



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

MARIA HELENA RODRIGUES MESQUITA BRITTO

O FATOR DE CRESCIMENTO DOS VASOS (VEGF) COMO MEDIADOR
NEUROPROTETOR NA QUEBRA DA BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA
NO ENVENENAMENTO PELA ARANHA *Phoneutria nigriventer* EM RATOS.
ANÁLISE DAS VIAS DE SINALIZAÇÃO E DA NEUROQUÍMICA CEREBRAL
POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAREMELHO COM TRANSFORMADA
DE FOURIER

**VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR (VEGF) AS A
NEUROPROTECTOR MEDIATOR IN THE BLOOD-BRAIN BARRIER
BREAKDOWN CAUSED BY *Phoneutria nigriventer* SPIDER
ENVENOMATION IN RATS. ANALYSIS OF SIGNALING PATHWAYS AND
CEREBRAL NEUROCHEMISTRY BY FOURIER TRANSFORM INFRARED
SPECTROSCOPY**

CAMPINAS

2019

MARIA HELENA RODRIGUES MESQUITA BRITTO

**O FATOR DE CRESCIMENTO DOS VASOS (VEGF) COMO MEDIADOR
NEUROPROTETOR NA QUEBRA DA BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA
NO ENVENENAMENTO PELA ARANHA *Phoneutria nigriventer* EM RATOS.
ANÁLISE DAS VIAS DE SINALIZAÇÃO E DA NEUROQUÍMICA CEREBRAL
POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA
DE FOURIER**

**VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR (VEGF) AS A
NEUROPROTECTOR MEDIATOR IN THE BLOOD-BRAIN BARRIER
BREAKDOWN CAUSED BY *Phoneutria nigriventer* SPIDER
ENVENOMATION IN RATS. ANALYSIS OF SIGNALING PATHWAYS AND
CEREBRAL NEUROCHEMISTRY BY FOURIER TRANSFORM INFRARED
SPECTROSCOPY**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutora em Farmacologia.

Thesis presented to the Faculty of Medical Sciences of the State University of Campinas as part to the requirement for obtaining the degree of Ph.D. in Pharmacology.

ORIENTADORA: PROFA. DRA. MARIA ALICE DA CRUZ HÖFLING

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA
ALUNA MARIA HELENA RODRIGUES MESQUITA BRITTO E
ORIENTADA PELA PROFA. DRA. MARIA ALICE DA CRUZ HÖFLING

CAMPINAS

2019

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

Mesquita Britto, Maria Helena Rodrigues, 1981-
M562f O fator de crescimento dos vasos (VEGF) como mediador neuroprotetor na quebra da barreira hematoencefálica no envenenamento pela aranha *Phoneutria nigriventer* em ratos : análise das vias de sinalização e da neuroquímica cerebral por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier / Maria Helena Rodrigues Mesquita Britto. – Campinas, SP : [s.n.], 2019.

Orientador: Maria Alice da Cruz Höfling.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Barreira hematoencefálica. 2. Venenos de aranha. 3. Fator de crescimento endotelial vascular. 4. Neuroproteção. 5. Itraconazol. I. Cruz-Höfling, Maria Alice da, 1944-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Vascular endothelial growth factor (VEGF) as a neuroprotector mediator in the blood-brain barrier breakdown caused by *Phoneutria nigriventer* spider envenomation in rats : analysis of signaling pathways and cerebral neurochemistry by Fourier transform infrared spectroscopy

Palavras-chave em inglês:

Blood-brain barrier

Spider venoms

Vascular endothelial growth factor

Neuroprotection

Itraconazole

Área de concentração: Farmacologia

Titulação: Doutora em Farmacologia

Banca examinadora:

Maria Alice da Cruz Höfling [Orientador]

Patricia Moriel

Stephen Hyslop

Charlyton Luis Sena da Costa

Gustavo Ferreira Simões

Data de defesa: 14-11-2019

Programa de Pós-Graduação: Farmacologia

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-0673-836X>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/4305012015263639>

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

MARIA HELENA RODRIGUES MESQUITA BRITTO

ORIENTADORA: DRA. MARIA ALICE DA CRUZ HÖFLING

MEMBROS:

1. PROFA. DRA. MARIA ALICE DA CRUZ HÖFLING

2. PROFA. DRA. PATRICIA MORIEL

3. PROF. DR. STEPHEN HYSLOP

4. PROF. DR. CHARLLYTON LUIS SENA DA COSTA

5. PROF. DR. GUSTAVO FERREIRA SIMÕES

Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A Ata de Defesa assinada pelos membros da Comissão Examinadora consta no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

Data: 14/11/2019

DEDICATÓRIA

Aos meus admiráveis pais Steiner (in

memoriam) e Ariel, por tanto amor e

ensinamentos dedicados incondicionalmente;

Ao meu amado esposo, Laurindo Neto, por ter

sido meu maior incentivo para essa conquista;

À minha querida filha Mariana Steiner, a

minha grande inspiração e razão de tudo;

Aos meus irmãos Marcos, Guilherme e Gustavo

pelo carinho e amizade;

Ao meu bom Deus, o princípio de tudo, meu

Porto Seguro sempre.

AGRADECIMENTOS

Quero expressar a minha gratidão como forma de devolver amor a quem me estendeu a mão nessa longa caminhada.

Inicio agradecendo à minha orientadora prof^a Dr^a Maria Alice da Cruz Höfling, pela acolhida calorosa, pelos incentivos diários, pelas melhores conversas e conselhos, pela dedicação incansável e amizade sincera. Aprendi que “Nada resiste ao trabalho” e tentarei seguir seu exemplo de determinação e amor à profissão.

Ao meu grande herói, meu pai Steiner (*in memorian*) que soube compreender a minha ausência e mesmo distante alegrava meus dias com nossas longas conversas, dando-me forças para seguir. Pai, esse momento de alegria também é seu, pois sei que estais aqui comigo sempre.

À minha querida mãe Ariel, meu anjo da guarda, meu maior exemplo de vida, minha fonte de inspiração para alcançar esse sonho e quem nunca me deixou desistir mesmo diante de tantas adversidades.

Ao meu marido Laurindo por acreditar em mim mesmo quando eu não acreditava, pelo amor dedicado, por ter enxugado cada lágrima e ter sorrido comigo cada sorriso, ajudando sempre e compreendendo todos os momentos vividos nessa trajetória.

À minha filha Mariana, fonte do meu maior amor, a razão de tudo, onde encontro a minha paz e meu melhor sorriso.

Aos meus irmãos e companheiros Marcos, Guilherme e Gustavo, pela amizade sincera, cuidado e carinho de sempre.

As minhas cunhadas Laiana e Renata por terem dado tanto apoio, carinho e amor à minha família durante a minha ausência.

Aos grandes amigos e irmãos de coração, Catarina Rapôso e Marcos Melo, por terem nos acolhido e dado uma família, tornando a vida mais leve e feliz.

Ao amigo Dr. David Cortellazzi, pela amizade, ensinamentos valiosos e conselhos sinceros.

Ao amigo Manoel Pinheiro pela confiança, ensinamentos e amizade.

Aos professores do Departamento de Farmacologia por ter compartilhado seus conhecimentos ao longo do curso.

Aos membros da banca de qualificação pela disponibilidade e valiosas contribuições; e aos membros da banca de defesa, minha gratidão por terem aceitado participar desse momento importante, podendo coompartilhar seus conhecimentos.

Aos bioteristas Miguel Silva e Antônio Vilson dos Santos pela disponilidade e cuidados com os animais experimentais, peças chaves em nossos estudos.

Às técnicas de laboratório Stephanie Souto e Cíntia Rizoli por toda contribuição em nossos experimentos.

Aos amigos do laboratório Edilene Siqueira, Willians Fernando, Bruno Kenzo, Giovanna Oliveira, Thaís Fachinelli e em especial Monique Mendonça por toda dedicação e contribuição para esse sonho se concretizar.

Aos professores Dr. Lício Augusto Velloso, Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira e Dra. Kumiko Koibuchi Sakane pela importante contribuição e disponibilizar a infraestrutura de seus laboratórios para o desenvolvimento desse trabalho.

Ao Gustavo Teramatsu por ser sempre disponível, resolutivo e gentil.

Às agências de fomentos pelo apoio financeiro. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001; da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo nº 2005/53625; e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), processos nºs A7914/2014-3, 305099/2011-6, 310111/2016-4, 454791/2014-3.

À Deus, meu porto seguro, princípio de tudo, fonte de proteção e amor.

A todos que de alguma forma contribuíram para a concretização desse sonho deixo minha sincera gratidão!!!

RESUMO

O veneno da aranha *Phoneutria nigriventer* (PNV) contém neuropeptídeos que afetam canais iônicos e a neurotransmissão, induzindo a quebra da barreira hematoencefálica (BHE) no hipocampo de ratos, o que ocorre paralelamente ao aumento do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). Sabe-se que a resposta biológica do VEGF é desencadeada através da regulação transcripcional promovida pelo domínio tirosina-quinase de receptores transmembranares do VEGF, dos quais o VEGFR-2 (Flk-1) é considerado o principal mediador e ativador de várias vias de sinalização. O trabalho propõe investigar o possível papel neuroprotetor do VEGF após inibir sua ligação ao receptor Flk-1 pelo itraconazol (ITZ). Para isso, examinamos o status bioquímico do hipocampo por espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR), bem como avaliamos as proteínas envolvidas nas rotas paracelular e transcelular da BHE e quais vias de sinalização, relacionadas à neuroproteção do VEGF, foram ativadas. Os ratos receberam PNV ou foram pré-tratados com ITZ (30 min) seguido de PNV pela veia da cauda e depois sacrificados em 1 e 2 h (intervalos com maiores sinais de intoxicação), 5 h (intervalo com sinais incipientes de recuperação) e 24 h (intervalo sem sinal visual detectável de envenenamento), sendo comparados aos controles, salina e ITZ. O pré-tratamento com o antifúngico agravou os efeitos do veneno e aumentou danos à BHE. Os espectros FT-IR do veneno, hipocampo dos controles, PNV e ITZ-PNV mostraram as bandas de 1400 cm^{-1} (carboxilato) e de 1467 cm^{-1} (flexão de CH_2 : principalmente lipídios), que foram considerados bandas biomarcadora e referência, respectivamente. A inibição da ligação VEGF/Flk-1 produziu mudanças marcantes na estabilidade lipídios/proteínas em 1-2 h. As maiores diferenças ocorreram nas regiões espectrais atribuídas à lípides simétricos (2852 cm^{-1}) e assimétricos (2924 e 2968 cm^{-1}). As análises quantitativas mostraram maiores aumentos na razão $1400\text{ cm}^{-1}/1467\text{ cm}^{-1}$ no período de intoxicação grave (1 h), e referem-se à região espectral de 3106 cm^{-1} a 687 cm^{-1} . Ademais, a desativação da ligação VEGF/Flk-1 pelo itraconazol (ITZ) aumentou o fator indutor de hipóxia (HIF1- α), VEGF, Flk-1, Flt-1, Neu-N e caspase-3 às 5 horas após a injeção do PNV.

No mesmo intervalo, a permeabilidade transcelular da BHE aumentou (caveolina-1 α , dinamina-2 e família Src de não receptores tirosina-quinase (SKFs)), enquanto laminina e a via paracelular (occludina, β -catenina) foram reforçadas e a proteína de efluxo glicoproteína-P (P-gp) aumentou. Ao mesmo tempo (5 h), ocorreu auto-fosforilação da via pró-proliferação celular (p38-fosforilada). Às 24 h, apesar da ausência de sinais de intoxicação, a via pró-sobrevivência celular (Akt-fosforilada) diminuiu nos animais pré-tratados com ITZ, enquanto aumentou nos tratados com PNV apenas. Os dados indicam ativação de mecanismos de neuroproteção relacionados ao VEGF envolvendo o receptor Flk-1 e principalmente à serina-treonina-quinase Akt, provavelmente via PI3K. ERK-fosforilada (2 h) e p38-fosforilada (5 h) sugerem interação entre as vias de sinalização com o objetivo de restabelecer a homeostase do hipocampo. O intervalo de 5 h parece ser o ponto de virada orquestrando respostas biológicas variadas. Os dados permitem concluir sobre o papel neuroprotetor do VEGF e que o mesmo pode ser explorado como possível alvo terapêutico no envenenamento por *P. nigriventer*.

Palavras-chave: Barreira hematoencefálica; veneno de aranha; fator de crescimento endotelial vascular; neuroproteção; itraconazol.

ABSTRACT

Phoneutria nigriventer spider venom (PNV) contains ion channels-acting neuropeptides that affect neurotransmission and induces transitory blood-brain barrier (BBB) breakdown in rat's hippocampus, which run in parallel with (vascular endothelial growth factor) VEGF upregulation. It is known that VEGF biological response is triggered through transcriptional regulation promoted by transmembrane tyrosine kinase receptors, being VEGFR-2 (Flk-1) considered the major mediator of VEGF effect through activation of a number of signaling pathways. The purpose of this work is to investigate a putative neuroprotective role of VEGF by inhibiting its binding to receptor Flk-1 by itraconazole (ITZ). To do this, we examined the biochemical status of the hippocampus by Infrared Spectroscopy and Fourier Transform (FT-IR), as well as evaluated the proteins involved in the BBB paracellular and transcellular routes and which signaling pathways related to VEGF neuroprotection were activated. Rats were administered PNV alone or were pre-treated with ITZ (30 min) followed by PNV through the tail vein, and then euthanized at 1 and 2 h (intervals with greatest signs of intoxication), 5 h (interval with incipient signs of animals' recovery) and 24 h (interval with no visually detectable envenomation sign) and compared to saline and ITZ controls. The antifungal pre-treatment aggravated PNV toxic effects and increased BBB damage. FT-IR spectra of venom and from hippocampi of controls, PNV and ITZ-PNV showed a 1400 cm^{-1} band linked to symmetric stretch of carboxylate and 1467 cm^{-1} band (CH_2 bending: mainly lipids), which were considered biomarker and reference bands, respectively. Inhibition of VEGF/Flk-1 binding produced marked changes in lipid/protein stability at 1-2 h. The largest differences were observed in spectra regions assigned to lipids, both symmetric (2852 cm^{-1}) and asymmetric (2924 and 2968 cm^{-1}). Quantitative analyses showed greatest increases in the $1400\text{ cm}^{-1}/1467\text{ cm}^{-1}$ ratio also at 1 h. Such changes at period of rats' severe intoxication referred to wavenumber region from 3106 cm^{-1} to 687 cm^{-1} . Furthermore, the deactivation of Flk-1 receptor by VEGF through itraconazole (ITZ) showed increased hypoxia inducible factor (HIF-1 α), VEGF, Flk-1, Flt-1, Neu-N and caspase-3 at 5 h after PNV injection. At same interval, BBB transcellular

permeability increased (caveolin-1 α , dynamin-2 and Src family of non-receptor tyrosine kinases (SKFs)), while laminin and paracellular route (occludin, β -catenin) were reinforced and P-glycoprotein (P-gp) efflux protein was increased. Such effects were timely followed by upregulation of auto-phosphorylation of the pro-proliferation (phosphorylated-p38) pathway. At 24 h, despite absence of intoxication signs, the pro-survival (p-Akt) pathway was downregulated in animals underwent inhibition of VEGF-Flk-1 binding, whereas it was upregulated in PNV rats non-treated with ITZ. The data indicate triggering of VEGF-related mechanisms involving Flk-1 receptor and serine-threonine kinase Akt, probably via PI3K, as the main mechanism of neuroprotection. Phosphorylated ERK (2 h) and p-p38 (5 h) indicates interplay among transduction pathways likely aiming at re-establishment of hippocampal homeostasis. The findings suggest 5 h interval as the turning point that orchestrates varied biological responses. Taking together the data of the present study allow concluding that VEGF expression exerts neuroprotective role and can be explored as a possible therapeutic target in *P. nigriventer* envenomation.

Keywords: Blood-brain barrier; spider venom; vascular endothelial growth factor; neuroprotection; itraconazole.

SUMÁRIO

1.0 INTRODUÇÃO	14
1.1 Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)	14
1.1.1 Regulação da expressão de VEGF pelo fator indutor de hipóxia (HIF-1)	16
1.1.2 Receptores de VEGF	17
1.1.3 Sinalização intracelular de VEGFRs em células neurais e vasculares	19
1.1.4 A atividade do VEGF no sistema nervoso central	22
1.2 Barreira hematoencefálica (BHE).....	24
1.2.1 Vias de acesso da Barreira Hematoencefálica ao Sistema Nervoso Central.....	27
1.3 Aranha <i>Phoneutria nigriventer</i>	31
1.4 Veneno da <i>Phoneutria nigriventer</i> (PNV)	32
1.4.1 Composição e neurotoxicidade.....	32
1.4.2 Atividade do veneno de <i>P. nigriventer</i> (PNV) sobre a BHE.....	34
1.5 Itraconazol	37
2.0 OBJETIVOS	39
2.1 Objetivo Geral	39
2.2 Objetivos Específicos	39
3.0 METODOLOGIA	41
3.1 Comitê de ética	41
3.2 Animais, veneno e itraconazol	41
3.3 Exposição ao veneno da <i>Phoneutria nigriventer</i> , itraconazol e seus controles.....	41
3.4 Avaliação neurológica	42
3.5 Avaliação da permeabilidade da barreira hematoencefálica (BHE)	42
3.6 Western blotting (WB)	43
3.7 Imunoprecipitação	45
3.8 Espectroscopia no infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)	45
3.9 Comitê de ética II	46
3.10 Cultura purificada de astrócito.....	46
3.11 Curva de sobrevivência.....	47
3.12 Imunocitoquímica	47
3.13 Análise estatística	48
4.0 RESULTADOS	49
CAPÍTULO I (Inhibition of VEGF-Flk-1 binding induced profound biochemical alteration in the hippocampus of a rat model of BBB breakdown by spider venom. A preliminary assessment using FT-IR spectroscopy).	50
CAPÍTULO II (VEGF/Flik-1 system exerts neuroprotection against <i>Phoneutria nigriventer</i> spider envenomation through PI3K-AKT-dependent pathway)	61

CAPÍTULO III (Dados Complementares).....	112
4.1 Itraconazol e PNV inibem o crescimento de culturas primárias de astróscitos corticais.....	112
4.2 Itraconazol e PNV induz o aumento da reatividade astroglial.....	114
4.3 Tratamento com Itraconazol + PNV induz ao aumento da expressão de VEGF em astrócitos corticais.....	120
5.0 DISCUSSÃO GERAL.....	126
6.0 CONCLUSÃO	139
7.0 REFERÊNCIAS.....	141
8.0 ANEXOS	161
Anexo 8.1 – Certificados CEUA	Erro! Indicador não definido.
Anexo 8.2 – Direitos Autorais.....	161

1.0 INTRODUÇÃO

1.1 Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)

Nos processos neuroreparativos do Sistema Nervoso Central (SNC), estão em primeira linha vários fatores de crescimento. Dentre eles, um dos fatores com expressiva participação é o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). O VEGF foi primeiro descrito como uma proteína capaz de induzir a permeabilidade vascular secretada por tumor, a qual foi denominada de fator vascular de permeabilidade (VPF) [Senger et al., 1983].

Em 1989, estudos determinaram o isolamento e sequenciamento de uma proteína mitogênica específica para células endoteliais que induzia a formação de novos vasos sanguíneos, que foi nomeada de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) [Ferrara, 2000]. Em seguida, com o sequenciamento completo do DNA complementar do gene que codificava o VEGF e VPF, verificou-se que se tratava aparentemente da mesma molécula [Keck et al., 1989].

O VEGF pertence a uma família de glicoproteínas diméricas da qual fazem parte o VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D e o fator de crescimento placentário (PIGF) [Ruiz-Almodóvar et al., 2009]). Eles compartilham uma estrutura comum de oito resíduos de cisteína no domínio de homologia do VEGF e a proteína purificada é um homodímero de aproximadamente 45 kDa. Dentro os membros da família, o VEGF-A (protótipo), ou apenas VEGF, é o fator mais estudado e compreendido [Roy et al., 2006].

O gene humano do VEGF está localizado no cromossomo 6p21.3, formado por 8 exons e separados por 7 itrons. *Splicing* alternativos regulam a capacidade de ligantes se ligarem aos receptores de VEGF e resultarem em quatro isoformas diferentes (VEGF_{121} , VEGF_{165} , VEGF_{189} , VEGF_{206}), tendo respectivamente 121, 165, 189 e 206 aminoácidos, após clivagem da sequência [Ferrara et al., 1991].

Desde sua descoberta, evidências vêm sendo acumuladas sobre a importância do VEGF na vasculogênese durante o desenvolvimento embrionário e na promoção da angiogênese em muitas condições patológicas, como no crescimento de processos neoplásicos e sua disseminação, na artrite reumatóide, psoríase e retinopatia diabética, dentre outras [Bates et al., 2002].

O VEGF induz a proliferação, germinação, migração, formação de tubo de células endoteliais [Ferrara et al., 2003] e também é um potente fator de sobrevivência para essas células durante a angiogênese fisiológica e tumoral [Bejamin and Keshet, 1997]. Originalmente, o VEGF foi descrito como um fator de permeabilidade, pois atua no aumento da permeabilidade do endotélio através da formação de lacunas intercelulares, organelas vesico-vasculares, vacúolos e fenestrações [Bates and Harper, 2003]. Esse fator também causa vasodilatação através da indução da síntese do óxido nítrico endotelial (eNOS) e o subsequente aumento na produção de óxido nítrico [Hood et al., 1998; Kroll and Waltenberger, 1999].

Estudos mais recentes têm abordada a função neurotrófica do VEGF. No sistema nervoso central, o VEGF tem sido associado a processos de neurogênese [Jin et al., 2002]; proliferação, diferenciação [Zhu et al. 2003; Sun et al., 2010] e sobrevivência neuronal [Jin et al. 2000, 2001]; crescimento axonal [Sondell et al. 1999]; proteção dos neurônios do hipocampo após hipóxia [Svensson et al. 2002] e proteção contra a excitotoxicidade provocada pelo glutamato [Matsuzaki et al., 2001] e em estados epilépticos [Nicoletti et al., 2008].

Existem fortes evidências de que o VEGF é essencial para a sobrevivência de neurônios motores, sendo demonstrado que em casos em que havia regulação deficiente de VEGF, verificou-se degeneração de início tardio em neurônios motores que se assemelham a doenças como a esclerose lateral amiotrófica [Brockington et al, 2004; Lladó et al., 2013]. Em conjunto, todos esses estudos indicam o VEGF como tendo papel na manutenção da homeostase cerebral [Brockington et al., 2004].

Classicamente sabe-se que o VEGF é uma citocina estimulada por vários fatores de crescimento, como o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento fibroblástico (FGFR), fator de crescimento epitelial (EGF), fator de necrose tumoral (TNF), interleucinas e é também estimulado por hipóxia por via do fator indutor de hipóxia (HIF) [Tammela et al. 2005].

1.1.1 Regulação da expressão de VEGF pelo fator indutor de hipóxia (HIF-1)

O vasto suprimento vascular do cérebro requer alta demanda de oxigênio que é usado para transmissão sináptica permanente e manutenção da homeostase, o que explica a relação direta entre hipóxia em condições cerebrais isquêmicas e a baixa sinalização sináptica [Astrup, 1982]. A hipóxia é um forte estímulo para a angiogênese, pois quando as células sofrem esse processo, elas liberam fatores angiogênicos para restabelecer a oferta de oxigênio através da formação de novos vasos [Ruiz-Almodóvar et al., 2009].

O mecanismo se dá pela ativação de fator induzido por hipóxia-1 (HIF-1), o qual leva à transcrição de vários genes que contribuem para a adaptação celular ao baixo nível de oxigênio. Alguns dos genes que desempenham papel importante no efeito protetor do HIF-1 são aqueles envolvidos na angiogênese, como o VEGF; na eritropoiese, como a eritropoetina (EPO); e os genes envolvidos no metabolismo da glicose, como os transportadores de glicose [Siddiq et al., 2007].

Como mencionado anteriormente, a hipóxia é um importante regulador da ativação de VEGF, de acordo com o seu papel angiogênico [Shweiki et al., 1992]. No nível da transcrição, a indução hipóxica do VEGF é regulada positivamente pelo HIF-1 que parece ocorrer tanto pela ativação da transcrição como também através da estabilização do mRNA do VEGF [Wang et al., 1998]. O HIF-1 é um heterodímero que consiste nas subunidades HIF-1 α e HIF-1 β . Enquanto a subunidade β é uma proteína nuclear expressa continuamente, a estabilidade, localização sub-cellular e atividade transcrecional da subunidade α são reguladas pela concentração celular de oxigênio [Semenza et al., 1997; Semenza, 2000]. Assim, o HIF-1 α se liga a uma seqüência de bases na região 5` flanqueada do gene do VEGF chamada de elemento responsável à hipóxia (HRE), aumentando a transcrição do gene [Salceda and Caro, 1997; Huang et al., 1998].

A alta demanda por oxigênio explica a diversidade de células que expressam o HIF-1 α no cérebro, tais como células ependimárias, neurônios, gliais (com foco em astrócitos) e células progenitoras neurais [Chávez et al., 1985; Yao et al., 2005; Lu et al., 2006; Roitbak et al., 2011]. Os astrócitos

constituem a população glial mais numerosa no SNC. Através de seus profusos processos englobando os contatos sinápticos neuronais, os astrócitos promovem o tamponamento local removendo o excesso de Glutamato (Glu) e K⁺ (potássio) para proteger os neurônios da excitotoxicidade. Esse excesso de Glu leva os astrócitos a regular o fator de transcrição HIF-1α de vários alvos, induzindo a transcrição de alvos protéicos, exemplo o VEGF, como mecanismo de proteção à sobrevivência dos neurônios [Badawi et al., 2012].

1.1.2 Receptores de VEGF

Em humanos, ratos e outros mamíferos, foram identificados três receptores que ligam diferentes isoformas de VEGFs: VEGFR-1 (*Flt-1 - fms-like-tyrosine kinase-1*), VEGFR-2 (*Flk-1 – fetal liver kinase-1*) e VEGFR-3 (*Flt-4*) [Claesson-Welsh, 2016].

Os receptores de VEGF (VEGFRs) mostram organização molecular semelhante e são compostos por um domínio extracelular de ligação com alças semelhantes à imunoglobulina, um domínio transmembranar, um domínio justamembranar, um domínio dividido de tirosina-quinase e uma cauda C-terminal (Figura 1) [Koch et al., 2011].

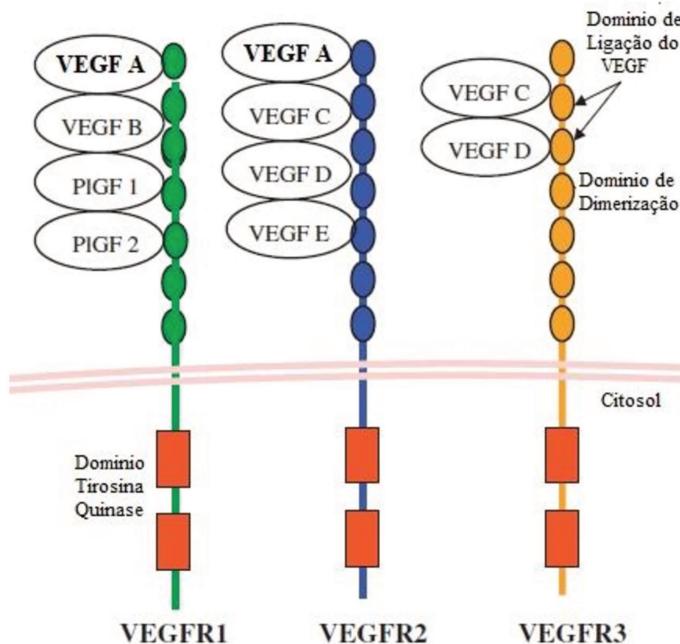


Figura 1. Receptores de VEGF e seus ligantes. Esquema modificado de Brockington et al., 2004.

O VEGFR-1, também conhecido como Flt-1, é uma glicoproteína de 180–185 kDa [Shibuya et al., 1990; de Vries et al., 1992] que é ativada em resposta à ligação de VEGF-A, VEGF-B e PIGF. Esse receptor é expresso em níveis altos em células endoteliais vasculares ao longo dos desenvolvimentos embrionário, pós-natal e adulto [Jakeman et al., 1992; Peters et al., 1993]. Além disso, existe uma vasta gama de células não endoteliais, como monócitos e macrófagos, trofoblastos humanos, células mesangiais renais, células musculares lisas vasculares, células dendríticas e tipos de células tumorais humanas, que também expressam VEGFR-1 [Clark et al., 1996; Takahashi, 1995]. A expressão desse receptor é regulada por hipóxia, sendo um mecanismo dependente de HIF-1 [Semenza, 2002]. Deve-se ressaltar um papel importante do VEGFR-1 que consiste na regulação negativa da ação biológica do VEGFR-2, pela ligação ao VEGF e na regulação da migração de monócitos durante processos inflamatórios [Koch and Claesson, 2012]. A perda da atividade quinase do VEGFR-1 ou a inibição da função do VEGFR-1 atua em uma série de condições patológicas que envolvem inflamação e recrutamento de células mieloides derivadas da medula óssea. Isto acontece no crescimento tumoral [Hiratsuka et al., 2001], como o glioma [Kerber et al., 2008], bem como na disseminação metastática de tumores [Kaplan et al., 2006]. Outras condições envolvendo inflamação, como artrite reumatóide [Murakami et al., 2006] e a fase inicial do estado de pós-AVC [Beck et al., 2010] também é afetada pela perda da atividade quinase do VEGFR-1.

O VEGFR-2, denominado também por Flk-1, é uma glicoproteína de 210-230 kDa que se liga ao VEGFA com uma afinidade 10 vezes menor do que o VEGFR-1. Além do VEGF-A, liga-se também às isoformas VEGF-C e VEGF-D, com exceção do VEGF-D em ratos que se liga apenas ao VEGFR3 [Shinkai et al., 1998; Fuh et al., 1998]. O VEGFR-2 é o principal receptor de VEGF nas células endoteliais, sendo essencial para a biologia celular endotelial durante o desenvolvimento e no adulto, em condições fisiológicas e patológicas [Koch and Claesson, 2012]. O receptor VEGFR-2 é expresso de forma mais proeminente no endotélio vascular e em seus precursores embrionários, possuindo maiores níveis de expressão durante a vasculogênese embrionária e angiogênese [Millauer et al., 1993; Oelrichs et al., 1993; Quinn et al., 1993] e durante os processos patológicos associados à neovascularização, como na

angiogênese tumoral [Plate et al., 1993; Millauer et al., 1994]. Acredita-se que esse receptor seja o principal transdutor dos efeitos do VEGFA na diferenciação, proliferação, migração e formação do tubo vascular na célula endotelial. Vários inibidores de baixa massa molecular da atividade quinase do VEGFR-2 são empregados clinicamente para bloquear a angiogênese patológica no câncer [Koch and Claesson, 2012].

O VEGFR-3, conhecido como Flt-4, é sintetizado como uma proteína precursora de 195 kDa. Sua atividade acontece com a ligação VEGF-C e VEGF-D e embora tenha sido descoberto como regulador do desenvolvimento endotelial linfático, também é expresso em células endoteliais vasculares sanguíneas. É o receptor responsável pela função linfoendotelial [Tammela et al., 2008]. A exposição ao VEGF-C ou VEGF-D processados pode induzir heterodimerização entre VEGFR-2 e VEGFR-3. A partir dessa ligação, um papel biológico importante para o VEGFR-3 pode estar na migração de células endoteliais [Stanczuk et al., 2015].

Os efeitos biológicos dos VEGFs são exercidos após a sua ligação com os receptores específicos [Shibuya et al., 1990]. Essa ligação pode ocorrer com VEGF que se encontra livremente difuso (solúvel) ou pela apresentação do VEGF por co-receptores expressos na mesma célula que os receptores de VEGF ou em células adjacentes [Nilsson et al., 2010]. Por ocasião da ligação do VEGF ao receptor específico ocorre a transdução dos sinais dos receptores envolvendo várias etapas bioquímicas, dentre as quais: a) interação entre o ligante com o receptor; b) dimerização do receptor; c) ativação da porção tirosina-quinase; d) auto-fosforilação do receptor; e) ligação e f) ativação de proteínas adaptadoras aos sítios de auto-fosforilação [Hicklin and Ellis 2005; Kerbel, 2008].

1.1.3 Sinalização intracelular de VEGFRs em células neurais e vasculares

Estudos têm demonstrado que o receptor VEGFR-2, ou Flk-1, é o principal mediador do VEGF na angiogênese tanto fisiológica quanto patológica, através da ativação de diferentes vias de sinalização [Brockington et al., 2004; Matsuzaki et al., 2001]. As principais vias ativadas são a PI3K/AKT

(phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B), importante reguladora da sobrevivência celular e apoptose [Burgering and Coffer, 1995; Frank et al., 1997] e a MAPK (*mitogen-activated protein kinases*) à qual pertencem a MAPK p38 e ERK (*extracellular signal-regulated kinases*), que são responsáveis por regular a proliferação, diferenciação e motilidade celular (Figura 2) [Roux and Blenis, 2004]. É preciso levar em conta, no entanto, que as etapas que envolvem a proliferação, sobrevivência e migração, são complexas, interagem entre si e se sobrepõem parcialmente [Ruiz-Almodóvar et al., 2009].

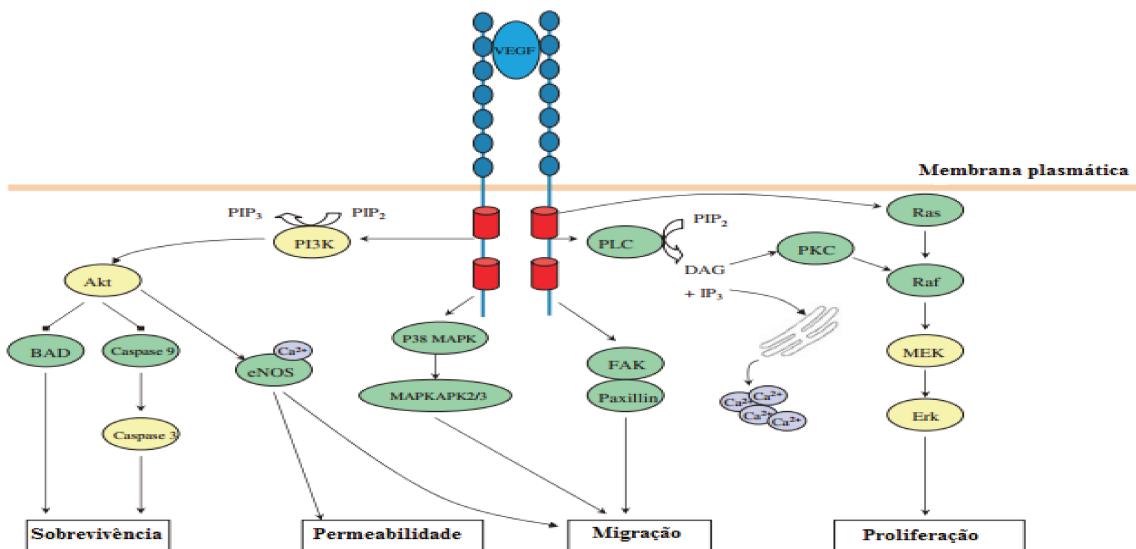


Figura 2. Via de sinalização da ligação do VEGF ao receptor VEGFR-2 ou Flk-1. Adaptação de Brockington et al., 2004.

Regulação da proliferação

A proliferação nas células endoteliais e neurais ocorre, em particular, através da fosforilação do resíduo de tirosina 1175, esse receptor serve como local de ancoragem para a fosfolipase C- γ (PLC- γ) que ativa a proteína quinase C (PKC) através da geração de diacilglicerol e aumento da concentração de Ca²⁺. O PKC por sua vez, ativa a proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) e a quinase regulada por sinal pela via extracelular 1/2 (ERK 1/2) [Mellitzer et al., 1999; Meadows et al., 2001; 2004]. A extensão em que o VEGFR-2 é endocitado determina a magnitude, duração e natureza qualitativa de sua sinalização. Por outro lado, a dinamina-2, uma GTPase transdutora de sinais envolvida na endocitose do receptor, se liga ao VEGFR-2 e medeia a endocitose desse receptor [Bhattacharya et al., 2009]. No entanto, mais

estudos são necessários para esclarecer sobre os mecanismos moleculares que regulam a internalização do VEGFR-2 [Ruiz-Almodóvar et al., 2009].

Regulação da sobrevivência

A sobrevivência de células endoteliais se dá através da ativação das vias de sinalização PI3K/Akt, atuando ao mesmo tempo na inibição das proteínas apoptóticas Bad e Caspase-9 [Maddika et al., 2007]. Os mecanismos moleculares envolvidos na regulação da sobrevivência neuronal não são completamente compreendidos; no entanto, eles parecem ocorrer, pelo menos em parte, pela ativação das vias PI3K/Akt e MAPK [Chow et al., 2001; Jin et al., 2001; Matsukizaki et al., 2001; Svensson et. al, 2002; Wick et al., 2002; Li et al., 2003; Ogunshola et al., 2012]. Curiosamente, o VEGF também promove a sobrevivência neuronal por induzir a fosforilação do canal de potássio dependente de voltagem, através de um mecanismo ligado à via PI3K [Qiu et al., 2003]. Além disso, o VEGF protege os neurônios do hipocampo contra a morte celular isquêmica, inibindo os canais de cálcio ativados por voltagem, reduzindo assim influxo de Ca^{2+} e a sobrecarga causada pelo insulto isquêmico [Ma et al., 2009].

Regulação da migração

As células da extremidade endotelial e os cones em crescimento axonal usam da filopodia, que são projeções citoplasmáticas que se estendem além da borda citoplasmática nas células migratórias, para detectar sinais de orientação em seu entorno e para navegar em resposta a esses sinais. Esse alongamento exige uma regulação precisa da polimerização da actina, convergência e reticulação dos filamentos. Uma vez formados, os filamentos são então estabilizados pela aderência à membrana das células endoteliais ou células adjacentes com seus receptores transmembrana, que se conectam ao citoesqueleto de actina. Essas novas aderências então atuam como locais de tração quando a célula se move para frente sobre elas [Gallo et al., 2004; Mattila et al., 2008].

O VEGF induz a migração das células endoteliais através do VEGFR-2 ativando a quinase Src. Esse receptor (VEGFR-2) ativado também é capaz de formar um complexo multiproteico com proteína associada a VEGFR (VARP),

também conhecido como adaptador específico de célula T, e a Src quinase para desencadear a migração. A ativação da cascata responsável pela migração celular induz a formação da filopodia [Matsumoto and Claesson-Welsh, 2001]. A migração neuronal também é regulada pelo VEGF, porém seus caminhos subjacentes permanecem incompletamente compreendidos [Ruiz-Almodóvar et al., 2009].

1.1.4 A atividade do VEGF no sistema nervoso central

O VEGF pode estar envolvido em diversos processos do desenvolvimento do sistema nervoso como a neurogênese e diferenciação; a vascularização no desenvolvimento cerebral; e as decisões de orientação do desenvolvimento de processos neurais. É cada vez mais reconhecido que os sistemas vascular e neuronal, durante o desenvolvimento, são regulados por sinais comuns e interagem entre si para coordenar seu crescimento e a padronização de redes neurais e vasculares [Brockington et al., 2004].

Vascularização do sistema nervoso

As células endoteliais do plexo perineural e neovascularização expressam receptores de VEGF, enquanto o VEGF é expresso na zona ventricular do neuroectoderma. O padrão de expressão espacial e temporal do VEGF e seus receptores sugere que o VEGF pode agir de forma parácrina para induzir o crescimento de capilares no cérebro em desenvolvimento. De fato, *in vitro*, o VEGF neuronal é indutível por hipoxia e capaz de suportar a formação de tubo em uma linha celular endotelial microvascular cerebral [Ogunshola et al., 2012].

Neurogênese

A neurogênese é o processo pelo qual ocorre a formação de novos neurônios [Yamashima et al., 2007]. Estudos têm demonstrado que o processo de neurogênese no SNC do adulto sofre forte influência de grande variedade de estímulos dentre os quais o VEGF.

Estudos demonstraram que os neurônios e as células gliais surgem de células tronco neurais (NSCs) que sofrem influência das células endoteliais

nesse processo. Em áreas específicas do sistema nervoso central “níchos vasculares”, como na zona subgranular neurogênica do hipocampo e da zona subventricular, células-tronco neurais proliferam em pequenos grupos ao redor da divisão de capilares [Palmer et al., 2000] e as células endoteliais interagem estreitamente com as NSCs e células astrogliais nesses níchos [Huxlin et al., 1992] (Figura 3). Além disso, as células endoteliais liberam fatores que induzem a diferenciação de precursores neuronais [Yamashima et al., 2007].

Evidências indicam que o VEGF participa na interação entre as células endoteliais e as progenitoras neurais. O VEGF, secretado por células endoteliais, células-tronco neurais e astrócitos, promove diferenciação astrocitária e neurogênese, este último por estímulo à proliferação, migração e diferenciação das células precursoras neurais. Além disso, o VEGF secretado pelas NSCs também promove proliferação e angiogênese das células endoteliais [Zacchigna et al., 2008].

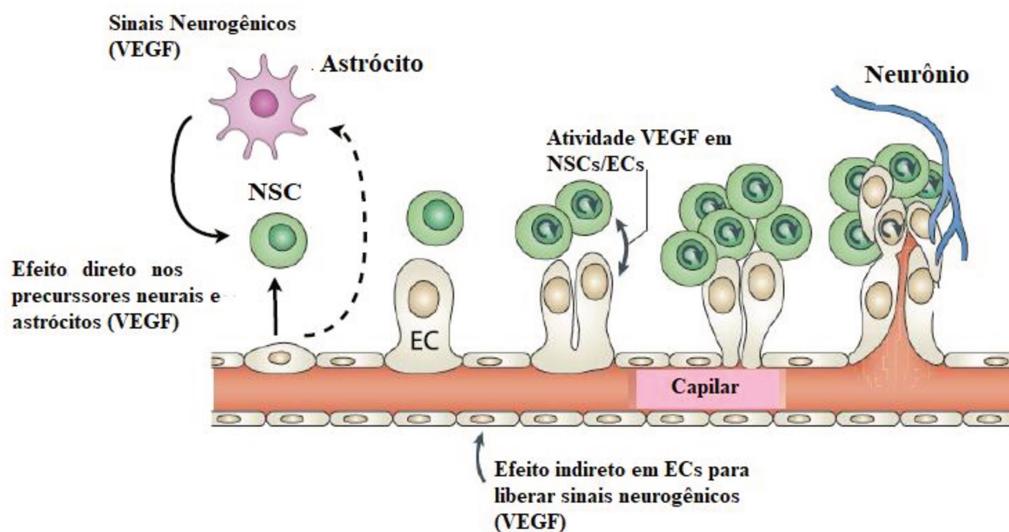


Figura 3. Atuação do VEGF no nicho neurovascular. As células-tronco neurais (NSCs) residem em níchos vasculares em regiões definidas do Sistema Nervoso Central e a neurogênese ocorre em espaços temporais próximos à associação do crescimento dos vasos nestes níchos pelas células endoteliais (ECs). Adaptado de Ruiz-Almodóvar et al., 2009.

Neuroproteção

O VEGF também tem efeitos neuroprotetores em muitos tipos de células neuronais no SNC (cortical, hipocampal, neurônios dopaminérgicos, cerebelares e retiniais) e no sistema nervoso periférico (neurônios simpáticos). Protege estas células contra a morte induzida por uma grande variedade de diferentes estímulos nocivos, incluindo hipóxia ou estímulos excitotóxicos; O VEGFR-2 medeia predominantemente esse efeito neuroprotetor, embora o VEGFR-1 também possa mediar esses efeitos [Ruiz-Almodóvar et al., 2009].

1.2 Barreira hematoencefálica (BHE)

A barreira hematoencefálica (BHE), localizada entre o sangue e o tecido cerebral, é composta por uma estrutura tanto física quanto molecular que atua na manutenção da homeostase do SNC, protegendo o tecido neural contra toxinas e variações na composição hidroelectrolítica do sangue, além de controlar os nutrientes essenciais e efluxo de substâncias indesejáveis ao cérebro [Cammalleri et al., 2011].

O principal componente da estrutura física da BHE é o endotélio dos microvasos, principalmente capilares cerebrais. As células endoteliais da BHE são caracterizadas pela ausência de fenestrações, alta resistência elétrica e pela existência de zônulas de oclusão e adesão mais extensas, juntamente a um esparsº transporte vesicular pinocítico [Grieb et al., 1985]. Complementando a unidade da BHE, em termos físicos, temos a membrana basal, os neurônios e células não neuronais como as células da glia (astrócitos e micróglia) e os pericitos vasculares. Assim, substâncias lipofílicas conseguem atravessar o endotélio vascular cerebral, mas não substâncias hidrofílicas [Banerjee and Bhat, 2007].

Membrana Basal

A membrana basal (MB) é uma estrutura de interface entre endotélio e os pés astrocitários; a MB é composta por proteínas integrais de membrana que é utilizada como um local de ancoragem e sinalização para interação célula-célula (e.g. laminina, integrina, colágeno IV, fibronectina, etc) (Figura 4) (Persidsky et al., 2006). Esta estrutura é essencial para a ligação vascular e

para a função seletiva da barreira, estando suas proteínas envolvidas na manutenção da BHE [Hawkins and Davis, 2005].

Neurônios

Os neurônios são responsáveis pela recepção, transmissão e potenciais de ação. Eles detectam variações em seu suprimento de nutrientes e oxigênio, e transformam estes sinais em mensagens elétricas ou químicas para os interneurônios adjacentes ou para os astrócitos, permitindo que os mediadores neuronais liberados exerçam ação sobre a microvasculatura encefálica [Muoio et al., 2014].

Uma das formas de detecção dos neurônios e diferenciá-los de outras células do sistema nervoso é utilizar o marcador Neuronal Nuclei (NeuN). O NeuN (proteína nuclear específica de neurônios) é um antígeno que é consistentemente detectado pelo anticorpo monoclonal correspondente anti-NeuN no núcleo da maioria dos tipos de neurônios em uma ampla gama de vertebrados [Muller et al., 1992; Dent et al., 2010] durante toda a sua vida útil. Assim, o anticorpo monoclonal *Neuronal Nuclei* (Anti-NeuN) é amplamente utilizado como ferramenta biomarcadora de neurônios maduros e que apresentam viabilidade neuronal [Snyder et al., 2012].

Astrócitos

Os astrócitos são as células gliais predominantes no SNC, envolvendo mais de 99% da barreira endotelial do SNC [Hawkins and Davis, 2005]. Constituem uma região de interposição entre o parêquima cerebral (neurópila) e a circulação sanguínea, sendo essas regiões astrocitárias de interposição com o endotélio conhecidas como pés-astrocitários (Figura 4) [Abbott et al., 2006].

Vários estudos têm demonstrado que os astrócitos além de formarem a BHE, também são responsáveis pela nutrição e suporte estrutural dos neurônios [Abbott et al., 2006] e pela manutenção e controle das sinapses neuronais [Perea et al., 2014; Covelo and Araque, 2015]. Evidências sugerem que os astrócitos desempenham atividade na vasodilatação em resposta ao aumento da atividade neuronal. Por exemplo, a liberação de glutamato pelos neurônios desencadeia um aumento de Ca^{2+} intracelular, que resulta na

vasodilatação dos capilares [Zonta et al., 2003]. É importante destacar que os astrócitos atuam na modulação da função neuronal através da liberação de fatores neurotróficos que participam do desenvolvimento neural [Dong and Benveniste, 2001].

Os astrócitos também merecem destaque na manutenção e permeabilidade da BHE. Até pouco tempo, acreditava-se que os astrócitos atuavam apenas como elementos estruturais passivos, desempenhando papel pouco relevante na homeostasia do SNC. Porém, novos estudos indicam que estas células são capazes de atuar efetivamente na manutenção e permeabilidade da BHE (Abbott et al., 2006; Wong et al., 2013; Cabezas et al., 2014; Chapouly et al., 2015). A quebra da BHE é uma característica da patogênese da lesão em condições inflamatórias do SNC, resultando em edema, excitotoxicidade, interrupção do metabolismo neuronal e a entrada de agentes pró-inflamatórios (Cabezas et al., 2014; Gorina et al.; 2014; Daneman and Prat, 2015; Daneman and Engelhardt, 2017). Argaw et al. (2009) demonstraram que os astrócitos reativos liberam o VEGF-A que atua diretamente na permeabilidade da BHE. Os mesmos autores inativaram a expressão astrocítica de VEGF-A e observaram que houve redução substancial na quebra da BHE e, consequentemente, redução na infiltração de linfócitos e no processo inflamatório. Desta forma, podemos afirmar que os astrócitos são componentes ativos da permeabilidade da BHE após processos inflamatórios no SNC.

As células astrocítárias se tornam reativas em resposta à injúria cerebral de qualquer natureza, respondendo rapidamente a esse estímulo através da astrogliose reativa, isto é, pela proliferação (hiperplasia) e pelo aumento dos processos astrocítários (hipertrofia). Quando se trata de casos leves e moderados de insulto cerebral, a astrogliose reativa é caracterizada por aumento variável da expressão de GFAP (proteína ácida fibrilar glial presente no citoplasma, do inglês *glial fibrillary acidic protein*). Já em situações severas, há o aumento acentuado na expressão dessa proteína ácida, juntamente com hipertrofia e proliferação astrocitária [Sofroniew and Vinters, 2010].

Pericitos

Os pericitos são células que circundam parcialmente as células endoteliais de capilares e pequenas vênulas, os quais podem se fundir com a lâmina basal do endotélio vascular (Figura 4). O papel dessas células na formação e manutenção da barreira hematoencefálica vem sendo aos poucos elucidado. Assim, suas principais funções estão relacionadas com a regulação de várias atividades necessárias para a homeostase do SNC, incluindo manutenção do fluxo sanguíneo, angiogênese e estabilidade vascular; *clearance* de metabólitos tóxicos e manutenção da permeabilidade da BHE e da lâmina basal [Winkler et al., 2011].

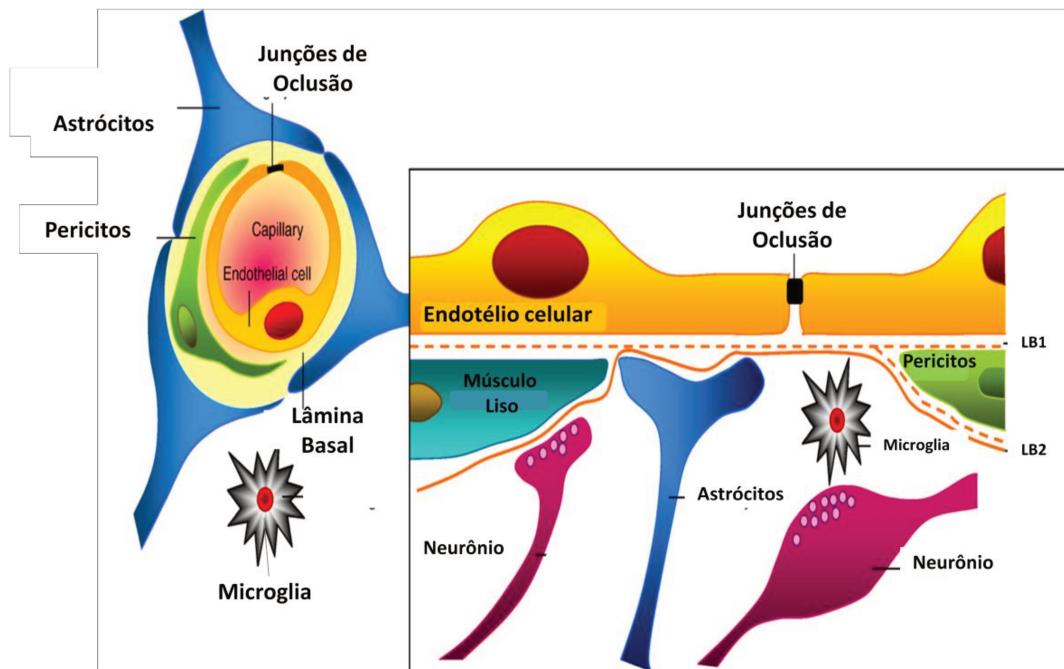


Figura 4. Associações celulares na Barreira Hematoencefálica (BHE). Adaptado de Abbott et al., 2010.

1.2.1 Vias de acesso da Barreira Hematoencefálica ao Sistema Nervoso Central

A homeostase do SNC depende de uma BHE saudável capaz de prevenir as flutuações dos íons e metabólitos que ocorrem no sangue periférico. Algumas condições médicas, como doenças neurodegenerativas ou

substâncias tóxicas, como o veneno da aranha *Phoneutria nigriventer*, podem causar a perda da integridade física ou fisiológica dessa barreira, comprometendo assim a função neural exercida pelos neurônios e pelas células da glia, o que prejudica a homeostase cerebral [Pardridge, 2012]. Embora a BHE seja essencial para o bom funcionamento do cérebro, ela continua a ser um grande obstáculo para a ação de medicamentos e intervenção terapêutica em patologias do sistema nervoso central [Pardridge, 2003].

Para exercer a sua função seletiva, a BHE é composta por um complexo juncional de células endoteliais dos capilares cerebrais que compreende as junções de oclusão (JO) e junções de adesão (JA), conhecida como via paracelular [Matter et al., 2003]. A BHE também é formada por vários sistemas seletivos de transportes que podem agir como transportadores de influxo e efluxo que é a via transcelular [Luurtsema et al., 2004].

a) Via paracelular

Durante a difusão de pequenas moléculas através das células endoteliais dos vasos que constituem a BHE, as junções intercelulares são modificadas para controlar o fluxo de moléculas pela via paracelular. Essa via é controlada pelas junções de oclusão (JO) ou *tight junction* e junções de adesão (JA) ou *adherens junction*. As JO, localizadas na porção média a apical do complexo juncional, são formadas por proteínas integrais de membrana ocludina, claudina e moléculas de adesão juncional (JAM) e por proteínas acessórias citoplasmáticas (ZO-1, ZO-2, ZO-3, cingulina e outras). As JA apresentam proteínas denominadas caderinas, que se unem ao citoesqueleto da célula endotelial pelas cateninas (α , β , γ), que são proteínas intermediárias, formando assim contatos adesivos entre as células (Figura 5) [Matter et al., 2003].

É importante destacar a existência das junções comunicantes (*gap-junctions*, GJ) que comunicam duas células. As GJ participam principalmente na sinalização célula-célula e célula-matriz e na fisiologia do SNC [Cheung et al., 2014; Eugenin et al., 2012]. Essas junções comunicantes são essenciais para a fisiologia dos neurônios e astrócitos cerebrais [Rouach et al., 2002].

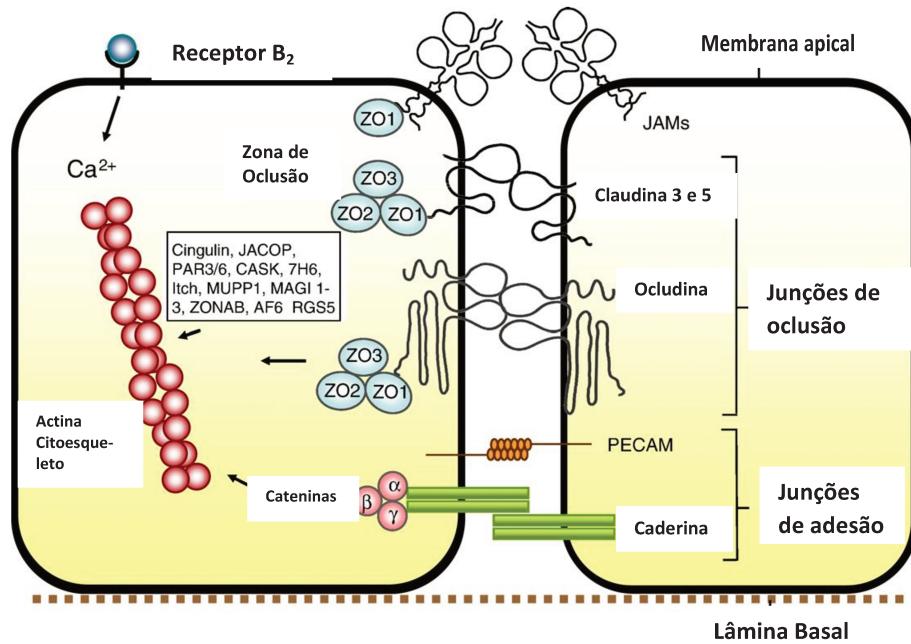


Figura 5. Estrutura das junções de adesão e oclusão da Barreira Hematoencefálica (BHE).
Fonte: Adaptado de Abbott et al., 2010.

b) Via transcelular

A via transcelular é uma rota altamente seletiva em que os receptores e transportadores presentes no endotélio podem agir no efluxo ou no influxo de substâncias, sendo alguns bidireccionais [Abbott et al., 2006]. As proteínas de influxo asseguram a entrada de nutrientes e as proteínas de efluxo previnem o acúmulo de componentes potencialmente tóxicos carreados para o sangue. Participam desta função diversas proteínas alvo, que tendo ou não afinidade pelo substrato a ser transportado medeiam seu transporte (Figura 6) [Ohtsuki and Terasaki, 2007]. Destaca-se no processo de efluxo a glicoproteína P (*P-glycoprotein* ou *P-gp*) que é considerada uma das principais proteínas transportadora de nessa categoria expressa pelas células endoteliais da BHE, astrócitos e micróglia [Higgs, 1992].

O transporte através da BHE, em geral, divide-se em: transporte através de carreadores ou transportadores (glicose e aminoácidos), endocitose mediada por receptor (insulina) e endocitose adsorptiva (lectina) (Figura 6). No processo de endocitose ocorre a invaginação da membrana plasmática e formação de vesículas com consequente internalização de micro e macromoléculas [Abbott et al., 2006].

É importante ressaltar que um dos tipos de endocitose mediada por receptor de extrema importância fisiológica da BHE são as cavéolas. As cavéolas são regiões especializadas da membrana celular, ricas em colesterol e esfingolipídios, cuja proteína estrutural central é a caveolina e desempenham papel chave no tráfego vesicular por transcitose, endocitose e potocitose [Pelkmans and Helenius, 2002; Williams and Lisanti, 2004]. Participa ativamente do processo de formação de cavéolas e principalmente do processo de liberação da vesícula formada para transporte a proteína dinamina-2. A dinamina-2 é uma GTPase com sensibilidade mecano-química que está envolvida na fissão da vesícula da membrana do endotélio da BHE. A dinamina-2 é a enzima que forma o gargalo da cavéola, e a perda do “gargalo” por fissão desprende a cavéola propriamente dita que então fica apta a ser transportada [González-Jamett et al., 2014].

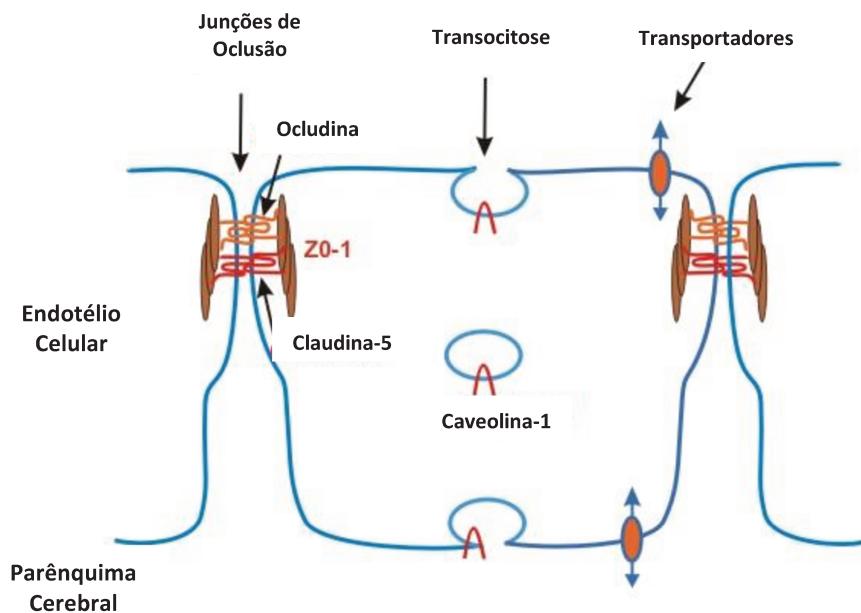


Figura 6. Rotas de transporte através da Barreira Hematoencefálica (BHE). Adaptado de Lee et al., 2001.

Assim o estudo da BHE se torna muito importante, pois sua função de homeostase desfavorece o acesso de muitos fármacos ao SNC, dificultando muitas vezes o tratamento eficaz. Dessa maneira o estudo em cima de substâncias como os venenos podem ser bastante promissores nessa atuação.

Nessa vertente, o veneno da aranha *Phoneutria nigriventer* tem apresentado resultados promissores.

1.3Aranha *Phoneutria nigriventer*

As aranhas, dentro do Reino Animal, pertencem à ordem Aranea, classe Arachnida, sendo descritas mais de 42.000 espécies distribuídas em 110 famílias [Vassilevski, 2009]. São animais em geral terrestres, com tamanhos variados que variam de 0,5 cm até mais de 20 cm, sendo todas carnívoras e se alimentam principalmente de insetos. Todas as aranhas produzem substâncias farmacologicamente ativas, onde a riqueza desses componentes farmacológicos faz desse grupo de animais um verdadeiro depósito de substâncias a serem testadas para fins de pesquisa e de desenvolvimento de drogas para a indústria farmacêutica e agroquímica [Cardoso et al., 2003].

No Brasil, os gêneros de aranhas com suas espécies *Phoneutria* (aranha armadeira), *Loxosceles* (aranha marrom) e *Latrodectus* (viúva negra) são responsáveis pelos casos mais graves de araneísmo, que é nome dado aos acidentes causados por aranhas [Lucas, 1988]. Os acidentes causados por *Loxosceles* e *Latrodectus* envolvem o contato accidental com essas aranhas em que a vítima espreme a aranha contra o corpo; já o gênero *Phoneutria* apresenta indivíduos bastante agressivos que ao se sentirem ameaçados atacam o seu opressor [Lucas, 2003].

A aranha *Phoneutria nigriventer*, conhecida popularmente como aranha “armadeira” (posição de defesa-ataque) ou aranha de “bananeira” (encontrada em “cachos” de banana), estão restritas à região da América do Sul (Figura 7). A maioria dos acidentes importantes clinicamente e causados por essa espécie no Brasil, ocorrem na região centro oeste, sudeste e sul [Bucaretschi et al., 2000].



Figura 7. Aranha *Phoneutria nigriventer* ou “armadeira” em posição de ataque. Fonte: America Museum of Natural History.

Os acidentes causados pela aranha *P. nigriventer* são importantes problemas de saúde pública em que podem apresentar desde sintomas leves (dor e edema local) até acidentes graves em que os pacientes apresentam sintomas como cólicas, tremores, convulsões tônicas, priapismo, taquicardias, hipertensão, distúrbios visuais, sudorese fria, em alguns casos edema pulmonar e morte. Tais sintomas são mais severos em crianças, idosos e/ou pessoas debilitadas [Bucaretschi et al., 2008].

Atualmente o tratamento dos acidentes leves se remete ao controle dos sintomas locais, em que é recomendado um anestésico local sem associação de vasodilatador. Já para as manifestações mais graves ou sistêmicas, trabalha-se com a soroterapia específica (soro antiaracnídico) na tentativa de barrar o veneno circulante o mais rápido possível evitando que a vítima chegue a óbito [Lucas, 1988; Bucaretschi et al., 2000].

1.4 Veneno da *Phoneutria nigriventer* (PNV)

1.4.1 Composição e neurotoxicidade

O veneno da aranha *P. nigriventer* contém peptídeos, aminoácidos livres, histamina e serotonina [Schenberg and Pereira Lima, 1971]. A maioria das toxinas que foram isoladas agem nos canais de sódio (Na^+), cálcio (Ca^{2+}) e potássio (K^+) [Gomez et al., 2002] e podem induzir repetidas descargas de potencial de ação nas membranas excitáveis das fibras nervosas e musculares

e produzirem efeitos neuroexcitatórios ao afetarem a neurotransmissão [Cruz-Höfling et al., 1985; Fontana and Vital Brazil 1985].

Estudos bioquímicos demonstram que o PNV possui potentes neurotoxinas e com base nos sinais clínicos excitatórios observados em pacientes e em experimentos com animais, percebeu-se que o veneno dessa aranha é neurotóxico e afeta o sistema nervoso autônomo [Antunes et al. 1992; Gomez et al. 2002], periférico [Fontana e Vital Brazil 1985; Cruz-Höfling et al., 1985; Love e Cruz-Höfling 1986; Love et al., 1986] e central [Le Sueur et al., 2003, 2004; Rapôso et al., 2007; Cruz-Höfling et al., 2009, 2016].

A partir do veneno bruto foram isoladas várias frações e as toxinas Phtx-1, Phtx-2, Phtx-3, sendo que todas demonstraram ação sobre o sistema nervoso de camundongos [Rezende Jr et al., 1991]. Os sintomas com ação excitatória como salivação, lacrimação, priapismo, paralisia flácida e espástica dos membros anteriores e posteriores e morte estavam relacionados com essas três principais toxinas derivadas do PNV [Schenberg and Pereira Lima, 1971]. A toxina Phtx-1 apresentou suas principais ações sobre os canais de Ca^{2+} [Figueiredo et al., 1995], a Phtx-2 atuou nos canais Na^+ [Araújo et al., 1993] e Phtx-3 demonstrou afetar os canais iônicos de K^+ e/ou Ca^{2+} [Troncone et al., 1995; Prado et al., 1996].

De um modo geral, a fração Tx3 e suas derivadas tem ação mais potente sobre o SNC [Antunes and Málaque, 2003]. Colaborando para essa maior atividade, verificou-se que a toxina PhTx3-3 apresentou inibição da liberação de glutamato dependente de Ca^{2+} em camundongos [Prado et al., 1996]; a PhTx3-4 inibiu canais de Ca^{2+} e liberou glutamato nas sinapses cerebrais [Miranda et al., 1998]; e a PhTx3-4 inibiu de forma seletiva e reversível receptores de glutamato N-metil-D-aspartato (NMDA) em neurônios hipocampais de rato [Figueiredo et al., 2001, ver De Lima et al., 2016 para revisão].

Percebe-se que o PNV apresenta grande quantidade de neurotoxinas, assim faz-se necessário uma ampla investigação da sua ação central. Dessa maneira, vale a pena investigar a ação desse veneno na barreira hematoencefálica, podendo ser ele uma boa ferramenta de auxílio à ação de fármacos no SNC.

1.4.2 Atuação do PNV sobre a BHE

Estudos realizados em nosso laboratório demonstraram que a injeção do veneno bruto de *P. nigriventer* em ratos provoca a permeabilidade temporária da barreira hematoencefálica no hipocampo e no cerebelo desses animais. Essa abertura temporária coincide com estado de envenenamento do animal, com a paralisia flácida e espástica transitória dos membros posteriores e com a salivação intensa [Le Sueur et al., 2003, 2004]. Experimentos posteriores vieram evidenciar macroscopicamente, através da coloração pelo azul de Evans, o que já se havia observado em nível molecular de que o PNV provoca a permeabilização temporária da BHE [Mendonça et al., 2014] ao mesmo tempo que causa profundas alterações bioquímicas hipocampais em ratos [Mesquita-Brito et al., 2018].

Nesse processo de permeabilização da BHE, os estudos sinalizaram que a via paracelular é atingida, apresentando a redução das proteínas de junção ocludina, ZO-1, claudina-5 (junções de oclusão) e β -catenina (junção de adesão) [Rapôso et al., 2012; Mendonça et al., 2014]. Rapôso et al., (2012) demonstraram que as junções comunicantes também sofreram alterações pelo o aumento da proteína Cx43. A lâmina basal foi outra estrutura que é afetada ao demonstrar diminuição na proteína laminina [Rapôso, 2007 et al., Mendonça et al., 2014].

Na via transcelular, observou-se aumento da forma inativa e ativa da proteína P-gp (do inglês *poly-glicoprotein*), nos períodos iniciais do envenenamento [Rapôso et al., 2012]; bem como também aumentou a atividade bombeadora da proteína de efluxo MRP-1 (*Multi-drug resistance-associated protein-1*), responsável pelo efluxo de substâncias prejudiciais ao SNC [Le Sueur et al., 2005]. Tais proteínas atuam efetivamente na bomba de efluxo da BHE, sugerindo assim que ocorreu um mecanismo compensatório pela perda da integridade nas junções celulares. Em tempos intermediários do envenenamento, verificou-se que a proteína transportadora de glicose (GLUT-1) tem sua expressão aumentada no endotélio, assim o aumento no aporte de glicose pode estar sendo utilizado no reparo tecidual das alterações geradas pelo PNV [Rapôso et al., 2014]. Já em tempos mais tardios ao envenenamento ocorreu o aumento na via endocítica tanto em modelos *in vitro* como *in vivo* [Le

Sueur et al., 2004, 2005]. Esse aumento na endocitose se dá através do aumento no tráfego de vesículas em trânsito pelo endotélio de vênulas, arteríolas e posteriormente de capilares da circulação cerebral [Le Sueur et al., 2003, 2004]. Recentemente, foi mostrado em nosso laboratório, evidências de que a caveolina-1 α , principal proteína estrutural das cavéolas, está envolvida na endocitose e aumento o tráfego transcelular nesse modelo de degradação da BHE induzida por PNV [Soares et al., 2014], e que cavéola é um alvo para o PNV [Soares et al., 2016]. Foi sinalizado ainda que em períodos de intensa intoxicação por PNV (1 h) ocorre a monomerização da enzima óxido nítrico sintetase endotelial (eNOS) (estado de desacoplamento), que dimeriza ainda mais sua forma ativa nos períodos de recuperação das manifestações tóxicas [Soares et al., 2015].

A continuidade dos estudos acerca da ação do PNV bruto no SNC em nosso laboratório, demonstrou a ativação de populações de neurônios através do aumento da expressão da enzima óxido nítrico sintetase neuronal (nNOS) nas regiões cerebrais de diferentes coordenadas estereotáxicas, como mostrado pela expressão da proteína cFOS [Cruz-Höfling et al., 2007; veja também, Cruz-Höfling et al., 2016 para revisão]. De fato, estudos posteriores demonstraram o envolvimento de fenótipos pro-inflamatórios após envenenamento por PNV [Rapôso et al., 2014] e o aumento de citocinas pro-inflamatórias (IFN- γ e TNF- α) após o envenenamento [Cruz-Höfling et al., 2009]. Além da ativação dessas citocinas pró-inflamatórias pelo PNV no hipocampo e cerebelo houve ainda gliose astrocitária, mediada pelo aumento da proteína marcadora astrocitária GFAP e também foi possível verificar que a proteína S-100 (biomarcador de injúria cerebral) econtrava-se intensamente marcada após o envenenamento tanto no cerebelo como em hipocampo de ratos [Cruz-Höfling et al., 2009].

Outras alterações transitórias dizem respeito à formação de edema perivasicular em função da ruptura da BHE. O edema observado é tanto citotóxico, como observado no cerebelo [Rapôso et al., 2007], quando os pés astrocitários ficam edemaciados; quanto vasogênico, como visto no hipocampo [Le Sueur et al., 2003], quando o edema extrapola para o espaço intersticial (neurópila) a partir do edema astrocitário. A formação de edema está relacionada à disfunção dos canais de água por conta de alteração na

expressão da principal proteína formadora desses canais, a aquaporina-4 (AQP4). Recentemente, demostramos que o PNV aumenta transitoriamente a expressão de AQP4 [Stávale et al., 2013]. É importante frisar que a AQP4 é marcadora de astrócitos estando densamente localizada na face luminal dos pés astrocitárias e colocalizada com canais kir4 de K⁺, enquanto na face voltada para a neurópila localizam-se os receptores de glutamato [Nielsen et al., 1997]. Os canais de água estão estreitamente associados tanto à formação como à resolução de edema cerebral e o PNV bloqueia canais de K⁺ e interfere na liberação e captação de glutamato [Vieira et al., 2003], e causa edema como mostrado através da expressão da AQP4 no cerebelo de ratos expostos ao veneno.

É importante sinalizar dentro desse contexto que a angiogênese também sofre alteração no processo de envenenamento sistêmico em ratos. Foi demonstrado que a expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e os receptores Flk-1 e Flt-1 e seus respectivos mRNAs foram regulados de forma variável e transitória em neurônios e astrócitos hipocampais de ratos [Mendonça et al., 2012, 2013]. Entretanto, não ficou claro se o VEGF seria um desencadeador de uma proteção causal, visando restaurar as perturbações homeostáticas induzidas pelo veneno. Assim, a investigação do papel do VEGF na mediação do PNV se faz importante para a contribuição na elucidação dos mecanismos envolvidos na permeabilidade temporária da BHE ocasionada pelo PNV. Nessa vertente, estudos mais recentes mostraram que a inibição da ligação do VEGF-Flk-1 pelo antifúngico itraconazol agravou a condição tóxica de animais que haviam sido injetados com PNV, bem como casou aumento do dano da BHE no hipocampo. Esse agravamento foi em conjunto com uma grande mudança na bioquímica das biomoléculas do hipocampo com ênfase nos lipídios, mas também envolvendo proteínas e ácidos nucléicos. Tais achados colaboraram para evidenciar o papel neuroprotetor do VEGF contra a perturbação da homeostase vascular e cerebral causada pela PNV, e que foi um dos propósitos do presente estudo [Mesquita-Brito et al., 2018].

1.5 Itraconazol

O itraconazol é um fármaco seguro e amplamente utilizado na prática clínica e aprovado pela FDA (Food and Drug Administration - USA). Esse agente pertence à família das drogas antifúngicas azólicas, que inibem a enzima lanosterol-14 α -demetilase (14-DM) que é responsável pelas conversões de lanosterol em ergosterol em fungos e lanosterol em colesterol em humanos, respectivamente [Nacev et. al, 2011]. O ergosterol é um componente vital da membrana celular dos fungos, assim a sua inibição tem como última consequência seu efeito antifúngico.

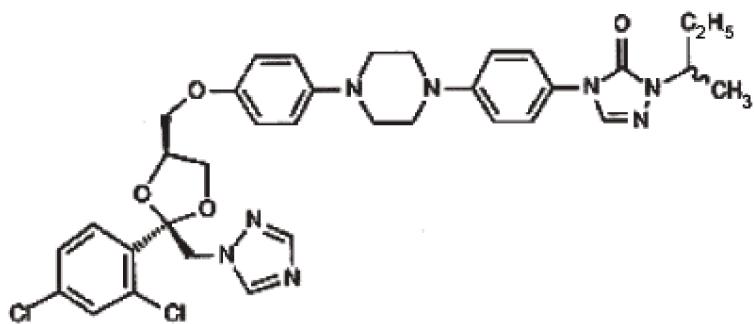


Figura 8. Estrutura química do Itraconazol. Fonte: Li et al., 2019.

Esse fármaco é rapidamente absorvido após a administração oral, com picos de concentração plasmática inalterado são obtidos 3 a 4 horas após a administração de uma dose oral. A eliminação do plasma é bifásica, com uma meia-vida terminal de 1 a 1,5 dias. O itraconazol liga-se às proteínas plasmáticas numa taxa de 99,8% e suas concentrações no sangue total correspondem a 60% da concentração no plasma. Sua metabolização é intensa no fígado, transformando-se em grande número de metabólitos, como o hidroxi-itraconazol, que apresenta, *in vitro*, uma atividade antifúngica comparável do itraconazol (Carrer et al., 2013).

Além do seu papel terapêutico como antifúngico, foi demonstrado por Chong et al., (2007) que o itraconazol tem sido identificado como um potente inibidor da proliferação de células endoteliais e da angiogênese estimulada, com inibição da biossíntese da 14-DM e de esteróis. Relatos recentes têm sugerido que a perturbação das vias de trânsito do colesterol, em que o

itraconazol atua, possa ser um possível mecanismo que contribui para essa atividade [Xu et al., 2010]. É importante ressaltar que esse antifúngico atuou como um antagonista da via de sinalização de *hedgehog* (envolvida na carcinogênese), fornecendo assim embasamento para a expansão da potencial aplicação terapêutica do itraconazol em ensaios clínicos de câncer em andamento [Kim et al., 2010].

Em virtude do seu poder anti angiogênico, o itraconazol tem sido utilizado como um potente inibidor do VEGF. Essa inibição ocorre devido ao itraconazol inibir significativamente a ligação do VEGF ao receptor VEGFR2, mesmo após a estimulação do VEGF. Estes efeitos foram devidos a um defeito no tráfego de VEGFR2 (ou Flk-1), levando à diminuição na sua expressão da superfície celular, além do que foram associados com o acúmulo de N-glicanos imaturos no VEGFR2. É interessante observar que esse antinfúngico não apresenta efeitos colaterais indesejáveis, como verificado com o uso de outros bloqueadores de VEGF [Nacev et al., 2011].

1.6 Hipótese

Assim, diante desse contexto e de estudos realizados em nosso laboratório na tentativa de desvendar o mecanismo de ação pelo qual o PNV causa a permeabilização temporária da BHE, lançamos a hipótese de que o aumento do VEGF, durante o envenenamento poderia ser um mecanismo para reverter ou prevenir dano cerebral excitotóxico. No entanto, para testar a validade dessa hipótese seria necessário que se efetuasse o bloqueio da ligação do VEGF ao seu receptor Flk-1 para que as consequências na permeabilidade da BHE, condições dos animais e transformações bioquímicas do hipocampo fossem avaliadas; e ainda propiciassem determinar quais seriam as vias de sinalização que levariam à expressão do VEGF em resposta ao Phoneutrismo em ratos. Sendo assim, o itraconazol se torna um excelente agente para efetivar o bloqueio das principais atividades desempenhadas pelo VEGF.

2.0 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Uma vez que a expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) se encontra aumentada, durante os efeitos tóxicos e da permeabilização da Barreira Hematoencefálica causado pelo veneno da aranha *Phoneutria nigriventer* (PNV), o presente trabalho teve como objetivo tentar elucidar os efeitos neuroprotetores do VEGF no hipocampo, após a inibição da ligação desse fator ao seu receptor VEGFR-2 (Flk-1) pelo itraconazol.

2.2 Objetivos Específicos

- a) Avaliar o efeito clínico causado pela inibição da ligação VEGF-Flk-1, em ratos adultos expostos (i.v.) ao veneno de *Phoneutria nigriventer* (PNV) em períodos de intensas manifestações neurotóxicas (1 e 2 h), quando mostram indícios de sinais de recuperação (5 h) e quando estão ausentes os sinais clínicos de envenenamento (24 h).
- b) Comprovar a inibição do itraconazol por imunoprecipitação no tempo de 2 h.
- c) Analisar a bioquímica do hipocampo de ratos que receberam administração sistêmica de veneno bruto de *Phoneutria nigriventer* sem ou com pré-tratamento com itraconazol por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR), nos períodos de 1 h, 2 h, 5 h e 24 h.
- d) Investigar por western blotting (WB), a expressão do fator 1- α indutor de hipoxia (HIF-1 α), do VEGF e de seus receptores Flt-1 e Flk-1 no hipocampo de ratos, após a pré-exposição (30 min) intravenosa de itraconazol seguido por PNV nos períodos de 1 h, 2 h, 5 h e 24 h;
- e) Verificar se a integridade da BHE foi afetada neste modelo de envenenamento e de bloqueio da ligação do VEGF-Flk-1 em hipocampo

de ratos adultos, através da expressão proteica (WB) de importantes proteínas da via paracelular (occludina, ZO-1, β -catenina) e da via transcelular de efluxo (P-gp) e de influxo por via endocítica (caveolina 1-alpha, dinamina-2 e Src), da membrana basal (laminina); bem como verificar a permeabilização da BHE macroscopicamente pela utilização do corante azul de Evans, nos períodos de 1 h, 2 h, 5 h e 24 h;

- f) Analisar o comportamento da via de sinalização do VEGF: PI3K/AKT, MAPK p38 e ERK 1/2 e de suas formas fosforiladas no hipocampo de ratos adultos, após a inibição da ligação do VEGF-FIk-1 pelo itraconazol, trabalhando com suas expressões proteicas por WB nos tempos de 1 h, 2 h, 5 h e 24 h.
- g) Avaliar a modulação da expressão de GFAP e VGEF em culturas primárias (tratadas e não tratadas com PNV e itraconazol) de astrócitos de ratos *Wistar*;
- h) Analisar a curva de sobrevivência em astrócitos tratados com PNV e itraconazol;

3.0 METODOLOGIA

❖ **Estudos *in vivo***

3.1 Comitê de ética

O presente trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/Unicamp, protocolo nº. 3223-1) e os experimentos foram realizados de acordo com o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

3.2 Animais, veneno e itraconazol

Ratos Wistar machos (*Rattus norvegicus*), com (6-8 semanas) semanas (190 ± 50 g), foram obtidos do Centro Multidisciplinar de Pesquisa Biológica (CEMIB) da UNICAMP. Os animais foram alojados em gaiolas, no total de 5 animais por gaiola, em condições laboratoriais padrão, recebendo alimentos e água *ad libitum* mantidos em um ciclo artificial claro/escuro de 12/12 h e temperatura entre 21-23 °C. O veneno da aranha *P. nigriventer* liofilizado foi gentilmente doado pelo Prof. Dr. Evanguedes Kalapothakis (Departamento de Biologia, IBS, UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil) e armazenado a -20 °C até sua utilização. O itraconazol, um sólido cristalino com mais de 98% de pureza (I6657) foi adquirido da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

3.3 Exposição ao veneno da *Phoneutria nigriventer*, itraconazol e seus controles

- PNV – Os ratos receberam uma injeção intravenosa (i.v.) de PNV (0,85 mg/kg em 0,5 mg/mL de solução salina estéril a 0,9%) através da veia da cauda [Le Sueur et al., 2003]. Após 1 e 2 h (intervalos com maiores sinais de toxicidade dos animais), 5 h (intervalo com sinais de recuperação dos animais) e 24 h (intervalo sem sinal de envenenamento detectável), os animais (n = 5 / tempo) foram mortos por decapitação (uso de guilhotina) após a inalação de CO₂ e os cérebros foram imediatamente dissecados.
- Itraconazol + PNV – Os animais receberam injeção intravenosa de itraconazol (dose de 10 mg/kg em uma mistura de 15% de dimetilsulfóxido (DMSO) com 85% de solução salina estéril 0,9%)

[Carrer et al., 2013], 30 min antes da injeção de PNV (0,85 mg/kg dissolvido em 0,5 mg/mL de solução salina a 0,9%). Os ratos tratados com itraconazol + PNV (grupo ITZ-PNV) foram mortos no mesmo intervalo e igual procedimento ao do grupo PNV: 1, 2, 5 e 24 h (n = 5 / tempo).

- Controles (salina e itraconazol) – Foram utilizados dois grupos de controle: um recebeu o mesmo volume (0,5 mg/mL) de solução salina esterilizada a 0,9% (i.v.) e o outro grupo controle recebeu itraconazol (10 mg/kg); os animais de ambos os grupos foram mortos após 5 h (n = 8-12 / grupo). Apenas um intervalo de tempo foi utilizado para poupar animais, além do que experimentos pilotos que foram realizados anteriormente não apresentaram diferenças relacionadas ao tempo para os grupos controle.

Após a remoção imediata do cérebro da caixa craniana dos animais controles salina e ITZ, e dos tratados com PNV e ITZ-PNV, os hipocampos dos lobos cerebrais esquerdo e direito foram cuidadosamente dissecados e congelados em nitrogênio líquido (-195,79 ° C; -320 ° F) até sua utilização para análise da expressão proteica por western blotting e espectroscopia no infravermelho com Transformada de Fourier.

3.4 Avaliação neurológica

Foram observados, através de inspeção visual de três avaliadores, todos os sinais clínicos (hiperemia, piloereção, tremores, salivação, dispinéia, paralisia espástica dos membros posteriores) apresentados pelos animais que utilizaram solução salina e ITZ (controles) e com PNV e ITZ-PNV (tratados), e após os tratamentos pelos tempos de sobrevida (1 h, 2 h, 5 h e 24 h).

3.5 Avaliação da permeabilidade da barreira hematoencefálica (BHE)

O método de extravasamento do corante vital Azul de Evans foi usado para avaliar a vulnerabilidade da BHE [Radu and Chernoff, 2013]. Os animais injetados com PNV receberam 10 mL/kg de solução de Azul de Evans (Vetec Química, Duque de Caxias, RJ, Brasil) (2% em solução salina a 0,9%, i.v.) as 1, 2, 5 e 24 h após injeção i.v. de PNV (n = 3 / tempo). Os animais pré-tratados com itraconazol seguido por PNV (grupo ITZ-PNV) receberam a mesma dose

de corante após 2 h ($n = 3$ / tempo). Este tempo foi selecionado para os animais com tratamento prévio de ITZ para poupar animais e porque no intervalo de 1-2 h os sinais de envenenamento alcançaram seu ápice, portanto, com maior vulnerabilidade da BHE ($n = 3$ / tratamento). Já os animais tratados apenas com solução salina 0,9%, ou itraconazol receberam a mesma dose de corante (tratamentos com PNV e ITZ-PNV) após 5 h ($n = 3$ / tratamento). Os ratos foram sacrificados por decapitação (guilhotina) após inalação de CO₂, 15 minutos após a injeção de azul de Evans e os cérebros foram rapidamente removidos e fotografados. Depois, os cérebros foram separados para expor os lobos temporais do hipocampo a serem fotografados.

3.6 Western blotting (WB)

A dosagem de proteínas separadas por eletroforese foi avaliada em homogeneizados de todo hipocampo (direito e esquerdo) nos grupos PNV, ITZ-PNV (tempos de 1, 2, 5 e 24 h, $n= 5$ / tempo) e solução salina e ITZ (tempo de 5 h. $n = 8-12$ / tratamento). Os hipocampos dos ratos (lobo direito e esquerdo) foram dissecados e homogeneizados com coquetel de extração de proteína (EDTA 10 mM, PMSF 2 mM, PNF 100 mM, pirofosfato de sódio 10 mM, NaVO4 10 mM, 0,1 mg de aprotinina / mL e Tris 100 mM, pH 7,4). As proteínas celulares foram quantificadas pelo ensaio de Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) e 40 µg dos lisado foram separados, sendo 8% (β -catenina, dinamina-2, Flt-1, Flk-1, HIF-1 α , laminina, ocludina e ZO-1) e 12% (Akt, pAkt, caspase 3, caveolina-1 α , , ERK, pERK, p38, pp38, NeuN, P-gp, Src e VEGF) SDS-PAGE. Após a transferência eletrônica na membrana de nitrocelulose (BioRad), as membranas foram incubadas com 5% de albumina de soro bovino (BSA) para bloquear locais antigênicos não específicos seguindo-se a lavagem com 0,1% de solução salina tamponada com Tris com 0,05% de Tween 20 (TBS-T), pH 7,4. A seguir as membranas foram incubadas durante a noite com os anticorpos primários (detalhes na Tabela 1). O anticorpo monoclonal β -actina foi utilizado como controle endógeno. As bandas de proteínas específicas foram visualizadas através de reagente quimioluminiscente (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) e a densidade de pixels em cada banda foi determinada pelo software Image J 1.45s (Wayne Rasband, NIH, Bethesda, MD, EUA). Os resultados foram confirmados em três conjuntos de experiências.

Tabela 1. Anticorpos primários usados no Western blotting (WB).

Anticorpo	Diluição	Fornecedor	Referência	Secundário
Cav-1α	1:1000	Santa Cruz	Sc-894	Coelho polyclonal
Caspase 3	1:500	Santa Cruz	Sc-7148	Coelho polyclonal
ERK	1:500	Santa Cruz	Sc-292838	Coelho polyclonal
phospho ERK	1:500	Santa Cruz	Sc- 101760	Coelho polyclonal
Flk-1	1:250	Santa Cruz	Sc-315	Coelho polyclonal
Flt-1	1:500	Santa Cruz	Sc-316	Coelho polyclonal
HIF-1α	1:500	Santa Cruz	Sc-10790	Coelho polyclonal
Laminin	1:500	Sigma Aldrich	L9393	Coelho polyclonal
NeuN	1:2000	Millipore	ABN78	Coelho polyclonal
P38	1:500	Santa Cruz	Sc-7149	Coelho polyclonal
phosphoAKT	1:500	Santa Cruz	Sc-7985-R	Coelho polyclonal
phosphoP38	1:500	Santa Cruz	Sc-17852-R	Coelho polyclonal
Src	1:1000	Cell Signally	#2108	Coelho polyclonal
ZO-1	1:500	Invitrogen	617300	Coelho polyclonal
AKT	1:500	Santa Cruz	Sc-1619	Cabra monoclonal
Dyn-2	1:500	Santa Cruz	Sc-81150	Cabra monoclonal
Occludin	1:500	Santa Cruz	Sc-8144	Cabra monoclonal
β-actin	1:1000	Sigma Aldrich	A2228	Rato monoclonal
β –catenin	1:600	Santa Cruz	Sc-7963	Rato monoclonal
PgP	1:250	Sigma Aldrich	P7965	Rato monoclonal
VEGF	1:500	Santa Cruz	Sc-7269	Rato monoclonal

3.7 Imunoprecipitação

A avaliação da associação das proteínas VEGF-Flk-1 foi realizada no hipocampo dos quatro grupos 2 h (intervalo com maiores sinais de envenenamento) após administração por i.v. de PNV, ITZ-PNV, solução salina ou ITZ ($n = 3$ / tratamento). Os hipocampos foram removidos e imediatamente homogeneizados em tampão de solubilização a 4 ° C (1% de Triton X-100, Tris-HCl 100 mM, pH 7,4), pirofosfato de sódio 100 mM, fluoreto de sódio 100 mM, EDTA 10 mM, ortovanadato de sódio 10 mM, PMSF 2,0 mM e 0,1 mg de aprotinina / mL. As amostras homogeneizadas de hipocampo foram centrifugadas durante 40 min a 11.000 rpm num rotor de 70 Ti (Beckman) a 4 ° C. A concentração de proteínas dos sobrenadantes foi determinada pelo método de coloração de Bradford. Foram utilizadas alíquotas dos sobrenadantes resultantes contendo 300 µg de proteína total para imunoprecipitação com anticorpo anti-VEGF (10 µL) a 4 °C durante a noite, seguindo-se a incubação com A-Sepharose [Solon et al., 2012]. As amostras de imunoprecipitado foram separadas por SDS-PAGE, transferidas por eletrotransferência para membranas de nitrocelulose e com o anticorpo anti-Flk-1 (1:250). As bandas específicas foram visualizadas por reagente de quimioluminiscência e a densidade de pixels em cada banda foi determinada pelo software Image J 1.45s. Os experimentos foram confirmados em três conjuntos de experimentos.

3.8 Espectroscopia no infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)

Os hipocampos congelados armazenados em nitrogênio líquido de cada grupo: salina, ITZ, PNV, ITZ-PNV ($n = 3$ / tempo / tratamento) foram liofilizados em um equipamento de alto vácuo (LyoStar 3, SP Científica, São Paulo, SP), permanecendo em secagem por mais de 24 h, com precisão de temperatura de $\pm 0,5$ °C e controle a vácuo em 0,1%. Em seguida, Os hipocampos liofilizados dos grupos salina e ITZ (5 h, $n = 3$) e PNV e ITZ-PNV (1, 2, 5 e 24 h, $n = 3$ / tempo / tratamento), bem como a amostra liofilizada do PNV ($n = 1$), foram misturados com brometo de potássio de potássio (KBr) em

um almofariz (na proporção de 1:150 mg) para a confecção de pastilhas de KBr e amostras. No total foram preparadas 31 pastilhas e os espectros de infravermelhos foram obtidos na faixa de 4000 a 400 cm⁻¹, com resolução de 4 cm⁻¹, no modo de transmissão, com 32 varreduras a uma temperatura controlada entre 18 – 20 °C. O espectrofotômetro utilizado foi um GX FTIR Spectrum (Perkin-Elmer®, Waltham, Massachusetts, EUA) e os espectros foram pré-processados com o auxílio do software Spectrum 5.3 utilizando correções de linha de base e suavização espectral pelo algoritmo Savitzky-Golay (9 pontos), seguido por normalização espectral e colocado em absorbância. Cada medição foi realizada em triplicata.

❖ Estudos *in vitro*

3.9 Comitê de ética II

Para o desenvolvimento dessa etapa do estudo houve a aprovação dos experimentos pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/Unicamp, protocolo nº. 3223-1A) e os mesmos foram realizados de acordo da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL).

3.10 Cultura purificada de astrócito

Culturas purificadas de astrócitos foram estabelecidas através da dissociação do córtex cerebral [McCarthy and De Vellis, 1980] de ratos *Wistar* neonatos (primeiro ou segundo dia pós-natal) obtidos no CEMIB/UNICAMP. O procedimento foi realizado com material cirúrgico estéril. Desta forma, procedeu-se a dissecção e fragmentação do tecido, o qual foi lavado em PB (0,1M, pH 7,4, Nutricell, Brasil) e imerso em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) sem cálcio e magnésio (pH 7,7, Nutricell, Brasil). Em seguida foi realizada a tripsinização (70 µl de tripsina em 4 ml de PB por três minutos) e posterior adição de soro fetal bovino para bloqueio da ação enzimática. A solução resultante foi colocada sobre um coxim de BSA (*bovine serum albumin*, albumina bovina 4% em DMEM) e submetida à centrifugação (1.300 RPM por 10 minutos). O precipitado foi ressuspensido em meio de cultura para células gliais, previamente preparado e aquecido à 37°C. As células foram aplicadas em placa para cultura (Costar, USA) contendo 24 poços (300 µl em cada poço). As placas com as culturas de astrócitos foram mantidas em incubadora com a

temperatura de 37°C e atmosfera de 5% de CO₂. Após 24 horas, deu-se início ao tratamento com PNV e Itraconazol. O desenho experimental de cada placa foi previamente definido da seguinte forma:

- Colunas 1 e 2: grupo controle, constituído somente por astrócitos cultivados com meio de cultura para células gliais;
- Coluna 3: grupo experimental, constituído por astrócitos + itraconazol na concentração de 800 nM [Nacev, 2011];
- Coluna 4: grupo experimental, constituído por astrócitos + PNV na concentração de 14,6 µg/ml [Le Sueur, 2003 e 2004];
- Coluna 5: grupo experimental, constituído por astrócitos + itraconazol + PNV. O itraconazol foi, primeiramente, adicionado em cada poço contendo os astrócitos e, 10 minutos após, incluiu-se o PNV.

Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

3.11 Curva de sobrevivência

Após a terceira passagem, os astrócitos corticais foram ressuspensos, em três placas diferentes, contendo cada uma 24 poços (Costar, USA). Em cada placa foram lançadas 20 mil células em 4 poços por grupo e, após 24 horas do plaqueamento, foram iniciados os tratamentos com PNV e Itraconazol. As placas com as culturas de astrócitos foram mantidas em incubadora com a temperatura de 37°C e atmosfera de 5% de CO₂. As culturas foram fixadas 2 horas, 5 horas e 24 horas após o início do tratamento. Após a fixação, os núcleos celulares foram corados com DAPI (4',6-Diamidino-2-fenilindol – Sigma), que identifica o núcleo celular ligando-se às moléculas de DNA, durante dez minutos, e digitalizados utilizando microscópio de fluorescência (Nikon TS100) com filtro para luz ultravioleta. Após serem digitalizadas, as fotos contendo os núcleos corados com DAPI foram analisadas no programa Photoshop CS5 para contabilizar o número total de núcleos contidos em cada foto. Foram quantificadas dez fotos para cada grupo.

3.12 Imunocitoquímica

Finalizado o período de tratamento, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% em DMEM. Após a fixação, as células foram lavadas em PB sem cálcio e magnésio (0,1M, pH 7,4, Nutricell, Brasil) e incubadas durante

duas horas com anticorpo primário cabra anti-GFAP (1:100, Santa Cruz), coelho anti-VEGF (1:200, Abcam). As células foram novamente lavadas em PB estéril e incubadas durante 45 minutos com anticorpos secundários anti-cabra, anti-coelho e anti-cabra, respectivamente, conjugados com CY-3 ou CY-2 (Jackson Lab., USA). Após finalização da técnica, as culturas foram mantidas em glicerol/PB 0,01M (3:1) para análise em microscópio de fluorescência.

Para cada grupo (controles e dosagens experimentais) três culturas de células foram incubadas com cada anticorpo, num total de doze poços por grupo. A quantificação foi realizada utilizando-se o software IMAGEJ (versão 1.33u, *National Institutes of Health*, USA). Assim, seis áreas representativas de cada poço com cultura foram documentadas para quantificação da densidade integrada de pixels. Uma média aritmética foi calculada para cada grupo experimental e, através da análise desses valores, foram realizadas as comparações entre os grupos.

3.13 Análise estatística

Os resultados numéricos foram analisados usando o pacote de software GraphPad Prism (San Diego, CA, EUA). A comparação do controle versus PNV e ITZ-PNV versus controle foi analisada por ANOVA unidirecional seguido do teste Dunnett *pos-hoc*. A comparação tempo-a-tempo entre amostras independentes de PNV versus ITZ-PNV foi analisada pelo teste de Mann Whitney U; um valor $p \leq 0,05$ indica significância estatística. Os dados foram expressos como média \pm SEM. As análises de FT-IR foram processados no software ORIGIN 7.5.

4.0 RESULTADOS

Este exemplar de Tese foi organizado com base em critérios estabelecidos pela Comissão Central de Pós-Graduação da Pró-Reitoria de Pós-Graduação da Universidade Estadual de Campinas (CCPG-PRPG/UNICAMP) nº 002/2018, que regulamenta o formato alternativo ao modelo tradicional para dissertações e teses e permite a inserção de artigos científicos publicados ou submetidos mediante aprovação da Editora, de autoria ou co-autoria do candidato.

Assim, a composição dos Resultados desta Tese ficou dividida em dois artigos científicos, os quais um foi publicado (Capítulo I) e o outro submetido para publicação (Capítulo II); e Dados Complementares (Capítulo III) conforme descrito abaixo:

- **Capítulo I:** Inhibition of VEGF-Flk-1 binding induced profound biochemical alteration in the hippocampus of a rat model of BBB breakdown by spider venom. A preliminary assessment using FT-IR spectroscopy. *Neurochemistry International*. 2018; 120: 64-74. DOI: 10.1016/j.neuint.2018.07.011.
- **Capítulo II:** VEGF/Flk-1 system exerts neuroprotection against *Phoneutria nigriventer* spider envenomation through PI3K-AKT-dependent pathway (Submetido à *Toxicon Journal*).
- **Capítulo III:** Dados Complementares (Estudo *in vitro*, a ser redigido para publicação).

CAPÍTULO I

Neurochemistry International 120 (2018) 64–74



Contents lists available at ScienceDirect

Neurochemistry International

journal homepage: www.elsevier.com/locate/neuint



Inhibition of VEGF-Flk-1 binding induced profound biochemical alteration in the hippocampus of a rat model of BBB breakdown by spider venom. A preliminary assessment using FT-IR spectroscopy



Maria Helena Rodrigues Mesquita-Brito^{a,b}, Monique Culturato Padilha Mendonça^{a,b}, Edilene Siqueira Soares^b, Kumiko Koibuchi Sakane^c, Maria Alice da Cruz-Höfling^{a,b,*}

^a Department of Pharmacology, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil

^b Department of Biochemistry and Tissue Biology, Institute of Biology, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil

^c Institute for Research and Development, University of Vale do Paraíba, São José dos Campos, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

ABSTRACT

Keywords:
Blood-brain barrier
Hippocampus
Itraconazole
FT-IR spectroscopy
Phoneutria nigriventer
Spider venom
VEGF

Phoneutria nigriventer spider venom (PNV) contains ion channels-acting neuropeptides that in rat induces transitory blood-brain barrier breakdown (BBBb) in hippocampus in parallel with VEGF upregulation. We investigated whether VEGF has a neuroprotective role by inhibiting its binding to receptor Flk-1 by itraconazole (ITZ). FT-IR spectroscopy examined the biochemical status of hippocampus and evaluated BBBb in rats administered PNV or ITZ/PNV at periods with greatest toxicity (1–2 h), recovery (5 h) and visual absence of symptoms (24 h), and compared to saline and ITZ controls. The antifungal treatment before venom intoxication aggravated the venom effects and increased BBB damage. FT-IR spectra of venom, hippocampi of controls, PNV and ITZ-PNV showed a 1400 cm⁻¹ band linked to symmetric stretch of carboxylate and 1467 cm⁻¹ band (CH₂ bending: mainly lipids) that were considered biomarker and reference bands, respectively. Inhibition of VEGF/Flk-1 binding produced marked changes in lipid/protein stability at 1–2 h. The largest differences were observed in spectra regions assigned to lipids, both symmetric (2852 cm⁻¹) and asymmetric (2924 and 2968 cm⁻¹). Quantitative analyses showed greatest increases in the 1400 cm⁻¹/1467 cm⁻¹ ratio also at 1 h. Such changes at period of rats' severe intoxication referred to wavenumber region from 3106 cm⁻¹ to 687 cm⁻¹ assigning for C-H and N-H stretching of protein, Amide I, C=N cytosine, N-H adenine, Amide II, CH₂ bending: mainly lipids, C-O stretch: glycogen, polysaccharides, glycolipids, z-type DNA, C-C, C-O and CH out-of-plane bending vibrations. We conclude that VEGF has a neuroprotective role and can be a therapeutic target in PNV envenomation. FT-IR spectroscopy showed to be instrumental for monitoring biochemical changes in this model of *P. nigriventer* venom-induced BBB disruption.

1. Introduction

The *Phoneutria nigriventer* spider venom (PNV) is a depository of large molecular diversity, which action involves the nervous and muscular system and interferes in the hemodynamics. Fractionation of venom reveals a plethora of toxins with broad spectrum of pharmacological action in insects and mammals which results mainly from interference on the physiology of sodium, potassium and calcium channels and disturbance of glutamate and acetylcholine release (see De Lima et al., 2016 for review). Crude PNV has been considered a potential source of molecules for the design of new drugs to be used in pharmaceuticals and agrochemical products. In Brazil, more than 90% of

human accidents with *P. nigriventer* are of low level and causes just profuse sweating in the victims and local pain, edema and erythema; accidents scored as severe cause besides nausea and vomiting, blurred vision, agitation, priapism, hypertension, tachycardia, arrhythmias, respiratory distress and convulsion. Less than 0.5% of accidents are graded as severe (Bucaretti et al., 2017). In rats, the crude PNV reproduces most of the toxic signs observed in humans (Le Sueur et al., 2003, 2004; Raposo et al., 2007; Mendonça et al., 2013). All these effects are self-limiting thus making the researches with *P. nigriventer* venom components even more attractive.

Our group has shown that the crude venom of *P. nigriventer* promotes temporary opening of the blood-brain barrier (BBB) in the

* Corresponding author. Department of Biochemistry and Tissue Biology, Institute of Biology, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil.

E-mail address: hofling@unicamp.com (M.A. da Cruz-Höfling).

<https://doi.org/10.1016/j.neuint.2018.07.011>

Received 15 May 2018; Received in revised form 5 July 2018; Accepted 30 July 2018

Available online 31 July 2018

0197-0186/ © 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

hippocampus and cerebellum of rats, which courses with a likewise toxic state and transitory flaccid and spastic paralysis of the hind limbs and intense salivation (Le Sueur et al., 2003, 2004). Moreover, the crude PNV activates populations of neuronal nitric oxide synthase (nNOS)-positive neurons in brain regions of different stereotaxic coordinate as shown by the expression of cFOS protein (Cruz-Höfling et al., 2007; see also, Cruz-Höfling et al., 2016 for review).

The BBB main component is the endothelium of capillaries whose structure is unique due to the lack of pores, high electrical resistance and adhesion and tight junctional proteins covering completely the cell-cell contacts. This apparatus prevents the paracellular transport of hydrophilic molecules but did not avoid the lipophilic molecules as O₂ and CO₂ that diffuses freely through the cell membrane alongside a concentration gradient (Grieb et al., 1985; Abbott et al., 2018). Thus, the bidirectional trafficking of molecules is obligatorily through the transcellular route via endocytosis, formation of caveolae, and transport of vesicles, all tightly regulated by membrane receptors and carriers; other BBB structures comprise the basement membrane, the end-feet processes of perivascular astrocytes and pericytes all-encompassing and working in concert for the selectivity of the barrier (Pardridge, 2003). The homeostasis of the central nervous system (CNS) relies on a healthy BBB able to prevent the ions and metabolites fluctuations occurring in the peripheral blood; certain medical conditions, such as neurodegenerative diseases or toxic substances, as PNV, can break down the functioning of the BBB and its role as guardian of brain homeostasis. It is worth mention that a steady-state BBB remains a major obstacle for drug delivery and therapeutic intervention in pathologies of the CNS (Pardridge, 2012). Studies dealing with natural substances that open transitorily the BBB with minimal side effects are of interest.

Our previous studies have shown that a mechanism underlying the opening of the BBB by the *P. nigriventer* spider venom could likely involve the vascular endothelial growth factor (VEGF) and receptors (Mendonça et al., 2012, 2013, 2014). We have found time-dependent increases of VEGF and receptors in rats systemically injected with PNV. VEGF has a major regulatory role on endothelial cell proliferation, angiogenesis and vascular permeability, including at the BBB (Ferrara, 2000). Growing number of evidences have now been referring to a neuroprotective role to VEGF following brain insult (Rosenstein and Krum, 2004; Yasuhara et al., 2004; Góra-Kupilas and Joso, 2005; Sun and Guo, 2005), particularly in hippocampus (Cammalleri et al., 2011). VEGF ligand regulation is evoked mainly by the VEGFR-2 signaling, a transmembrane tyrosine kinase receptor also named Flk-1 (Ferrara et al., 2003). In fact, the inhibition of Flk-1 leads to neuronal deterioration following traumatic brain/hippocampus's injury (Sköld et al., 2006; Lee and Agoston, 2009), and worsening of illness condition. We do not know whether the increased expression of VEGF in the hippocampus of rats administered crude PNV earlier reported (Mendonça et al., 2012, 2013, 2014) would be a triggering of a causal protective factor aimed at modulating the venom's homeostatic perturbations. One way to clarify this is by blocking VEGF ligand through the inhibition of Flk-1. Itraconazole is a Food and Drug Administration (FDA)-approved agent belonging to the family of azole antifungal drugs. Reports describe itraconazole as having antiangiogenic properties due to the inhibition of VEGF/Flk-1 binding (Chong et al., 2007; Aftab et al., 2011; Nacev et al., 2011).

Hence, the aim of the current work is to examine how the inhibition of Flk-1/VEGF binding by itraconazole echoes on both the neurotoxic condition of the animals and BBB integrity, as well as to analyze possible changes in functional groups in the hippocampus molecular content of rats administered PNV.

To achieve this purpose we followed the evolution of animals during the experimental period, evaluate BBB status by infusing Evans blue vital dye and used vibrational spectroscopy to assessing the biochemistry of the hippocampus of rats that received systemic administration of *Phoneutria nigriventer* crude venom before and after itraconazole treatment.

2. Materials and methods

2.1. Ethics statement

The institution's Committee for Ethics in Animal Use (CEUA/IB/UNICAMP, protocol n. 32223-1) approved this study and the experiments were carried out according to the Brazilian Society of Laboratory Animal Science (SBCAL) guidelines.

2.2. Animals, venom and itraconazole

Male Wistar rats (*Rattus norvegicus*), aged 6 weeks (190 ± 50 g) were obtained from the Multidisciplinary Center for Biological Research (CEMIB) of UNICAMP and housed under standard laboratory conditions, and receiving food and water *ad libitum*. The lyophilized *P. nigriventer* spider venom was kindly donated by Dr. Evanguedes Kalapothakis (Department of Biology, IBS, UFMG, Belo Horizonte, MG, Brazil) and stored at -20 °C until its use. Itraconazole was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

2.3. Exposure to *Phoneutria nigriventer* venom and itraconazole and their controls

Since our previous studies showed that both the clinical condition of animals and BBB-disruption were self-limited, and the VEGF upregulation was time-related, the analyses were taken at a time-window from 1 to 24 h, corresponding to clinical evolution of envenomed animals.

PNV - Rats received an intravenous (i.v.) injection of PNV (0.85 mg/kg in 0.5 mg/ml of 0.9% sterile saline) through the tail vein (Le Sueur et al., 2003). After 1 and 2 h (intervals with greatest signs of envenomation), 5 h (interval with signs of animals recovery) and 24 h (interval with no detectable envenomation sign), the animals (n = 3/interval, total of 12 animals in this group) were euthanized by decapitation after CO₂ inhalation and the brains were immediately removed.

ITZ - The animals received i. v. injection of itraconazole (10 mg/kg dissolved in a mixture of 15% dimethylsulfoxide (DMSO) plus 85% of 0.9% sterile saline solution (Carrer et al., 2013), 30 min prior to the injection of PNV. Itraconazole + PNV-treated rats (ITZ-PNV group) were euthanized at same intervals and as for PNV alone group: 1, 2, 5 and 24 h (n = 3/time, total of 12 animals in this group). The effectiveness in inhibiting the VEGF-Flk-1 binding by itraconazole was assessed by immunoprecipitation; the data showed a significant decrease of the VEGF-Flk-1 immunecomplex in the hippocampus of ITZ-PNV rats in comparison to the found in the PNV group (unpublished results).

Control - Two groups of controls were used: One received the same volume (0.5 mg/ml) of 0.9% sterile solution (i.v.) and the other control group received itraconazole; the animals of both groups were euthanized after 5 h (n = 3/group, total of 6 animals in control groups) We used just one interval because a previous pilot experiment had indicated the normality of animals' behavior of these two groups irrespective of the survival period. Our goal was to keep the number of animals used in the experiments to a minimum if unneeded.

After immediate brains excision from the scalp, the hippocampi from saline and ITZ controls, PNV- and ITZ-PNV-treated rats were carefully dissected, according to Paxinos and Watson (1986) rat brain atlas and frozen in liquid nitrogen (-195.79 °C; -320 °F) until its use. Fresh brain has the advantage to allow identifying visually different regions and anatomical boundaries because they show different colors and shapes. For hippocampi dissection, the brains were placed in Petri dish containing physiologic solution and a cross-section was made with a scalpel. The hippocampus was paler than the cortex and then carefully dissected with surgical material (tweezers, spatula) and removed from the left and right brain hemispheres. Then, the hippocampi (n = 3 animals per group) were frozen immediately in liquid nitrogen (-195.79 °C; -320 °F) until use.

2.4. Evaluation of blood-brain barrier (BBB) permeability

Evans blue dye (EB) extravasation method was used to assessing BBB vulnerability. The BBB in rats aged 6 weeks is completely mature (Risau and Wolburg, 1990). The animals injected with PNV received 10 ml/kg of EB (Vetec Química, Duque de Caxias, RJ, Brazil) solution (2% in 0.9% saline, i. v.) at 1, 2, 5 and 24 h after i. v. injection of PNV ($n = 3$ /time, $n = 12$ /PNVgroup). As for PNV-injected rats, animals treated with itraconazole before PNV (ITZ-PNV group) received same dye dose after treatment ($n = 3$ /time, $n = 12$ /ITZ-PNVgroup); animals treated with 0.9% saline or itraconazole alone received same dye dose at 5 h ($n = 3$ /treatment). The rats were euthanized by decapitation after CO_2 inhalation 15 min after EB injection and brains were rapidly removed and photographed. After, the brains were sectioned for checking Evans blue spreading into the brain tissue. All animals from the four groups were observed following treatment and during their survival to observe their clinical condition evolution.

The total number of animals used in FT-IR spectroscopy and Evans blue studies was 60.

2.5. Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy

The frozen hippocampi stored in liquid nitrogen from each saline, ITZ, PNV, ITZ-PNV groups were lyophilized in a high vacuum equipment (LyoStar 3, SP Científica, São Paulo, SP, Brazil), main drying (over 24 h) and features Type T thermocouple-controlled shelf temperature accuracy of $\pm 0.5^\circ\text{C}$ and vacuum control with 0.1%. The refrigerator system enabled shelf pull down from ambient to -40°C in less than 25 min. The hippocampi powder from the saline and ITZ controls (5 h, $n = 3$ for each control) and PNV and ITZ-PNV groups (1, 2, 5 and 24 h, $n = 3$ /time; $n = 12$ /group), as well as, the lyophilized *Phoneutria nigriventer* venom ($n = 1$) were mixed with dried potassium bromide (KBr) in a mortar (at ratio of 1 mg:150 mg). Thirty one KBr pellets were prepared and infrared spectra were obtained using the spectrum in the range of 4000 cm^{-1} to 400 cm^{-1} with a resolution of 4 cm^{-1} in the transmission mode, with 32 scans at a controlled temperature of $18\text{--}20^\circ\text{C}$. The spectrophotometer used was a GX FTIR Spectrum (Perkin-Elmer®, Waltham, Massachusetts, EUA) and the spectra were pre-processed with the aid of the Spectrum 5.3 software utilizing baseline correction and smoothing by a 9-points Savitzky-Golay algorithm followed by spectral normalization and placed in absorbance. The mean spectra for each group were obtained. Each measurement was performed in triplicate. For the analysis of the obtained spectra we used Origin software, version 7.5. The present study model intends to delineate possible qualitative and quantitative differences in the hippocampal tissue by FT-IR spectroscopy analysis when Flk-1, the main receptor of VEGF is inhibited by itraconazole. Statistic treatment is not required.

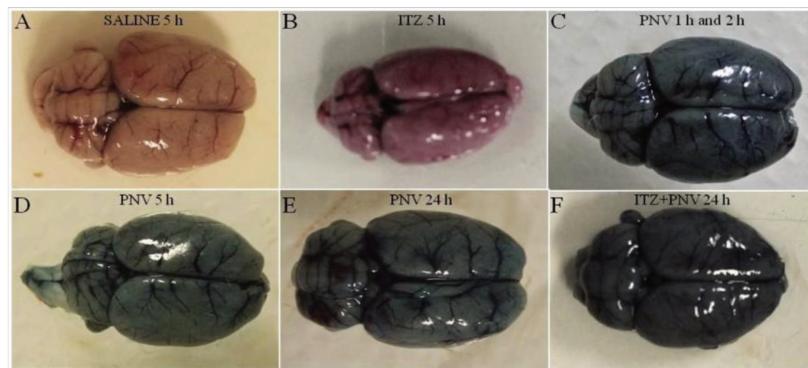


Fig. 1. Representative images of dorsal surface of brains from rats i. v.-infused with Evans blue 5 h after saline (Saline 5 h) or itraconazole (ITZ 5 h) administration, and 1, 2, 5 and 24 h after *Phoneutria nigriventer* venom administration (PNV 1 h and 2 h; PNV 5 h; PNV 24 h), and after itraconazole plus PNV injection (ITZ-PNV here displayed just the 24 h interval); $n = 3$ per interval. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

3. Results and discussion

3.1. Signs of envenoming

The rats administered saline or itraconazole alone appeared clinically normal all over the 5 h post i. v. injection. There is no visible distinction in the behavior of both control groups. In contrast, the animals i. v.-injected with *Phoneutria nigriventer* venom presented immediate signs of intoxication, such as piloerection, ear redness, intense salivation, shivering, dyspnea, and spastic paralysis of the hind limbs (Le Sueur et al., 2003; Rapôso et al., 2007; Mendonça et al., 2013); they remained immovable at the corner of the cage. Animals surviving 5 h post venom administration showed amelioration of paralysis and started strolling around the cage; animals which survived 24 h post envenomation showed no visible signs of intoxication (Soares et al., 2015, Supplementary 1). The signs of intoxication of animals pre-treated with itraconazole (ITZ-PNV group) were visibly more precocious and intense mainly relative to shivering, dyspnea and one fatal case occurred within the 1 h interval. Another animal was treated with ITZ plus PNV to complete $n = 3$ animals for 1 h interval). The finding indicates that the inhibition of VEGF/Flk-1 binding by itraconazole was deleterious for the clinical outcomes of animal. This is in accordance with the trophic role of VEGF and receptor on neurons and vascular cells (Ferrara, 2000; Rosenstein and Krum, 2004; Yasuhara et al., 2004; Góra-Kupilas and Josclo, 2005; Sun and Guo, 2005), and reiterate that inhibition of Flk-1 signaling after brain insult increases neuronal deterioration in the injured area (Ferrara et al., 2003; Sköld et al., 2006).

3.2. Evaluation of blood-brain barrier permeability

The usefulness of infusing EB to delineate BBB dysfunction has long been used, and has been successfully demonstrated in PNV-induced BBB leakage (Mendonça et al., 2013). In the present study, the brains of adult rats from saline control that had been i. v.-infused with EB before euthanasia (5 h) remained unstained as shown by the pinkish color of the whole brain; the data indicate that there was no extravasation of the dye from microvasculature circulation into the brain, thus indicating a fully functional BBB. However, in the brain and in the regions of hippocampus of the itraconazole control a bluish shadow obscured the fresh pink color, thus indicating that although at very low rate, ITZ induced permeability of the BBB, corroborating previous studies (Lim et al., 2014). In contrast, the brains from animals of PNV or ITZ-PNV groups (1, 2, 5 and 24 h intervals) were strongly bluish; thus indicating disruption of the BBB and leakage of EB into the cerebral tissue. In the ITZ-PNV group the intensity of bluish color in the brain was greater than in the PNV group (Fig. 1). It is worth mentioning that the bluish color at 24 h does not mean a ruptured BBB at this very same interval; instead, it more likely resulted from dye extravasation at earlier

intervals given the clearance of the dye from brain is a slow pace process.

The findings indicate that the strongest blue color in the brain of ITZ-PNV group resulted from the sum of permeability caused by the antifungal drug alone plus the permeability caused by the spider venom. Taking in consideration that animals' condition was aggravated in this group, we further investigated putative spectral differences in the biochemistry of hippocampus of rats of the PNV and ITZ-PNV groups relative to the saline control and antifungal control. The data could give clue on the role of VEGF in the PNV-induced toxic condition of animals and BBB breakdown.

3.3. FT-IR spectroscopy qualitative analysis of hippocampus from saline and itraconazole control rats

Vibrational infrared spectroscopy allows identifying amine, carboxyl, hydroxyl, carbonyl and other functional groups of proteins, nucleic acids and lipids by measuring the frequency and intensity at which a given sample absorbs infrared radiation (Stuart, 2004). The Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy analysis was applied to detail the hippocampal spectral changes caused by PNV in regard to spectra obtained in the hippocampus of rats either administered saline solution (considered basal spectra) or administered itraconazole (drug control).

In this study, the vibrational infrared spectroscopy was first determined in hippocampi of rats injected with sterile saline solution or itraconazole in order to evaluating interferences of the antifungal drug on the biomolecules content relative to saline baseline. These hippocampi samples were considered control for further comparative purposes relative to PNV group and ITZ-PNV group. The absorbance spectrum range was set from 4000 to 400 cm^{-1} region. In general, the spectra are interpreted from empirical comparisons with others spectra and extrapolating results from simpler molecules (Stuart, 2004). Each molecule has its own unique vibrational characteristics and therefore it will result in unique infrared spectral signatures. Additionally, the infrared spectrum of biological systems is a result of the contribution of the infrared absorption bands of all biomolecules that comprise the biological tissue and their interactions (Colthup et al., 1990). The close molecular interaction into the tissue environment influences the vibrational characteristics. Also, position, intensity, and width of vibrational band can be used for monitoring particular functional group or regions of particular chemical species (Petiboin et al., 2006). We worked with the mid-infrared spectrum (4000–400 cm^{-1}) that can be divided in four regions and the nature of a group frequency may generally be determined by the region at which it is located. The regions are distributed as follow: the X-H stretching region (4000–2500 cm^{-1}), the triple-bond region (2500–2000 cm^{-1}) and the fingerprint region (1800–600 cm^{-1}) (Silverstein et al., 2005).

The absorbance spectra of the hippocampi from rats injected with 0.9% saline solution and itraconazole (controls) were displayed in Fig. 2 and the bands assignment was based on Stuart, 2004 and Elibol-Can et al. (2011) (Table 1).

According to the averaged spectra of the two controls, the hippocampal tissue presented mainly lipids and proteins (Table 1). This is in accordance with the richness in lipids present in the myelinated nerve fibers and proteins of cell membrane of neurons, glial cells and respective receptors and carriers engaged in the synapse functioning.

Fig. 3 shows the averaged FT-IR spectra measured in the hippocampus of the saline (black line) and itraconazole (red line) controls ($n = 3$ spectra per group) disposed in two separate infrared (IR) spectrum range, one comprising the X-H stretching band running from 4000 cm^{-1} to 2500 cm^{-1} (panel A), and the other comprising both the triple bond and the fingerprint regions, which run from 2000 cm^{-1} to 500 cm^{-1} (panel B). No new band appeared in ITZ hippocampal samples relative to saline, which can be attributed to poor drug permeability across the BBB. Such poor permeability of ITZ across the BBB is due to its paltry lipophilicity, its high molecular mass (705 Da) against

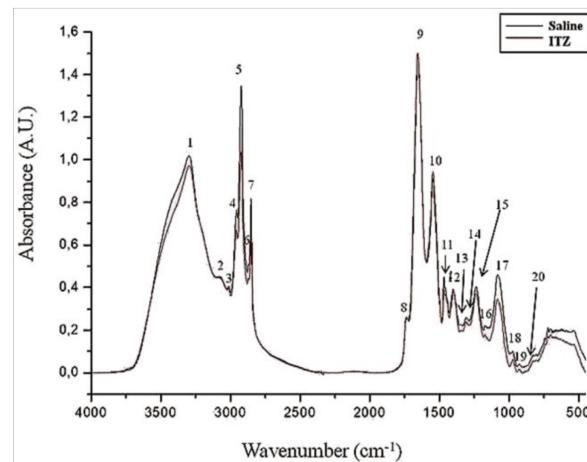


Fig. 2. Comparative mean infrared spectra of hippocampi from control rats 5 h after i. v. injection of 0.9% saline sterile solution (black line) or itraconazole (red line), and obtained at 4000 to 400 cm^{-1} spectral range region. The peaks were plotted on the X axis consisting of wavenumber (cm^{-1}) and absorbance Y axis (A.U., arbitrary units). Measurements were in triplicate. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

Table 1
General band assignment of FT-IR medium spectrum of controls hippocampus tissue (0.9% saline solution and itraconazole).

Peak	Wavenumber (cm^{-1})	Definition of the spectral assignment
01	3300	Amide A (mainly N-H stretching of hydrogen-bonded amide groups of proteins)
02	3088	C-H and N-H stretching (amide B) of protein
03	3015	Olefinic H-C=C-H stretching vibration: unsaturated lipids, cholesterol esters
04	2968	CH_3 asymmetric stretching: mainly lipids
05	2924	CH_2 asymmetric stretching: mainly lipids
06	2872	CH_3 symmetric stretching: mainly proteins
07	2852	CH_2 symmetric stretching: mainly lipids
08	1736	(Ester) Carbonyl C=O stretch in phospholipids, cholesterol esters and triglycerides
	1730	
09	1656	Amide I (C=O stretching in proteins (80%) α -Helix
	1650	
10	1546	Amide II (proteins, N-H bending (60%) and the C-N stretching (40%))
11	1467	CH_2 bending: mainly lipids
	1456	
12	1400	COO^- symmetric stretching: fatty acids, amino acid side groups
13	1344	Amide III (protein C-N stretching (40%), N-H bending (30%) and C-C stretching (20%))
14	1308	CH_2 twisting and bending (protein, lipid, nucleic acids)
15	1235	PO_2^- asymmetric stretch, fully hydrogen-bonded: mainly nucleic acids
16	1171	CO-O-C asymmetric stretching: glycogen and nucleic acids
17	1083	PO_2^- symmetric stretching: nucleic acids and phospholipids
18	973	C-O stretching: glycogen, polysaccharides, glycolipids
19	925	C-N ⁺ -C stretching: nucleic acids, ribose-phosphate main chain vibrations of RNA
20	872	z-type DNA
		Vibrations in N-type sugars in nucleic acid backbone

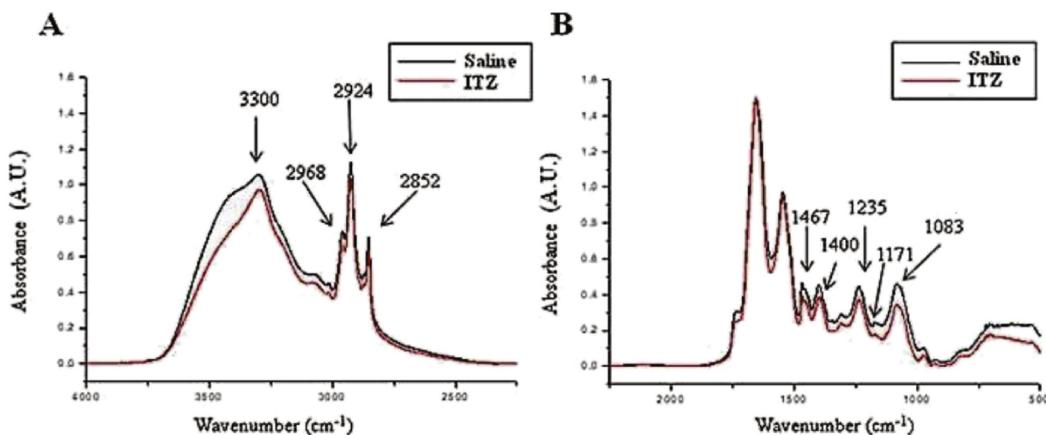


Fig. 3. Comparative infrared medium spectra of control hippocampus 5 h after i. v. injection of 0.9% sterile saline solution (black line) or itraconazole (red line), obtained at 4000 to 2500 cm⁻¹ (A) and 2000 to 500 cm⁻¹ (B) spectral range regions. The peaks were plotted on the X axis consisting of wavenumber (cm⁻¹) and absorbance Y axis (A.U., arbitrary units). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

the limit of 300–400 Da. sized molecules able to permeate and cross the BBB (Pardridge, 2003), and else due to endothelial cells richness in P-gp efflux proteins, and because ITZ is substrate for P-gp that pumps the drug back, so preventing its access into the CNS (Miyama et al., 1998; Lim et al., 2014). However, there were some differences in the amplitude of the bands. Spectra difference between the two controls allows identifying those molecular components that were targeted by itraconazole, even though its poor permeability to BBB.

The main differences emerged at 3300 cm⁻¹ (amide A, groups of protein), 2968 cm⁻¹ (CH₃ asymmetric stretching, mainly lipids), 2924 cm⁻¹ and 2852 cm⁻¹ (CH₂ asymmetric stretching, mainly lipids), 1467 cm⁻¹ (CH₂ bending, mainly lipids), 1400 cm⁻¹ (COO⁻ symmetric stretching, fatty acids, amino acid side groups), 1235 cm⁻¹ (PO₂⁻ asymmetric stretching, mainly nucleic acids); 1171 cm⁻¹ (CO-O-C asymmetric stretching, glycogen and nucleic acids), 1083 cm⁻¹ (PO₂⁻ symmetric stretching or C-O stretching, nucleic acids and phospholipids) (Stuart, 2004) corresponding to peaks 1, 4, 5, 7, 11, 15, 16 and 17, respectively, and refers to decreases in bands intensity in the itraconazole control relative to its saline counterpart (Fig. 3). The data obtained through the FT-IR analysis informed us that the antifungal azole drug once inside the hippocampus affects peaks which are in great extent assigned preferably to lipids and lesser to proteins, nucleic acids and glycogen. Studies report that lipids constitute 60% of the brain mass and fatty acids have pivotal role in assuring good structural and functional performance to the brain (Chang et al., 2009); this explains, at least in part, the major targeting of lipids by the drug.

Such spectral differences found between hippocampi of rats treated with saline and itraconazole confirmed that albeit at very low rate ITZ was able to gain access to the CNS, including hippocampal tissue (Lim et al., 2014), and that such low permeability rate was enough to cause molecular disturbance. The low ITZ permeability (5 h, Fig. 1) was aforementioned when showed that the Evans blue percolated into the brain tissue. Literature refers to FT-IR spectra of itraconazole as presenting peaks that greatly approximates from the observed in mid-infrared spectral region ranging from 4000 to 500 cm⁻¹ (Fig. 3) (Nesseeem, 2001; Kumar et al., 2014; Fadke et al., 2015). We can suggest that differences here observed in the intensity of the bands can be accounted for intermolecular interactions of the azole antifungal drug vs. hippocampi molecules (mainly lipids) along the 30 min after i. v. injection and during the process of euthanasia and hippocampi dissection and freezing.

3.4. FT-IR qualitative analysis of the spectrum of the crude *Phoneutria nigriventer* venom

The vibrational spectra obtained from *Phoneutria nigriventer* venom (PNV) itself indicate a 1400 cm⁻¹ band linked to symmetric stretching of carboxylate (Stuart, 2004) (Fig. 4), as the found in the hippocampal samples of rats treated with PNV or ITZ-PNV (Fig. 5) and even in the controls (Fig. 3). Hence, the 1400 cm⁻¹ band was chosen as a biomarker and 1467 cm⁻¹ (CH₂ bending: mainly lipids) as a reference band to assist the interpretation to the biomarker band. The 1400 cm⁻¹ band usually appears in wide-ranging biological systems; its choice as a PNV biomarker was due to both its well-definition in hippocampi of rats treated with PNV and because this band suffer important changes in the samples pre-treated with ITZ throughout the period post envenomation. Molecules that absorb infrared radiation in the wavenumber region from 1800 to 600 cm⁻¹ are part of the fingerprint region; and this is an important region for identifying the sample structure (Stuart, 2004; Silverstein et al., 2005). The IR spectra of *P. nigriventer* venom revealed mainly proteins and a band peaking at 1400 cm⁻¹ that can be ascribed to carboxylate. This is in agreement with myriads of toxins present in the crude PNV, and which has been considered a true “cocktail of polypeptides” (Gomez et al., 2002), the majority of them with action in the nervous system (De Lima et al., 2016).

3.5. FT-IR qualitative analysis of the spectrum of the hippocampus in the saline, itraconazole, PNV and PNV-ITZ groups

The averaged spectra of hippocampi of PNV- and ITZ-PNV-treated rats kept some similarities with the venom spectra, thus evidencing its presence inside this brain region. Despite the similarities, the spectra of the hippocampi of rats injected with PNV (Fig. 5) also showed differences relative to peaks' intensity in comparison to PNV spectra (Fig. 4). The differences reflect changes in the infrared absorbance of biomolecules resulting from the interaction venom-hippocampi milieu (Colthup et al., 1990). Fig. 5 zoomed at 1500–1200 cm⁻¹ allows visualizing the dynamics configuration of the FT-IR spectra recorded from hippocampal samples of rats at different treatment intervals (1, 2, 5, and 24 h for PNV and ITZ-PNV groups) and in comparison to both 5 h saline and 5 h ITZ group. Visual inspection shows remarkable biochemical changes both in the biomarker band and band of reference relative to baseline of saline control (Fig. 5A) and ITZ control (Fig. 5B). The major change in the biomarker band in PNV group (Fig. 5C, E, G, I) and ITZ-PNV group (Fig. 5D, F, H, J) refers mainly to 1 h, followed by 2 h time

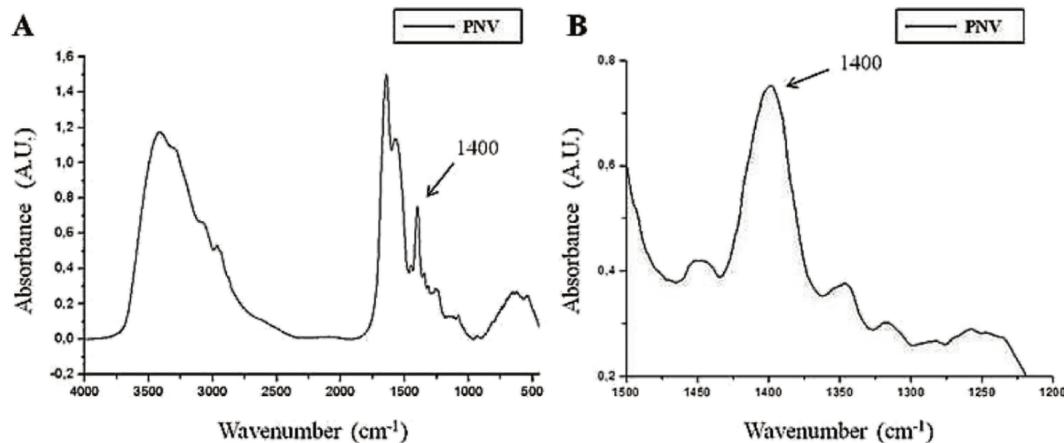


Fig. 4. Representative medium infrared spectra of *Phoneutria nigriventer* venom (PNV), obtained at 4000 to 400 cm^{-1} (A) and 1500 to 1200 cm^{-1} (B) spectral region. The zoomed regions comprising 1500–1200 cm^{-1} show the 1400 cm^{-1} band enlarged (B). The peaks were plotted on the X axis consisting of wavenumber (cm^{-1}) and absorbance Y axis (A.U. = arbitrary units).

frame, meaning noticeable change in the molecular content of hippocampi at times of greatest neurotoxic manifestation to envenomed animals. Earlier studies of our group have already referred to significant alterations of endothelial membrane transport proteins and others associated to BBB disruption (Le Sueur et al., 2003, 2004; Rapôso et al., 2007; Mendonça et al., 2012, 2013; 2014; Soares et al., 2014, 2016a; 2016b, 2016c; Stávale et al., 2013). Particularly remarkable was the obvious increase in the intensity of the biomarker band in the animals pre-treated with itraconazole plus PNV at 1 h compared with animals treated only with PNV at matched interval (compare Fig. 5C–D). The inhibition of VEGF-Flk-1 binding by prior treatment with ITZ (ITZ + PNV-1 h group) strongly altered the relation between the bands 11 (CH_2 bending: mainly lipids) and 12 (COO⁻ symmetric stretch: fatty acids, amino acid side groups) in the hippocampus (see Table 1). It is important to emphasize that in the ITZ-PNV group one animal died during the first hour given the signs of intoxication were greater than in rats of the PNV group (see 3.1. sub-section), and Evans blue (EB) extravasation was more intense (see 3.2. sub-section). It reveals a profound impact caused by the pre-treatment with ITZ which inhibited the binding VEGF ligand plus Flk-1 signaling (Nacev et al., 2011).

It is known that VEGF/Flk-1 binding promotes phosphorylation of tyrosine residues of tyrosine kinase receptors that then reaches a state of activation (Ferrara et al., 2003); VEGF signal transduction takes place via activation of its receptors, and among them Flk-1 plays a key role in vascular permeability, angiogenesis or antiangiogenesis, and neuroprotection (Yasuhara et al., 2004; Góra-Kupilas and Josco, 2005; Sun and Guo, 2005; Cammalleri et al., 2011). In physiological condition, the Flk-1 receptor is compartmentalized in flask-shaped invaginations of the cell membrane called caveolae (Rothberg et al., 1992), structures involved in the transcellular transport at the BBB. These subdomains of the cell membrane, called caveolae, contain high concentration of cholesterol, glycosphingolipids and the fatty acids side chains of the phospholipids. Given its topology and protein content, caveolae are considered subset of lipid rafts membrane subdomains, differing from them by the presence of caveolin-1α (Pike, 2003), the main scaffolding molecule of the caveolae frame (Rothberg et al., 1992). In the caveolae, together with high concentration of cholesterol, glycosphingolipids, phospholipids, Flk-1 and caveolin 1α, it is also compartmentalized the endothelial nitric oxide synthase (eNOS); eNOS-derived NO is responsible for vascular tonus and regulation of hemodynamics and has role in BBB health (Rath et al., 2009); thus, loss of NO bioavailability associated with eNOS uncoupling leads to microvascular dysfunction. These characteristics of caveolae have elect them as an

important signaling platform for a number of pivotal cell events including endocytosis, transcytosis, synapsis formation and stabilization, signal transduction, intercellular communication, apoptosis, mechanosensing, and other signaling events, including those related to calcium handling (Labrecque et al., 2003; Sonveaux et al., 2004). We have recently shown evidences that caveolin-1α is involved in the endocytosis and increased transcellular trafficking in this model of PNV-induced BBB breakdown (Soares et al., 2014), and that caveolae is a target for PNV (Soares et al., 2016a). We also showed that at periods of intense intoxication by PNV (1 h) there occurs monomerization of eNOS (uncoupling state), which further dimerizes to its active form at periods of recovery from the toxic manifestations (Soares et al., 2015).

ITZ inhibits signaling of VEGF through its transmembrane tyrosine kinase Flk-1 receptor; upon ITZ exposure the receptor is not expressed anymore at the endothelial cell membrane, but instead presents a perinuclear topology in the form of molecular aggregates (Nacev et al., 2011). Studies report that itraconazole is selective for endothelial cells and induces functional disruption and perturbation of cholesterol homeostasis, leading to its accumulation into lysosomes. Itraconazole inhibits Flk-1 trafficking, glycosylation, and signaling in endothelial cells; the antifungal azole drug inhibits mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway activation by disrupting intracellular handling of cholesterol homeostasis, leading to losses of both the fluidity and impermeability of the endothelial cell membrane (Nacev et al., 2011; Xu et al., 2010).

The mechanism by which VEGF is involved in the *P. nigriventer* envenomation is not unraveled yet. However, taking these findings together, we can suggest that the huge spectral alteration observed in the hippocampi of rats that had been administered systemically ITZ plus PNV was caused by profound disturbance in biochemical homeostasis of the hippocampi, with lipids taking a special role, but also proteins and nucleic acids as shown by the spectra recorded. Key endothelial membrane molecules, namely, VEGF, Flk-1, caveolin-1α, eNOS, and lipids, including cholesterol and phospholipids were affected by itraconazole leading to the changes here seen. In addition, *P. nigriventer* venom is rich in bioactive polypeptides with different pharmacological effects resulting mainly through its ability to block Ca^{2+} and K^+ channels and delay inactivation of Na^+ channels; these actions disturb glutamate and acetylcholine membrane receptors (De Lima et al., 2016). Moreover PhTX2, a fraction isolated from the crude PNV, delays the closure of sodium channel, increases Ca^{2+} concentration and dose-dependent glutamate release in synaptosomes (Romano-Silva et al., 1993). Cerebral endothelial cells in rats and other animal species express a number

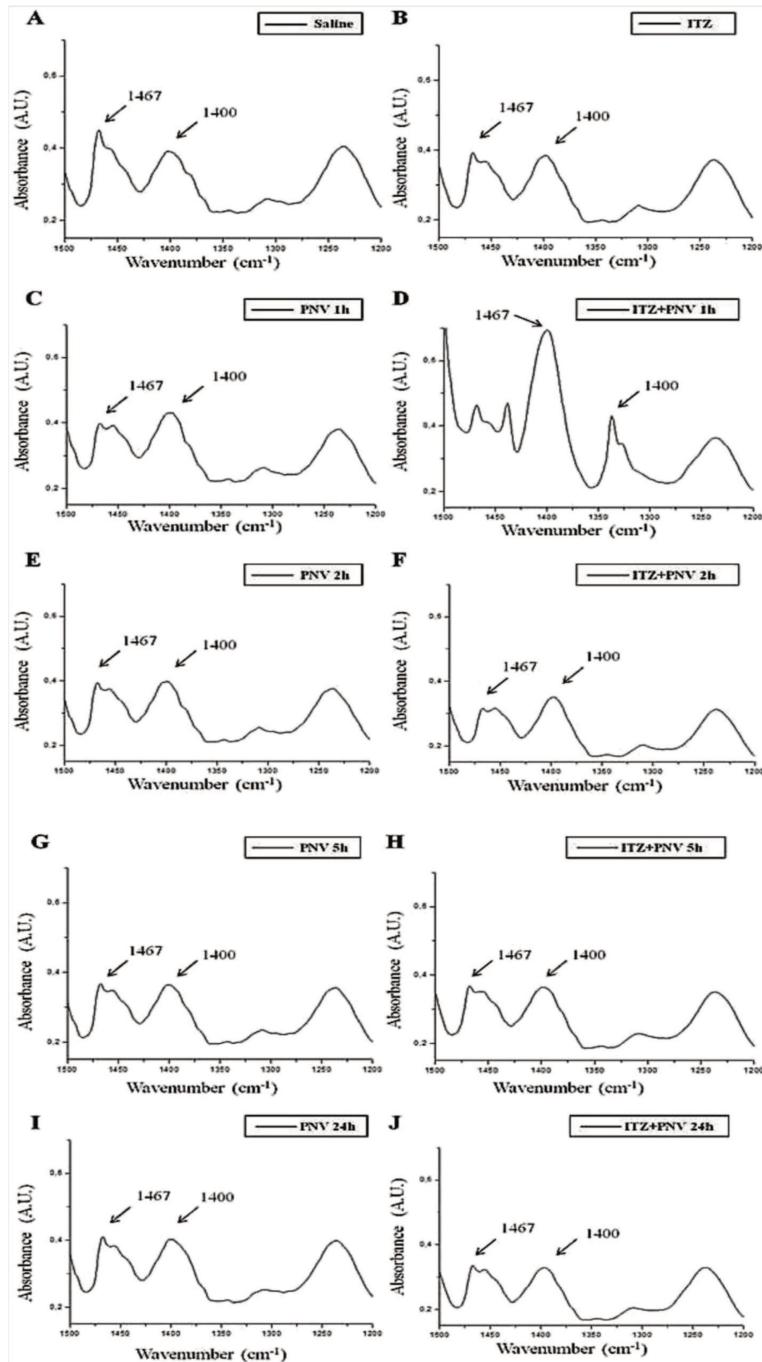


Fig. 5. Representative infrared spectra of 5 h-saline (A) and 5 h-itraconazole (B) hippocampi in control rats. The *Phoneutria nigriventer* venom (PNV)-treated groups 1 h (C), 2 h (E), 5 h (G) and 24 h (I) and the prior itraconazole (30') + PNV-treated groups 1 h (D), 2 h (F), 5 h (H) and 24 h (J), from 1500 to 1200 cm⁻¹ spectral region. The 1400 cm⁻¹ (biomarker band, carboxylate) and 1467 cm⁻¹ (reference band, CH₂ bending) bands are signposted. The peaks were plotted on the X axis consisting of wavenumber (cm⁻¹) and absorbance Y axis (A.U., arbitrary units).

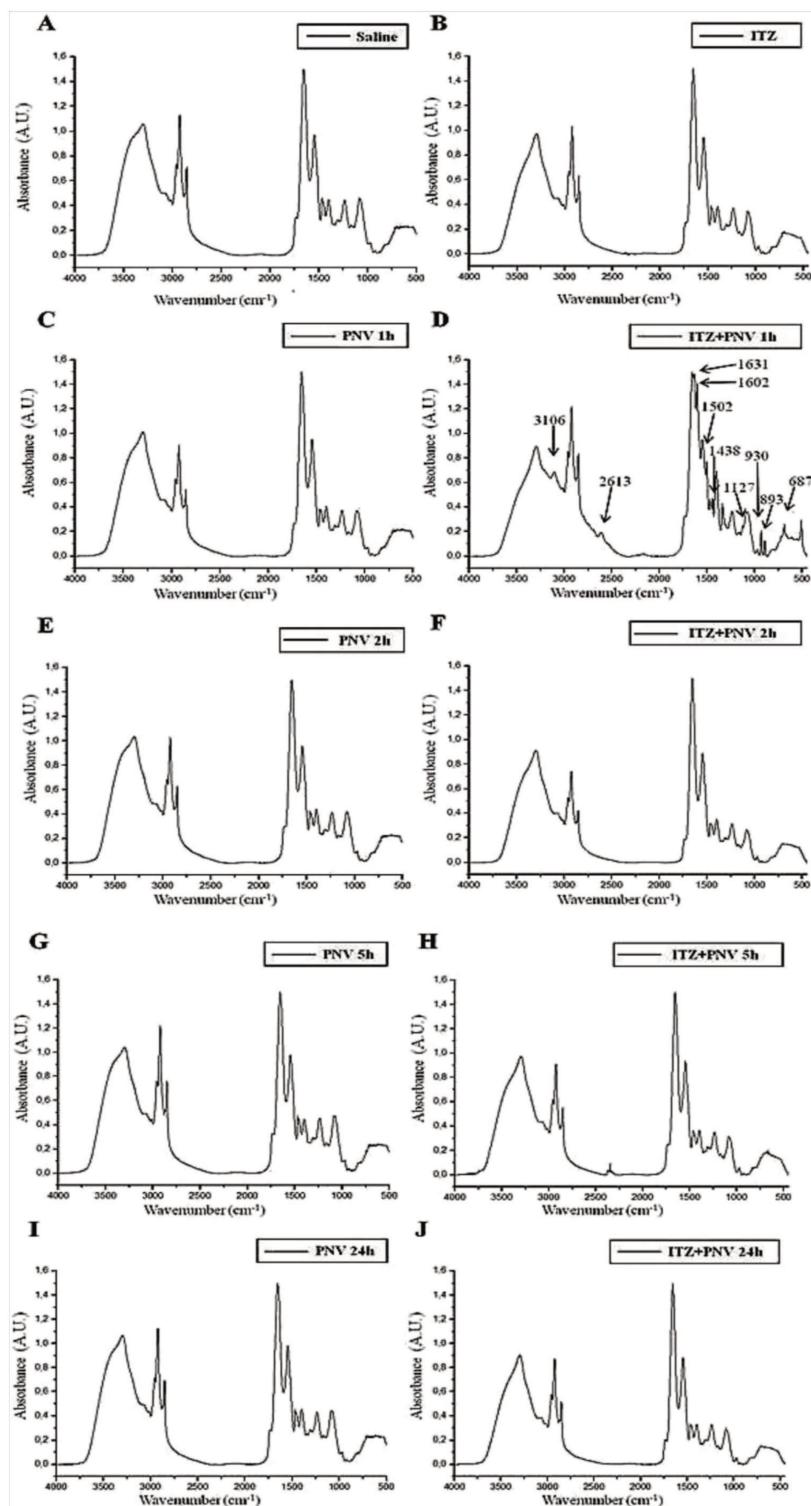


Fig. 6. Representative infrared spectra of saline and itraconazole controls (panels A and B) and of *Phoneutria nigriventer* venom (PNV)-treated groups 1 h (C), 2 h (E), 5 h (G) and 24 h (I) and the prior itraconazole (30') + PNV-treated groups 1 h (D), 2 h (F), 5 h (H) and 24 h (J), recorded from 4000 to 500 cm⁻¹ spectral region. The peaks were plotted on the X axis consisting of wavenumber (cm⁻¹) and absorbance Y axis (A.U., arbitrary units).

of receptors specific for glutamate (Sharp et al., 2005). Impairment of glutamate handling contributes to changes in the BBB functionality, and thus for the changes in the biochemical status of hippocampi of rats of PNV-ITZ group at 1 h time frame.

However, as the time elapsed after venom or itraconazole + venom administration to rats advanced, the spectral differences in the two groups relative to the control groups progressively was attenuated (Fig. 5G, I and Fig. 5H, J, respectively), reiterating the transient nature of events already mentioned in this rat model of transitory BBB breakdown/toxic condition induced by the venom of *Phoneutria nigriventer*.

Fig. 6 (panels A–J) shows the FT-IR spectra from hippocampal saline-5 h and itraconazole-5 h control samples and from 1, 2, 5 and 24 h intervals post PNV or post ITZ-PNV recorded at 4000–400 cm⁻¹ spectral region (Fig. 6A–B). Complex molecular structure as the presented by hippocampal tissue leads to more absorption bands and more complex spectra. The visual inspection corroborates previous recordings showing the major changes occurring at the ITZ-PNV-1 h group (Fig. 6D). It is shown in the ITZ-PNV 1 h-group additional biochemical reactions that resulted in new vibrational modes. The new bands were: 3106 cm⁻¹ (C-H and N-H stretching of protein); 2613 cm⁻¹, 1631 cm⁻¹ (Amide I); 1602 cm⁻¹ (C=N cytosine, N-H adenine); 1502 cm⁻¹ (Amide II); 1438 cm⁻¹ (CH₂ bending: mainly lipids); 1127 cm⁻¹ (C-O stretch: glycogen, polysaccharides, glycolipids); 930 cm⁻¹ (z-type DNA); 893 cm⁻¹ (C-C, C-O) and 687 cm⁻¹ (CH out-of-plane bending vibrations) (Movasaghi et al., 2008). After this acute (1 h) molecular stress caused by inhibiting VEGF-Flk-1 coupling in this PNV-induced BBB breakdown model, the hippocampi milieu tended to relax and return to its former physiological biochemical status as demonstrated in the spectral profile of ITZ-PNV from 2 h ahead (Fig. 6F). The data correlates with the transitory BBB breakdown and self-limiting toxic manifestations of envenomed animals. Other molecular changes were due to differences in the bands amplitude, probably to PNV (Fig. 6 A, C, E and I) and ITZ plus PNV (Fig. 6 B, D, F and J) presence in the hippocampal parenchyma.

3.6. FT-IR spectroscopy quantitative analysis of the hippocampus in saline, ITZ, PNV and ITZ-PNV groups

Table 2 and Fig. 7 show the ratio between the bands at 1400 and 1467 cm⁻¹ to analyze quantitatively the dynamics of the biomarker band intensity relative to reference band intensity. The data depicted in Table 2 show that PNV as well as ITZ-PNV treatments cause great alteration in the I₁₄₀₀/I₁₄₆₇ ratio when comparing with saline and itraconazole controls. There was also intra groups' variation and between groups in the I₁₄₀₀/I₁₄₆₇ ratio time-dependently, indicating hippocampal molecular readjustment as the time elapses. In the hippocampi of PNV-treated rats the I₁₄₀₀/I₁₄₆₇ ratio varied from 1.07 (1 h) till 0.97 (24 h). In the hippocampi of ITZ + PNV-treated rats the I₁₄₀₀/I₁₄₆₇ ratio varied from 1.51 (1 h) till 0.97. Interestingly, FT-IR spectral

Table 2
Relative intensity ratio between 1400 and 1467 cm⁻¹ bands according to the groups.

Groups	I ₁₄₀₀ /I ₁₄₆₇
Control Saline	0.87
Control ITZ	0.97
PNV 1 h	1.07
ITZ + PNV 1 h	1.51
PNV 2 h	1.00
ITZ + PNV 2 h	1.10
PNV 5 h	0.99
ITZ + PNV 5 h	0.99
PNV 24 h	0.97
ITZ + PNV 24 h	0.97

ITZ – itraconazole, PNV – *Phoneutria nigriventer* venom.

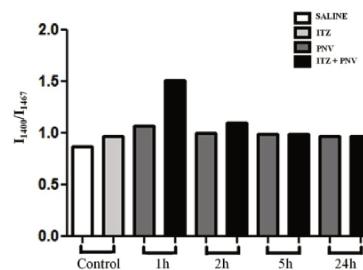


Fig. 7. Representative graphs of the I₁₄₀₀/I₁₄₆₇ ratio according to the experimental groups.

analyses of hippocampi show that the molecular alterations between PNV versus ITZ-PNV groups are restricted to the intervals of greatest signs of venom neurotoxicity (1 and 2 h, being greater at 1 h than at 2 h). The data reiterate that molecular alterations are transient and thus self-limiting. At 5 h (interval of amelioration of toxic animals' condition) and 24 h (when signs of intoxication are no more visible) there was no ratio difference relative to both the biomarker band (1400 cm⁻¹, carboxylate) and reference band (1467 cm⁻¹, mainly lipids).

The relevance of the study is obvious; it contributes to our understanding of the pathophysiology of *Phoneutria nigriventer* envenomation; it may give a clue of VEGF as a therapeutic target in PNV envenomation; the knowledge of effects of venom considered a potential source of molecules of interest to pharmaceutical and pharmacological purposes is evident.

4. Conclusions and prospects

FT-IR spectroscopy analyses showed that the inhibition of the high affinity Flk-1 receptor to VEGF ligand by prior treatment with itraconazole caused profound changes in the vibrational characteristics of specific chemical functional groups that had absorbed IR radiation. There was a correlation among the magnitude of the changes and aggravation of the toxic condition of ITZ-PNV-treated animals and increased damage to BBB. This study demonstrates that VEGF signal transduction is involved in the modulation of PNV effects in the hippocampus of rats to counteract the hazardous venom toxicity. FT-IR spectra analyses showed that this cytokine represents a potential target to be explored as therapeutic tool in *P. nigriventer* envenomation. This is the first study showing PNV-induced modulation of molecular content in the hippocampi of rats by FT-IR spectroscopy. This is a preliminary study to serve as basis for further studies with PNV isolated toxins and for shedding light in the mechanistic role of VEGF/Flk-1 in the envenomation picture caused by this spider species. The coupling of FT-IR spectroscopy analysis to other analytical methods will allow advancing in the knowledge of the pathophysiological and pharmacological activities of the venom toxins, important for likely to design molecules with pharmacological and pharmaceutical interest.

Funding

This work was funded by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (grant # 05/53625-1), Fundo de Apoio à Pesquisa e Extensão (FAEPEX- Unicamp, grant # 2679/16) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (grant # 454791/2014-3). M.A.C.H. is a Research Fellow from CNPq (grants # 305099/2011/6; # 310111/2016-4). M.H.R.M.B. is a doctoral student supported by studentship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (grant # 1369978).

Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

We thank Willians Fernando Vieira for reading critically the manuscript.

References

- Abbott, N.J., Pizzo, M.E., Preston, J.E., Janigro, D., Thorne, R.G., 2018. The role of brain barriers in fluid movement in the CNS: is there a 'glymphatic' system? *Acta Neuropathol.* 135 (3), 387–407. <https://doi.org/10.1007/s00401-018-1812-4>.
- Aftab, B.T., Dobromilskaya, I., Liu, J.O., Rudin, C.M., 2011. Itraconazole inhibits angiogenesis and tumor growth in non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 71, 6764–6772. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-0691>.
- Bucarelli, F., Bertani, R., De Capitani, E.M., Hyslop, S., 2017. Envenomation by wandering spiders (Genus *Phoneutria*). In: Clinical Toxicology in Australia, Europe and Americas. Springer Science + Business Media B.V. https://doi.org/10.1007/978-94-007-6288-6_63-3.
- Cammalleri, M., Martini, D., Ristori, C., Timperio, A.M., Bagnoli, P., 2011. Vascular endothelial growth factor up-regulation in the mouse hippocampus and its role in the control of epileptiform activity. *Eur. J. Neurosci.* 33, 482–498. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2010.07529.x>.
- Carrer, D.P., Samonis, G., Droggiti, D.I., Tsaganos, T., Pistiki, A., Giannarellou-Bourboulis, E.J., 2013. Intravenous itraconazole against experimental neutropenic *Candida parapsilosis* infection: efficacy after suppression of bacterial translocation. *J. Infect. Chemother.* 19, 1080–1086. <https://doi.org/10.1007/s10156-013-0627-4>.
- Chang, C.Y., Ke, D.S., Chen, J.Y., 2009. Essential fatty acids and human brain. *Acta Neurol. Taiwan.* 18 (4), 231–241.
- Chong, C.R., Xu, J., Lu, J., Bhat, S., Sullivan, D.J., Liu, J.O., 2007. Inhibition of angiogenesis by the antifungal drug itraconazole. *ACS Chem. Biol.* 2, 263–270. <https://doi.org/10.1021/cb600362d>.
- Colthup, N.B., Daly, L.H., Wiberley, S.E., 1990. Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy, 3 ed. Academic Press, New York.
- Cruz-Höfling, M.A., Tavares, J.C., Raposo, C., 2016. *Phoneutria nigriventer* Venom. Action in the central nervous system. In: Gopalakrishnakone, P., Corzo, G.A., De Lima, M.E., Diego-Garcia, E. (Eds.), Spider Venoms. Toxinology Series Springer. https://doi.org/10.1007/978-94-007-6389-0_1.
- Cruz-Höfling, M.A., Zago, G.M., Melo, L.L., Raposo, C., 2007. c-FOS and n-NOS reactive neurons in response to circulating *Phoneutria nigriventer* spider venom. *Brain Res.* Bull.
- 73, 114–126. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2007.01.017>.
- De Lima, M.E., Figueiredo, S.G., Matavel, A., Nunes, K.P., Silva, C.N., Almeida, F.M., Diniz, M.R.V., Cordeiro, M.N., Stankiewicz, M., Beirão, P.S.L., 2016. *Phoneutria nigriventer* venom and toxins: a review. In: Gopalakrishnakone, P., Corzo, G.A., De Lima, M.E., Diego-Garcia, E. (Eds.), Spider Venoms. Toxinology Series Springer. https://doi.org/10.1007/978-94-007-6389-0_6.
- Elbilo-Can, B., Jakubowska-Dogru, E., Sevencan, M., Sevencan, F., 2011. The effects of short-term chronic ethanol intoxication and ethanol withdrawal on the molecular composition of the rat hippocampus. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 35, 2050–2062. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2011.01556.x>.
- Fadke, J., Desai, J., Thakkar, H., 2015. Formulation development of spherical crystal agglomerates of itraconazole for preparation of directly compressible tablets with enhanced bioavailability. *AAPS PharmSciTech* 16, 1434–1444. <https://doi.org/10.1208/s12249-015-0332-y>.
- Ferrara, L.N., 2000. VEGF: an update on biological and therapeutic aspects. *Curr. Opin. Biotechnol.* 11, 617–624.
- Ferrara, N., Gerber, H.P., LeCouter, J., 2003. The biology of VEGF and its receptors. *Nat. Med.* 9, 669–676.
- Gomez, M.V., Kalapothakis, E., Guatimosim, C., Prado, M.A., 2002. *Phoneutria nigriventer* venom: a cocktail of toxins that affect ion channels. *Cell. Mol. Neurobiol.* 22, 579–588.
- Góra-Kupilas, K., Josco, J., 2005. The neuroprotective function of vascular endothelial growth factor (VEGF). *Folia Neuropathol.* 43, 31–39.
- Grieb, P., Forster, R.E., Strome, D., Goodwin, C.W., PAPE, P.C., 1985. O₂ exchange between blood and brain tissue studies with 18 O₂ indicator-dilution technique. *J. Appl. Physiol.* 58, 1929–1941.
- Kumar, N., Goindi, S., Saini, B., Bansal, G., 2014. Thermal characterization and compatibility studies of itraconazole and excipients for development of solid lipid nanoparticles. *J. Therm. Anal. Calorim.* 115, 2375–2383. <https://doi.org/10.1007/s10973-013-3237-6>.
- Labrecque, L., Royal, I., Surprenant, D.S., Patterson, C., Gingras, D., Beliveau, R., 2003. Regulation of vascular endothelial growth factor receptor-2 activity by caveolin-1 and plasma membrane cholesterol. *Mol. Biol. Cell* 2003 (14), 334–347.
- Le Sueur, L.P., Collares-Buzato, C.B., Cruz-Höfling, M.A., 2004. Mechanisms involved in the blood-brain barrier increased permeability induced by *Phoneutria nigriventer* spider venom in rats. *Brain Res.* 1027, 38–47. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2004.08.055>.
- Le Sueur, L.P., Kalapothakis, E., Cruz-Höfling, M.A., 2003. Breakdown of the blood-brain barrier and neuropathological changes induced by *Phoneutria nigriventer* spider venom. *Acta Neuropathol.* 105, 125–134. <https://doi.org/10.1007/s00401-002-0623-8>.
- Lee, C., Agoston, D.V., 2009. Inhibition of VEGF receptor 2 increased cell death of dentate hilar neurons after traumatic brain injury. *Exp. Neurol.* 220, 400–403. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2009.08.019>.
- Lim, W.M., Rajimikanth, P.S., Mallikarjun, C., Kang, Y.B., 2014. Formulation and delivery of itraconazole to the brain using a nanolipid Carrier system. *Int. J. Nanomed.* 9, 2117–2126. <https://doi.org/10.2147/IJN.S57565>.
- Mendonça, M.C.P., Soares, E.S., Stávale, L.M., Irazusta, S.P., Cruz-Höfling, M.A., 2012. Upregulation of the vascular endothelial growth factor, Flt-1, in rat hippocampal neurons after envenoming by *Phoneutria nigriventer*; age-related modulation. *Toxicol.* 60, 656–664. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.05.015>.
- Mendonça, M.C.P., Soares, E.S., Stávale, L.M., Kalapothakis, E., Cruz-Höfling, M.A., 2014. Vascular endothelial growth factor increases during blood-brain barrier-enhanced permeability caused by *Phoneutria nigriventer* spider venom. *BioMed Res. Int.* 1–13. <https://doi.org/10.1155/2014/721968>.
- Mendonça, M.C.P., Soares, E.S., Stávale, L.M., Raposo, C., Cope, A., Kalapothakis, E., Cruz-Höfling, M.A., 2013. Expression of VEGF and Flt-1 and Flt-1 receptors during blood-brain barrier (BBB) impairment following *Phoneutria nigriventer* spider venom exposure. *Toxins* 5, 2572–2588. <https://doi.org/10.3390/toxins5122572>.
- Miyama, T., Takanaga, H., Matsuo, H., 1998. P-glycoprotein-mediated transport of itraconazole across the blood-brain barrier. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42 (7), 1738–1744.
- Movahagh, S., ur Rehman, I., 2008. Fourier Transform infrared spectroscopy of biological tissues. *Applied Spectroscopy Reviews* 43 (2), 134–179. <https://doi.org/10.1080/05704920701829043>.
- Nacev, B.A., Grassi, P., Dell, A., Haslam, S.M., Liu, J.O., 2011. The antifungal drug itraconazole inhibits vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2) glycosylation, trafficking, and signaling in endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 286, 44045–44056. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.278754>.
- Nesseem, D.I., 2001. Formulation and evaluation via liquid crystal for topical delivery system. *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.* 26, 387–399.
- Pardridge, W.M., 2012. Drug transport across the blood-brain barrier. *J. Cerebr. Blood Flow Metabol.* 32 (11), 1959–1972. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2012.12>.
- Pardridge, W.M., 2003. Blood barrier drug targeting: the future of brain drug development. *Mol. Interv.* 3 (2), 90–105. <https://doi.org/10.1124/mi.3.2.90>.
- Paxinos, G., Watson, C., 1986. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. Acad Press, San Diego, USA.
- Petibois, C., Gionnet, K., Gonçalves, M., Perromat, A., Moenner, M., Délénis, G., 2006. Analytical performances of FT-IR spectrometry and imaging for concentration measurements within biological fluids, cells, and tissues. *Analyst* 131, 640–647. <https://doi.org/10.1039/b518076g>.
- Pike, L.J., 2003. Lipid rafts bringing order to chaos. *J. Lipid Res.* 44, 655–667.
- Raposo, C., Zago, G.M., Silva, G.H., Cruz-Höfling, M.A., 2007. Acute blood-brain barrier permeabilization in rats after systemic *Phoneutria nigriventer* venom. *Brain Res.* 1149, 18–29. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.02.086>.
- Rath, G., Dassy, C., Feron, O., 2009. Caveole, caveolin and control of vascular tone nitric oxide (NO) and endothelin derived hyperpolarization factor (EDHF) regulation. *J. Physiol. Pharmacol.* 60 (4), 105–109.
- Risau, W., Wolburg, H., 1990. Development of the blood-brain barrier. *Trends Neurosci.* 13, 174–178.
- Romanó-Silva, M.A., Ribeiro-Santos, R., Ribeiro, A.M., Gomez, M.V., Diniz, C.R., Cordeiro, M.N., Brammer, M.J., 1993. Rat cortical synaptosomes have more than one mechanism for Ca²⁺ entry linked to rapid glutamate release: studies using the *Phoneutria nigriventer* toxin PhTX2 and potassium depolarization. *Biochem. J.* 296, 313–319.
- Rosenstein, J.M., Krum, J.M., 2004. New roles for VEGF in nervous tissue beyond blood vessels. *Exp. Neurol.* 187, 246–253. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2004.01.022>.
- Rothberg, K.G., Heuser, W.C., Donzell, Y.S., Ying, J.S., Glenney, J.R., Anderson, R.G., 1992. Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell* 68, 673–682.
- Sharp, C.D., Houghton, J., Elrod, J.W., Warren, A., Jackson, I.V.T.H., Jawahar, A., Nanda, A., Minagar, A., Alexander, J.S., 2005. N-methyl-D-aspartate receptor activation in human cerebral endothelium promotes intracellular oxidant stress. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 288, H1893–H1909.
- Silverstein, R.M., Webster, F.X., Kiemle, D.J., 2005. Spectrometric Identification of Organic Compounds, 7 ed. John Wiley & Sons, Inc, United States of America.
- Sköld, M.K., Risling, M., Holmin, S., 2006. Inhibition of vascular endothelial growth factor receptor 2 activity in experimental brain contusions aggravates injury outcome and leads to early increased neuronal and glial degeneration. *Eur. J. Neurosci.* 23, 21–34. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04527.x>.
- Soares, E.S., Mendonça, M.C., da Cruz-Höfling, M.A., 2015. eNOS uncoupling in the cerebellum after BBB disruption by exposure to *Phoneutria nigriventer* spider venom. *Toxicol.* 310, 7–13.
- Soares, E.S., Mendonça, M.C.P., Cruz-Höfling, M.A., 2016a. Caveole as a target for *Phoneutria nigriventer* spider venom. *Neurotoxicology* 54, 111–118. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2016.04.005>.
- Soares, E.S., Mendonça, M.C.P., Irazusta, S.P., Cope, A., Stávale, L.M., Cruz-Höfling, M.A., 2014. Evidences of endocytosis via caveolae following blood-brain barrier breakdown by *Phoneutria nigriventer* spider venom. *Toxicol. Lett.* 229, 415–422. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2014.07.018>.
- Soares, E.S., Mendonça, M.C.P., Rocha, T., Kalapothakis, E., Cruz-Höfling, M.A., 2016b. Are synchronized changes in connexin-43 and caveolin-3 a bystander effect in a *Phoneutria nigriventer* venom model of blood-brain barrier breakdown. *J. Mol. Neurosci.* 59, 452–463. <https://doi.org/10.1007/s12031-016-0749-0>.
- Soares, E.S., Stávale, L.M., Mendonça, M.C.P., Cope, A., Cruz-Höfling, M.A., 2016c. Age-related modulations of AQP4 and Caveolin-1 in the Hippocampus predispose the

- toxic effect of *Phoneutria nigriventer* spider venom. Int. J. Mol. Sci. 17, 1–14. <https://doi.org/10.3390/ijms17111462>.
- Sonneaux, P., Martinive, P., DeWever, J., Batova, Z., Daneau, G., Pelat, M., Ghisdal, P., Gregoire, V., Dessim, C., Balligand, J.L., Feron, O., 2004. Caveolin-1 expression is critical for vascular endothelial growth factor-induced ischemic hindlimb collateralization and nitric oxide-mediated angiogenesis. Circ. Res. 95, 154–161.
- Stávale, I.M., Soares, E.S., Mendonça, M.C.P., Irazusta, S.P., Cruz-Höfling, M.A., 2013. Temporal relationship between aquaporin-4 and glial fibrillary acidic protein in cerebellum of neonate and adult rats administered a BBB disrupting spider venom. Toxicol. 66, 37–46. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.01.026>.
- Stuart, B.H., 2004. Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications. John Wiley & Sons, England.
- Sun, F., Guo, X., 2005. Molecular and cellular mechanisms of neuroprotection by vascular endothelial growth factor. J. Neurosci. Res. 79, 180–184. <https://doi.org/10.1002/jnr.20321>.
- Xu, J., Dang, Y., Ren, R.Y., Liu, J.O., 2010. Cholesterol trafficking is required for mTOR activation in endothelial cells. Proc. Natl. Acad. Sci. Unit. States Am. 107 (10), 4764–4769. <https://doi.org/10.1073/pnas.0910872107>.
- Yasuhara, T., Shingo, T., Date, I., 2004. The potential role of vascular endothelial growth factor in the central nervous system. Rev. Neurosci. 15, 293–307.

CAPÍTULO II

Submissions Being Processed for Author Maria Alice da Cruz-Hofling, PhD.

The screenshot shows the Toxicon manuscript submission system interface. At the top, there are links for 'Contact us', 'Help?', 'Username: hofling@unicamp.br', 'Switch To: Author', 'Go to: My EES Hub', and 'Version: EES 2019.7'. Below this, a message says 'Being Processed for Author Maria Alice da Cruz-Hofling, PhD.' A table displays one submission:

Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status
TOXCON-D-19-00322	VEGF/Flik-1 system exerts neuroprotection against <i>Phoneutria nigriventer</i> spider envenomation through PI3K-AKT-dependent pathway	Aug 31, 2019	Oct 11, 2019	Under Review

At the bottom, it says 'Page: 1 of 1 (1 total submissions)' and 'Display 10 results per page.'

Research Paper

VEGF/Flik-1 system exerts neuroprotection against *Phoneutria nigriventer* spider envenomation through PI3K-AKT-dependent pathway

Maria Helena Rodrigues Mesquita Britto ^{a,b}, Monique Culturato Padilha Mendonça ^{a,b}, Edilene Siqueira Soares ^b, Giovanna de Oliveira ^b, Carina Silva Solon ^c, Lício Augusto Velloso ^c and Maria Alice da Cruz-Höfling ^{a,b}.

^aDepartment of Pharmacology, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil

^bDepartment of Biochemistry and Tissue Biology, Institute of Biology, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil

^cDepartment of Clinical Medicine, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil

Correspondence should be addressed to Maria Alice da Cruz-Höfling;
hofling@unicamp.br

Abstract

Phoneutria nigriventer spider venom (PNV) disrupts the blood-brain barrier (BBB), increases glutamate release in response to delayed Na⁺ channels inactivation, causes membrane depolarization, higher Ca²⁺ influx and neurotoxicity. By using analytical Fourier Transform Infrared Spectroscopy we found that PNV induces intense alterations in the hippocampal biochemical status in rats. Then, we hypothesized that VEGF,

whose expression increases in envenomed rats, could be exerting neuroprotection given deactivation of Flk-1 receptor by VEGF through itraconazole (ITZ) worsened the animals' condition and enhanced hippocampal molecular alteration. Herein, we used the same model to shedding light on the role of VEGF. Rats pre-treated with ITZ showed increased hypoxia inducible factor (HIF-1 α), VEGF, Flk-1, Flt-1, Neu-N and caspase-3 at 5 h after PNV injection. At same interval, BBB transcellular permeability increased (caveolin-1 α , dynamin-2 and Src family of non-receptor tyrosine kinases (SKFs), while laminin and paracellular route (occludin, β -catenin) was reinforced and P-glycoprotein (P-gp) efflux protein was increased. Such effects were timely followed by upregulation of the pro-proliferation (phosphorylated-p38) pathway. At 24 h, despite the absence of intoxication signs the pro-survival (p-Akt) pathway was downregulated in animals underwent inhibition of VEGF-Flk-1 binding, whereas it was upregulated in PNV rats non-treated with ITZ. The data indicate triggering of VEGF-related mechanisms involving Flk-1 receptor and serine-threonine kinase Akt, probably through PI3K, as the main mechanism of neuroprotection. Phosphorylated ERK (2 h) and p-p38 (5 h) indicates interplay among transduction pathways throughout aiming at re-establishment of hippocampal homeostasis. The findings suggest the 5 h interval as the turning point that orchestrates varied biological responses.

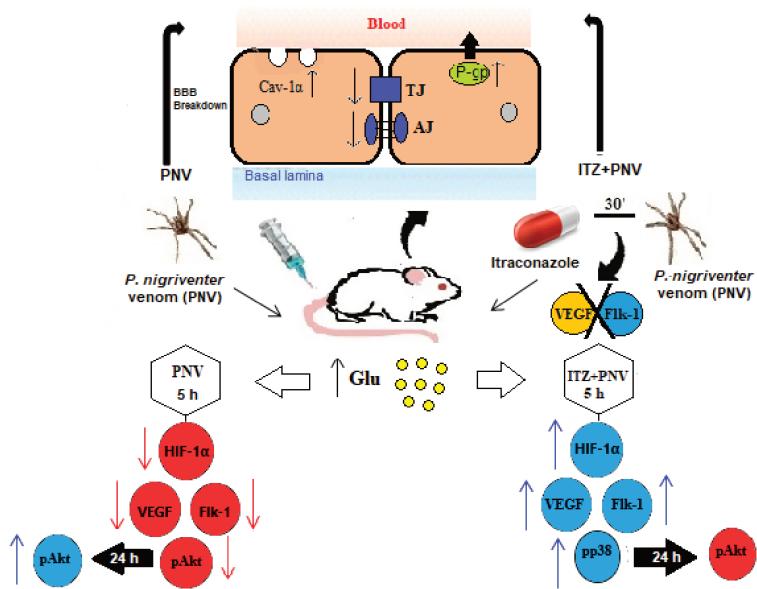
Keywords: H1F-1 α ; itraconazole; spider venom; VEGF-Flk-1 system.

Highlights

1. *P. nigriventer* venom induces glutamate release and blood-brain barrier breakdown
2. VEGF role is investigated by the deactivation of Flk-1 by VEGF through itraconazole.
3. VEGF mechanism of neuroprotection implied cross-talk among BBB-associated proteins.

4. Akt, MAPK-p38, ERK signaling pathways are involved in VEGF-mediated venom effect.
5. Akt remains activated even after clinical evolution and BBB had been normalized.

Graphical Abstract



1. Introduction

In Brazil, accidents caused by *Phoneutria nigriventer* graded as severe have great medical relevance. Envenomation produces pain, intense sweating, blurred vision, vomiting, agitation, cardiovascular and respiratory distress, priapism and convulsion (Bucaretschi et al., 2000, 2008). Similar excitotoxic signs are observed in rodents. Studies of our group have shown that the *Phoneutria nigriventer* venom (PNV) causes blood-brain barrier breakdown (Le Sueur et al., 2003; Stávale et al., 2013) through increased vesicular transport (Le Sueur et al., 2004), and paracellular frailty (Mendonça et al., 2012, 2013; Rapôso et al. 2007). The venom contains neuropeptides that delay inactivation of sodium channels and block potassium and calcium channels and interfere

in glutamate (Glu) and acetylcholine release (see, De Lima et al., 2016 for review). Astrocytes are direct target of the venom through Ca^{2+} -evoked transients probably involving the Na^+K^+ ATPase (Rapôso et al., 2016). The presence of ion channels-acting toxins in venom are likely responsible for these excitotoxic signs. The richness in bioactive neuropeptides and identification of their pharmacological action have been matter of numerous studies and motivation for the design of new biomolecules (Cruz-Höfling et al., 1985; see Cruz-Höfling et al., 2016 and De Lima et al., 2016, for reviews; Fontana and Vital Brazil 1985; Gomez et al., 2002; Love and Cruz-Höfling, 1986). Recently, we have shown that the expression of the vascular endothelial growth factor (VEGF) and receptors Flk-1 and Flt-1 and their respective mRNAs were variably and transiently upregulated in hippocampal neurons and astrocytes of rats that had been injected with *Phoneutria nigriventer* spider venom (Mendonça et al., 2012, 2013), but remained unclear whether VEGF has part in the mechanism of BBB permeation and venom-induced neurotoxic manifestations.

Vascular endothelial growth factor (VEGF) is an angiogenic, vasculogenic and vascular permeability cytokine that is essential for physiological and pathological development of new blood vessels (Ferrara et al., 2004, 2003; Roberts and Palade, 1997). The cytokine has been reported to have role on neuronal survival (Jin et al., 2000, 2001), neurogenesis (Jin et al., 2002), proliferation and differentiation (Sun et al., 2010; Zhu et al., 2003). Studies have shown that VEGF has neuronal role against Glu-induced excitotoxicity in hypoxia and oxidative stress conditions (Li et al., 2003, Tolosa et al., 2008; Tovar-Y-Romo and Tapia, 2010, Van Den Bosch et al., 2004). The protective mediation against glutamatergic-induced synaptic excitability has been ascribed to the ability of VEGF in modulating the physiology of calcium, potassium and voltage-gated sodium channels (Rosenstein et al., 2010; Sun and Guo, 2005; Sun and

Ma, 2013). Overall, those studies indicate a VEGF role in the maintenance of brain homeostasis (Moens et al., 2014).

VEGF biological response is triggered through transcriptional regulation promoted by transmembrane tyrosine kinase receptors, among them the VEGFR-1 or Flt-1 and VEGFR-2 or Flk-1 (Ferrara et al., 2003; Shibuya et al., 1990). The Flk-1 is considered a major mediator of the VEGF effect through activation of a number of signaling pathways (Shalaby et al., 1995), whereas evidences indicate that Flt-1 regulates negatively Flk-1 kinase activity (Koch et al., 2011). Upon VEGF-Flk-1 binding, the receptor dimerizes and become activated to initiate the cytokine signal transduction, which though is modulated by co-receptors in order to control the nature of the biological responses.

Hypoxia has been shown to be a major regulator of VEGF receptors activation. So, the cytokine is a direct transcriptional target of the hypoxia inducible factor (HIF), notably the HIF-1 α isoform (see Claesson-Welsh, 2016). In general, the most activated pathways related to VEGF neuroprotection involves the PI3K / Akt, which is important regulator of cell survival (Burgering and Coffer, 1995; Franke et al., 1997), MAPK (mitogen-activated protein kinases), which belongs to MAPK p38, and ERK (extracellular signal-regulated kinases), which is responsible for regulating cell proliferation, differentiation and motility (Roux and Blenis, 2004). The inhibition of VEGF-Flk-1 binding prevents protective signaling and negatively affects both the vascular and brain homeostasis.

Itraconazole is an antifungal azole drug that recently was reported as antiangiogenic (Nacev et al., 2011) with absence of undesirable side effects compared to other VEGF inhibitors (Aftab et al., 2011). Mechanistically the drug inhibits the binding of VEGF to Flk-1 and impedes the receptor signaling after the ligand stimulation

(Nacev et al., 2011). Very recently, we showed that the inhibition of VEGF-Flk-1 binding by the antifungal itraconazole aggravated the toxic condition of animals that had been injected with PNV as well as increased BBB damage in the hippocampus (Mesquita-Brito et al., 2018); it was also found that at intervals of animals' greatest intoxication (1-2 h post envenomation) there was a huge change of the biochemistry of hippocampal biomolecules, with emphasis in lipids, but also involving proteins and nucleic acids. Such changes were considerably less intense to envenomed animals that had been treated with just the spider venom. The findings represent strong evidence for a VEGF neuroprotective role against the vascular and brain homeostasis perturbation caused by PNV. Although vascular alterations and direct disturbance on the neurochemistry of the brain result from venom toxicity, the mechanisms underlying these effects are not completely understood yet.

The purpose of this study is to advance in the knowledge of the molecular mechanism related to the PNV-induced BBB impairment having VEGF as mediator. To do this we pre-treated animals with itraconazole before PNV administration. The study can give clues on VEGF-associated signaling pathways that mediate the neurotoxic action at time-points coinciding with different phases of the clinical outcome post PNV envenomation. The study could offer clues for therapeutic intervention following *P. nigriventer* envenomation.

2. Material and Methods

2.1. Ethics statement

This study was approved by the institution's Committee for Ethics in Animal Use (CEUA/IB/UNICAMP, protocol 32223-1) and was carried out according to the Brazilian Society of Laboratory Animal Science (SBCAL) guidelines for animal use.

2.2. Animals, venom and itraconazole

Male *Wistar* rats (*Rattus norvegicus*), aged 6-8 weeks (adults) and weighing 190-240 g were obtained from the Multidisciplinary Center for Biological Research (CEMIB-UNICAMP) and maintained on a 12:12 h artificial light-dark cycle. The animals were housed in cages under standard laboratory conditions. The lyophilized PNV was kindly donated by Dr. Evanguedes Kalapothakis, UFMG, Belo Horizonte, M.G., Brazil and stored at -20°C until use. The itraconazole, a crystalline solid with more than 98% purity (I6657, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) was dissolved in 15 % dimethylsulfoxide (DMSO) in sterile 0.9 % saline just prior the experiments (Carrer et al., 2013).

2.3. Immunoprecipitation

The evaluation of VEGF-Flk-1 protein immune-complexes was performed in the hippocampus of the four groups 2 h after i.v. administration of PNV, ITZ-PNV, saline or ITZ (n = 3/treatment). Two hours is interval with greatest signs of envenomation Samples of hippocampi homogenates were immunoprecipitated according Velloso et al., (1995). The hippocampi were removed and immediately homogenized in solubilization buffer at 4 °C (1% Triton X-100, 100 mM Tris-HCl, pH 7.4), 100 mM sodium pyrophosphate, 100 mM sodium fluoride, 10 mM EDTA, 10 mM sodium

orthovanadate, 2.0 mM PMSF and 0.1 mg aprotinin/ml). Samples of hippocampi homogenates were centrifuged for 40 min at 11,000 rpm in a 70.Ti rotor (Beckman) at 4°C. The protein concentration of the supernatants was determined by the Bradford dye method. Aliquots of the resulting supernatants containing 300 µg of total protein were used for immunoprecipitation with anti-VEGF antibody (10 µl) at 4°C overnight, followed by incubation with A-Sepharose (Solon et al., 2012). The immunoprecipitate samples were separated by SDS-PAGE, electro transferred to nitrocellulose membranes and reblotted with anti-Flk-1 antibody (1:250). Specific blot bands were visualized by chemiluminescence reagent and the density of pixels in each band was determined by Image J 1.45s software. The experiments were confirmed in three sets of experiments.

*2.4. Exposure to *Phoneutria nigriventer* spider venom and Itraconazole*

Four groups were assayed; PNV, ITZ-PNV, saline control and drug (ITZ) control. PNV received a non-lethal intravenous (i.v.) injection of PNV (0.85 mg/kg in 0.5 mg/ml of sterile 0.9% saline solution) through the tail vein (Le Sueur et al., 2003). ITZ-PNV received 10 mg/kg ITZ 30 min before systemic injection of venom; saline (physiologic) control received same volume/via of vehicle (0.9% sterile saline), whereas drug control received i.v. injection of ITZ (10 mg/kg) through the tail vein (Carrer et al., 2013). Animals from PNV and ITZ-PNV groups were euthanized at 1 and 2 h (intervals with greatest signs of envenomation), 5 h (interval with incipient signs of animals' recovery) and 24 h (interval with no visually detectable envenomation sign). Control rats, saline or itraconazole, were euthanized after 5 h (just one interval based on previous pilot assessment that showed no time-related differences to both controls; also it favors the use of animals to a minimum possible).

2.5. Evaluation of blood-brain barrier (BBB) permeability

2.5.1. Evans blue leakage assessment

Evans-blue (EB) infusion was used to assessing anatomically the BBB leakage; EB was complementary to western blotting assessment of molecular alterations to the junctional proteins at the BBB endothelium (see below at 2.5.2). Both approaches evaluated the integrity of the BBB in the four experimental groups: PNV, saline, ITZ and ITZ-PNV. Briefly, non-anesthetized animals received (i.v.) 10 ml/kg of EB (Vetec Química, Duque de Caxias, RJ, Brazil) dye dose (2% in 0.9% saline) at 1, 2, 5 and 24 h after they had been injected with PNV or ITZ plus PNV ($n = 3/\text{interval}$), while saline or ITZ groups were infused with EB two hours after saline or ITZ solutions ($n = 3/\text{treatment}$). This time was selected because at 1 to 2 h intervals the envenomation signs achieved its apogee in PNV and ITZ-PNV rats, so it was expected greatest BBB leakage. The animals of the four groups were euthanized by decapitation after CO_2 inhalation fifteen minutes after EB injection and brain and hippocampus were rapidly removed and photographed.

2.5.2. Western blotting (WB) assessment of BBB associated proteins

The expressional changes of proteins associated to paracellular and transcellular transport at the blood-brain interface were determined. The dosage of proteins electrophoretically separated was evaluated in homogenates from both the left and right hippocampal hemispheres belonging to PNV, ITZ-PNV, saline and ITZ groups. After 1, 2, 5 and 24 h of PNV or ITZ-PNV ($n=5/\text{time}$) administration, or 5 h after saline (physiological control) or ITZ (drug control) administration ($n = 8-12$ per control group) rats were euthanized by decapitation after CO_2 inhalation and the brains were immediately removed. The rats' hippocampi were stereotaxic dissected (Paxinos and

Watson, 1986) and homogenized with protein extraction cocktail (10 mM EDTA, 2 mM PMSF, 100 mM NaF, 10 mM sodium pyrophosphate, 10 mM NaVO₄, 0.1 mg of aprotinin/mL and 100 mM Tris, pH 7.4). Cellular protein was quantified by Bradford assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), then 40 µg of the cleared lysates were separated on 8% (β -catenin, dynamin-2, Flt-1, Flk-1, HIF1- α , laminin, occludin and ZO-1) or 12% (Akt, pAkt, caspase 3, caveolin-1 α , ERK, pERK, p38, pp38, NeuN, P-gp, Src and VEGF) SDS-PAGE. After electrotransfer onto nitrocellulose membrane (BioRad), the membranes were incubated with 5 % bovine serum albumin (BSA) to block non-specific antigenic sites followed by washing with TBS-T (0.1 % Tris-buffered saline with 0.05 % Tween 20, pH 7.4). Subsequently, the membranes were incubated overnight with primary antibodies (details in Table 1). The mouse polyclonal antibody against β -actin was used as an endogenous control. Specific protein bands were visualized through chemiluminescence reagent (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) and the density of pixels in each blot band was determined by Image J 1.45s software (Wayne Rasband, NIH, Bethesda, MD, USA). The experiments were confirmed in three sets of experiments.

Table 1. Primary antibodies used in this study.

Antibody	Dilution	Supplier	Reference	Host
Cav-1 α	1:1000	Santa Cruz	Sc-894	Rabbit polyclonal
Caspase 3	1:500	Santa Cruz	Sc-7148	Rabbit polyclonal
ERK	1:500	Santa Cruz	Sc-292838	Rabbit polyclonal
phospho ERK	1:500	Santa Cruz	Sc- 101760	Rabbit polyclonal
Flk-1	1:250	Santa Cruz	Sc-315	Rabbit polyclonal
Flt-1	1:500	Santa Cruz	Sc-316	Rabbit polyclonal
HIF-1 α	1:500	Santa Cruz	Sc-10790	Rabbit polyclonal

Laminin	1:500	Sigma Aldrich	L9393	Rabbit polyclonal
NeuN	1:2000	Millipore	ABN78	Rabbit polyclonal
P38	1:500	Santa Cruz	Sc-7149	Rabbit polyclonal
phosphoAKT	1:500	Santa Cruz	Sc-7985-R	Rabbit polyclonal
phosphoP38	1:500	Santa Cruz	Sc-17852-R	Rabbit polyclonal
Src	1:1000	Cell Signally	#2108	Rabbit polyclonal
ZO-1	1:500	Invitrogen	617300	Rabbit polyclonal
AKT	1:500	Santa Cruz	Sc-1619	Goat monoclonal
Dyn-2	1:500	Santa Cruz	Sc-81150	Goat monoclonal
Occludin	1:500	Santa Cruz	Sc-8144	Goat monoclonal
β -actin	1:1000	Sigma Aldrich	A2228	Mouse monoclonal
β -catenin	1:600	Santa Cruz	Sc-7963	Mouse monoclonal
PgP	1:250	Sigma Aldrich	P7965	Mouse monoclonal
VEGF	1:500	Santa Cruz	Sc-7269	Mouse monoclonal

2.7. Statistics

All numerical results were analyzed using the GraphPad Prism software package, version 5 (San Diego, CA, USA). Comparison of PNV *vs.* control, and ITZ-PNV *vs.* control was analyzed by one-way ANOVA followed by post-*hoc* Dunnett test. Time-by-time comparison between PNV *vs.* ITZ-PNV independent samples was analyzed by *Mann Whitney U test or t-Student test*; a *p* value ≤ 0.05 indicates statistical significance. Data were expressed as mean \pm SEM.

3. Results and Discussion

To determine whether increased VEGF expression could represent a neuroprotective biological response against PNV-induced BBB disruption and brain homeostasis perturbation in hippocampus we inhibited the VEGF/Flk-1 binding

(Mesquita-Britto et al., 2018). To do this we pre-treated animals with itraconazole (Nacev et al., 2011) 30 min before PNV administration and examined the outcome at time-points corresponding to severe venom intoxication (1 and 2 h), onset of incipient recovery signs (5 h), and no visible envenomation sign (24 h).

3.1. Effect of itraconazole on VEGF-Flk-1 binding assessed by immunoprecipitation

First of all, we examined the effectiveness of itraconazole in preventing protein-protein interactions. The inhibitory effect of the antifungal itraconazole was assessed based on the expression of VEGF and its tyrosine kinase Flk-1 receptor in the hippocampi of rats 2 h after PNV or ITZ-PNV administration (2.5 h after ITZ prior treatment) relative to saline and drug controls (Figure 1). Western blotting data indicated decreased values of VEGF and Flk-1 protein immune-complexes in the hippocampi of PNV-ITZ group when compared to both controls (**p≤0.001). The tendency to decrease the VEGF-Flk-1 binding found in the PNV when compared to saline was not statistically significant (p = 0.19). The comparison between PNV vs. ITZ-PNV revealed that the prior treatment with the antifungal drug reduced over 90 % the availability of the VEGF-Flk-1 immune-complex (+++p<0.001) in the hippocampi thus proving the efficacy of ITZ treatment in inhibiting the binding of the cytokine to Flk-1.

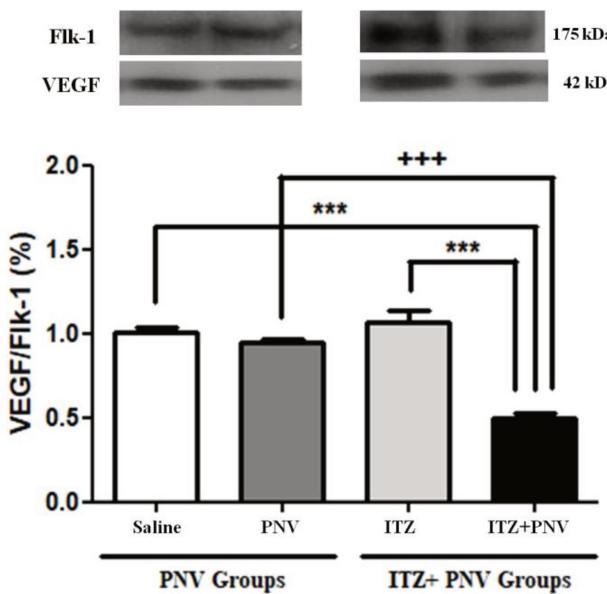


Fig. 1. The association of VEGF to Flk-1 in saline-, PNV- or ITZ-PNV-treated rats 2 h following exposure and determined by immunoprecipitation using anti-VEGF and anti-Flk-1 antibodies. Data are means \pm SEM, Student's *t*-test, *** $p\leq 0.001$ relative to saline and ITZ controls respectively; +++ $p\leq 0.001$ relative to PNV vs. ITZ-PNV; *Phoneutria nigriventer* venom (PNV); itraconazole pre-treatment plus PNV (ITZ-PNV).

3.2. Clinical signs of envenoming.

The PNV-treated animals exhibited the already described excitotoxic signs produced by the venom intoxication (Le Sueur et al., 2003; Mendonça et al., 2013; Rapôso et al., 2007). They were more intense 1 and 2 h after PNV i.v. injection; at 5 h, although animals appear intoxicated some signs of recovering start to appear (see Supplementary data in Soares et al., 2015, who used the same batch of PNV as the one used here). At 24 h, the rats were asymptomatic under visual inspection. In comparison to PNV clinical signs, the treatment with ITZ (ITZ-PNV group) intensified shivering and dyspnea and retarded the recovery of both the paralysis and typical exploratory behavior of animals into the cage. Furthermore, three rats of ITZ-PNV group died

within the first 2 h, and have to be replaced, indicating that animals' envenomation picture had worsened when VEGF-Flk-1 binding was inhibited. None of the PNV group died. No clinical neurotoxic signs were observed in both saline and ITZ control groups. We believe that the exacerbation of the clinical condition of animals that had the VEGF-Flk-1 binding inhibited by itraconazole might be grounded on the expressive alteration on the biochemical status of hippocampus as shown recently by Mesquita-Brito et al. (2018). The findings correlate well with studies revealing that inhibition of Flk-1 signaling in brain insult models intensifies damages to the injured area of the brain (Ferrara et al., 2003; Sköld et al., 2006).

3.3. Effect of itraconazole inhibition of VEGF-Flk-1 binding - Evans blue leakage assessment of blood-brain barrier disruption

BBB integrity was first assessed by visual inspection of the brains after i.v.-infusion of vital Evans blue (EB) dye. A steady-state BBB maintains EB confined within the brain vasculature, while leaky BBB allows the dye to escape from circulation and invades the brain parenchyma which then becomes dark blue.

Saline control rats that had received i.v. infusion of EB preserved the pink color typical of fresh brain thus indicating no extravasation of circulating dye from the cerebral microvasculature (Figure 2A). Figure 2B shows that itraconazole alone weakened the BBB as shown by brain that lost its fresh rose-pink color and acquired an incipient bluish shade. In contrast, the PNV- and ITZ-PNV-treated animals showed brains with dark blue color that indicates disruption of BBB and spreading of the dye throughout the brain parenchyma (Fig. 2C); at some extent extravasation of the dye was more accentuated in the ITZ-PNV group (Fig. 2D). However, visually there was no noticeable time-related difference in the intensity of the blue color in the brain of treated

animals including at 24 h. At this time-point animals showed no sign of envenomation as aforementioned. Also, the profound biochemistry alteration of hippocampus seen at 1 h by FT-IR spectroscopy did not differ from the baseline status of controls at 24 h (Mesquita-Brito et al., 2018). Also, the data of western blotting of proteins associated to BBB had returned to basal level (see data displayed below, Figs. 3-6). We conclude that the dark blue color of the brain tissue at 24 h might result more from a not fast clearance of the dye, than a still permeable BBB at this stage.

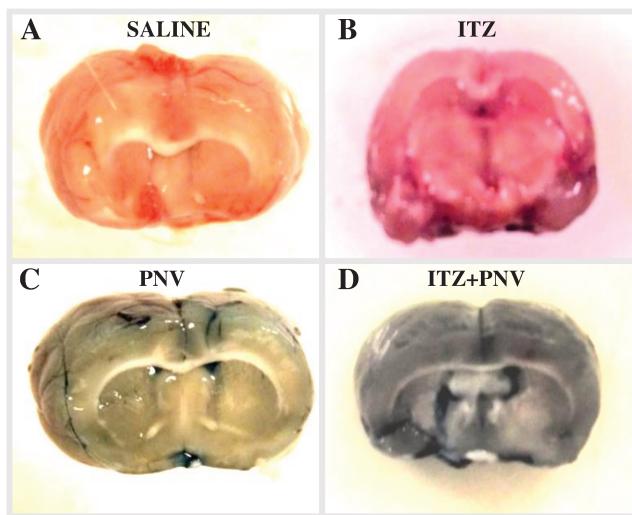


Fig. 2. Representative images of brains longitudinal sections from rats injected with Evans blue 2 hours after administration of saline (A), *Phoneutria nigriventer* venom (PNV) (B), itraconazole (ITZ) (C) and ITZ+PNV (D).

3.4. Effect of itraconazole inhibition of VEGF-Flk-1 binding on HIF-1 α , VEGF, Flk-1 and Flt-1 expressions

To determine whether hypoxia induction was differentially conferred by itraconazole treatment before *P. nigriventer* venom exposure and how this reflect on VEGF and receptors we assessed their expression by immunoblotting assays.

HIF-1 α : PNV induced reduction at 5 h (**p≤0.001) relative to saline control (n = 8-12). The prior ITZ treatment (ITZ-PNV group) instead caused an increase at 5 h over the ITZ control (n = 8-12) at same time-point (*p≤0.05). The comparison PNV vs. ITZ-PNV showed that the pre-treatment with ITZ doubled the expression of HIF-1 α at 5 hours (+p≤0.05) (Figure 3A), suggesting hypoxia condition and/or environmental hippocampal stress (Krock et al., 2011) likely resulting from reduction of VEGF/Flk-1 interaction, as shown by immunoprecipitation assay.

VEGF: Figure 3B shows that relative to control (n = 8-12), PNV caused a reduction at 1 h (*p≤0.05), an upregulation at 2 h (**p≤0.001) followed again by downregulation at 5 h (**p≤0.001) and return to baseline at 24 h. In contrast, hippocampi from ITZ-PNV group showed that the pre-treatment with itraconazole antagonized the effects that had been induced by venom causing decrease at 2 h (**p≤0.01) and increase at 5 h (**p≤0.01), compared to control (n = 8-12). At 24 h the VEGF level had equalized to the basal level. Time-by-time comparison between PNV vs. ITZ-PNV revealed that the inhibition of VEGF-Flk-1 binding by the antifungal azole drug decreased VEGF level more than 100% at 2 h (+p≤0.05), period of greatest intoxication. At this period the availability of VEGF-Flk-1 immune complexes seen through immunoprecipitation had dropped significantly in ITZ-PNV hippocampi in comparison to the found in PNV hippocampi (see Fig. 1). However, at 5 h, period of incipient signs of amelioration of animals' toxic condition, the inhibition of VEGF-Flk-1 binding promoted the reverse, i.e., increased VEGF level over 100% (+p≤0.05) (Figure 3B).

Flk-1: Relative to control, PNV induced downregulations of hippocampal R2 receptor at 1 and 5 h (**p≤0.001), followed by return to baseline at 24 h. ITZ prior treatment (ITZ-PNV group) attenuated Flk-1 downregulation that had been induced by

PNV at 1 and 2 h ($*p \leq 0.05$), followed by increase at 5 h ($*p \leq 0.05$) and return to baseline at 24 h. Inter-groups comparison (PNV vs. ITZ-PNV) revealed that Flk-1 expression exceeded over 100% in hippocampal tissue of rats pre-treated with the antifungal azole drug at 5 h ($+p \leq 0.05$), thus indicating a time-related effect (Figure 3C).

Flt-1: PNV reduced time-dependently the content of receptor R1 in the hippocampi of envenomed animals at 1 h and 5 h ($***p \leq 0.001$); at 24 h Flt-1 had returned to baseline. The pre-treatment with the antifungal drug (ITZ-PNV group) prevented PNV-induced down regulation at 1 and 2 h by maintaining R1 receptor at baseline level. In contrast to PNV alone, ITZ-PNV-treated rats increased the receptor at 5 h ($*p \leq 0.05$). Time-by-time comparison between PNV vs. ITZ-PNV showed that the inhibition of VEGF-Flk-1 binding by ITZ upregulated the expression of the receptor R1 at 1 h ($+p \leq 0.05$) and doubled over 100% at 5 h ($+p \leq 0.05$) (Figure 3D).

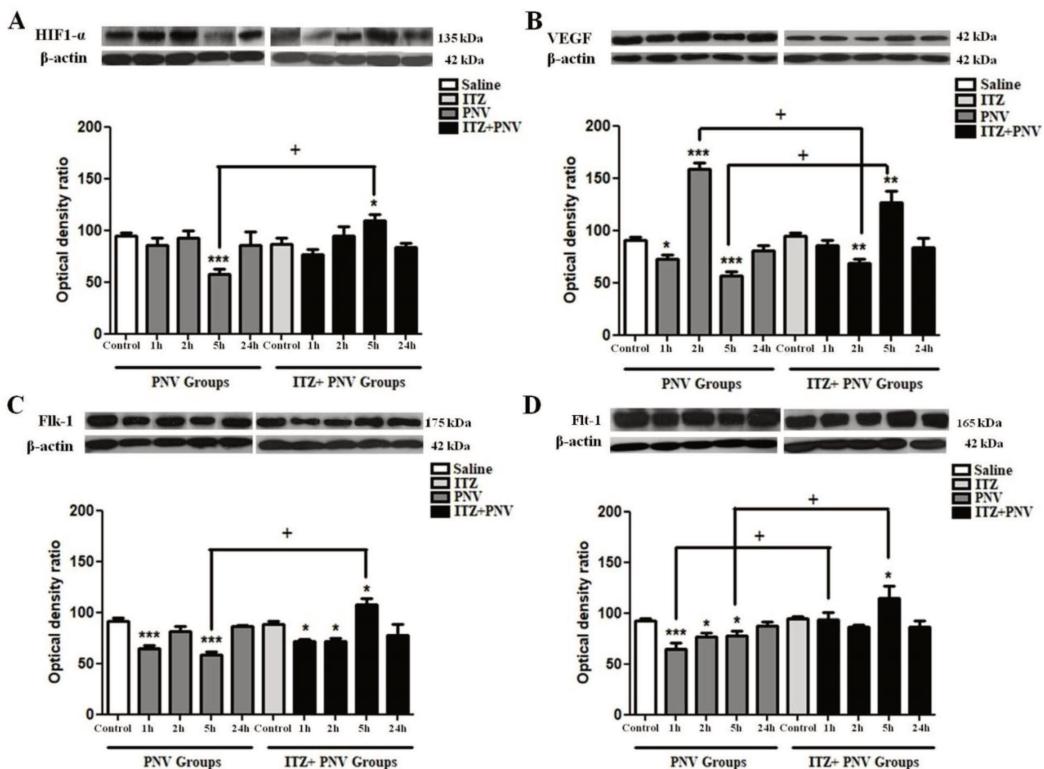


Fig. 3. Immunoblots of HIF-1 α (A), VEGF (B), Flk-1 (C) and Flt-1 (D) of hippocampi 5 h after the rats had been i.v.- injected with sterile saline or itraconazole (controls, n = 8-12/treatment), or 1, 2, 5 and 24 h after they had been i.v.-injected with *Phoneutria nigriventer* venom (PNV, n = 5/time) or pre-treated with itraconazole followed by venom (ITZ-PNV, n = 5/time). Data are means \pm SEM; one-way ANOVA followed by post-hoc Dunnett test for PNV or ITZ-PNV vs. respective controls, *p \leq 0.05, **p \leq 0.01, ***p \leq 0.001. Mann Whitney test for time-based comparison between PNV vs. ITZ-PNV groups: † p \leq 0.05 denotes difference caused by ITZ prior treatment.

The vast vascular supply of the brain requires a high demand for O₂ that is used for permanent synaptic transmission and maintenance of homeostasis; this implies to direct relationship between hypoxia and synaptic signaling (Astrup, 1982). The high demand for O₂ explains the diversity of cells expressing HIF-1 α in the brain, such as ependymal, neuronal, glial (with focus on astrocytes) and neural progenitor cells (Chávez et al. 2000, Lu et al. 2006; Roitbak et al. 2011). Astrocytes, the more numerous glial cell in the brain, are key elements in the tightness of the BBB through the intimate contact of their end-feet to capillary endothelium; moreover, astrocytes are seminal modulators of neurovascular unit and as such undertake a pivotal role on neurotransmission function (Cauli and Hamel, 2018). Through their profuse processes closely-juxtaposed to neuronal synaptic contacts they promote the local buffering by removing excess of Glu and K⁺ to protect neurons from excitotoxicity. The excess of Glu leads astrocytes to upregulate the HIF-1 α transcription factor of various targets as a mechanism of protection to neurons survival (Badawi et al., 2012). PnTx-2, a major fraction of the PNV, which reproduces the main toxic effects and pharmacological activities of the crude venom, increases Glu (and acetylcholine) release in response to

retarded closure of the Na^+ channels that results in membrane depolarization and Ca^{2+} influx (Moura et al., 1998, Romano-Silva et al., 1993). PnTx2-6 (also named δ -CNTX-Pn1b), a toxin isolated from PnTx-2 releases Glu from rat brain synaptosomes involving Na^+ and Ca^{2+} channels and increases vascular permeation at the blood-brain barrier *in vivo* (Silva et al., 2018). The authors show that the vascular effect of PnTx2-6 is not restricted to the BBB, since the toxin causes cavernosal relaxation and penile erection by mechanism associated with nitric oxide/cyclic GMP-pathway dependence. Other toxins from crude PNV block potassium and calcium channels (see, De Lima et al., 2016 for review). We suggest that the excitotoxicity of envenomed animals has its origin in both the increased Glu release and disturbance in Na^+ channels physiology and Ca^{2+} and K^+ handling. As result, it was promoted upregulation of HIF-1 α that in turn induces transcription of protein targets, for instance VEGF, that will protect hippocampal cells against Glu toxicity (Badawi et al., 2012), and likely against profound molecular stress on the neurochemical status of the brain tissue (Mesquita-Brito et al., 2018).

In the present study, animals pre-treated with ITZ showed HIF-1 α upregulation thus indicating that the blockade of VEGF-Flk-1 binding induced both a state of hippocampal hypoxia and increased toxic manifestation to animals. This is accordance with three fatal cases in animals and the intensification of dyspneic condition of animals of ITZ-PNV group herein shown.

It is well-established that the lowering of oxygen and the resulting activation of HIF-1 α triggers the transcription of various genes, such as VEGF, glucose transporter-1 (GLUT-1) and glycolytic enzymes to adapt cell survival to the hypoxic condition (Bunn and Poyton, 1996). Among the genes, VEGF has a lead involvement in the protective role mediated by H1F-1 α (Wick et al. 2002). Likewise HIF-1 α that is ubiquitously

expressed in the brain; the VEGF is also broadly expressed all over the CNS, including endothelial cells, neurons and astrocytes.

According to our results the blockade of VEGF-Flk-1 binding by ITZ prior treatment counteracted the action promoted by PNV alone. The major antagonistic effect was produced at 5 h for all the proteins, VEGF, Flk-1 and Flt-1, a time-point also showing upregulation of HIF-1 α (Fig. 3A-D). The finding strongly suggests triggering of a HIF-1 α -mediated protection to hippocampus in ITZ-PNV animals by induction of a timely-synchronous VEGF and Flk-1 and Flt-1 receptors upregulation. The findings suggest activation of mechanisms aimed at restoring homeostasis to hippocampal milieu. Previous *in vivo* and *in vitro* studies showed that GLUT-1 was significantly upregulated at 5 h in the hippocampus of PNV-treated animals, and that GLUT-1 labeling was intense around the blood microvessels thus indicating the presence of GLUT-1 located at perivascular astrocytes end-feed (Rapôso et al., 2014). We concluded that glucose supply was being promoted by GLUT-1 in response to high energy demand after PNV insult to the brain; we also showed by quantitative real-time PCR the decrease of *glut-1* mRNA transcripts in cultured astrocytes incubated for 2 h with PNV. We also showed the nitric oxide (NO) mediation of these effects by blocking selectively the neuronal nitric oxide synthase (nNOS) by 7-nitroindazole pre-treatment. We then suggested that NO might function as a second messenger acting on PNV effects. In the current study, both PNV and ITZ-PNV groups showed that the expressional changes of the proteins were transitory and self-limiting being resolved 24 h post-treatment. This is accordance to the evolution of the toxic state of animals that was resolved by 24 h too, and reiterates triggering of endogenous mechanism to recompose homeostasis and normoxic brain status. In normoxic brain HIF-1 α is degraded by ubiquitin-proteosome system (Huang et al., 1998).

Using identical study model and same venom batch, we evaluated by vibrational spectroscopy the biochemistry of hippocampus of rats that received systemic administration of *Phoneutria nigriventer* crude venom before and after itraconazole treatment (Mesquita-Britto et al., 2018). Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy allows identifying changes in the spectral signature of different functional groups of tissue biomolecules by measuring the frequency and intensity at which a given sample absorbs infrared radiation (Stuart, 2004). The findings showed that at periods of greatest intoxication there was huge spectra modification resulting mostly from changes in functional groups of lipids, but also of proteins- and nucleic acids-related biomolecules. The changes were acute but progressively were resolved time-dependently, achieving physiological levels 24 h post-treatment. Also, the changes were remarkably more intense in the hippocampi of animals that had been treated with itraconazole before the spider venom. Control animals administered saline or itraconazole alone did not show changes in the physiological spectra of hippocampi biochemistry.

3.5. Effect of itraconazole inhibition of VEGF-Flk-1 binding on the neuron viability.

Because VEGF and receptors were expressed in astrocytes and pyramidal neurons of CA subfields and granule neurons of dentate gyrus of hippocampus in rats exposed to PNV as reported in a previous study of ours (Mendonça et al., 2013), and because neurons are part of the neurovascular unit associated to BBB and thus subjected to Glu toxicity, we assessed the viability of hippocampal neurons through western blotting analysis of the neuronal nuclear protein (NeuN) and caspase-3 expressions in animals i.v.-injected with PNV with or without previous treatment with itraconazole. NeuN is an antigen detected in the nucleus of neurons in a wide range of vertebrates

(Dent et al., 2010; Muller et al., 1992) throughout their lifespan. Typically, it is considered a biomarker of mature neuron and neurons' viability (Snyder et al, 2012).

Caspase-3 is a biomarker that indicates activation of pathways that lead to cell death by apoptosis. Both biomarkers can be expressed after brain insults that damage the BBB.

NeuN: Both PNV and ITZ-PNV groups showed upregulation of hippocampal NeuN expression with difference that in PNV group the translation event happened earlier at 2 h whereas in the ITZ-PNV it was later at 5 h; moreover, the protein upregulation was less prominent for ITZ-PNV (41%, *** $p\leq 0.001$ vs. 60% for PNV *** $p\leq 0.001$) relative to controls ($n = 8-12$) (Fig. 4A). Comparison between PNV vs. ITZ-PNV revealed NeuN expressional decrease at 2 h (+ $p\leq 0.05$) and increase at the very same 5 h (++ $p\leq 0.01$) and timely in concert with HIF-1 α , VEGF, Flk-1 and Flt-1 upregulations (compare Figures 2 and 3), and as well as coinciding with the first signs of animals recovery.

Caspase-3: Both PNV and ITZ-PNV reduced caspase-3 expression, the former by 70% at 5 h and the latter by 40% at 2 h relative to respective controls ($n = 8-12$) (** $p\leq 0.001$). Inter-groups comparison (PNV vs. ITZ-PNV) revealed that caspase-3 expression increased significantly at 5 h (107%, + $p\leq 0.05$) in hippocampal tissue of rats pre-treated with itraconazole (Figure 4B). The data evidences transient activation of apoptosis pathways in hippocampus after itraconazole-induced inhibition of VEGF-Flk-1 binding as compared to PNV-treated animals at 5 h post treatment.

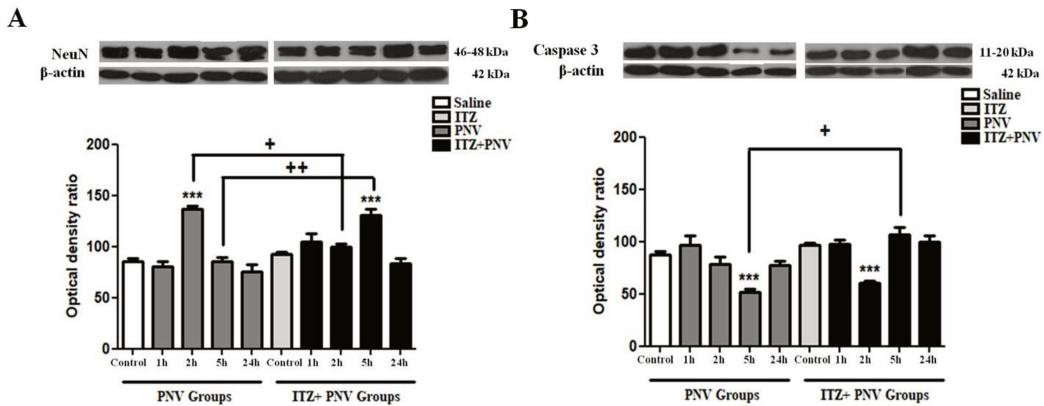


Fig. 4. Immunoblots of NeuN (A) and caspase-3 (B) in the hippocampi of rats i.v.- injected with saline or itraconazole (ITZ, controls, n = 8-12/saline/ITZ) or PNV- and ITZ+PNV-treated rats at 1, 2, 5 and 24 h (n = 5/time). Data are means ± SEM, One-way ANOVA followed by post-hoc Dunnett, ***p≤0.001 relative to controls. Mann-Whitney test for comparison between PNV and ITZ-PNV at matched intervals, +p≤0.05, ++p≤0.01 denotes differences caused by ITZ prior treatment.

The activation of apoptotic pathway shown in the current study model could be associated with dysregulation of calcium homeostasis promoted by some PNV toxins that increase intracellular calcium content (Romano-Silva et al., 1993). Recent *in vitro* study of ours showed that PNV directly impairs astrocytes intracellular Ca²⁺ release and produced Ca²⁺ mobilization from intracellular stores; such action probably involving the Na⁺/K⁺-ATPase, an energy-transducing ion pump that has role in the modulation of Ca²⁺ signaling (Rapôso et al., 2016). It is well established that intracellular Ca²⁺ overload in response to excessive Glu release under stressful stimuli, as the promoted by PNV and ITZ-PNV treatment, can lead to neuronal death, depending on the duration of stimuli. Crude PNV, PnTx-2 fraction and its isolated toxins delay the inactivation of Na⁺ channels, induce membrane depolarization and Ca²⁺ influx and increased Glu release (De Lima et al., 2016; Love et al., 1986; Love and Cruz-Höfling, 1986), events

that are known to activate caspase-3 pathway and promote cell unviability and death. Study indicated that VEGF pre-treatment of cultured CA1 pyramidal neurons of hippocampus acutely and dose-dependently reduces intracellular Ca^{2+} influx caused by KCl or Glu exposure, via inhibitory activity of high voltage activated (HVA)- Ca^{2+} currents, and that the inhibition of Flk-1 signaling prevents such effects (Ma et al., 2009). It is likely that a similar mechanism might be involved in the VEGF role in this PNV study model.

Importantly, PnTx3-3 another toxin from PNV is highly effective in inhibiting calcium-dependent Glu release. The toxin blocks HVA channels, but not the low-voltage-activated (LVA) calcium channels, namely P/Q, R, L and N type (see De Lima et al., 2016). As can be seen, the same venom contains toxins with antagonistic effects on ion channels physiology. We suggest that the dysregulation of calcium homeostasis by toxins contained in the whole PNV and the inhibition of Flk-1 signaling by itraconazole would be part of the mechanism related to increase in caspase-3, as seen in the hippocampi of ITZ-PNV in comparison to PNV counterpart. A mechanism of neuroprotection by VEGF was shown in study model of ischemic injury after stroke (Sun and Guo, 2005). The authors reported that VEGF inhibits caspase-3 activity and apoptosis and enhances neurogenesis in parallel with the activation of PI3-K pathway, tyrosine phosphorylation of potassium channels proteins and decrease in potassium currents.

The protection of neurons by VEGF is exerted by interference on Ca^{2+} , K^+ , and voltage-gated Na^+ channels physiology and modulation of glutamatergic synaptic excitability (Sun and Guo, 2005; Rosenstein et al., 2010; Sun and Ma, 2013). Both hippocampal pyramidal dendrites and granule dendrites are rich in glutamate receptors,

Na^+ and Ca^{2+} channels, also targets of PNV, hence explaining the alterations of VEGF and receptors upon itraconazole inhibition of VEGF-Flk-1 binding.

3.6. Effect of itraconazole inhibition of VEGF-Flk-1 binding on the paracellular tightness of the BBB - Western blotting of junctional proteins and laminin

The BBB is a highly complex structure subjected to continuous changes in ions and metabolites fluctuations that occur naturally in the circulating blood after meal, exercise, starvation, rest or under positive or negative external sensory stimulus. The arsenal of proteins forming tight junctions and adhesion junctions along endothelial cells contacts prevents the paracellular transit of molecules between brain and blood. The basement membrane (BM) sandwiched between the endothelium and astrocytes are also part of such natural dynamics (Abbott et al., 2010). Herein, we assessed first the impact of itraconazole pretreatment on the expression of proteins engaged in the BBB paracellular route and laminin from basement membrane (BM) at different time-points post treatment.

Occludin: an integral transmembrane protein fundamental for paracellular tightness and barrier function was down regulated at 1 h and 5 h ($*p \leq 0.05$), in hippocampus of PNV group. In the ITZ-PNV group, occludin expression was decreased at 1 and 2 h ($**p \leq 0.01$), whilst it was increased at 5 h ($*p \leq 0.05$). The comparison PNV vs. ITZ-PNV showed that disruption of VEGF-Flk-1 binding by the antifungal azole drug interestingly doubled the content of occludin in the microvasculature of hippocampus at 5 h ($+p \leq 0.05$) (Figure 5A), suggesting paracellular barrier tightening.

ZO-1: in PNV-exposed rats, the actin cytoskeleton TJ-associated protein important for barrier fence dropped acutely at 1 h in hippocampal capillaries ($*p \leq 0.05$), followed by return to baseline thereafter. In ITZ-PNV-exposed rats ZO-1 expression

decreased ZO-1 at 1 h (**p≤0.01) and at 2 h (**p≤0.001), indicating that the antifungal azole drug accentuated downregulation of ZO-1 at periods of greatest intoxication. The comparison PNV vs. ITZ-PNV revealed that inhibition of VEGF-Flk-1 binding caused reduction of ZO-1 level in hippocampal microvessels at 2 h (+p≤0.05) (Figure 5B).

β-catenin: PNV induced downregulation of the AJ protein representative of the cadherin/catenin complex at 1 h (**p≤0.001) and 5 h (**p≤0.01). ITZ prior treatment induced downregulation at 2 h (**p≤0.01). The comparison PNV vs. ITZ-PNV showed that itraconazole previous treatment dropped β-catenin expression below the level induced by PNV at 1 h (+p≤0.05), while increased it above the level induced by PNV at 5 h (+p≤0.05) (Figure 5C).

Laminin: Relative to control (n = 8-12), PNV reduced the content of laminin expression, the main matrix constituent of the basement membrane at 1 h (*p≤0.05) 5 and 24 h, (**p≤0.001), while promoted expressive upregulation at 2 h (**p≤0.001). The pre-treatment with the antifungal drug (ITZ-PNV group) induced downregulation at 2 h (**p≤0.001) followed by upregulation at 5 and 24 h (*p≤0.05 and ***p≤0.001, respectively), relative to ITZ control (n = 8-12). The comparison PNV vs. ITZ-PNV at matched intervals post-treatment showed that the antifungal drug pretreatment reduced laminin at 2 h, an interval of greatest neurotoxicity (72%, +p≤0.05) followed by sustained rising at 5 and 24 h (+p≤0.05), intervals characterized by onset of clinical recovery and absence of toxic signs, respectively (Figure 5D).

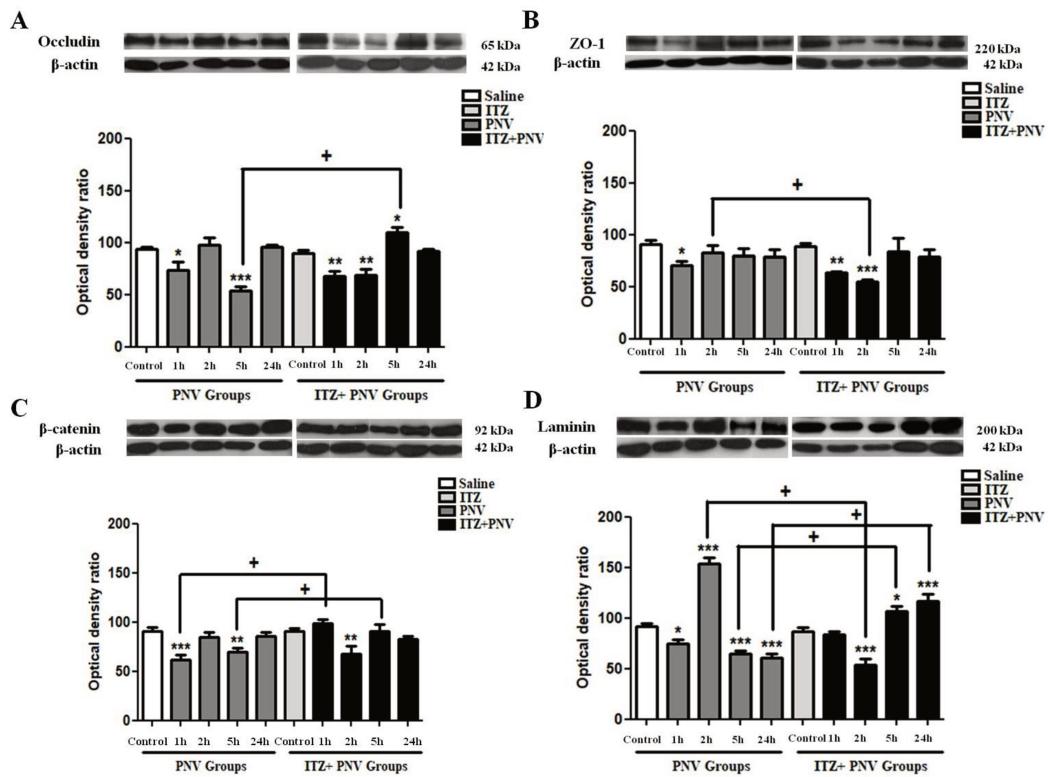


Fig. 5. Immunoblots of Occludin (A), ZO-1 (B), β-Catenin (C) and Laminin (D) in the hippocampi of i.v.-injected saline or itraconazole (controls, n = 8-12/saline/ITZ)) or PNV- or ITZ+PNV-treated rats at 1, 2, 5 and 24 h (n = 5/time). Data are means ± SEM, One-way ANOVA followed by post-hoc Dunnett, *p≤0.05 , **p≤0.01, ***p≤0.001 relative to controls; Mann-Whitney test for comparison between PNV x ITZ-PNV groups at matched intervals, +p≤0.05 denotes groups differences caused by ITZ.

Relative to PNV findings, the prior treatment with itraconazole triggered opposing mediating and modulating time-related expressional changes on TJ and AJ proteins and BM laminin: it reduced ZO-1, β-catenin and laminin at periods of greatest intoxication (1 and 2 h) whereas increased occludin, β-catenin and laminin at intervals that recovery was underway (5 and 24 h).

Such contrasting effect is not new in this BBB model (Le Sueur et al., 2004; Rapôso et al., 2007, 2012; Mendonça et al., 2014). Comparatively, the systemic injection of PNV or ITZ+PNV altered distinctly the expression of each of these proteins suggesting time-related phosphorylation/dephosphorylation rate and hence opening/closure cycles in the endothelial fence state. As result, the steady state dynamics of the BBB was broken down. It is known that the state of endothelial cytoplasmic and BM anchorage of TJ proteins have important role for paracellular leakiness or tightness. Occludin together with claudins are typical sealing TJ proteins linked to the actin cytoskeleton of endothelial cells via ZO-1 and ZO-2 (Willot et al., 1992), whereas the principal linker molecules between adherens junctions and the cytoskeleton are the catenins (Abbott et al., 2010). On the other hand, expression of laminin, the main matrix constituent of BM profoundly affects the expression of junctional proteins (Savettieri et al, 2000; Tilling et al. 1998). The BM underlying BBB endothelium is actually a mix of two BMs, one produced by the endothelium proper and the other produced by the astrocytes, named parenchymal BM (pBM). The laminin composition differs between the two BMs; vascular laminin isoform 8 and 10 are part of BM endothelium whilst laminin isoform 1 and 2 are part of pBM (Sixt et al., 2001). The expression of laminin 8 is strongly upregulated by cytokines and growth factors, including VEGF, and laminin 10 is upregulated by proinflammatory signals (Hallmann et al., 2005, see also Thomsen et al., 2017). On the other hand, astrocytic laminin are critical for the proper functioning of the BBB since it has role in the polarity of astrocytic end feet and the expression of TJ proteins in endothelial cells (Yao et al., 2014). We suppose that the expression of laminin isoforms from vascular and astrocytic sources were modulated distinctly by the PNV and ITZ+PNV treatment and likely have time-dependent differential regulation to occludin, ZO-1 and β -catenin expressions. The

understanding of this complex interaction under adverse condition is far from being resolved.

3.7. Effect of itraconazole inhibition of VEGF-Flk-1 binding on the transcellular transport – Western blotting of Cav-1 α , Din-2, Src, P-gp

Next, we evaluated how the inhibition of VEGF-Flk-1 binding impacted the expression of some proteins with key-engagement in the BBB bi-directional transcytosis in relation to changes that had been caused by PNV alone. We investigated the expression of Cav-1 α , the main scaffolding protein that forms caveolae (Rothberg et al., 1992); dyn-2 protein that forms the caveolae neck and interconnects it to endothelial membrane (Yao et al., 2005); Src family kinases are cytosolic enzymes that catalyzes transference of phosphate groups from donors (like ATP) to tyrosine residues in proteins (Roskoski, 2015), and P-glycoprotein (P-gp) transmembrane efflux protein that limits the transcellular passage of blood-borne potentially toxic molecules into the BBB (Schinkel and Jonker, 2003).

Cav-1 α : Relative to control (n = 8-12), PNV induced a two-step increase in the caveolae structural protein at 1 h (**p≤0.01) and 5 h (**p≤0.001) indicating that venom promoted increased caveolae formation at intervals of great toxicity. The pre-treatment with ITZ (ITZ-PNV rats) modulated the process since the upregulation of Cav-1 α , although of statistic significant (*p<0.05), was of shorter magnitude (20% at 5 h), but persisted longer (22% at 24 h). The comparison between PNV vs. ITZ-PNV groups showed that inhibition of VEGF-Flk-1 binding attenuated by 22% the PNV-induced upregulation of Cav-1 α at 5 h (+p≤0.05), whereas induced a 25% increase at 24 h (+p≤0.05), meaning caveolae reconstitution (Figure 6A). The data indicate that the inhibition of VEGF-Flk-1 binding reduced the number of caveolae, thus suggesting cell

membrane flattening by scission from membrane at a first step (5 h) and caveolae neoformation at a second step (24 h).

Dyn-2: PNV induced ~90% decrease of the caveolae neck-former protein at 1 h (**p≤0.001), whereas ITZ pre-treatment (ITZ-PNV group) induced decrease at 1 h (**p≤0.01) followed by increase at 5 h (**p≤0.001). Time-by-time PNV vs. ITZ-PNV comparison showed that the pre-treatment with itraconazole increased by ~50% the level of dyn-2 in the hippocampi of ITZ-PNV rats at 5 h (+p≤0.05) and promoted a trend to its decrease at 24 h (p=0.73), what is tune to the level of Cav-1 α at same time-points (Figure 6B). Decreases in caveolin-1 α and dyn-2 indicate caveolae detachment from cell membrane and flattening of cell surface followed by internalization and transport of endosomal vesicles and thus increases in BBB permeability; the opposite meaning re-invagination of cell surface at lipid raft membrane domains and flask-shaped caveolae reorganization with reduction/absence of endosome transport and thus return to BBB steady state. The data agrees with our previous findings relative to caveolae as target of PNV (Soares et al., 2016). It is worth mention that dyn-2 takes part in other cell events involving vesicles, such as synaptic vesicles recycling, synaptic transmission, neurosecretion, phagocytic vesicles and sorting of vesicles from Golgi lamellae (González-Jamett et al., 2014, reviewed by Yao et al., 2005). This could explain why increases of dyn-2 at 5 h paralleled well-timed to attenuation of Cav-1 α upregulation (lesser number of caveolae). We suggest that inhibition of VEGF-Flk-1 binding by itraconazole just partially inhibited BBB transcellular transport that had been caused by PNV. On the other side, it suggests interference on neurotransmission given caveolae is present in other structures than capillary endothelium.

Interestingly, at the very same 5 h interval, while there was declined regulation of the transcellular transport (downregulation of cav-1 α), the paracellular route appeared

reinforced as shown by increased occludin, β -catenin and laminin expressions (Fig. 5). It is difficult to explain the chronology of events and signaling pathways that were triggered and culminate with up and downregulation of proteins of the BBB molecular barrier. Nevertheless, it is known that BBB physiology works through physical and molecular interdependent mechanisms with view to maintain CNS homeostasis. Studies indicate that cav-1 controls disruption of TJ proteins via Ras signaling (Zhong et al., 2008), a protein belonging to GPTase family also compartmentalized at caveolae dominium (Pattel et al., 2008).

Our data revealed compensatory mechanisms likely to preserve homeostasis that tighten up the paracellular route when transcellular route is weakened (Yao et al., 2005). Also, at 24 h, the increases in caveolin-1 α and laminin expressions and tendency to increase dyn-2 in hippocampi of ITZ-PNV rats correlate well with healthy BBB (physiologic level of TJ proteins) at an interval to which toxic signs of animals had been visually vanished.

It is acknowledged that the level of increases and decreases of Cav-1 α , as well as TJ and AJ proteins, as the found in the present study, implies in increased tyrosine phosphorylation and dephosphorylation by tyrosine kinase and tyrosine phosphatase, respectively, thus resulting in cycles of BBB weakening and restoration. The endocytosis of caveolae-derived vesicles depends on activation of Src kinase family (SKF) and phosphorylation of dyn-2, which improves direct interaction to caveolin-1, the caveolae scaffold protein (Nag et al., 2009; Shajahan et al., 2004b; Yao et al., 2005).

Src: PNV downregulated acutely the Src kinase family (SKF) by 164% at 1 h, a critical period of animals' intoxication, (**p \leq 0.001); thereafter Src reached baseline. The prior exposure to ITZ (ITZ-PNV group) neutralized the marked decrease that had been induced by PNV at 1 h, and subsequently promoted a transitory drop of Src

content at 2 h (* $p \leq 0.05$) followed by non-significant upregulation thereafter for 5 and 24 h ($p=0.0032$). Comparison between PNV and ITZ-PNV groups revealed that the inhibition of Flk-1 signaling to VEGF ligand through the prior ITZ treatment produced increases in hippocampal Src expression at 1 and 5 h (+ $p \leq 0.05$) (Figure 6C).

Hence, increases in Src in ITZ-PNV rats paralleled with attenuation of Cav-1 α increases and upregulation of dyn-2, laminin, β -catenin, occludin, all at 5 h time-point, indicating that there was interacting partnership among those proteins, and that cholesterol, phospholipids and sphingolipids rich membrane domains of caveolae constitute a platform for triggering cell signaling transduction pathways.

As a matter of fact, Src kinase family (SKF) has been implicated in numerous cell events by interacting with transmembrane tyrosine kinase receptors, as for example Flk-1 which is also compartmentalized in the microdomains of the plasma membrane, the caveolae. In recent study, we showed the participation of Src in the time-related down and up changes of Cav-1 α after systemic envenomation by PNV thus indicating corresponding decreases and increases in caveolae disassembly and reassembly, respectively (Soares et al., 2016). Studies show that Flk-1, Src, caveolin-1 share compartmentalization at caveolae-derived endocytic vesicles, and that Flk-1 recruitment from intracellular stores are Src-dependent in response to VEGF activation (Gampel et al., 2006).

Furthermore, other signaling molecules such as protein kinase C endothelial nitric oxide synthase (eNOS), G proteins, including Ras, growth factor receptors and many fosfatases also co-habit caveolae membrane microdomain compartment (Pattel et al., 2008). A structure with so many relevant transducing molecules, receptors and lipids enrichment for sure elects caveolae as protagonist of relevant roles in multiple signaling pathways (Labrecque et al. 2003; Sonveaux et al., 2004).

Studies have also shown that P-glycoprotein (P-gp) has been located in the caveolae of brain capillaries and that interaction between P-gp and caveolin-1 modulates P-gp transport activity (Demeule et al., 2000; Jodoin et al., 2003).

P-gp: PNV induced P-gp reduction at 1 h (** $p \leq 0.01$), and upregulation at 2 h (** $p \leq 0.01$) followed by reduction at 5 h (** $p \leq 0.01$) and its return to baseline at 24 h. The ITZ-PNV group showed P-gp downregulation at 2 h (** $p \leq 0.01$) and 24 h (127%, *** $p \leq 0.001$) compared to control. Time-by-time PNV vs. ITZ-PNV comparison revealed that the inhibition of VEGF-Flk-1 binding by itraconazole decreased by 50% and 124% the P-gp expression at 2 h at 24 h (+ $p \leq 0.05$). In opposition, the inhibition of VEGF-Flk-1 binding promoted upregulation at 5 h (+ $p \leq 0.05$) (Figure 6D).

P-gp is part of the multidrug resistance (MDR) efflux transporter protein family (ABCB1). Located in the luminal aspect of brain capillaries, it works to protect the tissue against xenobiotics (Fromm, 2004; Schinkel and Jonker, 2003). The MDR proteins extrude drugs and toxins if they gain access into the cytoplasm of brain endothelial cells to preserve homeostasis of the CNS environment.

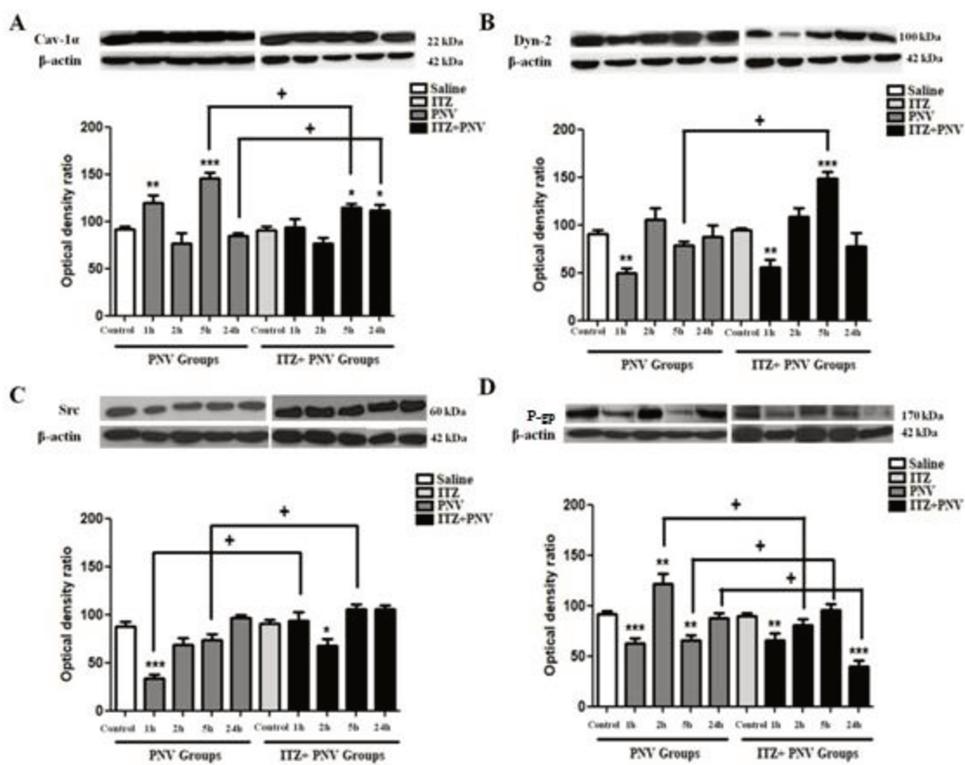


Fig. 6. Immunoblots of Cav-1 α (A), Dyn-2 (B), Src (C) and P-gp (D) of hippocampi 5 h after the rats had been i.v.- injected with sterile saline or itraconazole (controls, n = 8–12/treatment), or 1, 2, 5 and 24 h after they had been i.v.-injected with *Phoneutria nigriventer* venom (PNV 1 h; 2 h; 5 h; 24 h, n = 5/time) or pre-treated with itraconazole followed by venom (ITZ-PNV 1 h, 2 h, 5 h, 24 h, n = 5/time). Data are means \pm SEM; one-way ANOVA followed by post-hoc Dunnett test for PNV or ITZ-PNV vs. respective controls, *p \leq 0.05, **p \leq 0.01, ***p \leq 0.001. Mann Whitney test for time-based comparison between PNV vs. ITZ-PNV groups. +p \leq 0.05 denotes differences caused by ITZ prior treatment relative to PNV.

Our data showed that inhibition of VEGF-Flk-1 binding caused downregulation of caveolin-1 α at 5 h and upregulation at 24 h whereas showed upregulation of P-gp at 5

h and downregulation at 24 h. Studies revealed that P-gp activity is modulated by caveolin-1. Decreases in the interaction between P-gp and caveolins (Demeule et al., 2000; Jodoin et al., 2003) increases transport activity, indicating that caveolin-1 negatively regulates P-gp, whereas downregulation of caveolin-1 enhanced P-gp transport (Barakat et al., 2007). Time-related cyclic alteration in the expression of caveolin-1 in the brain and so in the number of caveolae was shown by our previous studies in BBB study model using *P. nigriventer* (Soares et al., 2014, 2016). The disassembly/reassembly of caveolae, the lipid raft microdomains of capillary endothelial membrane, as shown in the current study, generates tensional forces and mechanical stress at plasma membrane that constitute a trigger mechanism for delivering signal transduction pathways (Nassoy and Lamaze, 2012; Park et al., 2000; Pelkmans and Helenius, 2012; Rothberg et al., 1992).

3.8. Effects of itraconazole inhibition of VEGF-Flk-1 binding on the transduction of signaling pathways for VEGF

In the current study the neuroprotective effect of VEGF and mechanism of action against *Phoneutria nigriventer* spider venom (PNV)-induced BBB breakdown is investigated through itraconazole impediment of the receptor signaling to binding to the cytokine (Nacev et al., 2011). Multiple pathways related to VEGF neuroprotection could be triggered for effective tissue adaptive response in the search for homeostasis reestablishment.

pAkt: PNV administration induced reduction of pAkt at 1 h, (**p ≤0.01) and at 5 h (*p≤0.05), intervals of great venom intoxication, followed by a upregulation in regulator of cell survival pathway at 24 h (**p≤0.001). The prior ITZ treatment (ITZ-PNV group) induced a 64% reduction at 1 h below the baseline (**p≤0.001). Inter-

groups comparison (PNV vs. ITZ-PNV) showed that the impediment of Flk-1-VEGF binding through the anti-fungal maintained depressed the expression of the PI3K / AKT pathway 24 post-treatment ($+p \leq 0.05$) at a time to which animals showed no signs of intoxication (Figure 7A). The data show that molecular alterations of Akt (also called protein kinase B or PKB) were sub-clinical.

pERK $\frac{1}{2}$: PNV caused reduction of pERK $\frac{1}{2}$ at 1, 2 and 24 h ($*p \leq 0.05$, $***p \leq 0.001$ and $***p \leq 0.001$, respectively) in the pathway linked to extracellular signal-regulated kinase. The prior treatment with itraconazole (ITZ-PNV group) caused also reductions of pERK $\frac{1}{2}$ at 1 h ($**p \leq 0.01$), 2 h ($*p \leq 0.05$) and 24 h ($***p \leq 0.001$). The data show that itraconazole did not antagonize the effects that had been produced to this particular VEGF-Flk-1 signaling pathway by PNV. However, the antifungal drug was able to alter the level of modulation relative to time after treatment. PNV vs. ITZ-PNV showed that the inhibition of VEGF-Flk-1 binding through itraconazole increased ERK $\frac{1}{2}$ at 2 h ($+p \leq 0.05$) (Figure 7B). The findings indicate that the impediment of Flk-1-VEGF binding showed relatively poor effect on extracellular signal-regulated kinase in comparison to PNV action.

pp-38: Relative to control group, PNV group showed acute drop of nearly ~90% in pp38 at 1 h ($***p \leq 0.001$), followed by return to physiological level thereafter. ITZ prior treatment caused reduction of this signaling pathway at 1 h (100%, $***p \leq 0.001$) and 2 h ($*p \leq 0.05$), respectively, followed by upregulation at 5 h ($*p \leq 0.05$), and return to basal level at 24 h. Comparison of pp38 level between PNV and ITZ-PNV groups showed that the itraconazole inhibition of Flk-1 receptor to VEGF ligand reduced p38 pathway activation at 2 h ($+p \leq 0.05$), whereas increased it at 5 h (thus a rise of 55% after 3 h interval) ($+p \leq 0.05$) (Figure 7C). The findings indicate that the inhibition of Flk-1-VEGF binding modulated negatively the regulation of cellular proliferation at a period

of greatest intoxication by PNV (2 h) followed by positive modulation at 5 h, thus coinciding to onset of animals signal of recuperation of toxic manifestations.

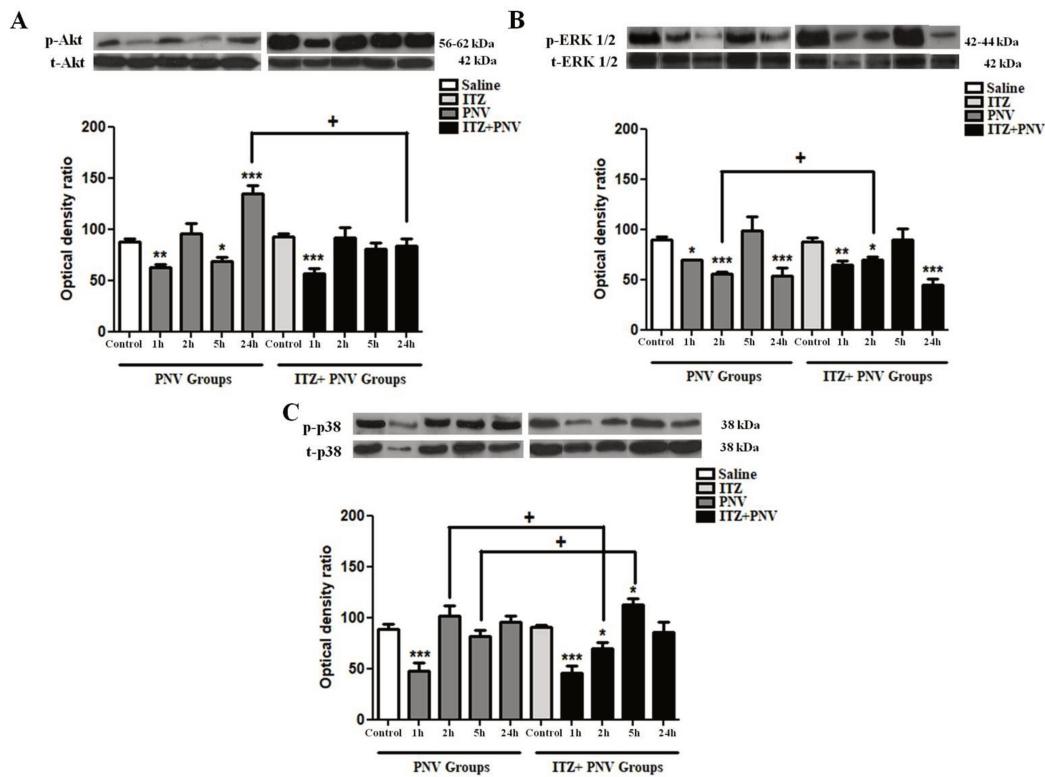


Fig. 7. Immunoblots of Akt (A), ERK 1/2 (B) and p38 (C) of hippocampi 5 h after the rats had been i.v.- injected with sterile saline or itraconazole at (controls, n = 8-12/treatment), or with 1, 2, 5 and 24 h after they had been i.v.-injected with *Phoneutria nigriventer* venom (PNV 1 h; PNV 2 h; PNV 5 h; PNV 24 h, n = 5/time) or pre-treated with itraconazole followed by venom (ITZ-PNV 1 h, ITZ-PNV 2 h, ITZ-PNV 5 h, ITZ-PNV 24 h, n = 5/time). Data are means ± SEM; one-way ANOVA followed by post-hoc Dunnett test for PNV or ITZ-PNV vs. respective controls, *p≤0.05, **p≤0.01, ***p≤0.001. Mann Whitney test was used for time-based comparisons between PNV vs. ITZ-PNV groups, +p≤0.05.

Our data indicate that the signaling pathways activated in animals that had been i.v. exposed to PNV alone were modulated in animals that previously were i.v.-treated with itraconazole and hence had the VEGF-Flk-1 binding inhibited. The data also showed an intricate balance on the biological response of VEGF likely aiming to repair homeostasis dysregulation that had been caused by *P. nigriventer* venom and enhanced in ITZ-PNV group; the homeostasis dysregulation was corroborated by enhancement of neurotoxic manifestations in animals from ITZ-PNV group, and was proved by FT-IR studies showing profound molecular alteration of hippocampal biochemical status (Mesquita-Brito et al., 2018). It seems clear that such balance is modified temporally through interacting signaling pathways of VEGFR2 (Flk-1), which at least partially, likely depends on the kinetics of circulating venom throughout the experimental period. When we compare time-by-time PNV vs. ITZ-PNV groups it is possible to detect the precise timing at which signaling modulation had occurred in function of ITZ pretreatment aggravation. At intervals of greatest toxicity (1 and 2 h), p-p38MAPK accentuated downregulation whereas p-ERK_{1/2} showed upregulation following the inhibition of VEGF-Flk-1 binding compared to PNV group; at 5 h post ITZ pretreatment, which corresponds to incipient signs of animals recovery, the upregulation of p-p38 was enhanced relative to PNV. Hence, phosphorylation of the two mitogen-activated protein kinase pathways (p38 and ERK), known for strongly mediating environmental and cellular stresses (Brockington et al., 2004), were activated at periods of great neurointoxication signs to animals (from 1 to 5 h). Our results showed that at 5 h, the inhibition of Flk-1 signaling to ligand doubled the expression of HIF-1 α suggesting hippocampal hypoxia condition and milieu stress and the momentum at which there was induction of VEGF. Herein, relative to PNV, the two MAPK pathways were activated and deactivated temporally: at 2 h p-p38 was reduced by 30%, while p-

ERK increased 17%, and at 5 h ERK pathway was 55% upregulated relative to its expression at 2 h.

Interestingly, at 24 h interval characterized by no visual sign of animals' toxicity, p-Akt was markedly downregulated. It is known that binding of VEGFR2 to ligand activates the antiapoptotic kinase Akt PI3K (see Brockinton et al, 2004); our results suggest deactivation of antiapoptotic mechanism by Akt at 24 h in ITZ-PNV hippocampus. In fact our data show significant increase of caspase 3 at 5 h and a tendency to increase at 24 h. The findings indicate that all three signaling pathways were triggered in the VEGF-mediated venom effect. However, just the AKT signaling pathway remains activated till 24 h post treatment despite subclinical toxic manifestation.

VEGFR2 signaling is not terminated in conjunction with internalization the receptor continues to signal until reaching its final destinations (Labrecque et al, 2003; Murdaca et al., 2004). The internalization of VEGFR2 is required for ERK and Akt activation, whereas p38 is active only by surface VGFR2 (Koch et al., 2011). In our results we suggest that the Akt, ERK and p38 pathways responded to PNV according to the Flk-1 response that modulated between falls and baselines. Only the cell survival pathway (Akt) showed an increase in the time of 24 hours that is search for the restoration of the normal parameters. We also suggest that prior itraconazole use partially abolished the activation of the PI3K/Akt signaling pathway (survival) and the p38 pathway (migration). The p38 pathway showed an increase at 5 h along with Flk-1 perhaps because its activation was already done on the surface of that receptor (Koch et al., 2011). Already the activation of ERK1/2 has not been altered, suggesting that itraconazole may be affecting only a subset of VEGF-responsive receptors. Studies

showed that itraconazole at doses up to 800 nM did not block ERK1/2 activation after VEGF addition (Nacev et al., 2011).

4. Conclusions

We conclude that increases of VEGF expression in this *Phoneutria nigriventer* venom model represents triggering of neuroprotection against both the BBB breakdown in hippocampus and the toxic condition of rats. Itraconazole is an inhibitor of VEGF-Flk-1 binding and its use prior PNV exposure aggravated clinical condition of rats including some lethal cases. Five hours after ITZ-PNV administration, the HIF-1 α expression, which had been decreased in PNV group, increased significantly, and in parallel exhibited synchronous increases in the expression of VEGF, Flk-1, Flt-1, Neu-N, caspase-3, occludin, β -catenin, laminin, caveolin-1 α , dynamin-2, Src and P-gp, all of them at the same 5 h interval. Such increases run in parallel with the onset of amelioration of clinical conditions of animals seen at 5 h, suggesting VEGF-Flk-1 re-binding. The prior administration of itraconazole in this PNV-induced BBB breakdown allowed identifying Flk-1 receptor and serine-threonine kinase Akt, probably through PI3K, as the main mechanism involved in cell survival induced by VEGF. Nevertheless, there was also phosphorylation of ERK at 2 h and p38 at 5 h indicating interplay among transduction pathways along the intervals examined. Likely, all pathways take part in the process of re-establishment of hippocampal homeostasis which is achieved at 24 h (Mesquita-Brito et al., 2018), interval characterized by absence of neurotoxic conditions by the animals.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Authors contribution

MHRMB conducted all the experiments, performed data analysis, participated in the writing and revision of manuscript; MCPM, ESS, GO, CS participated in different steps of experiments; LAV provided lab facilities for immunoprecipitation test; MACH designed the study, supervised the experiments, provided lab facilities, analyzed data, wrote and revised the manuscript.

Acknowledgments

The authors thank Dr. Evanguedes Kalapothakis for donation of venom and Mr. Miguel Silva for excellent animal care. This work was funded by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) grant # 2005/53625-1, Fundo de Apoio à Pesquisa e Extensão (FAEPEX- Unicamp) grant # 2679/16 and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), grant # 4547914/2014-3. M.A.C.H. is a Research Fellow from CNPq (grants # 305099/2011/6; # 310111/2016-4), G.O. is an undergraduate student with a scholarship from CNPq, # 16444/2015-7; M.H.R.M.B. is a doctoral student supported by studentship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) grant #1369978.

References

- Abbott, N.J., Patabendige, A.A., Dolman, D.E., Yusof, S.R., Begley, D.J., 2010. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis.* 37(10),13-25. <http://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.07.030>.
- Aftab, B.T., Dobromilskaya, I., Liu, J.O., Rudin, C.M., 2011. Itraconazole inhibits angiogenesis and tumor growth in non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 71, 6764-72. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-0691>.
- Astrup, J., 1982. Energy-requiring cell functions in ischemic brain. Their critical supply and possible inhibition in protective therapy. *J Neurosurg* 56 (4), 482-497.

- Badawi, Y., Ramamoorthy, P., Shi, Honglian., 2012. Hypoxia-inducible factor 1 protects hypoxic astrocytes against glutamate toxicity. ASN Neuro. 4(4), 231-41. <http://doi.org/10.1042/AN20120006>.
- Barakat, S., Demeule, M., Pilorget, A., Régina, A., Gingras, D., Baggetto, L.G., Bélieau, R., 2007. Modulation of p-glycoprotein function by caveolin-1 phosphorylation. J Neurochem. 101(1):1-8. <http://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04410.x>.
- Bucaretschi, F., Deus Reinaldo, C.R., Hyslop, S., Madureira, P.R., De Capitani, E.M., 2000. A clinico-epidemiological study of bites by spiders of the genus *Phoneutria*. Rev Inst Med Trop São Paulo. 42, 17-21.
- Bucaretschi, F., Mello, SM., Vieira, R.J., Mamoni, R.L., Blotta M.H., Antunes, E., Hyslop, S., 2008. Systemic envenomation caused by the wandering spider *Phoneutria nigriventer*, with quantification of circulating venom. Clin Toxicol 46, 885–889. <https://doi.org/10.1080/15563650802258524>.
- Bunn, H.F., Poyton, R.O., 1996. Oxygen sensing and molecular adaptation to hypoxia. Physiol Rev. 76(3), 839-885. <http://doi.org/10.1152/physrev.1996.76.3.839>.
- Burgering, B.M., Coffer, P.J., 1995. Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction. Nature 376. (6541), 599-602. <http://doi.org/10.1038/376599a0>.
- Carrer, D.P., Samonis, G., Droggi, D.I., Tsaganos, T., Pistiki, A., Giambellos-Bourboulis, E.J., 2013. Intravenous itraconazole against experimental neutropenic *Candida parapsilosis* infection: efficacy after suppression of bacterial translocation. J Infect Chemother. 19 (6), 1080-1086. <http://doi.org/10.1007/s10156-013-0627-4>.
- Cauli, B. and Hamel, E., 2018. Brain perfusion and astrocytes. Trends Neurosci. 41 (7), 409-413. <http://doi.org/10.1016/j.tins.2018.04.010>.
- Chávez, J.C., Agani, F., Pichiule, P., LaManna, J.C., 1985. Expression of hypoxia-inducible factor-1 alpha in the brain of rats during chronic hypoxia. J Appl Physiol. 89 (5), 1937-1942.
- Claesson-Welsh, L., 2016. VEGF receptor signal transduction – A brief update. Vascular Pharmacol. 86, 14-17. <http://doi.org/10.1016/j.vph.2016.05.011>.
- Cruz-Höfling, M.A., Love, S., Brook, G., Duchen, L.W., 1985. Effects of *Phoneutria nigriventer* spider venom on mouse peripheral nerve. Q. J. Exp. Physiol. 70 (4), 623-640.

- Cruz-Höfling, M.A., Tavares, J.C., Rapôso, C., 2016. *Phoneutria nigriventer* Venom. Action in the central nervous system. In: P. Gopalakrishnakone, Gerardo A. Corzo, Maria Elena de Lima, Elia Diego-García (eds.) Spider Venoms, Toxinology Series Springer. https://doi.org/10.1007/978-94-007-6389-0_1.
- De Lima, M.E., Figueiredo, S.G., Matavel, A., Nunes, K.P., Silva, C.N., Almeida, F.M., Diniz, M.R.V., Cordeiro, M.N., Stankiewicz, M., Beirão, P.S.L., 2016. *Phoneutria nigriventer* venom and toxins: a review. In: Gopalakrishnakone P, Corzo GA, De Lima ME, Diego-García E (eds.) Spider venoms, Toxinology Series Springer. https://doi.org/10.1007/978-94-007-6389-0_6.
- Demeule, M., Jodoin, J., Gigras, D., Bélieau, R., 2000. P-glycoprotein is localized in caveolae in resistant cells and in brain capillaries. FEBS Lett. 466(2-3), 219-2224.
- Dent, M.A., Segura-Anaya, E., Alva-Medina, J., Aranda-Anzaldo, A., 2010. NeuN/Fox-3 is an intrinsic component of the neuronal nuclear matrix. FEBS Letters. 584 (13), 2767-2771. <http://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.04.073>.
- Ferrara, N., 2004. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. Endocr Rev. 25 (4), 581–611.
- Ferrara, N., Gerber, H.P., Le Couter, J., 2003. The biology of VEGF and its receptors. Nat Med. 9 (6), 669–676.
- Fontana, M. D., Vital-Brazil, O., 1985. Mode of action of *Phoneutria nigriventer* spider venom at the isolated phrenic nerve-diaphragm of the rat. Braz. J. Med Biol Res. 18 (4), 557-565.
- Franke, T.F., Kaplan, D.R., Cantley, L.C., 1997. PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis. *Cell*. 88 (4), 435-437.
- Fromm, M.F., 2004. Importance of P-glycoprotein at blood-brain barriers. Trends Pharmacol Sci. 25(8), 423-429. <http://doi.org/10.1016/j.tips.2004.06.002>.
- Gampel, A., Moss, L., Jones, M.C., Brunton, V., Norman, J.C., Mellor, H., 2006. VEGF regulates the mobilization of VEGFR2/KDR from an intracellular endothelial storage compartment. Blood. 108 (8), 2624-2631. <http://doi.org/10.1182/blood-2005-12-007484>.
- Gomez, M.V., Kalapothakis, E., Guatimosim, C., Prado, M.A., 2002. *Phoneutria nigriventer* venom: a cocktail of toxins that affect ion channels. Cell. Mol. Neurobiol. 22, 579-88.

- González-Jamett, A.M., Haro-Acuña, V., Momboisse, F., Caviedes, P., Bevilacqua, J.A., Cárdenas, A.M., 2014. Dynamin-2 in nervous system disorders. *J Neurochem.* 128(2), 210-23. <http://doi.org/10.1111/jnc.12455>.
- Hallman, R., Horn, N., Selh, M., Wendler, O., Pausch, F., Sorokin, L.M., 2005. Expression and function laminins in the embryonic and mature vasculature. *Physiol Rev.* 85(3), 979-1000. <http://doi.org/10.1152/physrev.00014.2004>.
- Huang, L.E., Gu, J., Schau, M., Bunn, H.F., 1998. Regulation of hypoxia-inducible factor 1 α is mediated by an O_2 -dependent degradation domain via the ubiquitin-proteosome pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95 (14), 7987-7992.
- Jin, K., Mao, X.O., Batteur, S.P., McEachron, E., Leahy, A., Greenberg, D.A., 2001. Caspase-3 and the regulation if hypoxic neuronal death by vascular endothelial growth factor. *Neuroscience.* 108 (2), 351-358.
- Jin, K., Zhu, Y., Sun, Y., Mao, X.O., Xie, L., Greenberg, D.A., 2002. Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis *in vitro* and *in vivo*. *Proc Nat Acad Sci U.S.A.* 99 (18), 11946-11950. <https://doi.org/10.1073/pnas.182296499>.
- Jin, K.L., Mao, X.O., Greenberg, D.A., 2000. Vascular endothelial growth factor: direct neuroprotective effect *in vivo* ischemia. *Proc Nat Acad Sci U.S.A.* 97 (18), 10242-10247.
- Jodoïn, J., Demeule, M., Fenart, L., Farmer, S., Linton, K.J., Higgins, C.F., Bélineau, R., 2003. P-glycoprotein in blood-brain barrier endothelial cells:interaction and oligomerization with caveolins. *J Neurochem.* 87(4), 1010-1023.
- Koch, S., Tugues, S., Li, X., Gualandi, L., Claesson-Welsh, L., 2011. Review Article: Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Biochem J.* 437, 169-183. <http://doi.org/10.1042/BJ20110301>.
- Krock, B.L., Skuli, N., Simon, M.C., 2011. Hypoxia-induced angiogenesis: good and evil. *Genes & Cancer.* 2 (12), 1117-1133. <http://doi.org/10.1177/1947601911423654>.
- Labrecque, L., Royalm, I., Surprenant, D.S., Patterson, C., Gingras, D., Beliveau, R., 2003. Regulation of vascular endothelial growth factor receptor-2 activity by caveolin-1 and plasma membrane cholesterol. *Mol Biol Cell.* 14 (1), 334-347. <http://doi.org/10.1091/mbc.e02-07-0379>.
- Le Sueur, L.P., Collares-Buzato, C.B., Cruz-Höfling, M.A., 2004. Mechanisms involved in the blood-brain barrier increased permeability induced by *Phoneutria*

- nigriventer* spider venom in rats. Brain Res. 1027, (1-2), 38-47. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2004.08.055>.
- Le Sueur, L.P., Kalapothakis, E., Cruz-Höfling, M.A., 2003. Breakdown of the blood-brain barrier and neuropathological changes induced by *Phoneutria nigriventer* spider venom. Acta Neuropathol. 105 (2), 125-134. <https://doi.org/10.1007/s00401-002-0623-8>.
- Li, B., Xu, W., Luo, C., Gozal, D., Liu R., 2003. VEGF-induced activation of the PI3-K/Akt pathway reduces mutant SOD1-mediated motor neuron cell death. Brain Res. Mol. Brain Res. 111 (1-2), 155-164.
- Love, S., Cruz-Höfling, M. A., 1986. Acute swelling of nodes of Ranvier caused by venoms which slow inactivation of sodium channels. Acta Neuropathol. 70 (1), 1-9.
- Love, S., Cruz-Höfling, M.A., Duchen, L.W., 1986. Morphological abnormalities in myelinated nerve fibres caused by *Leiurus*, *Centruroides* and *Phoneutria* venoms and their prevention by tetrodotoxin. Q J Exp Physiol. 71, 115–122.
- Lu, D.Y., Liou, H.C., Tang, C.H., Fu, W.M., 2006. Hypoxia-induced iNOS expression in microglia is regulated by the PI3-kinase/Akt/mTOR signaling pathway and activation of hypoxia inducible factor-1alpha. Biochem Pharmacol. 72(8), 992-1000. <http://doi.org/10.1016/j.bcp.2006.06.038>.
- Ma, Y.Y., Li, K.Y., Wang, J.J., Huang, Y., Su, F.Y., 2009. Vascular endothelial growth factor acutely reduces calcium influx via inhibition of the Ca²⁺ channels in rat hippocampal neurons. J Neurosci Res. 87(2), 393-402. <http://doi.org/10.1002/jnr.21859>.
- Mendonça, M.C., Soares, E.S., Stávale, L.M., Kalapothakis, E., Cruz-Höfling, M.A., 2014. Vascular endothelial growth factor increases during blood-brain barrier-enhanced permeability caused by *Phoneutria nigriventer* spider venom. Biomed Res Int. 721968 (2014). <http://doi.org/10.1155/2014/721968>.
- Mendonça, M.C.P., Soares, E.S., Stávale, L.M., Irazusta, S.P., Cruz-Höfling, M.A., 2012. Upregulation of the vascular endothelial growth factor, Flt-1, in rat hippocampal neurons after envenoming by *Phoneutria nigriventer*; age-related modulation, Toxicon. 60, 656-64. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.05.015>.
- Mendonça, M.C.P., Soares, E.S., Stávale, L.M., Rapôso, C., Coope, A., Kalapothakis, E., Cruz-Höfling, MA., 2013. Expression of VEGF and Flk-1 and Flt-1 receptors during Blood-Brain Barrier (BBB) impairment following *Phoneutria nigriventer*

- Spider Venom exposure. Toxins. 5, 2572-88.
<https://doi.org/10.3390/toxins5122572>.
- Mesquita-Brito, M.H.R., Mendonça, M.C.P., Soares, E.S., Sakane, K.K., Cruz-Höfling, M.A., 2018. Inhibition of VEGF-Flk-1 binding induced profound biochemical alteration in the hippocampus of a rat model of BBB breakdown by spider venom. A preliminary assessment using FT-IR spectroscopy. Neurochemistry International. 120, 64-74. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2018.07.011>.
- Moens, S., Govea, J., Stapor, P.C., Cantelmo, A.R., Carmeliet, P., 2014. The multifaceted activity of VEGF in angiogenesis. Implications for therapy responses. Cytokine Growth Factor Rev. 25, 473-482.
<http://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2014.07.009>.
- Moura, J.R., Prado, M.A., Gomez, M.V., Kalapothakis, E., Diniz, C.R., Cordero, M.N., Romano-Silva, M.A., 1998. Investigation of the effect of PhTx2, from the venom of the spider *Phoneutria nigriventer*, on the release of [3H]-acetylcholine from rat cerebrocortical synaptosomes. Toxicon. 36 (8), 1189-1192.
- Muller, R.J., Buck, C.R., Smith, A.M., 1992. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. Development. 116 (1), 201–211.
- Murdaca, J., Treins, C., Monthouel-Kartmann, M. N., Pontier-Bres, R., Kumar, S., Van Obberghen, E., Giorgetti-Peraldi, S., 2004. Grb10 prevents Nedd4-mediated vascular endothelial growth factor receptor-2 degradation. J. Biol. Chem. 279, 26754–26761. <http://doi.org/10.1074/jbc.M311802200>.
- Nacev, B.A., Grassi, P., Dell, A., Haslam, S.M., Liu, J.O., 2011. The antifungal drug itraconazole inhibits vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2) glycosylation, trafficking, and signaling in endothelial cells. J Biol Chem. 286, 44045-56. <http://doi.org/10.1074/jbc.M111.278754>.
- Nag, S., Manias, J.L., Stewart, D.J., 2009. Expression of endothelial phosphorylated caveolin-1 is increased in brain injury. Neuropathol Appl Neurobiol. 35, 417-26.
<http://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2008.01009.x>.
- Nassoy, P., Lamaze, C., 2012. Stressing caveolae new role in cell mechanics. Trends Cell Biol. 22(7), 381-9. <http://doi.org/10.1016/j.tcb.2012.04.007>.
- Park, H., Go, Y.M., Darji, R., Choi, J.W., Lisanti, M.P., Maland, M.C., Jo, H., 2000. Caveolin-1 regulates shear stress-dependent activation of extracellular signal-regulated kinase. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 278, H1285-H1293.
<http://doi.org/10.1152/ajpheart.2000.278.4.H1285>.

- Pattel, H.H., Murray, F., Insel, P.A., 2008. Caveolae as organizers of pharmacologically relevant signal transduction molecules. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 48: 359–91. <http://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.48.121506.124841>.
- Paxinos, G., Watson, C., 1986. The rat brain in stereotaxic coordinates. San Diego, USA: Acad Press.
- Pelkmans, L., Helenius, A., 2002. Endocytosis via caveolae. *Traffic* 3, 311-20.
- Rapôso, C., Björklund, U., Kalaphothakis, E., Biber, B., Cruz-Höfling, M.A., Hansson, E., 2016. Neuropharmacological effects of *Phoneutria nigriventer* on astrocytes. *Neurochem. Int.* 96, 13-23. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2016.04.005>.
- Rapôso, C., Odorissi, P.A., Oliveira, A.L., Aoyama, H., Ferreira, C.V., Verinaud, L., Fontana, K., Ruela-de-Sousa, R.R., Cruz-Höfling, M.A., 2012. Effect of *Phoneutria nigriventer* venom on the expression of junctional protein and P-gp efflux pump function in the blood-brain barrier. *Neurochem Res.* 37 (9), 1967-1981. <http://doi.org/10.1007/s11064-012-0817-y>.
- Rapôso, C., Zago, G.M., Silva, G.H., Cruz-Höfling, M.A., 2007. Acute blood-brain barrier permeabilization in rats after systemic *Phoneutria nigriventer* venom. *Brain Res.* 1149, 18-29. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.02.086>.
- Rapôso, C., Odorissi, P.A., Savioli, S.F., Hell, R.C., Simões G.F., Ruela-de-Sousa, R.R., de Oliveira, A.L., da Cruz-Höfling, M.A., 2014. Triggering of protection mechanism against *Phoneutria nigriventer* spider venom in the brain. *PLoS One.* 9(9), e107292. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0107292>.
- Roberts, W.G., Palade, G.E., 1997. Neovasculature induced by vascular endothelial growth factor is fenestrated. *Cancer Res.* 57 (4), 765–772. <https://doi.org/10.1080/15563650802258524>.
- Roitbak, T., Surviladze, Z., Cunningham, L.A., 2011. Continuous expression of HIF-1 α in neural stem/progenitor cells. *Cell Mol Neurobiol.* 31(1), 119-33. <http://doi.org/10.1007/s10571-010-9561-5>.
- Romano-Silva, M.A., Ribeiro-Santos, R., Ribeiro, A.M., Gomez, M.V., Diniz, C.R., Cordeiro, M.N., Brammer, M.J., 1993. Rat cortical synaptosomes have more than one mechanism for Ca²⁺ entry linked to rapid glutamate release: studies using the *Phoneutria nigriventer* toxin PhTX2 and potassium depolarization. *Biochem J.* 296(Pt 2), 313-319.

- Rosenstein, J.M., Krum, J.M., 2004. New roles for VEGF in nervous tissue beyond blood vessels. *Exp Neurol.* 2004; 187: 246–53. <http://doi.org/10.1016/j.expneurol.2004.01.022>.
- Roskoski Jr, R., 2015. Src protein-tyrosine kinase structure, mechanism, and small molecule inhibitors. *Pharmacol Res.* 94, 9-25. <http://doi.org/10.1016/j.phrs.2015.01.003>.
- Rothberg, K.F., Heuser, J.E., Donzell, W.C., Ying, Y.S., Glenney, J.R., Anderson, R.G., 1992. Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell.* 68 (4), 673-682.
- Roux, P.P., Blenis, J., 2004. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev.* 68, 320-344. <http://doi.org/10.1128/MMBR.68.2.320-344>.
- Savettieri, G., Di Liegro, I., Catania, C., Licata, L., Pitarresi, G.L., D'Agostino, S., Schiera, G., De Caro, V., Giandalia, G., Giannola, L.I., Cestelli, A., 2000. Neurons and ECM regulate occludin localization in brain endothelial cells. *Neuroreport.* 11(5), 1081-1084.
- Schinkel, A.H., Jonker, J.W., 2003. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Adv Drug Deliv Rev.* 55, 3–29.
- Shajahan, A.N., Timblin, B.K., Sandoval, R., Tiruppathi, C., Malik, A.B., Minshall, R.D., 2004b. Role of Src-induced dynamin-2 phosphorylation in caveolae-mediated endocytosis in endothelial cells. *Biol Chem.* 279(19), 20392–400. <http://doi.org/10.1074/jbc.M308710200>.
- Shalaby, F., Rossant, J., Yamaguchi, T.P., Gertsenstein, M., Wu, X.F., Breitman, M.L., Schuh, A.C., 1995. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature.* 376 (6535), 62–6.
- Shibuyia, M., Yamaguchi, S., Yamane, A., Ikeda, T., Tojo A., Matsushime H., Sato M., 1990. Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase gene (Flt) closely related to the fms family. *Oncogenese.* 5 (4), 519-524.
- Silva, C.N.P., Lomeo, R.S., Torres, F.S., Borges, M.H., Nascimento, M.C., Rodrigues Mesquita-Brito, M.H., Rapôso, C., Pimenta, A.M.C., da Cruz-Höfling, M.A., Gomes, D.A., de Lima, M.E., 2018. PnTx2-6 (or δ-CNTX-Pn2a), a toxin from *Phoneutria nigriventer* spider venom releases l-glutamate from rat brain synaptosomes involving Na⁺ and Ca²⁺ channels and changes protein expression at

- the blood-brain barrier. *Toxicon.* 150, 280-288.
<http://doi.org/10.1016/j.neuint.2018.07.011>.
- Sixt, M., Engelhardt, B., Pausch, F., Hallmann, R., Wendler, O., Sorokin, L.M., 2001. Endothelial cell laminin isoforms, laminins 8 and 10, play decisive roles in T cell recruitment across the blood-brain barrier in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Cell Biol.* 153(5), 933-946.
- Sköld, M.K., Risling, M., Holmin, S., 2006. Inhibition of vascular endothelial growth factor receptor 2 activity in experimental brain contusions aggravates injury outcome and leads to early increased neuronal and glial degeneration. *Eur J Neurosci.* 23, 21-34. <http://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04527.x>.
- Snyder, J.S., Ferrante, S.C., Cameron, H.A., 2012. Late maturation of adult-born neurons in the temporal dentate gyrus. *Plos One.* 7(11), 1-8.
<http://doi.org/10.1371/journal.pone.0048757>.
- Soares, E.S., Mendonça, M.C., da Cruz-Höfling, M.A., 2015. eNOS uncoupling in the cerebellum after BBB disruption by exposure to *Phoneutria nigriventer* spider venom. *Toxicon.* 104, 7-13. <http://doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.07.009>.
- Soares, E.S., Mendonça, M.C., da Cruz-Höfling, M.A., 2016. Caveolae as target for *Phoneutria nigriventer* spider venom. *Neurotoxicology.* 54, 111-118.
<http://doi.org/10.1016/j.neuro.2016.04.005>.
- Soares, E.S., Mendonça, M.C., Irazusta, S.P., Coope, A., Stávale, L.M., da Cruz-Höfling, M.A., 2014. Evidences of endocytosis via caveole following blood-brain barrier breakdown by *Phoneutria nigriventer* spider venom. *Toxicol Lett.* 229(3): 415-422. <http://doi.org/10.1016/j.toxlet.2014.07.018>.
- Solon, C.S., Franci, D., Ignacio-Souza, L.M., Romanatto, T., Roman, E.A., Arruda A.P., Morari, J., Torsoni, A.S., Carneiro, E.M., Velloso, L.A., 2012. Taurine enhances the anorexigenic effects of insulin in the hypothalamus of rats. *Amino Acids.* 42 (42), 2403-2410. <http://doi.org/10.1007/s00726-011-1045-5>.
- Sonneaux, P., Martinive, P., DeWever, J., Batova, A., Daneau, G., Pelat, M., Ghisdal, P., Gregore, V., Dessy, C., Balligand, J.L., Feron, O., 2004. Caveolin-1 expression is critical for vascular endothelial growth factor-induced ischemic hindlimb collateralization and nitric oxide-mediated angiogenesis. *Circ Res.* 95 (2), 154-161. <http://doi.org/10.1161/01.RES.0000136344.27825.72>.
- Stávale, L.M., Soares, E.S., Mendonça, M.C.P., Irazusta, S.P., Cruz-Höfling, M.A., 2013. Temporal relationship between aquaporin-4 and glial fibrillary acidic protein

- in cerebellum of neonate and adult rats administered a BBB disrupting spider venom. *Toxicon*. 66, 37-46. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.01.026>.
- Stuart, B.H., 2004. Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications. England: John Wiley & Sons.
- Sun, F., Guo, X.. 2005. Molecular and cellular mechanisms of neuroprotection by vascular endothelial growth factor. *J Neurosci Res.* 79, 180–84. <http://doi.org/10.1002/jnr.20321>.
- Sun, G., Ma, Y., 2013. Vascular endothelial growth factor modulates voltage-gated Na⁺ channel properties and depresses action potential firing in cultured rat hippocampal neurons. *Biol Pharm Bull.* 36 (4), 548–555.
- Sun, J., Sha, B., Zhou, W., Yang, Y., 2010. VEGF-mediated angiogenesis stimulates neural stem cell proliferation and differentiation in the premature brain. *Biochem Biophys Res Commun.* 394 (1), 146-152. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.02.132>.
- Thomsen, M.S., Routhe, L.J., Moos, T., 2017. The vascular basement membrane in the healthy and pathological brain. *J Cereb Blood Flow Metab.* 37 (10), 3300-3317. <http://doi.org/10.1177/0271678X17722436>.
- Tilling, T., Korte, D., Hoheisel, D., Galla, H.J., 1998. Basement membrane proteins influence brain capillary endothelial barrier function in vitro. *J Neurochem.* 71(30),1151-1157.
- Tolosa, L., Mir, M., Asensio, V.J., Olmos, G., Llado, J., 2008. Vascular endothelial growth factor protects spinal cord motoneurons against glutamate-induced excitotoxicity via phosphatidylinositol 3-kinase. *J. Neurochem.* 105 (4), 1080-109. <http://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.05206.x>.
- Tovar-Y-Romo, L.B., Tapia, R., 2010. VEGF protects spinal motor neurons against chronic excitotoxic degeneration in vivo by activation of PI3-K pathway and inhibition of p38MAPK. *J. Neurochem.* 115 (5), 1090-1101. <http://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.06766.x>.
- Van Den Bosch, L., Storkebaum, E., Vleminckx, V., Moons, L., Vanopdenbosch, L., Scheveneels, W., Carmeliet, P., Robberecht, W., 2004. Effects of vascular endothelial growth factor (VEGF) on motor neuron degeneration. *Neurobiol. Dis.* 17(1), 21- 28. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2004.06.004>.
- Velloso, L.A., Carneiro, E.M., Crepaldi, S.C., Boschero, A.C., Saad, M.J., 1995. Glucose- and insulin-induced phosphorylation of the insulin receptor and its

- primary substrates IRS-1 and IRS-2 in rat pancreatic islets. FEBS Lett. 377 (3), 353 – 357. [http://doi.org/10.1016/0014-5793\(95\)01370-9](http://doi.org/10.1016/0014-5793(95)01370-9).
- Wick, A., Wick, W., Waltenberger, J., Weller, M., Dichgans, J., Schulz, J.B., 2002. Neuroprotection by Hypoxic Preconditioning Requires Sequential Activation of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor and Akt. *J Neurosci.* 22(15), 6401- 7. <http://doi.org/20026672>.
- Willot, E., Balda, M.S., Heintzelman, M., Jameson, A., Anderson, M.J., 1992. Localization and differential expression of two isoforms of the tight junction protein ZO-1. *Am J Physiol.* 262, C1119-1124. <http://doi.org/10.1152/ajpcell.1992.262.5.C1119>.
- Yao, Q., Chen, J., Cao, H., Orth, J.D., McCaffery, J.M., Stan, R.V., McNiven, M.A., 2005. Caveolin-1 interacts directly with dynamin-2. *J Mol Biol* 348(2): 491-501. <http://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.02.003>.
- Yao, Y., Chen, Z.L., Norris, E.H., Strickland, S., 2014. Astrocytic laminin regulates pericyte differentiation and maintains blood-brain barrier integrity. *Nat Commun.* 5, 3413. <http://doi.org/10.1038/ncomms4413>.
- Zhong, Y., Smart,E.J.,Weksler,B., Couraud,P.O.,Hennig,B.,and Toborek,M., 2008. Caveolin-1 regulates human immunodeficiency virus-1Tat-induced alterations of tight junction protein expression via modulation of the Ras signaling. *J. Neurosci.* 28, 7788–7796. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0061-08.2008>.
- Zhu, Y., Jin, K., Mao, X.O., Greenberg, D.A., 2003. Vascular endothelial growth factor promotes proliferation of cortical neuron precursors by regulating E2F expression. *FASEB J.* 17 (2), 186-193. <https://doi.org/10.1096/fj.02-0515com>.

CAPÍTULO III

Efeitos *in vitro* do PNV e Itraconazol em culturas primárias de astrócitos

4.1 Itraconazol e PNV inibem o crescimento de culturas primárias de astróscitos corticais

A análise da curva de sobrevivência celular mostra que, tanto o itraconazol como o PNV atuam inibindo a reprodução de astrócitos corticais. Desta forma, podemos observar redução no número total de astrócitos após 2 horas de tratamento, sendo essa redução significativa no grupo submetido ao tratamento com itraconazol + PNV (Grupo Controle, $15 \times 10^4 \pm 5 \times 10^3$; Grupo Itraconazol + PNV, $12 \times 10^4 \pm 7 \times 10^3$, $p < 0,05$ – Figura 10A e D). Após 5 horas de tratamento podemos observar que a redução foi mais evidente no grupo PNV (Grupo Controle, $16 \times 10^4 \pm 22 \times 10^3$; Grupo PNV, $86 \times 10^4 \pm 3 \times 10^3$, $p < 0,001$ – Figura 8A e B) e no grupo itraconazol + PNV (Grupo Controle, $16 \times 10^4 \pm 22 \times 10^3$; Grupo Itraconazol + PNV, $83 \times 10^4 \pm 3 \times 10^3$, $p < 0,001$ – Figura 8A e D). Após 24 horas observamos redução no número de astrócitos em todos os grupos tratados (Grupo Controle, $16 \times 10^4 \pm 13 \times 10^3$; Grupo Itraconazol, $85 \times 10^4 \pm 7 \times 10^3$, $p < 0,001$; Grupo Controle, $16 \times 10^4 \pm 13 \times 10^3$; Grupo PNV, $77 \times 10^4 \pm 2 \times 10^3$, $p < 0,001$ e Grupo Controle, $16 \times 10^4 \pm 13 \times 10^3$; Grupo Itraconazol + PNV, $71 \times 10^4 \pm 2 \times 10^3$, $p < 0,001$, Figura 8).

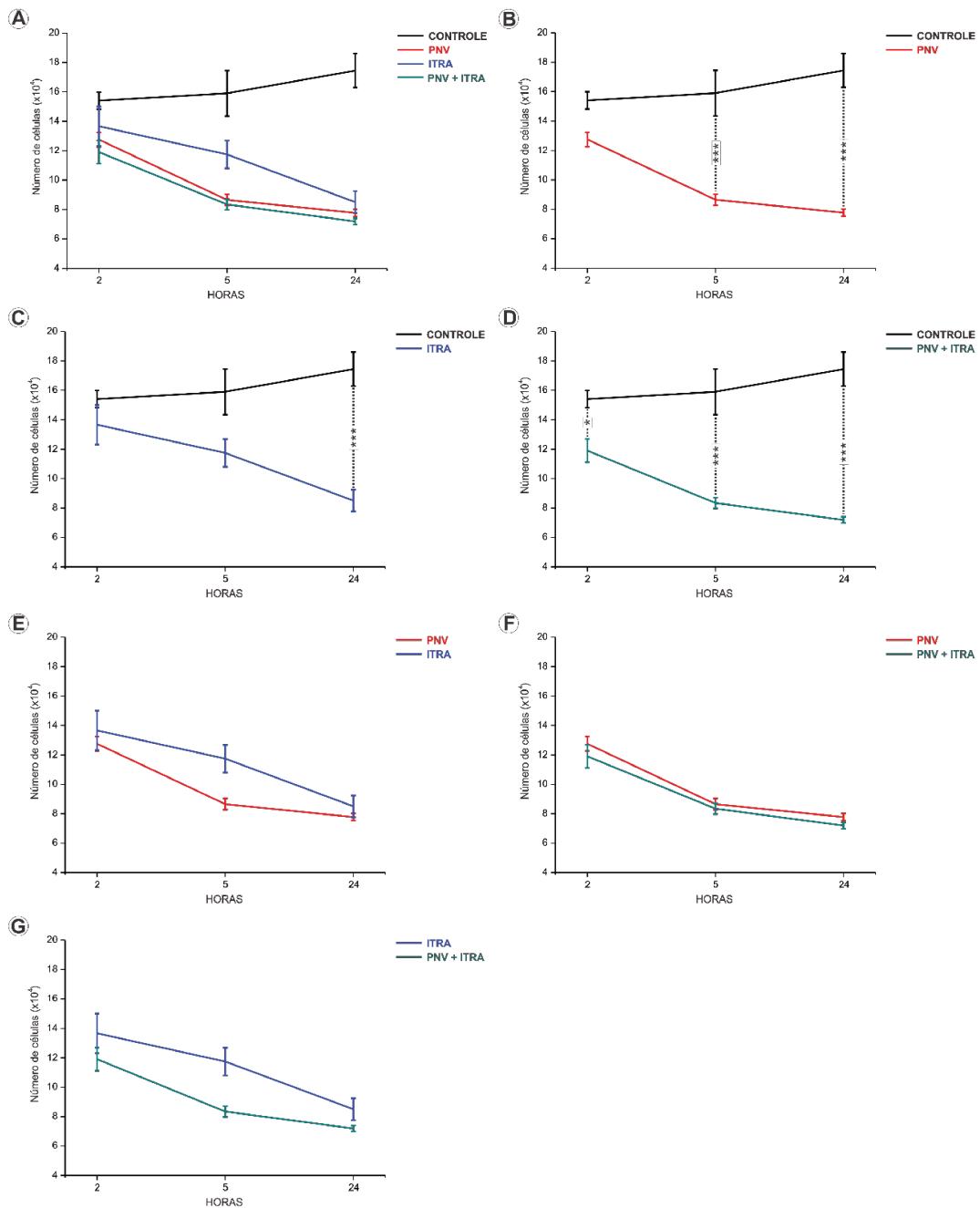


Figura 8. Curvas de sobrevivência celular. **(A)** Representa as curvas de sobrevivência celular de todos os grupos estudados; **(B)** Comparaçao das curvas de sobrevivência celular entre o grupo controle e o grupo tratado com PNV; **(C)** Comparaçao das curvas de sobrevivência celular entre o grupo controle e o grupo tratado com itraconazol; **(D)** Comparaçao das curvas de sobrevivência celular entre o grupo controle e o grupo tratado com itraconazol + PNV; **(E)** Comparaçao das curvas de sobrevivência celular entre o grupo tratado com itraconazol e o grupo tratado com PNV; **(F)** Comparaçao das curvas de sobrevivência celular entre o grupo tratado com PNV e o grupo tratado com itraconazol + PNV; **(G)** Comparaçao das curvas de sobrevivência celular entre o grupo tratado com Itraconazol e o grupo tratado com itraconazol + PNV.

4.2 Itraconazol e PNV induz o aumento da reatividade astroglial

As Figuras 9, 10 e 11 mostram a expressão de GFAP em células astrogliais submetidas ao tratamento com Itraconazol e PNV após 2, 5 e 24 horas, respectivamente.

Após 2 horas de tratamento podemos observar um aumento significativo da reatividade em astrócitos tratados com Itraconazol e PNV (Grupo Controle, $5,62 \times 10^5 \pm 3,63 \times 10^4$; Grupo Itraconazol, $9,06 \times 10^5 \pm 1,18 \times 10^5$, $p < 0,01$; Grupo Controle, $5,62 \times 10^5 \pm 3,63 \times 10^4$; Grupo PNV, $9,21 \times 10^5 \pm 5,09 \times 10^4$, $p < 0,01$; Grupo Controle, $5,62 \times 10^5 \pm 3,63 \times 10^4$; Grupo Itraconazol + PNV, $8,17 \times 10^5 \pm 5,63 \times 10^4$, $p < 0,05$ – Figura 9).

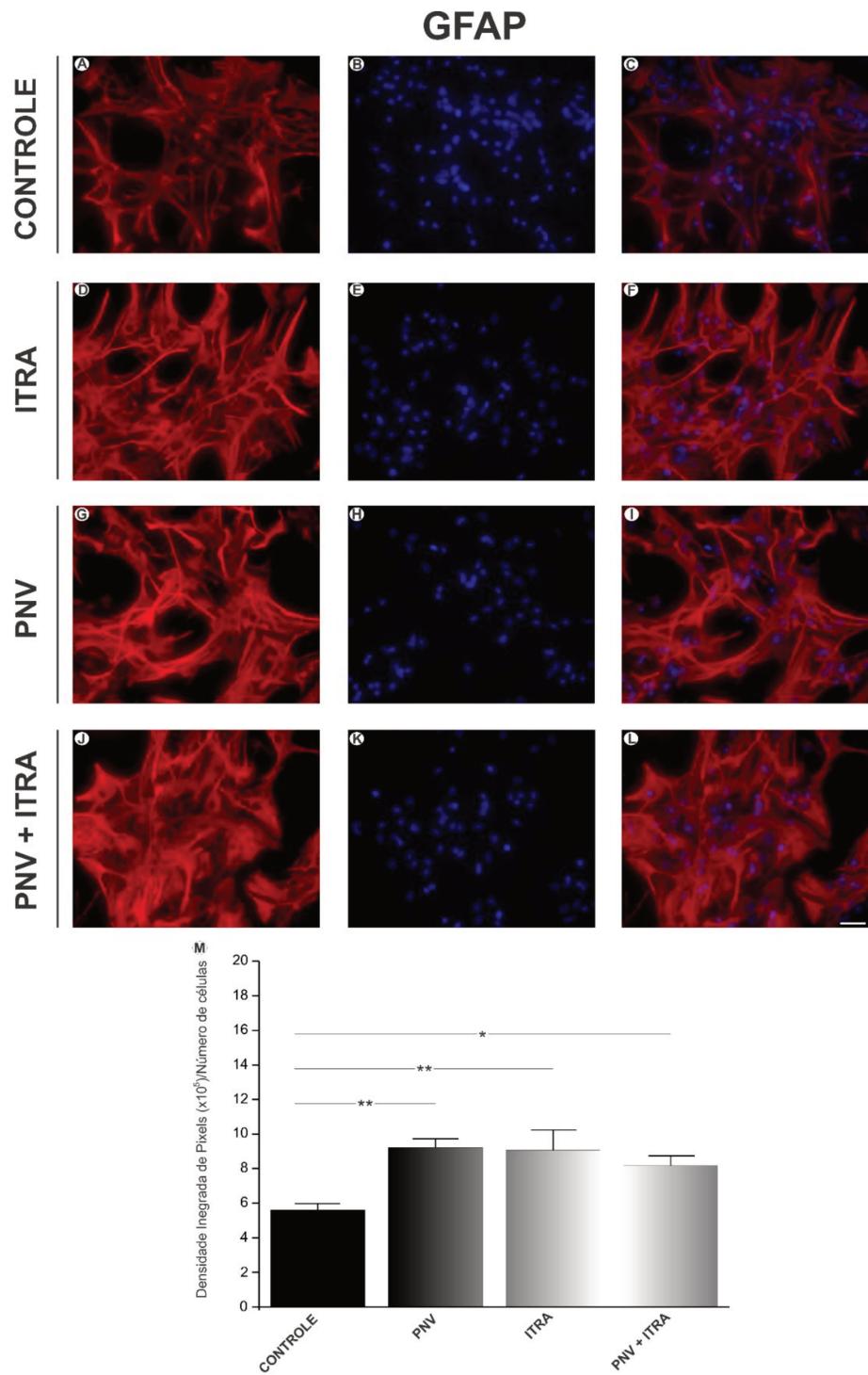


Figura 9. Imunomarcação anti-GFAP e DAPI em grupos tratados durante 2 horas. Figuras A, B e C mostrando astrócitos sem tratamento, definidas como grupo controle. Figuras D, E e F, mostrando astrócitos tratados com PNV. Figuras G, H e I mostrando astrócitos tratados com Itraconazol. Figuras J, K e L mostrando astrócitos tratados com Itraconazol + PNV. Figura M, análise quantitativa da densidade integrada de pixels entre os grupos das linhagens. Escala = 50 μ m.

Observamos, também, que após 5 horas esse aumento foi mais significativo (Grupo Controle, $6,31 \times 10^5 \pm 1,01 \times 10^5$; Grupo Itraconazol, $9,18 \times 10^5 \pm 9,08 \times 10^4$, $p<0,05$; Grupo Controle, $6,31 \times 10^5 \pm 1,01 \times 10^5$; Grupo PNV, $10,64 \times 10^5 \pm 8,21 \times 10^4$, $p<0,01$; Grupo Controle, $6,31 \times 10^5 \pm 1,01 \times 10^5$; Grupo Itraconazol + PNV, $13,38 \times 10^5 \pm 9,89 \times 10^4$, $p<0,001$ – Figura 10).

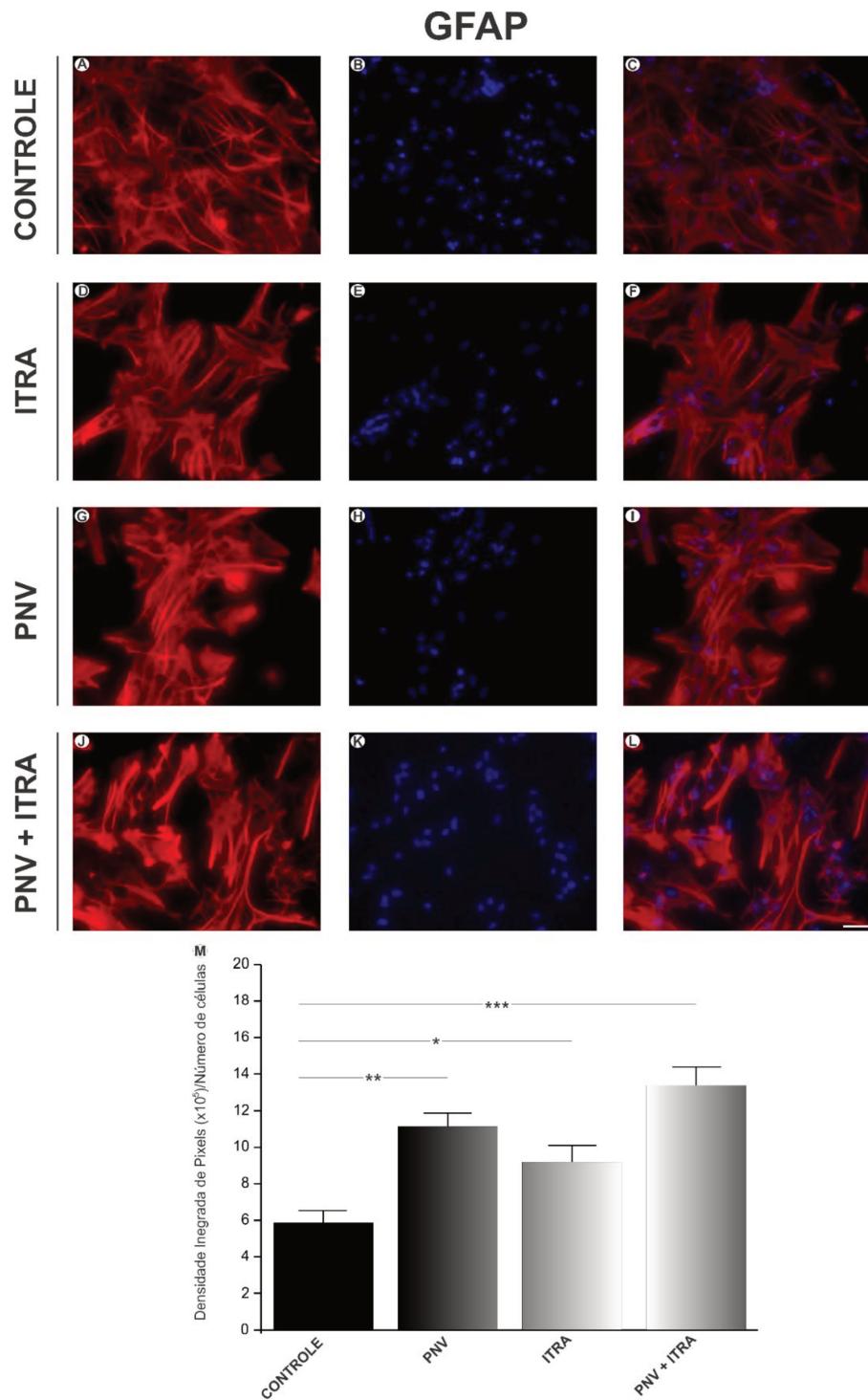


Figura 10. Imunomarcação anti-GFAP e DAPI em grupos tratados durante 5 horas. Figuras A, B e C mostrando astrócitos sem tratamento, definidas como grupo controle. Figuras D, E e F, mostrando astrócitos tratados com PNV. Figuras G, H e I mostrando astrócitos tratados com Itraconazol. Figuras J, K e L mostrando astrócitos tratados com Itraconazol + PNV. Figura M, análise quantitativa da densidade integrada de pixels entre os grupos das linhagens. Escala = 50µm.

Após 24 horas de tratamento observamos que a reatividade glial foi ainda mais significativa nos grupos tratados (Grupo Controle, $5,63 \times 10^5 \pm 5,63 \times 10^5$; Grupo Itraconazol, $9,48 \times 10^5 \pm 8,01 \times 10^4$, $p < 0,05$; Grupo Controle, $5,63 \times 10^5 \pm 5,63 \times 10^5$; Grupo PNV, $11,17 \times 10^5 \pm 1,48 \times 10^5$, $p < 0,001$; Grupo Controle, $5,63 \times 10^5 \pm 5,63 \times 10^5$; Grupo Itraconazol + PNV, $14,74 \times 10^5 \pm 1,09 \times 10^5$, $p < 0,001$ – Figura 11).

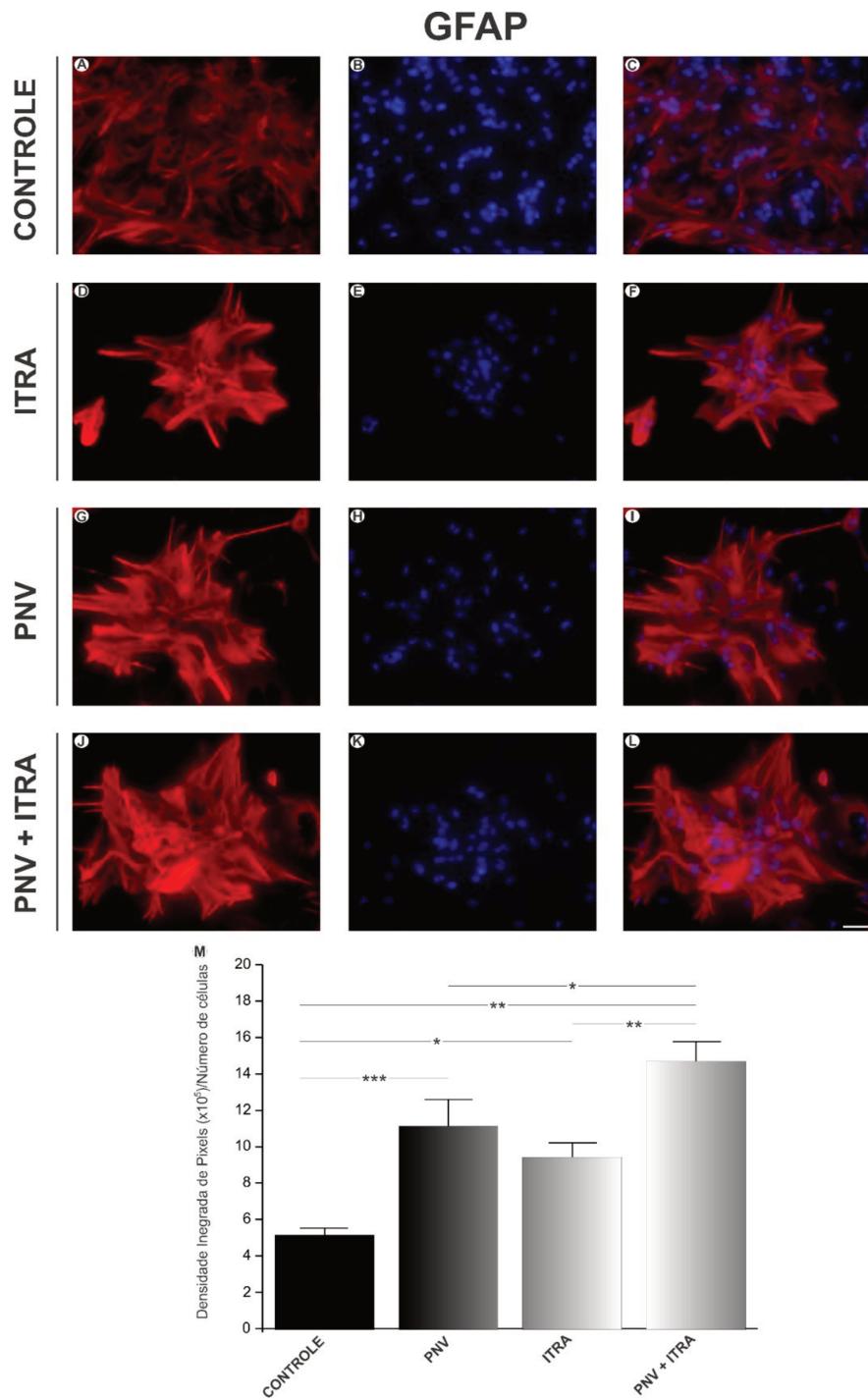


Figura 11. Imunomarcação anti-GFAP e DAPI em grupos tratados durante 24 horas. Figuras A, B e C mostrando astrócitos sem tratamento, definidas como grupo controle. Figuras D, E e F, mostrando astrócitos tratados com PNV. Figuras G, H e I mostrando astrócitos tratados com Itraconazol. Figuras J, K e L mostrando astrócitos tratados com Itraconazol + PNV. Figura M, análise quantitativa da densidade integrada de pixels entre os grupos das linhagens. Escala = 50µm.

4.3 Tratamento com Itraconazol + PNV induz ao aumento da expressão de VEGF em astrócitos corticais

As Figuras 12, 13 e 14 mostram a expressão de VEGF em células astrogliais submetidas ao tratamento com Itraconazol e PNV após 2, 5 e 24 horas, respectivamente.

Após 2 horas de tratamento não observamos diferença na expressão de VGEF em astrócitos tratados com Itraconazol e PNV (Grupo Controle, $38,38 \times 10^4 \pm 72,60 \times 10^3$; Grupo Itraconazol, $42,30 \times 10^4 \pm 29,24 \times 10^3$, $p>0,05$: Grupo Controle, $38,38 \times 10^4 \pm 72,60 \times 10^3$; Grupo PNV, $42,97 \times 10^4 \pm 70,05 \times 10^3$, $p>0,05$: Grupo Controle, $38,38 \times 10^4 \pm 72,60 \times 10^3$; Grupo Itraconazol + PNV, $49,09 \times 10^4 \pm 34,96 \times 10^3$, $p>0,05$ – Figura 12).

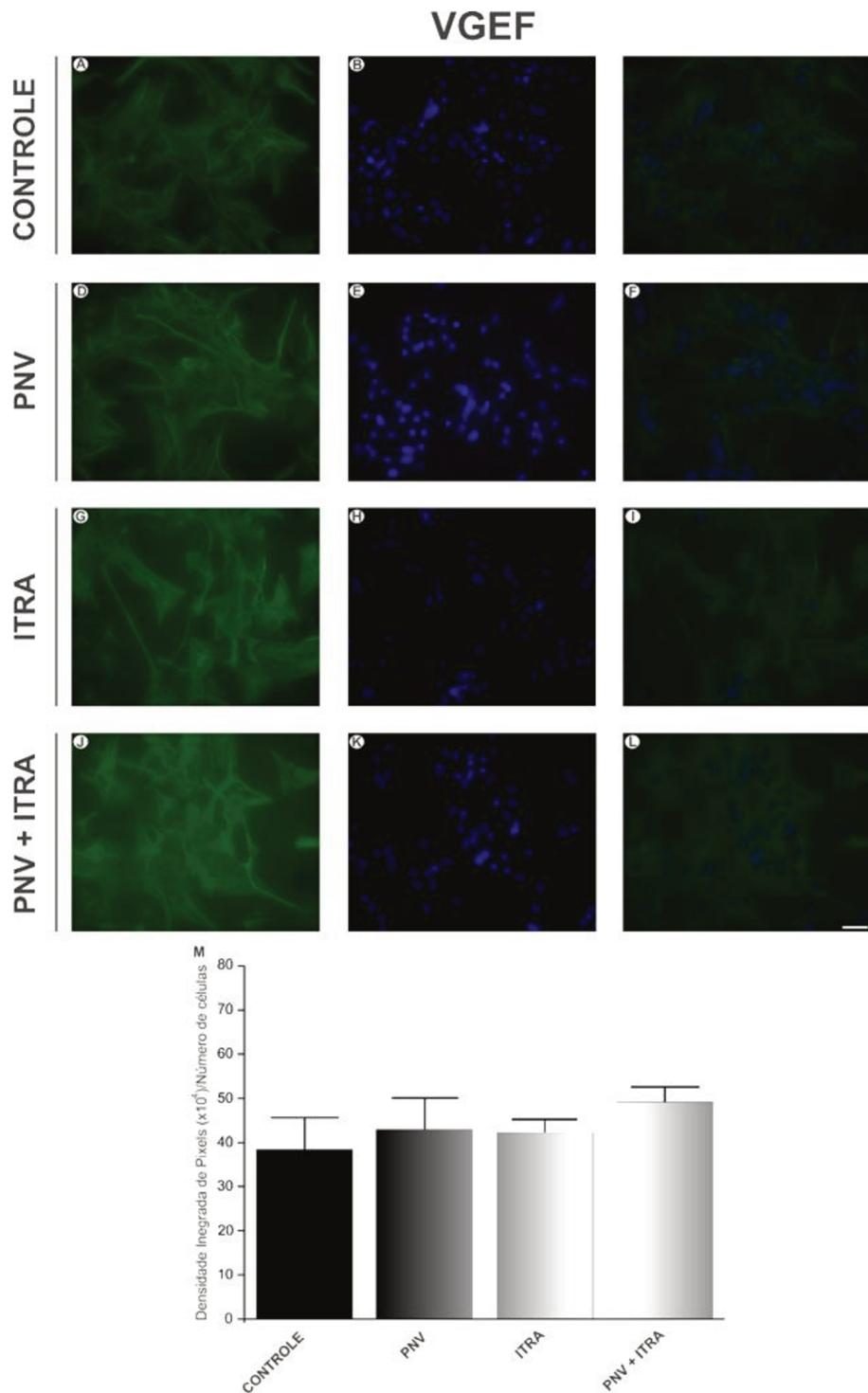


Figura 12. Imunomarcação anti-VEGF e DAPI em grupos tratados durante 2 horas. Figuras A, B e C mostrando astrócitos sem tratamento, definidas como grupo controle. Figuras D, E e F, mostrando astrócitos tratados com PNV. Figuras G, H e I mostrando astrócitos tratados com Itraconazol. Figuras J, K e L mostrando astrócitos tratados com Itraconazol + PNV. Figura M, análise quantitativa da densidade integrada de pixels entre os grupos das linhagens. Escala = 50μm.

Cinco horas após o início do tratamento podemos observar um aumento significativo na expressão de VEGF em astrócitos tratados com Itraconazol + PNV (Grupo Controle, $39,16 \times 10^4 \pm 62,6 \times 10^3$; Grupo Itraconazol + PNV, $61,80 \times 10^4 \pm 62,88 \times 10^3$, $p<0,01$ – Figura 12). Nos demais grupos não observamos diferenças estatísticas (Grupo Controle, $39,16 \times 10^4 \pm 62,6 \times 10^3$; Grupo Itraconazol, $49,07 \times 10^4 \pm 47,17 \times 10^3$, $p>0,05$ e Grupo Controle, $39,16 \times 10^4 \pm 62,6 \times 10^3$; Grupo PNV, $44,87 \times 10^4 \pm 55,65 \times 10^3$, $p>0,05$ – Figura 12).

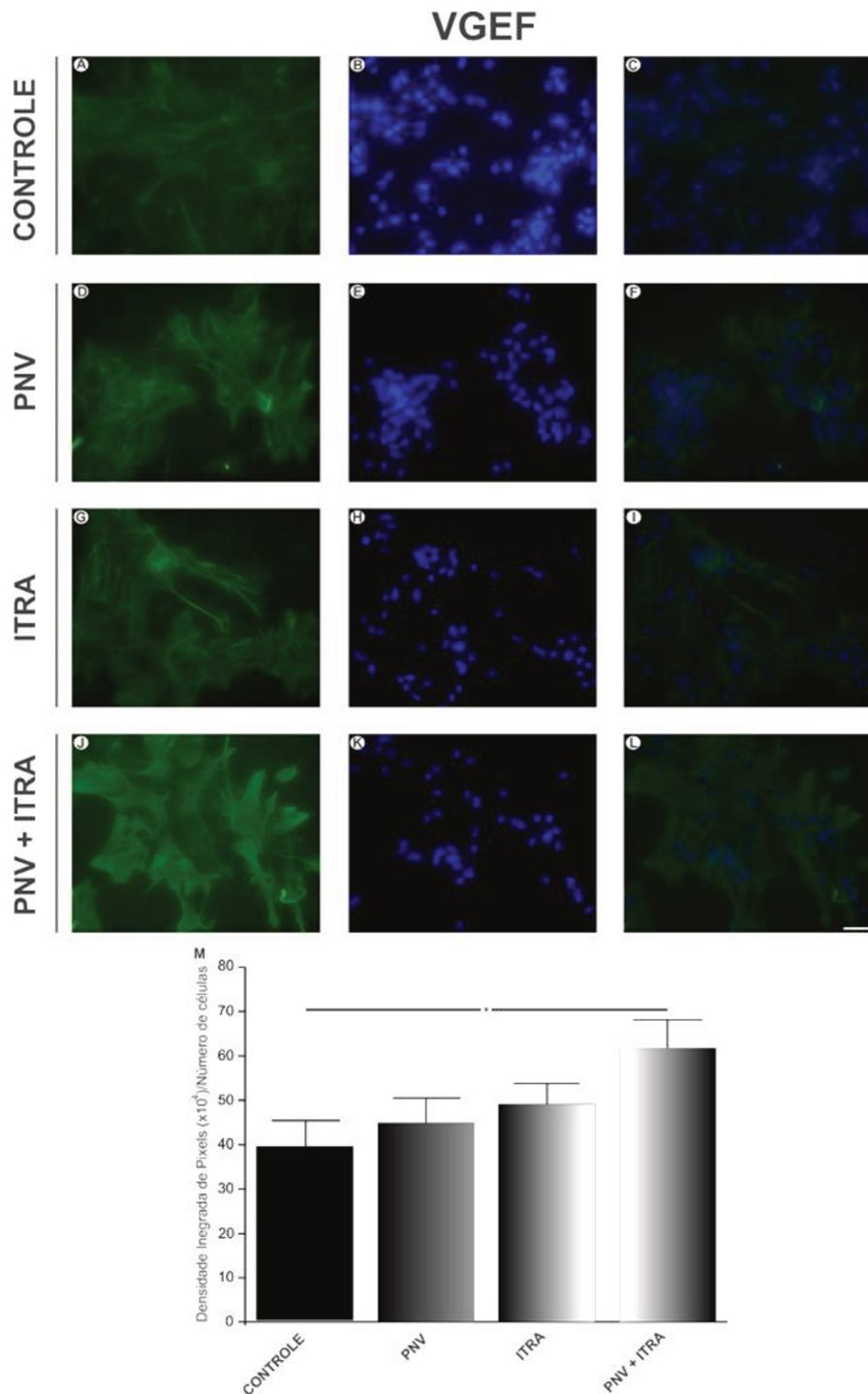


Figura 13. Imunomarcação anti-VEGF e DAPI em grupos tratados durante 5 horas. Figuras A, B e C mostrando astrócitos sem tratamento, definidas como grupo controle. Figuras D, E e F, mostrando astrócitos tratados com PNV. Figuras G, H e I mostrando astrócitos tratados com Itraconazol. Figuras J, K e L mostrando astrócitos tratados com Itraconazol + PNV. Figura M, análise quantitativa da densidade integrada de pixels entre os grupos das linhagens. Escala = 50µm.

Após 24 h do início do tratamento podemos, também, observar um aumento significativo na expressão de VEGF em astrócitos tratados com Itraconazol + PNV (Grupo Controle, $38,79 \times 10^4 \pm 65,30 \times 10^3$; Grupo Itraconazol + PNV, $67,61 \times 10^4 \pm 57,64 \times 10^3$, $p<0,01$ – Figura 14). Nos demais grupos não observamos diferenças estatísticas (Grupo Controle, $38,79 \times 10^4 \pm 65,30 \times 10^3$; Grupo Itraconazol, $54,34 \times 10^4 \pm 50,66 \times 10^3$, $p>0,05$ e Grupo Controle, $38,79 \times 10^4 \pm 65,30 \times 10^3$; Grupo PNV, $59,11 \times 10^4 \pm 71,63 \times 10^3$, $p>0,05$ – Figura 14).

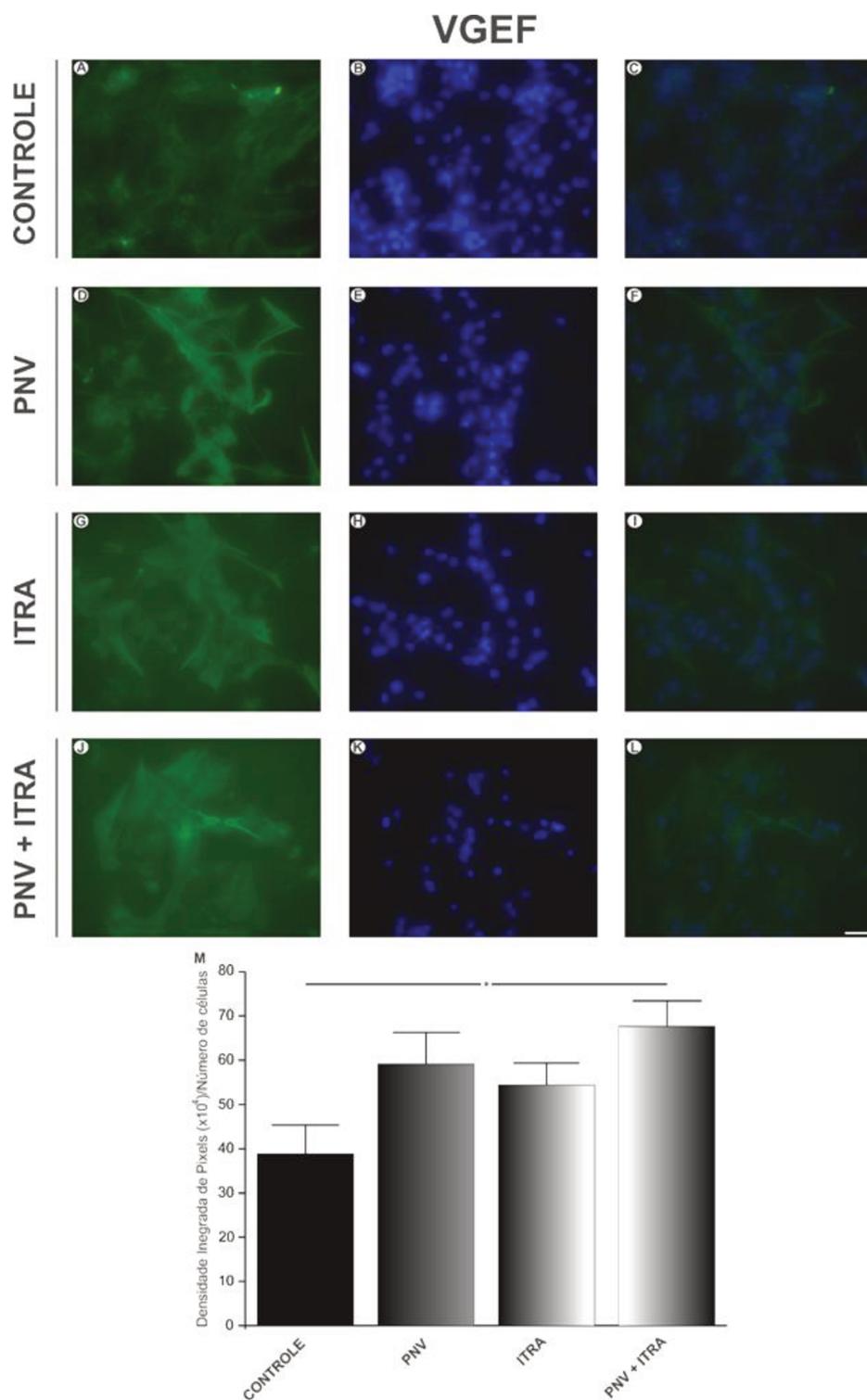


Figura 14. Imunomarcação anti-VGEF e DAPI em grupos tratados durante 24 horas. Figuras A, B e C mostrando astrócitos sem tratamento, definidas como grupo controle. Figuras D, E e F, mostrando astrócitos tratados com PNV. Figuras G, H e I mostrando astrócitos tratados com Itraconazol. Figuras J, K e L mostrando astrócitos tratados com Itraconazol + PNV. Figura M, análise quantitativa da densidade integrada de pixels entre os grupos das linhagens. Escala = 50 μ m.

5.0 DISCUSSÃO GERAL

Os venenos de aranhas são fontes inestimáveis para pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos [Vassilevsky et al., 2010]. O estudo do veneno da aranha *Phoneutria nigriventer* (PNV) por pesquisadores, principalmente brasileiros, revelou a riqueza de toxinas na sua composição, as quais mostram ações importantes em sistemas biológicos de insetos e mamíferos, com potencial para aplicação na indústria farmacêutica e agrícola [para revisão consultar de Lima et al., 2016]. Muito embora no desenvolvimento de novas drogas seja essencial o estudo da estrutura-função e mecanismo de ação das toxinas, é o veneno bruto, e não as toxinas isoladas, que é inoculado em acidentes com animais peçonhentos [Gutiérrez, 2018]. Nossa grupo vem trabalhando a mais de duas décadas com o veneno bruto da aranha *P. nigriventer* com ênfase em sua ação no SNC, sendo o foco na BHE. Uma revisão dos trabalhos publicados entre 2003 a 2014 pode ser consultada em Cruz-Höfling et al. [2016]. Um desses trabalhos verificou que concomitantemente à permeabilização da BHE o hipocampo de ratos injetados com o veneno de PNV apresentava aumento da expressão do VEGF [Mendonça et al., 2012, 2013]. Classicamente, sabe-se que essa citocina é um fator de permeabilidade vascular [Ferrara et al., 2000, 2003]; entretanto, há estudos que mostram seu papel neuroprotetor em condições de injúria de neurônios do SNC [ver Brockington et al., 2004].

Sabe-se que a ação do VEGF se dá através da ligação com seus receptores 1 e 2, sendo o VEGFR-2, também chamado Flk-1, o mais bem estudado quanto ao seu mecanismo de ação. A ligação do VEGF ao Flk-1 induz ativação da atividade kinase do receptor e o desencadeamento das respostas biológicas. A inativação da ligação do VEGF ao seu receptor Flk-1 resulta, portanto, na precarização da sinalização das vias do VEGF. Como consequência, as respostas biológicas relacionadas ao aumento da permeabilização, angiogênese e neuroproteção, como por exemplo nas condições de hipóxia seriam prejudicadas. Nossa estratégia para investigar o significado da expressão do VEGF neste modelo de envenenamento por *P. nigriventer*, e avançar no entendimento da sua ação central, foi usar o antifúngico itraconazol que inibe a ligação VEGF-Flk-1 [Nacev et al., 2011].

Com a inibição da ligação VEGF-Flk-1 comparamos as diferenças entre animais tratados com PNV e animais pré-tratados com itraconazol, seguido por PNV e avaliamos: 1- clinicamente os animais em diferentes períodos após o envenenamento a fim de observar se havia piora ou melhora; 2- se houve alteração na natureza bioquímica do hipocampo e se sim, em qual momento ocorreria a alteração mais expressiva? 3- o extravazamento do corante Azul de Evans no SNC e a expressão das proteínas que formam a via paracelular e a via transcelular para inferir o status funcional da BHE no hipocampo. Houve aumento ou diminuição na expressão dessas proteínas após a inibição da ligação VEGF-Flk-1 (e portanto maior ou menor permeabilidade da BHE, respectivamente)? 4- quais vias de sinalização do VEGF foram acionadas (ou não), e em que intervalos de tempo tal fato ocorria?

Os dados obtidos com os ensaios de imunoprecipitação comprovaram a eficácia do tratamento com o itraconazol (ITZ) na inibição da ligação do VEGF ao receptor Flk-1 (Fig. 1, Capítulo II). Esse resultado reiterou dados da literatura que descrevem o efeito inibitório do antifúngico itraconazol na ligação VEGF-Flk-1 [Nacev et al., 2011]. Por outro lado, os resultados do hipocampo com Espectroscopia no Infravermelho e Transformada de Fourier (FT-IR) mostraram picos na faixa espectral entre 4000 a 500 cm⁻¹ do infravermelho médio (Fig. 3A, B, Capítulo I), o que, segundo a literatura, é uma faixa espectral que se aproxima à descrita para o itraconazol [Nesseem, 2001; Kumar et al., 2014; Fadke et al., 2015]. O dado é evidência do fármaco no SNC e sua disponibilidade para inibir a ligação VEGF-Flk-1.

Da mesma forma ao avaliarmos o comportamento dos grupos funcionais moleculares por FT-IR verificamos que ocorreram agudas e marcantes alterações espectrais no hipocampo dos animais do grupo ITZ-PNV em relação ao grupo PNV [Mesquita-Britto et al., 2018, Capítulo I]. Os espectros decorrem de características vibracionais em regiões com comprimentos de onda no infravermelho que são assinaturas espectrais únicas de cada molécula [Stuart, 2004; Elibol-Can et al. 2011] (Figs. 2, 5 e 6 e Tabela 1, Capítulo I). Os dados espectrais no hipocampo dos ratos tanto controles como tratados revelaram que referiam-se em maior medida à lípides e proteínas, mas também a carboidratos e ácidos nucleicos, em concordância com o aparato molecular estrutural e funcional das fibras nervosas mielinicas,

amielínicas, membranas neuronais, gliais e ependimárias e sinapses do SNC [Verkhratsky and Nedergaard, 2014].

Entretanto, os picos espectrais com maiores mudanças por conta do tratamento prévio com ITZ referiam-se à lipídios, o que está de acordo com o fato de os lipídios perfazerem até 60% da massa cerebral e os ácidos graxos desempenharem papel fundamental no bom desempenho estrutural e funcional do cérebro [Chang et al., 2009].

É importante frisar, que moléculas passíveis de atravessar a BHE são lipofílicas e com massa molecular entre 300-400 Da. [Pardridge, 2003]. O itraconazol possui baixa lipolificidade; sua massa molecular é de 705 Da., além do que o anti-fúngico azólico é substrato para a proteína de efluxo P-gp, abundante na face luminal do endotélio vascular cerebral [Miyama et al., 1998; Lim et al., 2014], e que funciona como uma bomba de efluxo de xenobióticos e metabólitos endógenos indesejáveis ao SNC. A despeito disso, é de se supor que 30 min após ter sido administrado, o itraconazol continuava na circulação e o seu acesso ao SNC seria facilitado por conta do aumento da permeabilidade à BHE causada pela administração i.v. do PNV. Os dados permitem concluir que tal fato ocorreu, dada a substancial diferença espectral entre PNV e ITZ-PNV. Tal conclusão se consubstancia pela pouca diferença espectral entre controle salina e controle ITZ, isto é, a não administração do PNV causa apenas pequenas diferenças na amplitude dos picos sem aparecimento de novas bandas (Fig. 3, Capítulo I). Estes dados demonstram que o ITZ sozinho foi capaz de ganhar acesso ao tecido hipocampal [Lim et al., 2014], e que embora baixa a taxa de permeabilidade do fármaco, esta foi suficiente para causar perturbação molecular, afetando a amplitude dos picos. Essa alteração contudo, não se refletiu na condição clínica do animal que era semelhante à do controle salina. Ilustrações que consubstanciam essas conclusões podem ser vistas ao comparar Figuras 1A e 1F (Capítulo I) que mostram que ratos injetados com ITZ sofreram menor extravasamento de Azul de Evans (AE) do que os ratos injetados com ITZ + PNV, e os animais pré-tratados com ITZ, maior extravasamento de AE do que os do grupo PNV [Mesquita-Brito et al., 2018, compare Fig. 1E e 1F, Capítulo I]. Os dados permitem verificar potencialização da quebra da BHE com o uso do fármaco, o que dá suporte à maior alteração bioquímica no ITZ-PNV, como também à

neurotoxicidade exacerbada dos ITZ-PNV, incluindo letalidade. Tais dados correlacionam-se bem com estudos que revelam que a inibição da sinalização de Flk-1 em modelos de insulto cerebral, intensificam os danos à área lesada do cérebro [Ferrara et al., 2003; Sköld et al., 2006], e no nosso estudo provavelmente por afetarem a porção bioquímica prevalente no SNC, que são os lípidos.

A análise do espectro do PNV no hipocampo revelou principalmente proteínas, o que está de acordo com a expressão “coquetel de polipeptídeos” usada por Gomez et al., 2002 [ver De Lima et al., 2016]; revelou também uma banda com pico de 1400 cm^{-1} , muito bem delineada e presente nos 4 grupos (Fig. 4A, B, Capítulo I). Essa banda, atribuída ao carboxilato [Stuart, 2004], é comum a vários sistemas biológicos, e foi denominada banda biomarcadora. Para auxiliar na interpretação da variação dos espectros mediante os tratamentos, foi definida a banda de referência (1467 cm^{-1} – lipídios) (Fig. 5A e B, Capítulo I). As duas bandas sofreram mudanças bioquímicas agudas notáveis nos grupos PNV e ITZ-PNV, em relação aos respectivos controles, salina e ITZ (comparar Fig. 5C e 5D, Capítulo I) no intervalo de 1 h, seguido em menor grau às 2 horas. Alterações espectrais refletem mudanças de absorbância no infravermelho devido a novas interações entre as biomoléculas da neurópila hipocampal, e com os peptídeos do PNV e o anti-fúngico. Em decorrência, é lógico pensar que ocorram perturbações profundas na homeostase que vai se manifestar na intensa condição neurotóxica na fase aguda do tratamento.

Ademais, o bloqueio de canais de Ca^{2+} e K^+ e o atraso no fechamento dos canais de Na^+ presentes nas membranas excitáveis do SNC e afetados pelos neuropeptídeos do PNV (ver De Lima et al., 2016) perturbam de forma drástica a neurotransmissão e levam à produção de glutamato (Glu) e acumulo de K^+ e exacerbação da excitabilidade. Na vigência da inibição da ligação VEGF-Flk-1 pelo ITZ, o efeito neuroprotetor do VEGF não acontece, potencializando os efeitos tóxicos causados pelo PNV.

É de se supor que a perturbação biomolecular seja irrestrita, isto é, estenda-se a todos os constituintes moleculares da neurópila, quer fazendo parte do interstício, dos neurônios, células gliais ou dos capilares hipocampais. Estes últimos constituem a principal barreira física entre o sangue e o cérebro,

a chamada barreira hematoencefálica. Contribuem ainda de forma fundamental para o normal funcionamento da BHE, os pés astrocitários, pericitos e membrana basal, todos envolvendo o endotélio [Persidsky, et al., 2006].

Sabe-se que a BHE é uma estrutura altamente complexa submetida a mudanças contínuas nas flutuações de íons e metabólitos. O controle do trânsito bi-direcional na interface sangue-cérebro se dá através de um arsenal de proteínas situadas ao longo dos contatos entre as células endoteliais. Essas proteínas formam as junções de oclusão (JO) e junções de adesão (JA), impedindo o trânsito paracelular de moléculas. Por outro lado, o transporte transcelular é escasso e altamente regulado por receptores e carreadores, além disso, os capilares cerebrais se caracterizam por possuírem alta resistência elétrica, e não apresentarem poros [Abbott et al., 2010].

Ao confrontarmos os efeitos causados pelo PNV na expressão de algumas proteínas aqui estudadas com aqueles causados quando os animais eram pré-tratados com itraconazol (PNV *versus* ITZ-PNV) verificamos que nos intervalos de grande toxicidade (1 – 2 horas) houve queda nos níveis de β -catenina e Src (1 h); VEGF, Neu-N, ZO-1, laminina e P-gp (2 h). Estes dados mostram que neste tempo a barreira paracelular foi permeabilizada pela baixa na expressão de β -catenina e ZO-1 e, além disso, a proteína de efluxo e a laminina também foram afetadas.

As cateninas são as principais moléculas ligantes entre as junções aderentes e o citoesqueleto das células endoteliais [Abbott et al., 2010]. A β -catenina é uma proteína que pode regular tanto positiva- como negativamente a função da BHE; por exemplo, há relatos em que a ativação da via de sinalização do VEGF inibe a sinalização da β -catenina em relação a alvos transpcionais importantes para a efetiva normalidade da BHE [Engelnhardt and Liebner, 2014]. Por outro lado, a Src quinase propicia fosforilação de resíduos de tirosina de proteínas, ativando vias de transdução de sinais [Parsons and Parsons, 2004]. Nossos resultados mostraram queda nos níveis de Src quinase (1 h) e VEGF (2 h) que em conjunto fazem parte das vias responsáveis pela regulação da atividade da proteína de efluxo P-gp, o que explica a regulação negativa da P-gp às 2 h. Por outro lado, a diminuição na expressão da ZO-1, e da laminina da membrana basal (principal constituinte de matriz da MB tanto endotelial como astrocítica, [Sixt et al., 2001]) está

relacionada ao aumento na permeabilidade da BHE em várias desordens neurológicas, por afetarem profundamente a expressão das proteínas juncionais [Savettieri et al., 2000; Tilling et al., 1998; Zlokovic, 2011]. As isoformas de laminina da MB vascular são diferentes das isoformas de laminina da MB dos astrócitos; as vasculares são fortemente reguladas positivamente por citocinas e fatores de crescimento, incluindo o VEGF, e por sinais pró-inflamatórios [Hallman et al., 2005, ver também Thomsen et al., 2017]. A laminina da MB astrocitária tem papel na polaridade dos pés astrocitários e na expressão das proteínas da JO. Sugerimos que na fase de 1-2 h de intensa toxicidade, o aumento da permeabilidade da BHE e a diminuição dos níveis de P-gp juntamente com importantes modificações moleculares vistas por FT-IR levaram à perda da homeostasia hipocampal e sofrimento neuronal, como visto pela diminuição da expressão de Neu-N, verificada às 2 h, e em consonância com a queda no complexo VEGF-Flk-1 visto por imunoprecipitação (2 h). Com o intuito de confirmar os nossos resultados, foram realizadas culturas primárias de astrócitos provenientes do córtex cerebral de ratos *Wistar* neonatos. Os resultados mostraram que, tanto o itraconazol como o PNV reduziram a taxa de proliferação celular após 2 horas de tratamento, sendo, esta redução, significativa após 5 horas de exposição. Além disso, podemos observar que a reatividade astrocitária aumentou significativamente após 2 horas de exposição. A partir desses dados, podemos supor que a exposição de itraconazol e PNV aos astrócitos pode promover aumento da permeabilizadade da BHE. Sugerimos também que a reatividade astrocitária pode decorrer da desorganização biomolecular do hipocampo, uma vez que os astrócitos reagem a agressões do meio [Mesquita Britto et al, 2018]. Nesse caso, a expressão aumentada do VEGF poderia decorrer tanto da ação permeabilizadora da BHE, como da ação neuroprotetora, dependendo do intervalo de tempo considerado.

Interessantemente e coincidentemente com o aparecimento de sinais incipientes de melhora na condição tóxica dos animais (5 h), o grupo que teve tratamento prévio com itraconazol comparado ao PNV (PNV *versus* ITZ-PNV) mostrou aumento significativo das proteínas HIF-1 α , VEGF, Flk-1, Flt-1, Neu-N, caspase-3, occludina, β -catenina, laminina, Dyn-2, Src, P-gp ao mesmo tempo em que houve diminuição de Cav-1 e houve recomposição quase total da bioquímica molecular do hipocampo (Mesquita-Britto et al., 2018).

O aumento do VEGF e seus receptores R1 e R2 supostamente foi decorrente do aumento do fator induzível por hipóxia, grandemente expresso por células do SNC, particularmente os astrócitos [Chávez et al. 2000, Lu et al. 2006; Roitbak et al. al. 2011], e notadamente a sua isoforma HIF-1 α , uma vez que o VEGF é alvo direto do fator de hipóxia [Wang et. al, 1998; Claesson-Welsh, 2016]. Condições de hipóxia geram citocinas pró-inflamatórias e moléculas excitotóxicas como o glutamato (Glu), que podem levar à morte celular, agravando a disfunção da BHE e do SNC [Badawi et al., 2012]. Os dados *in vitro* obtidos mostram uma tendência ao aumento da expressão de VEGF em astrócitos exposto à itraconazol e PNV, sendo que observamos o aumento significativo no grupo itraconazol + PNV após 24 horas de tratamento. Futuros estudos moleculares serão realizados para confirmar nossa hipótese sobre os efeitos do VEGF e receptores sobre os astrócitos corticais, neste modelo de estudo.

O excesso de Glu leva os astrócitos a regular o fator de transcrição HIF-1 α de vários alvos como mecanismo de proteção à sobrevivência dos neurônios [Badawi et al., 2012]. Estudo mostra que a fração PnTx-2, que reproduz os principais efeitos tóxicos e atividades farmacológicas do veneno bruto, aumenta a liberação de Glu (e acetilcolina) em resposta ao fechamento retardado dos canais de Na $^{+}$ que resulta na despolarização das membranas excitáveis e no influxo de Ca $^{2+}$ [Moura et al., 1998, Romano-Silva et al., 1993]. A regulação positiva de HIF-1 α que por sua vez induz a transcrição de alvos proteicos, por exemplo VEGF, protege as células do hipocampo contra a toxicidade de Glu [Badawi et al., 2012] e provavelmente contra o estresse molecular profundo como mostrado pelo estado neuroquímico do tecido cerebral (Mesquita-Britto et al., 2018). Estudos recentes demonstraram que o VEGF e receptores R1 e R2 são expressos em astrócitos e neurônios hipocampais em ratos expostos ao PNV [Mendonça et al., 2013]. Neurônios e astrócitos fazem parte da unidade neurovascular associada à BHE, que mantém em homeostase o ambiente cerebral. Tais resultados sugerem a ativação de mecanismos que visam restaurar a homeostase do meio hipocampal, em particular em células essenciais à neurotransmissão, portanto uma neuroproteção.

O fator de hipóxia é também considerado fator de neuroproteção, pois ao acionar mecanismos transducionais adaptativos de tolerância hipóxica pelos neurônios e astrócitos preserva a unidade neurovascular (NVu, “neurovascular unit”) e contribui para a boa funcionalidade da BHE. A NVu atua acoplando a atividade neuronal à função vascular e vice-versa; a NVu controla a homeostase cerebral e mantém o microambiente adequado à sobrevivência neuronal através da atividade da BHE que, dinamicamente, faz ajustes às injunções do momento [El Ali A et al., 2014]. Estruturalmente, fazem parte da NVu os neurônios, a BHE (endotélio, proteínas da BM, pés terminais astrocitários e pericitos) e as micróglias, que em concerto coordenam plasticamente a integridade do tecido nervoso, com particular destaque para os astrócitos neurônios [Cauli and Hamel, 2018].

A ocludina é uma típica proteína da JO ligada ao citoesqueleto de actina das células endoteliais via ZO-1 e ZO-2 [Willot et al., 1992]. O aumento nos níveis de ocludina, ZO-1 e laminina em intervalo onde sinais de melhora da toxicidade estão em andamento (5 h), sugere resposta reativa onde vias relacionadas à neuroproteção dependente de VEGF podem ter sido acionadas. Tal fato também foi observado com o aumento da β -catenina e P-gp indicando reforço na BHE, concomitante à maior expressão de Neu-N, indicando que houve melhoria na viabilidade neuronal. O NeuN é um antígeno detectado no núcleo de neurônios [Muller et al., 1992; Dent et al., 2010], e considerado um biomarcador de neurônios maduros e viabilidade neuronal [Snyder et al, 2012].

Por outro lado, o aumento da Caspase-3 no hipocampo de ITZ-PNV às 5 h evidencia ativação transitória das vias de morte por apoptose após a inibição da ligação VEGF-Flk-1 pelo ITZ. Tanto NeuN como a Caspase-3 são biomarcadores que podem ser expressos após insultos cerebrais que danificam a BHE. A ativação da via apoptótica tem relação com desequilíbrio do Ca^{2+} . PNV e toxinas isoladas do PNV retardam inativação dos canais de Na^+ [De Lima et al., 2016; Love et al., 1986; Love e Cruz-Höfling, 1986] e bloqueiam canais de Ca^{2+} [Romano-Silva et al., 1993] que resulta na perda da homeostase do cálcio e aumento da liberação de Glu. Esses eventos, é sabido, ativam a via da caspase-3 e promovem morte celular e a inibição da sinalização do Flk-1 pelo itraconazol seriam parte desse mecanismo. Um mecanismo de neuroproteção foi mostrado em modelo de lesão isquêmica após acidente

vascular cerebral em que foi relatado que o VEGF inibe a atividade da caspase-3 e apoptose e aumenta a neurogênese em paralelo com a ativação da via PI3-K, a fosforilação da tirosina de proteínas dos canais de potássio e a diminuição das correntes de potássio [Sun and Guo, 2005]. Essa proteção dos neurônios seria exercida pela interferência do VEGF na fisiologia dos canais Ca^{2+} , K^+ e Na^+ - voltagem dependente e da modulação da excitabilidade sináptica glutamatérgica [Sun and Guo, 2005; Rosenstein et al., 2010; Sun and Ma, 2013]. Vale ressaltar que dendritos dos neurônios piramidais e granulares do hipocampo são ricos em receptores de glutamato, canais de Na^+ e Ca^{2+} dando margem à interpretação de que a inibição da sinalização do sistema VEGF-Flk-1 teria papel na ativação da via da Caspase-3.

A inibição da ligação VEGF-Flk-1 (grupo ITZ-PNV) levou à diminuição da expressão da Cav-1 α em relação ao grupo PNV, que é indício de menor número de cavéolas e maior trânsito transcelular. A Cav-1 α é uma proteína de membrana formadora de cavéolas e que é ricamente expressa no endotélio vascular cerebral. As cavéolas são domínios de membrana endotelial em forma de delta (Ω) ricos em colesterol, fosfolipídios e esfingolipídios (“lipid-rafts”) e caveolina 1, que estão engajadas na endocitose, e transporte por transcitose em fase fluida na interface sangue-cérebro [Nag et al., 2009; Yao et al., 2005]. São estruturas dinâmicas pois o número de cavéolas pode variar sob demanda de transporte; baixa expressão de Cav-1 significa menor número de cavéolas e pressupõe seu destacamento da membrana celular, que então se aplaina, e há formação de vesículas para transcitose. Por outro lado, maior expressão de Cav-1 implica em maior número de cavéolas ligadas à membrana celular e menor trânsito vesicular na BHE.

Nossos resultados mostraram que a Cav-1 está diminuída à 1 h e 5 h quando há pré-tratamento com ITZ em relação ao grupo PNV, portanto maior permeabilização da via transcelular, e está aumentada às 24 h indicando estabilidade da BHE num intervalo onde os animais não mostram toxicidade. Isso significa que ao longo do tratamento houve um processo dinâmico. Inesperadamente, ao contrário da Cav-1 que está diminuída, a Dyn-2 (que forma o gargalo da cavéola) está aumentada às 5 h (e também às 24 h) no grupo ITZ-PNV o que significa maior número de cavéolas conectadas à membrana endotelial e menor transporte transcelular. A possível explicação

seria o fato de a Dyn-2 participar de outros eventos celulares envolvendo vesículas, como a reciclagem de vesículas sinápticas, transmissão sináptica, neurossecção, vesículas fagocíticas e das lamelas de Golgi [González-Jamett et al., 2014] e o seu aumento estaria ligado a outros eventos em curso. Concordantemente, a expressão aumentada de Src quinase (uma GTPase) pode sugerir fosforilação da Dyn-2 (5 h) que é pré-requisito para a separação da cavéola da membrana celular, seguido de internalização e transporte vesicular em elevação [Shajahan et al., 2004; Yao et al., 2005; Nag et al., 2009].

De fato, a família da Src quinase (SKF) tem sido relacionada a numerosos eventos celulares por interação com receptores transmembrana tirosina-quinase, dentre os quais o Flk-1. Recentemente, mostramos a participação tempo-dependente pós-PNV desempenhada pela Src na diminuição e aumento de Cav-1 α , indicando diminuição e aumento na densidade de cavéolas na membrana endotelial, respectivamente [Soares et al., 2016]. É importante enfatizar que o receptor Flk-1 do VEGF, a Src quinase, caveolin-1, eNOS, proteína kinase C e o receptor do fator de crescimento epidermal compartilham o mesmo compartimento das cavéolas formado pelos microdomínios “lipid-rafts” da membrana endotelial [Ikezu et al., 1998], e que o recrutamento de Flk-1 a partir de reservas intracelulares é processo dependentes da Src quinase em resposta a ativação do VEGF [Gampel et al., 2006]. Estudos revelaram que a glicoproteína P (P-gp) também está localizada nas cavéolas de capilares cerebrais [Demeule et al., 2000] e que diminuição da expressão da caveolina-1 aumenta a atividade de transporte da P-gp [Jodoin et al., 2003; Barakat et al., 2007]. Nossos resultados mostram que no hipocampo de ITZ-PNV houve diminuição de caveolina-1 e aumento de P-gp, enquanto às 24 horas houve aumento de caveolina-1 e diminuição de P-gp, o que também está de acordo com dados da literatura [Barakat et al., 2007] tanto com a condição tóxica dos animais nesses tempos como com os dados de FT-IR [Mesquita-Brito et al., 2018].

O sistema cavéola/Cav-1 tem papel importante na homeostase dos lípides do SNC e em sinalizações celulares, incluindo na atividade das vesículas sinápticas e neurotransmissão/reciclagem de vesículas [Pelkmans and Helenius, 2002; Williams and Lisanti, 2004], e portanto se constitui em

plataforma para desencadear vias de transdução de sinalização celular [Labrecque et al., 2003]. As forças tensionais e estresse mecânico gerados na membrana endotelial causados por ciclos de endocitose e formação de cavéolas e de destacamento das cavéolas da membrana atuam como um mecanismo de gatilho na ativação dessas vias de sinalização de transdução de sinais [Rothberg et al., 1992; Park et al., 2000; Pelkmans and Helenius, 2002; Nassoy and Lamaze, 2012; ver Soares et al., 2016].

Múltiplas vias relacionadas à neuroproteção do VEGF podem ser desencadeadas para uma resposta adaptativa tecidual efetiva na busca pelo restabelecimento da homeostase [Brockington et al., 2004; Matsuzaki et al., 2001]. Nesse contexto, fez-se necessário avaliar algumas proteínas envolvidas em importantes vias de sinalização do VEGF, como aquelas que atuam na sobrevivência e apoptose; proliferação, diferenciação e motilidade celular.

Os dados indicaram que as vias de sinalização que foram ativadas nos animais que tinham sido expostos apenas ao PNV, foram moduladas com o tratamento prévio com ITZ. A comparação PNV vs. ITZ-PNV tempo a tempo permitiu determinar o exato intervalo em que tal modulação ocorreu para mais ou para menos em função do pré-tratamento com itraconazol e que resultou na piora da condição tóxica dos animais, causou notáveis alterações bioquímicas do hipocampo mostradas por FT-IR e alterou a expressão das proteínas da via paracelular/transcelular da BHE. Por exemplo, no período mais grave de intoxicação (1-2 h) a via p-p38 MAPK que fora diminuída pelo PNV, diminuiu ainda mais em ITZ-PNV. Nesse mesmo intervalo de 1-2 h, estavam significativamente em declínio a expressão de VEGF, Neu-N, ZO-1, β-catenina, Src, laminina e P-gp, indicando fragilização da BHE. Por outro lado, a p-ERK 1/2 mostrou contra-reação contra o efeito inibitório dessa via que havia sido causado pelo PNV. Portanto as duas vias de proteína-quinase ativadas por mitógeno e que medeiam estresses ambientais e celulares [Brockington et al., 2004] foram afetadas pelo pré-tratamento com ITZ (Fig. 7B e C).

Às 5 h, quando os animais ainda com condição tóxica expressiva, mas já mostrando sinais de recuperação, a via p-p-38 que havia tido tendência à ativação pelo PNV em relação ao controle salina, é ativada significativamente no grupo ITZ-PNV. É nesse intervalo de 5 h que ocorre aumento na expressão de VEGF, Flk-1 e Flt-1, Neu-N, ocludina, β-catenina, laminina, caspase-3, P-gp,

Cav-1 α , Dyn-2, e Src. Portanto, a fosforilação da via da proteína quinase ativada por mitógeno MAKP p38, conhecida por mediar positivamente distúrbios celulares e/ou relacionados ao microambiente cerebral [Brockington et al., 2004], foi ativada em período de recuperação tóxica (5 h) nos animais ITZ-PNV. Os dados da imunoprecipitação analisados 2 h pós-tratamento, indicaram que cerca de 10% do VEGF e Flk-1 não formaram imunocomplexos, o que pode ser suficiente para uma ação sinalizadora reativa do sistema VEGF/Flk-1; além disso, é possível que após 5 horas o efeito inibitório do ITZ tenha se dissipado, pelo menos em parte, e aumentado a porcentagem de VEGF e Flk-1 não complexados e portanto viáveis para sinalizações celulares, o que contribuiria para o aumento das proteínas relacionadas à regulação da função de barreira na interface sangue cérebro.

Curiosamente, no intervalo de 24 horas caracterizado por aparente normalidade dos ratos, isto é, sem sinal visual de toxicidade nos animais, a Cav-1 aumentou (indicando menos transcitose), a via p-Akt que havia aumentado após exposição ao PNV, diminuiu significativamente sua expressão no grupo ITZ-PNV. Esse dado pode significar que em condição de toxicidade aparentemente banida, a mediação dessa via de sobrevivência celular não foi exigida. Sabe-se que a ligação do VEGFR2 ao VEGF ativa a quinase antiapoptótica Akt PI3K [ver Brockington et al, 2004]; os resultados obtidos sugerem a desativação do mecanismo antiapoptótico por Akt às 24 h no hipocampo ITZ-PNV. De fato, nossos dados mostram aumento significativo da caspase 3 às 5 horas e uma tendência de aumento às 24 horas.

Em suma, os resultados indicam que todas as três vias de sinalização foram disparadas na mediação dos efeitos do veneno pelo VEGF. No entanto, apenas a via de sinalização de AKT permaneceu ativada até 24 horas após o tratamento com PNV, apesar da manifestação tóxica subclínica, mas não com ITZ-PNV. Às 24 h o transporte transcelular estava diminuído (menos Cav-1), menos expressão da P-gp, laminina significativamente aumentada e p-Akt significativamente desativada em relação à PNV.

A sinalização de VEGFR2 não cessa no momento da sua internalização, ao invés continua a sinalizar até alcançar seus destinos finais [Labrecque et al, 2003; Murdaca et al., 2004]. A internalização do VEGFR2 é necessária para a ativação de ERK e Akt, mas não para p38 que é ativada

somente pela VGFR2 presente na superfície celular [Koch et al., 2011], o que é respaldado pelo aumento desse receptor às 5 horas juntamente e o fato de a ativação da via p38 já ter ocorrido na superfície desse receptor [Koch et al., 2011]. Já a ativação de ERK_{1/2} não foi alterada às 5 h, sugerindo que o itraconazol pode estar afetando apenas um subconjunto de receptores responsivos ao VEGF. De fato, estudos mostraram que o itraconazol em doses até 800 nM não bloqueia a ativação de ERK_{1/2} após adição de VEGF [Nacev et al., 2011].

6.0 CONCLUSÃO

A partir dos experimentos realizados e resultados obtidos, é possível concluir que:

- ✓ O ITZ é um inibidor da ligação do VEGF-Flk-1 e a sua utilização prévia à exposição ao PNV agravou a condição clínica de ratos, incluindo alguns casos letais.
- ✓ O aumento da expressão de VEGF, neste modelo utilizando o PNV, representa o desencadeamento de neuroproteção para a restituição da homeostase da BHE no hipocampo.
- ✓ O uso prévio de ITZ ocasionou profundas mudanças nas características vibracionais de grupos funcionais químicos específicos (lipídios, proteínas e ácidos nucléicos) no hipocampo de ratos. Tal fato pode sugerir que essa alteração espectral foi causada por distúrbios bioquímicos na homeostase da BHE, especialmente nos períodos críticos dos sinais clínicos do envenenamento (1 e 2 h).
- ✓ O tempo de 5 h foi considerando o ponto de viragem que orquestrou respostas biológicas variadas. Assim, cinco horas após a administração do ITZ-PNV, a expressão de HIF-1 α aumentou significativamente, e em paralelo exibiu aumentos sincrônicos na expressão de VEGF, Flk-1, Flt-1, Neu-N, e caspase-3. Tais aumentos ocorrem concomitantemente com o início da melhora das condições clínicas dos animais observados às 5 h, sugerindo a restauração da ligação VEGF-Flk-1 e atuação neuroprotetora do VEGF.
- ✓ A permeabilidade da BHE foi alterada pelo PNV e aumentada com o uso prévio de ITZ. Tal fato pôde ser comprovado com o aumento da permeabilidade transcelular da BHE (caveolina-1 α , dinamina-2 e Src), enquanto houve reforço compensatório da barreira paracelular (occludina, β -catenina), associado aos aumentos de laminina e da proteína de efluxo P-gp.
- ✓ A administração prévia de ITZ, no modelo experimental aqui utilizado, permitiu identificar o receptor de Flk-1 e a serina-treonina quinase Akt, provavelmente através de PI3K, como o principal mecanismo envolvido na sobrevivência celular induzida por VEGF. No entanto, houve também fosforilação de ERK (2 h) e p38 (5 h) indicando interação entre as vias

de transdução ao longo dos intervalos examinados. Assim, provavelmente, todas as vias participam do processo de restabelecimento da homeostase hipocampal que é atingida às 24 h, intervalo caracterizado pela ausência de condições neurotóxicas dos animais.

- ✓ O tratamento prévio com ITZ demonstrou inibição significativa na reprodução de astrócitos corticais juntamente com aumento significativo da astrogliose a partir de 2 h, já o VEGF aumenta expressivamente a partir de 5h. Tais achados colaboram com os sinais clínicos mais críticos do envenenamento nos animais e que o tempo de recuperação coincide com a atuação neuroprotetora do VEGF no tempo de viragem.
- ✓ Este estudo, através dos resultados obtidos, pode servir de base para futuras pesquisas com toxinas isoladas de PNV, permitindo assim avançar no conhecimento das atividades fisiopatológicas e farmacológicas das toxinas do veneno, fatos importantes dentro da probabilidade de projetar moléculas com interesses farmacológicos e terapêuticas.

7.0 REFERÊNCIAS

- Abbott NJ, Ronnback L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the bloodbrain barrier. *Nat. Rev. Neurosci.* 2006; 7: 41–53.
- Abbott NJ, Patabendige AA, Dolman DE, Yusof SR, Begley DJ. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis.* 2010; 37(10),13-25.
- Antunes E, Málaque CMSA. Mecanismo de ação do veneno de *Phoneutria* e aspectos clínicos do foneutrismo. In: Cardoso JLC, França FOS, Wen FH, Málaque CMS, Haddad JrV, (Eds). *Animais Peçonhentos no Brasil. Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes*. São Paulo: Sarvier/FAPESP, 2003; p150–60.
- Antunes E, Marangoni RA, Brain SD, De Nucci G. *Phoneutria nigriventer* (armed spider) venom induces increased vascular permeability in rat and rabbit skin in vivo. *Toxicon* 1992; 30:1011–6.
- Araújo DAM, Cordeiro MN, Diniz CR, Beirão PSL. Effects of a toxic fraction, PhTx2 from the spider *Phoneutria nigriventer* on the sodium current. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1993; 347: 205–8.
- Argaw AT, Gurfein BT, Zhang Y, Zameer A, John GR. VEGF-mediated disruption of endothelial CLN-5 promotes blood-brain barrier breakdown. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106 (6):1977–1982.
- Astrup J. Energy-requiring cell functions in ischemic brain. Their critical supply and possible inhibition in protective therapy. *J Neurosurg.* 1982; 56(4): 482-497.
- Badawi Y, Ramamoorthy P, Shi H. Hypoxia-inducible factor 1 protects hypoxic astrocytes against glutamate toxicity. *ASN Neuro.* 2012; 4(4): 231-41.
- Banerjee S, Bhat MA. Neuron-Glial Interactions in Blood-Brain Barrier Formation. *Annu Rev Neurosci.* 2007; 30: 235-58.
- Barakat S., Demeule M., Pilarget A., Régina A., Gingras D., Baggetto L.G., Bélieau R. Modulation of p-glycoprotein function by caveolin-1 phosphorylation. *J Neurochem.* 2007; 101(1):1-8.
- Bates DO, Harper SJ. Regulation of vascular permeability by vascular endothelial growth factors. *Vascul Pharmacol.* 2003; 39: 225–237.

- Bates DO, Hillman NJ, Pocock TM, Neal CR. Regulation of microvascular permeability by vascular endothelial growth factors. *J Anat.* 2002; (5): 529-530.
- Beck H, Raab S, Copanaki E, Heil M, Scholz A, Shibuya M, Deller T, Machein M, Plate KH. VEGFR-1 signaling regulates the homing of bone marrow-derived cells in a mouse stroke model. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2010; 69: 168–175.
- Benjamin LE, Keshet E. Conditional switching of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in tumors: induction of endothelial cell shedding and regression of hemangioblastoma-like vessels by VEGF withdrawal. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997; 94: 8761– 8766.
- Bhattacharya R, Kwon J, Li X, Wang E, Patra S, Bida JP, Bajzer Z, Claesson-Welsh L, Mukhopadhyay D. Distinct role of PLC β 3 in VEGF-mediated directional migration and vascular sprouting. *J. Cell Sci.* 2009; 122, 1025–1034.
- Brockington A, Lewist C, Wharton S, Shaw, PJ. Vascular endothelial growth factor and the nervous system. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 2004; 30: 427–446.
- Bucaretschi F, Deus Reinaldo CR, Hyslop S, Madureira PR, De Capitani EM. A clinico-epidemiological study of bites by spiders of the genus *Phoneutria*. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 2000; 42, 17-21.
- Bucaretschi F, Mello SM, Vieira RJ, Mamoni RL, Blotta MH, Antunes E, Hyslop S. Systemic envenomation caused by the wandering spider *Phoneutria nigriventer*, with quantification of circulating venom. *Clin Toxicol.* 2008; 46, 885–889.
- Burgering BM, Coffer PJ. Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction. *Nature.* 1995; 376. (6541), 599-602.
- Cabezas R, Avila M, Gonzalez J, El-Bachá RS, Báez E, García-Segura LM. Astrocytic modulation of blood brain barrier: perspectives on Parkinson's disease. *Front Cell Neurosci.* 2014; 8:211.
- Cammalleri M, Martini D, Ristori C, Timperio AM, Bagnoli P. Vascular endothelial growth factor up-regulation in the mouse hippocampus and its role in the control of epileptiform activity. *Eur J Neurosci.* 2011; 33: 482–98.

- Cardoso JLC, Wen FH. Introdução ao ofidismo. In: Cardoso JLC, França FOS, Wen FH, Málaque CMS, Haddad JrV. Animais Peçonhentos no Brasil. Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. São Paulo: Sarvier, 2003; 468p.
- Carrer DP, Samonis G, Droggiti DI, Tsaganos T, Pistiki A, Giambarellos-Bourboulis EJ. Intravenous itraconazole against experimental neutropenic *Candida parapsilosis* infection: efficacy after suppression of bacterial translocation. *J Infect Chemother.* 2013; 19 (6), 1080-1086.
- Cauli B, Hamel E. Brain perfusion and astrocytes. *Trends Neurosci.* 2018; 41 (7), 409-413.
- Chang CY, Ke DS, Chen JY. Essential fatty acids and human brain. *Acta Neurol. Taiwan.* 2009; 18 (4), 231–241.
- Chávez JC, Agani F, Pichiule P, LaManna JC. Expression of hypoxia-inducible factor-1 alpha in the brain of rats during chronic hypoxia. *J Appl Physiol.* 1985; 89(5): 1937-1942.
- Chávez JC, Agani F, Pichiule P, Lamanna JC. Expression of hypoxia-inducible factor-1a in the brain of rats during chronic hypoxia. *J Appl Physiol.* 2000: 89: 1937–1942.
- Cheung G, Chever O, Rouach N. Connexons and pannexons: newcomers in neurophysiology. *Front Cell Neurosci* 2014; 8: 348.
- Chong CR, Xu J, Lu J, Bhat S, Sullivan DJ, Liu JO. Inhibition of angiogenesis by the antifungal drug itraconazole. *ACS Chem. Biol.* 2007; 2, 263–270.
- Chow J, Ogunshola O, Fan SY, Li Y, Ment LR, Madri JA. Astrocyte-derived VEGF mediates survival and tube stabilization of hypoxic brain microvascular endothelial cells in vitro. *Brain Res.* 2001; 130: 123–132.
- Claesson-Welsh L. VEGF receptor signal transduction – A brief update. *Vascular Pharmacol.* 2016; 86: 14-17.
- Clark DE, Smith SK, Sharkey AM, Charnock-Jones DS. Localization of VEGF and expression of its receptors Flt and KDR in human placenta throughout pregnancy. *Hum. Reprod.* 1996; 11: 1090–1098.
- Covelo A, Araque A. Lateral regulation of synaptic transmission by astrocytes. *Neuroscience.* 2015; S0306-4522(15) 00188-8.

- Cruz-Höfling MA, Zago GM, Melo LL, Raposo C. c-FOS and n-NOS reactive neurons in response to circulating *Phoneutria nigriventer* spider venom. *Brain Res Bull* 2007;73:114–26.
- Cruz-Höfling MA, Love S, Brook G, Duchen LW. Effects of *Phoneutria nigriventer* spider venom on mouse peripheral nerve. *Q. J. Exp. Physiol.* 1985; 70 (4), 623-640.
- Cruz-Höfling MA, Rapôso C, Verinaud L, Zago GM. Neuroinflammation and astrocytic reaction in the course of *Phoneutria nigriventer* (armed-spider) blood-brain barrier (BBB) opening. *Neurotoxicology*. 2009; 30, 636–646.
- Cruz-Höfling MA, Tavares JC, Rapôso C. *Phoneutria nigriventer* Venom. Action in the central nervous system. In: P. Gopalakrishnakone, Gerardo A. Corzo, Maria Elena de Lima, Elia Diego-García (eds.) *Spider Venoms, Toxinology Series* Springer. 2016.
- Daneman R, Engelhardt B. Brain barriers in health and disease. *Neurobiol Dis.* 2017 Nov;107:1-3. doi: 10.1016/j.nbd.2017.05.008.
- Daneman R, Prat A. The blood-brain barrier. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015 Jan 5;7(1):a020412. doi: 10.1101/cshperspect.a020412.
- De Lima ME, Figueiredo SG, Matavel A, Nunes KP, Silva CN, Almeida FM, Diniz MRV, Cordeiro MN, Stankiewicz M, Beirão PSL. 2016. *Phoneutria nigriventer* venom and toxins: a review. In: Gopalakrishnakone P, Corzo GA, De Lima ME, Diego-García E (eds.) *Spider venoms, Toxinology Series* Springer.
- De Vries C, Escobedo JA, Ueno H, Houck K, Ferrara N, Williams LT. The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science.* 1992; 255: 989–991.
- Demeule M, Jodoin J, Gigras D, Bélieau R. P-glycoprotein is localized in caveolae in resistant cells and in brain capillaries. *FEBS Lett.* 2000; 466(2-3), 219-2224.
- Dent MA, Segura-Anaya E, Alva-Medina J, Aranda-Anzaldo A. NeuN/Fox-3 is an intrinsic component of the neuronal nuclear matrix. *FEBS Letters.* 2010; 584 (13), 2767-2771.
- Dong Y, Benveniste EM. Immune function of astrocytes. *Glia*, 2001; 36: 330-341.

- EIAli A, Thériault P, Rivest S. The role of pericytes in neurovascular unit remodeling in brain disorders. *Int J Mol Sci.* 2014; 16;15(4):6453-74.
- Elibol-Can B, Jakubowska-Dogru E, Severcan M, Severcan F. The effects of short-term chronic ethanol intoxication and ethanol withdrawal on the molecular composition of the rat hippocampus. *Alcohol Clin Exp Res* 2011; 35: 2050-62.
- Engelhardt B, Liebner S. Novel insights into the development and maintenance of the blood-brain barrier. *Cell Tissue Res.* 2014; 355(3):687-99.
- Eugenin EA, Basilio D, Sáez JC, Orellana JA, Raine CS, Bukauskas F, Bennett MV, Berman JW. The role of gap junction channels during physiologic and pathologic conditions of the human central nervous system. *J Neuroimmune Pharmacol* 2012; 7: 499–518.
- Fadke J, Desai J, Thakkar H. Formulation development of spherical crystal agglomerates of itraconazole for preparation of directly compressible tablets with enhanced bioavailability. *AAPS Pharm Sci Tech* 2015; 16: 1434-44.
- Ferrara N, Gerber HP, Le Couter J. The biology of VEGF and its receptors. 2003. *Nat Med.* 9 (6), 669–676.
- Ferrara N. VEGF: an update on biological and therapeutic aspects. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2000; 11, 617–624.
- Ferrara N, Houck KA, Jakeman LB, Winer J, Leung DW. The vascular endothelial growth factor family of polypeptides. *J Cell Biochem.* 1991 Nov;47(3):211-8. Review.
- Figueiredo SG, Garcia ME, Valentim AC, Cordeiro MN, Diniz CR, Richardson M. Purification and amino acid sequence of the insecticidal neurotoxin Tx4(6-1) from the venom of the 'armed' spider *Phoneutria nigriventer* (Keys). *Toxicon* 1995; 33: 83-93.
- Figueiredo SG, Perez-Garcia MEL, Cordeiro MN, Diniz CR, Patten D, Halliwell RF, Gilroy J, Richardson M. Purification and amino acid sequence of a highly insecticidal toxin from the venom of the Brazilian spider *Phoneutria nigriventer* which inhibits NMDA-evoked currents in rat hippocampal neurons. *Toxicon* 2001; 39: 309–17.

- Fontana MD, Vital-Brazil O. Mode of action of *Phoneutria nigriventer* spider venom at the isolated phrenic nerve-diaphragm of the rat. *Braz. J. Med Biol Res.* 1985; 18 (4), 557-565.
- Franke TF, Kaplan DR, Cantley LC. PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis. *Cell.* 1997; 88 (4), 435-437.
- Fuh G, Li B, Crowley C, Cunningham B, Wells JA. Requirements for binding and signaling of the kinase domain receptor for vascular endothelial growth factor. *J. Biol. Chem.* 1998; 273, 11197-11204.
- Gallo G, Letourneau PC. Regulation of growth cone actin filaments by guidance cues. *J Neurobiol.* 2004; 58: 92-102.
- Gampel A, Moss L, Jones MC, Brunton V, Norman JC, Mellor H. VEGF regulates the mobilization of VEGFR2/KDR from an intracellular endothelial storage compartment. *Blood.* 2006; 108 (8), 2624-2631.
- Gomez MV, Kalapothakis E, Guatimosim C, Prado MA. *Phoneutria nigriventer* venom: a cocktail of toxins that affect ion channels. *Cell. Mol. Neurobiol.* 2002; 22, 579-88.
- González-Jamett AM, Haro-Acuña V, Momboisse F, Caviedes P, Bevilacqua JA, Cárdenas AM. Dynamin-2 in nervous system disorders. *J Neurochem.* 2014; 128(2):210-23.
- Grieb P, Forster RE, Strome D, Goodwin CW, PAPE PC. O₂ exchange between blood and brain tissues studies with 18 O₂ indicator-dilution technique. *J. Appl. Physiol* 1985; 58: 1929-41.
- Gutiérrez JM. Global Availability of Antivenoms: The relevance of Public Manufacturing Laboratories. *Toxins.* 2018; 11(1):5, 1-13.
- Hallman R, Horn N, Selh M, Wendler O, Pausch F, Sorokin LM. Expression and function laminins in the embryonic and mature vasculature. *Physiol Rev.* 2005; 85(3), 979-1000.
- Hawkins BT, Davis TP. The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol Rev* 2005; 57: 173-85.
- Hicklin DJ, Ellis LM. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J Clin Oncol.* 2005; 23,1011-1027.
- Higgins CF. ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol* 1992; 8: 371-80.

- Hiratsuka S, Maru Y, Okada A, Seiki M, Noda T, Shibuya M. Involvement of Flt-1 tyrosine kinase (vascular endothelial growth factor receptor-1) in pathological angiogenesis. *Cancer Res.* 2001; 61: 1207–1213.
- Hood JD, Meininger CJ, Ziche M, Granger HJ. VEGF upregulates ecNOS message, protein, and NO production in human endothelial cells. *Am J Physiol.* 1998; 274:1054–1058.
- Huang LE, Gu J, Schau M, Bunn HF. Regulation of hypoxia-inducible factor 1 α is mediated by an O₂-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteosome pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998; 95 (14): 7987–7992.
- Huxlin KR, Sefton AJ, Furby JH. The origin and development of retinal astrocytes in the mouse. *J Neurocytol.* 1992; 21: 530–544.
- Ikezu T, Ueda H, Trapp BD, Nishiyama K, Sha JF, Volonte D, Galbiati F, Byrd AL, Bassell G, Serizawa H, Lane WS, Lisanti MP, Okamoto T. Affinity-purification and characterization of caveolins from the brain: differential expression of caveolin-1, -2, and -3 in brain endothelial and astroglial cell types. *Brain Res* 1998; 804: 177–92.
- Jakeman LB, Winer J, Bennett GL, Altar CA, Ferrara N. Binding sites for vascular endothelial growth factor are localized on endothelial cells in adult rat tissues. *J. Clin. Invest.* 1992; 89: 244–253.
- Jin K, Mao XO, Batteur SP, McEachron E, Leahy A, Greenberg DA. Caspase-3 and the regulation if hypoxic neuronal death by vascular endothelial growth factor. *Neuroscience.* 2001; 108 (2): 351-358.
- Jin K, Zhu Y, Sun Y, Mao XO, Xie L, Greenberg DA. Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis *in vitro* and *in vivo*. *Proc Nat Acad Sci. U.S.A.* 2002; 99 (18):11946-11950.
- Jodoin J, Demeule M, Fenart L, Farmer S, Linton KJ, Higgins CF, Bélineau R. P-glycoprotein in blood-brain barrier endothelial cells:interaction and oligomerization with caveolins. *J Neurochem.* 2003; 87(4), 1010-1023.
- Kaplan RN, Psaila B, Lyden D. Bone marrow cells in the “pre-metastatic niche”: Within bone and beyond. *Cancer Metastasis Rev.* 2006; 25: 521–529.

- Keck PJ, Hauser SD, Krivi G, Sanzo K, Warren T, Feder J, Connolly DT. Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. Science. 1989; 246(4935): 1309-1312.
- Kerbel RS. Tumor Angiogenesis. N Engl J Med. 2008; 358, 2039-49.
- Kerber M, Reiss Y, Wickersheim A, Jugold M, Kiessling F, Heil M, Tchaikovski V, Waltenberger J, Shibuya M, Plate KH. Flt-1 signaling in macrophages promotes glioma growth in vivo. Cancer Res. 2008; 68: 7342–7351.
- Kim J, Tang JY, Gong R, Kim J, Lee JJ, Clemons KV, Chong CR, Chang KS, Fereshteh M, Gardner D, Reya T, Liu JO, Epstein EH, Stevens DA, Beachy PA. Itraconazole, a commonly used antifungal that inhibits Hedgehog pathway activity and cancer growth. Cancer Cell. 2010;17(4):388-399.
- Koch S, Claesson-Welsh L. Signal Transduction by Vascular Endothelial. Cold Spring Harb Perspect Med 2012;2:a006502.
- Koch S, Tugues S, Li X, Gualandi L, Claesson-Welsh L. Review Article: Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. Biochem J. 2011; 437: 169-183.
- Kroll J, Waltenberger J. A novel function of VEGF receptor-2 (KDR): rapid release of nitric oxide in response to VEGF-A stimulation in endothelial cells. Biochem Biophys Res Commun. 1999; 265:636– 699.
- Kumar N, Goindi S, Saini B, Bansal G. Thermal characterization and compatibility studies of itraconazole and excipients for development of solid lipid nanoparticles. J Thermal Anal Calorim 2014; 115: 2375-83.
- Labrecque L., Royalm I., Surprenant D.S., Patterson C., Gingras D., Beliveau, R. Regulation of vascular endothelial growth factor receptor-2 activity by caveolin-1 and plasma membrane cholesterol. Mol Biol Cell. 2003; 14 (1), 334-347.
- Le Sueur L, Collares-Buzato, CB, Kalapothakis E, Cruz-Hofling MA. In vitro effect of the *Phoneutria nigriventer* spider venom on cell viability paracellular barrier function and transcellular transport in cultured cell lines. Toxicon 2005; 46: 130–41.
- Le Sueur LP, Collares-Buzato CB, Cruz-Höfling MA. Mechanisms involved in the blood-brain barrier increased permeability induced by *Phoneutria nigriventer* spider venom in rats. Brain Res. 2004; 1027, (1-2), 38-47.

- Le Sueur LP, Kalapothakis E, Cruz-Höfling MA. Breakdown of the blood-brain barrier and neuropathological changes induced by *Phoneutria nigriventer* spider venom. *Acta Neuropathol.* 2003; 105 (2), 125-134.
- Lee G, Dallas S, Hong M, Bendayan R. Drug Transporters in the Central Nervous System: Brain Barriers and Brain Parenchyma Considerations. *Pharmacol Rev.* 2001; 53: 569-96.
- Li B, Xu W, Luo C, Gozal D, Liu R. VEGF-induced activation of the PI3-K/Akt pathway reduces mutant SOD1-mediated motor neuron cell death. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 2003. 111 (1-2), 155-164.
- Li K, Fang D, Xiong Z, Luo R. Inhibition of the hedgehog pathway for the treatment of cancer using Itraconazole. *Onco Targets Ther.* 2019. 12: 6875-6886.
- Lim WM, Rajinikanth PS, Mallikarjun C, Kang YB. Formulation and delivery of itraconazole to the brain using a nanolipid Carrier system. *Int. J. Nanomed.* 2014; 9, 2117–2126.
- Lladó J, Tolosa L, Olmos G. Cellular and molecular mechanisms involved in the neuroprotective effects of VEGF on motoneurons. *Front Cell Neurosci.* 2013; 7(181):1-6.
- Love S, Cruz-Höfling MA. Acute swelling of nodes of Ranvier caused by venoms which slow inactivation of sodium channels. *Acta Neuropathol.* 1986; 70 (1), 1-9.
- Love S, Cruz-Höfling MA, Duchen LW. Morphological abnormalities in myelinated nerve fibres caused by *Leiurus*, *Centruroides* and *Phoneutria* venoms and their prevention by tetrodotoxin. *Q J Exp Physiol.* 1986; 71, 115–122.
- Lu DY, Liou HC, Tang CH, Fu WM. Hypoxia-induced iNOS expression in microglia is regulated by the PI3-kinase/Akt/mTOR signaling pathway and activation of hypoxia inducible factor-1alpha. *Biochem Pharmacol.* 2006; 72(8): 992-1000.
- Lucas SM. Aranhas de interesse médico no Brasil. In: Cardoso JLC, França FOS, Wen FH, Málaque CMS, Haddad JrV, (Eds). *Animais Peçonhentos no Brasil. Biologia, Clínica e Terapêutica dos acidentes.* São Paulo: Sarvier/FAPESP, 2003; p141–9.

- Lucas SM. Spiders in Brazil. *Toxicon* 1988; 26:759–72.
- Luurtsema G, Lange EC, Lammertsma AA, Franssen EJ. Transport across the blood brain barrier: stereo selective and PET-tracers. *Mol. Imag. Biol.* 2004; 6 (5): 306-318.
- Ma YY, Li KY, Wang JJ, Huang Y, Su FY. Vascular endothelial growth factor acutely reduces calcium influx via inhibition of the Ca²⁺ channels in rat hippocampal neurons. *J Neurosci Res.* 2009; 87(2),393-402.
- Maddika S, Ande SR, Panigrahi S, Paranjothy T, Weglarczyk K, Zuse A, Eshraghi M, Manda KD, Wiechec E, Los M. Cell survival, cell death and cell cycle pathways are interconnected: implications for cancer therapy. *Drug Resist Update.* 2007; 10: 13–29.
- Matsumoto T, Claesson-Welsh L. VEGF receptor signal transduction. *Sci. STKE.* 2001, re21.
- Matsuzaki H, Tamatani M, Yamaguchi A, Namikawa K, Kiyama H, Vitek MP, Mitsuda N, Tohyama M. Vascular endothelial growth factor rescues hippocampal neurons from glutamate-induced toxicity: signal transduction cascades. *FASEB J.* 2001; 15: 1218–1220.
- Matter K, Balda MS. Holey barrier: claudins and the regulation of brain endothelial permeability. *The Journal of Cel Biology.* 2003; 161(3): 459-60.
- Mattila PK, Lappalainen P. Filopodia: molecular architecture and cellular functions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008; 9: 446–454.
- McCarthy KD, De Vellis J. Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *J Cell Biol.* 1980; 85(3):890-902.
- Meadows KN, Bryant P, Pumiglia K. Vascular endothelial growth factor induction of the angiogenic phenotype requires Rasactivation. *J Biol Chem.* 2001; 276: 49289–49298.
- Meadows KN, Bryant P, Vincent PA, Pumiglia KM. Activated Ras induces a proangiogenic phenotype in primary endothelial cells. *Oncogene.* 2004; 23: 192–200.
- Mellitzer G, Xu Q, Wilkinson DG. Eph receptors and ephrins restrict cell intermingling and communication. *Nature.* 1999; 400: 77–81.

- Mendonça MCP, Soares ES, Stávale LM, Kalapothakis E, Cruz-Höfling MA. Vascular endothelial growth factor increases during blood-brain barrier-enhanced permeability caused by *Phoneutria nigriventer* spider venom. *Biomed Res Int.* 2014; 721968.
- Mendonça MCP, Soares ES, Stávale LM, Irazusta SP, Cruz-Höfling MA. Upregulation of the vascular endothelial growth factor, Flt-1, in rat hippocampal neurons after envenoming by *Phoneutria nigriventer*; age-related modulation, *Toxicon.* 2012; 60, 656-64.
- Mendonça MCP, Soares ES, Stávale LM, Rapôso C, Coope A, Kalapothakis E, Cruz-Höfling MA. Expression of VEGF and Flk-1 and Flt-1 receptors during Blood-Brain Barrier (BBB) impairment following *Phoneutria nigriventer* Spider Venom exposure. *Toxins.* 2013; 5, 2572-88.
- Mesquita-Brito MHR, Mendonça MCP, Soares ES, Sakane KK, Cruz-Höfling MA. Inhibition of VEGF-Flk-1 binding induced profound biochemical alteration in the hippocampus of a rat model of BBB breakdown by spider venom. A preliminary assessment using FT-IR spectroscopy. *Neurochemistry International.* 2018; 120, 64-74.
- Millauer B, Shawver LK, Plate KH, Risau W, Ullrich A. Glioblastoma growth inhibited in vivo by a dominant-negative Flk-1 mutant. *Nature.* 1994; 367, 576–579.
- Millauer B, Wizigmann-Voos S, Schnurch H, Martinez R, Moller NP, Risau W, Ullrich A. High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell.* 1993; 72, 835–846.
- Miranda DM, Romano-Silva MA, Kalapothakis E, Diniz CR, Cordeiro MN, Moraes-Santos T, Prado MA, Gomez MV. *Phoneutria nigriventer* toxins block tityustoxin-induced calcium influx in sinaptosomes. *Neuroreport* 1998; 9: 1371–3.
- Miyama T, Takanaga H, Matsuo H, Yamano K, Yamamoto K, Iga T, Naito M, Tsuruo T, Ishizuka H, Kawahara Y, Sawada Y. P-glycoprotein-mediated transport of itraconazole across the blood-brain barrier. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1998; 42 (7), 1738–1744.
- Moura JR, Prado MA, Gomez MV, Kalapothakis E, Diniz CR, Cordero MN, Romano-Silva MA. Investigation of the effect of PhTx2, from the venom of

- the spider *Phoneutria nigriventer*, on the release of [³H]-acetylcholine from rat cerebrocortical synaptosomes. *Toxicon*. 1998; 36 (8),1189-1192.
- Muller RJ, Buck CR, Smith AM. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development*. 1992; 116 (1), 201–211.
- Muoio V, Persson PB, Sendeski MM. The neurovascular unit - concept review. *Acta Physiol (Oxf)*. 2014; 210(4):790-8.
- Murakami M, Iwai S, Hiratsuka S, Yamauchi M, Nakamura K, Iwakura Y, Shibuya M. Signaling of vascular endothelial growth factor receptor-1 tyrosine kinase promotes rheumatoid arthritis through activation of monocytes/macrophages. *Blood*. 2006; 108: 1849–1856.
- Murdaca J, Treins C, Monthouel-Kartmann MN, Pontier-Bres R, Kumar S, Van Obberghen E, Giorgetti-Peraldi S. Grb10 prevents Nedd4-mediated vascular endothelial growth factor receptor-2 degradation. *J. Biol. Chem.* 2004; 279, 26754–26761.
- Nacev BA, Grassi P, Dell A, Haslam SM, Liu JO. The antifungal drug itraconazole inhibits vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2) glycosylation, trafficking, and signaling in endothelial cells. *J Biol Chem.* 2011; 286, 44045-56.
- Nag S, Manias JL, Stewart DJ. Expression of endothelial phosphorylated caveolin-1 is increased in brain injury. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2009; 35, 417-26.
- Nassoy P, Lamaze C. Stressing caveolae new role in cell mechanics. *Trends Cell Biol*. 2012; 22(7), 381-9.
- Nesseem DI. Formulation and evaluation via liquid crystal for topical delivery system. *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.* 2001; 26, 387–399.
- Nicoletti JN, Shah SK, McCloskey DP, Goodman JH, Elkady A, Atassi H, Hylton D, Rudge JS, Scharfman HE, Croll SD. Vascular endothelial growth factor is up-regulated after status epilepticus and protects against seizure-induced neuronal loss in hippocampus. *Neuroscience*. 2008; 151: 232–241.
- Nielsen S, Nagelhus EA, Amiry-Moghaddam M, Bourque C, Agre P, Ottersen OP. Specialized membrane domains for water transport in glial cells: high-resolution immunogold cytochemistry of aquaporin-4 in rat brain. *J Neurosci*. 1997; 17: 171-80.

- Nilsson I, Bahram F, L, X, Gualandi L, Koch S, Jarvius M, Soderberg O, Anisimov A, Kholova I, Pytowski B. VEGF receptor 2/3 heterodimers detected in situ by proximity ligation on angiogenic sprouts. *EMBO J.* 2010; 29, 1377–1388
- Oelrichs RB, Reid HH, Bernard O, Ziemięcki A, Wilks AF. NYK/FLK-1: a putative receptor protein tyrosine kinase isolated from E10 embryonic neuroepithelium is expressed in endothelial cells of the developing embryo. *Oncogene.* 1993; 8, 11–18.
- Ogunshola OO, Al-Ahmad A. HIF-1 at the blood-brain barrier: A mediator of permeability? *High Alt. Med. Biol.* 2012, 13, 153–161.
- Ohtsuki S, Terasaki T. Contribution of carrier-mediated transport systems to the blood–brain barrier as a supporting and protecting interface for the brain; importance for CNS drug discovery and development. *Pharm. Res.* 2007; 24, 1745–1758.
- Palmer TD, Willhoite AR, Gage FH. Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. *J Comp Neurol.* 2000; 425: 479–494.
- Pardridge WM. Drug transport across the blood-brain barrier. *J Cereb Blood Flow Metab* 2012; 32(11):1959-72.
- Pardridge WM. Blood barrier drug targeting: the future of brain drug development. *Mol Interv* 2003; 3(2): 90-105.
- Park H, Go YM, Darji R, Choi JW, Lisanti MP, Maland MC, Jo H. Caveolin-1 regulates shear stress-dependent activation of extracellular signal-regulated kinase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000; 278, H1285-H1293.
- Parsons SJ., Parson JT. Src family kinases, key regulators of signal transduction. *Oncogene.* 2004; 18;23(48):7906-9.
- Pelkmans L, Helenius A. Endocytosis via caveolae. *Traffic.* 2002; 3, 311-20.
- Perea G, Sur M, Araque A. Neuron-glia networks: integral gear of brain function. *Front Cell Neurosci.* 2104; 8: 378.
- Persidsky Y, Ramirez SH, Haorah J, Kanmogne GD. Blood–brain barrier: structural components and function under physiologic and pathologic conditions. *J Neuroimmune Pharmacol* 2006; 1: 223–36.
- Peters KG, De Vries C, Williams LT. Vascular endothelial growth factor receptor expression during embryogenesis and tissue repair suggests a role in

- endothelial differentiation and blood vessel growth. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1993; 90: 8915–8919.
- Plate KH, Breier G, Millauer B, Ullrich A, Risau W. Up-regulation of vascular endothelial growth factor and its cognate receptors in a rat glioma model of tumor angiogenesis. Cancer Res. 1993; 53, 5822–5827.
- Platnick NI. The World Spider Catalog, Version 13.0. American Museum of Natural History. 2012. Disponível em: <<http://research.amnh.org/iz/spiders/catalog/ARANEIDAE.html>> Acesso em 10 de maio de 2019.
- Prado MAM, Guatimosin C, Gomez MV, Diniz CR, Cordeiro MN, Romano-Silva MA. A novel tool for the investigation of glutamate release from rat cerebrocortical synaptosomes: the toxin Tx3-3 from the venom of the spider *Phoneutria nigriventer*. Biochem Journ 1996; 3: 145–50.
- Qiu MH, Zhang R, Sun FY. Enhancement of ischemia-induced tyrosine phosphorylation of Kv1.2 by vascular endothelial growth factor via activation of phosphatidylinositol 3-kinase. J Neurochem. 2003; 87: 1509–1517.
- Quinn TP, Peters KG, De Vries C, Ferrara N, Williams LT. Fetal liver kinase 1 is a receptor for vascular endothelial growth factor and is selectively expressed in vascular endothelium. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1993; 90, 7533–7537.
- Radu M, Chernoff J, An *in vivo* assay to test blood vessel permeability. J Vis Exp. 2013; 73:50062.
- Rapôso C, Odorissi PA, Oliveira AL, Aoyama H, Ferreira CV, Verinaud L, Fontana K, Ruela-de-Sousa RR, Cruz-Höfling MA. Effect of *Phoneutria nigriventer* venom on the expression of junctional protein and P-gp efflux pump function in the blood-brain barrier. Neurochem Res. 2012; 37 (9), 1967-1981.
- Rapôso C, Zago GM, Silva GH, Cruz-Höfling MA. Acute blood-brain barrier permeabilization in rats after systemic *Phoneutria nigriventer* venom. Brain Res. 2007; 1149, 18-29.
- Rezende JrL, Cordeiro MN, Oliveira EB, Diniz CR. Isolation of neurotoxic peptides from the venom of the 'armed' spider *Phoneutria nigriventer*. Toxicon 1991; 29 (10): 1225-1233.
- Roitbak T, Surviladze Z, Cunningham LA. Continuous expression of HIF-1α in neural stem/progenitor cells. Cell Mol Neurobiol. 2011; 31(1): 119-33.

- Romano-Silva MA, Ribeiro-Santos R, Ribeiro AM, Gomez MV, Diniz CR, Cordeiro MN, Brammer MJ. Rat cortical synaptosomes have more than one mechanism for Ca^{2+} entry linked to rapid glutamate release: studies using the *Phoneutria nigriventer* toxin PhTX2 and potassium depolarization. *Biochem J.* 1993; 296(Pt 2), 313-319.
- Rosenstein JM, Krum JM. New roles for VEGF in nervous tissue beyond blood vessels. *Exp Neurol.* 2004; 187: 246–53.
- Rothberg KF, Heuser JE, Donzell WC, Ying YS, Glenney JR, Anderson RG. Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell.* 1992; 68 (4), 673-682.
- Rouach N, Avignone E, Meme W, Koulakoff A, Venance L, Blomstrand F, Giaume C. Gap junctions and connexin expression in the normal and pathological central nervous system. *Biol Cell* 2002; 94: 457–75.
- Roux PP, Blenis J. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2004; 68, 320-344.
- Bhardwaj S, Ylä-Herttula S. Biology of vascular endothelial growth factors. *FEBS Lett.* 2006; 580: 2879-2887.
- Rubin LL, Staddon JM. The cell biology of the blood-brain barrier. *Annu Rev Neurosci* 1999; 22: 11–28.
- Ruiz-Almodóvar C, Lambrechts D, Mazzone M, Carmeliet P. Role and therapeutic potential of VEGF in the nervous system. *Physiol. Rev.* 2009; 89: 607- 648.
- Salceda S, Caro J. Hypoxia-inducible factor 1a (HIF-1a) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J Biol Chem.* 1997; 272: 22642–22647.
- Savettieri G, Di Liegro I, Catania C, Licata L, Pitarresi GL, D'Agostino S, Schiera G, De Caro V, Giandalia G, Giannola LI, Cestelli A. Neurons and ECM regulate occludin localization in brain endothelial cells. *Neuroreport.* 200; 11(5), 1081-1084.
- Schenberg S, Pereira Lima FA. *Phoneutria nigriventer* venom In: Bücherl, W; Buckley, E.E. (Eds) *Venomous Animals and Their Venom.* Academic Press, New York.1971; 3: 279-285.

- Semenza G. Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1. *Biochem Pharmacol.* 2002; 64:993–998.
- Semenza GL, Agani F, Booth G, Forsythe J, Iyer N, Jiang BH, Leung S, Roe R, Wiener C, Yu A. Structural and functional analysis of hypoxia inducible factor 1. *Kidney Int.* 1997; 51: 553–555.
- Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science.* 1983; 219: 983–985.
- Shajahan AN, Timblin BK, Sandoval R, Tiruppathi C, Malik AB, Minshall RD. Role of Src-induced dynamin-2 phosphorylation in caveolae-mediated endocytosis in endothelial cells. *Biol Chem.* 2004; 279(19), 20392–400.
- Shibuya M, Yamaguchi S, Yamane A, Ikeda T, Tojo A, Matsushima H, Sato M. Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase gene (flt) closely related to the fms family. *Oncogene.* 1990; 5, 519–524.
- Shinkai A, Ito M, Anazawa H, Yamaguchi S, Shitara K, Shibuya M. Mapping of the sites involved in ligand association and dissociation at the extracellular domain of the kinase insert domain-containing receptor for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem.* 1998; 273: 31283–31288.
- Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature.* 1992; 359: 843–845.
- Siddiq A, Aminova LR, Ratan RR. Hypoxia inducible factor prolyl 4-hydroxylase enzymes: center stage in the battle against hypoxia, metabolic compromise and oxidative stress. *Neurochem Res.* 2007; 32: 931–946.
- Sixt M, Engelhardt B, Pausch F, Hallmann R, Wendler O, Sorokin LM. Endothelial cell laminin isoforms, laminins 8 and 10, play decisive roles in T cell recruitment across the blood-brain barrier in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Cell Biol.* 2001; 153(5), 933-946.
- Sköld MK, Risling M, Holmin S. Inhibition of vascular endothelial growth factor receptor 2 activity in experimental brain contusions aggravates injury outcome and leads to early increased neuronal and glial degeneration. *Eur J Neurosci.* 2006; 23, 21-34.

- Snyder JS, Ferrante SC, Cameron HA. Late maturation of adult-born neurons in the temporal dentate gyrus. *Plos One*. 2012; 7(11), 1-8.
- Soares ES, Mendonça MC, da Cruz-Höfling MA. Caveolae as target for *Phoneutria nigriventer* spider venom. *Neurotoxicology*. 2016; 54, 111-118.
- Soares ES, Mendonça MCP, da Cruz-Höfling MA. eNOS uncoupling in the cerebellum after BBB disruption by exposure to *Phoneutria nigriventer* spider venom. *Toxicon*. 2015; 104, 7-13.
- Soares ES, Mendonça MC, Irazusta SP, Coope A, Stávale LM, da Cruz-Höfling MA. Evidences of endocytosis via caveole following blood-brain barrier breakdown by *Phoneutria nigriventer* spider venom. *Toxicol Lett*. 2014; 229(3): 415-422.
- Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol*; 2010; 119(1):7-35.
- Solon CS, Franci D, Ignacio-Souza LM, Romanatto T, Roman EA, Arruda AP, Morari J, Torsoni AS, Carneiro EM, Velloso LA. Taurine enhances the anorexigenic effects of insulin in the hypothalamus of rats. *Amino Acids*. 2012; 42 (42), 2403-2410.
- Sondell M, Lundborg G, Kanje M. Vascular endothelial growth factor has neurotrophic activity and stimulates axonal outgrowth, enhancing cell survival and Schwann cell proliferation in the peripheral nervous system. *J.Neurosci*. 1999; 19: 5731-5740.
- Stanczuk L, Martinez-Corral I, Ulvmar MH, Zhang Y, Lavina B, Fruttiger M. cKit Lineage Hemogenic Endothelium-Derived Cells Contribute to Mesenteric Lymphatic Vessels. *Cell Reports*, 2015.
- Stávale LM, Soares ES, Mendonça MCP, Irazusta SP, Cruz-Höfling MA. Temporal relationship between aquaporin-4 and glial fibrillary acidic protein in cerebellum of neonate and adult rats administered a BBB disrupting spider venom. *Toxicon*. 2013; 66, 37-46.
- Stuart BH. Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications. England: John Wiley & Sons; 2004.
- Sun F, Guo X. Molecular and cellular mechanisms of neuroprotection by vascular endothelial growth factor. *J Neurosci Res*. 2005; 79, 180–84.

- Sun G, Ma Y. Vascular endothelial growth factor modulates voltage-gated Na⁺ channel properties and depresses action potential firing in cultured rat hippocampal neurons. *Biol Pharm Bull.* 2013; 36 (4), 548–555.
- Sun J, Sha B, Zhou W, Yang Y. VEGF-mediated angiogenesis stimulates neural stem cell proliferation and differentiation in the premature brain. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010; 394(1): 146-152.
- Svensson B, Peters M, Konig HG, Poppe M, Levkau B, Rothermundt M, Arolt V, Kögel D, Prehn JH. Vascular endothelial growth factor protects cultured rat hippocampal neurons against hypoxic injury via an antiexcitotoxic, caspase-independent mechanism. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2002; 22: 1170–1175.
- Takahashi T, Shirasawa T, Miyake K, Yahagi Y, Maruyama N, Kasahara N, Kawamura T, Matsumura O, Mitarai T, Sakai O. Protein tyrosine kinases expressed in glomeruli and cultured glomerular cells: Flt-1 and VEGF expression in renal mesangial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1995; 209: 218–226.
- Tammela T, Enholm B, Alitalo K, Paavonen K. The biology of vascular endothelial growth factors. *Cardiovasc Res.* 2005; 65(3): 550-563.
- Tammela T, Zarkada G, Wallgard E, Murtomaki A, Suchting S, Wirzenius M, Waltari M, Hellstrom M, Schomber T, Peltonen R. Blocking VEGFR-3 suppresses angiogenic sprouting and vascular network formation. *Nature.* 2008; 454, 656–660.
- Thomsen MS, Routhe LJ, Moos T. The vascular basement membrane in the healthy and pathological brain. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2017; 37 (10), 3300-3317.
- Tilling T, Korte D, Hoheisel D, Galla HJ. Basement membrane proteins influence brain capillary endothelial barrier function in vitro. *J Neurochem.* 1998; 71(30),1151-1157.
- Troncone LRP, Lebrun I, Magnoli F, Yamane T. Biochemical and pharmacological studies on a lethal neurotoxic polypeptide from *Phoneutria nigriventer* spider venom. *Neurochem Res* 1995; 20: 879–83.
- Vassilevski AA, Kozlov SA, Grishin EV. Molecular diversity of spider venom. *biochemistry (Moscow)* 2009; 74: 1505–34.

- Vassilevsky AA, Koslov SA, Egorov TA, Grishin EV. Purification and characterization of biologically active peptides from spider venoms. *Methods Mol. Biol.* 2010; 615, 87–100.
- Verkhratsky A, Nedergaard M. Astroglial cradle in the life of the synapse. *Phil Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2014; 369:20130595.
- Vieira LB, Kushmerick C, Hildebrand ME, Garcia E, Stea A, Cordeiro MN, et al. Inhibition of high voltage-activated calcium channels by spider toxin PnTx3-6. *J Pharmacol Exp Ther* 2005;314:1370–7.
- Wang H, Keiser JA. Vascular endothelial growth factor upregulates the expression of matrix metalloproteinases in vascular smooth muscle cells: role of flt-1. *Circ Res.* 1998; 83: 832–840.
- Wick A, Wick W, Waltenberger J, Weller M, Dichgans J, Schulz JB. Neuroprotection by Hypoxic Preconditioning Requires Sequential Activation of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor and Akt. *J Neurosci.* 2002; 22(15), 6401- 7.
- Williams TM, Lisanti MP. The caveolin genes: from cell biology to medicine. *Ann Med*, 2004; 36: 584–95.
- Willot E, Balda MS, Heintzelman M, Jameson A, Anderson MJ. Localization and differential expression of two isoforms of the tight junction protein ZO-1. *Am J Physiol.* 1992; 262, C1119-1124.
- Winkler EA, Bell RD, Zlokovic BV. Central nervous system pericytes in health and disease. *Nat Neurosci.* 2011; 14(11):1398-405.
- Wong AD, Ye M, Levy AF, Rothstein JD, Bergles DE, Searson PC. The blood-brain barrier: an engineering perspective. *Front Neuroeng.* 2013; 6:7.
- Xu J, Dang Y, Ren RY, Liu JO. Cholesterol trafficking is required for mTOR activation in endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. Unit. States Am.* 2010; 107 (10), 4764–4769.
- Yamashima T, Tonchev AB, Yukie M. Adult hippocampal neurogenesis in rodents and primates: endogenous, enhanced, and engrafted. *Rev Neurosci.* 2007;18: 67-82.
- Yao Q, Chen J, Cao H, Orth JD, McCaffery JM, Stan RV, McNiven MA. Caveolin-1 interacts directly with dynamin-2. *J Mol Biol.* 2005; 348(2): 491-501.

- Zacchigna S, Lambrechts D, Carmeliet P. Neurovascular signalling defects in neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci*. 2008; 9: 169–181.
- Zhu Y, Jin K, Mao XO, Greenberg DA. Vascular endothelial growth factor promotes proliferation of cortical neuron precursors by regulating E2F expression. *FASEB J*. 2003; 17(2):186-193.
- Zlokovic BV. Neurovascular pathways to neurodegeneration in Alzheimer's disease and other disorders. *Nat Rev Neurosci*. 2011; 12(12):723-38.
- Zonta M, Angulo MC, Gobbo S, Rosengarten B, Hossmann KA, Pozzan T, Carmignoto G. Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation. *Nat Neurosci*. 2003; 6(1):43-50.

8.0 ANEXOS

Anexo 8.1 – Certificados CEUA



UNICAMP



CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

C E R T I F I C A D O

Certificamos que o projeto "Análise das vias de sinalização do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) após envenenamento por Phoneutria nigriventer em ratos wistar" (protocolo nº 3223-1), sob a responsabilidade de Profa. Dra. Maria Alice da Cruz-Höfling / Maria Helena Rodrigues Mesquita Britto, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e com a legislação vigente, LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009.

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao IBAMA, SISBIO ou CIBio.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 17 de fevereiro de 2014.

Campinas, 17 de fevereiro de 2014.

Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva



C E R T I F I C A D O

Certificamos que o projeto intitulado "Análise das vias de sinalização do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) após envenenamento por Phineutria nigrovirente em ratos wistar", protocolo nº 3223-1(A), sob a responsabilidade de Profa. Dra. Maria Alice da Cruz-Höfling / Maria Helena Rodrigues Mesquita Britto, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica ou ensino, encontra-se de acordo com os preceitos da LEI N° 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais e do DECRETO N° 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal - CONCEA, e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP, em 19 de outubro de 2015.

Vigência do projeto: 11/2015-08/2016

Espécie/Linhagem: Rato heterogênico Wistar

No. de animais: 10

Idade/Peso: 03 dias / 6g

Sexo: machos

Origem: CEMIB/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao IBAMA, SISBIO ou CIBio.

Campinas, 19 de outubro de 2015.

Profa. Dra. Liana Maria Cardoso Verinaud
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva

Anexo 8.2 – Direitos Autorais

Autorização da revista Neurochemistry International para incluir o artigo “Inhibition of VEGF-Flk-1 binding induced profound biochemical alteration in the hippocampus of a rat model of BBB breakdown by spider venom. A preliminary assessment using FT-IR spectroscopy. 2018 DOI: 0.1016/j.neuint.2018.07.011” na presente Tese de Doutorado.

Re: Dear Neurochemistry International Central Customer Services team, [191014-009161]

 Traduzir a mensagem para: Português | Nunca traduzir do: Inglês

 Researcher Support <support@elsevier.com>
Qua, 16/10/2019 05:10
Você

Dear Dr. Mesquita-Britto,

Article reference: NCI4278

Thank you for your e-mail and apologize for the delayed in response.

I wish to advise that you may include your journal articles, in full or part, in your thesis or dissertation.

As a journal author, you retain rights for large number of author uses, including use by your employing institute or company.

You may also find the below links useful for reference:

<https://www.elsevier.com/about/our-business/policies/copyright>

You may view the 'Personal Use' link in the above site.

Please also see:

<https://www.elsevier.com/about/our-business/policies/copyright/personal-use>

Should you have further questions with regard to sharing, you may contact our permissions department directly at:
permissionshelpdesk@elsevier.com

I hope this helps.

If I can be of any further assistance please do not hesitate to contact me.

Kind Regards,

Gieza Maquiling
Researcher Support
ELSEVIER