

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Bioquímica e Imunologia

Arthur Estanislau Dantas

**Peçonha bruta de *Loxosceles similis*
(Moenkhaus, 1898) ativa uma via
apoptótica dependente de caspases
em fibroblastos dérmicos humanos**

Belo Horizonte
Minas Gerais – Brasil

2013

Arthur Estanislau Dantas

**Peçonha bruta de *Loxosceles similis*
(Moenkhaus, 1898) ativa uma via
apoptótica dependente de caspase
em fibroblastos dérmicos humanos**

Dissertação apresentada ao programa de
pós-graduação em Bioquímica e Imunologia
da Universidade Federal de Minas Gerais,
como requisito parcial para a obtenção do
título de mestre em Bioquímica e Imunologia.

Área de concentração: Bioquímica

Orientador: Dawidson Assis Gomes

Co-orientador: Evanguedes Kalapothakis

Belo Horizonte – MG

2013



ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE ARTHUR ESTANISLAU DANTAS. Aos treze dias do mês de dezembro de 2013 às 09:00 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da dissertação de Mestrado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "Veneno bruto de *Loxosceles similis* ativa uma via apoptótica dependente de caspases em fibroblastos dérmicos humanos", requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia, área de concentração: Bioquímica. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Dawidson Assis Gomes, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dra. Camila Dias Lopes (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dra. Liza Figueiredo Felicori Vilela (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dra. Evanguedes Kalapothakis-co-orientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dra. Dawidson Assis Gomes - Orientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado. Pelas indicações o candidato foi considerado APROVADO. O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 13 de dezembro de 2013.

Dra. Camila Dias Lopes (UFMG)

Dra. Liza Figueiredo Felicori Vilela (UFMG)

Dra. Evanguedes Kalapothakis-co-orientador (UFMG)

Dra. Dawidson Assis Gomes - Orientador (UFMG)

Agradecimentos

Início os agradecimentos utilizando uma frase que ouvi de uma colega ao final da minha graduação que confirmou algo que eu sempre soube: “Nossa Arthur, você deu muita sorte, só teve bons orientadores durante a faculdade”. Portanto, agradeço a vocês meus orientadores por se tornarem para mim o exemplo que pretendo seguir durante toda a minha carreira no mundo acadêmico.

Obrigado prof. Dawidson Gomes pela orientação, paciência, amizade, por todos os ensinamentos que contribuíram imensamente para meu crescimento tanto pessoal quanto profissional e por sempre me incentivar a correr atrás das minhas ideias e sonhos.

Agradeço também ao prof. Evanguedes Kalapothakis por ter me aberto as portas do seu laboratório ainda no primeiro período, me iniciado no mundo da ciência, me apresentado essa área maravilhosa das toxinas e por todos os conselhos e ensinamentos ao longos de todos esse anos.

Aos meus amigos de LICM, tanto os “Dawidsonianos” quanto os “Alfredianos” obrigado pelas ajudas nos experimentos, pelas resoluções de dúvidas nos protocolos, pelas ajudas nas diluições seriadas e regras de três, por ligar a UV do fluxo cedo e obviamente obrigado por tornar esses dois anos mais fáceis e tranquilos sempre com uma boa conversa, uma dancinha engraçada ou um bom almoço para distrair e relaxar.

Agradeço também ao pessoal do LBMM, principalmente à “velha guarda” e especialmente à Carol Horta por estar sempre disposta a discutir resultados, me passar alíquotas de veneno ou sugerir novos experimentos ou ideias.

Obrigado ao departamento de Bioquímica e Imunologia e ao programa de pós-graduação em Bioquímica e Imunologia e a toda a sua equipe pelas aulas, conhecimento e oportunidade de realizar o mestrado.

Agradeço às agências de fomento CAPES, CNPq, FAPEMIG e National Institutes of Health (NIH) pelo apoio financeiro.

Fico grato também aos membros da banca por terem aceito o convite e por fornecerem contribuições relevantes para este trabalho.

Por último agradeço aos meus pais e irmãos que me forneceram a formação humana necessária, me ensinaram que sempre devo correr atrás do que desejo e por todo o apoio ao longo de todos esses anos de estudo, seja no colégio, seja na UFMG o apoio e incentivo sempre incondicional de vocês foi preponderante para que eu pudesse chegar onde cheguei.

Sumário

Lista de símbolos e abreviaturas	VIII
Lista de figuras.....	X
Lista de tabelas.....	XI
Resumo.....	XII
Abstract	XIII
1. Introdução.....	2
1.1 Aranhas do gênero <i>Loxosceles</i>	2
1.2. Loxoscelismo	4
1.2.1 Diagnóstico e tratamento do loxoscelismo.....	7
1.3 Peçonhas de aranhas do gênero <i>Loxosceles</i>	8
1.3.1 Componentes principais da peçonha.....	8
1.3.2 Esfingomielinase D: características bioquímicas.....	13
1.4 Mecanismos de morte celular.....	16
1.4.1 Definição de apoptose	17
1.4.1.1 Caspases.....	19
1.4.2 Definição de necrose.....	22
2. Objetivos	25
2.1 Objetivo geral	25
2.2 Objetivos específicos.....	25
3. Materiais e métodos:	27
3.1 Obtenção da peçonha bruta da aranha <i>L. similis</i>	27
3.2 Quantificação de proteínas	27
3.3 Resolução eletroforética em gel SDS-PAGE	27
3.4. Isolamento e cultivo dos fibroblastos	28
3.5 Ensaio de MTT	30
3.6 Microscopia de Fluorescência para determinação de apoptose	31
3.7 Citometria de fluxo para determinação de apoptose	32
3.8 Citometria de fluxo para análise da atuação de caspases no processo de apoptose ...	33
3.9 Microscopia de Fluorescência para detecção de caspase-3 ativa.....	35
3.10 Análise estatística.....	36
4. Resultados	38
4.1 Perfil eletroforético da peçonha	38

4.2 Fibroblastos tratados com o veneno bruto mostraram diminuição do metabolismo de MTT.	39
4.3 O EC50 do veneno em fibroblastos humanos foi de 40 µg/mL.....	41
4.4 Tratamento com a peçonha bruta induz uma resposta apoptótica.	42
4.5 A inibição das caspases -4, -6 e -9 reduz a porcentagem de células em apoptose.....	46
4.6 A peçonha bruta também ativa as caspases-3 e -7.....	50
5. Discussão e conclusões	52
6. Referências bibliográficas.....	60
7. Anexos	85

Lista de símbolos e abreviaturas

SmaseD	Esgingomielinase D
C1P	Ceramida 1-fosfato
LPC	Lisofosfatidilcolina
LPA	Ácido lisofosfatídico
LPI	18:1-1 –oleoil-lisofosfatidilserina
LPG	18:1 ácido 1-oleoil-lisobisfosfatídico
PLD	Lisofosfolipase D
IAPs	Proteínas inibidoras de apoptose
Apaf-1	Fator ativador da apoptose-1
ATP	Adenosina trifosfato
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
SDS	Dodecil sulfato de sódio

TEMED	Tetramethylethylenediamine
PSA	Persulfato de Amônia
DMEM	Meio modificado de Dulbecco
PBS	Tampão salina fosfato
SFB	Soro fetal bovino
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difeniltetrazol brometo
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético

Lista de figuras

- | | |
|-----------------|--|
| Figura 1 | A aranha <i>Loxosceles</i> |
| Figura 2 | Vias de ativação de caspases |
| Figura 3 | Perfil eletroforético da peçonha |
| Figura 4 | O tratamento com a peçonha bruta de <i>L. similis</i> altera a viabilidade celular em culturas de fibroblastos. |
| Figura 5 | O EC50 do efeito da peçonha de <i>L. similis</i> em fibroblastos humanos é 40 µg/mL. |
| Figura 6 | Marcação com YO-PRO-1 indica que o tratamento com a peçonha de <i>L. similis</i> induz apoptose em fibroblastos. |
| Figura 7 | Marcação com anexina V-FITC confirma que o tratamento com a peçonha de <i>L. similis</i> induz apoptose em fibroblastos. |
| Figura 8 | A inibição das caspases-4, -6, -9 diminui a quantidade de células apoptóticas. |
| Figura 9 | O tratamento com a peçonha de <i>L. similis</i> ativa as caspase-3 e -7. |

Lista de tabelas

Tabela 1	Atividades enzimáticas de peçonhas de aranhas <i>Loxosceles</i> .
Tabela 2	Sequência de aminoácidos dos inibidores de caspase utilizados neste trabalho.

Resumo

Aranhas do gênero *Loxosceles* representam um risco para a saúde humana, devido aos efeitos necróticos e sistêmicos de sua picada. Os sintomas do envenenamento com as aranhas marrons variam de dermonecrose na maioria dos casos a hemólise sistêmica e coagulopatia, levando à falência renal aguda na minoria dos acidentes. Ao contrário dos efeitos sistêmicos, que já são bem caracterizados, os mecanismos de morte celular induzidas pela peçonha das aranhas marrons, ainda não são tão bem descritos na literatura. Existem evidências de que células tratadas com a peçonha iniciam uma resposta apoptótica, mas nenhuma via de apoptose foi caracterizada. No presente trabalho estudamos as caspases ativadas durante o processo de apoptose iniciado *in vitro* pela peçonha de *Loxosceles similis* em fibroblastos humanos. Utilizando o teste de metabolização de MTT, verificamos que dentre todas as linhagens testadas, apenas fibroblastos primários foram susceptíveis à ação da peçonha. Através das técnicas de microscopia de fluorescência e de citometria de fluxo, verificamos que fibroblastos humanos tratados com a peçonha iniciam uma resposta apoptótica. Fazendo uso ainda da citometria de fluxo, verificamos que a inibição das caspases-9, 6 e 4 influenciaram no curso do processo apoptótico, diminuindo a marcação para anexina V-FITC em relação ao grupo tratado apenas com a peçonha. Por fim, utilizando a microscopia de fluorescência mostramos que as caspases efetoras 3 e 7 também são ativadas durante o processo.

Abstract

Spiders from the *Loxosceles* genus represent a risk to human health due to the systemic and necrotic effect of their bite. The symptoms of envenomation with the brown spiders may vary from dermonecrosis in the majority of cases to coagulopathy and hemolysis leading to acute renal failure. Even though the systemic effects are well characterized, the cell death mechanisms triggered by the venom of the brown spiders are still not well described in literature. There is evidence in literature that many cells treated with the venom enter in an apoptotic process, however the triggering of this response is not well comprehended. In the present study we assessed the caspases activated during the process of apoptosis begun *in vitro* by the *Loxosceles similis*' venom. Using the test of MTT metabolization, we verified that among all tested cell lines, only primary fibroblasts were affected by the brown spider's venom. We demonstrate using fluorescence microscopy and flow cytometry that human fibroblasts treated with the whole venom started an apoptotic response. Furthermore, using flow cytometry we verified that the inhibition of caspases-4, -6 and -9 decreased the percentage of cells labeled with the apoptosis marker annexin V-FITC. Ultimately, by fluorescence microscopy we could observe that the effectors caspases-3 and -7 are also activated during the process.

1. Introdução

1. Introdução

1.1 Aranhas do gênero *Loxosceles*

As aranhas do gênero *Loxosceles* pertencem à família Sicariidae, ordem araneomorpha. Atualmente existem 105 espécies do gênero *Loxosceles* descritas (Platnick, 2013). As aranhas desse gênero são popularmente conhecidas como aranhas marrons, devido à sua coloração variada de tons dessa cor. Podem ser chamadas também de aranhas-violino, por possuírem em seu cefalotórax uma mancha no formato desse instrumento. Elas medem, em média, de 2 a 3 cm de perna a perna e possuem três pares de olhos (Figura 1) (Futrell, 1992; Hogan *et al.*, 2004).



Figura 1: A aranha *Loxosceles*. À esquerda, aranha *Loxosceles similis* coletada na Gruta da Lapinha, Lagoa Santa, Minas Gerais (Foto: Anderson do Carmo, arquivo pessoal). À direita, vista anterior da aranha *Loxosceles reclusa*, com destaque à configuração de seis olhos dispostos em três díades (Fonte: Vetter & Visscher, 1998).

Elas apresentam hábitos de vida noturnos, não agressivos e são animais sedentários. Alimentam-se de pequenos insetos, , podem viver de 3 a 7 anos e são capazes de permanecer meses em ambientes com privação de água e alimentos. Elas ocupam uma grande variedade de habitats, tanto urbanos quanto naturais, são capazes de viver debaixo de pedras, troncos, interior de cavernas, buracos de árvores e locais áridos ou moderadamente úmidos. Nesses locais, elas constroem suas teias irregulares e aguardam a presa. As construções humanas também são habitats favoráveis para essas aranhas, celeiros, garagens, viveiros e galpões apresentam condições que beneficiam o modo de vida desses animais. Em residências elas são encontradas embaixo de móveis, atrás de quadros, frestas no chão e dentro de armários e gavetas (Gertsch, 1967; Galiano & Hall, 1973; Futrell, 1992).

As aranhas marrons estão distribuídas tanto regiões temperadas quanto em regiões tropicais, principalmente nas Américas e na África. Mas podem ser encontradas também na Europa, Oceânia e Ásia. No Brasil as seguintes espécies são encontradas: *L. gaucho* (Gerstch, 1967), *L. laeta* (Nicolet, 1849) e *L. intermedia* (Mello-Leitão, 1934) são as principais causadoras de acidentes, mas há também *L. adalaida* (Gerstch, 1967), *L. amazonica* (Gerstch, 1967), *L. anomala* (Mello-Leitão, 1917), *L. chapadensis* (Bertani, Fukushima & Nagahama, 2010) *L. puortoi* (Martins, Knysak & Bertani, 2002) e *L. similis* (Moenkhaus, 1898) (Platnick, 2013).

Em Minas Gerais, há registros de *L. similis*, *L. laeta*, e *L. anomala* (Gertsch, 1967; Álvares *et al.*, 2004; Machado *et al.*, 2005). Machado *et al.* (2005) relataram a presença dessas três espécies em Belo Horizonte sendo este o primeiro registro de *L. similis* em residências em área urbana. Até então,

essa espécie era encontrada somente no interior de Minas Gerais e em grutas nas redondezas de Belo Horizonte (Ferreira *et al.*, 2000, 2005). Além disso, Andrade *et al.* (2001) capturaram espécimes de *L. similis* em grutas do Estado do Mato Grosso do Sul.

Assim, após diversos registros da aranha *L. similis* em ambientes antrópicos, estudos mais profundos do mecanismo de ação de seu veneno torna-se fundamental.

1.2. Loxoscelismo

Acidentes causados por aranhas do gênero *Loxosceles* provocam sinais clínicos e sintomas característicos e são denominados loxoscelismo. Segundo o Ministério da Saúde (2013), em 2010, houve 23668 casos de acidentes por aranhas registrados no Brasil. Existem apenas três gêneros de relevância médica no país, sendo eles os gêneros *Loxosceles*, *Phoneutria* e *Latrodectus*, sendo que o primeiro é responsável por cerca de 50% do casos em que a aranha causadora é identificada, segundo o Ministério da Saúde.

Na região sudeste, São Paulo é o estado que notifica o maior número de casos de acidentes por aranhas. No Brasil, os estados com maior número de acidentes são respectivamente Paraná e Santa Catarina (Marques-da-Silva & Fischer, 2005; Ministério da Saúde, 2013). O loxoscelismo é predominante na região metropolitana de Curitiba, com cerca de 2000 a 3000 casos por ano (Málaque *et al.*, 2002).

As aranhas-marrons são tipicamente animais inofensivos, picam apenas quando são comprimidas contra o corpo. Por isso, os acidentes domésticos

envolvendo esses animais ocorrem comumente quando a aranha está presente nas roupas ou calçados vestidos pela vítima, ou quando a pessoa está dormindo. Em Curitiba, dos 1,5 casos por 1000 habitantes registrados entre 1993 e 2006, 20,1% das picadas ocorreram na coxa, 15,7% no tronco, 12% no braço e 18,4% da perna da vítima. Os acidentes são mais frequentes nos meses mais quentes do ano, havendo um número muito maior de casos entre outubro e fevereiro em relação ao resto do ano (Málaque *et al.*, 2002; Dyachenko e Rozenman, 2006; Secretária Municipal de Saúde de Curitiba, 2006; Diaz e Leblanc, 2007).

Como a picada das aranhas-marrons é indolor no momento da picada e os primeiros sinais e sintomas se manifestam apenas algumas horas após o acidente, a vítima na maioria dos casos não é capaz de capturar ou identificar o animal, assim, o diagnóstico do loxoscelismo torna-se complicado, fazendo com que os casos não sejam corretamente notificados pelas autoridades. A picada é geralmente confundida com infecções cutâneas bacterianas ou virais, dermatites, vasculites ou úlcera diabética (Isbister & Vetter, 2005).

O primeiro sintoma é uma dor aguda de grau variado, que pode ocorrer dentro de 2 a 8 horas após a picada, podendo progredir para uma sensação de queimadura. Em até 24 horas, o local da picada fica cercado por eritema e edema, em casos de severidade moderada e grave, as lesões progridem para necrose em 48 a 72 horas. A necrose apresenta como sinais iniciais hiperestesia, formação de bolha de conteúdo hemorrágico, endureção e cianose, gerando uma úlcera vermelho-azulada, dolorosa e coberta por escara, circundada por um halo de isquemia e vasoconstrição. O aumento da área da necrose pode ocorrer por espalhamento gravitacional, dependendo de onde

ocorreu a picada. A escara pode sair, deixando uma úlcera que podendo regredir em 6 a 8 semanas, porém alguns casos necessitam de enxerto. Febre e atralgia também podem acompanhar os sintomas descritos. Esse conjunto de sintomas é conhecido como loxoscelismo cutâneo e ocorre em 80% dos casos (Futrell, 1992; Andersen *et al.*, 2011; Málaque *et al.*, 2011).

Ocasionalmente, o quadro clínico progride para diarreia, vômito, febre, cefaleia, coagulopatias, hemólise, petéquia, trombocitopenia e urticária em 24 a 48 horas após a picada. Esta é uma complicação mais rara, denominada loxoscelismo cutâneo-hemolítico, que independe da severidade da lesão cutânea. Os sintomas característicos do loxoscelismo sistêmico são hemólise intra vascular, coagulação intravascular, em casos intensos de coagulação vascular, ocorre também uma falência renal aguda, esta sendo a principal causa de óbito. O percentual de morte pode chegar a 1,5% dos casos, sendo crianças e idosos os mais afetados (Schenone *et al.* 1989, 2001; Sezerino *et al.* 1998; Hogan *et al.*, 2004).

Os efeitos biológicos das picadas de aranhas do gênero *Loxosceles* variam dependendo tanto da espécie causadora do acidente, diferenças inter e intraespecíficas (sexo e idade da aranha), quanto da vítima (espécie, idade, presença de comorbidades, variabilidade genética, local da picada) (Barretto *et al.*, 1985; Sezerino *et al.*, 1998; de Oliveira *et al.*, 1999; Gonçalves de Andrade *et al.*, 1999; Dyachenko & Rozenman, 2006; Pauli *et al.*, 2006). O loxoscelismo sistêmico tem maior incidência em áreas onde a espécie *L. laeta* é predominante, como no Peru (27,2%), Chile (15,7%) e Santa Catarina, Brasil (13,1%) (Schenone *et al.*, 1989; Sezerino *et al.*, 1998; Abdulkader *et al.*, 2008).

1.2.1 Diagnóstico e tratamento do loxoscelismo.

Como citado anteriormente, a picada indolor da aranha marrom dificulta o diagnóstico e o tratamento do loxoscelismo. Como a vítima não sente a picada, a identificação da aranha geralmente não ocorre e como este é o primeiro passo para um diagnóstico conclusivo e o início do tratamento, um atraso de 24 a 48 horas para a procura por atendimento médico por parte da vítima é comum e isso pode aumentar a lesão e complicar o tratamento.

Para o diagnóstico sem a identificação do agente causador, os sintomas clínicos são avaliados associados a dados epidemiológicos da região do acidente. (Malaque *et al.*, 2002; Vetter, 2009). Diversos ensaios imunológicos já foram criados, porém nenhum desses métodos é disponibilizado comercialmente para diagnóstico, apesar de apresentarem potencial para aplicação clínica (Barret *et al.*, 1993; Chavez-Olórtegui *et al.*, 1998; Miller *et al.*, 2000; Krwyko & Gomez, 2002; McGlasson *et al.*, 2009).

Quanto ao tratamento, não existe consenso acerca do melhor esquema e há poucos estudos que comparem a eficácia das diversas intervenções indicadas (Pauli *et al.*, 2006; Manríquez & Silva, 2009; Ibister & Fan, 2011;).

O soro antiaracnídico ou é indicado a partir do momento em que a hemólise é detectada e, no quadro cutâneo, quando o diagnóstico é feito nas primeiras 72 horas; a limitação ao uso de antiveneno se deve ao diagnóstico tardio, muitas vezes realizado já com a necrose cutânea delimitada. Nesse caso, medidas de suporte, como uso de antissépticos, lavagem com permanganato de potássio (KMnO₄) 1:40.000 e curativos locais são recomendados

até ser realizada a remoção da escara e acompanhamento cirúrgico para o manejo da úlcera e correção da cicatriz (Ministério da saúde, 2010).

Existem outras terapias como oxigenoterapia hiperbárica, nitroglicerina tópica e eletrochoque, entretanto estes tratamentos apresentam resultados conflitantes e não são muito utilizados. O antiveneno é indicado em casos moderados e graves da lesão cutânea e com complicações sistêmicas. Para a forma cutâneo-visceral, também indica-se uma hidratação vigorosa, reposição de fluidos em casos de hemólise e coagulopatia e manejo da insuficiência renal aguda em casos mais severos. (Ministério da saúde, Fundação Nacional da saúde 2001; Málaque *et al.*, 2002; Monteiro *et al.*, 2002; da Silva *et al.*, 2004; Abulkader *et al.*, 2008; Manríquez & Silva, 2009; Andersen *et al.*, 2011).

1.3 Peçonhas de aranhas do gênero *Loxosceles*

1.3.1 Componentes principais da peçonha

As aranhas *Loxosceles* utilizam a peçonha como auxiliar na alimentação, paralisando insetos e também como mecanismo de defesa. A aranha injeta um total de aproximadamente 4 μ L, com variação de 30 a 100 μ g de proteínas dependendo da espécie (Forrester *et al.*, 1978; Sams *et al.*, 2001). As fêmeas produzem uma maior quantidade de veneno em relação aos machos e isso pode estar relacionado ao maior tamanho e peso das fêmeas. Além disso, o veneno das fêmeas ainda apresenta um potencial dermonecrótico maior em coelhos (De oliveira *et al.*, 1999).

As peçonhas dessas aranhas são uma complexa mistura de substâncias. As toxinas presentes na peçonha variam 5 a 850 KDa, sendo que as moléculas de 5 a 40 KDa predominam (Veiga *et al.*, 2000a). Transcriptomas das glândulas de veneno de *L. laeta* e *L. intermedia* mostram que 30,9% e 43,5% dos transcritos, respectivamente, são toxinas (Fernandes-pedrosa *et al.*, 2008; Gresmki *et al.*, 2010).

Considerando que a aranha tem como principal uso da sua peçonha a captura e paralisação de presas, que são em sua maioria insetos, era previsto que grande parte das toxinas expressas na glândula de veneno da espécie *L. intermedia* fosse de peptídeos com atividade inseticida. Em 2010, Zobel-Thropp *et al.* verificaram que a esfingomielinase D é capaz de paralisar a pata traseira de grilos causando sua total extensão, favorecendo a captura da presa. De Castro *et al.* (2004) isolaram três toxinas da peçonha da peçonha de *L. intermedia* LiTx1 (7,4 kDa) LiTx2 (7,9 kDa) e LiTx3 (5,6 kDa), tóxicas para larvas de *Spodoptera fugiperda*. Estudos de bioinformática mostraram que LiTx3 pode ter ação em canais para Na⁺, para as outras proteínas citadas os dados foram inconclusivos. Em 2006, outra toxina, até hoje não caracterizada, foi denominada LiTx4 (*GenBank* número DQ388598.1). Essa toxina possui alta similaridade com LiTx2, logo elas podem ter funções e estrutura semelhantes (Gresmki *et al.*, 2010).

Além das toxinas, o veneno também apresenta diversas enzimas. Essas proteínas também são compostos importantes no veneno de diversos animais, como abelhas, serpentes e aranhas (Rash & Hodgson, 2002). Várias enzimas já foram identificadas como constituintes das peçonhas de aranhas *Loxosceles*,

como mostrado na tabela 1, dentre elas estão hialuronidases, fosfatases alcalinas, proteases e lipases.

Tabela 1: Atividades enzimáticas de peçonhas de aranhas *Loxosceles*. Modificado de: Rash & Hodgson (2002); Da Silva *et al.* (2004).

Atividade enzimática	Aranha	Referências Bibliográficas
Hialuronidase	<i>L. rufescens</i> <i>L. laeta</i> <i>L. reclusa</i> <i>L. deserta</i> <i>L. intermedia</i> <i>L. gaucho</i>	Wright <i>et al.</i> , 1973; Geren <i>et al.</i> , 1976 Schenone & Suarez, 1978; Barbaro <i>et al.</i> , 2005 Geren <i>et al.</i> , 1976; Young & Pincus, 2001; Barbaro <i>et al.</i> , 2005 Barbaro <i>et al.</i> , 2005 Barbaro <i>et al.</i> , 2005; Da Silveira <i>et al.</i> , 2007c Barbaro <i>et al.</i> , 2005
Fosfatase alcalina	<i>L. reclusa</i>	Heitz & Norment, 1974; Geren <i>et al.</i> , 1976; Norment <i>et al.</i> , 1979
Esterase	<i>L. reclusa</i>	Wright <i>et al.</i> , 1973; Norment <i>et al.</i> , 1979
Lipase	<i>L. reclusa</i>	Norment <i>et al.</i> , 1979
Hidrolase	<i>L. reclusa</i>	Geren <i>et al.</i> , 1976; Norment <i>et al.</i> , 1979
ATPase	<i>L. reclusa</i> <i>L. laeta</i>	Geren <i>et al.</i> , 1976 Schenone & Suarez, 1978
5` ribonucleotídeo fosfohidrolase	<i>L. reclusa</i>	Geren <i>et al.</i> , 1976
Esfingomielinase D/Fosfolipase D	<i>L. intermedia</i> <i>L. gaucho</i> <i>L. laeta</i>	Tambourgi <i>et al.</i> , 1998a; Kalapothakis <i>et al.</i> , 2002, 2007; Araújo <i>et al.</i> , 2003; Barbaro <i>et al.</i> , 2005; Chaim <i>et al.</i> , 2006, 2011; Da Silveira <i>et al.</i> , 2006, 2007a; Felicori <i>et al.</i> , 2006; Appel <i>et al.</i> , 2008; Gremski <i>et al.</i> , 2010; De Giuseppe <i>et al.</i> , 2011; Gomes <i>et al.</i> , 2011 Cunha <i>et al.</i> , 2003; Barbaro <i>et al.</i> , 2005; Machado <i>et al.</i> , 2005b; Gomes <i>et al.</i> , 2011 Fernandes-Pedrosa <i>et al.</i> , 2002, 2008; Barbaro <i>et al.</i> , 2005; De Santi-Ferrara <i>et al.</i> , 2009;

	<i>L. similis</i> <i>L. reclusa</i> <i>L. deserta</i> <i>L. rufescens</i> <i>L. boneti</i> <i>L. arizonica</i> <i>L. adelaida</i>	Catalán <i>et al.</i> , 2011; Gomes <i>et al.</i> , 2011 Gomes <i>et al.</i> , 2011; Chatzaki <i>et al.</i> , 2012 Forrester <i>et al.</i> , 1978; Kurpiewski <i>et al.</i> , 1981; Rekow <i>et al.</i> , 1983; Rees <i>et al.</i> , 1988; Futrell, 1992; Merchant <i>et al.</i> , 1998; Ramos-Cerillo <i>et al.</i> , 2004; Barbaro <i>et al.</i> , 2005 Barbaro <i>et al.</i> , 2005 Young & Pincus, 2001 Ramos-Cerillo <i>et al.</i> , 2004 Binford <i>et al.</i> , 2005; Zobel-Thropp <i>et al.</i> , 2010 Pretel <i>et al.</i> , 2005
Proteases	<i>L. rufescens</i> <i>L. reclusa</i> <i>L. deserta</i> <i>L. intermedia</i> <i>L. gaucho</i> <i>L. laeta</i>	Young & Pincus, 2001 Eskafi & Norment, 1976; Jong <i>et al.</i> , 1979; Barbaro <i>et al.</i> , 2005 Barbaro <i>et al.</i> , 2005 Barbaro <i>et al.</i> , 1996, 2005; De Souza <i>et al.</i> , 1998; Feitosa <i>et al.</i> , 1998; Veiga <i>et al.</i> , 1999, 2000a,b; Da Silveira <i>et al.</i> , 2002, 2007b; Zanetti <i>et al.</i> , 2002; Gremski <i>et al.</i> , 2010; Trevisan-Silva <i>et al.</i> , 2010 Barbaro <i>et al.</i> , 1996, 2005; Barretto <i>et al.</i> , 2003; Trevisan-Silva <i>et al.</i> , 2010 Barbaro <i>et al.</i> , 1996, 2005; da Silveira <i>et al.</i> , 2002; Fernandes-Pedrosa <i>et al.</i> , 2008; Trevisan- Silva <i>et al.</i> , 2010

Hialuronidases, são enzimas que tem como principal substrato o ácido hialurônico que é um mucopolissacarídeo que é o principal constituinte da matriz extracelular. Essas enzimas já foram encontradas em venenos de diversas aranhas. Acredita-se, que as hialuronidases favoreçam a dispersão dos outros componentes do veneno por meio da hidrólise do tecido conectivo (Kreil, 1995; Rash & Hodgson, 2002; Girish & Kemparaju 2007; Girish *et al* 2009).

As proteases, tem sua presença na peçonhas das aranhas marrons questionada. Alguns autores defendem que a presença dessas enzimas aconteça devido à contaminação por fluidos digestivos no momento da extração do veneno, principalmente se essa extração ocorrer por eletrochoque (Rash & Hodgson, 2002). Entretanto, há trabalhos em que serino e metaloproteases foram encontradas em transcritos das glândulas de peçonha de *L. intermedia* e *L. laeta*, reforçando o fato de que tais enzimas realmente estão presentes nos venenos das aranhas marrons (Fernandes-Pedrosa *et al.*, 2008; Gremski *et al.*, 2010). As metaloproteases são endopeptidases que são capazes de clivar grande parte das moléculas da matriz extracelular, como laminina, colágeno e fibronectina, remodelando as estruturas dessas moléculas. Essas proteases também podem atuar em moléculas plasmáticas como fibrinogênio. As metaloproteases que atuam na matriz extracelular são compostas por gelatinases, colagenases, estromelisinases e outras metaloproteases (Kleiner & Stetler-Stevenson, 1993).

Além das metaloproteases, a peçonha das aranhas do gênero *Loxosceles* também possuem outro grupo de enzimas de amplo espectro de ação para moléculas plasmáticas e da matriz extracelular, as serinoproteases. Nesse grupo estão inclusas as enzimas trombina, plasmina, uroquinase e ativador de plasminogênio tecidual (Tang, 2001; Quattrocchi *et al.*, 2002). Nos estudos de transcriptomas das glândulas de peçonha de *L. intermedia* e de *L. laeta*, sequências similares a inibidores de serino/cisteonoproteases foram encontradas (Fernandes-Pedrosa *et al.*, 2008; Gremski *et al.*, 2010). Esses inibidores tem como provável função proteger as próprias toxinas proteicas contra as proteases da peçonha (Zupunski *et al.*, 2003).

Outro grupo de proteínas presente na peçonha das aranhas desse gênero são as proteínas com atividade esfingomielinásica, estas são tidas como o principal arsenal tóxico para humanos da peçonha das aranhas marrons. O principal componente da peçonha das aranhas *Loxosceles* é a Esfingomielinase D (de 32 a 35 kDa), essa proteína já foi caracterizada bioquímica e biologicamente. A essa proteína, se atribuem os principais efeitos tóxicos do loxoscelismo, como dermonecrose, hemólise, agregação plaquetária e morte em camundongos (Forrester *et al.*, 1978; Tambourgi *et al.*, 1995; 1998). Cerca de 16% e 20% das toxinas expressas nas glândulas de peçonha das aranhas *L. laeta* e de *L. intermedia* respectivamente, pertencem a esse grupo de enzimas (Fernandes-Pedrosa *et al.*, 2008; Gremski *et al.*, 2010).

Até o momento, não são conhecidos todos os componentes presentes nas glândulas de peçonha de aranhas do gênero *Loxosceles*. Por exemplo, 25% e 47% dos transcritos das glândulas das aranhas *L. laeta* e *L. intermedia*, respectivamente, possuem função desconhecida (Fernandes-Pedrosa *et al.*, 2008; Gremski *et al.*, 2010).

1.3.2 Esfingomielinase D: características bioquímicas.

Como mostrado anteriormente, a maioria das ações de peçonhas de aranhas *Loxosceles* são atribuídas a proteínas com atividade enzimática de esfingomielinase D (SmaseD). Esta enzima é encontrada em outros animais como na saliva de carrapato e veneno de escorpião (Alarcon-Chaidez *et al.* 2009; Borchani *et al.* 2011). Ela ainda é produzida por algumas bactérias

patogênicas, como *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Corynebacterium ulceran* e *Arcanobacterium hemolyticum*. A SmaseD de *C. pseudotuberculosis* possui 30% de similaridade com a enzima de *Loxosceles* e causa linfadenite em animais, é patogênica a humanos e apresenta efeitos fisiopatológicos semelhantes aos do loxoscelismo em modelos animais (Songer, 1997; Van meeteren *et al.*, 2004).

A enzima SmaseD é um tipo específico de fosfolipase D. Ela possui ação dependente de Mg^{2+} e converte esfingomielina em ceramida 1-fosfato (C1P, N-acil-esfingosina 1-fosfato) e colina. C1P é um componente da bicamada lipídica e aparentemente não perturba a estrutura da membrana plasmática, porém esse fato é controverso. Entretanto, células de mamíferos tratadas com essa enzima não convertem C1P em ceramida (Murakami *et al.*, 2005; Van Meeteren *et al.*, 2007; Stock *et al.*, 2012).

Com isso, foi criado um questionamento acerca da atividade biológica das enzimas SmaseD de Bactéria e de *Loxosceles*. Se a atividade das duas enzimas é diferentes, dúvidas sobre como a SmaseD de *Loxosceles* pode causar os efeitos fisiopatológicos foram então levantadas. Então, Van Meeteren *et al.*, (2004), Lee & Lynch (2005) realizaram diversos testes de especificidade de substrato. O primeiro demonstrou que a SmaseD recombinante de *L. laeta* e de *C. pseudotuberculosis* são capazes de converter lisofosfatidilcolina (LPC) ligada à albumina em ácido lisofosfatídico (LPA) e colina. O segundo estudo, demonstrou que a SmaseD recombinante de *L. reclusa* hidrolisa, além de LPC e esfingomielina, os lisofosfolipídeos LPI (18:1-1 –oleoil-lisofosfatidilserina), LPG (18:1 ácido 1-oleoil-lisobisfosfatídico, liso-fator ativador plaquetário (C_{16:0}) e ácido fosfatídico cíclico.

Devido ao amplo espectro de ação dessa enzima demonstrado nos estudos citados, foi sugerido, após o trabalho de Lee & Lynch (2005) que o nome da enzima SmaseD fosse substituída por lisofosfolipase D (PLD), tornando a enzima parte de um grupo mais amplo que poderia explicar melhor os efeitos desse grupo de toxinas dermonecroticas.

Apesar de a peçonha das aranhas do gênero *Loxosceles* ser bem caracterizada, os mecanismos que levam à morte das células tratadas com o veneno das aranhas desse gênero não é ainda bem conhecido. Este trabalho se propõe a estudar os mecanismos de morte celular causados pela peçonha da aranha *Loxosceles similis*, já que essa espécie é sinantrópica e encontrada em Minas Gerais e na região metropolitana de Belo Horizonte (Ferreira *et al.*, 2005; Machado *et al.*, 2005a).

Estudos já mostraram que a PLD de *Loxosceles* em queratinócito causa apoptose ligada a um aumento da expressão de metaloproteinase-2 e -9 (Paixão-Cavalcante, van den Berg, de Freitas Fernandes-Pedrosa, Gonçalves de Andrade, & Tambourgi, 2006), em eritrócitos ela gera produtos bioativos que estimulam o influxo de cálcio para o interior da célula por canais do tipo L e ainda é capaz de induzir lise celular após se associar diretamente ao C_{1q} e iniciar uma hemólise autóloga mediada via complemento (Chaves-Moreira *et al.*, 2011; Tambourgi *et al.*, 2007). Porém são poucos os estudos que investigaram os mecanismos de morte iniciados pela peçonha das aranhas marrons e seus componentes, portanto neste estudo buscamos conhecer melhor as vias de morte celular ativadas em fibroblastos tratados com o veneno da aranha *Loxosceles similis*.

1.4 Mecanismos de morte celular

Células que estão morrendo, estão em um processo reversível, até que um certo ponto irreversível seja alcançado, e ultrapassado (Kroemer et al., 2008). Esses pontos podem ser uma ativação massiva de caspases (Cohen *et al.*, 1997), perda do potencial de ação de membrana mitocôndrial (Green *et al.*, 1997), permeabilização completa da membrana externa da mitocôndria (Green, 2004) e exposição de resíduos de fosfatidilserina que emitem sinais para a fagocitose da célula. Entretanto, existem diversos exemplos de ativação de caspases que não levam a processos letais para a célula (Garrido & Kroemer, 2004; Galuzzi *et al.*, 2008), o potencial de membrana mitocôndrial pode ser dissipado sem que isso leve a um processo de morte instantânea (de Graaf, *et al.*, 2004) e a exposição de fosfatidilserina pode ser reversível (Yang, *et al.*, 2002).

Portanto, como não é possível estabelecer um ponto irreversível para o processo de morte celular, em 2009 o Comitê de Nomenclatura de Morte Celular, propôs que a célula deve ser considerada morta somente quando a célula perder a integridade da membrana celular, o que pode ser definido pela incorporação de certos corantes, quando a célula, incluindo seu núcleo, for completamente fragmentada em corpos distintos e/ou quando a célula ou seus fragmentos adjacentes sejam fagocitados por uma célula vizinha *in vivo* (Kroemer *et al.*, 2009). Neste trabalho analisamos dois tipos de morte celular em células tratadas com o veneno bruto de *L. similis*, a apoptose e a necrose.

1.4.1 Definição de apoptose

O termo apoptose, foi definido por Kerr *et al* (1972) para representar um aspecto definido de um tipo de morte celular. Morfologicamente, a apoptose consiste em um arredondamento da célula, retração de pseudópodes, diminuição do volume celular, condensação da cromatina, fragmentação nuclear, pouca ou nenhuma alteração nas organelas citoplasmáticas, formação de corpos apoptóticos na membrana celular (porém a membrana mantém sua integridade até os estágios finais do processo) e fagocitose por um macrófago próximo à célula *in vivo* (Baehrecke, 2002; Barkla & Gibson, 1999; Roachi & Clark; 2000).

A apoptose pode ser regulada por diversos moduladores, incluindo alguns íons (ex: Ca^{2+}) (Matson & Chan; 2003), genes (ex. c-myc, Bcl-2/Bax, Fas, DR5) (Evan GI *et al.*, 1992; Kischkel Fc *et al.*, 2000; Hoetelmans RW *et al.*, 2003), proteínas (ex. p53, caspases, IAPs) (Janicke *et al.*, 1998; LaCasse *et al.*, 1998; Alsafadi *et al.*, 2009;) e até mesmo algumas organelas (ex. mitocôndria, retículo endoplasmático) (Breckenridge *et al.*, 2003; Gershoni *et al.*, 2009).

O processo apoptótico tem ainda como característica, um fluxo contínuo de Ca^{2+} , pois este íon está envolvido na ativação de diversas endonucleases, transglutaminases, regulação gênica, ativação de proteases e organização do citoesqueleto (Zimmerman *et al.*, 1982; Orrenius *et al.*, 1992 Barbado *et al.*,

2009) . Entretanto, o influxo de cálcio não é essencial para que ocorra a apoptose (Ulukaya *et al.*, 2011).

