DEMO VERSION

This file was created with the DEMO VERSION of CAD-KAS PDFs 2 One. This is the reason why this file contains this page.

The order the full version please visit our website under http://www.cadkas.com

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE FDERAL DO PARANÁ

REGINALDO VIEIRA DE SENE

POLISSACARÍDEOS SULFATADOS MINIMIZAM OS EFEITOS DO VENENO DE ARANHA MARROM (*LOXOSCELES INTERMEDIA*) EM CÉLULAS ENDOTELIAIS

CURITIBA
2009

UNIVERSIDADE FDERAL DO PARANÁ

REGINALDO VIEIRA DE SENE

POLISSACARÍDEOS SULFATADOS MINIMIZAM OS EFEITOS DO VENENO DE ARANHA MARROM (*LOXOSCELES INTERMEDIA*) EM CÉLULAS ENDOTELIAIS

Dissertação apresentada ao curso de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular, Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para obtenção do título de mestre em Biologia Celular.

Orientadora: Profª. Drª. Célia Regina Cavichiollo Franco
Co-orientador: Prof. Dr. Edvaldo da Silva Trindade

CURITIBA
2009

Sene, Reginaldo Vieira

Polissacarídeos sulfatados minimizam os efeitos do veneno de aranha marrom *(Loxsceles intermedia)* em células endoteliais.
Curitiba, 2009. 100p.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná- UFPR

1. *Loxosceles intermedia.* 2. Polissacarídeos sulfatados. 3. Fibronectina. 4. Matriz extracelular.

Aos meus queridos pais.
Aos meus inestimáveis amigos.
Aos sonhos e pessoas que se perderam
ao longo do caminho... Nunca os esquecerei.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Aos meus pais, Eurides e Lúcia, e a minha irmã Anuana. Sei que foram dois anos difíceis. Porém, mesmo que o universo venha abaixo, iremos cortar os céus e rasgar montanhas – porque nada é mais forte que uma família unida. Obrigado pela chance de viver.

À Profª. Drª. Célia Regina e Profº. Drº. Edvaldo, os responsáveis por tudo que aqui se encontra. Obrigado pelo apoio quando este foi necessário, por serem o pai e mãe adotivos em Curitiba, pelos sorrisos trocados, por tudo que foi ensinado, pelo afinco e trabalho, zelo e orientação. Estarão sempre em meio às batidas do meu coração.

Ao Profº. Dr°. Sílvio Sanches, pelo exemplo de seriedade e disciplina. Obrigado pelo todo o suporte durante todos estes anos.

Ao Profº. Drº. Hugo Alexandre, pela grande colaboração e extrema boa vontade.

À Jenifer Nowatzki: por todo o companheirismo, pela incrível e imensa ajuda em dias de semana, fins de semana e feriados. Nunca esquecerei dos almoços (seja com miojo, seja com lasanha), os recordes de trabalho quebrados na cultura... muito obrigado por me emprestar tanto de seu tempo, esforço e ajuda se tornando o braço esquerdo deste canhoto (e o que seria de um canhoto sem seu braço esquerdo?!).

À Kátia Sabrina por toda a instrução, todas as técnicas ensinadas (10 segundos para cada pinhão no microondas), todas as dúvidas sanadas, todos os favores, enfim, muito obrigado por ser esta pessoa fantástica sempre com um sorriso estampado no rosto.

Aos amigos do laboratório de Investigação de Polissacarídeos Sulfatados: Jeniffer grande amiga (e vamos continuar reclamando um pro outro), Fernanda e Adriano a dupla super dinâmica, Luigi o melhor estagiário do mundo, Gabriel o orientador mais legal do mundo, Steelle, Fabrício e Débora. A amizade de vocês foi imprescindível.

A todos os amigos do Laboratório de Matriz Extracelular. Obrigado pelo apoio, ajuda, companheirismo, todos vocês se configuram como verdadeiros exemplos de sabedoria, perfeição, competência e dedicação. Sob o risco de esquecer alguém, não cito nomes, porém tenho todos vocês em minhas lembranças.

A todos os alunos e pessoas que hora ou outra doavam aranhas para que fosse possível a extração de veneno.

Aos amigos do laboratório da Profª Dorly, Fernando e Sharon, muito obrigado pela ajuda, companhia e momentos de diversão.

Aos componentes do laboratório de Neurobiologia, obrigado pela ajuda, quebra galhos e adoráveis conversas, especialmente Michele e Bia.

Aos amigos e amigas que tanto estimo, em especial ao quinteto curitibano Remom, Gabriel, Diego, Gabi e Carol – anexado a estes Rodolfo. Foram períodos de grande significado que ficarão para sempre marcados, e eternamente lembrados.

Aos amigos do fórum. Unidos por um ideal há 9 anos atrás... e ainda contando!

Ao amigo remanescente de Uberaba, Matheus. Não importa a distância ou quanto tempo ficarmos sem nos vermos, os elos que unem as correntes de nossa amizade são inquebráveis.

Aos meus fiéis amigos caninos, saudades dos que permanecem... e dos que se foram.

À CAPES pelo apoio financeiro.

Acima de tudo, agradeço por ter nascido nesta época para viver estes momentos, com todas estas pessoas – à singularidade da vida.

“ Mutatis mutandis ”
(mudando-se o que deve ser mudado)

RESUMO

Acidentes envolvendo aranhas do gênero *Loxosceles*, comparados com outros animais peçonhentos, ocupam o primeiro lugar em termos de saúde pública no estado do Paraná. O quadro clínico induzido pela picada da aranha da espécie *Loxosceles intermedia* pode evoluir para dois quadros clínicos o cutâneo e/ou sistêmico. A compreensão da ação citotóxica e biomolecular do veneno de *L. intermedia* ainda é bastante incompleta, não sendo conhecidos fármacos eficientes que visem neutralizar, minimizar ou mesmo inativar a potente ação das toxinas presentes neste veneno. Sendo assim, foram empregados neste trabalho polissacarídeos sulfatados (heparina e fucanas) a fim de avaliar uma possível proteção sobre os efeitos induzidos pelo veneno. 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, apresentam semelhanças estruturais 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 pela ação do veneno da aranha marrom. Os resultados mostraram um papel protetor destes compostos sobre os efeitos de perda de adesão e alterações morfológicas decorrentes da ação do veneno. Alterações ultra-estruturais foram minimizadas quando as células endoteliais foram expostas ao veneno na presença dos polissacarídeos. Pela eletroforese em gel de agarose, foi possível verificar interação de proteínas do veneno com os polissacarídeos. Utilizando citometria de fluxo foi possível verificar que a ligação do veneno sobre a superfície celular é parcialmente deslocada, quando os polissacarídeos são adicionados. Quando foi avaliada a ação proteolítica do veneno sobre a fibronectina plasmática em SDS-PAGE, constatou-se que os polissacarídeos testados atuam minimizando a degradação da proteína. Ensaios de adesão celular sobre uma matriz de fibronectina pré-tratada com veneno, na presença ou ausência dos polissacarídeos, foram realizados. Os resultados mostraram que há um menor número de células que aderem, quando a fibronectina foi exposta para o veneno. No entanto, na presença dos polissacarídeo o número de células aumenta, ficando, em alguns casos, próximo ao controle, sugerindo que a degradação da fibronectina foi inibida. Este dado foi confirmado, quando avaliado a matriz extracelular de fibronectina secretada e organizada pelas células endoteliais em cultura, uma vez que os resultados utilizando imunocitoquímica mostraram que a fibronectina é protegida da ação degradativa do veneno. Estes resultados sugerem uma possível aplicação farmacológica e biotecnológica dos polissacarídeos para atenuarem os efeitos induzidos pelas toxinas presentes no veneno da aranha *Loxosceles intermedia*.

Palavras chave: Veneno de *Loxosceles intermedia*, polissacarídeos sulfatados, fibronectina, matriz extracelular.

ABSTRACT

Accidents regarding the genus *Loxosceles*, compared to other poisonous animals, take first place in terms of health issue in Paraná. The clinic features induced by the spider´s bite may evolve to cutaneous and/or sistemic effects. The understanding of the cytotoxic e biomolecular action of the venom is still under investigation. There are no pharmacos that nullyfies or inactvate the action of the venom´s toxins. Nevertheless, sulfated polysaccharides were used in order to investigate its potential pharmacological action. Fucan is a term used to define a family of sulfated polysaccharides. Its most regarding feature is the presence of sulfated L-fucose. Thus, fucans have estructural likenesses with heparin, a highly sulfated glicosaminoglycan, used clinically for its activities. In the present work, fucans extracted from brown seaweed, nominated Fucans A and B and Heparin were tested as possible pharmacos against the effects of brown spider venom. The results showed a possible protective role of the polysaccharides against the loss of adhesion and mophological changes induced by the venom. Ultraestructural chages were minimized when cells were treated with venom in the presence of the polysaccharides. A visible interaction beteween venom´s proteins and sulfated polysaccharides was noticed, through an agarose gel electrophoresis performed in Tris/Acetate buffer. The labeling of venom on the cell surface was dislocated due to the interaction with the polysaccharides, and the interaction of the venom´s proteins with the polysaccharides in proteolytic processes regarding the extracelullar matrix was minimized. By analysis of the electrophoretic profile in SDS-PAGE, and the intensity of degrading bands induced by the venom on fibronectin, the protective effect of the polysaccharides was observed. Adhesion assays upon endothelial cells on fibronectin matrix was conducted with venom in the presence or absence of the polyshaccharides, where the protective effect lead to an increase of cell adhesion. And finnaly, regarding the protective role of the polysaccharides upon the fibronectin secreted by the endothelial cells in culture, an imunocitochemitry assay was conducted, where the fibronectin matrix was less degraded when treated with venom in the presence of the polysccharides. The results even though superficial, suggest a possible biotechnological and pharmacological use of the polysaccharides against the effects induced by the venom of the brown spider.

Keywords: *Loxosceles intermedia venom*, sulfated polysaccharides, fibronectin, extracellular matrix

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. EXEMPLAR DE *Loxosceles reclusa* EVIDENCIANDO CARACTERÍSTICAS DO GÊNERO *LOXOSCELES*.....17

FIGURA 2. DISTRIBUIÇÃO MUNDIAL DAS PRINCIPAIS ESPÉCIES DO GÊNERO LOXOSCELES.....19

FIGURA 3. DIMORFISMO SEXUAL DE LOXOSCELES INTERMEDIA.....20

FIGURA 4. CASO DE LOXOSCELISMO.....23

FIGURA 5. ALTERAÇÔES HISTOPATOLÓGICAS EM PELE DE COELHO APÓS EXPOSIÇÃO AO VENENO DE ARANHA MARROM.....24

FIGURA 6. DEGRADAÇÃO DE MOLÉCULAS PURIFICADAS DE MATRIZ EXTRACELULAR POR TOXINAS DO VENENO DE ARANHA MARROM.....30

FIGURA 7. CÉLULAS ENDOTELIAS EXPOSTAS AO VENENO DE *Loxosceles intermedia*.....32

FIGURA 8. UNIDADE ESTRUTURAL DA HEPARINA.....34

FIGURA 9. ESTRUTURA PROPOSTA PARA UMA GALACTOFUCANA SULFATADA EXTRAÍDA DE *S. Schoederi*.....35

FIGURA 10. HEPARINA LIGA À COMPONENTES DA MATRIZ EXTRACELULAR 38

FIGURA 11. PERFIL ELETROFORÉTICO DOS POLISSACARÍDEOS SULFATADOS.....41

FIGURA 12. POLISSACARÍDEOS SULFATADOS INIBEM A PERDA DE ADESÃO DAS CÉLULAS ENDOTELIAIS, CAUSADAS PELO VENENO DE ARANHA MARROM.....51

FIGURA 13. POTENCIAL EFEITO PROTETOR CONTRA A PERDA DE ADESÃO DE CÉLULAS TRATADAS COM VENENO DE ARANHA MARROM.....53

FIGURA 14. VIABILIDADE CELULAR DAS CÉLULAS ENDOTELIAIS EXPOSTAS AOS POLISSACARÍDEOS.....54

FIGURA 15. NA PRESENÇA DOS POLISSACARÍDEOS O VENENO DE *L. intemedia* PROVOCA MENOS ALTERAÇÕES ULTRAESTRUTURAIS.....56

FIGURA 16. INTERAÇÃO ENTRE PROTEÍNAS PRESENTES NO VENENO DE ARANHA MARROM E OS DIFERENTES POLISSACARÍDEOS SULFATADOS TESTADOS.....59

FIGURA 17. DESLOCAMENTO DA MARCAÇÃO DE VENENO DA SUPERFÍCIE DAS CÉLULAS ENDOTELIAIS, QUANDO EM PRESENÇA DE POLISSACARÍDEO.....61

FIGURA 18. POLISSACARÍDEOS INIBEM O EFEITO FIBRONECTINOLÍTICO DO VENENO.....63

FIGURA 19. ADESÃO DAS CÉLULAS ENDOTELIAIS SOBRE "COAT" DE FIBRONECTINA.....66

FIGURA 20. ENSAIO DE ADESÃO SOBRE MATRIZ DE FIBRONECTINA EXPOSTA AO VENENO NA PRESENÇA OU AUSÊNCIA DOS POLISSACARÍDEOS.....67

FIGURA 21. POLISSACARÍDEOS INIBEM A DEGRADAÇÃO DE FIBRONECTINA DA MEC CAUSADA PELO VENENO.....70

FIGURA 22. MOLÉCULA DE FIBRONECTINA, SEUS DOMÍNIOS E SÍTIOS DE INTERAÇÃO.....75

FIGURA 23. LALP, METALOPROTEASE DA FAMÍLIA DAS ASTACINAS.....78

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

A – Alanina

BSA - Albumina de soro bovino (Bovine Serum Albumin)

C – Cisteína

D - Ácido Aspártico

CS – Condoitim sulfato

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

dpi – “dots per inch”

DS – Dermatam sulfato

E – Ácido Glutâmico

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

ELISA - Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

F – Fenilanina

G – Glicina

GAG - Glicosaminoglicano

H – Histidina

HS – heparam sulfato

I – Isoleucina

IgG - Imunoglobulina G

K – Lisina

K_D – constante de dissociação aparente

kDA - kilo daltons

L – Leucina

LALP – *Loxosceles* astacin-like protease

M – Metionina

M- molar

m- mili

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

MEC- Matriz Extracelular

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

MMP – Metaloproteases

N – Asparagina

nM – nano molar

P – Prolina

Q – Glutamina

R – Arginina

RGD – tripeptídeo arginina, glicina e ácido aspártico

PBS – Tampão salino fosfatado (phosphate buffer saline)

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

S – Serina

SDS – PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (sodium dodecyl sulfate – poliacrylamide gel electrophoresis)

SFB - Soro fetal bovino

T – Treonina

TIMP – Inibidores de Metaloproteases

V – Valina

Y - Tirosina

W - Triptofano

μ - micro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 15
1.1. CARACTERÍSTICAS GERAIS DAS ARANHAS 15
1.2. O GÊNERO *Loxosceles* 16
1.3. DISTRIBUIÇÃO DO GÊNERO Loxosceles 18
1.4. *Loxosceles intermedia* *19*
1.5. LOXOSCELISMO *21*
1.6. DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO 25
1.7. CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DO VENENO LOXOSCÉLICO 26
1.7.1. Ação das toxinas do veneno sobre a matriz extracelular 29
1.7.2. Ação das toxinas sobre as células endoteliais 30
1.8. POLISSACARÍDEOS SULFATADOS 32
1.8.1. Glicosaminoglicanos 32
1.8.2. Heparina 34
1.8.3. Fucanas 35
1.8.4. Interações de Polissacarídeos com as Células Endoteliais 37
2. OBJETIVOS 39
2.1. OBJETIVO GERAL 39
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 39
3. MATERIAIS E MÉTODOS 40
3.1. OBTENÇÃO DO VENENO LOXOSCÉLICO 40
3.2. POLISSACARÍDEOS SULFATADOS 40
3.3. LINHAGEM CELULAR 41
3.4. OBTENÇÃO DE MOLÉCULA DE MATRIZ PURIFICADA 42
3.5. CARACTERIZAÇÃO DO EFEITO DO VENENO NA PRESENÇA OU AUSÊNCIA DOS POLISSACARÍDEOS SULFATADOS 43
3.6. ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DAS CÉLULAS EXPOSTAS AO VENENO NA PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE POLISSACARÍDEO 44
3.7. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 44
3.8. ENSAIO DE CITOMETRIA DE FLUXO 45

3.9. ENSAIO DE ADESÃO CELULAR 46
3.10. PROTEÇÃO CONTRA DEGRADAÇÃO FIBRONECTINA PLÁSMATICA..47
3.11. PROTEÇÃO CONTRA DEGRADAÇÃO DA MATRIZ EXTRACELULAR DE FIBRONECTINA PRODUZIDA PELAS CÉLULAS ENDOTELIAIS
....47
3.12. ANÁLISES ESTATÍSTICAS..... 48
4. RESULTADOS 49
4.1. CARACTERIZAÇÃO DO EFEITO DO VENENO NA PRESENÇA OU AUSÊNCIA DOS POLISSACARÍDEOS SULFATADOS..... 44
4.2. ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DAS CÉLULAS EXPOSTAS AO VENENO NA PRESENÇA OU AUSÊNCIA DOS POLISSACARÍDEOS..... 55
4.3. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 58
4.4. ENSAIO DE CITOMETRIA DE FLUXO..... 60
4.5. POLISSACARÍDEOS PROTEGEM A DEGRADAÇÃO DA MATRIZ EXTRACEULAR CAUSADA PELO VENENO 61
4.5.1. A DEGRADAÇÃO DE FIBRONECTINA PLÁSMATICA CAUSADA PELO VENENO É MINIMIZADA PELOS POLISSACARÍDEOS.....62
4.5.2. POLISSACARÍDEOS MANTEM O PADRÃO DE ADESÃO CELULAR À FIBRONECTINA.....68
4.5.3. POLISSACARÍDEOS PODEM PROMOVER A PROTEÇÃO DA CLIVAGEM DA FIBRONECTINA PRODUZIDA PELAS CÉLULAS
5. DISCUSSÃO 71
6. CONCLUSÕES 81
REFERÊNCIAS.....82

DEMO VERSION

This file was created with the DEMO VERSION of CAD-KAS PDFs 2 One. This is the reason why this file contains this page.

The order the full version please visit our website under http://www.cadkas.com

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; 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.

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-abdomen. Entretanto, nas aranhas essas 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; BARNES, 1996). São exímios predadores, se alimentando principalmente de insetos.

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 & HODGSON, 2002).

Apesar do pavor que a maioria das pessoas sentem ao se deparar com qualquer aranha, apenas 100 espécies descritas parecem oferecer riscos ao homem (BARBARO *et al.*, 1994; RUPPERT; BARNES, 1996; APPEL *et. al.,* 2005), e de todas as espécies já descritas, apenas algumas dezenas apresentam o veneno bem estudado (GRISHIN, 1999), sendo que por séculos, picadas de diferentes espécies de aranhas vem sendo associadas a casos específicos e doenças (SCHIENLE *et al*., 2005).

Dentro da subordem das Labidognathas, muitas famílias são consideradas perigosas, tais como Segestriidae, Agelenidae, Salticidae, Gnaphosidae, Thomisidae, Heteropodidae, Clubionidae, Lycosidae, Theridiidae, Loxosxelidae 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; RASH; HODGSON, 2002).

1.2. O GÊNERO Loxosceles

O gênero Loxosceles (mundialmente conhecido como aranha marrom, marrom reclusa, aranhas gaucho) se tornaram importantes nos estudos devido a seu hábito cosmopolita, principalmente em ambientes humanos (APPEL *et al*., 2005).

Aranhas deste gênero possuem o corpo com comprimento de 8 a 15 mm de comprimento do corpo e pernas medindo de 8 a 30 mm. (DA SILVA *et al*., 2004) 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), possuem uma mancha semelhante a 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 43ºC, 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 & VISCHER, 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 inadvertida do animal contra o corpo (LUCAS, 1988; FUTRELL, 1992; APPEL *et al*., 2005).

FIGURA 1. EXEMPLAR DE *Loxosceles reclusa* EVIDENCIANDO CARACTERÍSTICAS DO GÊNERO *LOXOSCELES.* Além da cor marrom, as aranhas do gênero *Loxosceles* compartilham a característica mancha em formato de violino no cefalotórax **(1)** e os três pares de olhos em "U", que podem ser usados como critério de classificação taxonômica **(2)**. FONTE: DONEPUDI *et al*., 2005.

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), América do Norte (FUTRELL, 1992; ESCALANTE – GALINDO *et al*., 1999; SWANSON; VETTER, 2006), Europa (NICHOLSON; GRAUDINS, 2002; BOGDAN *et al.,* 2005), África (FUTRELL, 1992 e NICHOLSON; GRAUDINS, 2003), Israel (COHEN *et al*., 1999) e Austrália (YOUNG; PINCUS, 2001; NICHOLSON; GRAUDINS, 2003), como pode ser visualizado na Figura 1. Foram também notificados acidentes no Oriente Médio e algumas partes da Ásia (NICHOLSON; GRAUDINS, 2003), assim como em Israel (BORKKAN *et al*., 1995 e COHEN *et al*., 1999).

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. gaucho*, 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. irtermedia*, 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. gaucho*, *L, laeta* e *L. intermedia* são as predominantes, sendo que estas são as principais espécies envolvidas em acidentes acometidos por aracnídeos (MÁLAQUE *et al*., 2002).

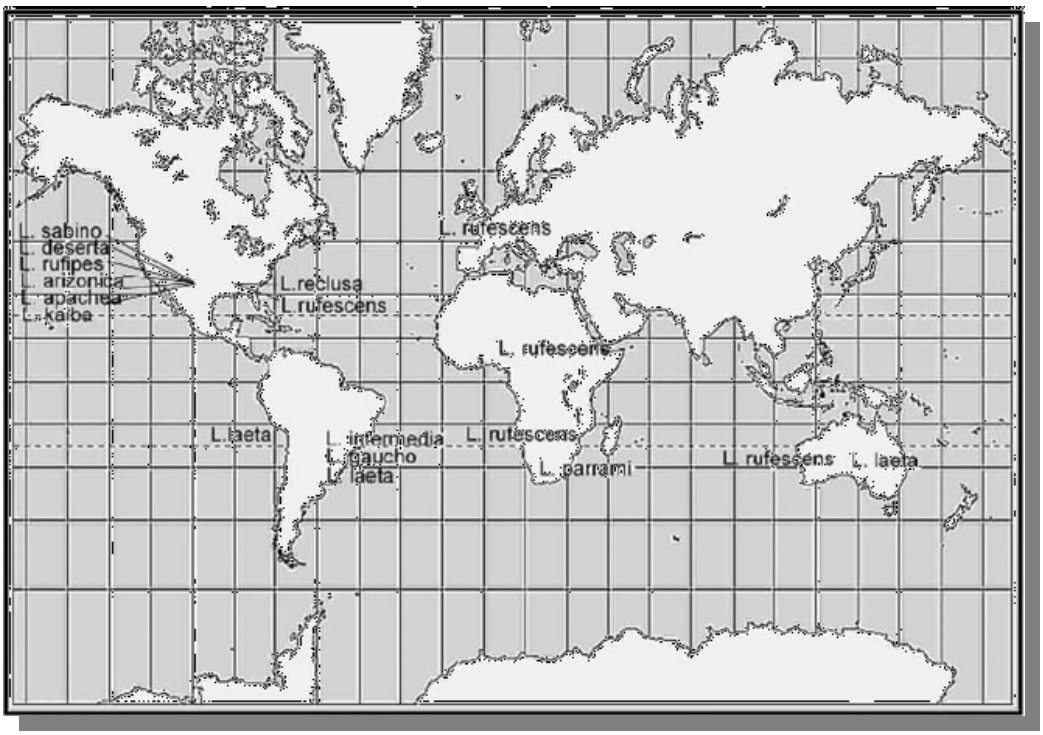


FIGURA 2. DISTRIBUIÇÃO MUNDIAL DAS PRINCIPAIS ESPÉCIES DO GÊNERO LOXOSCELES. Como ilustra a figura, o gênero *Loxosceles* está distribuído globalmente. Diferentes espécies ocorrem em várias regiões, se tornando importante caso de saúde pública. Além das regiões marcadas no mapa, casos de loxoscelismo também já foram reportados em Israel, no Oriente Médio. FONTE: HOGAN *et al.,* 2004.

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: *Loxosceles*
Ordem: Araneida	Espécie: *Loxosceles intermedia*

Como as demais aranhas do gênero *Loxosceles,* trata-se de uma espécie cujos representantes são reclusos, não agressivos e preferem se alimentar de presas mortas (SANDIDGE, 2003). 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 (ANDRADE *et al*., 2000), como pode ser visualizado na figura 3.

FIGURA 3. DIMORFISMO SEXUAL DE LOXOSCELES INTERMEDIA. Macho à esquerda apresenta abodômen delgado e pernas mais longas, enquanto a fêmea à direita possui abdômen robusto e pernas mais curtas; o critério mais evidente para dimorfismo sexual, em quaisquer espécie de aranhas, se trata da presença de pedipalpos modificados no macho. FONTE: DA SILVA *et al*.,2004.

São aranhas bem adaptadas às regiões urbanas, onde deixam a teia durante a noite, são animais que possuem hábito noturno, saem à procura de alimento ou de um lugar no qual irão construir uma nova teia (MÁLAQUE *et al.,* 2002). 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 e, em um ato de defesa a aranha acaba por picar a vítima. Estes acidentes ocorrem principalmente durante as estações mais quentes do ano (SCHENONE; LETONJA, 1975).

A fêmea produz mais veneno que o macho e o volume médio inoculado por picada é de 4µl com cerca de 65 a 100µg proteínas (SAMS *et al*., 2001).

1.5. LOXOSCELISMO

Loxoscelismo é o termo utilizado para representar os acidentes envolvendo aranhas do gênero *Loxosceles* (BARBARO *et al*., 1994). O primeiro caso documentado de loxoscelismo ocorreu em 1879 no Tennessee, sendo que a reação cutânea foi primeiramente descrita somente em 1937 (HUNTER *et al*., 2001). Entretanto, dados realmente consistentes remontam cerca de 50 anos atrás, em 1957 no Chile, e outras observações feitas no Brasil, seguidas pelos Estados Unidos. Estes casos correlacionaram as picadas de aranhas marrons às lesões necróticas (MACCHIAVELLO, 1947; ATKIN *et al.,* 1958; SAMS *et al.,* 2001).

No Brasil, principalmente no Sul e Sudeste , o loxoscelismo é considerado um sério problema de Saúde Pública, com mais de 3.000 casos registrados anualmente pelo Ministério de Saúde (HOGAN *et al.,* 2004). De fato, o loxoscelismo está classificado como a terceira maior incidência de acidentes envolvendo animais venenosos no país (PAULI *et al.,* 2006). O Paraná é o estado brasileiro que mais notifica acidentes provocados por aranhas do gênero, com uma média anual de 2.577 casos, sendo a espécie *L. intermedia* a mais comumente encontrada em ambiente urbano, e possivelmente a maior responsável por estes acidentes (MARQUES-DA-SILVA; FISCHER, 2005). Segundo dados da Secretaria de Saúde do Estado do Paraná, este número vem aumentando nos últimos anos.

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 a mais proeminente na área urbana do Estado de Paraná (FISHER, 1994, MATTOSINHO *et al*., 1997 e ANDRADE *et al*., 2000).

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 de 84 - 97% e de 3 - 16% dos casos de acidentes (BARBARO *et al*., 1992; PAULI *et al.,* 2006). 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 (GONÇALVES-DE-ANDRADE *et al.,* 1999; GUILHERME; FERNANDES, BARBARO*,* 2001; DE OLIVEIRA *et al*., 1999, 2005), assim como dependerá de fatores pertinentes à espécie da aranha (Ministério da saúde, 1998), sexo do animal (DE OLIVEIRA *et al*., 1999), seu estágio de desenvolvimento (ANDRADE *et al*., 1999) e quantidade de veneno inoculado (SEZERINO *et al*., 1998).

Os mecanismos pelos quais o veneno da aranha marrom causa as lesões sistêmica e o local estão sob investigação. Não existem explicações científicas conclusivas do motivo pelo qual camundongos não desenvolvem a lesão dermonecrótica, enquanto humanos, porcos da índia e coelhos a desenvolvem (DA SILVA *et al.,* 2004). O veneno de *L. deserta* causa uma grande lesão necrótica em suínos e o tamanho da lesão é dose dependente (HOOBS; YEALY, 1994).

FIGURA 4. CASO DE LOXOSCLISMO. **(A)** Lesão local, 48 horas após a picada. Característico edema e eritrema com placa marmórea (seta). **(B)** Evolução do quadro 26 dias após a picada com espalhamento gravitacional (triângulo). **(C)** 113 dias após a picada, com formação da cicatriz. **(D)** 3 anos após a picada, com cicatriz ainda visível. FONTE: Hogan *et al.,* 2004.

Alguns dos efeitos nocivos do veneno podem ser atribuídos às toxinas proteolíticas, que degradam várias moléculas de matriz extracelular, resultando em hemorragia local e espalhamento gravitacional da lesão cutânea e efeitos sistêmicos, incluindo coagulação intravascular disseminada e falha renal (FEITOSA *et al*., 1998; VEIGA *et al*., 1999, 2000, 2001a,b; LUCIANO *et al*., 2004; CHAIM *et al.,* 2006).

Existem evidências científicas do papel de neutrófilos na dermonecrose causada pelo veneno de *Loxosceles intermedia* e isto foi comprovado através de análises histopatológicas em modelos animais (ELSTON *et al*., 2000; OSPEDAL *et al*., 2002) e em biópsias de pacientes humanos (YIANNIAS; WINKELMANN,

1992). A participação de neutrófilos na resposta inflamatória parece ser dependente de um efeito agonista de células endoteliais pelo veneno, o que leva a uma ativação desregulada e indireta de neutrófilos, envolvidos na dermonecrose (PATEL, *et al*., 1994, DA SILVA *et al*., 2004), como pode ser visualizado na figura 5.

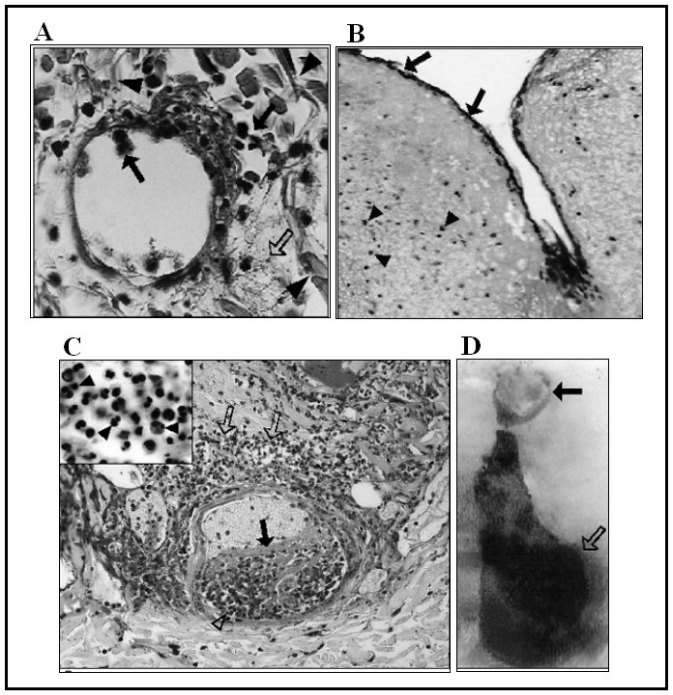


FIGURA 5. ALTERAÇÔES HISTOPATOLÓGICAS EM PELE DE COELHO APÓS EXPOSIÇÃO AO VENENO DE ARANHA MARROM. Todas as micrografias mostram fotos de biópsias de coelho que foi tratado com 40µg de veneno total de aranha marrom. **(A)** Vaso sanguíneo e tecido conjuntivo depois de 30 minutos de exposição ao veneno. Seta preta indicam leucócitos interagindo com células endoteliais. Seta branca indica rede de fibrina na derme e triângulo preto indica grande desorganização das fibras de colágeno. **(B)** Detalhes do vaso sanguíneo da pele de coelho após 8 h de exposição ao veneno, mostrando acúmulo de leucócitos (setas brancas), a seta preta indica coagulação intravascular. **(C)** Pele de coelho após 2 dias de inoculação com veneno. A seta preta indica dermonecrose, e o triangulo preto mostra pontos difusos de dermonecrose. **(D)** Visualização macroscópica de dermonecrose em pele de coelho após 24horas de injeção do veneno. Seta preta indica local de aplicação do veneno, e seta branca mostra o espalhamento gravitacional. FONTE: DA SILVA *et al.,* 2004.

1.6. DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO

O diagnóstico do loxoscelismo é raramente baseado na identificação da aranha, pois os pacientes não levam consigo o animal. O meio mais comum de reconhecimento do loxoscelismo se dá por sinais clínicos e sintomas além de dados geográficos (MALAQUE *et al*., 2002). O diagnóstico baseado unicamente em exames clínicos é sempre difícil e especulativo, sendo assim, existem vários casos onde picadas de aranha marrom não foram reconhecidas como tal, pois se encontravam fora da região geográfica natural de ocorrência deste tipo de aranha (VETTER, 1999; 2000; NISHIOKA, 2001; VETTER AND BARGER, 2002; VETTER AND BUSH, 2002; VETTER *et al*., 2003).

Vários casos de diagnósticos errôneos foram reportados (DA SILVA *et al.,*2004). A lesão característica da doença de Lyme é muito similar a lesão dermonecrótica do loxoscelismo e imita até mesmo os simtomas sistêmicos. Osterhoudt *et al*. (2002) reportou que um garoto de 9 anos com doença de Lyme foi mal diagnosticado como tendo sido picado por aranha marrom. A doença de Lyme pode ser considerada como um diagnóstico diferencial. Vetter e Bush (2002) descreveram um caso de queimadura química erroneamente diagnosticado como picada de aranha marrom, sendo que este paciente era de um local onde inexistiam populações de aranha marrom.

Os diagnósticos mais completos devem ser baseados na pesquisa básica, onde comparações com achados histopatológicos em modelos animais e dados clínicos, como um típico perfil de células inflamatórias (FUTRELL, 1992; YIANNIAS AND WINKELMANN, 1992; OSPEDAL *et al*., 2002), em caso de dúvidas, os médicos devem requisitar diagnósticos confirmatórios com a biópsia de pele lesionada.

Barret *et al*., (1993) desenvolveu um teste específico para diagnosticar picadas de *L. reclusa* usando a coleta de secreções da lesão. De acordo com os

autores, a sensibilidade do teste é de 90%, e em casos de amostras de 3 dias após a picada, a especificidade é de 100% comparado com outras espécies.

Um teste de sanduíche para ELISA foi usado para detecção de proteínas do veneno do gênero *Loxosceles,* o qual além de identificar veneno de *L. intermedia, L. gaucho* ou *L. laeta* injetados em camundongos, também pode detectar antígenos circulantes no soro de pacientes envenenados por *L. intermedia* (CHAVEZ-OLORTEGUI *et al*., 1998).

Diferentes intervenções e medicamentos foram propostos para o tratamento de envenenamento loxoscélico, tais como tratamento local, analgésicos, aspirina, vasodilatadores, dextran, nitroglicerina, choques elétricos, anti histamínicos, antibióticos, corticosteróides, excisão cirúrgica, antiveneno e dapsona (KING JR., 1985; REES *et al*., 1985,1987; ALARIO *et al*.,1987; BARRETT *et al*., 1994; MAYNOR *et al*., 1997; MASTERS *et al*., 1998; ISBISTER *et al.,* 2003; DA SILVA *et al*., 2004; SWANSON E VETTER, 2005).

Entretanto, as pesquisas não chegaram a resultados conclusivos, com pouca evidência de melhora no quadro clínico para sustentar a variedade destes tratamentos (FUTRELL, 1992; PHILLIPS *et al.,* 1995; SAMS *et al.,* 2001; WENDELL, 2003). Algumas medidas não são recomendadas, enquanto outras são demasiadamente caras, dolorosas ou potencialmente tóxicas e muito do que é conhecido em estudos de casos, onde nenhum cuidado de controle e testes era tomados, se torna difícil provar a eficácia do uso destes vários medicamentos em humanos (JARVIS *et al*., 2000; SAMS *et al*., 2001; SWANSON E VETTER, 2005).

1.7. 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. Qualquer que seja a função dos venenos, eles evolutivamente foram mais eficazes do que o uso da teia (RUPPERT; 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 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*.

Nas aranhas do gênero *Loxosceles* o veneno apresenta ação enzimática (MARTINEZ-VARGAS, 1987) e é uma mistura complexa de toxinas proteicas com proeminência de proteínas de baixo peso molecular de cerca de 5 a 40 kDa. O volume total de veneno injetado é mínimo (entre 1 a 2 µl), e contém proteínas na ordem de dezenas de microgramas (SWANSON; VETTER, 2006). Entre estas enzimas, o veneno apresenta identificado em sua composição várias toxinas, incluindo fosfases alcalinas, hialuronidases, metalloproteases (proteases semelhante às astacinas), peptídeos inseticidas de baixo peso molecular (5,6 – 7,9 kDA), e esfingomielinase D de 32-35 kDa aparentemente envolvida na agregação plaquetária (FUTRELL, 1992; FEITOSA *et al*, 1998; de CASTRO *et al*., 2004; BARBARO *et al*., 2005; da SILVEIRA *et al*., 2006; da SILVEIRA *et al*., 2007a; da SILVEIRA *et al.,* 2007b; da SILVEIRA *et al*., 2007c) 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).

Análises em SDS-PAGE dos venenos de diferentes espécies como *L. gaucho*, *L. intermedia* e *L. laeta* revelaram similaridade em sua composição, com a presença de bandas nas regiões entre 30 e 35 kDa (BARBARO *et al*., 1994). As toxinas presentes no veneno destas três espécies podem ser separadas em três frações principais (A, B e C) sendo a atividade de dermonecrose restrita apenas à fração A (BARBARO *et al*., 1996). Em *L. gaucho* foi isolada uma fração de 30 kDa

na qual foram identificadas duas isoformas denominadas Loxnecrogin A (31,4 kDa) e Loxnecrogin B (31,6 kDa) com atividade dermonecrótica, entretanto não tão intensa em relação a atividade produzida pelo veneno total.

As toxinas presentes no veneno de aranha marrom, em especial as dermonecróticas, são capazes de provocar a dermonecrose, hemólise, agregação plquetária, disturbios renais, aumento na permeabilidade vascular e resposta inflamatória desregulada (DA SILVA *et al*., 2004; HOGAN *et al*., 2004; SWANSON; VETTER, 2006; CHAIM *et al*., 2006).

A toxina primeiramente caracterizada em veneno de *Loxosceles reclusa* como esfingomielinase-D, tem ação direta na clivagem da ceramida-1-fosfato da esfingomielina (FUTRELL, 1992; DA SILVA *et al*., 2004), mas estudos baseados em métodos bioquímicos, levam a crer que a enzima possui uma vasta gama de substratos, hidrolizando glicerofosfolipídios e esfingofosfolipídios para gerar ácido lisofosfatídico ou ceramida-1-fosfato. Como resultado, foi sugerido que tais toxinas, antes conhecidas como esfingomielinases-D do veneno de aranha marrom, fossem denominadas fosfolipase-D, devido a sua maior gama de atividade hidrolítica em lipídios (LEE; LYNCH, 2005).

Há presença de uma hialuronidase com mobilidade eletroforética entre 33 kDa e 63 kDa, e sua provável contribuição consiste na extensão das lesões dermonecróticas por espalhamento gravitacional (FUTRELL, 1992; YOUNG; PINCUS, 2001; DA SILVA *et al*., 2004). Tais enzimas 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).

Além das enzimas mencionadas existem outras moléculas biologicamente ativas presentes no veneno de *L. intermedia* com atividade proteolítica sobre

entactina e sobre componentes da membrana basal (FUTRELL, 1992; VEIGA *et al*., 2000; VEIGA *et al*, 2001b).

1.7.1. 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 glicoconjugados que interagem tridimensionalmente, originando uma rede molecular (YURCHENCO; 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. Sabe-se que o veneno degrada o esqueleto protéico do proteoglicano de heparam sulfato e hidrolisa entactina (molécula que age como ponte de organização da membrana basal) (VEIGA *et al*., 2001b), como pode ser visualizado na figura 6. Ainda, experimentos de imunomarcação com visualização em microscopia confocal, mostraram a ligação de toxinas do veneno à membrana basal glomerular de rins de camundongos expostos as toxinas presentes no veneno (LUCIANO *et al*., 2004), o que mais uma

vez reforça a idéia da participação da matriz extracelular no comprometimento renal nos casos de loxoscelismo cutâneo-visceral.

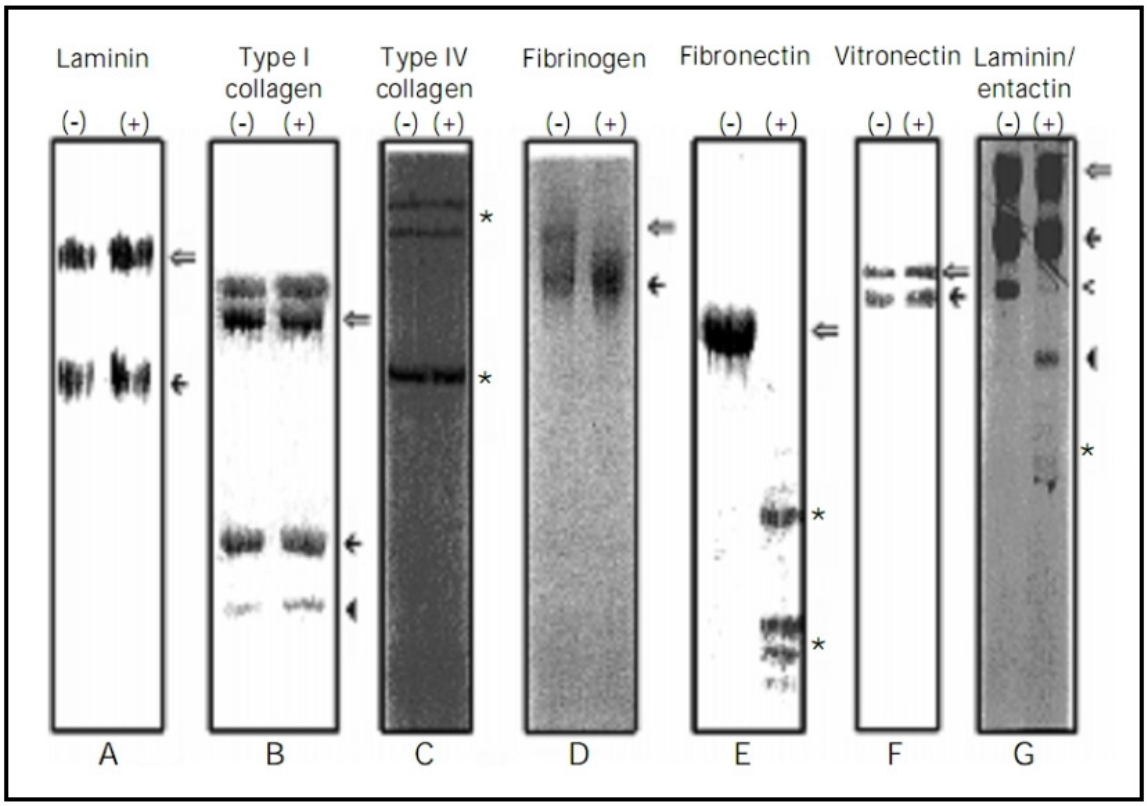


FIGURA 6 – DEGRADAÇÃO DE MOLÉCULAS PURIFICADAS DE MATRIZ EXTRACELULAR POR TOXINAS DO VENENO DE ARANHA MARROM. Diferentes moléculas de matriz foram incubadas na ausência (-) ou na presença (+) do veneno e analisadas em gel de SDS-PAGE. **(A)** Laminina extraído do tumor de EHS. **(B)** Colágeno do tipo I extraído do tendão de rato. **(C)** Colágeno do tipo IV de placenta humana. **(D)** Fibrinogênio humano. **(E)** Fibronectina humana. **(F)** Vitronectina humana. **(G)** Dímero de laminina e entactina extraídos de tumor de EHS. FONTE: VEIGA *et al.,* 2001b.

1.7.2. Ação das toxinas 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 (figura 7 A-C). No entanto, a viabilidade das células soltas mostrou ser superior a 95%. Desta forma, quando estas células foram lavadas e recolocadas em cultura, em uma nova placa com meio livre de veneno, foi observado que as mesmas foram capazes de aderir e se proliferar (figura 7 D-F), mostrando que as enzimas do veneno atuam sobre a matriz extracelular (Veiga *et al*., 2001a), mas no tempo analisado não provoca a morte das células.

Sabe-se que o tratamento de células endoteliais com veneno de aranha marrom, além de promover a perda de adesão, também leva a alterações ultraestruturais, bem como o tratamento da matriz de fibronectina secretada pelas próprias células endoteliais com veneno, exibe extensa desorganização e degradação (PALUDO *et al*., 2006).

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 também interagem com os componentes da matriz extracelular poderiam minimizar ou até mesmo levar à inibição da ação dos efeitos induzidos por estas toxinas. Assim, no presente trabalho busca-se investigar se polissacarídeos sulfatados podem interferir com a ação do veneno. Para tanto, estes compostos são descritos a seguir.

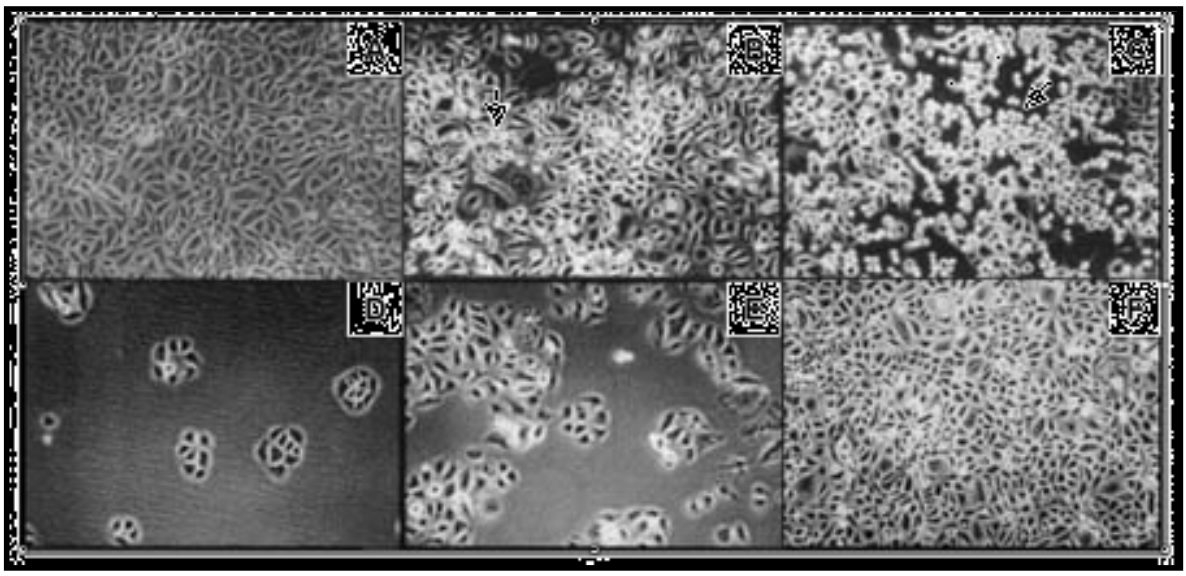


FIGURA 7. CÉLULAS ENDOTELIAS EXPOSTAS AO VENENO DE *LOXOSCELES INTERMEDIA*. **(A)** Controle, célula não expostas para as toxinas do veneno. **(B)** e **(C)** Células expostas às toxinas do veneno por 6 e 18 horas, respectivamente. Observe que as células alteraram a morfologia, apresentando um caráter arredondado, o qual indica a perda da interações célula-célula e célula-matriz extracelular. **(D)** - **(F)** As células soltas foram lavadas e recolocadas em uma nova placa de cultura como meio fresco, livre de veneno e as células foram mantidas em cultura por 6 horas **(D)**, 18 horas **(E)** e 72 horas **(F)**. FONTE: Veiga *et al*, 2001a.

1.8. POLISSACARÍDEOS SULFATADOS

1.8.1. Glicosaminoglicanos

Os glicosaminoglicanos (GAGs) são grandes e complexas moléculas de carboidratos que interagem com várias proteínas, atuando em muitos processos fisiológicos e patológicos (RADEMANCHER *et al.,* 1988; JACKSON *et al.,* 1991). Também já foram chamados de mucopolissacarídeos, devido às suas propriedades viscosas e lubrificantes. Estas moléculas estão presentes em superfícies de todas as células animais, na matriz extracelular, em grânulos intracelulares de específicos tipos celulares e alguns são conhecidos por ligarem e regularem uma variedade distinta de proteínas, incluindo citocinas, enzimas, fatores de crescimento e moléculas de adesão (JACKSON *et al.,* 1991; CONRAD *et al.,* 1998).

Estes heteropolisacarídeos lineares são 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). A maioria desses compostos apresentam grupamentos sulfatos, que juntamente com as carboxilas dos ácidos urônicos, conferem uma alta densidade de cargas negativas a estes compostos (DIETRICH, 1984).

Em tecidos de mamíferos ocorrem sete tipos de GAGs: heparina, heparam sulfato, condroitim 4-sulfato, condroitim 6-sulfato, dermatam sulfato, queratam sulfato e ácido hialurônico (DIETRICH, 1984), definidos com base em seus constituintes. Estes glicosaminoglicanos podem ser diferenciados quanto ao tipo de hexosamina e açúcar não nitrogenado, quanto ao grau de sulfatação e a posição em que são sulfatados, bem como quanto ao tipo de ligação glicosídica inter- e intradissacarídica.

Todos são polímeros de natureza ácida e, com exceção do ácido hialurônico, carregam grupamentos sulfatos, ligados a várias posições. Desta forma a alta densidade de cargas negativas tem influência sobre funções fisiológicas e também sobre propriedades farmacológicas.

Os glicosaminoglicanos possuem um papel importante na sinalização celular e desenvolvimento de angiogênese (LOZZO *et al.,* 2001), crescimento axonal (HOLT *et al.,* 2005) e na anti coagulação (CASU *et al.,* 2004; FAREED *et al.,* 2000). Acredita-se que estas moléculas participam em processos de migração celular pois agem como co-receptores para fatores de crescimento. Na verdade, membros da família de fatores de crescimento precisam interagir com cadeias de heparina / heparam sulfato a fim de que seus receptores ativem toda sua sinalização (LOZZO *et al.,* 2001; KISYLEVSKY *et al.,* 2007). A superexpressão destes fatores contribuem para a progressão de tumores, em caso de matástases.

1.8.2. Heparina

Heparina foi o primeiro composto a ser usado como anticoagulante e agente anti trombótico. Foi isolada primeiramente em 1916 de uma preparação de fígado de cão. A heparina comercial introduzida nas práticas clínicas há cerca de 60 anos atrás, é extraída de mucosa intestinal de suínos e bovinos e também de pulmão bovino (NADER *et al.,*2001). Além de estar presente em tecidos como pele, pulmão e intestino, também localiza-se dentro de mastócitos, estando relacionada com a resposta imunológica inespecífica.

Esta molécula é bastante conservada evolutivamente, conservando estruturas similares em todos o reino vertebrado, como por exemplo o peru (NADER *et al.,* 1999), baleia (WARDA *et al.,* 2003a), camelo (OTOTANI *et al.,* 1981), rato (WARDA *et al.,* 2003b), humanos (BLAND *et al.,* 1982) e até mesmo em organismos invertebrados (LINHARDT *et al.,* 1992), tais como lagosta (HOVINGH *et al.,* 1982), camarão (DIETRICH *et al.,*1982), espécies de moluscos marinhos (HOVINGH *et al.,* 1993) e caranguejo (PJELR *et al.,* 1987).

As cadeias de heparina são constituídas de dissacarídeos contendo ácido urônico e α-D-glucosamina, que pode estar sulfatado. Os resíduos de ácidos urônicos são do tipo α-L-idurônico e β-D-glucurônico sendo que a maioria dos resíduos de ácido L-idurônico está sulfatado. O ácido D-glucurônico raramente encontra-se sulfatado. As ligações glicosídicas intradissacarídicas são do tipo α (1-4) ou β (1-4) e a ligação interdissacarídica é do tipo α (1-4) (GANDHI *et al.,* 2008) como pode ser visto na figura 8.

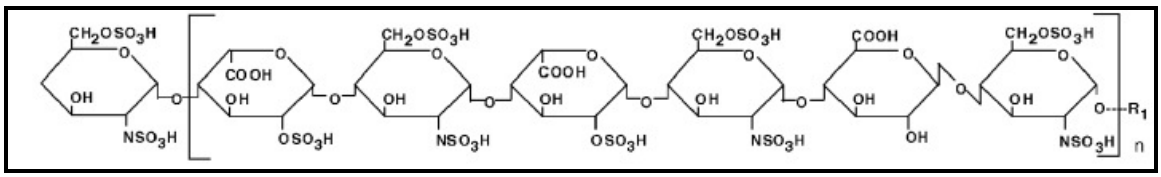


FIGURA 8. UNIDADE ESTRUTURAL DA HEPARINA. FONTE: GANDHI *et al.,* 2008.

1.8.3. Fucanas

O primeiro fucoidan isolado proveniente de alga marrom foi descrito a 95 anos atrás (KILING, 1913). Trinta e cinco anos depois foram publicadas evidências de que fucanas também ocorriam em invertbrados marinhos (VASSEUR, 1948).

Estes polissacarídeos denominados fucana, possuem como característica estrutural mais marcante a presença de L-fucose sulfata, são facilmente extraídos da parede celular de algas marrom (família Phaeophyceae) utilizando água quente (PERCIVAL; ROSS, 1950) ou solução ácida (BLACK, 1954). Sua estrututura é complexa e resíduos de 3- e 4-fucose ligados estão certamente presentes, e sulfatação nas posições 2- e 4- podem ser identificadas (MULLOY *et al*., 1994; PEREIRA *et al*., 1999).

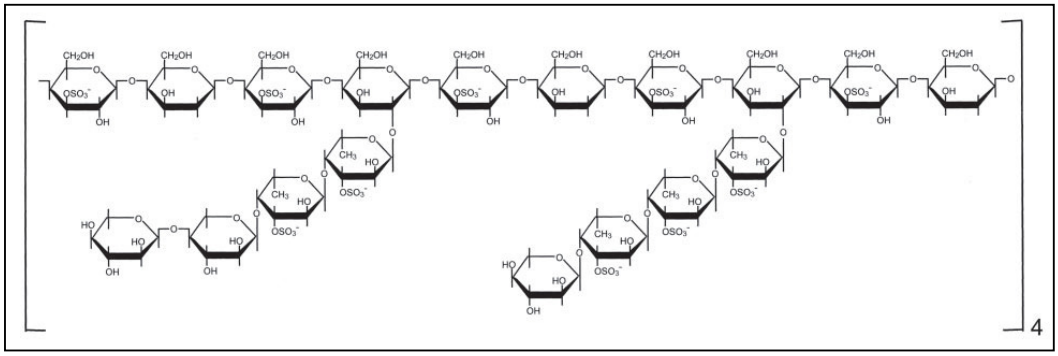


FIGURA 9. ESTRUTURA PROPOSTA PARA UMA GALACTOFUCANA SULFATADA EXTRAÍDA DE *S. Schoederi*. FONTE: ROCHA *et al.,* 2005.

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; MACDOWELL, 1967).

Ao contrário das fucanas extraidas de algas, os polissacarídeos de equinodermos possuem estruturas simples, compostas de unidades repetitivas de oligossacarídeos. Elas diferem entre si principalmente por diferentes padrões de sulfatação nos resíduos de suas unidades (MULLOY *et al*., 1994; ALVES *et al*., 1997; VILELA-SILVA *et al*., 1999)

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 (BERTEAU; MULLOY, 2003).

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*., 2002); anti-oxidante (RUPEREZ *et al*., 2002), inibidores *in vitro* de vários vísrus, incluindo impotantes patógenos humanos, tais como o vírus da imunodficiência humana, herpes e dengue (WITVROUW; DECLERQ, 1997; MARCHETTI *et al*., 1995, GONZALEZ *et al*., 1987; KAKUDA, 2000) entre outras.

Porém, devido ao fato de muitos estudos de atividade biológica serem conduzidos utilizando preparações cruas de fucoidan, se torna difícil determinar as relações entre atividade e estrutura. Ao longo dos anos, vem se tornando mais claro que ao menos algumas destas várias atividades descritas não são meramente devido em função de sua alta carga negativa, mas especificamente pela complexidade estrutural distinta (BERTEAU; MULLOY, 2003).

A presença de xilofucanas em três espécies de algas marrom foi demonstrada por Dietrich e col. (1995). As algas *Padina gymnospora, Dictyota*

mertensis e S*argassum vulgare*, apresentavam três fucanas, que foram 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.

1.8.4. Interações de Polissacarídeos com as Células 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 (KJELLÉN; 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 matriz extracelular 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*. (2008) demonstraram que a atividade antitrombótica da heparina é mediada pelo estimulo da síntese de heparam sulfato nas células endoteliais e, a matriz extracelular é o local de ligação para desencadear tal estímulo (Figura 9 – A-D) (TRINDADE *et al*., 2008). Ainda, estes autores foram capazes de mostrar que a interação da heparina com a MEC é dose e tempo dependentes (dados não mostrados). 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.

Assim, como o sítio de ligação dos polissacarídeos sulfatados é a matriz extracelular, buscamos, com o presente trabalho, investigar se estes compostos podem ter efeito protetor sobre a ação do veneno da aranha marrom, utilizando como modelo de estudo, células endoteliais em cultura.

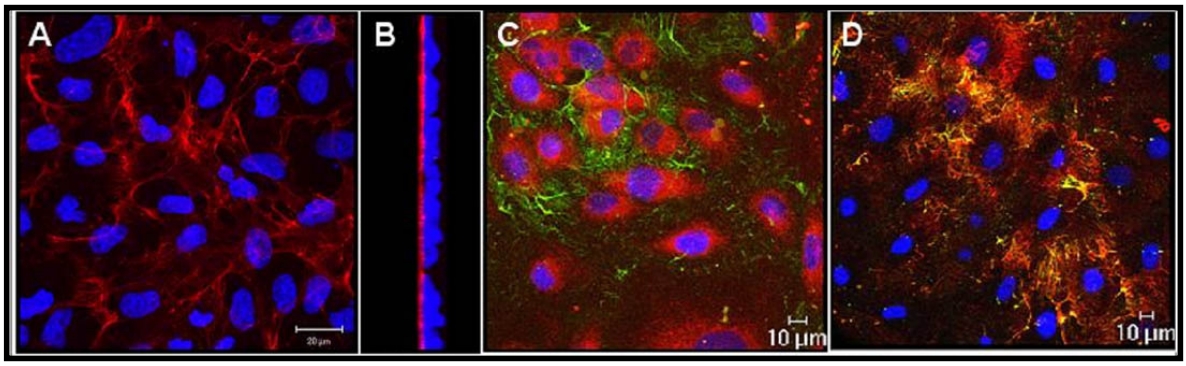


FIGURA 10. HEPARINA LIGA À COMPONENTES DA MATRIZ EXTRACELULAR. **(A)-(D)** Imagens obtidas em microscopia confocal. (**A)** Heparina biotinilada ligada à matriz em vermelho. (**B)** Projeção da imagem A deslocada 90°; **(C)** Heparina biotinilada ligada à matriz em verde e anticorpo anti-sindecam-4 (proteoglicano de superfície celular) revelado em vermelho; **(D)** colocalização da ligação da heparina biotinilada corada em vermelho com a imunomarcação para fibronectina revelada em verde. Núcleo celular corado em azul com DAPI. FONTE: Trindade *et al*., 2008.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Levando em consideração ação do veneno de L. intermedia sobre componentes da matriz extracelular, causando a desadesão das células em cultura e, no endotélio vascular induzindo a degeneração de suas paredes e, por outro lado, que polissacarídeos sulfatados podem interagirem com componentes da matriz extracelular, objetivou-se avaliar o possivel papel protetor de polissacarídeos sultadatos sobre os efeitos induzidos pela ação do veneno de aranha marrom em células endoteliais em cultura.

2.2. OS OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar o possível efeito protetor dos polissacarídeos sobre células tratadas com veneno por um período de 24 horas.

- Analisar quais eventos causados pelo veneno são minimizados, tais como perda de adesão e alteração de morfologia.

- Verificar se existe uma possível interação entre componentes do veneno e os polissacarídeos utilizados.

- Analisar o papel protetor dos polissacarídeos sobre fibronectina, uma molécula da matriz extracelular.

- Observar se existem diferenças no papel dos polissacarídeos em relação ao efeito protetor sobre fibronectina plasmática ou secretada por células endoteliais.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. OBTENÇÃO DO VENENO LOXOSCÉLICO

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. 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). Após coleta, a concentração de proteínas foi realizada pelo método de Bradford (1976).

3.2. POLISSACARÍDEOS SULFATADOS

Foram utilizadas 2 fucanas, (denominadas Fucanas A, B), provenientes da alga marrom *Spatoglossum schröederi*, as quais foram purificadas, caracterizadas e quantificadas pelo Prof. Hugo A. O. Rocha (UFRN). De acordo com o perfil eletroforético obtido em gel de agarose (tampão PDA), pôde-se comprovar a pureza e caracterização das fucanas, como ilustra a Figura 11. Em relação aos glicosaminoglicanos, foi utilizada heparina não fracionada extraída de pulmão bovino, que foi gentilmente fornecida pela Dra Helena Bonciani Nader (UNIFESP).

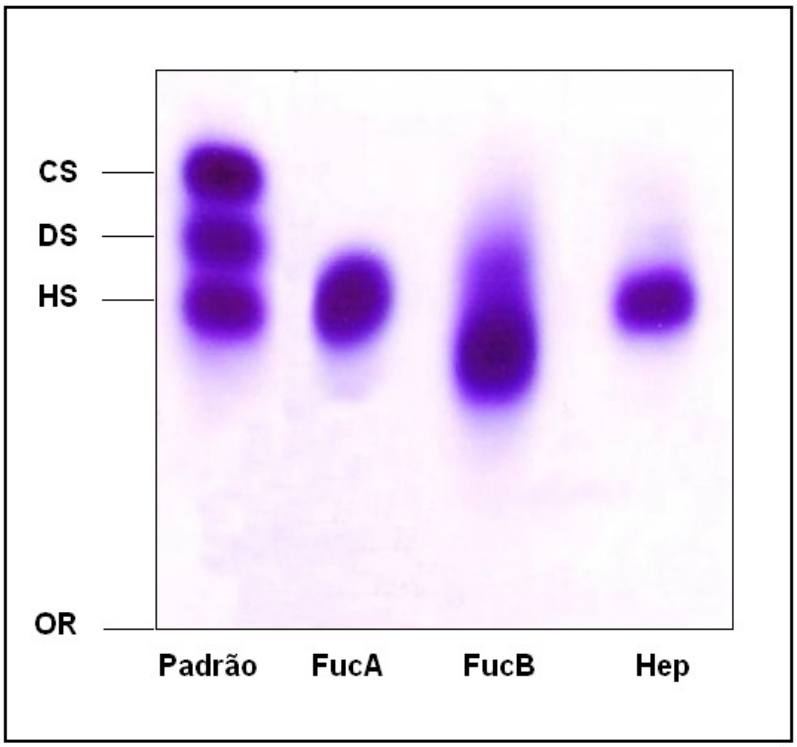


FIGURA 11. PERFIL ELETROFORÉTICO DOS POLISSACARÍDEOS SULFATADOS. Eletroforese em gel de agarose utilizando tampão PDA 0,05M, pH 9,0. 5 µl dos polissacarídeos são aplicados nas canaletas do gel. Para referência de mobilidade eletroforética, padrões (5 µg) foram utilizados: heparam sulfato **(HS)**, dermatam sulfato **(DS)** e condroitim 4 sulfato **(CS)**. Ao final, foi realizada precipitação em solução de Cetavlon 0,1%, por 2 horas, à temperatura ambiente. Após o gel ter secado a temperatura ambiente, foi 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. Origem do gel **(OR)**. Evidencia-se por ordem crescente de mobilidade eletroforética, as fucanas A **(FucA)**, B **(FucB)** e Heparina **(Hep)**.

3.3. LINHAGEM CELULAR

Foi empregada a linhagem de células endoteliais de aorta de coelho (RAEC) (BUONASSISI, 1973), as quais foram cedidas pela Profª. Dra Helena Bonciani Nader (UNIFESP). As células foram mantidas numa mistura de nutrientes HAM-F_{12} com L-glutamina (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) (que foi esterilizado em

filtro com membrana de acetato de celulose 0,22 mm da Millipore). A seguir, foi adicionado 10% de soro fetal bovino (Cultilab, Campinas, SP), 10.000U de Penicilina e 10 mg/ml de Estreptomicina (Invitrogen Carlsbad, CA, EUA).

As células foram mantidas em incubadora de CO_2 (SANYO, modelo MCO-1SAC, Japão) à 37^{o}C, com uma atmosfera úmida, sob tensão de 5%. $CO_{2.}$ As trocas de meio foram realizadas a cada dois dias e os subcultivos, realizados quando as células atingiam a confluência.

Para o subcultivo das células, as mesmas formam primeiramente lavadas com solução de EBSS (solução salina balanceada de Earl) sendo posteriormente, acionado solução de pancreatina diluída em EBSS (0,25% w/v). O complexo enzimático de pancreatina (também conhecida como viocase) é composto por colagenases, elastases, esterases, nucleases e peptidases. Este complexo é extraído do pâncreas suíno e foi adquirido da Gibco (Life Technologies Rockville, MD, EUA). As células permaneceram sob ação enzimática por um período de 20 minutos. A seguir, a suspensão de células foi diluída em meio F12 contendo 10% de SFB, para inibir ação enzimática. A seguir, as células foram coletadas por centrifugação e ressuspensas novamente em meio F12 contendo 10% de SFB. Dependendo do objetivo do ensaio, as células foram cultivadas em frascos, placas de Petri ou de “multiwell” provenientes da Corning (NY, USA). Estoques celulares foram mantidos no nitrogênio líquido, armazenados em tubos adequados, em solução de congelamento (50% de soro fetal bovino e 10 % de DMSO (Sigma–Aldrich) em F_{12}).

3.4. OBTENÇÃO DE MOLÉCULA DE MATRIZ EXTRACELULAR PURIFICADA

Fibronectina foi purificada a partir de plasma humano fresco (obtido no Hospital Central de Curitiba) em cromatografia de afinidade em gelatina-sepharose (Pharmacia, Uppsala, Sweden) como descrito por Engvall e Ruoslathi (1977).

3.5. CARACTERIZAÇÃO DO EFEITO DO VENENO NA PRESENÇA OU AUSÊNCIA DOS POLISSACARÍDEOS SULFATADOS

Células endoteliais foram cultivadas até atingirem a confluência. Posteriormente estas células foram expostas a 40 μg/ml de toxinas do veneno (correspondente à quantidade média de veneno inoculado em uma picada em nutriente HAM-F_{12}, sendo mantido por 24 horas em incubadora. Passadas as primeiras 2 horas, foi adicionado 100 μg/ml de polissacarídeos sulfatados (de heparina ou fucana), sendo mantidos tanto o veneno, quanto os carboidratos pelo restante do tempo de incubação sobre a cultura de células. Ao final do ensaio, o meio com células foi removido e as células soltas coletadas em microtubos, para a contagem das mesmas em hemocitômetro. As células que permaneceram aderidas na placas foram removidas utilizando pancreatina, acondicionadas em microtubos e também contabilizadas em hemocitômetro, sendo feita assim uma estimativa da quantidade de células aderidas e soltas.

Para confirmação dos dados, outra placa submetida a tratamento semelhante, teve as células fixadas com formaldeído 2% em PBS por 20 min (temperatura ambiente). Após a fixação as células foram coradas com cristal violeta (VETEC, RJ, Brasil) (0,8%) em etanol (Biotec, Pinhais, PR, Brasil) (20%). Após lavagem exaustiva com PBS, o corante foi eluído com 0,1M de citrato de sódio (VETEC, RJ, Brasil) em etanol (50%), sendo posteriormente medida a absorbância a 550nm em leitor de ELISA.

A viabilidade celular foi realizada incubando as células com 100μg de polissacarídeos. 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 subseqüentemente soltas com pancreatina. A estimativa do número total de células presentes em cada poço foi realizada por contagem em hemocitômetro. A seguir, o corante Azul de Tripan (Sigma-Aldrich) 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 hemocitômetro pelo método de exclusão, no qual as células com a membrana plasmática comprometida coram-se tornando-se azuladas.

3.6. ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DAS CÉLULAS EXPOSTAS AO VENENO NA PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE POLISSACARÍDEO

As células foram plaqueadas em lamínulas circulares de 13 mm, acondicionadas em placa de 24 poços (Corning, NY, USA). Após atingirem a confluência, as células foram expostas a 40 μg/ml de veneno de aranha marrom por um período de 2 horas, as células receberam o tratamento ou não de 100 μg/ml dos polissacarídeos. Após um período de incubação de 4 horas, as células foram lavadas 4 vezes em tampão cacodilato (Synth, Diadema, SP) 0,15M, pH 7.4 a 4^{o}C e, então, fixadas em solução de Karnovsky (KARNOVSKY, 1965) por 20 min, lavadas novamente em tampão cacodilato e pós-fixadas com tetróxido de ósmio (EMS, PA, USA) por 10min, sendo em seguida, lavadas com cacodilato. Finalmente as células aderidas nas lamínulas foram desidratadas com concentrações crescentes de etanol (Merck, Darmstadt, Almanha) (30%, 50%, 70%, 90%, duas vezes 100%) por 10 min cada. A seguir, foram submetidas ao ponto crítico (BALZERS CPD010) e metalizadas com ouro (BALZERS SCD030) , posteriormente, analisadas no microscópio eletrônico de varredura MEV XL-30 Philips, no centro de microscopia eletrônica da UFPR.

3.7. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

A possível interação do veneno com os polissacarídeos em questão, foi investigada por eletroforese em gel de agarose (HiMedia, FL, USA) (0,6%), preparado em tampão Tris/Acetato (Amresco, Ohio, USA) 0,05M pH 8,00, que é colocado sobre lâminas de vidro medindo (7,5 x 5,0 x 0,2). Alíquotas de 5 µl dos polissacarídeos sultafos foram pré-incubadas com as toxinas do veneno por 1 hora a 37ºC e em seguida foram aplicadas nas canaletas do 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 de cada GAG, sendo heparan sulfato, dermatan sulfato e condroitin 4-sulfato). Ao final da corrida eletroforética, os compostos foram precipitados no gel de agarose pela incubação em solução de Cetavlon (Amresco, Ohio, USA) 0,1%, por um tempo mínimo de duas horas, à temperatura ambiente.

Em seguida o gel foi seco sob à temperatura ambiente e para visualização da possível interação dos componentes de interesse, foi realizada dupla coloração, sendo que para corar os polissacarídeos foi utilizado o corante azul de toluidina (Vetec, RJ, Brasil) 0,1%, numa solução de ácido acético (Biotec, Pinhais, PR, Brasil) 1% e etanol(Biotec, Pinhais, PR, Brasil) 50%, e para corar as proteínas do veneno foi utilizado o corante negro de amido (0,1% em ácido acético 7% por 15min). A seguir o gel foi seco a temperatura ambiente.

3.8. ENSAIO DE CITOMETRIA DE FLUXO

Alíquotas de células endoteliais ($1x10^6$ células/ml) foram separadas em microtutubos somente com meio de cultura HAM-F_{12} na presença ou ausência (grupo controle) de veneno de aranha marrom (40μg/ml) e de fucana A ou B. As células foram mantidas sob agitação branda por 2h (37ºC 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 (Santa Cruz, Biotech., Inc., CA, USA) (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).

3.9. ENSAIO DE ADESÃO CELULAR

Placas de 24 poços (Corning, NY, USA) foram previamente sensibilizadas por 2 horas a 37°C e 5% CO_2, 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 bloqueados com BSA (Sigma, MO, USA) 1% diluído em PBS estéril por 1 hora a 37°C e 5% CO_2. Para controle experimental, foram utilizados poços sensibilizados apenas com BSA 1%. Com o intuito de verificar o efeito do veneno na presença ou ausência dos polissacarídeos sulfatados sobre a matriz de fibronectina, 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, houveram poços incubados somente com os polissacarídeos sulfatados.

No grupo controle foi adicionado somente de meio de cultura, sendo que estas condições foram mantidas por 2 horas a 37°C numa atmosfera de 5% de CO_2. Após este período, os poços foram lavados com PBS estéril e $4x10^4$ 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 as células foram lavadas com PBS e submetidas à fixação em metanol (Biotec, Pinhais, Brasil) por 10 minutos.

Depois de serem fixadas, as células foram coradas com Cristal Violeta (Vetec, RJ, Brasil) 0,5% dissolvido em etanol 20% por 20 minutos à temperatura ambiente e então lavadas 10 vezes com PBS. O corante foi eluído tratando as células com 500μl de citrato de sódio (Vetec, RJ, Brasil) 0,1M, 50% em etanol, 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 de cada poço foram expressas em relação ao grupo controle (adesão sobre o BSA). Cada variável foi processada em octoplicata.

3.10. PROTEÇÃO CONTRA DEGRADAÇÃO DE FIBRONECTINA PLÁSMATICA

A verificação da degradação de fibronectina plasmática foi realizada pela incubação *in vitro* de soluções de proteína de matriz extracelular purificada, na presença de veneno loxoscélico com ou sem 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 horas a 37ºC. O perfil protéico das soluções incubadas foi obtido por experimentos de eletroforese em gel de poliacrilamida (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. Após a coloração, os géis foram escaneados e submetidos a análise de densitometria de bandas, pelo software *Scion Image PC*.

3.11. PROTEÇÃO CONTRA DEGRADAÇÃO DA MATRIZ EXTRACELULAR DE FIBRONECTINA PRODUZIDA PELAS CÉLULAS ENDOTELIAIS

Células endoteliais foram plaqueadas em lamínulas circulares de 13 mm de diâmetro (1 x 10^4 células por lamínulas), as quais foram mantidas em cultura a 37ºC e 5% de CO_2 até a confluência. Após o período necessário de cultivo celular, as células foram expostas ou não (controle) às toxinas do veneno de aranha marrom (40µg/ml) por 2 horas. Após este período, as células foram expostas simultaneamente aos polissacarídeos sulfatados por mais 2 horas em cultura.

Posteriormente, as células foram lavadas com PBS e fixadas com uma solução de paraformaldeído (Electron Microscopy Sciences, Washington, NY, USA) 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 (Merck, Darmstadt, Alemanha) 0,1 M por 2 minutos, e as células foram novamente lavadas com PBS por 5 vezes. Após isso, as células foram expostas a anticorpos policlonais IgG anti-fibronectina (Santa Cruz, Biotech., Inc., CA, USA) produzido em camundongo (1:250 em PBS) por 1 hora. Após, foram feitas 5 lavagens com PBS, e então as células foram incubadas com anticorpo

anti-IgG de camudongo conjugado com Alexa flúor 488 (1:250 em PBS) (Molecular Probes, Eugene, OR, USA).

A seguir, as células foram novamente lavadas com PBS e então incubadas com solução de DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride - Molecular Probes, Eugene, OR, EUA), 3 μM em PBS por 5 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 confocal, (Confocal Radiance 2100, Bio Rad Hercules, CA, USA) acoplado com Nikon-Eclipse E800 com objetivas plano-apocromáticas (Sciences and Technologies Group Instruments Division, Melville, NY, USA) e analizadas por software específico (Laser Sharp 2000) pertencente ao Setor de Ciências Biológicas da UFPR.

3.12. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas dos parâmetros e os dados da contagem absoluta foram realizadas utilizando análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey para comparações entre as médias. O programa GraphPad Prisma versão 3.00 foi utilizado, no qual os valores ± erro padrão da média (EPM) foram utilizados. A significância foi determinada como $P \leq 0,05$.

4. RESULTADOS

Conforme apresentado anteriormente, diversos estudos têm mostrado alterações nas células endoteliais que são desencadeadas pela exposição ao veneno de *L. intermedia*. Destacam-se os dados obtidos por Veiga *et al.,* (2001a) que evidenciaram alterações da morfologia e posterior perda de adesão celular com a liberação das células da placa de cultura. Neste estudo foi demonstrado que após 6 horas de exposição ao veneno, cerca de 50% das células se apresentavam arredondadas e grande parte solta no sobrenadante. Já com 18 horas de tratamento, observaram que 95% de células estavam soltas da placa de cultura. O mais interessante é que, quando estas células soltas foram lavadas e replaqueadas em novo meio, livre de veneno, foi observado que elas voltaram a aderir, mostrando que o veneno agia na matriz extracelular (VEIGA *et al*., 2001a).

Com o propósito de buscar compostos que possam atuar como protetor sobre a ação do veneno nas células endoteliais, e tendo a informação de que glicosaminoglicanos (em especial a heparina) e fucanas são polissacarídeos sulfatados que possuem a capacidade de interação com moléculas da matriz extracelular, buscamos neste trabalho avaliar se estes compostos podem minimizar a ação do veneno nestas células.

4.1. CARACTERIZAÇÃO DO EFEITO DO VENENO NA PRESENÇA OU AUSÊNCIA DOS POLISSACARÍDEOS SULFATADOS

Para avaliar o possível efeito protetor de polissacarídeos sulfatado, sobre a ação do veneno de *L. intermedia*, as células endoteliais foram inicialmente expostas para as toxinas loxoscélicas (por um período de 2 horas) e posteriormente foi adicionado polissacarídeo, sendo mantidos até o final da incubação (24 horas).

Os resultados estão ilustrados na Figura 12, onde pode-se observar que as células que foram expostas para as toxinas do veneno, na ausência de

polissacarídeos, apresentam-se em menor número (Figura 12 E). Ainda, nota-se grandes alterações da morfologia celular, evidenciando células arredondadas e distantes umas das outras, com aspecto muito diferente quando comparadas com o grupo controle (na ausência de veneno), no qual se observa células aderidas firmemente à placa de cultura, e exibem uma morfologia espraiada. Estes resultados estão de acordo com os obtidos anteriormente por outros autores.

No entanto, quando as células foram expostas para o veneno, na presença tanto de Fucanas (A e B), quanto de Heparina, observa-se um maior número de células aderidas, indicando uma possível proteção (Figuras 12 F-H). Ainda, observa-se que além da diminuição da perda de adesão, há também menos alterações morfológicas.

É importante salientar que a exposição somente a estes polissacarídes, na ausência de veneno, não altera a morfologia celular (Figuras 12 B-D). Estas células se assemelham muito ao aspecto do grupo controle (Figura 12 A), sem qualquer perda de adesão (evidenciada pela não existência de células soltas) ou aparentes alterações morfológicas.

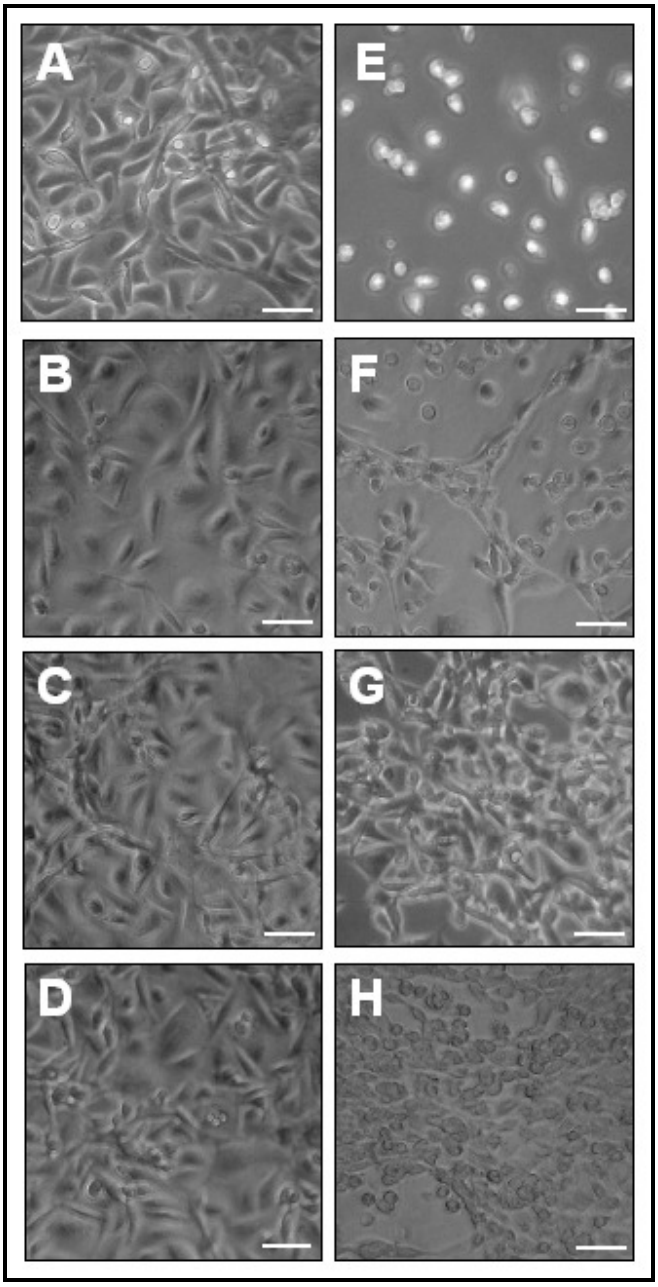


FIGURA 12. POLISSACARÍDEOS SULFATADOS INIBEM A PERDA DE ADESÃO DAS CÉLULAS ENDOTELIAIS, CAUSADAS PELO VENENO DE ARANHA MARROM. As micrografias acima evidenciam as células endoteliais tratadas ou não (controle - **CTRL**) com o veneno. No grupo tratado somente com o veneno (**VN**), a grande maioria das células se soltaram do substrato e evidencia-se profundas alterações morfológicas (células visivelmente arredondadas). Grupos que foram tratados com o veneno na presença de fucana A (**VN+FucA**), fucana B (**VN+FucB**) e heparina (**VN+Hep**) apresentaram maior número de células aderidas e alterações morfológicas de menor intensidade. Grupos onde as células foram expostas somente aos polissacarídeos, fucana A **(FucA**), fucana B **(Fuc B**) e heparina (**Hep**) não apresentam alterações em relação ao grupo controle (**CTRL**). Barra = 120μm.

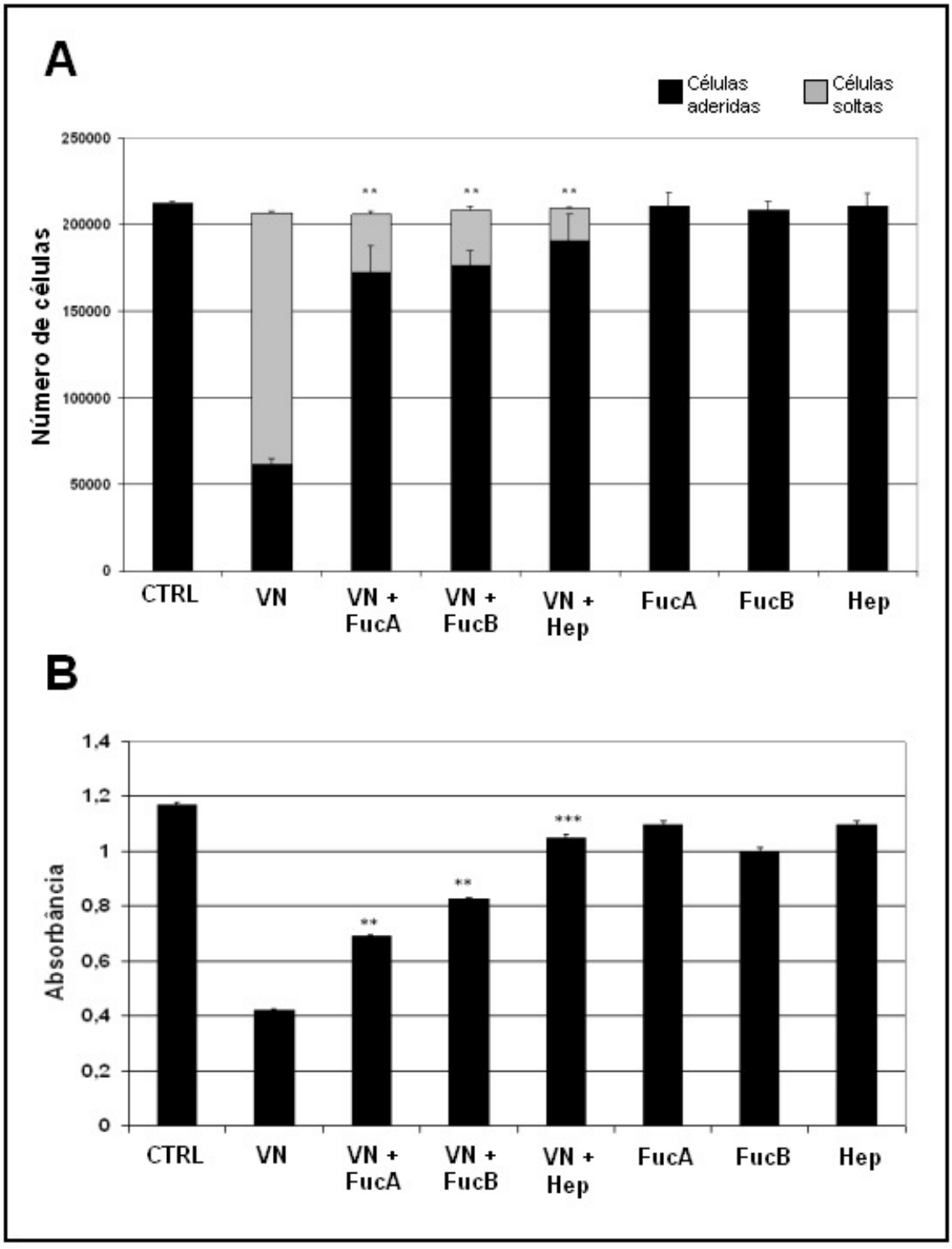
Para confirmar estes resultados o número de células, tanto daquelas soltas, quanto das que permaneceram aderidas, foram contadas em hematocitômetro. Os resultados estão expressos na Figura 13 A, onde pode-se confirmar que havia muito mais células aderidas nos grupos que foram expostos ao veneno na presença dos polissacarídeos sulfatados.

Assim, a Figura 13 A ilustra claramente a tendência observada anteriormente nas micrografias (Figura 12). No grupo das células tratadas com veneno (VN), observa-se o maior número de células soltas (cerca de 70% do total de células estava em suspensão) e uma pequena quantidade de células ainda se mantinha aderida à placa de cultivo (Figura 13 A). No momento de liberação destas células aderidas, observou-se também que muitas se soltavam com a simples agitação mecânica. Ainda, o tempo necessário para a ação enzimática (com pancreatina) para que as células remanescentes se soltassem foi bastante reduzido. Tudo isto demonstra o frágil estado de adesão no qual estas células se encontravam.

Nos grupos onde os polissacarídeos foram adicionados na presença do veneno, observou-se um significativo aumento no número de células aderidas na placa, e conseqüentemente, uma considerável diminuição daquelas soltas (Figura 13 A). Além disto, a ação enzimática da pancreatina não foi tão rápida, quanto comparada àquela observada nas células tratadas somente com o veneno.

Como esperado, as células tratadas apenas com os polissacarídeos (FucA, FucB e Hep) não apresentaram diferenças significativas quando comparadas com as células do grupo controle (CTRL).

Resultados similares foram obtidos quando as células aderidas foram fixadas na placa de cultura com metanol, seguido pela coloração com cristal violeta e eluição com citrato de sódio. Este eluato foi então submetido à leitura da absorbância (Figura 13 B). Tais resultados serviram como base de comparação para o método de contagem utilizado anteriormente, sendo a que tendência observada foi similar em ambos ensaios.


A
Células aderidas
Células soltas
Número de células
250000
200000
150000
100000
50000
0
**
**
**
CTRL
VN
VN + FucA
VN + FucB
VN + Hep
FucA
FucB
Hep
B
Absorbância
1,4
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
**
**
***
CTRL
VN
VN + FucA
VN + FucB
VN + Hep
FucA
FucB
Hep

Cabe salientar que a toxicidade dos polissacarídeos foi avaliada em ensaios de viabilidade celular, com uso de Azul de Trypan. Observou-se que após o tratamento por 24, 48 ou 72 horas com polissacarídeos, não houve qualquer alteração na viabilidade destas células (Figura 14).

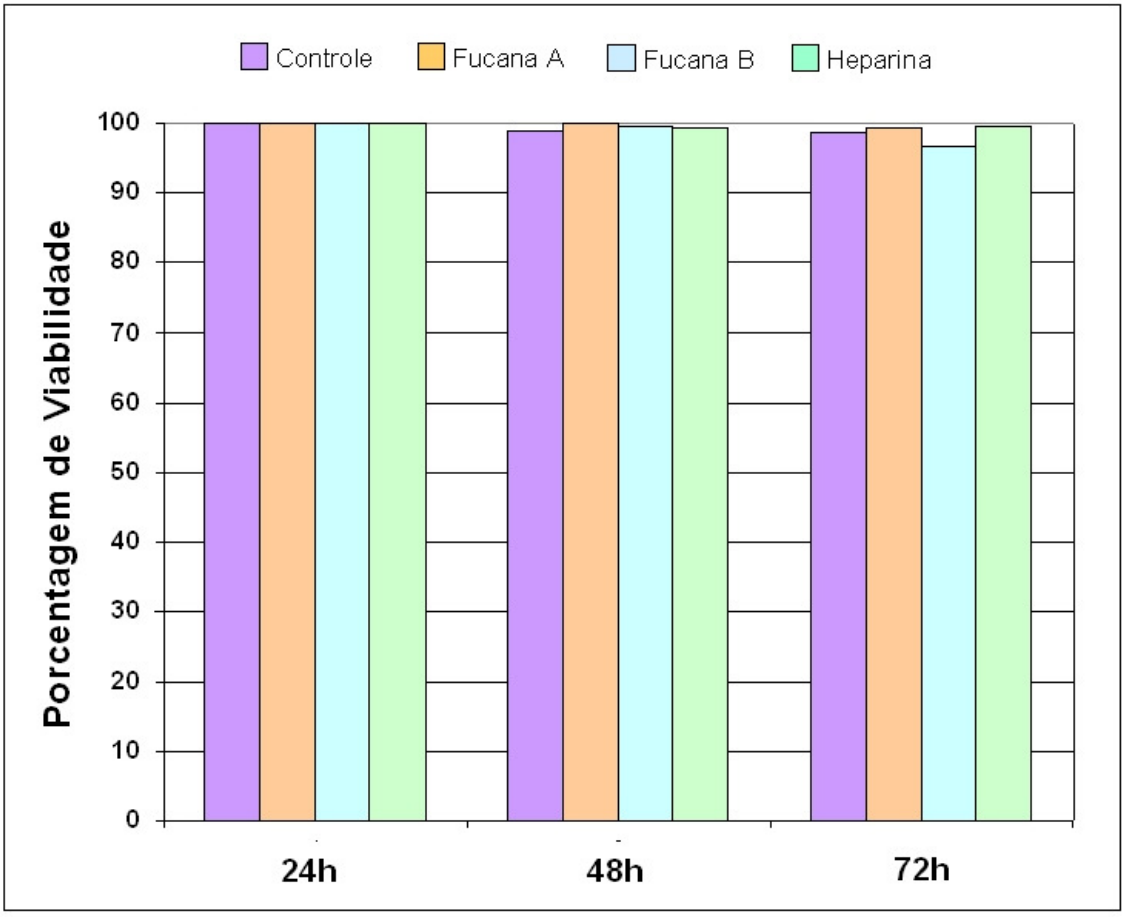


FIGURA 14. VIABILIDADE CELULAR DAS CÉLULAS ENDOTELIAIS EXPOSTAS AOS POLISSACARÍDEOS. Observa-se pelo gráfico que o tratmamento das células com Fucana A, B e Heparina, na concentração de 100µg/ml, por períodos de 24, 48 ou 72h não levou a quaisquer alterações na viabilidade celular, evidenciando a não citotoxicidade dos compostos.

Tais resultados sugerem que os polissacarídeos exibem um papel protetor contra o efeito do veneno sobre células endoteliais em cultura, tanto em relação ao processo de perda de adesão das células, quanto às alterações morfológicas causadas pelo veneno.

4.2. ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DAS CÉLULAS EXPOSTAS AO VENENO NA PRESENÇA OU AUSÊNCIA DOS POLISSACARÍDEOS

Paludo *et al..,* (2006) evidenciaram as alterações ultraestruturais induzidas pelo veneno de aranha marrom em células endoteliais em cultura. Entre os eventos descritos, podemos destacar o arredondamento e retração do corpo celular, a perda de contato entre células vizinhas e visíveis projeções extensivas de filopódios.

Assim, buscou-se verificar se tais alterações morfológicas poderiam ser minimizadas com o uso dos polissacarídeos. Para tanto, as células endoteliais foram expostas ao veneno por 4 horas. Em alguns grupos, após as duas primeiras horas de incubação, foi adicionado polissacarídeo. Os resultados estão expressos nas eletromicrografias observadas na Figura 15.

Nas Figuras 15 A-B observa-se as células que não foram expostas para as toxinas do veneno (controle), mostrando células bem aderidas ao substrato e espraiadas. A Figura 15 C, que corresponde às células tratadas com o veneno na ausência de polissacarídeos, permite confirmar as características descritas por Paludo *et al.,* (2006). Nesta eletromicrografia (Figura 15C) também se evidencia células com morfologia arredondadas e com retração do corpo celular. Além disto, há numerosos filopódios que se projetam da base da célula, o que dá a sensação de que estão aderidas apenas por estes pontos de contato com a placa. Este aspecto irregular é bastante característico para este tipo de tratamento, como já foi demonstrado previamente por outros autores.

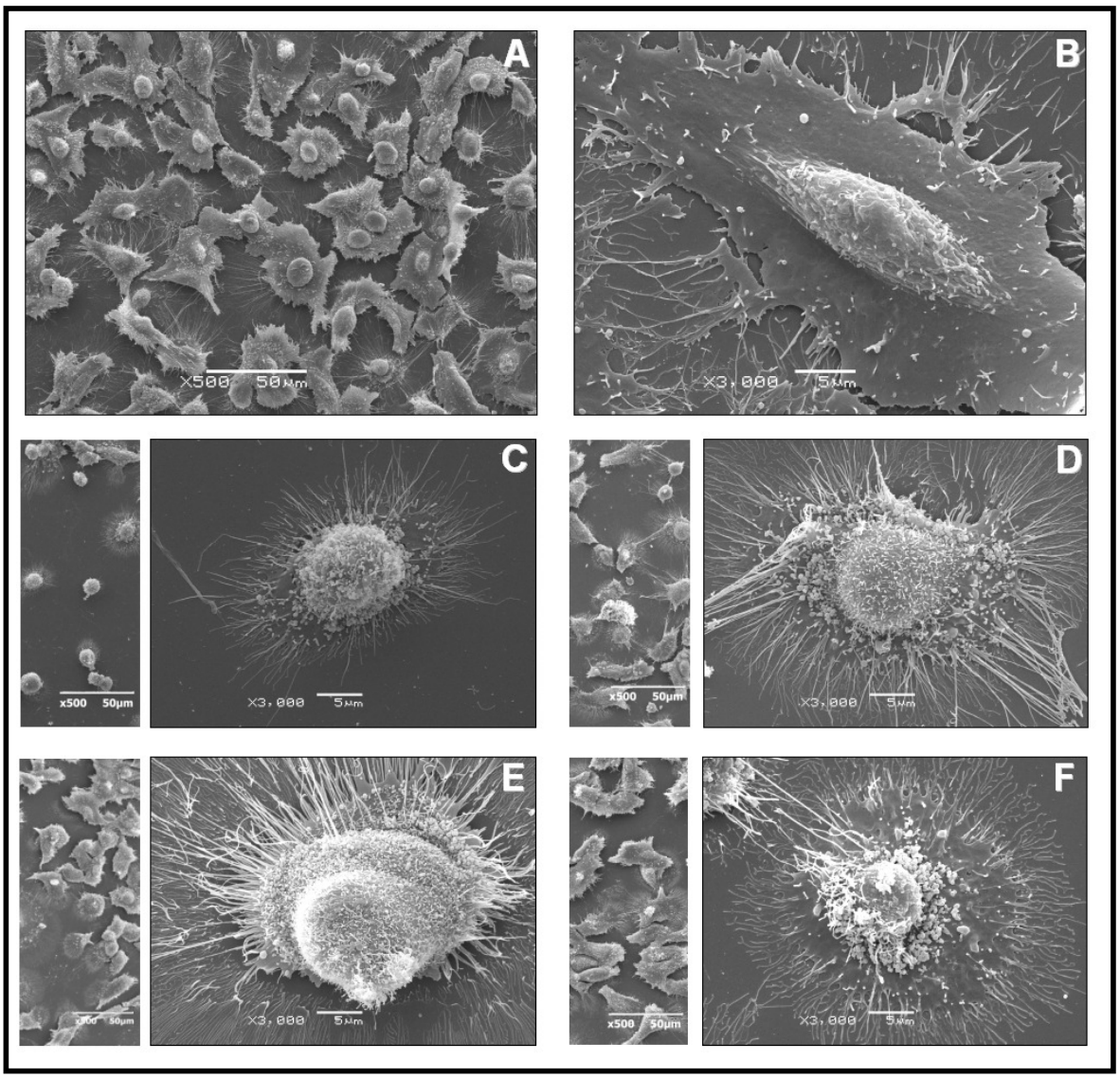


FIGURA 15. NA PRESENÇA DOS POLISSACARÍDEOS O VENENO DE *L. intemedia* PROVOCA MENOS ALTERAÇÕES ULTRAESTRUTURAIS. **(A)** Morfologia típica de uma monocamada de células endoteliais (em sub-confluência). **(B)** Células controle em maior aumento, evidenciando a morfologia espraiada e vários processos laterais. **(C)** Células expostas ao veneno na ausência de polissacarídeos. A Eletromicrografia à direita mostra aspecto geral em menor aumento, e a esquerda mostra o detalhe de uma célula em maior aumento, evidenciando uma retração celular e presença de inúmeros filopódeos. **(D)** Células expostas para o veneno na presença de fucana A **(E)**, fucana B e heparina **(F).** Observa-se à direita de cada quadro um maior do número de células aderidas e nas eletromicrografias da esquerda (em maior aumento) um minimização das alteração drástica causas pelo veneno (**C**) na ausência de polissacarídeo.

O tratamento com o veneno e posterior adição dos polissacarídeos sulfatados resultou em um visível aumento na adesão celular e uma notável proteção na manutenção da morfologia da célula (Figuras 15 D-E).

Células tratadas com veneno na presença de fucana A (Figura 15 D), ou de fucana B (Figura 15 E) ou de heparina (Figura 15 F) apresentaram grandes diferenças em relação ao número de células aderidas, quando comparadas ao grupo tratado somente com veneno (Figura 15 C). Além disso, observou-se que a morfologia das células está num estado de alteração intermediário em relação ao grupo tratado com veneno na ausência de polissacarídeo e do grupo controle (não exposto ao veneno). Este dado é sustentado pelo fato de que ocorre uma pequena perda no espraiamento e aumento da projeção de filopódios, apesar do volume do corpo celular e da adesão ao substrato estarem aparentemente preservados. Assim, os efeitos do veneno sobre a morfologia das células endoteliais parecem ter sido minimizados na presença dos polissacarídeos.

Os grupos tratados somente com os polissacarídeos não exibiram qualquer diferenciação do grupo controle (CTRL) (dados não mostrados).

Até o momento, foi verificada diminuição de perda de adesão, bem como de alterações morfológicas. Estes resultados reforçam a idéia de que os polissacarídeos sulfatados podem proporcionar minimização da ação do veneno sobre as células endoteliais.

Sabendo-se que o veneno de aranha marrom possui ação enzimática sobre moléculas da matriz extracelular (VEIGA *et al.*., 2001a) e, por outro lado, liga-se à superfície celular (PALUDO *et al.*., 2006), buscou-se avaliar se a proteção oferecida pelos polissacarídeos sulfatados é decorrente da interação com as moléculas da matriz extracelular ou pela interação diretamente à proteínas presente no veneno.

4.3. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

Com o intuito de buscar evidências de uma possível interação entre os polissacarídeos e as proteínas presentes no veneno de aranha marrom, estes compostos foram previamente incubados e então submetidos à eletroforese em gel de agarose, utilizando o tampão Tris-Acetato, o qual fornece uma separação eletroforética pela carga líquida dos compostos.

O perfil individual dos polissacarídeos pode ser observado na Figura 16 (FucA, FucB e Hep). Como estes compostos são aniônicos, migram para o pólo positivo (porção superior do gel). A heparina (Hep) foi o polissacarídeo que apresentou maior migração eletroforética, o que é justificado por ser altamente negativa, devido à presença dos grupamentos carboxílicos dos resíduos de ácidos urônicos e dos grupamentos sulfatos, presentes em diversas posições.

Quando se avalia o veneno (VN), verifica-se que ocorre uma migração parcial para o pólo positivo e para o negativo, indicando que dentre os seus componentes, existem compostos que são carregados negativamente e outros positivamente (Figura 16).

Curiosamente, quando o veneno foi incubado com os polissacarídeos, observou-se que houve alteração do padrão de migração de cada composto, isto é, tanto o polissacarídeo, quanto das proteínas presentes no veneno alteraram suas mobilidades eletroforéticas. Quando se compara a coloração das proteínas do veneno que não foram incubadas (VN), com aquelas que foram incubadas com polissacarídeo, nota-se claramente que há uma alteração tanto da intensidade de coloração, quanto do padrão de migração, mostrando que houve um arrasto que acompanha o polissacarídeo. Este resultado sugere que toxinas presentes no veneno podem interagir com os polissacarídeos sulfatados testados, pois mostra que ocorre interação entre as proteínas do veneno, possivelmente entre os seus resíduos de aminoácidos positivos e os grupamentos carboxílicos ou sulfatos, presentes nos polissacarídeos.

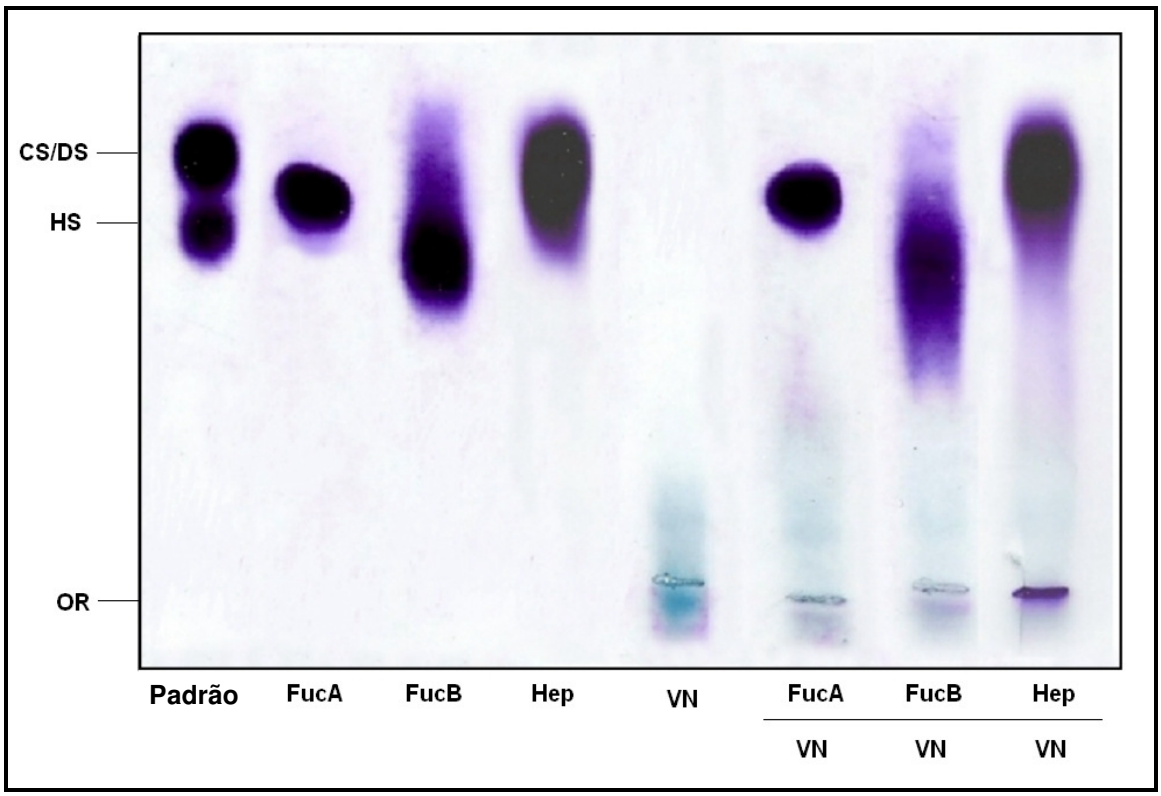


FIGURA 16. INTERAÇÃO ENTRE PROTEÍNAS PRESENTES NO VENENO DE ARANHA MARROM E OS DIFERENTES POLISSACARÍDEOS SULFATADOS TESTADOS. Os polissacarídeos foram incubados com veneno por uma hora. Posteriormente, amostras separadas (não incubadas) ou provenientes da incubação foram submetidas à eletroforese em gel de agarose, tampão Tris-Acetato pH 8,0. Assim, **FucA, FucB, Hep** e **VN** representam o perfil eletroforético de fucana A, fucana B, heparina e Veneno, respectivamente. Observa-se que os polissacarídeos migram para o pólo negativo. Já as toxinas presentes no veneno, mostram parte que migraram para o pólo positivo e outra parte para o pólo negativo. As toxinas que foram incubadas com polissacarídeos (**FucA VN**, **FucB VN** e **Hep VN**) mostram alteração da migração e intensidade de coloração. Padrão - foi utilizado uma mistura contendo 5µg de heparam sulfato **(HS)**, dermatam sulfato (**DS**) e de condroitim sulfato (**CS**), sendo que estes dois últimos migram juntamente (**CS**/**DS**). O gel foi duplamente corado, para proteína com Negro de amigo e para açúcar com azul de toluidina.

Assim o próximo passo foi verificar se a interação pode ser responsável pelo papel protetor dos polissacarídeos.

4.4. ENSAIO DE CITOMETRIA DE FLUXO

PALUDO *et al..,* (2006), utilizando anticorpos policlonais, foram capazes de demonstrar por citometria de fluxo que as toxinas do veneno interagem com a superfície das células endoteliais. Assim, buscou-se investigar se os polissacarídeos são capazes de alterar esta interação observada por estes autores. Para tanto as células foram expostas para o veneno, na presença dos polissacarídeos. De forma similar à realizada por Paludo *et al*.. (2006) a interação das toxinas loxoscélicas foi detectada com o uso de anticorpo específico e análise em por citometria de fluxo. Os resultados estão ilustrados na Figura 17.

O histograma A (Figura 17) mostra que as células não tratadas com veneno exibem fluorescência basal, indicada pelo histograma cinza. No mesmo histograma, observa-se a marcação de células que foram incubadas com veneno e posteriormente tratadas com anticorpos anti-veneno e revelados com anticorpo secundário conjugado com marcador fluorescente. Evidencia-se um pico de fluorescência ao redor de 10^3, indicando a marcação do veneno sobre a superfície celular.

Já no histograma B, a marcação em preto evidencia as células que foram incubadas com veneno na presença de fucana A. Esta marcação tem seu pico entre 10^2 e 10^3 na escala de intensidade de fluorescência. Quando comparada àquela obtida na ausência de polissacarídeo (Figura 17 A) verifica-se que há um deslocamento para a esquerda, indicando que houve uma menor ligação do veneno com a superfície da célula endotelial.

Resultado semelhante foi obtido quando o veneno foi incubado na presença de Fucana B (Figura 17 C). A heparina também proporcionou uma menor ligação do veneno com a superfície celular (dados não mostrados). Estes dados sugerem que os polissacarídeos minimizam a ligação do veneno com a superfície celular, fato que poderia ser em decorrência de sua interação direta com as toxinas loxoscélica, a qual já foi evidenciada anteriormente (Figura 16)

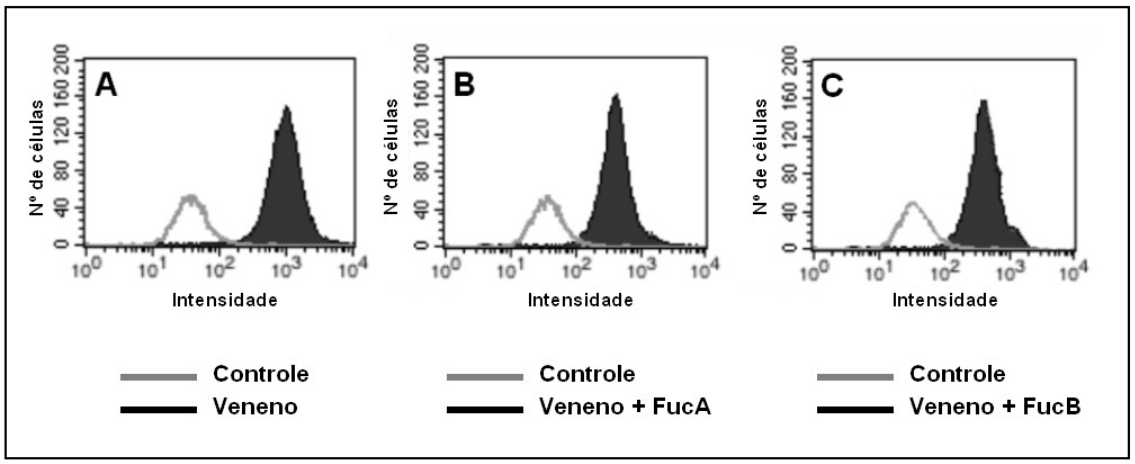


FIGURA 17. DESLOCAMENTO DA MARCAÇÃO DE VENENO DA SUPERFÍCIE DAS CÉLULAS ENDOTELIAIS, QUANDO EM PRESENÇA DE POLISSACARÍDEO. Os histogramas evidenciam a marcação de veneno na superfície das células. No histograma A verifica-se a marcação de células controle (cinza) e células incubadas com veneno por 1 hora (preto). O histograma B indica a marcação de células controle (cinza) e células incubadas por 1 hora com veneno na presença de fucana A. A fucana B também é capaz de minimizar a ligação do veneno com as células endoteliais, como pode ser observado em C. Note que a marcação obtida para o veneno, tanto na presença de fucana A, quanto B (pico em preto), estão deslocadas para esquerda, em comparação à ligação do veneno na ausência de polissacarídeos (A).

No entanto, este deslocamento não foi tão significativo, portanto, poderia não ser a única forma de perturbação que os polissacarídeos estão promovendo na ação do veneno em descolar as células. Assim, o próximo passo foi investigar se pode ocorre proteção da degradação de componentes da matriz extracelular.

4.5. POLISSACARÍDEOS PROTEGEM A DEGRADAÇÃO DA MATRIZ EXTRACEULAR CAUSADA PELO VENENO

Conforme apresentado anteriormente, o veneno de *L. intemedia* cliva proteínas da matriz extracelular, em especial a entactina e a fibronectina. Assim, buscou-se avaliar se os polissacarídeos poderiam promover uma inibição deste efeito proteolítico. Sabidamente, a molécula de fibronectina possui diversos domínios de ligação, dentre eles, para receptores celulares (integrinas), para colágeno e para a heparina. Este fato nos levou a investigar se esta molécula poderia ser protegida.

4.5.1. A DEGRADAÇÃO DE FIBRONECTINA PLÁSMATICA CAUSADA PELO VENENO É MINIMIZADA PELOS POLISSACARÍDEOS

A fibronectina pode ser encontrada em forma fibrilar, no caso da matriz extracelular ou em forma solúvel, presente no plasma, que participa de processos de coagulação sangüínea, cicatrização, entre outros. Inicialmente buscou-se avaliar se há papel protetor contra o efeito fibronectinolítico do veneno utilizando como modelo, fibronectina plasmática.

Para tanto, a fibronectina purificada de plasma humano foi previamente incubada ou não (controle) com veneno na presença ou ausência dos polissacarídeos por 2 horas. Após a incubação, o material foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%) sob condições redutoras. Após a coloração com Azul de Coomassie, foi possível identificar o perfil eletroforético da molécula de fibronectina (FN), a qual mostra duas cadeias que migram juntamente (Figura 18).

Após exposição ao veneno (VN), verificou-se que a fibronectina foi degradada, mostrando bandas que foram evidenciadas no gel e possuem massa molecular aparente inferiores à banda original (220 kDa). Isto confirma o efeito fibronectinolítico do veneno.

Quando a fibronectina foi incubada com veneno na presença dos polissacarídeos (VN+FucA, VN+FucB e VN+Hep) fica evidente que promovem uma inibição do efeito fibronectinolítico, com a diminuição na quantidade e na intensidade de bandas formadas (Figura 18 A). A intensidade destas bandas foram analisadas por densitometria, onde um *software* converte em escala numérica a intensidade de pixels de uma área (dpi – *dots per inch* – pontos por polegada). A análise foi realizada nas duas bandas que foram formadas após a degradação do veneno (Figura 18 B e C).

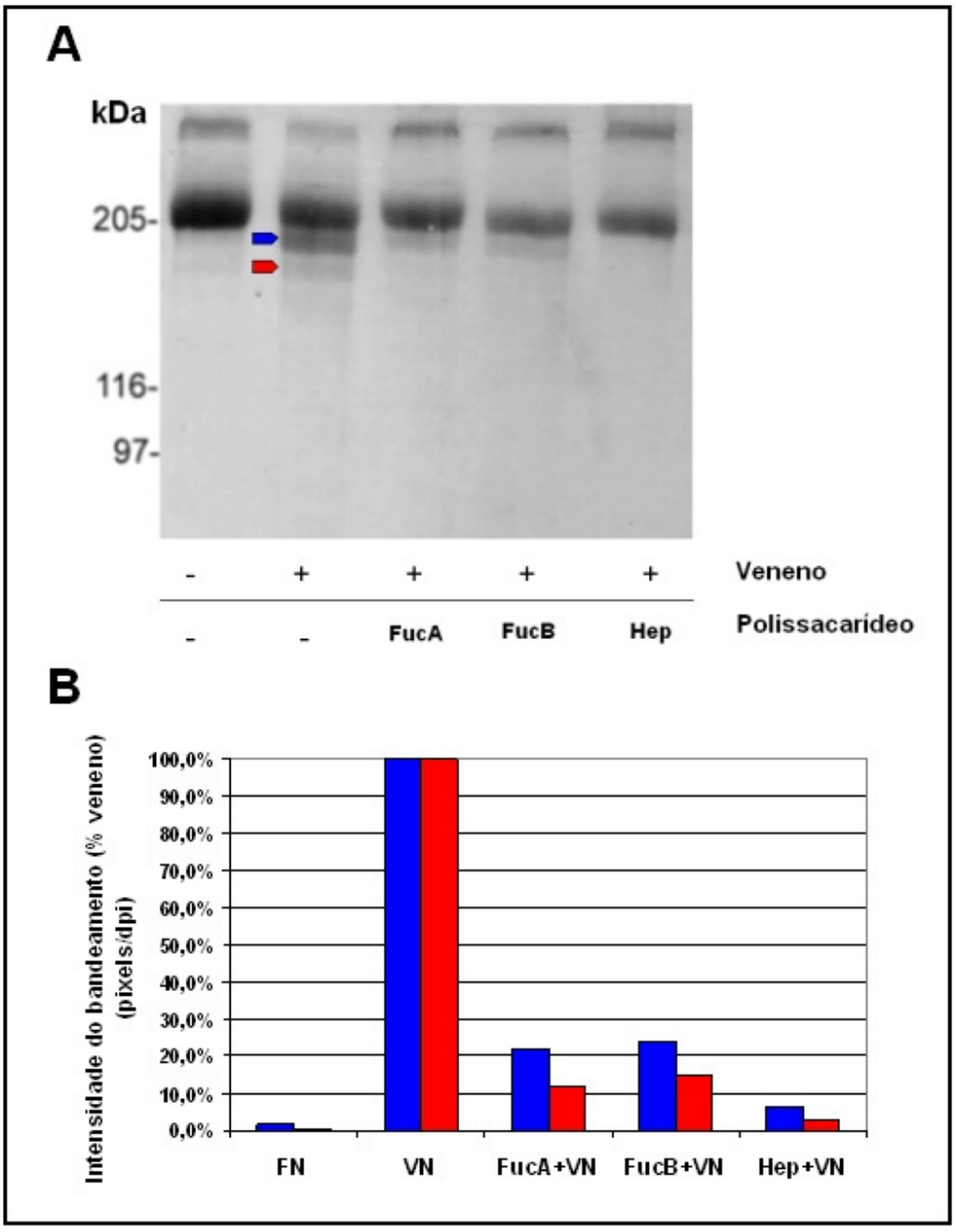


FIGURA 18. POLISSACARÍDEOS INIBEM O EFEITO FIBRONECTINOLÍTICO DO VENENO. **A** - Fibronectina purificada foi incubada com o veneno na presença ou ausência dos polissacarídeos por 2 horas e então, cada amostra foi submetida à SDS-PAGE em condições redutoras. As setas indicam bandas que são produtos de degradação da fibronectina incubada com veneno. **B** - A intensidade das bandas formadas após a degradação com o veneno, foram quantificadas utilizando um software que realizou a densitometria. Ao final da quantificação foi comparada com aquela proveniente da banda observada após o tratamento com o veneno na ausência de polissacarídeo.

Quando foi avaliada a primeira banda das amostras provenientes da incubação da fibronectina com o veneno na presença dos polissacarídeos e estas foram comparadas com aquela na ausência, verifica-se que de fato há uma nítida redução da banda formada (Figura 18 B).

A Figura 18 C revela a intensidade da segunda banda de degradação em cada incubação. Os resultados obtidos são similares ao anterior, sendo que a formação deste produto de degradação é quase inexistente para os grupos incubados com veneno na presença de polissacarídeos.

Nenhuma alteração foi observada quando a fibronectina foi incubada somente com os polissacarídeos (FucA, FucB e Hep) (dados não mostrados).

Os resultados mostram que, quando a fibronectina foi incubada com veneno na presença de polissacarídeos (FucA+VN, FucB+VN e Hep+VN), evidencia-se uma grande diminuição dos produtos formados, conseqüentemente, indicando uma menor atividade das toxinas do veneno sobre a fibronectina.

Assim, este resultado que mostra que os polissacarídeos sulfatados podem evitar, ou ao menos retardar a degradação de moléculas de matriz, o que chama a atenção como possível mediador do mecanismo de proteção observado nas células endoteliais tratadas com veneno na presença de polissacarídeos. Para comprovar esta hipótese foram realizados ensaios de adesão celular, sobre a molécula de fibronectina.

4.5.2. POLISSACARÍDEOS MANTEM O PADRÃO DE ADESÃO CELULAR À FIBRONECTINA

Buscando avaliar se as células são capazes de aderirem à molécula de fibronectina tratada com o veneno, foi realizado ensaio de adesão. Para tanto placas de cultura foram previamente sensibilizadas para a ligação de fibronectina. Após a sensibilização, as placas foram tratadas ou não (controle) com o veneno na ausência ou presenças dos polissacarídeos sulfatados por duas horas. Após o período de incubação, as células endoteliais foram plaqueadas e então submetidas à adesão por duas horas. Os resultados estão ilustrados na Figura 19.

A Figura 19A mostra que, um grande número de células aderiram à fibronectina que não foi degradada pelo veneno. Já a Figura 19 B está de acordo com o observado na Figura 18, tendo em vista que em duas horas de incubação houve uma degradação parcial da quantidade de fibronectina. Desta forma, houve uma menor quantidade de célula aderida.

Quando o “coat” de fibronectina foi exposto para as toxinas do veneno na presença de polissacarídeos, observou-se que houve uma nítida diferença em relação à quantidade de células que foram capazes de aderirem (Figuras 19 F-H), comparando-se àquelas que aderiram na placa tratada somente com veneno (Figura 19 E).

Como controle experimental, as células foram submetidas à adesão sobre um “coat” de albumina (BSA) (Figura 19 I).

A adesão observada na Figura 14 foi também mensurada conforme descrito em Materiais e Métodos. Poços sensibilizados com fibronectina que não receberam tratamento foram usados como controle positivo e normalizados para 100% de adesão celular. Poços sensibilizados com albumina de soro bovino (BSA) foram adotados como controle negativo, sendo normalizadas para 0% de adesão. Os resultados podem ser observados na Figura 20.

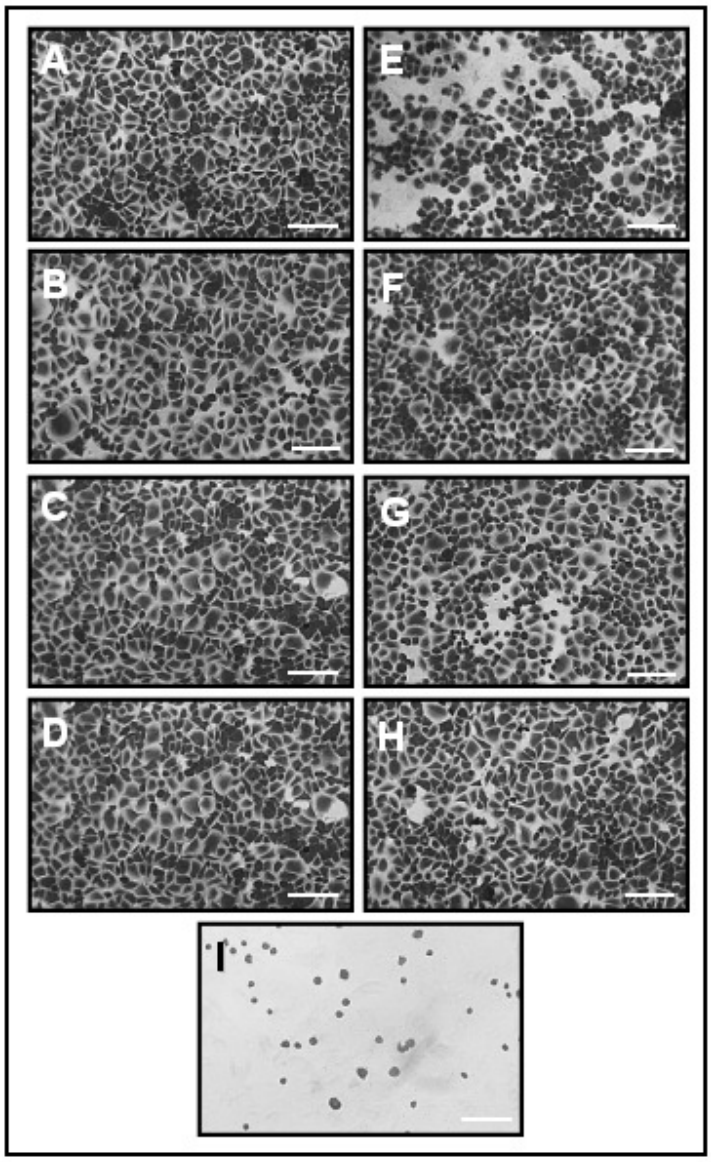


FIGURA 19. ADESÃO DAS CÉLULAS ENDOTELIAIS SOBRE "COAT" DE FIBRONECTINA. Poços de multiwell foram sensibilizados para a ligação da fibronectina. A seguir foram tratados ou não (**A**-controle) com veneno loxoscélico na presença ou ausência de polissacarídeos por duas horas. A seguir, as células foram plaqueadas e mantidas por 2 horas a 37ºC em 5% de CO_2. Ao final da incubação, os poços foram lavados e as células foram fixadas e então submetidas à coloração com cristal violeta. A seguir, as células aderidas foram fotografadas em microscópio invertido com contraste de fase. Barra = 60µm

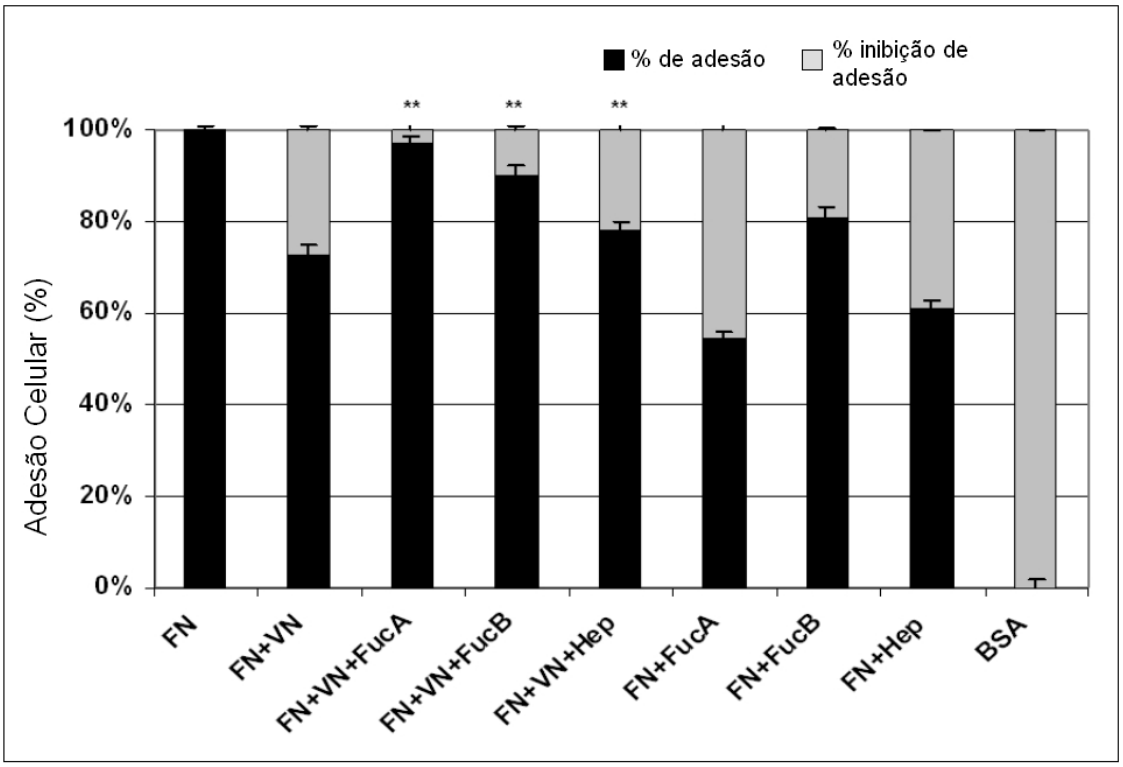


FIGURA 20. ENSAIO DE ADESÃO SOBRE MATRIZ DE FIBRONECTINA EXPOSTA AO VENENO NA PRESENÇA OU AUSÊNCIA DOS POLISSACARÍDEOS. Poços de multiwell foram sensibilizados para a ligação da fibronectina. A seguir foram tratados ou não com veneno loxoscélico na presença ou ausência de polissacarídeos por duas horas. A seguir, as células foram plaqueadas e mantidas por 2 horas a 37ºC em 5% de CO_2. Ao final da incubação, os poços foram lavados e as células foram fixadas e então submetidas à coloração com cristal violeta. O Posteriormente, o corante foi eluído com citrato de sódio e o eluato foi submetido à leitura da absorbância, sendo considerado 100% a leitura proveniente das células aderidas sobre a não tratada com veneno e 0% de adesão sobre os poços sensibilizados com albumina (BSA). Note que o "coat" de fibronectina exposto ao veneno (FN+VN) mostra diminuição na adesão de células, enquanto que aquele exposto ao veneno na presença dos polissacarídeos (FN+VN+ FucA, or FucB or Hep) mostraram em todos os casos aumento na porcentagem de adesão celular, comparado ao veneno. O tratamento da matriz de fibronectina com os polissacarídeos apenas, também mostrou uma diminuição no número de células aderentes.

Assim, o grupo controle (FN) exibe 100% de adesão (ou 0% de inibição de adesão) sobre a matriz de fibronectina. Sabendo-se que as células endoteliais secretam grandes quantidades de fibronectina, logo este seria um modelo ideal para a condução deste ensaio: as células aderem facilmente sobre a molécula de matriz, além de que este substrato é passível de degradação para toxinas do veneno. Pelo grupo controle, percebe-se que realmente, as células aderem preferencialmente sobre a fibronecta intacta.

Quando os poços foram incubados com albumina (BSA) observa-se uma inversão, sendo este um substrato pelo qual as células não possuem receptores específicos para adesão. Sendo assim, foi obtido 0% de adesão (ou 100% de inibição de adesão).

A matriz de fibronectina que foi exposta ao veneno (FN+VN) mostra uma diminuição na adesão celular a quase 30%, corroborando o fato de que provavelmente esta molécula tenha sido mesmo degradada e, portanto, sobrando menos substrato para adesão das células endoteliais. Quando este "coat" foi tratado com o veneno na presença dos polissacarídeos, observou-se uma diferença nos valores de inibição de adesão, sendo reduzido para valores ao redor a 5%, 10% e 20%, para fucana A, fucana B e heparina, respectivamente.

Tendo em vista que a fibronectina possui descrito na literatura sítios de interação para a heparina, era prevista que houvesse uma inibição da adesão das células quando esta molécula foi incubada com o "coat". Curiosamente o mesmo ocorreu com os outros polissacarídeos testados (fucana A e fucana B), mostrando que a interação pode ser eletrostática.

4.5.3. POLISSACARÍDEOS PODEM PROMOVER A PROTEÇÃO DA CLIVAGEM DA FIBRONECTINA PRODUZIDA PELAS CÉLULAS

Estudos preliminares conduzidos por Paludo *et al..,* (2006) mostraram que as células endoteliais sintetizam e organizam altos níveis de fibronectina na matriz extracelular. Ainda, foram capazes de mostrar que este componente da matriz extracelular é degradado pelas toxinas do veneno.

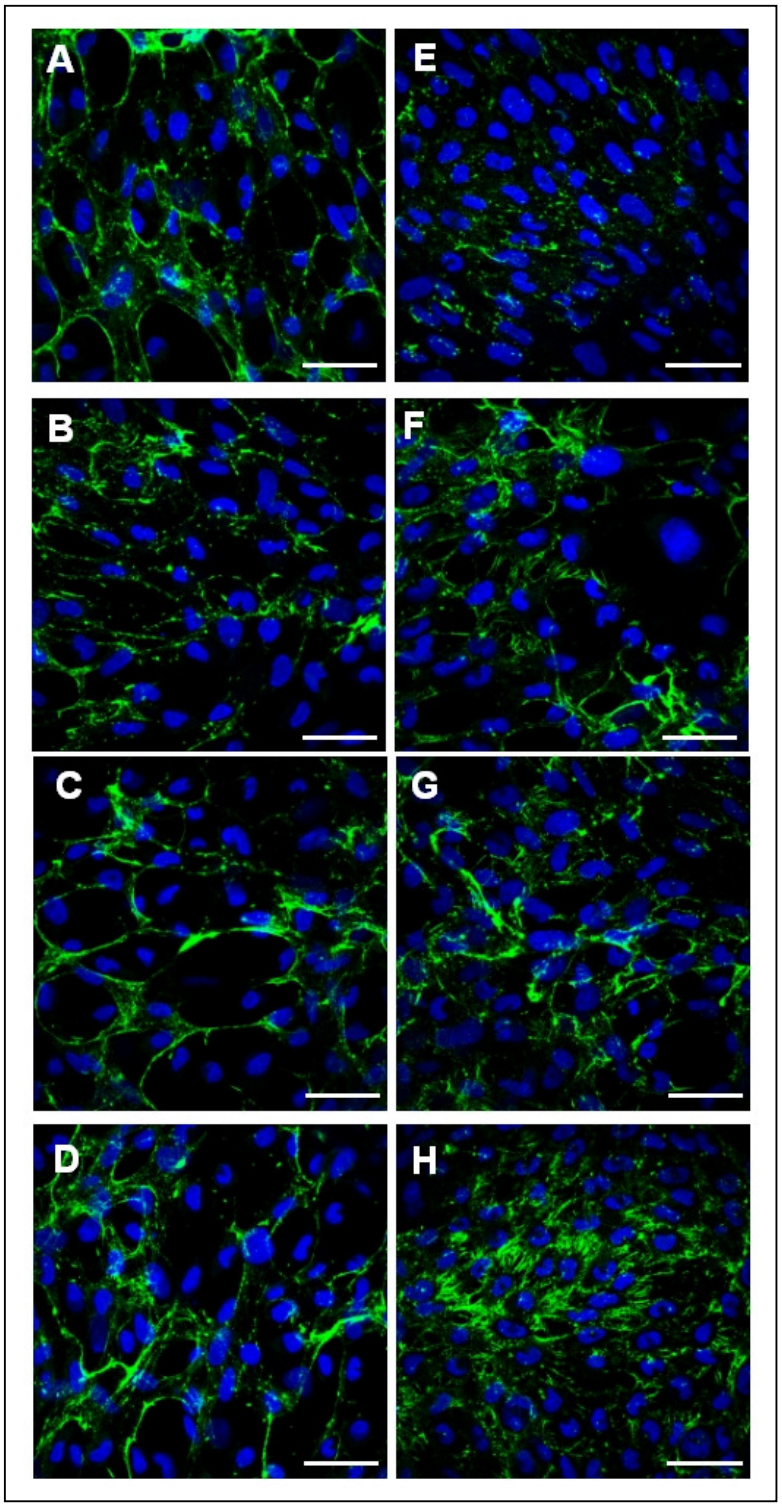
Devido ao fato de que os polissacarídeos podem impedir o efeito fibronectinolítico do veneno em fibronectina plasmática, o estudo foi realizado, porém, visando as moléculas secretadas e organizadas pelas próprias células endoteliais.

Assim, as células foram tratadas ou não (controle) com veneno por 2 horas, na presença ou ausência de polissacarídeos. A detecção da fibronectina foi realizada com o uso de anticorpo específico e revelação com anticorpo secundário conjugado com marcador fluorescente em verde (Figura 21).

O grupo controle apresentou um alto nível de marcação de fibronectina, confirmado que a células endoteliais sintetiza e secreta sob condições normais (Figura 21 A). O tratamento com o veneno, como era de se esperar, reduziu drasticamente o aspecto fibrilar e organizado da matriz de fibronectina (Figura 21 E).

Já quando o veneno foi exposto na presença dos polissacarídeos (Figura 21 F-H), os níveis de fibronectina foram similares ao observado para as células não tratadas com veneno (controle).

Grupos incubados somente com os polissacarídeos (Figura 21 B-D) mantiveram o mesmo aspecto do grupo controle.


A
E
B
F
C
G
D
H

5. DISCUSSÃO

Acidentes envolvendo aranhas marrons (*Loxosceles*) têm como principal característica a conhecida lesão dermonecrótica na pele e o espalhamento gravitacional. Menos comumente, o veneno provoca também efeitos sistêmicos, tais como coagulação disseminada intravascular, hemólise, falha renal e aumento da permeabilidade da parede dos vasos sanguíneos (FUTRELL, 1992; DA SILVA *et al*., 2004).

Até o presente, um número de enzimas e moléculas biologicamente ativas que poderiam contribuir para os efeitos deletérios do veneno de *L. Intermedia* foram identificados e bioquimicamente caracterizados. Nestes, inclui a fosfolipase D, um membro da família de proteínas na faixa de 32-35 kDa (apresenta relações evidenciadas com lesões necróticas, agregação plaquetária e hemólise) (FUTRELL, 1992; DA SILVA *et al*., 2004; APPEL *et al*., 2008) e metaloproteases de 32-35 kDa e de 20-28 kDa. Estas enzimas têm papel fundamental em hemorragia, ação deletéria em vasos sanguíneos e problemas de cicatrização, como observado em alguns casos (FEITOSA *et al*., 1998; DA SILVEIRA *et al*., 2002). Atividade das hialuronidades, descritas como enzimas de 33 e 66 kDa, foram associadas com espalhamento gravitacional das lesões de pele (YOUNG; PINCUS, 2001; VEIGA *et al*., 2001b, DA SILVA *et al*., 2004). Além disso, serino proteases, lipases e fosfatases alcalinas foram também descritas (FUTRELL, 1992; DA SILVA *et al*., 2004).

Em estudos *in vivo*, com coelhos tratados com veneno por injeção intradermica, verificou-se que este age sobre o endotélio, causando instabilidade vascular e vacuolização citoplasmática das células endoteliais. Além do fato de que o tratamento de células endoteliais de coelho em cultura levou a perda de adesão das células ao substrato (VEIGA *et al*., 2001a).

Até aquela ocasião, acreditava-se que as células endoteliais que se soltam estavam mortas. No entanto, Veiga *et al*., (2001a) foram os pioneiros a comprovar que as células soltas, quando lavadas e recolocadas em cultura, com um meio livre de veneno, eram capazes de readerirem, mostrando claramente que o

veneno não matava as células endoteliais diretamente, mas agia na matriz extracelular. Em diversos outros modelos de estudo, como células renais (MDCK), já foi demonstrado que o veneno age diminuindo a viabilidade celular, de forma tempo de dose dependentes (KUSMA *et al.,* 2008).

Somente agora que o nosso grupo foi capaz de responder o por quê que as células endoteliais não sofrem ação direta do veneno. Utilizando modelo celular desprovido de glicosaminoglicano fomos capazes de demonstrar que o veneno age muito mais rápido soltando as células o que sugeria que estes compostos podem proteger as células. Assim, utilizando células endoteliais que expressam menos proteoglicano de heparam sulfato conseguimos mostrar que é este composto que impede a ação direta do veneno. Sabendo-se que as cadeias de heparam sulfato deste proteoglicano é rico em dissacarídeos trissulfatados, contendo ácido idurônico 2-*O*-sulfatado, que é característico da molécula de heparina, sugere que polissacarídeos sulfatados podem atuar inibindo a ação do veneno sobre as células endoteliais (NOWATZKI, 2009 – manuscrito em elaboração).

Assim, na busca de compostos que podem possuir atividade inibitória sobre a ação do veneno nas células endoteliais investigamos a possibilidade de heparina e fucanas atuarem neste sentido. Nossa suposição baseava-se na idéia de que o efeito deletério do veneno nas células endoteliais está na atividade proteolítica sobre componentes da matriz extracelular.

Neste sentido, Bouças *et al*., (2008) utilizando “probes” de glicosaminoglicanos, conjugados com biotina, foram capazes de mostrar que heparina, heparam sulfato e dermatam sulfato ligam-se à matriz extracelular das células endoteliais e sub-endoteliais (musculares lisas). Trindade *et al*., (2008) utilizando heparina conjugada tanto com biotina, quanto com marcadores fluorescentes, demonstraram que a ligação com a matriz extracelular possui uma constante de dissociação aparente (K_D) na ordem de 44 nM, indicando que trata-se de uma forte ligação. Ainda, foram capazes de mostrar que fibronectina compartilha da ligação com a heparina, o que é particularmente interessante pois o K_D obtido para ligação à matriz extracelular foi muito próxima aquele

estabelecido para a ligação à fibronectina in vitro (TARSIO *et al*., 1987). Recentemente Medeiros (2008) demonstrou que fucana A também é capaz de ligar à matriz extracelular das células endoteliais, sendo tal ligação também compartilhada com a fibronectina (MEDEIROS, 2008).

Assim, escolhemos testar glicosaminoglicanos e fucanas (A e B) para avaliar se podem inibir a ação do veneno sobre as células endoteliais. Os dados preliminares mostraram que dentre os glicosaminoglicanos testados, a heparina foi a mais efetiva em inibir a desadesão celular causada pelo veneno. Esta propriedade foi seguida pelo dermatam sulfato em menor intensidade. O condrotim sultato não apresentou efeito protetor (dados não mostrados). Estes dados estão de acordo com a intensidade de ligação destes glicosaminoglicanos sobre a matriz extracelular das células endotelias, conforme observado por Bouças *et al*., (2008), os quais mostraram que o condroitim sulfato não liga na matriz extracelular. Isto poderia supor que, apesar de serem carregados negativamente e, por mais que a ligação na matriz seja eletrostática, ainda sim deve haver preferência para ligação, devido a conformação espacial das cargas negativas para poderem interagir com a cadeia lateral de resíduos de aminoácidos básicos, dos componentes da matriz extracelular.

Quando avaliada a atividade de fucanas (A e B) sobre a ação do veneno, foi observado que ambas inibem a desadesão causada pelas toxinas loxoscélicas, de forma similar à heparina (Figuras 12 e 13).

Além da desadesão, outro efeito bastante característico do tratamento de células endoteliais com veneno de aranha marrom é a alteração na morfologia. Paludo *et al.,* (2006) observaram alterações ultra-estruturais importantes, como o surgimento de projeções de filopódios por toda a extensão da célula, que também passa a apresentar um corpo celular arredondado e retraído. O tratamento com os polissacarídeos, das células endoteliais que foram previamente expostas ao veneno, foi suficiente para confirmar o efeito protetor destes compostos sobre a morfologia celular.

Como pode ser observado na Figura 15, a adição de polissacarídeo tornou possível a manutenção do espraiamento e do volume celular, apresentando

características muito parecidas com as células do grupo controle. No entanto, essas células apresentam um estado intermediário, quando comparado às células expostas ao veneno, com as não expostas (controle) (Figura 15). Este resultado pode ser explicado pelo fato de que o polissacarídeo foram adicionados somente depois de duas horas de que as células já estavam expostas ao veneno. Assim, estas alterações já poderiam ter sido desencadeadas pelo veneno, quando os polissacarídeos foram apresentados. No entanto, esta estratégia foi adotada para simular o que pode ocorrer com a administração de um fármaco, o que somente seria utilizado após a ocorrência do acidente (picada da aranha marrom).

O mecanismo de proteção que os polissacarídeos oferecem foi investigado. Sabendo-se que a heparina é capaz de se ligar a várias proteínas da matriz extracelular como fibronectina (YAMADA, 1983; WIERZBICKA-PATYNOWSKI; SCHWARZBAUER, 2003), vitronectina (HAYMAN *et al*., 1983; UNDERWOOD *et al*., 2002), laminina (SAKASHITA *et al*., 1980; SASAKI *et al*., 2004), trombospondina (BERGE *et al*., 1999), colágenos tipo I, III and V (DELACOUX *et al*., 1998) e tenascina (LANE, 1989; JANG *et al*., 2004), cujas interações são, geralmente, de natureza eletrostática (KJELLÉN; LINDAHL, 1991; LINDAHL *et al*., 1994; SAMPAIO *et al*., 2006) e, por outro lado, sabendo-se que dentre as diversas moléculas da matriz extracelular testadas, o veneno foi capaz de degradar a fibronectina isolada (VEIGA *et al*., 2001b) ou produzida pelas células endoteliais (PALUDO *et al*., 2006), buscamos avaliar se os compostos testados poderiam proteger a degradação da fibronectina.

A avaliação sobre a ação do veneno na degradação da fibronectina plasmática mostrou que os polissacarídeos minimizaram esta degradação (Figura 18. Este resultado pode ser explicado pelo fato que esta molécula possui sítio de interação para a heparina (Figura 22).

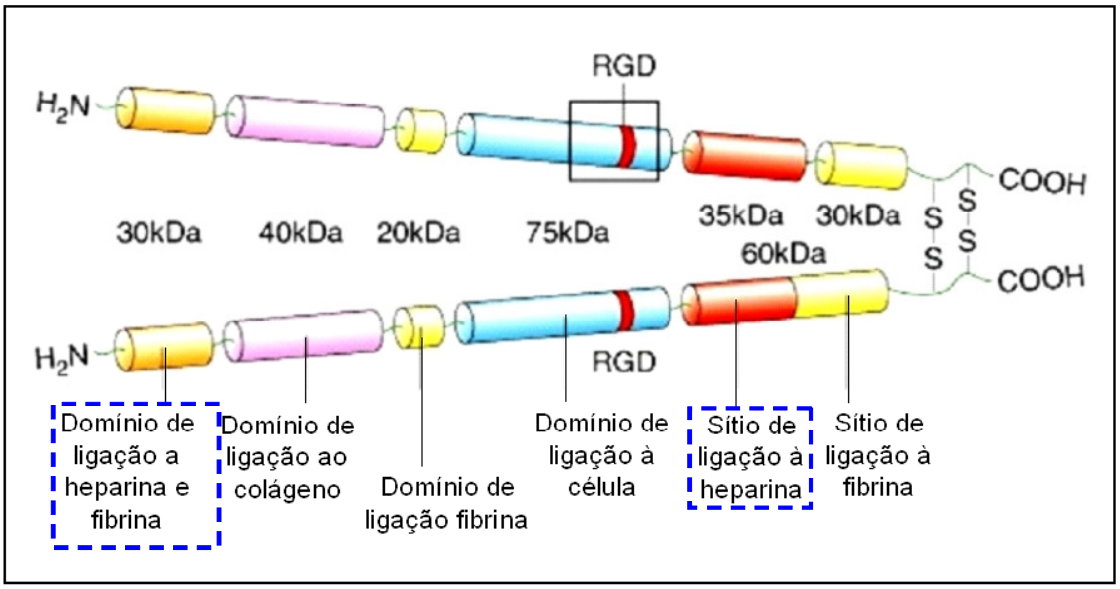


FIGURA 22. MOLÉCULA DE FIBRONECTINA, SEUS DOMÍNIOS E SÍTIOS DE INTERAÇÃO. A molécula de fibronectina constitui-se em um dímero formado por duas grandes subunidades de 220 kDa, unidas por pontes dissulfidricas, próximas da região carboxi-terminal. Possui múltiplos domínios, conferindo a esta proteína a capacidade de ligar diversas moléculas (como heparina, fibrina, colágeno) ou à célula (sítio RGD – formado pela sequência Arg-Gly-Asp). Note a proximidade do sítio de ligação à célula e do sítio de ligação à heparina. Destacados pelos retângulos tracejado estão os sítios/domínio de ligação à heparina de cada cadeia. Fonte: WILLEY J; SONS, 1999.

Buscando comprovar se a proteção observada para a fibronectina poderia de fato refletir na proteção da desadesão das células, inicialmente foi avaliado a adesão celular sobre a molécula de fibronectina tratada com veneno, na ausência ou na presença dos polissacarídeos.

Os resultados mostraram claramente que, quando a matriz de fibronectina é previamente tratada com veneno, ocorre uma diminuição do número de células aderidas. Novamente, os polissacarídeos testados mostraram minimizar este efeito (Figura 19 e 20). Um dado curioso foi verificado na adesão das células à molécula de Fibronectina que foi exposta aos polissacarídeos na ausência de veneno. Neste caso, houve uma significativa inibição da adesão celular (Figura 19 e 20). Este resultado deve-se ao fato de que a fibronectina apresenta diferentes sítios de ligação para a heparina, sendo que um deles está muito próximo do sítio de ligação à células (via tripeptídio RGD – arginina, glicina e ácido aspártico)

(Figura 22). Assim, quando o polissacarídeo interage com este sítio, dado o tamanho da molécula do carboidrato, pode impedir que as células reconheçam o sítio de interação RGD.

Como discutido anteriormente, o veneno também age sobre a fibronectina produzida pelas células. Assim, o próximo passo foi avaliar se polissacarídeos poderiam proteger a fibronectina endógena da degradação do veneno. Os dados mostraram que, de fato, os polissacarídeos testados são potentes inibidores da ação proteolítica do veneno sobre a matriz de fibronectina.

Assim, os dados mostraram que fucanas (A e B) e heparina podem minimizar a degradação da fibronectina, tanto em solução, quanto aquela produzida pelas células endoteliais. Como existe sítio de interação para a heparina e, considerando que fucanas, por serem poliânios, podem se comportarem como "heparin-like", estas também devem ligar nos sítios de interação para a heparina, conforme mostrado em ensaios "in situ" por Medeiros (2008). Desta forma, estes compostos podem proteger a fibronectina da ação proteolítica causada pelo veneno de *L. intermedia*.

A degradação de fibronectina é decorrente da ação de metaloprotease presentes no veneno, como mostrado por Feitosa *et al*., (1999), utilizando veneno total obtido por eletrochoque. Este dado foi confirmado por da Silveira *et al*., (2002) utilizando extratos da glândula de *L. intermedia* e *L. laeta*, para evitar a crítica de possíveis contaminantes regurgitados pela aranha no momento do choque elétrico.

Recentemente da Silveira *et al*., (2007) por expressão heteróloga, clonaram à partir do cDNA da biblioteca obtida da glândula de *L. intermedia*, uma metaloprotease semelhante a astacina (LALP – *Loxosceles* astacin-like protease) a qual possui dentre outras propriedades, atividade proteolítica sobre a fibronectina e a capacidade de soltar as células endoteliais da placa de cultura, de forma semelhantes àquelas atividades observadas pelo veneno total de *L. intermedia*.

Quando avaliado a seqüência de resíduos de aa desta proteína observa-se que aproximadamente 20% são básicos (apresentando 15 Lisinas, 15 argininas e

7 histidinas) (Figura 23C), os quais poderiam servir de sítio de interação eletrostática com os polissacarídeos, uma vez que estes são poliânios.

O mais interessante é que esta enzima pertence a uma família de proteínas conhecidas por Astacinas, as quais têm como assinaturas principal o sítio ativo formado por um domínio que liga zinco, contendo ^{92}HEXXHXXGFXHE (His92–Glu103) (BOND; BOYNON, 1995; DA SILVEIRA *et al*., 2007), que está inserido em uma região alfa-hélice (Figura 23A) e uma dobra contendo ^{147}MXY (M-metionina; Y-Tiroxina; X- geralmente é Histidina, mas LALP possui L-Leucina), conhecida como volta de metionina. Assim, nesta região a proteína faz uma volta e a cadeia lateral deste resíduo de tirosina (Y) se aproxima do sítio ativo, atuando na estabilização da ligação ao zinco (Figura 23B) (BOND; BOYNON, 1995).

Conforme descrito por Cardin e Waintraub (1989), após examinarem uma série de seqüências de ligação para a heparina, propuseram dois sítios "consensus" de ligação: XBBXBX e XBBBXXBX, onde B representa um resíduo de aminoácido básico e X um resíduo neutro ou hidrofóbico.

Assim, comparando o primeiro sítio "consensus" definido por Cardin e Waintraub (1989) (XBBXBX) com a seqüência de aa de LALP definida por da Silveira *et al*., (2007), verifica-se que próximo à volta de metionina, dista 8 resíduos de aminoácidos, existe uma seqüência com esta característica (TRKFKT). Desta forma, os polissacarídeos poderiam ligar nesta região e, ocasionar uma pertubação na enzima que poderia ou levar a uma mudança conformacional e/ou impedir estericamente a interação com o substrato, resultando na diminuição da atividade sobre a clivagem de fibronectina e, consequentemente da matriz extracelular e menor liberação das células endoteliais.

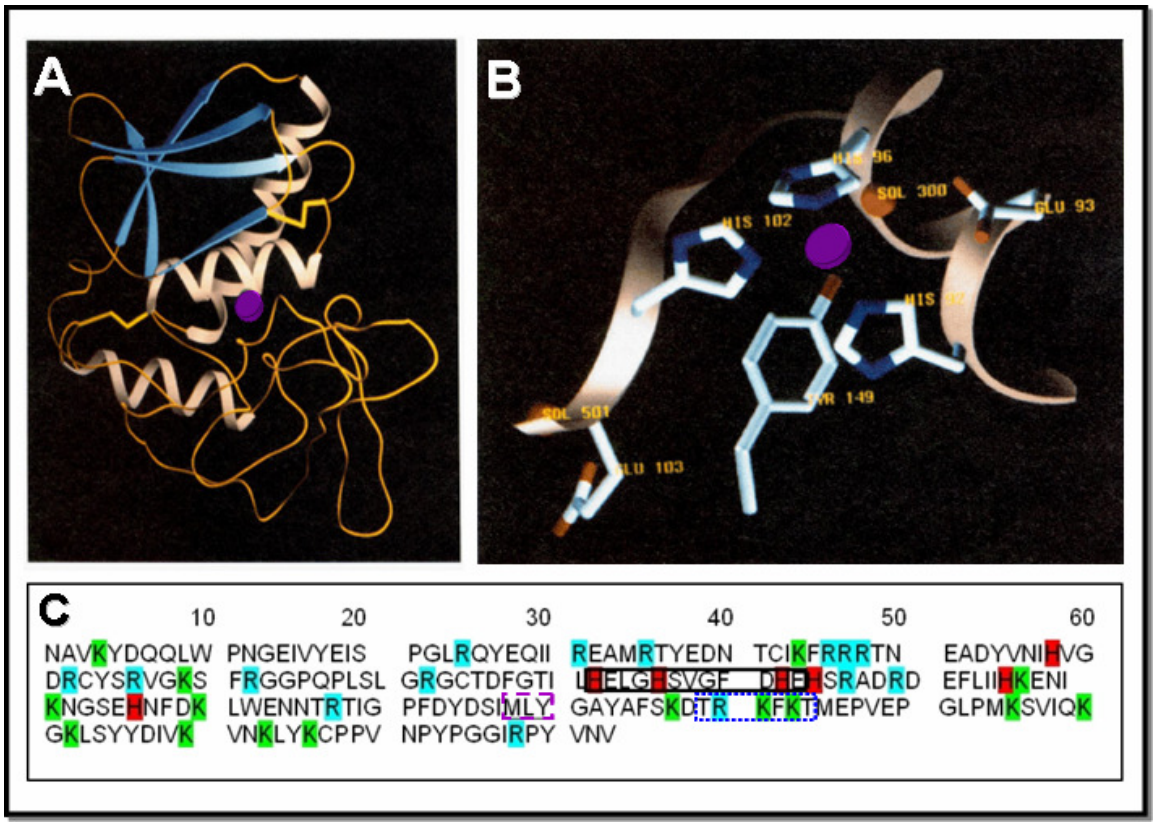


Figura 23. LALP, UMA METALOPROTEASE DA FAMÍLIA DAS ASTACINAS. A Figura acima ilustra um modelo da conformação protéica de uma Astacina (**A**). Observe que o sítio ativo está entre uma região alfa-hélice onde interage com o zinco (estrutura representada em lilás). Em **B** está ilustrado o sitio ativo da enzima, onde há a participação da tirosina (Tyr-149) a qual pertence a volta de metionina (destacado em **C** com um retângulo com traços descontínuos em róseo), a qual participa da establização do zinco. Em **C** está a seqüência do resíduos de aa de LALP. Observe que os aa positivos estão destacados coloridos (R – arginina; H – histidina e K – lisina). Note que o sítio ativo está delimitado por um retângulo com traço preto e contínuo. A seqüência TRKFKT (destacada com o retângulo tracejado em azul) é uma região característica de ligação com a heparina. Fonte A e B – adaptados de BOND E BOYNON, 1995; C – DA SILVEIRA *et al.*, 2007.

O dado que suporta que ocorre interação de polissacarídeo e membros da família das Astacinas, está no trabalho realizado por Tsai *et al.*, (2004) que purificaram a Nefrosina (uma enzima também da família das Astacinas) utilizando a cromatografia de afinidade à heparina. Estes autores exploraram esta

possibilidade tento em vista que a proteína apresentava regiões ricas em aa positivos (TSAI *et al*., 2004).

Nossos resultados utilizando a incubação de heparina ou fucanas com o veneno, e posterior avaliação em eletroforese, mostraram que existe interação entre toxinas loxoscélicas (Figura 16). No entanto, como utilizamos somente o veneno total não é possível afirmar que a interação foi somente com metaloprotease (LALP).

Outros autores também já mostraram que polissacarídeos sulfatados, em especial heparina e fucoidam, por serem poliânios, podem inibir a ação de toxinas presentes em veneno de animais peçonhentos. Neste sentido, destacam-se os trabalho com veneno de cobra e uso de heparina, desenvolvido por MELO *et al*., (1993), LOMONTE *et al*., (1994), TJONG *et al*., (2007) ou uso de fucoidam, realizados por AZOFEIFA *et al*., (2008) e ANGULO e LOMONTE, (2008). Ainda, diversos trabalhos mostram que a ação inibitória destes polissacarídeos são decorrentes da inibição de fosfolipases presentes no veneno (LOMONTE *et al*., 1994; AZOFEIFA *et al*., 2008; ANGULOA; LOMONTEA, 2008).

Estes dados reforçam nossos achados que heparina e fucanas interagem com toxinas do veneno (Figura 16). Assim, apesar de já existirem estudos que mostraram uso de polissacarídeo sulfatado como inibidor da ação de veneno, esta é a primeira vez que foi demonstrado que heparina e fucanas pode minimizar a ação do veneno de *L. intermedia* e aponta para a inibição da atividade da metaloprotease, pela interação com a enzima e/ou com o substrato. Trabalhos adicionais devem ser realizados para identificar se os polissacarídeos atuam como inibidor direto da enzima ou como protetor do substrato, ou ocorre a sobreposição de ambas atividades.

Finalmente, existem várias propostas para tratamento do loxoscelismo, destacando-se o uso de corticosteróides e/ou soro anti-veneno, porém não existe um critério unânime em relação a melhor medida terapêutica (KING JR., 1985; REES *et al*., 1985; PAULI *et al.,* 2006). Assim, o presente trabalho, com a constatação de que polissacarídeos sulfatados podem minimizar os efeitos de

enzimas do veneno de aranha marrom em células endotelias, abrem grandes possibilidades para o uso “in vivo”.

Ainda, nos testes de viabilidade celular (Figura 14), verificou-se que a heparina e as fucanas não possuem efeito citotóxico sobre células endoteliais. Este dado é muito importante, pois isenta estes polissacarídeos de qualquer ação citotóxica, sendo esta, uma importante característica de qualquer fármaco. Como a heparina é um produto disponível comercialmente há muito anos, e as fucanas, extraídas de algas, são livres de contaminantes de origem animal, assim mais trabalhos envolvendo agora o modelo “in vivo” são necessários para avaliar a possibilidade de utilização destes compostos como possíveis fármacos para inibir os efeitos deletérios causados pelo veneno de *L. intermedia*.

6. CONCLUSÕES

Com base em todos os resultados apresentados, podemos concluir que polissacarídeos sulfatados exibe um poder protetor sobre a ação do veneno de *L. intermedia* em células endoteliais. Esta proteção foi observada tanto minimizando a perda de adesão, quanto as alterações morfológicas e ultra-estruturais, eventos característicos após o tratamento com veneno.

Os dados mostraram que ocorre interação entre proteínas do veneno loxoscélico e os polissacarídeos. Esta interação deve ser de natureza eletrostática, proveniente das cargas negativas dos polissacarídeos testados e de resíduos de aminoácidos positivos.

Apesar de ser evidenciado que os polissacarídeos causaram uma diminuição da ligação do veneno à superfície da célula endotelial, os dados sugerem que a proteção proporcionada por estes compostos está relacionada à matriz extracelular, em especial à molécula de fibronectina. Os resultados mostram claramente que a fibronectina é protegida do efeito proteolítio do veneno, tanto em solução, quanto a organizada pelas células em matriz extracelular.

Como existem sítios de interação para heparina tanto na fibronectina, quanto na metaloprotease presente no veneno, os dados sugerem que a inibição ao efeito proteolítico, pode ser em decorrência da proteção ao substrato ou pela inibição direta da atividade enzimática.

Ainda, o conjunto de resultado, juntamente com a informação de que polissacarídeos testados não apresentam toxicidade celular, sugerem que heparina e fucanas podem ser possíveis fármacos de escolha para atuar na inibição dos efeitos deletérios, desencadeados pelo veneno de *L. intermedia*.

Trabalhos adicionais deve ser conduzidos para confirmar está hipóteses.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ALARIO, A., PRICE, G., STAHL, R., BANCROFT, P. Cutaneous necrosis following a spider bite: a case report and review**. Pediatrics 79** (4), 618–621, 1987.

ALVES, A.P., MULLOY, B., DINIZ, J.A., AND MOURAO, P.A.S. Sulfated polysaccharides from the egg jelly layer are species-specific inducers of acrosomal reaction in sperms of sea urchins**. J. Biol. Chem**., 272, 6965-6971, 1997.

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

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,** v.28, p. 245-247, 2000.

ANGULO Y., LOMONTE, B. Inhibitory effect of fucoidan on the activities of crotaline snake venom myotoxic phospholipases A2. **Biochemical Pharmacology** 1993–2000, 2003.

APPEL M. H., DA SILVEIRA. R. B., GREMSKI, W., VEIGA, S. S. Insights into brown spider and loxoscelism **ISJ** 2: 152-158, 2005.

APPEL, M.H., DA SILVEIRA, R.B., CHAIM, O.M., PALUDO, K.S., SILVA, D.T., CHAVES, D.M., DA SILVA, P.H., MANGILI, O.C., SENFF-RIBEIRO, A., GREMSKI, W., NADER, H.B., VEIGA, S.S. Identification, cloning and functional characterization of a novel dermonecrotic toxin (phospholipase D) from brown spider (Loxosceles intermedia) venom. Biochim Biophys Acta. 1780(2):167-78, 2008.

ATKIN, J. A., WINGO, C. W., SODEMAN, W. A., FLYNN, J. E. Necrotic arachnidism. **Am. J. Trop. Med**. 7: 165-184, 1958.

AZOFEIFA K, ANGULO Y, LOMONTE B. Ability of fucoidan to prevent muscle necrosis induced by snake venom myotoxins: comparison of high- and low-molecular weight fractions. **Toxicon**. 51(3):373-80, 2008.

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

BARBARO K.C.; EICKSTEDT V.R.; MOTA I. Antigenic cross-reactivity of venoms from medically important Loxosceles (Araneae) species in Brazil. **Toxicon.** V.32, p.113-20, 1994.

BARBARO K.C.; FERREIRA M.L; CARDOSO D. F.; EICKSTEDT V. R; MOTA I. Identification and neutralization of biological activities in the venoms of Loxosceles spiders. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.29, p.1491-1497, 1996.

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

BARRETT, S.M., ROMINE-JENKINS, M., BLICK, K.E. Passive hemagglutination inhibition test for diagnosis of brown recluse spider bite envenomation. **Clin. Chem**. 39, 2104–2107, 1993.

BARRETT, S.M., ROMINE-JENKINS, M., FISHER, D.E. Dapsone or eletric shock therapy of brown recluse spider envenomation? **Ann. Emerg. Med**. 24 (1), 21–25, 1994.

BERGE, N.; LOGANADANE, L. D.; VASSY, J. Adhesion-induced intracellular signalling in endothelial cells depends on the nature of the matrix. **Cell Adhes. Comm**., v.7, p.29-41, 1999.

BERTEAU, O., MULLOY, B. Sulfated fucans, fresh perspectives: structures, functions, and biological properties of sulfated fucans and an overview of enzymes active toward this class of polysaccharide. **Glycobiology;** 13, 6, 29-40, 2003

BOND, J. S., BEYNON, R. J. The astacin family of metalloendopeptidases. **Profein Science** 4:1247-1261, *1995.*

BORKKAN J.; GROSS E.; LUBIN Y.; ORYAN I. An outbreak of venomous spider bites in a citrus grove, **Ann. J. Trop. Med. Hyg.**,v. 52, p.228-230, 1995.

BLAND C.E., GINSBURG H., SILBERT J.E., METCALFE D.D. Mouse heparin proteoglycan. Synthesis by mast cell-fibroblast monolayers during lymphocyte-dependent mast cell proliferation**. J Biol Chem**;257:8661–8666, 1982.

BLACK, W.A.P. The seasonal variation in the combined L-fucose content of the common British laminariaceae and fucaceae. **J. Sci. Food Agr**., 5, 445-448, 1954.

BRADFORD, M. A. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of Protein–Dye binding, **Anal. Biochem.** v.72, p. 248–254, 1976.

BOUÇAS, R. I., TRINDADE, E. S., TERSARIO, I. L S., DIETRICH, C. P., NADER, H. B. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)-like fluorescence assay to investigate the interactions of glycosaminoglycans to cells. **Analytica chimica acta** 618; 218–226, 2008.

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

BÜCHERL, W. As aranhas. In **Invertebrados.**1ª ed., Edtart, São Paulo, 1972.

CHAVEZ-OLORTEGUI, C., ZANETTI, V.C., FERREIRA, A.P., MINOZZO, J.C., MANGILI, O.C., GUBERT, I.C. Elisa for the detection of venom antigens in experimental and clinical envenomation by Loxosceles intermedia spiders. **Toxicon** 36, 563–569, 1998.

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

CARDIN, A. D., WEINTRAUB, H.J. Molecular modeling of protein glycosaminoglycan interactions. **Arteriosclerosis**, 9(1):21-32, 1989.

CASU B., GUERRINI M., TORRI G. Structural and conformational aspects of the anticoagulant and anti-thrombotic activity of heparin and dermatan sulfate. **Curr Pharm Des;**10:939–949, 2004.

CHAIM, O.M.; SADE, Y.B.; da SILVEIRA, R.B.; TOMA, L.; KALAPOTHAKIS, E.,; CHAVEZ-OLORTEGUI, C.; MANGILI, O.C.; GREMSKI, W.; DIETRICH, C.P.; NADER, H.B.; VEIGA, S.S.; Brown spider dermonecrotic toxin directly induces nephrotoxicity. **Toxicology and applied pharmacology**, United States, v.221, p. 64-77, 2006.

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

CONRAD H.E. Heparin-Binding Proteins. San Diego, CA: Academic Press, 1998.

DA SILVA, P. H.; DA SILVEIRA, R. B.; APPEL, M. H.; MANGILI, C. O.; GREMSKI, W.; VEIGA, S. S. Brown spiders and loxoscelism. **Toxicon**, v.44, p.693-704 , 2004.

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

DA SILVEIRA R. B., CHAIM, O. M., MANGILI, O. C., GREMSKI, W., DIETRICH, C. P., NADER, H. B., VEIGA, S. S. Hyaluronidases in Loxosceles intermedia (Brown spider) venom are endo-b-N-acetylhexosaminidases hydrolases, **Toxicon** v. 49, p. 758-768, 2007a

DA SILVEIRA, R.B., PIGOZZO, R. B., CHAIM, O. M., APPEL, M. H., SILVA, D. T., DREYFUSS, J. L., TOMA, L., DIETRICH, C. P., NADER, H. B., VEIGA, S. S., GREMSKI, W. Two novel dermonecrotic toxins LiRecDT4 and LiRecDT5 from Brown spider (Loxosceles intermedia) venom: from cloning to functional characterization, **Biochimie** v. 89, p. 289-300, 2007b

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

DE CASTRO, C. S., SILVESTRE, F. G., ARAÚJO, S. C., GABRIEL, M. Y., MANGILI O. C., CRUZ, I., CHAVEZ-OLORTEGUI, C., KALAPOTHAKIS, E. Identification and molecular cloning of insecticidal toxins from the venom of the brown spider Loxosceles intermedia, **Toxicon**, v. 44, p. 273-280, 2004.

DELACOUX, F.; FICHARD, A.; GEOURJON, C.; GARRONE, R.; RUGGIOERO, F. Molecular features of the collagen V heparin binding site. **J. Biol. Chem**., v.273, p.15069-15076, 1998.

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

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

DIETRICH, C. P.; DIETRICH, S. M. C. Eletrophoretic behaviour of acidic mucopolysacharides in dyamine buffers. **Anal Biochem**., v.70, p.645-647,1976.

DIETRICH C.P., PAIVA J.F., CASTRO R.A.B., CHAVANTE S.F., JESKE W., FAREED J. Structural features and anticoagulant activities of a novel natural low molecular weight heparin from the shrimp Penaeus brasiliensis. **Biochim Biophys Acta**;1428:273–283, 1999.

DIETRICH, C. P. A model for cell-cell recognition and control of cell growth mediated by sulfated glycosaminoglycans. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v.17, p.5-15, 1984.

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 Phaeophycea. **Plant Science**., v.108, p.143-153, 1995.

DONEPUDI, K. S., AHMED, K. A., STOCKS, R. M. S., NELSON, D., THOMPSON, J. W. Aural involvement in loxoscelism: Case report and literature review - **International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology,** 69, 1559—1561, 2005.

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**, v.38, p.265-285, 2000.

ELSTON, D.M. What's eating you? Loxosceles reclusa (brown recluse spider). Cutis 69, 91–95, 2002.

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.,** v.135, p.423-426, 1999.

ESCOUBAS, P., DIOCHOT, S., CORZO, G. Structure and pharmacology of spider venom neurotoxins. Biochimie 82: 893-907, 2000.

FAREED J., HOPPENSTEADT D.A., BICK R.L. An update on heparins at the beginning of the new millennium. **Semin Thromb Hemost**;26:5–18, 2000.

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

FISHER M. L. Levantamento das espécies de Loxosceles Heinecken and Lowe, 1832 no município de Curitiba, Paraná, Brasil**. Estudos de Biologia,** v.3, p.63-88, 1994.

FUTRELL, J. M.; Loxoscelism. **Am. J. Med. Sci**., v.304, p.261-267, 1992.

GAJARDO-TOBAR, R. Personal experience with loxoscelism **Mem. Inst. Butantan**, v.33, p.689-698, 1966.

Gandhi, N. S. The Structure of Glycosaminoglycans and their Interactions with Proteins. **Chem Biol Drug Des**; 72: 455–482, 2008.

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.** , v.174, p.90-99, 1976.

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.**, v.77, p.352-359, 1998.

GONÇALVES-de-ANDRADE, R.M.; TAMBOURGI, D.V. First record on *Loxoscleles laeta* (Nicolet, 1849) (Araneae, Sicariidae) in the West Zone of São Paulo City, São Paulo, Brazil, and considerations regarding its geographic distribution. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical,** Brasil, v.36, p.425-426, 1999.

GONZALEZ M, ALARCON B, CARRASCO L. Polysaccharides as antiviral agents: antiviral activity of carrageenan. **Antimicrobial Agents Chemother,** 31:1388-93, 1987.

GRISHIN, E. Polipeptide neurotoxins from spider vemons. **Eur.J.Biochem.**, v.264, p.276-280, 1999.

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

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, p. 96, 1983.

HOLT, C.E., DICKSON B.J. Sugar codes for axons? **Neuron**;46:169–172, 2005.

HOBBS, G.D., YEALY, D.M. Development of an acute swine model for Loxosceles envenomation. Vet. Hum. **Toxicon**. 36, 298–300, 1994

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

HOVINGH P., LINKER A. An unusual heparan sulfate isolated from lobsters (Homarus americanus). **J Biol Chem**;257:9840–9844, 1982.

HOVINGH P., LINKER A. Glycosaminoglycans in Anodonta californiensis, a freshwater mussel. **Biol Bull**;185:263–276, 1993.

HUNTER H. S.; CORY A. D.; SMITH M. L.; Necrotic arachnidism. **J Am Acad.Dermatol.**, v.44, p.561-73, 2001.

ISBISTER, G.K., WHITE, J. Clinical consequences of spider bites: recent advances in our understanding. Toxicon 43 (5), 477–492, 2004.

JACKSON R.L., BUSCH S.J., CARDIN A.D. Glycosaminoglycans: molecular properties, protein interactions, and role in physiological processes. **Physiol Rev**; 71:481–539, 1991.

JANG, J.H., HWANG, J.H., CHUNG, C.P., CHOUNG, P.H. Identification and kinetics analysis of a novel heparin-binding site (KEDK) in human tenascin-C. J Biol Chem 279:25562–25566, 2004.

JARVIS, R.M., NEUFELD, M.V., WESTFALL, C.T. Brown recluse spider bite to the eyelid. **Ophthalmology** 107 (8), 1492–1496, 2000.

KAKUDA TN. Pharmacology of nucleoside and nucleotide reverse transcriptase inhibitor-induced mitochondrial toxicity**. Clin Ther** ; 22:685-708, 2000.

KILLING, H. Zur biochemie der Meersalgen**. Z. Physiol. Chem**., 83,171-197, 1913.

KING JR., L.E. Brown recluse spider bites: stay cool. Letter to the, editor. **JAMA** 254 (20), 2895–2896, 1985.

KISILEVSKY R., ANCSIN J.B., SZAREK W.A., PETANCESKA S. Heparan sulfate as a therapeutic target in amyloidogenesis: prospects and possible complications. **Amyloid**;14:21–32, 2007.

KJELLÉN, L.; LINDAHL, U. Proteoglycans: structures and interations. **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**, v.678, p.467-476, 1981.

KUSMA, J., CHAIM, O.M., WILLE, A.C., FERRER, V.P., SADE, Y.B., DONATTI, L., GREMSKI, W., MANGILI, O.C., VEIGA, S.S. Nephrotoxicity caused by brown spider venom phospholipase-D (dermonecrotic toxin) depends on catalytic activity. **Biochimie.** 90(11-12):1722-36, 2008

LOMONTE, B., TARKOWSKI, A., BAGGE, U., HANSON, L. A. Neutralization of the cytolytic and myotoxic activities of phospholipases A2 from Bothrops asper snake venom by glycosaminoglycans of the heparin/heparan sulfate family. **Biochem Pharmacol**. 47(9):1509-18, 1994.

LANE, D. A. Heparin binding and neutralising proteins. In: LANE D. A., LINDAHL U, Heparin - Chemical and biological properties, clinical applications. **Edward Arnold Publishers.** London-UK. p.363-391, 1989.

LINHARDT R.J., AMPOFO S.A., FAREED J., HOPPENSTEADT D., FOLKMAN J., MULLIKEN J.B. Isolation and characterization of human heparin. **Biochemistry**;31:12441–12445, 1982.

LEE, S., LYNCH, K.R. Brown recluse spider (Loxosceles reclusa) venom phospholipase D (PLD) generates lysophosphatidic acid (LPA). **Biochem. J**. 391: 317-323, 2005.

LINDAHL, U.; KIDHOLT, K.; SPILLMANN, D.; KJELLÉN, L. More to “heparin” than anticoagulation**. Tromb. Res.** v.75, n.1, p1-32, 1994.

IOZZO R.V., SAN ANTONIO J.D. Heparan sulfate proteoglycans: heavy hitters in the angiogenesis arena**. J Clin Invest**;108:349–355, 2001.

LUCAS, S. Spiders in Brazil. **Toxicon,** v.26, p.759-772, 1988.

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 A Direct Cytotoxicity of *Loxosceles intermedia* (Brown Spider) Venon in Renal Tissue. **J. Histochem. Cytochem.**, v.52, p.455-467, 2004.

MACCHIAVELLO A. Cutaneous arachnidism or gangrenous spot of Chile. **Pub. Health Trop. Med.** 22: 425-466, 1947.

MÁLAQUE, C.M.S., CASTRO-VALENCIA, J.E., CARDOSO, J.L.C., FRANÇA, F.O.S., BARBARO, K.C., FAN, H.W. Clinical and epidemiological features of definitive and presumed loxoscelism in São Paulo, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop**. S, 62; 150 – 158, 2002.

MARCHETTI M, PISANI S, PIETROPAOLO V, SEGANTI L, NICOLETTI R, ORSI N. Inhibition of Herpes simplex virus infection by negatively charged and neutral carbohydrate polymers**. J Chemother**; 7:90-6, 1995.

MARTINEZ-VARGAS, A.Z. Loxoscelismo, um problema de salud en el Perú. **Bol. San. Panam.,** v.103, p.378-386, 1987.

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

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.**, v.3, p. 99, 1997.

MASTERS, E.J.. Loxoscelism. **N. Engl. J. Med**. 339 (6), 379, 1998.

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, p.373-387, 1998.

MAYNOR,M.L., MOON, R.E., KLITZMAN, B., FRACICA, P.J., CANADA, A. Brown recluse spider envenomation: a prospective trial of hyperbaric oxygen therapy. **Acad. Emerg. Med**. 4 (3), 184–192, 1997.

MEDEIROS, V. Síntese do HS antitrombótico em células endoteliais: Interação da heparina e fucana A da alga Spatoglossum schröederi com a matriz extracelular e vias de sinalização associadas. Tese de Doutorado, UNIFESP, 2008.

MELO, P.A., HOMSI-BRANDEBURGO, M.I., GIGLIO, J.R., SUAREZ-KURTZ, G. Antagonism of the myotoxic effects of Bothrops jararacussu venom and bothropstoxin by polyanions. Toxicon. 3:285-91, 1993.

MEREDITH, J.E. Jr.; SCHWARTZ, M.A. The extracellular matrix as a cell survival factor. **Mol. Biol. Cell.,** v.4, p.953-961, 1993.

MULLOY, B., RIBEIRO, A.C., ALVES, A.P., VIEIRA, R.P., AND MOURAO, P.A.S. Sulfated fucans from echinoderms have a regular tetrasaccharide repeating unit defined by specific patterns of sulfation at the O-2 and O-4 positions. **J. Biol. Chem**., 269, 22113-22123, 1994.

NADER H.B., CHAVANTE S.F., DOS-SANTOS E.A., OLIVEIRA F.W., DE-PAIVA J.F., JERÔNIMO S.M.B. Heparan sulfates and heparins: similar compounds performing the same functions in vertebrates and invertebrates? **Braz J Med Biol** Res;32:529–538, 1999.

NADER, H.B. PINHAL M.A.S., BAÚ E.C., CASTRO R.A.B., MEDEIROS G.F., CHAVANTE S.F., LEITE E.L., TRINDADE E.S., SHINJO S.K., ROCHA H.A.O., TERSARIOL I.L.S., MENDES A., DIETRICH C.P. Development of new heparin-like compounds and other antithrombot drugs and their interaction with vascular endothelial cells**. Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 34: 699-709, 2001.

NICHOLSON G. M.; GRAUDINS A. Antivenoms for the treatment of spider envenomation. **J. Toxicol. Tox.**, v.22, p.35-59, 2003.

Nishioka, S.A., Misdiagnosis of brown recluse spider bite**. West. J. Med**. 174, 240, 2001.

OSPEDAL, K.Z., APPEL, M.H., NETO, J.F., MANGILI, O.C., VEIGA, S.S., GREMSKI, W. Histopathological findings in rabbits after experimental acute exposure to the Loxosceles intermedia (brown spider) venom. Int. J. Exp. Pathol. 84, 287–294, 2002.

OSTERHOUDT, K.C., ZAOUTIS, T., ZORC, J.J. Lyme disease masquerading as brown recluse spider bite. **Ann. Emerg. Med**. 39, 558–561, 2002.

OTOTANI N., KIKUCHI M., YOSIZAWA Z. Comparative studies on the structures of highly active and relatively inactive forms of whale heparin**. J Biochem**; 90:241–246, 1981.

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

PALUDO, K.S.; GREMSKI, L.H.; VEIGA, S.S.; CHAIM, O.M.; GREMSKI, W.; de Freitas BUCHI; NADER, H.B.; DIETRICH, C.P.; FRANCO, C.R.C. The effect of Brown spider venom on endothelial cell morphology and adhesive structures. **Toxicon**, v.47, p. 844-853, 2006.

PATEL, K.D., MODUR, V., ZIMMERMAN, G.A. The necrotic venom of the brown recluse spider induces dysregulated endothelial cell-dependent neutrophil activation: differential induction of GM-CSF, IL-8, and E-selectin expression. **J. Clin. Invest**. 94, 631–642, 1994.

PERCIVAL, E. G. V., MC DOWELL, R. H. Chemistry and enzymology of marine algal polysaccharides. **London: Academic Press**, p.219, 1967.

PERCIVAL, E.G.V. AND ROSS, A.G. The isolation and purification of fucoidin from brown seaweeds. **J. Chem. Soc**., 717-720, 1950.

PEREIRA, M.S., MULLOY, B., AND MOURAO, P.A.S. Structure and anticoagulant activity of sulfated fucans**. J. Biol. Chem**., 274, 7656-7667, 1999.

PHILLIPS, S., KOHN, M., BAKER, D., VANDER LEEST, R., GOMEZ, H., MCKINNEY, P., MCGOLDRICK, J., BRENT, J. Therapy of brown spider envenomation: a controlled trial of hyperbaric oxygen, dapsone, and cyproheptadine. **Ann. Emerg. Med.** 25 (3), 363–368, 1995.

PEJLER G., DANIELSSON A., BJORK I., LINDAHL U., NADER H.B., DIETRICH C.P. Structure and antithrombin-binding properties of heparin isolated from the clams Anomalocardia brasiliana and Tivela mactroides. **J Biol Chem**;262:11413–11421, 1987.

RADEMACHER T.W., PAREKH R.B., DWEK R.A. Glycobiology. **Annu Rev Biochem**; 57:785–838, 1988.

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

REES, R.S., ALTENBERN, D.P., LYNCH, J.B., KING JR., L.E.. Brown recluse spider bites: a comparison of early surgical excision versus dapsone and delayed surgical excision. **Ann. Surg.** 202 (5), 659–663, 1985.

REES, R.S., CAMPBELL, D., RIEGER, E., KING JR., L.E. The diagnosis and treatment of brown recluse spider bites. **Ann. Emerg. Med**. 16 (9), 945–949, 1987.

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. Tese Doutorado em Biologia Molecular– Escola Paulista de Medicina, Universidade Federa de São Paulo. Natal, 2002.

ROCHA, H. A, Moraes F. A., Trindade, E. S., Franco, C. R.C., Torquato, R. J. S., Veiga, S. S., Valente, A. P., Moura P. A. S., Leite, E. L., Nader, H. B., Dietrich C. P. Structural and Hemostatic Activities of a Sulfated Galactofucan fromthe Brown Alga Spatoglossumschroederi an ideal antithrombotic agent? **Journal of Bilogical Chemistry**, 280, 50, pp. 41278–41288, 2005.

ROCHA H. A.; MORAES F. A.;. TRINDADE E. S.; 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 schroederi*. An ideal antithrombotic agent? **J. Biol. Chem.,** v.280, p.41278-41288, 2006.

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, p.840-845, 2002.

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

SAKASHITA S, ENGVALL E, ROUSLAHTI E. Basement membrane glycoprotein laminin binds to heparin. **FEBS Lett** 116:243–246, 1980.

SAMPAIO, L.O., TERSARIOL, I.L.S., LOPES, C.C., BOUCAS, R.I., NASCIMENTO, F.D., ROCHA, H.A.O., NADER, H.B.Heparins and heparan sulfate. Structure, distribution and protein interactions. In: Verli H, editor. Insights into carbohydrate structure and biological function. Kerala, India:**Transworld Research Network**. pp 1–24, 2006.

SAMS, H. H.; DUNNICK, C. A.; SMITH, M. L.; KING, E. L.; Necrotic Arachnidism. **J. Am. Acad. Dermatol.** v.44, p.561-573, 2001.

SANDIDGE, J.S. Arachnology: scavenging by brown recluse spiders. **Nature,** 426, 6962, 2003.

SASAKI, T., FASSLER, R., HOHENESTER, E. Laminin: The crux of basement membrane assembly. **J Cell Biol** 164:959–963, 2004.

SCHENONE, H.; LETONJA, T. Notas sobre la biologia y distribuicion geográfica de las aranas del gênero Loxosceles. **Bol. Chil. Parasitol.** ,v.30, p.27-29, 1975.

SCHIENLE, A., SCHÄFER, A., WALTER, B., STARK, R., VAITL, D. Brain activation of spider phobics towards disorder-relevant, generally disgust- and fear-inducing pictures. **Neurosci. Lett**. 388: 1-6, 2005.

SEZERINO U. M; ZANNIN M.; COELHO L. K; GONÇALVES JÚNIOR J.; GRANDO M.; MATTOSINHO S. G.; CARDOSO J. L. C.; von EICKSTEDT V. R.; FRANÇA F. O.; 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.,** v. 92, p.546-548, 1998.

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. Biophy. Acta,** v.1497, p.127-134, 2000.

SOERENSEN, B. Acidentes por animais peçonhentos: reconhecimento, clínica e tratamento. **Editora Atheneu**, 1996.

SWANSON, D.L., VETTER, R.S. Medical progress: bites of brown recluse spiders and suspected necrotic arachnidism. **N. Engl. J. Med**. 352 (7), 700–707, 2005.

SWANSON, D. L., VETTER, R. S. Loxoscelism. **Clin, Dermat,** v. 24, p. 213-221, 2006.

TARSIO JF, REGER LA, FURCHT LT. Decreased interaction of fibronectin, type IV collagen,and heparin due to nonenzymatic glycation. Implications for diabetes mellitus. Biochemistry 26:1014–1020, 1987.

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**., v.155, p.4459-4466, 1995.

TJONG, S.C., CHEN, T.S., HUANG, W.N., WU, W.G. Structures of heparin-derived tetrasaccharide bound to cobra cardiotoxins: heparin binding at a single protein site with diverse side chain interactions. **Biochemistry**. 4;46(35):9941-52, 2007

TRINDADE, E. S., OLIVER, C., JAMUR, M. C., ROCHA, H. A. O., FRANCO, C. R. C., BOUÇAS, R. I., JARROUGE, T. R., PINHAL, M. A. S., TERSARIOL, I. L. S., GOUVEIA, T. C., DIETRICH, C. P., NADER, H. B. The Binding of Heparin to the Extracellular Matrix of Endothelial Cells Up-Regulates the Synthesis of a Antithrombotic Heparan Sulfate Proteoglycany. J. Cell. Physiol. 217: 328–337, 2008.

TSAI, P.L., CHEN, C.H., HUANG. C,J., CHOU, C.M., CHANG, G.D. Purification and cloning of an endogenous protein inhibitor of carp nephrosin, an astacin metalloproteinase. **J Biol Chem**, 279(12):11146-11155, 2004.

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.

VASSEUR, E. Chemical studies on the jelly coat of the sea-urchin egg. **Acta Chem. Scand.**, 2, 900-913, 1948.

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.,** v.272, p.12529-12535, 1997.

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,** v.37, p.587-607, 1999.

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

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.** v.102, p.229-237, 2001a.

VEIGA, S.S.; ZANETTI, V.C.; BRAZ, A.; MANGILI, O.C.; GREMSKI, W. Extracellular matrix molecules as targets for brown spider venom toxins. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 34, p. 843-850, 2001b.

VETTER R. S.; VISCHER P. K. Bites and stings of medically important venomous arthropods. **Int. J. Dermatol.,** v.38, p.481-496, 1998.

VETTER, R.S.. Identifying and misidentifying the brown recluse spider. **Dermatol. Online J**. 5, 7, 1999.

VETTER, R.S. Myth: idiopathic wounds are often due to brown recluse or other spider bites throughout the United States. **West. J. Med**. 173, 357–358, 2000.

VETTER, R.S., BARGER, D.K. An infestation of 2,055 brown recluse spiders (Araneae:Sicariidae) and no envenomation in a Kansas home: implications for bite diagnoses in nonendemic areas. **J. Med. Entomol**. 39, 948–951, 2002.

VETTER, R.S., BUSH, S.P. Chemical burn misdiagnosed as brown recluse spider bite. **Am. J. Emerg. Med**. 20, 68–69, 2002.

VETTER, R.S., CUSHING, P.E., CRAWFORD, R.L., ROYCE, L.A.. Diagnoses of brown recluse spider bites (loxoscelism) greatly outnumber actual verifications of the spider in four western American states. **Toxicon** 42, 413–418, 2003.

VILELA-SILVA, A.C., ALVES, A.P., AND VALENTE, A.P. Structure of the sulfated a-L-fucan from the egg jelly coat of the sea urchin Strongylocentrotus franciscanus: patterns of preferential 2-O- and 4-O-sulfation determine sperm cell recognition. **Glycobiology**, 9, 927-933, 1999.

WARDA M., MAO W., TOIDA T., LINHARDT R.J. Turkey intestine as a commercial source of heparin? Comparative structural studies of intestinal avian and mammalian glycosaminoglycans. **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol**;134:189–197, 2003.

WARDA M., GOUDA E.M., TOIDA T., CHI L., LINHARDT R.J. Isolation and characterization of raw heparin from dromedary intestine: evaluation of a new source of pharmaceutical heparin. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol;**136:357–365, 2003.

WENDELL, R.P. Brown recluse spiders: a review to help guide physicians in nonendemic areas. **South. Med. J**. 96 (5), 486–490, 2003.

WIERZBICKA-PATYNOWSKI, I., SCHWARZBAUER, J. E. The ins and outs of fibronectin matrix assembly. **J Cell Sci** 116:3269–3276, 2003.

WITVROUW M, DECLERQ E. Sulfated polysaccharides extracted from sea algae as potential antiviral drugs. **Gen Pharmacol**;29:497-511, 1997.

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.,** v.4, p. 1577-1590, 1990.

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,** v.39, p.391-400, 2001.

YIANNIAS, J.A., WINKELMANN, R.K.. Persistent painful plaque due to a brown recluse spider bite. Cutis 50, 273–275, 1992.

DEMO VERSION

This file was created with the DEMO VERSION of CAD-KAS PDFs 2 One. This is the reason why this file contains this page.

The order the full version please visit our website under http://www.cadkas.com

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ALARIO, A., PRICE, G., STAHL, R., BANCROFT, P. Cutaneous necrosis following a spider bite: a case report and review**. Pediatrics 79** (4), 618–621, 1987.

ALVES, A.P., MULLOY, B., DINIZ, J.A., AND MOURAO, P.A.S. Sulfated polysaccharides from the egg jelly layer are species-specific inducers of acrosomal reaction in sperms of sea urchins**. J. Biol. Chem**., 272, 6965-6971, 1997.

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

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,** v.28, p. 245-247, 2000.

ANGULO Y., LOMONTE, B. Inhibitory effect of fucoidan on the activities of crotaline snake venom myotoxic phospholipases A2. **Biochemical Pharmacology** 1993–2000, 2003.

APPEL M. H., DA SILVEIRA. R. B., GREMSKI, W., VEIGA, S. S. Insights into brown spider and loxoscelism **ISJ** 2: 152-158, 2005.

APPEL, M.H., DA SILVEIRA, R.B., CHAIM, O.M., PALUDO, K.S., SILVA, D.T., CHAVES, D.M., DA SILVA, P.H., MANGILI, O.C., SENFF-RIBEIRO, A., GREMSKI, W., NADER, H.B., VEIGA, S.S. Identification, cloning and functional characterization of a novel dermonecrotic toxin (phospholipase D) from brown spider (Loxosceles intermedia) venom. Biochim Biophys Acta. 1780(2):167-78, 2008.

ATKIN, J. A., WINGO, C. W., SODEMAN, W. A., FLYNN, J. E. Necrotic arachnidism. **Am. J. Trop. Med**. 7: 165-184, 1958.

AZOFEIFA K, ANGULO Y, LOMONTE B. Ability of fucoidan to prevent muscle necrosis induced by snake venom myotoxins: comparison of high- and low-molecular weight fractions. **Toxicon**. 51(3):373-80, 2008.

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

BARBARO K.C.; EICKSTEDT V.R.; MOTA I. Antigenic cross-reactivity of venoms from medically important Loxosceles (Araneae) species in Brazil. **Toxicon.** V.32, p.113-20, 1994.

BARBARO K.C.; FERREIRA M.L; CARDOSO D. F.; EICKSTEDT V. R; MOTA I. Identification and neutralization of biological activities in the venoms of Loxosceles spiders. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.29, p.1491-1497, 1996.

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

BARRETT, S.M., ROMINE-JENKINS, M., BLICK, K.E. Passive hemagglutination inhibition test for diagnosis of brown recluse spider bite envenomation. **Clin. Chem**. 39, 2104–2107, 1993.

BARRETT, S.M., ROMINE-JENKINS, M., FISHER, D.E. Dapsone or eletric shock therapy of brown recluse spider envenomation? **Ann. Emerg. Med**. 24 (1), 21–25, 1994.

BERGE, N.; LOGANADANE, L. D.; VASSY, J. Adhesion-induced intracellular signalling in endothelial cells depends on the nature of the matrix. **Cell Adhes. Comm**., v.7, p.29-41, 1999.

BERTEAU, O., MULLOY, B. Sulfated fucans, fresh perspectives: structures, functions, and biological properties of sulfated fucans and an overview of enzymes active toward this class of polysaccharide. **Glycobiology;** 13, 6, 29-40, 2003

BOND, J. S., BEYNON, R. J. The astacin family of metalloendopeptidases. **Profein Science** 4:1247-1261, *1995.*

BORKKAN J.; GROSS E.; LUBIN Y.; ORYAN I. An outbreak of venomous spider bites in a citrus grove, **Ann. J. Trop. Med. Hyg.**,v. 52, p.228-230, 1995.

BLAND C.E., GINSBURG H., SILBERT J.E., METCALFE D.D. Mouse heparin proteoglycan. Synthesis by mast cell-fibroblast monolayers during lymphocyte-dependent mast cell proliferation**. J Biol Chem**;257:8661–8666, 1982.

BLACK, W.A.P. The seasonal variation in the combined L-fucose content of the common British laminariaceae and fucaceae. **J. Sci. Food Agr**., 5, 445-448, 1954.

BRADFORD, M. A. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of Protein–Dye binding, **Anal. Biochem.** v.72, p. 248–254, 1976.

BOUÇAS, R. I., TRINDADE, E. S., TERSARIO, I. L S., DIETRICH, C. P., NADER, H. B. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)-like fluorescence assay to investigate the interactions of glycosaminoglycans to cells. **Analytica chimica acta** 618; 218–226, 2008.

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

BÜCHERL, W. As aranhas. In **Invertebrados.**1ª ed., Edtart, São Paulo, 1972.

CHAVEZ-OLORTEGUI, C., ZANETTI, V.C., FERREIRA, A.P., MINOZZO, J.C., MANGILI, O.C., GUBERT, I.C. Elisa for the detection of venom antigens in experimental and clinical envenomation by Loxosceles intermedia spiders. **Toxicon** 36, 563–569, 1998.

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

CARDIN, A. D., WEINTRAUB, H.J. Molecular modeling of protein glycosaminoglycan interactions. **Arteriosclerosis**, 9(1):21-32, 1989.

CASU B., GUERRINI M., TORRI G. Structural and conformational aspects of the anticoagulant and anti-thrombotic activity of heparin and dermatan sulfate. **Curr Pharm Des;**10:939–949, 2004.

CHAIM, O.M.; SADE, Y.B.; da SILVEIRA, R.B.; TOMA, L.; KALAPOTHAKIS, E.,; CHAVEZ-OLORTEGUI, C.; MANGILI, O.C.; GREMSKI, W.; DIETRICH, C.P.; NADER, H.B.; VEIGA, S.S.; Brown spider dermonecrotic toxin directly induces nephrotoxicity. **Toxicology and applied pharmacology**, United States, v.221, p. 64-77, 2006.

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

CONRAD H.E. Heparin-Binding Proteins. San Diego, CA: Academic Press, 1998.

DA SILVA, P. H.; DA SILVEIRA, R. B.; APPEL, M. H.; MANGILI, C. O.; GREMSKI, W.; VEIGA, S. S. Brown spiders and loxoscelism. **Toxicon**, v.44, p.693-704 , 2004.

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

DA SILVEIRA R. B., CHAIM, O. M., MANGILI, O. C., GREMSKI, W., DIETRICH, C. P., NADER, H. B., VEIGA, S. S. Hyaluronidases in Loxosceles intermedia (Brown spider) venom are endo-b-N-acetylhexosaminidases hydrolases, **Toxicon** v. 49, p. 758-768, 2007a

DA SILVEIRA, R.B., PIGOZZO, R. B., CHAIM, O. M., APPEL, M. H., SILVA, D. T., DREYFUSS, J. L., TOMA, L., DIETRICH, C. P., NADER, H. B., VEIGA, S. S., GREMSKI, W. Two novel dermonecrotic toxins LiRecDT4 and LiRecDT5 from

Brown spider (Loxosceles intermedia) venom: from cloning to functional characterization, **Biochimie** v. 89, p. 289-300, 2007b

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

DE CASTRO, C. S., SILVESTRE, F. G., ARAÚJO, S. C., GABRIEL, M. Y., MANGILI O. C., CRUZ, I., CHAVEZ-OLORTEGUI, C., KALAPOTHAKIS, E. Identification and molecular cloning of insecticidal toxins from the venom of the brown spider Loxosceles intermedia, **Toxicon**, v. 44, p. 273-280, 2004.

DELACOUX, F.; FICHARD, A.; GEOURJON, C.; GARRONE, R.; RUGGIOERO, F. Molecular features of the collagen V heparin binding site. **J. Biol. Chem**., v.273, p.15069-15076, 1998.

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

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

DIETRICH, C. P.; DIETRICH, S. M. C. Eletrophoretic behaviour of acidic mucopolysacharides in dyamine buffers. **Anal Biochem**., v.70, p.645-647,1976.

DIETRICH C.P., PAIVA J.F., CASTRO R.A.B., CHAVANTE S.F., JESKE W., FAREED J. Structural features and anticoagulant activities of a novel natural low molecular weight heparin from the shrimp Penaeus brasiliensis. **Biochim Biophys Acta**;1428:273–283, 1999.

DIETRICH, C. P. A model for cell-cell recognition and control of cell growth mediated by sulfated glycosaminoglycans. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v.17, p.5-15, 1984.

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 Phaeophycea. **Plant Science**., v.108, p.143-153, 1995.

DONEPUDI, K. S., AHMED, K. A., STOCKS, R. M. S., NELSON, D., THOMPSON, J. W. Aural involvement in loxoscelism: Case report and literature review - **International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology,** 69, 1559—1561, 2005.

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**, v.38, p.265-285, 2000.

ELSTON, D.M. What's eating you? Loxosceles reclusa (brown recluse spider). Cutis 69, 91–95, 2002.

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.,** v.135, p.423-426, 1999.

ESCOUBAS, P., DIOCHOT, S., CORZO, G. Structure and pharmacology of spider venom neurotoxins. Biochimie 82: 893-907, 2000.

FAREED J., HOPPENSTEADT D.A., BICK R.L. An update on heparins at the beginning of the new millennium. **Semin Thromb Hemost**;26:5–18, 2000.

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

FISHER M. L. Levantamento das espécies de Loxosceles Heinecken and Lowe, 1832 no município de Curitiba, Paraná, Brasil**. Estudos de Biologia,** v.3, p.63-88, 1994.

FUTRELL, J. M.; Loxoscelism. **Am. J. Med. Sci**., v.304, p.261-267, 1992.

GAJARDO-TOBAR, R. Personal experience with loxoscelism **Mem. Inst. Butantan**, v.33, p.689-698, 1966.

Gandhi, N. S. The Structure of Glycosaminoglycans and their Interactions with Proteins. **Chem Biol Drug Des**; 72: 455–482, 2008.

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.** , v.174, p.90-99, 1976.

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.**, v.77, p.352-359, 1998.

GONÇALVES-de-ANDRADE, R.M.; TAMBOURGI, D.V. First record on *Loxoscleles laeta* (Nicolet, 1849) (Araneae, Sicariidae) in the West Zone of São Paulo City, São Paulo, Brazil, and considerations regarding its geographic distribution. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical,** Brasil, v.36, p.425-426, 1999.

GONZALEZ M, ALARCON B, CARRASCO L. Polysaccharides as antiviral agents: antiviral activity of carrageenan. **Antimicrobial Agents Chemother,** 31:1388-93, 1987.

GRISHIN, E. Polipeptide neurotoxins from spider vemons. **Eur.J.Biochem.**, v.264, p.276-280, 1999.

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

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, p. 96, 1983.

HOLT, C.E., DICKSON B.J. Sugar codes for axons? **Neuron**;46:169–172, 2005.

HOBBS, G.D., YEALY, D.M. Development of an acute swine model for Loxosceles envenomation. Vet. Hum. **Toxicon**. 36, 298–300, 1994

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

HOVINGH P., LINKER A. An unusual heparan sulfate isolated from lobsters (Homarus americanus). **J Biol Chem**;257:9840–9844, 1982.

HOVINGH P., LINKER A. Glycosaminoglycans in Anodonta californiensis, a freshwater mussel. **Biol Bull**;185:263–276, 1993.

HUNTER H. S.; CORY A. D.; SMITH M. L.; Necrotic arachnidism. **J Am Acad.Dermatol.**, v.44, p.561-73, 2001.

ISBISTER, G.K., WHITE, J. Clinical consequences of spider bites: recent advances in our understanding. Toxicon 43 (5), 477–492, 2004.

JACKSON R.L., BUSCH S.J., CARDIN A.D. Glycosaminoglycans: molecular properties, protein interactions, and role in physiological processes. **Physiol Rev**; 71:481–539, 1991.

JANG, J.H., HWANG, J.H., CHUNG, C.P., CHOUNG, P.H. Identification and kinetics analysis of a novel heparin-binding site (KEDK) in human tenascin-C. J Biol Chem 279:25562–25566, 2004.

JARVIS, R.M., NEUFELD, M.V., WESTFALL, C.T. Brown recluse spider bite to the eyelid. **Ophthalmology** 107 (8), 1492–1496, 2000.

KAKUDA TN. Pharmacology of nucleoside and nucleotide reverse transcriptase inhibitor-induced mitochondrial toxicity**. Clin Ther** ; 22:685-708, 2000.

KILLING, H. Zur biochemie der Meersalgen**. Z. Physiol. Chem**., 83,171-197, 1913.

KING JR., L.E. Brown recluse spider bites: stay cool. Letter to the, editor. **JAMA** 254 (20), 2895–2896, 1985.

KISILEVSKY R., ANCSIN J.B., SZAREK W.A., PETANCESKA S. Heparan sulfate as a therapeutic target in amyloidogenesis: prospects and possible complications. **Amyloid**;14:21–32, 2007.

KJELLÉN, L.; LINDAHL, U. Proteoglycans: structures and interations. **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**, v.678, p.467-476, 1981.

KUSMA, J., CHAIM, O.M., WILLE, A.C., FERRER, V.P., SADE, Y.B., DONATTI, L., GREMSKI, W., MANGILI, O.C., VEIGA, S.S. Nephrotoxicity caused by brown spider venom phospholipase-D (dermonecrotic toxin) depends on catalytic activity. **Biochimie.** 90(11-12):1722-36, 2008

LOMONTE, B., TARKOWSKI, A., BAGGE, U., HANSON, L. A. Neutralization of the cytolytic and myotoxic activities of phospholipases A2 from Bothrops asper snake venom by glycosaminoglycans of the heparin/heparan sulfate family. **Biochem Pharmacol**. 47(9):1509-18, 1994.

LANE, D. A. Heparin binding and neutralising proteins. In: LANE D. A., LINDAHL U, Heparin - Chemical and biological properties, clinical applications. **Edward Arnold Publishers.** London-UK. p.363-391, 1989.

LINHARDT R.J., AMPOFO S.A., FAREED J., HOPPENSTEADT D., FOLKMAN J., MULLIKEN J.B. Isolation and characterization of human heparin. **Biochemistry**;31:12441–12445, 1982.

LEE, S., LYNCH, K.R. Brown recluse spider (Loxosceles reclusa) venom phospholipase D (PLD) generates lysophosphatidic acid (LPA). **Biochem. J**. 391: 317-323, 2005.

LINDAHL, U.; KIDHOLT, K.; SPILLMANN, D.; KJELLÉN, L. More to “heparin” than anticoagulation**. Tromb. Res.** v.75, n.1, p1-32, 1994.

IOZZO R.V., SAN ANTONIO J.D. Heparan sulfate proteoglycans: heavy hitters in the angiogenesis arena**. J Clin Invest**;108:349–355, 2001.

LUCAS, S. Spiders in Brazil. **Toxicon,** v.26, p.759-772, 1988.

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 A Direct Cytotoxicity of *Loxosceles intermedia* (Brown Spider) Venon in Renal Tissue. **J. Histochem. Cytochem.**, v.52, p.455-467, 2004.

MACCHIAVELLO A. Cutaneous arachnidism or gangrenous spot of Chile. **Pub. Health Trop. Med.** 22: 425-466, 1947.

MÁLAQUE, C.M.S., CASTRO-VALENCIA, J.E., CARDOSO, J.L.C., FRANÇA, F.O.S., BARBARO, K.C., FAN, H.W. Clinical and epidemiological features of definitive and presumed loxoscelism in São Paulo, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop**. S, 62; 150 – 158, 2002.

MARCHETTI M, PISANI S, PIETROPAOLO V, SEGANTI L, NICOLETTI R, ORSI N. Inhibition of Herpes simplex virus infection by negatively charged and neutral carbohydrate polymers**. J Chemother**; 7:90-6, 1995.

MARTINEZ-VARGAS, A.Z. Loxoscelismo, um problema de salud en el Perú. **Bol. San. Panam.,** v.103, p.378-386, 1987.

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

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.**, v.3, p. 99, 1997.

MASTERS, E.J.. Loxoscelism. **N. Engl. J. Med**. 339 (6), 379, 1998.

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, p.373-387, 1998.

MAYNOR,M.L., MOON, R.E., KLITZMAN, B., FRACICA, P.J., CANADA, A. Brown recluse spider envenomation: a prospective trial of hyperbaric oxygen therapy. **Acad. Emerg. Med**. 4 (3), 184–192, 1997.

MEDEIROS, V. Síntese do HS antitrombótico em células endoteliais: Interação da heparina e fucana A da alga Spatoglossum schröederi com a matriz extracelular e vias de sinalização associadas. Tese de Doutorado, UNIFESP, 2008.

MELO, P.A., HOMSI-BRANDEBURGO, M.I., GIGLIO, J.R., SUAREZ-KURTZ, G. Antagonism of the myotoxic effects of Bothrops jararacussu venom and bothropstoxin by polyanions. Toxicon. 3:285-91, 1993.

MEREDITH, J.E. Jr.; SCHWARTZ, M.A. The extracellular matrix as a cell survival factor. **Mol. Biol. Cell.,** v.4, p.953-961, 1993.

MULLOY, B., RIBEIRO, A.C., ALVES, A.P., VIEIRA, R.P., AND MOURAO, P.A.S. Sulfated fucans from echinoderms have a regular tetrasaccharide repeating unit defined by specific patterns of sulfation at the O-2 and O-4 positions. **J. Biol. Chem**., 269, 22113-22123, 1994.

NADER H.B., CHAVANTE S.F., DOS-SANTOS E.A., OLIVEIRA F.W., DE-PAIVA J.F., JERÔNIMO S.M.B. Heparan sulfates and heparins: similar compounds performing the same functions in vertebrates and invertebrates? **Braz J Med Biol** Res;32:529–538, 1999.

NADER, H.B. PINHAL M.A.S., BAÚ E.C., CASTRO R.A.B., MEDEIROS G.F., CHAVANTE S.F., LEITE E.L., TRINDADE E.S., SHINJO S.K., ROCHA H.A.O., TERSARIOL I.L.S., MENDES A., DIETRICH C.P. Development of new heparin-

like compounds and other antithrombot drugs and their interaction with vascular endothelial cells**. Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 34: 699-709, 2001.

NICHOLSON G. M.; GRAUDINS A. Antivenoms for the treatment of spider envenomation. **J. Toxicol. Tox.**, v.22, p.35-59, 2003.

Nishioka, S.A., Misdiagnosis of brown recluse spider bite**. West. J. Med**. 174, 240, 2001.

OSPEDAL, K.Z., APPEL, M.H., NETO, J.F., MANGILI, O.C., VEIGA, S.S., GREMSKI, W. Histopathological findings in rabbits after experimental acute exposure to the Loxosceles intermedia (brown spider) venom. Int. J. Exp. Pathol. 84, 287–294, 2002.

OSTERHOUDT, K.C., ZAOUTIS, T., ZORC, J.J. Lyme disease masquerading as brown recluse spider bite. **Ann. Emerg. Med**. 39, 558–561, 2002.

OTOTANI N., KIKUCHI M., YOSIZAWA Z. Comparative studies on the structures of highly active and relatively inactive forms of whale heparin**. J Biochem**; 90:241–246, 1981.

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

PALUDO, K.S.; GREMSKI, L.H.; VEIGA, S.S.; CHAIM, O.M.; GREMSKI, W.; de Freitas BUCHI; NADER, H.B.; DIETRICH, C.P.; FRANCO, C.R.C. The effect of Brown spider venom on endothelial cell morphology and adhesive structures. **Toxicon**, v.47, p. 844-853, 2006.

PATEL, K.D., MODUR, V., ZIMMERMAN, G.A. The necrotic venom of the brown recluse spider induces dysregulated endothelial cell-dependent neutrophil activation: differential induction of GM-CSF, IL-8, and E-selectin expression. **J. Clin. Invest**. 94, 631–642, 1994.

PERCIVAL, E. G. V., MC DOWELL, R. H. Chemistry and enzymology of marine algal polysaccharides. **London: Academic Press**, p.219, 1967.

PERCIVAL, E.G.V. AND ROSS, A.G. The isolation and purification of fucoidin from brown seaweeds. **J. Chem. Soc**., 717-720, 1950.

PEREIRA, M.S., MULLOY, B., AND MOURAO, P.A.S. Structure and anticoagulant activity of sulfated fucans**. J. Biol. Chem**., 274, 7656-7667, 1999.

PHILLIPS, S., KOHN, M., BAKER, D., VANDER LEEST, R., GOMEZ, H., MCKINNEY, P., MCGOLDRICK, J., BRENT, J. Therapy of brown spider envenomation: a controlled trial of hyperbaric oxygen, dapsone, and cyproheptadine. **Ann. Emerg. Med.** 25 (3), 363–368, 1995.

PEJLER G., DANIELSSON A., BJORK I., LINDAHL U., NADER H.B., DIETRICH C.P. Structure and antithrombin-binding properties of heparin isolated from the clams Anomalocardia brasiliana and Tivela mactroides. **J Biol Chem**;262:11413–11421, 1987.

RADEMACHER T.W., PAREKH R.B., DWEK R.A. Glycobiology. **Annu Rev Biochem**; 57:785–838, 1988.

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

REES, R.S., ALTENBERN, D.P., LYNCH, J.B., KING JR., L.E.. Brown recluse spider bites: a comparison of early surgical excision versus dapsone and delayed surgical excision. **Ann. Surg.** 202 (5), 659–663, 1985.

REES, R.S., CAMPBELL, D., RIEGER, E., KING JR., L.E. The diagnosis and treatment of brown recluse spider bites. **Ann. Emerg. Med**. 16 (9), 945–949, 1987.

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. Tese Doutorado em Biologia Molecular– Escola Paulista de Medicina, Universidade Federa de São Paulo. Natal, 2002.

ROCHA, H. A, Moraes F. A., Trindade, E. S., Franco, C. R.C., Torquato, R. J. S., Veiga, S. S., Valente, A. P., Moura P. A. S., Leite, E. L., Nader, H. B., Dietrich C. P. Structural and Hemostatic Activities of a Sulfated Galactofucan fromthe Brown Alga Spatoglossumschroederi an ideal antithrombotic agent? **Journal of Bilogical Chemistry**, 280, 50, pp. 41278–41288, 2005.

ROCHA H. A.; MORAES F. A.;. TRINDADE E. S.; 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 schroederi*. An ideal antithrombotic agent? **J. Biol. Chem.,** v.280, p.41278-41288, 2006.

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, p.840-845, 2002.

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

SAKASHITA S, ENGVALL E, ROUSLAHTI E. Basement membrane glycoprotein laminin binds to heparin. **FEBS Lett** 116:243–246, 1980.

SAMPAIO, L.O., TERSARIOL, I.L.S., LOPES, C.C., BOUCAS, R.I., NASCIMENTO, F.D., ROCHA, H.A.O., NADER, H.B.Heparins and heparan sulfate. Structure, distribution and protein interactions. In: Verli H, editor. Insights into carbohydrate structure and biological function. Kerala, India:**Transworld Research Network**. pp 1–24, 2006.

SAMS, H. H.; DUNNICK, C. A.; SMITH, M. L.; KING, E. L.; Necrotic Arachnidism. **J. Am. Acad. Dermatol.** v.44, p.561-573, 2001.

SANDIDGE, J.S. Arachnology: scavenging by brown recluse spiders. **Nature,** 426, 6962, 2003.

SASAKI, T., FASSLER, R., HOHENESTER, E. Laminin: The crux of basement membrane assembly. **J Cell Biol** 164:959–963, 2004.

SCHENONE, H.; LETONJA, T. Notas sobre la biologia y distribuicion geográfica de las aranas del gênero Loxosceles. **Bol. Chil. Parasitol.** ,v.30, p.27-29, 1975.

SCHIENLE, A., SCHÄFER, A., WALTER, B., STARK, R., VAITL, D. Brain activation of spider phobics towards disorder-relevant, generally disgust- and fear-inducing pictures. **Neurosci. Lett**. 388: 1-6, 2005.

SEZERINO U. M; ZANNIN M.; COELHO L. K; GONÇALVES JÚNIOR J.; GRANDO M.; MATTOSINHO S. G.; CARDOSO J. L. C.; von EICKSTEDT V. R.; FRANÇA F. O.; 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.,** v. 92, p.546-548, 1998.

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. Biophy. Acta,** v.1497, p.127-134, 2000.

SOERENSEN, B. Acidentes por animais peçonhentos: reconhecimento, clínica e tratamento. **Editora Atheneu**, 1996.

SWANSON, D.L., VETTER, R.S. Medical progress: bites of brown recluse spiders and suspected necrotic arachnidism. **N. Engl. J. Med**. 352 (7), 700–707, 2005.

SWANSON, D. L., VETTER, R. S. Loxoscelism. **Clin, Dermat,** v. 24, p. 213-221, 2006.

TARSIO JF, REGER LA, FURCHT LT. Decreased interaction of fibronectin, type IV collagen,and heparin due to nonenzymatic glycation. Implications for diabetes mellitus. Biochemistry 26:1014–1020, 1987.

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**., v.155, p.4459-4466, 1995.

TJONG, S.C., CHEN, T.S., HUANG, W.N., WU, W.G. Structures of heparin-derived tetrasaccharide bound to cobra cardiotoxins: heparin binding at a single protein site with diverse side chain interactions. **Biochemistry**. 4;46(35):9941-52, 2007

TRINDADE, E. S., OLIVER, C., JAMUR, M. C., ROCHA, H. A. O., FRANCO, C. R. C., BOUÇAS, R. I., JARROUGE, T. R., PINHAL, M. A. S., TERSARIOL, I. L. S., GOUVEIA, T. C., DIETRICH, C. P., NADER, H. B. The Binding of Heparin to the Extracellular Matrix of Endothelial Cells Up-Regulates the Synthesis of a Antithrombotic Heparan Sulfate Proteoglycany. J. Cell. Physiol. 217: 328–337, 2008.

TSAI, P.L., CHEN, C.H., HUANG. C,J., CHOU, C.M., CHANG, G.D. Purification and cloning of an endogenous protein inhibitor of carp nephrosin, an astacin metalloproteinase. **J Biol Chem**, 279(12):11146-11155, 2004.

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.

VASSEUR, E. Chemical studies on the jelly coat of the sea-urchin egg. **Acta Chem. Scand.**, 2, 900-913, 1948.

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.,** v.272, p.12529-12535, 1997.

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,** v.37, p.587-607, 1999.

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

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.** v.102, p.229-237, 2001a.

VEIGA, S.S.; ZANETTI, V.C.; BRAZ, A.; MANGILI, O.C.; GREMSKI, W. Extracellular matrix molecules as targets for brown spider venom toxins. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 34, p. 843-850, 2001b.

VETTER R. S.; VISCHER P. K. Bites and stings of medically important venomous arthropods. **Int. J. Dermatol.,** v.38, p.481-496, 1998.

VETTER, R.S.. Identifying and misidentifying the brown recluse spider. **Dermatol. Online J**. 5, 7, 1999.

VETTER, R.S. Myth: idiopathic wounds are often due to brown recluse or other spider bites throughout the United States. **West. J. Med**. 173, 357–358, 2000.

VETTER, R.S., BARGER, D.K. An infestation of 2,055 brown recluse spiders (Araneae:Sicariidae) and no envenomation in a Kansas home: implications for bite diagnoses in nonendemic areas. **J. Med. Entomol**. 39, 948–951, 2002.

VETTER, R.S., BUSH, S.P. Chemical burn misdiagnosed as brown recluse spider bite. **Am. J. Emerg. Med**. 20, 68–69, 2002.

VETTER, R.S., CUSHING, P.E., CRAWFORD, R.L., ROYCE, L.A.. Diagnoses of brown recluse spider bites (loxoscelism) greatly outnumber actual verifications of the spider in four western American states. **Toxicon** 42, 413–418, 2003.

VILELA-SILVA, A.C., ALVES, A.P., AND VALENTE, A.P. Structure of the sulfated a-L-fucan from the egg jelly coat of the sea urchin Strongylocentrotus franciscanus: patterns of preferential 2-O- and 4-O-sulfation determine sperm cell recognition. **Glycobiology**, 9, 927-933, 1999.

WARDA M., MAO W., TOIDA T., LINHARDT R.J. Turkey intestine as a commercial source of heparin? Comparative structural studies of intestinal avian and mammalian glycosaminoglycans. **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol**;134:189–197, 2003.

WARDA M., GOUDA E.M., TOIDA T., CHI L., LINHARDT R.J. Isolation and characterization of raw heparin from dromedary intestine: evaluation of a new source of pharmaceutical heparin. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol;**136:357–365, 2003.

WENDELL, R.P. Brown recluse spiders: a review to help guide physicians in nonendemic areas. **South. Med. J**. 96 (5), 486–490, 2003.

WIERZBICKA-PATYNOWSKI, I., SCHWARZBAUER, J. E. The ins and outs of fibronectin matrix assembly. **J Cell Sci** 116:3269–3276, 2003.

WITVROUW M, DECLERQ E. Sulfated polysaccharides extracted from sea algae as potential antiviral drugs. **Gen Pharmacol**;29:497-511, 1997.

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.,** v.4, p. 1577-1590, 1990.

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,** v.39, p.391-400, 2001.

YIANNIAS, J.A., WINKELMANN, R.K.. Persistent painful plaque due to a brown recluse spider bite. Cutis 50, 273–275, 1992.

DEMO VERSION

This file was created with the DEMO VERSION of CAD-KAS PDFs 2 One. This is the reason why this file contains this page.

The order the full version please visit our website under http://www.cadkas.com

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo