.*, 2000b; 32:397-408.
- VEIGA, S. S.; ZANETTI, V. C.; FRANCO, C. R. C.; TRINDADE, E.S.; PORCIONATTO, M. A.; 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*. 102: 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.** *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2001b; 34:843-850.
- VETTER R. S.; VISSCHER P. K.; **Bites and stings of medically important venomous arthropods,** *Int. J. Dermatol.* 1998; 38:481-496.
- YAMADA, K. M. **Cell-surface interactions with extracellular materials.** *Annual Rev. Biochem.* v.52, p.761-799, 1983.
- YURCHENCO, P. E SCHITTNY, J. **Molecular architecture of basement membranes.** *FASEB J.* 1990; 4:1577-1590.
- YOUNG, A.R. E PINCUS, S.J. **Comparison of enzymatic activity from three species of necrotising arachnids in Australia: *Loxosceles rufescens*, *Badumna insignis* and *Lampona cylindrata*.** *Toxicon* 2001; 39:391-400.
- ZANETTI, V.C.; DA SILVEIRA, R.B.; DREYFUSS, J.L.; HAOACH, J; MANGILI, O.C.; VEIGA, S.S.; GREMSKI, W. **Morphological and biochemical evidence of blood vessel damage and fibrinogelysis triggered by brown spider venom.** *Blood Coag. Fibrinol.* 2002; 13:1-14.