Existem algumas vias de apoptose, mesmo que morfologicamente similares, essas vias são iniciadas por diferentes vias bioquímicas. As principais vias seriam as vias intrínsecas ou extrínsecas, com ou sem a participação da mitocôndria (Danial & Korsmeyer, 2004; Kroemer *et al.*; 2007). Porém pode existir sinalização cruzada entre essas vias (Taylor, Cullen, & Martin, 2008).

A via extrínseca da apoptose, é definida por uma morte celular apoptótica induzida por sinais de stress extracelulares e propagada por receptores transmembrana específicos (Mehlen *et al.*, 2011), essa via leva à ativação das caspases-8 e -10 (Reubold & Eschenburg, 2012).

A via intrínseca ou via mitocondrial é iniciada por diferentes agentes de stress celular, como danos ao DNA ou predominância de estímulos pró-apoptóticos que levem a uma permeabilização da membrana externa da mitocôndria (Taiti *et al.*, 2010; Kroemer *et al.*, 2007). A permeabilização leva à liberação do citocromo C da membrana interna para o citoplasma; (Kroemer *et al.*, 2007), ligação do citocromo C ao Apaf-1 (*apoptosis protease-activating factor 1*) essa ligação, na presença do ATP, forma o apoptossomo que servirá como plataforma para a ativação da procaspase-9 (Riedl & Salvesen 2007), ao ser ativada, essa enzima levará à ativação da caspase efetora caspase-3 (Rodriguez *et al.*, 1999). Entretanto, o citocromo C pode ser ativado também pela via extrínseca levando também à ativação das procaspase-9 (Kulikov *et al.*, 2012; Slee *et al.*, 1999; Ulukaya, Acilan, & Yilmaz, 2011).

1.4.1.1 Caspases

Caspases pertencem a uma família de proteínas altamente conservada, dependentes de cisteínas e aspartato-específicas, são proteases ácidas que utilizam um resíduo de cisteína como núcleo catalítico e geralmente clivam suas proteínas alvos após um resíduo de aspartato (Alnemri *et al.*, 1998). Elas podem ter tanto uma função apoptótica quanto uma função não apoptótica. Já foram caracterizadas 13 caspases em seres humanos (Chowdhury *et al.*, 2008).

Todas as caspases existem na célula na forma de um precursor zimogênio inativo. Estudos de cristalografia de raio-X mostraram que elas são sintetizadas como um único polipeptídeo de 32-55 kDa, apresentando três domínios. O primeiro possui de 17-21 kDa, é o domínio onde está o sítio ativo da enzima e fica localizado no centro da proteína, o segundo se localiza no C-terminal da proteína e possui de 10-13 kDa, é chamado de subunidade catalítica menor e por último um domínio NH₂-terminal com 3-24 kDa chamado de domínio de morte (Martinon *et al.*, 2001; Weber and Vincenz, 2001).

O papel apoptótico dessas enzimas no processo de morte celular já é bem estabelecido. Neste processo, as caspases -2, -8, -9 e -10 são caspases iniciadoras, enquanto as caspases -3, -6 e -7 são caspases efetoras (Kumar & Vaux, 2002; Salvesen, 2002; Chowdhury *et al.*, 2006). As caspases -1,-4,-5 e -11 são importantes na ativação de vias inflamatórias, são chamadas de caspases inflamatórias e estão todas presentes no mesmo locus gênico

(Martinon & Tschopp, 2004). Neste trabalho foi dada ênfase na função das caspases -4, -3, -6 e -9 na morte de células tratadas com o veneno bruto de *Loxosceles similis*.

A Caspase-9 é tida como a caspase canônica na via intrínseca mitocondrial de apoptose, esta via é regulada primariamente pelas famílias de proteínas Bcl-2 e BH-3 (Gross *et al.*,1999; Degterev *et al.*,2003). Nessa via, um sinal de morte celular leva à liberação do citocromo C da mitocôndria, que se liga e facilita a formação do apoptossomo septamérico, que recruta e ativa a caspase-9. A ligação entre o apoptossomo e a caspase-9 cliva e ativa as caspases -3, -6 e -7 (Li *et al.*,1997; Acehan *et al.*, 2002). Essas três caspases, estão importantes caspases efetoras *downstream* que clivam diversos substratos em células apoptóticas, elas podem amplificar sinais tanto da via intrínseca quanto da via extrínseca (Porter & Janicke, 1999; Degterev *et al.*, 2003; Lakhani *et al.*, 2006) Na figura 2 está mostrado um esquema das possíveis vias apoptóticas iniciadas pelas caspases -8 e -9.

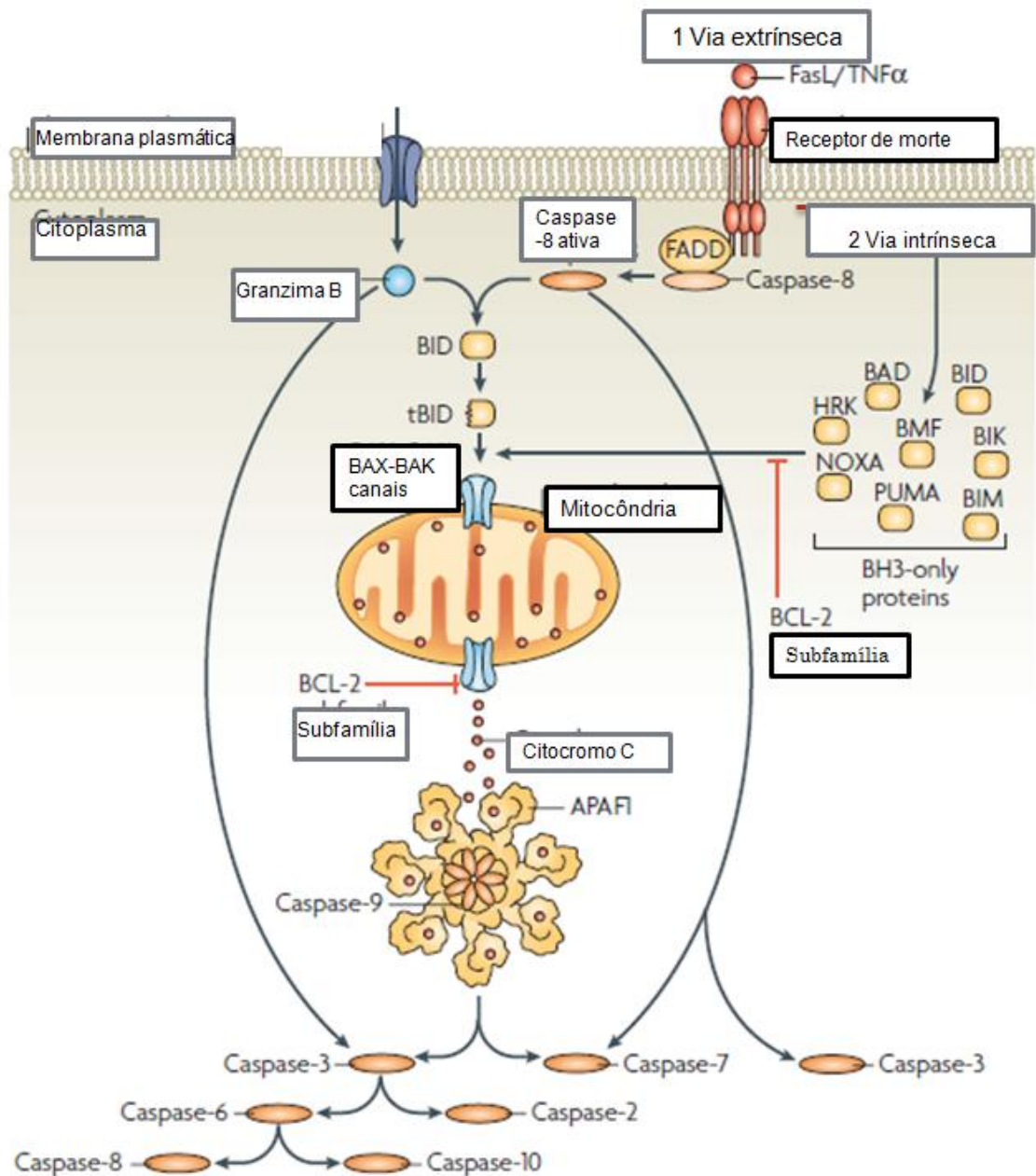


Figura 2: Vias de ativação de caspases. A ativação de caspase através da via extrínseca envolve a ligação extracelular de um ligante de morte extracelular (como por exemplo FasL ou o Fator de Necrose Tumoral α (TNF α)) a um receptor de morte transmembrana. A ligação do receptor de morte com seu respectivo logante provoca o recrutamento de proteínas adaptadoras, como a *Fas-associated death domain protein* (FADD), que por sua vez recruta e agrega várias moléculas de caspase-8, desse modo promovendo o seu auto processamento e ativação. A caspase-8 ativa em seguida processa e ativa proteliticamente as caspases-3 e -7, provocando a ativação de outras caspases e culminando na proteólise dos substratos e a morte celular. Em algumas situações, sinalizações da via extrínseca podem realizar uma sinalização cruzada com a via intrínseca através de uma proteólise de *BH3-only protein* BID (BH3-agonista de interação do domínio de morte) mediada por caspase-8. A proteína BID processada (tBID) pode promover a liberação do citocromo C da mitocôndria e a montagem do apoptossomo (composto por 7

moléculas da proteína *apoptotic protease-activating factor-1* (APAF1) e o mesmo número de homodímeros de caspase-9). Na via intrínseca, diversos estímulos que provoquem stress celular ou danos, ativam um ou mais membros da família BH3-only proteins. Essas proteínas agem como um sensor específico da via para vários estímulos e são reguladas de formas distintas. Sua ativação, ao alcançar um certo limiar, ultrapassa o efeito inibitório das proteínas da família *anti-apoptotic B-cell lymphoma-2* (BCL-2) e promove o recrutamento dos oligômeros de BAK-BAX na membrana externa da mitocôndria. Esses oligômeros permitem o efluxo de proteínas do espaço intermembranar para o citoplasma, como o citocromo C, que então reúne o complexo apoptossomo, ativa a caspase-9 e então propaga uma cascata proteolítica de ativação de outras caspases (Taylor et al., 2008).

A caspase-4 humana é pouco caracterizada, porém ela parece estar ligada ao processo apoptótico induzido por stress do retículo endoplasmático. Entretanto, como seu gene, está localizado no mesmo locus gênico da enzima caspase-1, acredita-se que ela pode estar relacionada com o processo inflamatório. Segundo Sollberger *et al* (2012), a caspase-4 apresenta um papel essencial na ativação da caspase-1 no complexo do inflamassomo.

1.4.2 Definição de necrose

A necrose é morfologicamente caracterizada por um ganho de volume celular, inchaço das organelas, rompimento da membrana celular e consequente vazamento do conteúdo intracelular (Kroemer *et al* 2009). Uma das principais diferenças da necrose para a apoptose é que, na primeira, como há um rompimento da membrana celular e um vazamento do conteúdo citoplasmático, um processo inflamatório se inicia. Já na segunda, como as células em apoptose são fagocitadas, não há vazamento de conteúdo intracelular, portanto não há processo inflamatório induzido por mediadores tipicamente intracelulares.

Porém, em um estado tardio da apoptose, a célula pode entrar em um estado de necrose secundária, isso ocorre principalmente *in vitro* quando não existem macrófagos para executar a fagocitose das células apoptóticas, estas acabam por sofrer um rompimento da membrana e entram em um estado necrótico após passar por um estado apoptótico (Ulukaya *et al*, 2011).

Portanto, devido aos poucos estudos relacionando vias de morte celular e a peçonha de aranhas do gênero *Loxosceles* neste trabalho iremos estudar as vias de morte celular induzidas pelo veneno bruto da aranha *Loxosceles similis in vitro* em fibroblastos dérmicos humanos.

2. Objetivos

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

- Investigar as vias de morte celular ativadas pela peçonha bruta de *Loxosceles similis* em fibroblastos dérmicos humanos.

2.2 Objetivos específicos

- Estudar o efeito do veneno de *L. similis* em diferentes tipos celulares.
- Identificar qual processo de morte celular é induzido pela peçonha bruta.
- Identificar qual é a via de morte ativada pela peçonha dentro do processo de morte celular.

3. Materiais e métodos

3. Materiais e métodos:

3.1 Obtenção da peçonha bruta da aranha *L. similis*

Para obtenção da peçonha, foi realizada remoção cirúrgica da glândula da aranha. As glândulas de diversas aranhas foram maceradas em água ultrapura tipo I grau biologia molecular (Phoneutria Biotecnologia e Serviços LTDA) e centrifugadas. O sobrenadante limpo foi coletado e estocado à -20°C para uso posterior.

3.2 Quantificação de proteínas

A quantificação de proteínas da peçonha bruta foi realizada segundo método descrito por Bradford (1976), utilizando-se albumina de soro bovino (Sigma-Aldrich, CA, USA) como padrão de proteínas.

3.3 Resolução eletroforética em gel SDS-PAGE

Foi utilizado o sistema de gel desnaturante SDS-PAGE (Laemmli, 1970), preparado em placas de vidro com espaçadores de 1 mm. O gel de separação era constituído de 12 % (v/v) de uma solução de: acrilamida/bisacrilamida 29:1 (p/p); Tris-HCl 0,4 M pH 8,8; SDS 0,1% (p/v); 50 mM de persulfato de amônia (PSA) e 0,05% (v/v) de TEMED. O gel de concentração era constituído de 4% (v/v) de uma solução de: acrilamida/bisacrilamida 29:1 (p/p); Tris-HCl 0,125 M pH 6,8; SDS 0,1% (p/v); PSA 50 mM e TEMED 0,025% (v/v).

As amostras (10 µg) foram adicionadas ao tampão de amostra desnaturante para SDS-PAGE 2x concentrado (100 mM de Tris-HCl pH 6,8; 4% de SDS; 0,2% de Azul de Bromofenol; 10% de β-mercaptoetanol; 20% de glicerol), fervidas durante 5 minutos e aplicadas às canaletas do gel.

A eletroforese foi desenvolvida verticalmente com o tampão de eletroforese SDS-PAGE (0,3% Tris-HCl; 1,2% de glicina e 0,1% de SDS) a 120V, 30 mA, durante aproximadamente 2 horas, até que o tampão da amostra atingisse o final do gel. Após a eletroforese, os géis foram revelados com a solução corante de Comassie Azul (0,25% de Comassie Azul; 45% de metanol; 9% de ácido acético glacial) por 20 minutos à 25°C e lavados em solução descorante (45% metanol e 9% ácido acético glacial) até o desaparecimento da coloração de fundo.

3.4. Isolamento e cultivo dos fibroblastos

Os fibroblastos primários dérmicos deste trabalho foram obtidos a partir de tecido epitelial humano e de tecido epitelial de coelhos. Para a obtenção do tecido epitelial de coelho, um pedaço de aproximadamente 1 cm² de pele foi retirado das costas de carcaças de coelhos cedidas pelo Prof. Dr. Evanguedes Kalapothakis. Todos os protocolos foram realizados de acordo com as diretrizes para o uso humano de animais em laboratório estabelecidos pela UFMG. Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG) (protocolo 305/2012).

O tecido para a obtenção dos fibroblastos humanos foi a pele da pálpebra superior de cinco pacientes saudáveis, com idade entre 52 e 65 anos,

submetidos à blefaroplastia realizada na Clínica de Olhos da Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte ou na Sociedade Oftalmológica de Minas Gerais, de acordo com as normas aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (CAAE: 12482913.4.0000.5149). Logo após a remoção da pele, esta foi transferida para tubos de polietileno cônicos de 50 mL contendo 20 mL de meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) (Sigma-Aldrich) sem soro fetal bovino (SFB). A pele foi então encaminhada ao Laboratório de Imunologia Celular e Molecular localizado no ICB – UFMG.

O protocolo para o isolamento de ambos os fibroblastos foi o mesmo e realizado como descrito a seguir. Em capela de fluxo laminar, os tecidos foram lavados em PBS 0,15M, pH 7,2 e transferidos para placa de cultura celular de 60x15 mm (Sarstedt, Alemanha) onde foram cortados em pedaços de, aproximadamente, 1 mm². Os pedaços de pele foram transferidos para tubo cônico de 50 mL contendo solução de 0,10% de colagenase tipo I em PBS 0,15 M (NaCl 138 mM; KCl 2,7 mM; Na₂HPO₄ 7,1 mM; KH₂PO₄ 1,47 mM; pH 7,2) e incubados por 3 horas, em estufa à 37°C, atmosfera úmida e 5% CO₂. Durante esse período, a cada 15 minutos, o tubo contendo o tecido foi agitado vigorosamente. Decorrido o período de 3 horas, a digestão foi interrompida pela adição de meio de cultura suplementado com 10% de SFB. A seguir, o tubo cônico de 50 mL foi centrifugado a 350 g por 10 minutos na centrífuga Eppendorf 5804 R. Ao final da centrifugação, o sobrenadante foi desprezado, o precipitado foi ressuspenso em meio de cultura completo e transferido para garrafas de cultura celular T-25 cm² e mantidas em estufa à 37°C, atmosfera úmida e 5% CO₂.

Após dois dias de cultivo, o conteúdo das garrafas de cultura foi transferido para tubos cônicos de 50 mL e centrifugado a 350 g à 20°C por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado, o precipitado formado foi suspenso em 5 mL do respectivo meio de cultura basal e acondicionados em novas garrafas de cultura celular T-25 cm², sendo utilizados nos experimentos a partir da terceira passagem.

3.5 Ensaio de MTT

Para analisar o metabolismo das células tratadas com o veneno bruto de *Loxosceles similis* e definir qual seria a dosagem utilizada do veneno nos demais ensaios, foi utilizado o método colorimétrico adaptado de Mosmann 1983 utilizando o ensaio de 3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difeniltetrazol brometo (MTT) (Life Technologies).

Para esse ensaio, as células foram tripsinizadas da garrafa utilizando uma solução de tripsina-EDTA 0,05% (Life Technologies) e semeadas em placas de 24 poços com uma densidade de 10⁵ células por poço e incubadas por 24 horas em uma estufa umidificada com 5% de CO₂ à 37°C.

Para a definição do modelo celular a ser utilizado, utilizamos uma dose de veneno considerada alta na literatura de 60 µg/mL nos poços da placa de cultura. O tempo de incubação com o veneno foi de 24 horas.

Após o período de incubação, as células foram tratadas com o reagente MTT. Após duas horas de incubação com o MTT ocorre uma alteração da morfologia das células e a formação de cristais de formazan. Os cristais de

formazan são dissolvidos “*overnight*” com SDS-HCl 10% e a densidade ótica medida a 595 nm no leitor de placas Elx800, (BioTek, VT, USA).

Como controle positivo de morte celular foi utilizada a Estaurosporina (Sigma-Aldrich) 200 nM em DMEM + 10% SFB, por 24 horas, o controle negativo consiste em células não tratadas. Os valores nos gráficos foram normalizados em relação ao controle negativo. Todos os dados foram analisados utilizando o GraphPad Software.

Após o estabelecimento do tipo celular a ser utilizado nos demais ensaios, partimos então para a determinação do EC50 a ser utilizado. As células foram plaqueadas e tratadas com a peçonha por 24 h utilizando uma diluição seriada (100, 33, 11, 3.66 and 1.22 µg/mL). Após as 24 h de incubação o protocolo de MTT foi realizado. Todos os dados foram analisados utilizando o GraphPad Software.

3.6 Microscopia de Fluorescência para determinação de apoptose

Para uma avaliação inicial do processo de morte celular sob o tratamento de veneno bruto de *Loxosceles similis* foi realizado um ensaio de microscopia de fluorescência. Para esse ensaio, as células foram tripsinizadas conforme citado anteriormente e plaqueadas em uma densidade de 5×10^4 células por poço. Elas foram incubadas em DMEM + 10% SBF e mantidas por 24 h em estufa umidificada à 37°C e 5% de CO₂. As células foram tratadas com o EC50 do veneno por 24 horas. Como controle de morte foi utilizada a Estaurosporina 200 nM por 24 horas para controle de necrose tardia e a mesma droga por 4 horas para controle de apoptose.

Após os tempos de incubação, as células foram marcadas com Iodeto de Propídeo (Life Technologies, CA, USA) na concentração de 5 µg/mL para avaliar a necrose e YO-PRO-1 5 µM (Life Technologies) para avaliar a apoptose por 30 minutos. As imagens foram realizadas utilizando o Microscópio de Fluorescência Nikon TI-Eclipse acoplado com a objetiva Nikon CFI S Plan Fluor ELWD 20X (N.A. 0.45), fonte de iluminação Lambda DG-4 (Sutter Instrument, USA) e uma câmera EMCCD LucaEM R (Andor Technology, USA) (Nikon, JAP) localizado no “Centro de Aquisição e Processamento de Imagem do Instituto de Ciências Biológicas - UFMG (CAPI)”. Os filtros de emissão (EM) e excitação (EX) utilizados para a fluorescência do YO-PRO-1 foram EM 480/30 e EX 535/40, respectivamente. Os filtros EM 540/25 e EX 605/55 foram utilizados para coletar as imagens com iodeto de propídeo. Células não marcadas foram utilizadas como controle negativo.

3.7 Citometria de fluxo para determinação de apoptose

Para esse ensaio, foram plaqueadas 10^5 células por poço em placas de 24 poços. Elas foram incubadas por 24 h em DMEM + 10% SFB em estufa umidificada à 37°C e 5% de CO₂. As células foram então tratadas com 40 µg/mL de veneno bruto de *L. similis* por 24 horas. Estaurosporina na concentração de 200 nM por 24 horas foi utilizada como controle positivo de morte celular.

Após o tratamento as células foram tripsinizadas da placa de 24 poços utilizando uma solução de tripsina-EDTA 0,05%, centrifugadas por 10 min a 350 g. Em seguida, o sobrenadante foi retirado e o pellet ressuspensão em 1 mL

de PBS 0,15 M. Elas foram então centrifugadas mais uma vez a 350 g, o sobrenadante retirado e as células ressuspendidas em tampão de ligação a Anexina V (50 mM HEPES, 700 mM NaCl, 12.5 mM CaCl₂, pH 7.4).

As células foram então marcadas com o kit de detecção de Anexina V-FITC (Sigma-Aldrich) de acordo com protocolo do fabricante. As leituras foram realizadas no citômetro Guava EasyCyte 6-2L (Millipore, MA, USA). A fluorescência para Anexina V-FITC foi coletada utilizando o filtro de emissão de 525/30 e a fluorescência para iodeto de propídeo foi coletada utilizando o filtro de emissão de 583/26. Os sinais de fluorescência foram devidamente compensados antes da coleta dos dados, utilizando células marcadas separadamente com cada fluorocromo. Os dados foram analisados utilizando o software FlowJo (Tree Star, San Carlos, CA, USA).

3.8 Citometria de fluxo para análise da atuação de caspases no processo de apoptose

Para esse ensaio, foram plaqueadas 10⁵ células por poço em placas de 24 poços. Elas foram incubadas por 24 h em DMEM + 10% SFB em estufa umidificada à 37°C e 5% de CO₂.

As células foram então tratadas com 40 µg/mL de veneno bruto de *L. similis* por 24 horas. Juntamente com o veneno foram adicionados inibidores diversos de caspases: inibidores permeáveis para as caspases 4, 6 e 9 (Sigma-Aldrich). Esses inibidores são peptídeos e suas respectivas sequências de aminoácidos se encontram na tabela 2. Cada um desses inibidores foi adicionado na concentração de 20 µM no meio de cultura. Estaurosporina na

concentração de 200 nM por 24 horas foi utilizada como controle positivo de morte celular.

	Sequência de aminácidos
Inibidor da caspase-4	Ac-AAVALLPAVLLALLAPLEVD-al
Inibidor da caspase-6	Ac-AAVALLPAVLLALLAPVEID-al
Inibidor da caspase-9	Ac-AAVALLPAVLLALLAPLEHD-al

Tabela 2: A sequência de aminoácidos dos inibidores de caspase utilizados neste trabalho

Após o tratamento as células foram tripsinizadas da placa de 24 poços utilizando uma solução de tripsina-EDTA 0,05%, centrifugadas por 10 min a 350 g. Em seguida, o sobrenadante foi retirado e o pellet ressuspense em 1 mL de PBS 0,15 M. Elas foram então centrifugadas mais uma vez a 350 g, o sobrenadante retirado e as células ressuspendidas em tampão de ligação a Anexina (50 mM HEPES, 700 mM NaCl, 12.5mM CaCl₂, pH 7.4).

As células foram então marcadas com o kit de detecção de Anexina V-FITC (Sigma-Aldrich) de acordo com protocolo fornecido pelo fabricante. As leituras foram realizadas no citômetro Guava EasyCyte 6-2L (Millipore). As células foram então marcadas com o kit de detecção de Anexina V-FITC (Sigma-Aldrich) de acordo com protocolo anexado ao kit. As leituras foram realizadas no citômetro Guava EasyCyte 6-2L (Millipore, MA, USA). A

fluorescência para Anexina V-FITC foi coletada utilizando o filtro de emissão de 525/30 e a fluorescência para iodeto de propídeo foi coletada utilizando o filtro de emissão de 583/26. Os sinais de fluorescência foram devidamente compensados antes da coleta dos dados, utilizando células marcadas com separadamente com cada fluorocromo. Os dados foram analisados utilizando o software FlowJo (Tree Star, San Carlos, CA, USA).

3.9 Microscopia de Fluorescência para detecção de caspase-3 ativa

Para avaliação da ativação de caspase-3 em células tratadas com o veneno bruto de *Loxosceles similis* foi realizado um ensaio de microscopia de fluorescência.

Para esse ensaio, as células foram tripsinizadas conforme citado anteriormente e plaqueadas em uma densidade de 5×10^4 células por poçoda placa de 24 poços. Elas foram incubadas por 24 h em DMEM + 10% SFB em estufa umidificada à 37°C e 5% de CO₂. As células foram tratadas com o EC50 do veneno por 24 e 48 horas. Como controle de morte foi utilizada a Estaurosporina 200 nM por 4 horas para controle de ativação da caspase-3.

Após os tempos de incubação, as células foram marcadas com “*Vybrant FAM Caspase-3 and -7 Assay Kit*” por 30 minutos. As imagens foram realizadas utilizando o Microscópio de Fluorescência Nikon Eclipse TI como descrito na seção 3.6. Os filtros de EM e EX utilizados para a coleta da fluorescência do *Vybrant FAM Caspase-3 and -7* foram EM 480/30 e EX 535/40, respectivamente.

3.10 Análise estatística

Todos os dados mostrados representam pelo menos três experimentos independentes e são expressos utilizando a média \pm o erro padrão da média (SEM). As análises estatísticas foram realizadas utilizando o GraphPad software. Experimentos com mais de dois grupos de dados foram comparados utilizando o teste one-way ANOVA e o pós-teste de Bonferroni.

4. Resultados

4. Resultados

4.1 Perfil eletroforético da peçonha

Após a extração do veneno, foi realizada uma quantificação por Bradford e uma corrida em gel de poliacrilamida SDS-Page para verificação do perfil eletroforético do extrato obtido.

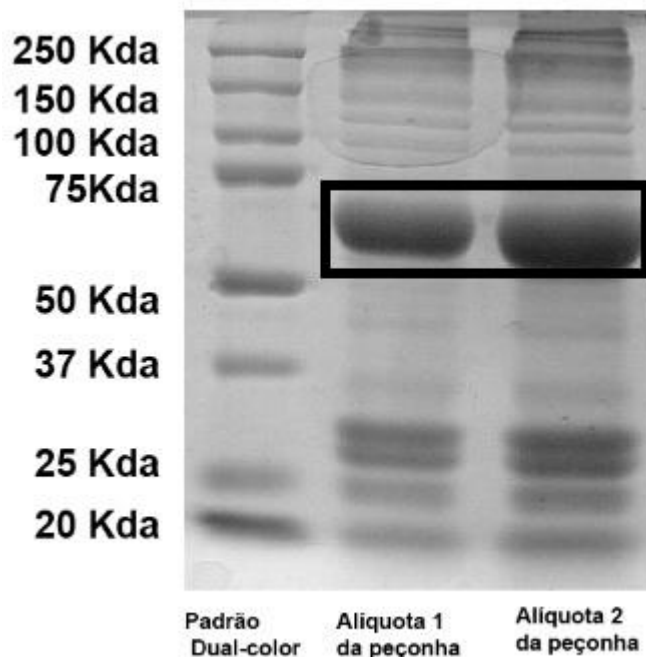


Figura 3: Gel de poliacrilamida SDS-PAGE mostrou que o veneno extraído possuía qualidade esperada. Corrida das alíquotas da peçonha em gel de poliacrilamida apresentou bandas bem definidas e nenhum arraste, indicando que as proteínas contidas no veneno não estavam degradadas. Na primeira canaleta foi corrido o padrão “*Precision Plus Protein Dual Color*” (Bio-Rad) e à esquerda estão presentes os pesos moleculares correspondentes às bandas do padrão de peso molecular, na segunda e na terceira canaletas estão as alíquotas de diferentes extrações da peçonha. A banda demarcada com um retângulo corresponde à BSA colocada nas alíquotas para melhor conversação do veneno.

A média da quantificação obtida das alíquotas foi de 9,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e as proteínas obtidas do extrato da glândula de veneno se mostraram bem

conservadas e com a qualidade esperada, apresentando bandas isoladas e pouco ou nenhum arraste no gel (Fig. 3).

4.2 Fibroblastos tratados com o veneno bruto mostraram diminuição do metabolismo de MTT.

O teste de MTT mede o metabolismo do reagente MTT pelas mitocôndrias das células. Ao ser metabolizado, esse reagente gera cristais de formazan que ao serem diluídos com SDS-HCl 10% alteram a coloração do meio. Logo, quanto maior a mudança de coloração, mais reagente foi metabolizado, indicando que as mitocôndrias estão funcionais e as células viáveis. Essa mudança é medida em um leitor de absorbância no comprimento de onda de 595 nm.

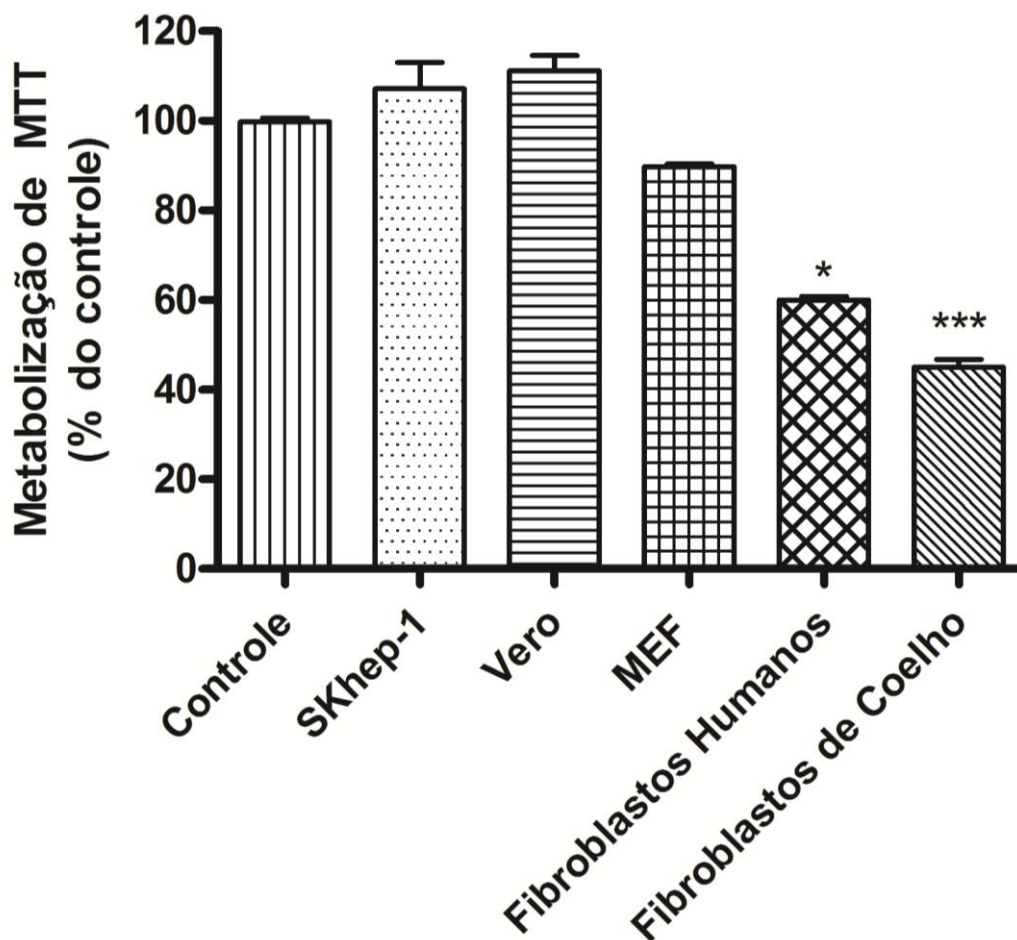


Figura 4: O tratamento com a peçonha bruta de *L. similis* altera o metabolismo de MTT em culturas de fibroblastos. A atividade metabólica das células foram avaliadas utilizando o teste que mede a metabolização de MTT. O gráfico de barras mostra a porcentagem de MTT metabolizado com 24 h de incubação com a peçonha nas células Skhep-1, Vero, Mouse Embryonic Fibroblast (MEF - BALB/3T3 clone A31), Fibroblasto Primário Humano e de Coelho. O controle consiste na média de todos os grupos não tratados. Todos os grupos foram comparados com o controle. (N=9, experimentos realizados em três dias independentes, * $p < 0.05$, *** $p < 0,001$)

Nesse ensaio observamos que diversas linhagens celulares tratadas com a peçonha bruta da aranha marrom não apresentaram qualquer diminuição em sua capacidade de metabolização do MTT (Fig. 4). As linhagens Skhep-1 (Adenocarcinoma hepático humano), Vero (Célula renal de

Cercopithecus aethiops) e MEF não apresentaram qualquer diminuição em sua atividade metabólica em relação ao controle. Já as duas células primárias de fibroblastos epiteliais, tanto de coelho quanto humano, apresentaram uma diminuição na metabolização do MTT. Os fibroblastos epiteliais humanos reduziram sua viabilidade para $60\pm 0,8\%$ enquanto os de coelho apresentaram uma redução de $45\pm 1,6\%$. Devido à facilidade de obtenção de fibroblastos dérmicos humanos e este ser um modelo relevante e interessante para o estudo da ação do veneno pois a peçonha age principalmente na pele em caso de acidentes com humanos, decidimos utilizar estas células nos demais experimentos deste trabalho.

4.3 O EC50 do veneno em fibroblastos humanos foi de 40 µg/mL.

Para o cálculo do EC50 da peçonha bruta de *L. similis* em fibroblastos epiteliais humanos, também foi utilizado o teste de MTT. Obtivemos então o valor de 40 µg/mL para o EC50 do veneno nessas células (Fig. 5), todos os próximos experimentos foram realizados utilizando o EC50. Este valor de EC50 já foi encontrado em outros estudos com a peçonha de aranhas *Loxosceles* (Nowatzki et al., 2010, 2012) *in vitro*.

4.4 Tratamento com a peçonha bruta induz uma resposta apoptótica.

Para iniciar a investigação do processo de morte celular gerado pela peçonha bruta da aranha marrom, realizamos um ensaio de YO-PRO-1, um marcador de DNA que penetra nas células apenas quando estas se encontram em processo apoptótico, e iodeto de propídeo que foi utilizado como marcador de necrose, já que este só entra na célula quando a membrana celular encontra-se comprometida.

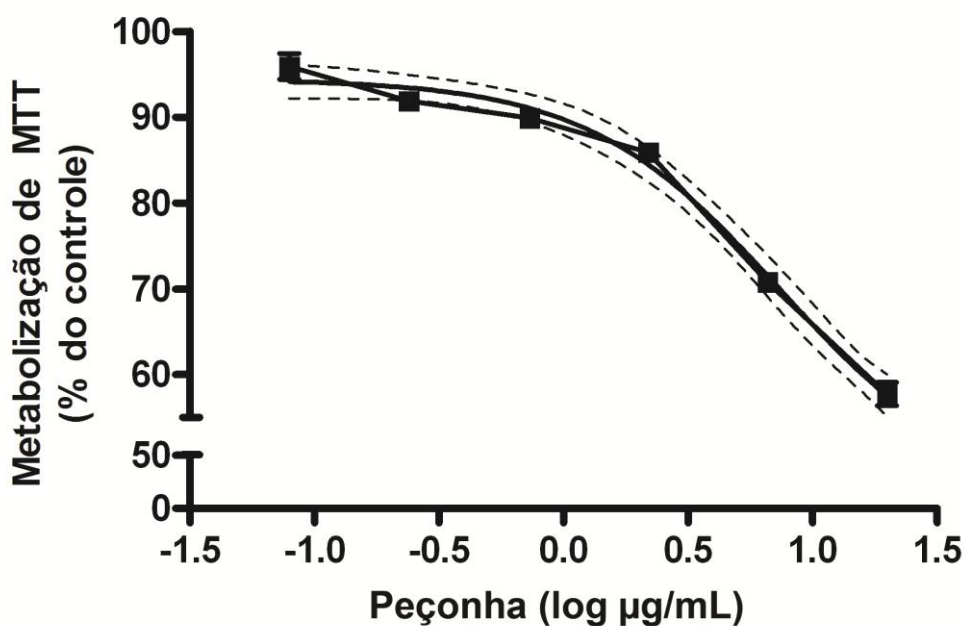


Figura 5: O EC50 do efeito da peçonha de *L. similis* em fibroblastos humanos é 40 µg/mL. Fibroblastos humanos foram tratados com concentrações crescentes da peçonha. A metabolização de MTT foi medida após 24 horas de incubação com a peçonha (N=9, experimentos realizados em três dias independentes).

Neste ensaio as células tratadas com a peçonha bruta apresentaram uma porcentagem de células marcadas para apoptose (verde) muito acima da

porcentagem de células marcadas para necrose (vermelho) (Fig. 6A). A porcentagem de células tratadas com o veneno e positivas para YO-PRO-1 foi de $87\pm 2,1\%$. O gráfico mostra que a resposta das células ao veneno se assemelha ao controle apoptótico, tratamento com estaurosporina por 4 h (Fig. 6B). O controle de estaurosporina 24 h serviu como um controle para ambas as marcações, uma vez que *in vitro* as células ao final do processo apoptótico entram em uma necrose tardia devido à ausência de macrófagos para realizar a fagocitose, permitindo a entrada dos dois marcadores.

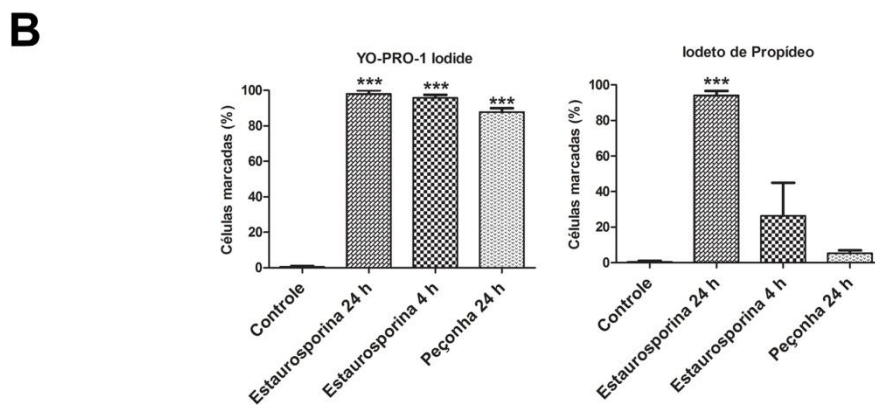
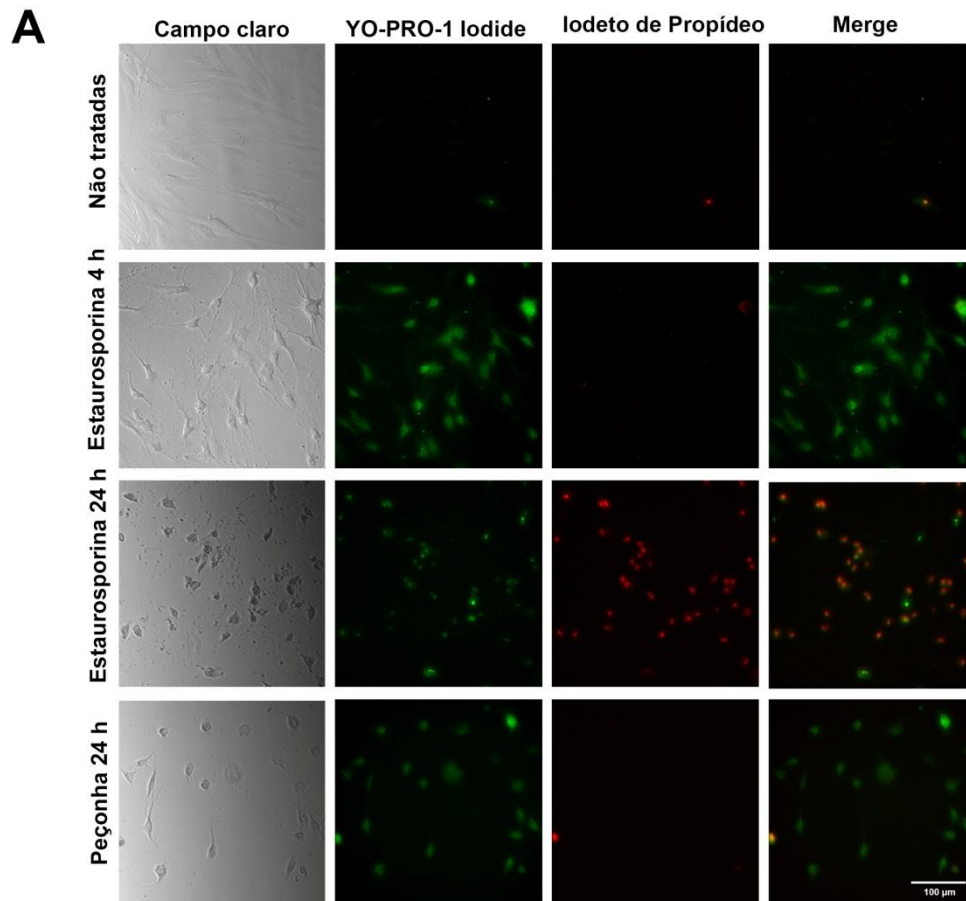


Figura 6: Marcação com YO-PRO-1 indica que o tratamento com a peçonha de *L. similis* induz apoptose em fibroblastos. **A**, imagens representativas de fibroblastos tratados com estaurosporina por 4 h (n=91) ou 24 h (n=99), tratado com peçonha por 24 h (n=124) ou não tratado (n=145). Células foram marcadas com YO-PRO-1 (verde) e iodeto de propídeo (vermelho), ambos são marcadores de ácidos nucleicos. As imagens de campo claro são mostradas à esquerda. As imagens sobrepostas (Merge) mostram células duplo marcadas. Os dados foram coletados em 3 diferentes experimentos. **B**, Quantificação das células marcadas com YO-PRO-1 e iodeto de propídeo. Todos os grupos foram comparados com o controle não marcado (***) $p < 0,001$.

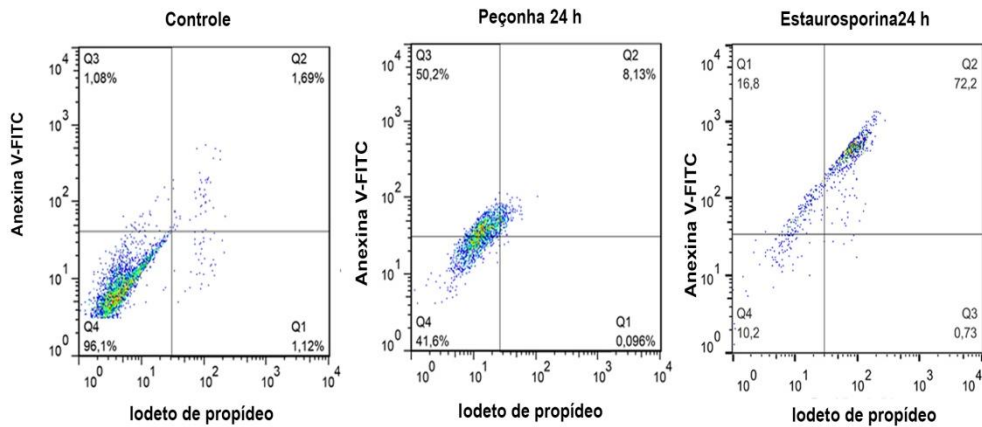
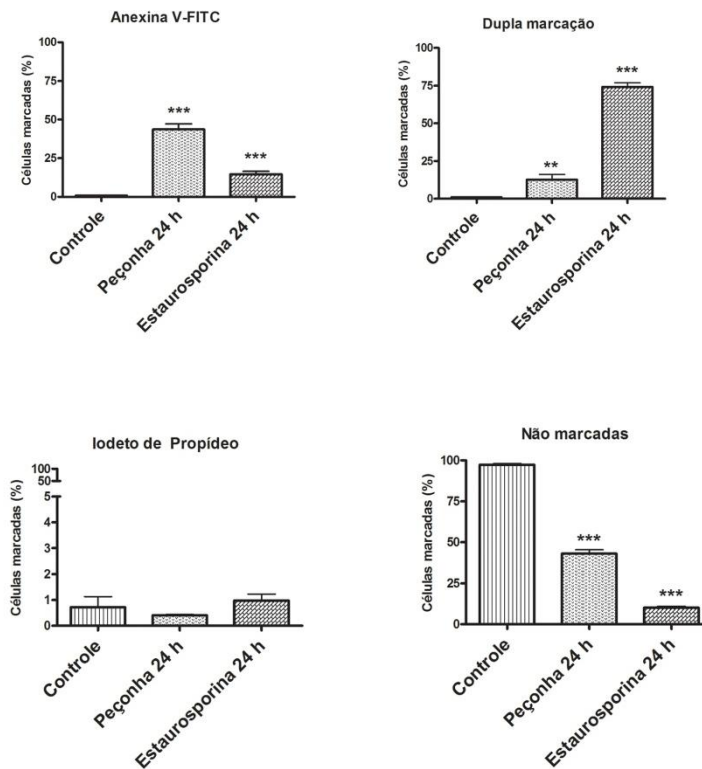
A**B**

Figura 7: Marcação com anexina V-FITC confirma que o tratamento com a peçonha de *L. similis* induz apoptose em fibroblastos. A, Gráficos representativos de citometria de fluxo de fibroblastos tratados com estaurosporina 24 h, peçonha por 24 h ou não tratados (n=9, experimentos foram realizados em 3 dias independentes). As células foram marcadas com anexina V-FITC (verde) e iodeto de propídeo (vermelho). Cinco mil eventos foram coletados por amostra. B, Os gráficos de barras mostram a porcentagem de células marcadas com anexina V-FITC, iodeto de propídeo, (neste grupo o eixo Y foi alterado para melhor visualização) duplo marcadas (anexina V-FITC e iodeto de propídeo) ou não marcadas. Todos os grupos foram comparados com o controle. (p<0,01, ***p<0,001).**

Para confirmar este resultado, realizamos um ensaio de Anexina V e iodeto de propídeo no citômetro de fluxo. A anexina V é uma proteína que se liga à fosfatidilserina (um lipídeo da fase intracelular da membrana plasmática) que se externaliza durante o início do processo apoptótico. Esta exposição ao meio extracelular de fosfatidilserina é um indicador precoce para células apoptóticas. O iodeto de propídeo foi utilizado com a mesma finalidade do ensaio anterior.

Este ensaio confirmou o resultado do ensaio anterior e também apresentou uma grande quantidade de células marcadas para apoptose, $43.6 \pm 3.5\%$ (Fig. 7A). $12.8 \pm 3.3\%$ das células apresentaram dupla marcação, indicando que elas já se encontravam no processo de necrose tardio. Como mostrado no gráfico, o veneno bruto apresenta uma maior porcentagem de células marcadas com anexina-V comparado com os outros marcadores (Fig. 7B).

Portanto com esses ensaios demonstramos que fibroblastos humanos tratados com a peçonha bruta da aranha *Loxosceles similis* entram em um processo de morte celular por apoptose.

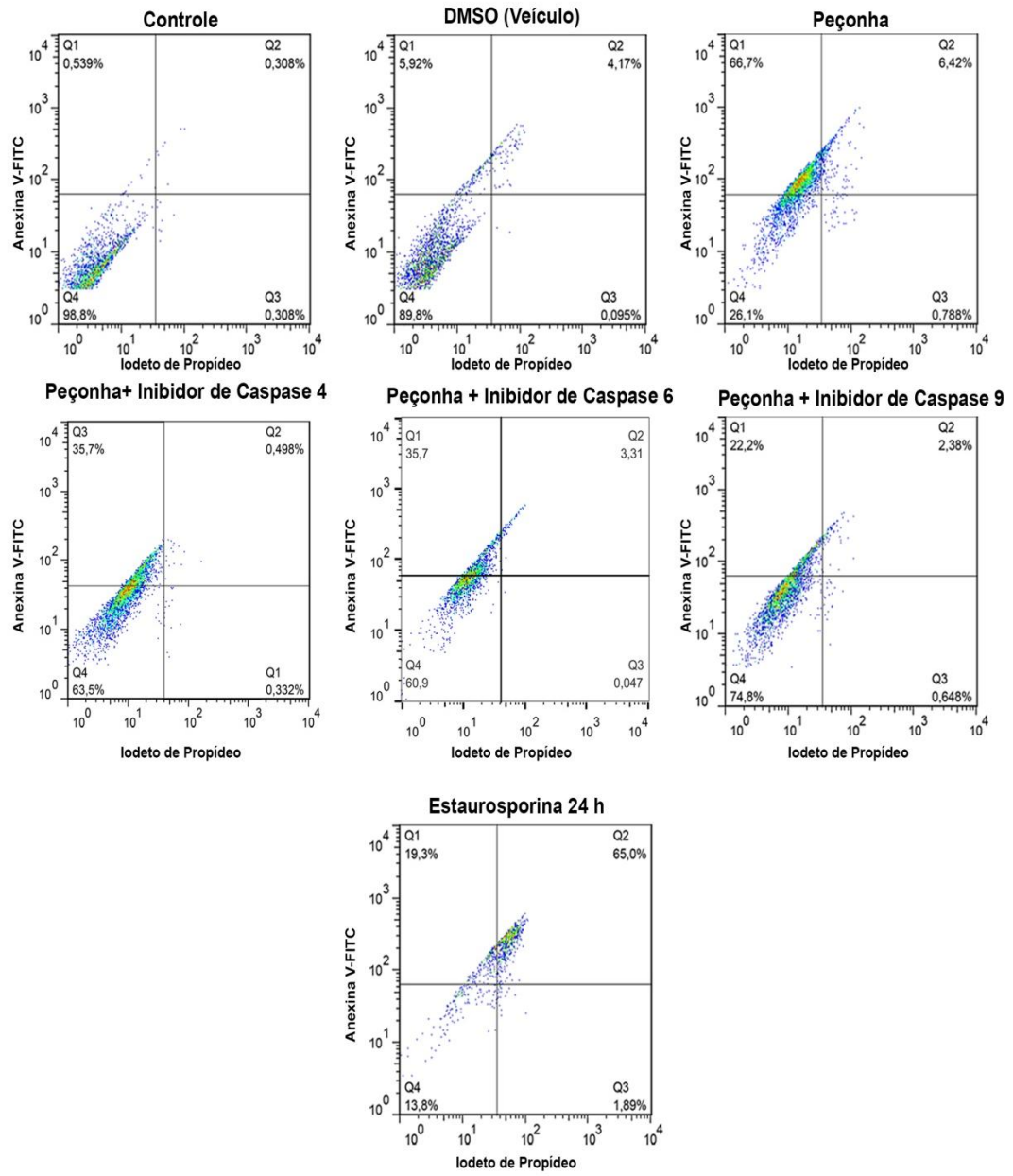
4.5 A inibição das caspases -4, -6 e -9 reduz a porcentagem de células em apoptose.

Para verificar se a apoptose era iniciada através de uma ativação de caspases, inibimos a caspase iniciadora -9, a caspase efetora -6 e uma caspase relacionada à inflamação, mas que também causou diminuição na marcação para apoptose, a caspase-4. Para a marcação das células neste

ensaio utilizamos os mesmos marcadores do ensaio anterior, anexina-V e iodeto de propídeo.

Observamos que a inibição da caspase-9 causou uma redução na porcentagem de células marcadas para anexina em relação ao grupo tratado apenas com a peçonha (fig. 8A), de $67\pm 3\%$ para $25\pm 2.4\%$. Esse resultado é coerente uma vez que a caspase-9 é uma caspase iniciadora e está mais *upstream* na via de ativação, logo sua inibição deveria causar uma grande redução na resposta apoptótica.

Os inibidores de caspases-4 e -6 também reduziram a marcação de anexina-V nos fibroblastos, apresentando $43\pm 8\%$ e $36\pm 0,7\%$ respectivamente de células positivas para essa marcação, como pode ser observado no gráfico da figura 8B. Todos os valores foram comparados com o grupo veículo, uma vez que este não apresentou diferença estatística em relação ao grupo controle não tratado. Além disso, os grupos tratados com os inibidores de caspases que apresentaram diferença em relação ao grupo tratado apenas com o veneno estão também indicados no gráfico.

A

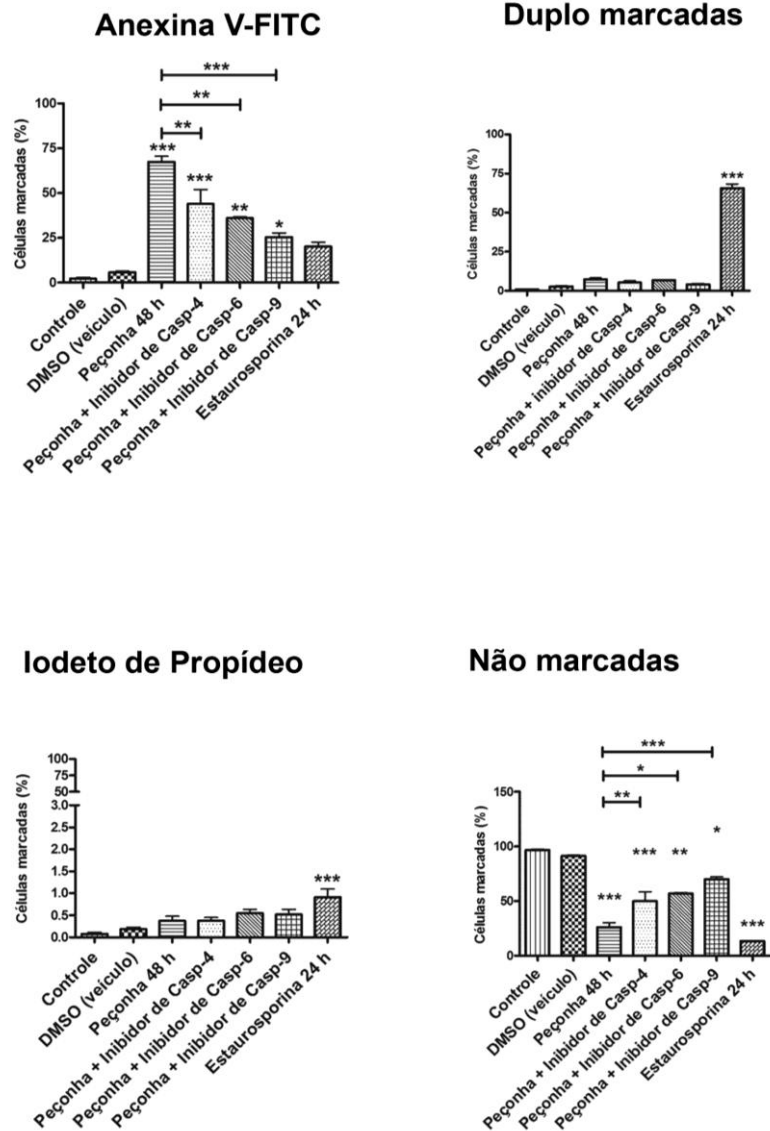
B

Figure 8: A inibição das caspases-4, -6, -9 reduz a quantidade de células apoptóticas. A, Os gráficos representativos de citometria de fluxo de fibroblastos tratados com o veículo dos inibidores (DMSO) e estaurosporina 24 h, peçonha por 48 h, inibidor de Caspase-4 mais peçonha por 48 h, inibidor de Caspase-6 mais peçonha por 48 h, inibidor de Caspase-9 mais peçonha por 48 h ou não tratadas (N=12, experimento foi realizado em 4 dias independentes). As células foram marcadas com anexina V-FITC (verde) e iodeto de propídeo (vermelho). Cinco mil eventos foram coletados por amostra. **B,** Os gráficos de barras mostram a porcentagem de células marcadas com anexina V-FITC, iodeto de propídeo, (neste grupo o eixo Y foi alterado para melhor visualização) duplo marcadas (anexina V-FITC e iodeto de propídeo) ou não marcadas. Todos os grupos foram comparados com o veículo (* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$).

4.6 A peçonha bruta também ativa as caspases-3 e -7

Realizamos um ensaio de microscopia de fluorescência para verificar se as principais caspases efetoras da via eram ativadas em fibroblastos tratados com a peçonha bruta da aranha marrom. Neste ensaio as células foram marcadas com o “*Vybrant FAM Caspase-3 e -7 Assay Kit*” que detecta as caspases-3 e -7 em sua forma ativa.

Como mostrado na figura 9A, a peçonha bruta da *L. similis*, células tratadas com a peçonha já mostram as enzimas ativadas com 24 horas de tratamento, o resultado do tratamento com 48 horas não apresentou diferença em relação ao tratamento com 24 horas, provavelmente a ativação das enzimas já era máximo no tempo mais curto. Neste ensaio foi medida a intensidade média de fluorescência emitida por cada célula e realizada uma média por grupo, como mostrado no gráfico da Fig. 9B. Os grupos tratados com a peçonha bruta por 24 h e 48 h apresentaram um aumento de 4,8 e 4,4 vezes na intensidade de fluorescência medida respectivamente. Como controle de morte celular foi usada apenas a estaurosporina por 4 horas, uma vez que neste tempo ela já é capaz de ativar a cascata apoptótica.

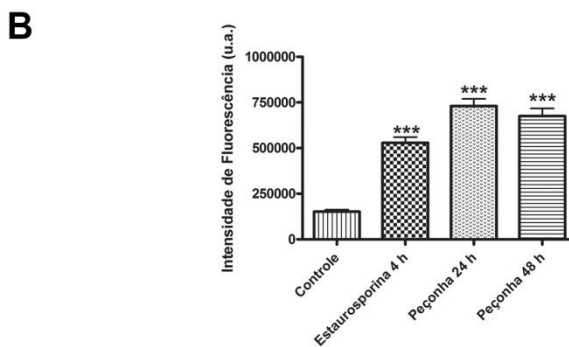
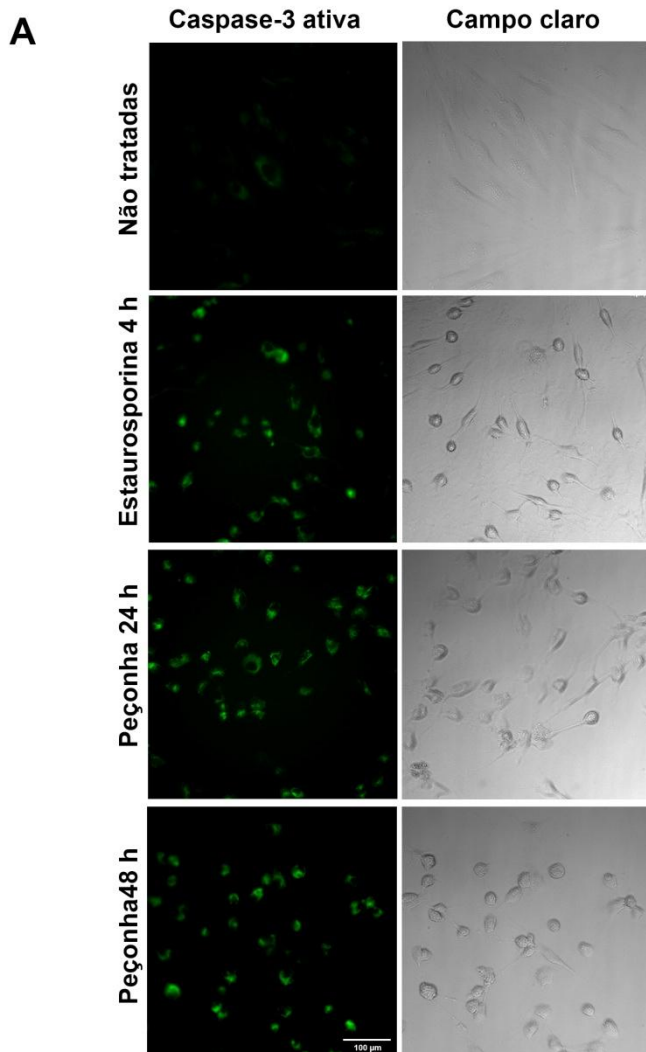


Figura 9: O tratamento com a peçonha de *L. similis* ativa as caspase-3 e 7. **A**, imagens representativas de fibroblastos tratados com estaurosporina por 4 h (n=133), peçonha por 24 h (n=152) e 48 h (n=152) ou não tratados (n=131). As células foram marcadas com Vybrant FAM Caspase-3 e -7 (verde). As imagens de campo claro estão mostradas nos painéis à direita. **B**, O gráfico de barras mostra a quantificação da fluorescência de células marcadas. Todos os grupos foram comparados com o controle (***) $p < 0,001$.

5. Discussão e conclusões

5. Discussão e conclusões

As aranhas do gênero *Loxosceles* são conhecidas por serem espalhadas por todo o globo terrestre. Essas aranhas foram localizadas no Brasil primeiramente em 1898 com a identificação da espécie *Loxoseceles similis* (Moenkhaus, 1898). No Brasil são reportados aproximadamente 10.000 acidentes por ano envolvendo aranhas desse gênero. Sua peçonha é composta por diversas enzimas, dentre elas estão algumas serinoproteases, hialuronidases, metaloproteases e a lisofosfolipase-D, esta última a principal toxina responsável pelos sintomas do loxoscelismo.

O loxoscelismo apresenta como principal sinal clínico uma lesão cutânea, que se inicia com uma reação inflamatória caracterizada por edema ao redor da ferida, seguido por um acúmulo de células inflamatórias, hemorragia na derme e lesão de tecidos cutâneos, com a formação de uma cicatriz negra dentro de algumas semanas. Efeitos sistêmicos, começando por trombocitopenia, hemólise, coagulação intravascular e falência renal ocorrem em 16% dos casos (Futrell, 1992; Sezerino *et al.*, 1998). Mesmo que os sintomas e mecanismos sistêmicos que levam ao quadro clínico geral sejam bem conhecidos, o mecanismo intracelular que ativa os processos de morte gerados pelo veneno ainda foram pouco explorados.

Esta trabalho foi o primeiro estudo a explorar as caspases envolvidas na morte celular em células tratadas com a peçonha bruta de qualquer aranha do gênero *Loxosceles*. Mostramos que o tratamento com a peçonha bruta da aranha *Loxosceles similis* em fibroblastos de pele humana inicia uma cascata de ativação que inclui a caspase iniciadora caspase-9 e as caspases efetoras

caspase-3, 6 e 7. Existem diversos estudos mostrando que a peçonha bruta de aranhas do gênero *Loxosceles* contribui em efeitos citotóxicos em diversos tipos celulares.

A peçonha apresenta efeitos tóxicos em eritrócitos (Chaves-Moreira et al., 2009), queratinócitos (Paixão-Cavalcante et al., 2006) células endoteliais (Nowatzki et al., 2012) e fibroblastos humanos (Horta et al., 2013). Utilizamos o teste de MTT para verificar se o tratamento com a peçonha bruta alteraria a viabilidade celular de diversos tipos de células. Neste teste o reagente de MTT é convertido em formazan pelas mitocôndrias das células, essa conversão de MTT em formazan altera a cor do meio e essa alteração indica o quanto de MTT foi convertido, podendo-se então inferir indiretamente a viabilidade das mitocôndrias das células. Neste estudo não observamos nenhum efeito deletério em algumas das linhagens celulares testadas como por exemplo Skhep-1, Vero e MEF (Fig 4). Esse resultado mostra que mesmo que a peçonha seja rica em diversas enzimas como proteases e fosfolipases ele possui especificidade e provavelmente depende de interações específicas, por exemplo com receptores de membrana, para causar os efeitos característicos do loxoscelismo.

Essa interação pode acontecer na membrana, como mostrado por Nowatzki *et al.* (2010). Nesse estudo a peçonha bruta de *L. intermedia* foi testada para interações na membrana da célula. Foi mostrado que o veneno interage com a membrana e é endocitado em células endoteliais, embora a peçonha tenha sido encontrada dentro de lisossomos no interior da célula, nenhum dano à estrutura dessa organela foi detectado, indicando que a citotoxicidade da peçonha não é dependente de rompimento lisossomal.

Em nosso estudo utilizamos dois métodos para investigar a ativação de caspases em células tratadas com a peçonha bruta da aranha *L. similis*. O primeiro foi a citometria de fluxo. Utilizando as marcações de anexina-V para apoptose e iodeto de propídeo para necrose, tratamos as células com a peçonha bruta e com inibidores de caspase permeáveis à membrana celular que inibiram as caspases-4, -6 e -9 e verificamos se a inibição dessas caspases diminuiria a marcação para esses dois tipos de morte celular. O segundo ensaio verificou a ativação das caspases efetoras-3 e -7, neste ensaio tratamos as células com a peçonha bruta e utilizamos o “*Vybrant FAM Caspase-3 and -7 Assay Kit*” para marcação das enzimas em seu estado ativo.

Já que detectamos a ativação de diversas caspases que participam da via intrínseca da apoptose (Figs. 8 e 9) e essas caspases podem ser ativadas através de interações extra-celulares devido à existência de sinalização cruzada entre as vias intrínseca e extrínseca, nós hipotetizamos que a peçonha interage com a membrana celular, ative a caspase-8 através das proteínas adaptadoras ativadas pelos receptores de membrana, a caspase-8 ativada, causará a liberação do citocromo C pela mitocôndria (Ulukaya et al., 2011), levando à ativação do apoptossomo e a caspase iniciadora-9, gerando então uma cascata proteolítica que leva à subsequente ativação das caspases efetoras -3, -6 e -7 (Kulikov et al., 2012; Slee et al., 1999).

Nosso resultado do cálculo de EC50 é semelhante ao de outros estudos com a peçonha de aranhas do gênero *Loxosceles in vitro* (Nowatzki et al., 2010; Nowatzki et al., 2012). Entretanto, nas figuras 6 e 7 podemos perceber uma grande diferença na porcentagem de células marcadas para apoptose com os marcadores YO-PRO[®]-1 e a anexina-V. Postulamos que essa

diferença pode ser explicada por dois fatores, o primeiro é que a anexina-V é um marcador muito mais específico para apoptose quando comparada ao YO-PRO®-1, como indicada pelo Comitê de Nomenclatura para Morte Celular como um método de detecção de apoptose (Kroemer *et al*, 2009). A segunda razão possível para a diferença entre os dois métodos é a quantidade de células semeadas para cada ensaio. Para o ensaio no microscópio de fluorescência foram plaqueadas 5×10^4 células, enquanto para os ensaios de citometria foram plaqueadas 10^5 células, o mesmo número que utilizamos para estabelecer o EC50 no ensaio de MTT, assim um menor número de células sofreria uma maior ação tóxica da peçonha, justificando uma maior marcação para apoptose no ensaio de microscopia.

No ensaio para verificar a ativação das caspases efetoras caspase-3 e 7, não houve diferença entre os grupos tratados com a peçonha por 24 e 48 horas, indicando que provavelmente a ativação da via apoptótica já era máxima com o tempo de 24 horas. Neste ensaio foi semeado o mesmo número de células do ensaio YO-PRO e iodeto de propídeo, dessa forma já era esperada uma resposta apoptótica massiva já que o número de células para este ensaio é a metade do número de células utilizadas para a determinação do EC50 nos ensaios de citometria.

Postulamos ainda que a inflamação gerada *in vivo* pela peçonha da aranha pode ser explicada em parte pelo mesmo modelo que utilizamos como um controle de dupla marcação na figura 6. Hipotetizamos que a ativação da apoptose pela ação do veneno é tão massiva *in vivo* que os macrófagos não são capazes de fagocitar todas as células que iniciaram o processo ativando uma necrose secundária, na qual a membrana perde sua integridade e há um

vazamento de conteúdo intracelular, estimulando reações inflamatórias do organismo.

Neste trabalho encontramos também evidência de que a peçonha bruta pode ativar apoptose através da via de stress do retículo endoplasmático, já que a inibição da caspase-4 diminuiu a porcentagem de células marcadas com anexina-V, Iodeto de Propídeo ou duplo marcadas (Fig.8A), entretanto existem estudos que demonstram que essa caspase pode não ser essencial na ativação dessa via, portanto a participação das caspase-4 na apoptose através da via de stress do retículo endoplasmático é controversa. A caspase-4 está ainda associada com outros processos como piroptose, ativação do inflamassomo via caspase-1 (Hitomi *et al.* 2004; Pelletier *et al.* 2006; Sollberger *et al.* 2012). Mais estudos serão necessários para demonstrar o papel do veneno de *Loxosceles* com as vias relacionadas com a ativação de caspase-4.

A atuação da caspase-4 pode estar associada *in vivo* não apenas a processos de morte celular, já que estudos mostram que ela participa da ativação da caspase-1 (Sollberger *et al.*, 2012), principal caspase relacionada ao inflamassomo (Iversen & Johansen, 2008). Dessa forma a caspase-4 pode ser também parte da geração das características inflamatórias relacionadas à picada da aranha marrom, como o recrutamento de neutrófilos (Barbaro *et al.*, 2010) e a liberação de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (Horta *et al.*, 2013).

Todos os tratamentos com inibidores de caspase diminuíram a marcação com anexina-V e aumentaram a porcentagem de células não marcadas, indicando que a inibição das caspases impediu a exposição da fosfatidilserina

na membrana celular, isto é um forte indicativo de que a inibição dessas enzimas foi capaz de impedir ou pelo menos atrasar o início do processo apoptótico.

Considerando que a peçonha bruta da aranha é uma mistura de diversas toxinas é esperado que diversas vias de morte celular sejam ativadas. Nowatzki et al. (2012) mostrou que o tratamento com a peçonha bruta de *L. intermedia* inicia um processo de anoikis em células endoteliais de aorta torácica de coelhos (RAECs). Em eritrócitos, a lisofosfolipase-D da aranha marrom induz o metabolismo de fosfolípidos de membrana, como a esfingomiéline e lisofosfatidilcolina, gerando produtos bioativos que estimulam o influxo de cálcio mediado por canais do tipo L (Chaves-Moreira et al., 2011). Em queratinócitos humanos, Paixão-Cavalcante et al. (2006) mostraram que a lisofosfolipase-D de *Loxosceles* induz apoptose associada a um aumento de da expressão de metaloproteinase-2 e 9. Tetraciclina, um inibidor de metaloproteinase, reduz a expressão de metaloproteinase-2 e impede a indução de metaloproteinase-9 em amostra de peles de coelhos.

Em outro estudo, o tratamento com tetraciclina atópica em coelhos inoculados com a peçonha bruta da aranha *L. intermedia* ou com a lisofosfolipase-D da mesma aranha, tiveram o progresso da lesão necrótica reduzido (Paixão-Cavalcante et al., 2007). Portanto, existem provavelmente diversos mecanismos ativados pela peçonha e seus componentes que podem iniciar o processo de morte celular, assim estudos mais profundos utilizando os componentes isolados são necessários para verificar qual via de morte celular é ativada por cada componente.

Nós realizamos ainda testes para verificar se o tratamento com a peçonha bruta induziria alguma resposta de cálcio nos fibroblastos humanos. Foram realizados testes para analisar respostas crônicas, incubando as células com a peçonha por até 5 h e de resposta aguda, incubando por até 5 minutos, em nenhum dos casos a peçonha induziu alguma resposta de cálcio (dado não mostrado) como foi mostrado em eritrócitos por Chaves-Moreira *et al.* (2011).

Portanto, este estudo apresentou dados que avançam o entendimento do mecanismo de ação da peçonha bruta da aranha *Loxosceles similis*. Nós apresentamos resultados que indicam que fibroblastos humanos provenientes da pele tratados com a peçonha da aranha *L. similis* iniciam um processo de morte celular caspase dependente com a ativação da caspase iniciadora caspase-9 e das caspases efetoras 3, 6 e 7. A inibição dessas caspases foi capaz de impedir ou atrasar o início do processo apoptótico.

6. Referências bibliográficas

6. Referências bibliográficas

ABDULKADER, R.C.; BARBARO, K.C.; BARROS, E.J.; BURDMANN, E.A. 2008. Nephrotoxicity of insect and spider venoms in Latin America. *Semin Nephrol.* v. 28, n. 4, p. 373-382.

ACEHAN D, JIANGX, MORGAN DG, HEUSER JE, WANGX, AKEY CW. 2002. Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol Cell* 9: 423–432.

ANDRADE, R.M.G.; GALATI, E.A.B.; TAMBOURGI, D.V. 2001 Presença de *Loxosceles similis* Moenkhaus, 1898 (Araneae, Sicariidae) na Serra da Bodoquena, Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* v. 34, n. 3, p. 275-277.

ALARCON-CHAIDEZ, F. J., BOPPANA, V. D., HAGYMASI, A T., ADLER, A J., & WIKEL, S. K. 2009. A novel sphingomyelinase-like enzyme in *Ixodes scapularis* tick saliva drives host CD4 T cells to express IL-4. *Parasite immunology*, 31(4), 210–9

ALNEMRI, E.S., LIVINGSTON, D.J., NICHOLSON, D.W., SALVESEN, G., THORNBERRY, N.A., WONG, W.W., YUAN, J., 1996. Human ICE/CED-3 protease nomenclature [letter]. *Cell*. 87, 171.

ÁLVARES, E.S.S.; RODRIGUES, T.; DE MARIA, M. 2004. On *Loxosceles anomala* (Mello-Leitão) (Araneae: Sicariidae). *Revista Ibérica de Aracnología*. v. 10, p. 293-295.

ANDERSEN, R.J.; CAMPOLI, J.; JOHAR, S.K.; SCHUMACHER, K.A.; ALLISON, E.J.JR. 2011. Suspected brown recluse envenomation: a case report and review of different treatment modalities. *J Emerg Med.* v. 41, n. 2, p. e31-37,.

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. 2008. Identification, cloning and functional characterization of a novel dermonecrotic toxin (phospholipaseD) from brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. *Biochim Biophys Acta*. v. 1780, n. 2, p. 167-178.

ARAUJO, S.C.; CASTANHEIRA, P.; ALVARENGA, L.M.; MANGILI, O.C.; KALAPOTHAKIS, E.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. 2003. Protection against dermonecrotic and lethal activities of *Loxosceles intermedia* spider venom by immunization with a fused recombinant protein. *Toxicon*. v. 41, n. 3, p. 261-267.

ALSAFADI S, TOURPIN S, ANDRE F, VASSAL G, AHOMADEGBE JC. 2009 P53 family: At the crossroads in cancer therapy. *curr med chem*; 16: 4328–4344.

BAEHRECKE EH. 2002. How death shapes life during development. *Nat Rev Mol Cell Biol*;3:779–787.

BARBADO M, FABLET K, RONJAT M, DE WAARD M. 2009. Gene regulation by voltage-dependent calcium channels. *Biochim Biophys Acta*; 1793: 1096–1104.

BARBARO, K.C.; FERREIRA, M.L.; CARDOSO, D.F.; EICKSTEDT, V.R.; MOTA, I. 1996 Identification and neutralization of biological activities in the venoms of *Loxosceles* spiders. *Braz J Med Biol Res*. v. 29, n. 11, p. 1491-1497.

BARBARO, K.C., CARDOSO, J.L.C., 2003. Mecanismo de ação do veneno de *Loxosceles* e aspectos clínicos do loxoscelismo. In: Cardoso, J.L.C., França, F.O.S., Wen, F.H., Málaque, C.M.S., Haddad Jr., V. (Eds.), *Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos acidentes*. Savier, São Paulo, pp. 160–174.

BARBARO, K.C., KNYSAK, I., MARTINS, R., HOGAN, C., WINKEL, K., 2005. Enzymatic characterization, antigenic cross-reactivity and neutralization of dermonecrotic activity of five *Loxosceles* spider venoms of medical importance in the Americas. *Toxicon* 45 (4), 489–499.

BARKLA DH, GIBSON PR. 1999. The fate of epithelial cells in the human large intestine. *Pathology*;31:230–238.

BARRETT, S.M.; ROMINE-JENKINS, M.; BLICK, K.E. 1993. Passive hemagglutination inhibition test for diagnosis of brown recluse spider bite envenomation. *Clin Chem*. v. 39, n. 10, p. 2104-2107.

BARRETTO, O.C.; CARDOSO, J.L.; DE CILLO, D. 1985. Viscerocutaneous form of loxoscelism and erythrocyte glucose-6-phosphate deficiency. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. v. 27, n. 5, p. 264-267.

BINFORD, G.J.; CORDES, M.H.; WELLS, M.A. 2005. Sphingomyelinase D from venoms of *Loxosceles* spiders: evolutionary insights from cDNA sequences and gene structure. *Toxicon*. v. 45, n. 5, p. 547-560.

BORCHANI, L., SASSI, A., SHAHBAZZADEH, D., STRUB, J.-M., TOUNSI-GUETTETI, H., BOUBAKER, M. S., ... EL AYEB, M. 2011. Heminecrolysin, the first hemolytic dermonecrotic toxin purified from scorpion venom. *Toxicon*, 58(1), 130–139.

BRECKENRIDGE DG, GERMAIN M, MATHAI JP, NGUYEN M, SHORE GC. 2003. Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways. *Oncogene*; 22: 8608–8618.

CATALÁN, A.; CORTES, W.; SAGUA, H.; GONZÁLEZ, J.; ARAYA, J.E. 2011. Two new phospholipase D isoforms of *Loxosceles laeta*: cloning, heterologous expression, functional characterization, and potential biotechnological application. *J Biochem Mol Toxicol*. v. 25, n. 6, p. 393-403.

CHAIM, O.M., SADE, Y.B., DA SILVEIRA, R.B., TOMA, L., KALAPOTHAKIS, E., CHAVEZ- OLORTEGUI, C., MANGILI, O.C., GREMSKI,W., VON DIETRICH, C.P., NADER, H.B., SANCHES VEIGA, S., 2006. Brown spider dermonecrotic toxin directly induces nephrotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 211 (1), 64–77.

CHAIM, O.M.; DA SILVEIRA, R.B.; TREVISAN-SILVA, D.; FERRER, V.P.; SADE, .YB.; BÓIA-FERREIRA, M.; GREMSKI, L.H.; GREMSKI, W.; SENFF-RIBEIRO, A.; TAKAHASHI, H.K.; TOLEDO, M.S.; NADER, H.B.; VEIGA, S.S. 2011. Phospholipase-D activity and inflammatory response induced by brown spider dermonecrotic toxin: endothelial cell membrane phospholipids as targets for toxicity. *Biochim Biophys Acta.* v. 1811, n. 2, p. 84-96.

CHATZAKI, M, C C HORTA, M O ALMEIDA, N B PEREIRA, T M MENDES, C DIAS-LOPES, G GUIMARÃES, L MORO, C CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, M C R HORTA, AND E KALAPOTHAKIS. 2012. “Cutaneous Loxoscelism Caused by *Loxosceles Similis* Venom and Neutralization Capacity of Its Specific Antivenom.” *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology* 60(1): 21–30.

CHAVES-MOREIRA, DANIELE, OLGA M CHAIM, YOUSSEF B SADE, KÁTIA S PALUDO, LUIZA H GREMSKI, LUCÉLIA DONATTI, JULIANA DE MOURA, OLDEMIR C MANGILI, WALDEMIRO GREMSKI, RAFAEL B DA SILVEIRA, ANDREA SENFF-RIBEIRO, AND SILVIO S VEIGA. 2009. “Identification of a Direct Hemolytic Effect Dependent on the Catalytic Activity Induced by Phospholipase-D (dermonecrotic Toxin) from Brown Spider Venom.” *Journal of cellular biochemistry* 107(4): 655–66.

CHAVES-MOREIRA, DANIELE, FERNANDA N SOUZA, ROSALVO T H FOGAÇA, OLDEMIR C MANGILI, WALDEMIRO GREMSKI, ANDREA SENFF-RIBEIRO, OLGA M CHAIM, AND SILVIO S VEIGA. 2011. “The Relationship Between Calcium and the Metabolism of Plasma Membrane Phospholipids in Hemolysis Induced by Brown Spider Venom Phospholipase-D Toxin.” *Journal of cellular biochemistry* 112(9): 2529–40.

CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C.; ZANETTI, V.C.; FERREIRA, A.P.; MINOZZO, J.C.; MANGILI, O.C.; GUBERT, I.C. 1998. ELISA for the detection of venom antigens in experimental and clinical envenoming by *Loxosceles intermedia* spiders. *Toxicon*. v. 36, n. 4, p. 563-569.

CHOWDHURY, I., THARAKAN, B., BHAT, G.K., 2006. Current concepts in apoptosis: the physiological suicide program revisited. *Cell Mol. Biol. Lett.* 11, 506–525

CHOWDHURY, I., THARAKAN, B., & BHAT, G. K. 2008. Caspases - an update. *Comparative biochemistry and physiology Part B Biochemistry molecular biology*, 151(1), 10–27.

COHEN GM. 1997. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J*;326(Part 1):1–16.

CUNHA, R.B., BARBARO, K.C., MURAMATSU, D., PORTARO, F.C., FONTES, W., DE SOUSA, M.V., 2003. Purification and characterization of loxnecrogin, a dermonecrotic toxin from *Loxosceles gaucho* brown spider venom. *J. Protein Chem.* 22 (2), 135–146.

DA SILVA, PAULO HENRIQUE, RAFAEL BERTONI DA SILVEIRA, MÁRCIA HELENA APPEL, OLDEMIR CARLOS MANGILI, WALDEMIRO GREMSKI, AND SILVIO SANCHES VEIGA. 2004. “Brown Spiders and Loxoscelism.” *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology* 44(7): 693–709.

DA SILVEIRA, R.B.; FILHO, J.F.S.; MANGILI, O.C.; VEIGA, S.S.; GREMSKI, W.; NADER, H.B.; DIETRICH, C.P. 2002. Identification of proteases in the extract of venom glands from brown spiders. *Toxicon*. v. 40, p. 815–822.

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. 2006. Molecular cloning and functional

characterization of two isoforms of dermonecrotic toxin from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom gland. *Biochimie*. v. 88, n. 9, p. 1241-1253.

DA SILVEIRA, R.B., CHAIM, O.M., MANGILI, O.C., GREMSKI, W., DIETRICH, C.P., NADER, H.B., VEIGA, S.S., 2007a. Hyaluronidases in *Loxosceles intermedia* (Brown spider) venom are endo-beta-N-acetyl-d-hexosaminidases hydrolases. *Toxicon* 49 (6), 758–768.

DA SILVEIRA, R.B., WILLE, A.C., CHAIM, O.M., APPEL, M.H., SILVA, D.T., FRANCO, C. R., TOMA, L., MANGILI, O.C., GREMSKI, W., DIETRICH, C.P., NADER, H.B., VEIGA, S.S., 2007b. Identification, cloning, expression and functional characterization of an astacin-like metalloprotease toxin from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. *Biochem. J.* 406 (2), 355– 363.

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., 2007c. Two novel dermonecrotic toxins LiRecDT4 and LiRecDT5 from brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom: from cloning to functional characterization. *Biochimie* 89 (3), 289–300.

DANIAL NN, KORSMEYER SJ. 2004. Cell death: critical control points. *Cell*;116:205–219.

DE GIUSEPPE, P.O.; ULLAH, A.; SILVA, DT.; GREMSKI, L.H.; WILLE, A.C.; CHAVES-MOREIRA, D.; RIBEIRO, A.S.; CHAIM, O.M; MURAKAMI, M.T.; VEIGA, SS.; ARNI, R.K. 2011. Structure of a novel class II phospholipase D: catalytic cleft is modified by a disulphide bridge. *Biochem Biophys Res Commun.* v. 409, n. 4, p. 622-627.

DE GRAAF AO, VAN DEN HEUVEL LP, DIJKMAN HB, DE ABREU RA, BIRKENKAMP KU, DE WITTE T, ET AL. 2004. Bcl-2 prevents loss of mitochondria in CCCP-induced apoptosis. *Exp Cell Res*;299:533–540.

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

DE SANTI-FERRARA, G.I.; FERNANDES-PEDROSA, M.F.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I.L.; GONÇALVES-DE-ANDRADE, R.M.; PORTARO, F.C.; MANZONI-DE-ALMEIDA, D.; MURAKAMI, M.T.; ARNI, R.K.; VAN DEN BERG, C.W.; HO, P.L.; TAMBOURGI, D.V. 2009. SMase II, a new sphingomyelinase D from *Loxosceles laeta* venom gland: molecular cloning, expression, function and structural analysis. *Toxicon*. v. 53, n. 7-8, p. 743-753.

DE SOUZA, G.A.; RIBEIRO, A.S.; SANTOS, V.L.P.; VEIGA, S.S.; MANGILI, O.C.; GREMSKI, W. 1998. Proteolytic effect of *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom proteins on EHS-basement membrane structures. *Acta Biologica Paranaense*. v. 27, p. 97-109.

DEGTEREV A, BOYCE M, YUAN J. 2003. A decade of caspases. *Oncogene* 22: 8543–8567

DENECKER, G., HOSTE, E., GILBERT, B., HOICHEPIED, T., OVAERE, P., LIPPENS, S., VAN DEN BROECKE, C., VAN DAMME, P., D'HERDE, K., HACHEM, J. P., BOR-GONIE, G., PRESLAND, R. B., SCHOONJANS, L., LIBERT, C., VANDEKERCKHOVE, J., GEVAERT, K., VANDENABEELE, P., AND DECLERCQ, W. 2007 Caspase-14 protects against epidermal UVB photodamage and water loss. *Nat. Cell Biol.* 9, 666–674

DYACHENKO, P.; ZIV, M.; ROZENMAN, D. 2006 Epidemiological and clinical manifestations of patients hospitalized with brown recluse spider bite. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. v. 20, n. 9, p. 1121-1125.

DIAZ, J.H.; LEBLANC. K.E. 2007. Common spider bites. *Am Fam Physician*. v. 75, n. 6, p. 869-873.

ESKAFI, F.M.; NORMENT, B.R. 1976. Physiological action of *Loxosceles reclusa* venom on insect larvae. *Toxicon*. v. 14, p. 7–12.

EVAN GI, WYLLIE AH, GILBERT CS, et al 1992. Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell*; 69: 119–128.

FEITOSA, L., GREMSKI, W., VEIGA, S.S., ELIAS, M.C., GRANER, E., MANGILI, O.C., BRENTANI, R.R., 1998. Detection and characterization of metalloproteinases with gelatinolytic, fibronectinolytic and fibrinogenolytic activities in brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. *Toxicon* 36 (7), 1039–1051.

FELICORI, L.; ARAUJO, S.C.; DE AVILA, R.A.; SANCHEZ, E.F.; GRANIER, C.; KALAPOTHAKIS, E.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. 2006. Functional characterization and epitope analysis of a recombinant dermonecrotic protein from *Loxosceles intermedia* spider. *Toxicon*. v. 48, n. 5, p. 509-519.

FERREIRA, R.L.; MARTINS, R.P.; YANEGA, D. 2000. Ecology of bat guano arthropod communities in a Brazilian dry cave. *Ecotropica*. v. 6, p. 105–115,.

FERNANDES PEDROSA, M.F.; JUNQUEIRA DE AZEVEDO, I.L.; GONÇALVES-DE-ANDRADE, R.M.; VAN DEN BERG, C.W.; RAMOS, C.R.; HO, P.L.; TAMBOURGI, D.V. 2002. Molecular cloning and expression of a functional dermonecrotic and haemolytic factor from *Loxosceles laeta* venom. *Biochem Biophys Res Commun*. v. 298, n. 5, p. 638-645.

FERNANDES-PEDROSA, M.F.; JUNQUEIRA DE AZEVEDO, I.L.; GONÇALVES DE ANDRADE, R.M.; KOBASHI, L.S.; ALMEIDA, D.D.; HO, P.L.; TAMBOURGI, D.V. 2008. Transcriptome analysis of *Loxosceles laeta* (Araneae, Sicariidae) spider venomous gland using expressed sequence tags. *BMC Genomics*. v. 9, p. 279.

FERREIRA, R.L.; PROUS, X.; MACHADO, S.F.; MARTINS, R.P. 2005. Population dynamics of *Loxosceles similis* (Moenkhaus, 1898) in a Brazilian dry cave: a new method for evaluation of population size. *Rev. Bras. Zoo.* v. 7, p. 129–141.

FORRESTER, L.J.; BARRETT, J.T.; CAMPBELL, B.J. 1978. Red blood cell lysis induced by the venom of the brown recluse spider. *Arch. Biochem. Biophys.* v. 187, n. 2, p. 355-365.

FUTRELL, J., 1992. Loxoscelism. *Am. J. Med. Sci.* 304, 261–267.

GERTSCH, W.J., 1967. The spider genus *Loxosceles* in South America (Araneae, Scytodidae). *Bull. Am. Museum Nat. Hist.* 136, 117–174.

GEREN, C.R.; CHAN, T.K.; HOWELL, D.E.; ODELL, G.V. 1976. Isolation and characterization of toxins from brown recluse spider venom (*Loxosceles reclusa*). *Arch. Biochem. Biophys.* v. 174, p. 90–99.

GALIANO, M.E.; HALL, M. 1973. Datos adicionales sobre el ciclo vital de *Loxosceles laeta* (Nicolet, 1849) (Araneae). *Physis.* v. 32, n. 85, p. 277–288,.

GALLUZZI L, JOZA N, TASDEMIR E, MAIURI MC, HENGARTNER M, ABRAMS JM, ET AL. 2008. No death without life: vital functions of apoptotic effectors. *Cell Death Differ*;15:1113–1123.

GALLUZZI, L, I VITALE, J M ABRAMS, E S ALNEMRI, E H BAEHRECKE, M V BLAGOSKLONNY, T M DAWSON, V L DAWSON, W S EL-DEIRY, S FULDA, E GOTTLIEB, D R GREEN, M O HENGARTNER, O KEPP, R A KNIGHT, S KUMAR, S A LIPTON, X LU, F MADEO, W MALORNI, P MEHLEN, G NUÑEZ, M E PETER, M PIACENTINI, D C RUBINSZTEIN, Y SHI, H-U SIMON, P VANDENABEELE, E WHITE, J YUAN, B ZHIVOTOVSKY, G MELINO, AND G KROEMER. 2012. “Molecular Definitions of Cell Death Subroutines: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death.” *Cell death and differentiation* 19(1): 107–20.

GARRIDO C, KROEMER G. 2004. Life's smile, death's grin: vital functions of apoptosis-executing proteins. *Curr Opin Cell Biol*;16:639–646.

GERSHONI M, TEMPLETON AR, MISHMAR D. 2009. Mitochondrial bioenergetics as a major motive force of speciation. *BioEssays*; 31: 642–650.

GIRISH, K.S.; KEMPARAJU, K. 2007. The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: a biological overview. *Life Sci.* v. 80, n. 21, p. 1921-1943.

GIRISH, K.S.; KEMPARAJU, K.; NAGARAJU, S.; VISHWANATH, B.S. 2009. Hyaluronidase inhibitors: a biological and therapeutic perspective. *Curr Med Chem.* v. 16, n. 18, p. 2261-2288.

GOMES, M.T.; GUIMARÃES, G.; FRÉZARD, F.; KALAPOTHAKIS, E.; MINOZZO, J.C.; CHAIM, O.M.; VEIGA, S.S.; OLIVEIRA, S.C.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. 2011. Determination of sphingomyelinase-D activity of *Loxosceles* venoms in sphingomyelin/cholesterol liposomes containing horseradish peroxidase. *Toxicon.* v. 57, n. 4, p. 574-579.

GONÇALVES DE ANDRADE, R.M.; DE OLIVEIRA, K.C.; GIUSTI, A.L.; DIAS DA SILVA, W.; TAMBOURGI, D.V. 1999. Ontogenetic development of *Loxosceles intermedia* spider venom. *Toxicon.* v. 37, n. 4, p. 627-632.

GREEN D, KROEMER G. 1998. The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria? *Trends Cell Biol*;8:267–271.

GREEN DR, KROEMER G. 2004. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science*;305:626–629.

GREMSKI, L.H.; DA SILVEIRA, R.B.; CHAIM, O.M.; PROBST, C.M.; FERRER, V.P.; NOWATZKI, J.; WEINSCHUTZ, H.C.; MADEIRA, H.M.; GREMSKI, W.; NADER, H.B.; SENFF-RIBEIRO, A.; VEIGA, S.S. 2010. A novel expression

profile of the *Loxosceles intermedia* spider venomous gland revealed by transcriptome analysis. *Mol Biosyst.* v. 6, n. 12, p. 2403-2416.

GROSS A, MCDONNELL JM, KORSMEYER SJ. 1999. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 13: 1899–1911.

GUIMARÃES, G, C DIAS-LOPES, C G DUARTE, L FELICORI, R A MACHADO DE AVILA, L F M FIGUEIREDO, J DE MOURA, B T FALEIRO, J BARRO, K FLORES, W SILVA, B TINTAYA, A YARLEQUE, C BONILLA, E KALAPOTHAKIS, C E SALAS, AND C CHÁVEZ-OLORTEGUI. 2013. “Biochemical and Immunological Characteristics of Peruvian *Loxosceles Laeta* Spider Venom: Neutralization of Its Toxic Effects by Anti-Loxoscelic Antivenoms.” *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology* 70: 90–97.

HARDY JA, LAM J, NGUYEN JT, O'BRIEN T, WELLS JA., 2004. Discovery of an allosteric site in the caspases. *Proc Natl Acad Sci USA*; 101: 12461–12466.

HEITZ, J.R.; NORMENT, B.R. 1974. Characteristics of an alkaline phosphatase activity in brown recluse venom. *Toxicon.* v. 12, n. 2, p. 181–187.

HOETELMANS RW, VAHRMEIJER AL, VAN VLIERBERGHE RL. 2003. The role of various Bcl-2 domains in the anti-proliferative effect and modulation of cellular glutathione levels: a prominent role for the BH4 domain. *Cell Prolif*; 36:35–44.

HOGAN, C.J.; BARBARO, K.C.; WINKEL, K. 2004. Loxoscelism: old obstacles, new directions. *Ann Emerg Med.* v. 44, n. 6, p. 608-624.

HORTA, CAROLINA C R, BÁRBARA B R OLIVEIRA-MENDES, ANDERSON O DO CARMO, FLÁVIA F SIQUEIRA, TATIANA M BARROCA, SAMYRA M DOS SANTOS NASSIF LACERDA, PAULO H DE ALMEIDA CAMPOS, LUIZ R DE FRANÇA, RODRIGO L FERREIRA, AND EVANGUEDES KALAPOTHAKIS. 2013. “Lysophosphatidic Acid Mediates the Release of Cytokines and

Chemokines by Human Fibroblasts Treated with *Loxosceles* Spider Venom.” *The Journal of investigative dermatology* 133(6): 1682–85.

ISBISTER, G.K.; VETTER, R.S. 2005. Loxoscelism and necrotic arachnidism: more myths and minor corrections. *Ann Emerg Med.* v. 46, n. 2, p. 205-206.

ISBISTER, G.K.; FAN, H.W. 2011. Spider bite. *Lancet.* v. 378, n. 9808, p. 2039-2047.

JANICKE RU, NG P, SPRENGART ML, PORTER AG. 1998. Caspase-3 is required for alpha-fodrin cleavage but dispensable for cleavage of other death substrates in apoptosis. *J Biol Chem*; 273: 15540–15545.

JONG, Y.S.; NORMENT, B.R.; HEITZ, J.R. 1979. Separation and characterization of venom components in *Loxosceles reclusa*-II. Protease enzyme activity. *Toxicon.* v. 17, n. 6, p. 529–537.

KALAPOTHAKIS, E.; ARAUJO, S.C.; DE CASTRO, C.S.; MENDES, T.M.; GOMEZ, M.V.; MANGILI, O.C.; GUBERT, I.C.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. 2002. Molecular cloning, expression and immunological properties of LiD1, a protein from the dermonecrotic family of *Loxosceles intermedia* spider venom. *Toxicon.* v. 40, n. 12, p. 1691-1699.

KALAPOTHAKIS, E.; CHATZAKI, M.; GONÇALVES-DORNELAS, H.; DE CASTRO, C.S.; SILVESTRE, F.G.; LABORNE, F.V.; DE MOURA, J.F.; VEIGA, S.S.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C.; GRANIER, C.; BARBARO, K.C. 2007. The Loxtox protein family in *Loxosceles intermedia* (Mello-Leitão) venom. *Toxicon.* v. 50, n. 7, p. 938-946.

KAUFMANN, T, A STRASSER, AND P J JOST. 2012. “Fas Death Receptor Signalling: Roles of Bid and XIAP.” *Cell death and differentiation* 19(1): 42–50.

KERR JFR, WYLLIE AH, CURRIE AR., 1972. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*;26:239–257.

KERR JFR, WINTERFORD CM, HARMON BV., 1994. Apoptosis: its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer*;73:2013–2026.

KISCHKEL FC, LAWRENCE DA, CHUNTHARAPAI A, et al 2000. Apo2L/TRAIL- dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5. *Immunity*; 12: 611–620

KLEINER, D.E.; STELER-STEVENSON, W.G. 1993. Structural biochemistry and activation of matrix metalloproteases. *Curr. Opin. Cell Biol.* v. 5, p. 891–897.

KREIL, G. 1995. Hyaluronidases - A group of neglected enzymes. *Prot. Sci.* v. 4, p. 1666–1669.

KROEMER G, GALLUZZI L, BRENNER C. 2007. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev*;87:99–163.

Kroemer, G, L Galluzzi, P Vandenabeele, J Abrams, E S Alnemri, E H Baehrecke, M V Blagosklonny, W S El-Deiry, P Golstein, D R Green, M Hengartner, R A Knight, S Kumar, S A Lipton, W Malorni, G Nunez, M E Peter, J Tschopp, J Yuan, M Piacentini, B Zhivotovsky, and G Melino. 2008. "Classification of Cell Death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009." *Cell Death Differ* 16(1): 3–11.

KRYWKO, D.M.; GOMEZ, H.F. 2002. Detection of *Loxosceles* species venom in dermal lesions: A comparison of 4 venom recovery methods. *Ann Emerg Med.* v. 39, p. 475–480.

KULIKOV, A V, E S SHILOV, I A MUFAZALOV, V GOGVADZE, S A NEDOSPASOV, AND B ZHIVOTOVSKY. 2012. "Cytochrome c: The Achilles' Heel in Apoptosis." *Cellular and molecular life sciences CMLS* 69(11): 1787–97.

KUMAR, S., VAUX, D.L., 2002. Apoptosis. A cinderella caspase takes center stage. *Science* 297, 1290–1291.

KURPIEWSKI, G.; FORRESTER, L.J.; BARRETT, J.T.; CAMPBELL, B.J 1981. Platelet aggregation and sphingomyelinase D activity of a purified toxin from the venom of *Loxosceles reclusa*. *Biochim. Biophys. Acta.* v. 678, n. 3, p. 467–476.

LACASSE EC, BAIRD S, KORNELUK RG, MACKENZIE AE. 1998. The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer. *Oncogene*; 17: 3247–3259.

LABBÉ, K, AND M SALEH. 2008. "Cell Death in the Host Response to Infection." *Cell death and differentiation* 15(9): 1339–49.

LAKHANI, S.A., MASUD, A., KUIDA, K., PORTER JR, G.A., BOOTH, C.J., MEHAL, W.Z., INAYAT, I., FLAVELL, R.A., 2006. Caspases 3 and 7: key mediators of mitochondrial events of apoptosis. *Science* 311, 847–851

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

MACHADO, É.O., ÁLVARES, É.S.S., DE MARIA, M., KALAPOTHAKIS, E., 2005. Sobre a presença de três espécies de *Loxosceles* Heineken & Lowe (Araneae: Sicariidae) no município de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. *Lundiana* 6, 113–115.

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

MAJNO G, JORIS I., 1995. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol*; 146:3–15.

MÁLAQUE, C.M.S.; CASTRO-VALENCIA, J.E.; CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, F.O.S.; BARBARO, K.C.; FAN, H.W. 2002. Clinical and epidemiological features of definitive and presumed loxoscelism in São Paulo, Brazil. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*. v. 44, n. 3, p. 139-143.

MÁLAQUE, C.M.; SANTORO, M.L.; CARDOSO, J.L.; CONDE, M.R.; NOVAES, C.T.; RISK, J.Y.; FRANÇA, F.O.; DE MEDEIROS, C.R.; FAN, H.W. 2011. Clinical picture and laboratorial evaluation in human loxoscelism. *Toxicon*. v. 58, n. 8, p. 664-671,.

MANRÍQUEZ, J.J.; SILVA, S. 2009. Loxoscelismo cutáneo y cutáneo-visceral: Revisión sistemática. *Rev. chil. infectol*. v.26, n. 5, p. 420-432,.

MARQUES-DA-SILVA, E.; FISCHER, M.L. 2005. Distribuição das espécies do gênero *Loxosceles* Heineken & Lowe, 1835 (Araneae; Sicariidae) no Estado do Paraná. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop*. v. 38, n. 4, p.331-335.

MARTINON, F., HOFMANN, K., TSCHOPP, J., 2001. The pyrin domain: a possible member of the death domain-fold family implicated in apoptosis and inflammation. *Curr. Biol*. 11, R118–R120

MARTINON F, TSCHOPP J. 2004. Inflammatory caspases: linking an intracellular innate immune system to autoinflammatory diseases. *Cell* 117: 561–574.

MATTSON MP, CHAN SL. Calcium orchestrates apoptosis. *Nat Cell Biol* 2003; 5: 1041–1043.

MCGLASSON, D.L.; GREEN, J.A.; STOECKER, W.V.; BABCOCK, J.L.; CALCARA, D.A. 2009 Duration of *Loxosceles reclusa* venom detection by ELISA from swabs. *Clin Lab Sci*. v. 22, n. 4, p. 216-222.

MERCHANT, M.L.; HINTON, J.F.; GEREN, C.R. 1998. Sphingomyelinase D activity of brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*) venom as studied by ³¹P-NMR: effects on the time-course of sphingomyelin hydrolysis. *Toxicon*. v. 36, n. 3. p. 537-545.

MEHLEN P, BREDESEN DE. 2011. Dependence receptors: from basic research to drug development. *Sci Signal*; 4: mr2.

MILLER, M.J.; GOMEZ, H.F.; SNIDER, R.J.; STEPHENS, E.L.; CZOP, R.M.; WARREN, J.S. 2000. Detection of *Loxosceles* venom in lesional hair shafts and skin: application of a specific immunoassay to identify dermonecrotic arachnidism. *Am J Emerg Med*. v. 18, n. 5, p. 626-628.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001. Governo Federal. Brasil. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. 2ª ed. - Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 120p..

MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010 Doenças infecciosas e parasitárias Guia de Bolso.
http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/doencas_infecciosas_parasitaria_guia_bolso.pdf

MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012. Sistema nacional de notificação de agravos. Ministério da Saúde, Brasília, Distrito Federal.

MONTEIRO, C.L.; RUBEL, R.; COGO, L.L.; MANGILI, O.C.; GREMSKI, W.; VEIGA, S.S. 2002. Isolation and identification of *Clostridium perfringens* in the venom and fangs of *Loxosceles intermedia* (brown spider): enhancement of the dermonecrotic lesion in loxoscelism. *Toxicon*. v. 40, n. 4, p. 409-418.

MOSMANN, T. 1983. "Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays." *Journal of immunological methods* 65(1-2): 55–63.

MURAKAMI, M.T.; FERNANDES-PEDROSA, M.F.; TAMBOURGI, D.V.; ARNI, R.K. 2005. Structural basis for metal ion coordination and the catalytic mechanism of sphingomyelinases D. *J Biol Chem.* v. 280, n. 14, p. 13658-13664.

NATHAN C, DING A. 2011. Nonresolving inflammation. *Cell*; 140: 871–882.

NORMENT, B.R.; JONG, Y.S.; J.R. HEITZ. 1979. Separation and characterization of venom components in *Loxosceles reclusa*-III. Hydrolytic enzyme activity. *Toxicon.* v. 17, n. 6, p. 539–548.

NOWATZKI, JENIFER, REGINALDO VIEIRA DE SENE, KATIA SABRINA PALUDO, SILVIO SANCHES VEIGA, CONSTANCE OLIVER, MARIA CÉLIA JAMUR, HELENA BONCIANI NADER, EDVALDO S TRINDADE, AND CÉLIA REGINA C FRANCO. 2010. "Brown Spider Venom Toxins Interact with Cell Surface and Are Endocytosed by Rabbit Endothelial Cells." *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology* 56(4): 535–43.

NOWATZKI, JENIFER, REGINALDO VIEIRA SENE, KATIA SABRINA PALUDO, LUIZ EDUARDO RIZZO, FERNANDO SOUZA-FONSECA-GUIMARÃES, SILVIO SANCHES VEIGA, HELENA BONCIANI NADER, CÉLIA REGINA C FRANCO, AND EDVALDO S TRINDADE. 2012. "Brown Spider (*Loxosceles Intermedia*) Venom Triggers Endothelial Cells Death by Anoikis." *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology* 60(3): 396–405.

OBENG, E. A, & BOISE, L. H. 2005. Caspase-12 and caspase-4 are not required for caspase-dependent endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *The Journal of biological chemistry*, 280(33), 29578–87.

ORRENIUS S, MCCABE MJ, JR., NICOTERA P. 1992. Ca(2+)-dependent mechanisms of cytotoxicity and programmed cell death. *Toxicol Lett*; 64–65 Spec No: 357–364.

P. LI, D. NIJHAWAN, I. BUDIHARDJO, S.M. SRINIVASULA, M. AHMAD, E.S. ALNEMRI, X. WANG, 1997. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91 (4) 479–489.

PAIXÃO-CAVALCANTE, DANIELLE, CARMEN W VAN DEN BERG, MATHEUS DE FREITAS FERNANDES-PEDROSA, RUTE M GONÇALVES DE ANDRADE, AND DENISE V TAMBOURGI. 2006. “Role of Matrix Metalloproteinases in HaCaT Keratinocytes Apoptosis Induced by *Loxosceles* Venom Sphingomyelinase D.” *The Journal of investigative dermatology* 126(1): 61–68.

PAIXÃO-CAVALCANTE, DANIELLE, CARMEN W VAN DEN BERG, RUTE M GONÇALVES-DE-ANDRADE, MATHEUS DE F FERNANDES-PEDROSA, CINTHYA KIMORI OKAMOTO, AND DENISE V TAMBOURGI. 2007. “Tetracycline Protects Against Dermonecrosis Induced by *Loxosceles* Spider Venom.” *The Journal of investigative dermatology* 127(6): 1410–18.

PAULI, I.; PUKA, J.; GUBERT, I.C.; MINOZZO, J.C. 2006. The efficacy of antivenom in loxoscelism treatment. *Toxicon*. v. 48, n. 2, p. 123-137.

PLATNICK, N., 2013. The world spider catalog, ver. 12. Available at: <<http://research.amnh.org/iz/spiders/catalog/INTRO2.html>>(accessed24.10.13)

PORTER, A.G., JANICKE, R.U., 1999. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ.* 6, 99–104

PRETEL, F.; GONÇALVES-DE-ANDRADE, R.M.; MAGNOLI, F.C.; DA SILVA, M.E.; FERREIRA, J.M.JR.; VAN DEN BERG, C.W.; TAMBOURGI, D.V. 2005. Analysis of the toxic potential of venom from *Loxosceles adelaida*, a Brazilian brown spider from karstic areas. *Toxicon*. v. 45, n. 4, p. 449-458.

QUATTROCCHI, C.C.; WANNENES, F.; PERSICO, A.M.; CIAFRÉ, S.A.; D'ARCANGELO, G.; FARACE, M.G.; KELLER, F. 2002. Reelin is a serine protease of the extracellular matrix. *J Biol Chem*. v. 277, n. 1, p. 303-309.

RAMOS-CERRILLO, B.; OLVERA, A.; ODELL, G.V.; PANIAGUA-SOLIS, J.; ALAGO'N, A.; STOCK, R.P. 2004. Genetic and enzymatic characterization of sphingomyelinase D isoforms from the North American fiddleback spiders *Loxosceles boneti* and *Loxosceles reclusa*. *Toxicon*. v. 44, p. 507-514.

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

REKOW, M.A.; CIVELLO, D.J.; GEREN, C.R. 1983. Enzymatic and hemolytic properties of brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*) toxin and extracts of venom apparatus, cephalothorax and abdomen. *Toxicon*. v. 21, n. 3, p. 441–444.

REES, R.S.; GATES, C.; TIMMONS, S.; DES PREZ, R.M.; KING JR., L.E. 1988. Plasma components are required for platelet activation by the toxin of *Loxosceles reclusa*. *Toxicon*. v. 26, n. 11, p. 1035–1045,.

REUBOLD, T.F. & ESCHENBURG, S., 2012. A molecular view on signal transduction by the apoptosome. *Cellular signalling*, 24(7), pp.1420–5.

RIEDL, S. J., & SALVESEN, G. S. 2007. The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 8(5), 405–13.

ROACH HI, CLARKE NM. 2000. Physiological cell death of chondrocytes in vivo is not confined to apoptosis. New observations on the mammalian growth plate. *J Bone Joint Surg Br*;82:601–613.

RODRIGUEZ J, LAZEBNIK Y. 1999. Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. *Genes Dev*; 13: 3179–3184

SALVESEN, G.S., 2002. Caspases and apoptosis. *Essays Biochem.* 38, 9–19

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

SCHENONE, H.; SUAREZ, G. 1978. Venoms of Scytodidae. Genus *Loxosceles*. In: S. Bettini (Ed.). *Handbook of Experimental Pharmacology.* v. 48, Arthropod Venoms. New York: Springer-Verlag. p. 247–275.

SCHENONE, H.; SAAVEDRA, T.; ROJAS, A.; VILLARROEL, F. Loxoscelism in Chile. Epidemiologic, clinical and experimental studies. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* v. 31, n. 6, p. 403-415.

SCHENONE, H.; SANTIAGO, R.A.; SAAVEDRA, T.; ROJAS, A. 1989. Loxoscelismo en pediatría. Región Metropolitana, Chile. *Rev. chil. pediatr.* v. 72, n. 2, 2001.

SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE, Curitiba, Paraná, Brasil. Acidentes Loxoscélicos - Protocolo técnico e fluxo de atenção em Curitiba, 2006. Disponível em:
<http://www.saude.curitiba.pr.gov.br/images/institucional/arquivos/protocolos/protocolo_001.pdf>. Acesso em: 25 out. 2013.

SELUANOV, ANDREI, AMITA VAIDYA, AND VERA GORBUNOVA. 2010. Establishing Primary Adult Fibroblast Cultures from Rodents. *Journal of visualized experiments : JoVE* (44): 1–4.

SEZERINO, U.M., ZANNIN, M., COELHO, L.K., GONC ,ALVES JR., J., GRANDO, M., MATTOSINHO, S.G., CARDOSO, J.L.C., VON EICKSTEDT, V.R., FRANÇA, F.O.S., BARBARO, K.C., FAN, H.W., 1998. A clinical and epidemiological study of Loxosceles spider envenoming in Santa Catarina, Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 92, 546–548.

SLEE, ELIZABETH A, MARY T HARTE, RUTH M KLUCK, BENI B WOLF, CARLOS A CASIANO, DONALD D NEWMAYER, HONG-GANG WANG, JOHN C REED, DONALD W NICHOLSON, EMAD S ALNEMRI, DOUGLAS R GREEN, AND SEAMUS J MARTIN. 1999. “Ordering the Cytochrome c–initiated Caspase Cascade: Hierarchical Activation of Caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a Caspase-9–dependent Manner” *The Journal of Cell Biology* 144(2): 281–92.

SOLLBERGER, GABRIEL, GERHARD E STRITTMATTER, MAGDALENA KISTOWSKA, LARS E FRENCH, AND HANS-DIETMAR BEER. 2012. “Caspase-4 Is Required for Activation of Inflammasomes.” *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 188(4): 1992–2000.

SONGER, J.G. 1997. Bacterial phospholipases and their role in virulence. *TrendsMicrobiol.* v. 5, p. 156-161.

STOCK, R.P.; BREWER, J.; WAGNER, K.; RAMOS-CERRILLO, B.; DUELUND, L.; JERNSHØJ, K.D.; OLSEN, L.F.; BAGATOLLI, L.A. 2012. Sphingomyelinase D activity in model membranes: structural effects of in situ generation of ceramide-1-phosphate. *PLoS One.* v. 7, n. 4, e36003.

S.W. TAIT, D.R. GREEN, 2010. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 11 (9) 621–632

TAMBOURGI, D.V.; MAGNOLI, F.C.; VON EICKSTEDT, V.R.; BENEDETTI, Z.C.; PETRICEVICH, V.L.; DA SILVA, W.D. 1995. 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, n. 9, p. 4459-4466.

TAMBOURGI, D.V.; MAGNOLI, F.C.; VAN DEN BERG, C.W.; MORGAN, B.P.; DE ARAUJO, P.S.; ALVES, E.W.; DIAS DA SILVA, W. 1998. Sphingomyelinases in the venom of the spider *Loxosceles intermedia* are responsible for both dermonecrosis and complement-dependent hemolysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* v. 251, n. 1, p. 366–373.

TAMBOURGI, D.V., DE SOUSA DA SILVA, M., BILLINGTON, S.J., GONCALVES DE ANDRADE, R.M., MAGNOLI, F.C., SONGER, J.G., VAN DEN BERG, C.W., 2002. Mechanism of induction of complement susceptibility of erythrocytes by spider and bacterial sphingomyelinases. *Immunology* 107 (1), 93–101.

TAMBOURGI, D. V, PEDROSA, M. F. F., DE ANDRADE, R. M. G., BILLINGTON, S. J., GRIFFITHS, M., & VAN DEN BERG, C. W. 2007. Sphingomyelinases D induce direct association of C1q to the erythrocyte membrane causing complement mediated autologous haemolysis. *Molecular immunology*, 44(4), 576–82.

TANG, B.L. ADAMTS: 2001. a novel family of extracellular matrix proteases. *Int J Biochem Cell Biol.* v. 33, n. 1, p. 33-44.

TAYLOR, REBECCA C, SEAN P CULLEN, AND SEAMUS J MARTIN. 2008. “Apoptosis: Controlled Demolition at the Cellular Level.” *Nature reviews. Molecular cell biology* 9(3): 231–41.

TREVISAN-SILVA, D.; GREMSKI, L.H.; CHAIM, O.M.; DA SILVEIRA, R.B.; MEISSNER, G.O.; MANGILI, O.C.; BARBARO, K.C.; GREMSKI, W.; VEIGA, S.S.; SENFF-RIBEIRO, A. 2010. Astacin-like metalloproteases are a gene family of toxins present in the venom of different species of the brown spider (genus *Loxosceles*). *Biochimie.* v. 92, n. 1, p. 21-32.

ULUKAYA, ENGIN, CEYDA ACILAN, AND YUSUF YILMAZ. 2011. "Apoptosis: Why and How Does It Occur in Biology?" *Cell biochemistry and function* 29(6): 468–80.

VAN MEETEREN, L.A.; FREDERIKS, F.; GIEPMANS, B.N.; PEDROSA, M.F.; BILLINGTON, S.J.; JOST, B.H.; TAMBOURGI, D.V.; MOOLENAAR, W.H. 2004. Spider and bacterial sphingomyelinases D target cellular lysophosphatidic acid receptors by hydrolyzing lysophosphatidylcholine. *J Biol Chem.* p. 279, n. 12, p. 10833-10836.

VAN MEETEREN, L.A.; STORTELEERS, C.; MOOLENAAR, W.H. 2007. Upregulation of cytokine expression in fibroblasts exposed to loxosceles sphingomyelinase D: what is the trigger? *J Invest Dermatol.* p. 127, n. 5, p. 1266-1267.

VEIGA, S.S.; GREMSKI, W.; DOS SANTOS, V.L.; FEITOSA, L.; MANGILI, O.C.; NADER, H.B.; DIETRICH, C.P.; BRENTANI, R.R. 1999. Oligosaccharide residues of *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom proteins: dependence on glycosylation for dermonecrotic activity. *Toxicon.* v. 37, n. 4, p. 587-607.

VEIGA, S.S., DA SILVEIRA, R.B., DREYFUS, J.L., HAOACH, J., PEREIRA, A.M., MANGILI, O.C., GREMSKI, W., 2000a. Identification of high molecular weight serineproteases in *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. *Toxicon* 38 (6), 825–839.

VEIGA, S.S.; FEITOSA, L.; DOS SANTOS, V.L.; DE SOUZA, G.A.; RIBEIRO, A.S.; MANGILI, O.C.; PORCIONATTO, M.A.; NADER, H.B.; DIETRICH, C.P.; BRENTANI, R.R.; GREMSKI, W. 2000b. Effect of brown spider venom on basement membrane structures. *Histochem J.* v. 32, n. 7, p. 397-408.

VETTER, R.S. 2009. Arachnids misidentified as brown recluse spiders by medical personnel and other authorities in North America. *Toxicon.* v. 54, n. 4, p. 545-547.

WEBER, C.H., VINCENZ, C., 2001. The death domain superfamily: a tale of two interfaces [review]? *Trends Biochem. Sci.* 26, 475–481

WRIGHT, R.P.; ELGERT, K.D.; CAMPELL, B.J.; BARRETT J.T. 1973. Hyaluronidase and esterase activities of the venom of the poisonous brown recluse spider. *Arch. Biochem. Biophys.* v. 159, p. 415–426.

WYLLIE, A. H., KERR, J. F. R. & CURRIE, A. R. 1980. Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.* 68, 251–305

YANG MY, CHUANG H, CHEN RF, YANG KD. 2002. Reversible phosphatidylserine expression on blood granulocytes related to membrane perturbation but not DNA strand breaks. *J Leukoc Biol*;71:231–237

YOUNG, A.R.; PINCUS, S.J. 2001. Comparison of enzymatic activity from three species of necrotising arachnids in Australia: *Loxosceles rufescens*, *Badumna insignis* and *Lampona cylindrata*. *Toxicon.* v. 39, n. 2-3, p. 391-400.

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

ZIMMERMAN UJ, SCHLAEPFER WW. 1982. Characterization of a brain calcium-activated protease that degrades neurofilament proteins. *Biochemistry*; 21: 3977–3982.

ZOBEL-THROPP, P.A.; BODNER, M.R.; BINFORD, GJ. 2010. Comparative analyses of venoms from American and African Sicarius spiders that differ in sphingomyelinase D activity. *Toxicon.* v. 55, n. 7, p. 1274-1282.

ZUPUNSKI, V.; KORDIS, D.; GUBENSEK, F. 2003. Adaptive evolution in the snake venom Kunitz/BPTI protein family. *FEBS Lett.* v. 547, n. 1-3, p. 131-136.

7. Anexos



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. 305 / 2012, relativo ao projeto intitulado "AÇÃO DO VENENO DA ARANHA LOXOSCELES SIMILIS EM FIBROBLASTOS", que tem como responsável Dawidson Assis Gomes, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 06/12/2012. Este certificado espira-se em 06/12/2017.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº. 305 / 2012, related to the Project entitled "STUDY OF THE ACTIVITY OF THE VENOM FROM THE BROWN SPIDER LOXOSCELES SIMILIS IN FIBROBLASTS", under the supervision of Dawidson Assis Gomes, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 06/12/2012. This certificate expires in 06/12/2017.

FRANCISNETE GRACIANE ARAUJO MARTINS

Coordenador(a) da CEUA/UFMG
Belo Horizonte, 06/12/2012.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP**

Projeto: CAAE – 12482913.4.0000.5149

**Interessado(a): Prof. Dawidson Assis Gomes
Departamento de Bioquímica e Imunologia
ICB - UFMG**

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 02 de outubro de 2013, o projeto de pesquisa intitulado "**Ação do veneno da aranha loxosceles similis em fibroblastos**".

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.


**Profa. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG**