

VERA LUCIA PEREIRA DOS SANTOS

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E BIOQUÍMICA DAS  
GLÂNDULAS PRODUTORAS DE VENENO DE *Loxosceles  
intermedia*(ARANHA MARROM)**

Dissertação apresentada como requisito parcial  
à obtenção do grau de Mestre em Morfologia  
(Biologia Celular). Departamento de Biologia  
Celular, Setor de Ciências Biológicas, Univer-  
sidade Federal do Paraná.

Orientação: Prof. Dr. Waldemiro Gremski

Co-orientação: Prof. Dr. Silvio Sanches Veiga

CURITIBA

1999

**Toda conquista só é possível quando todos os conquistadores estiverem imbuídos do mesmo ideal.**

Sub-ten. Paulo Santos

Corpo de Bombeiros da PMPR

**O melhor método de se vencer obstáculos, é o método de equipe.**

Colins L. Power.

**A DEUS,**

**Tudo posso naquele que me fortalece.**

Felipenses 3:14

À minha mãe, Raquel, por seu amor, seu carinho e sua ajuda, os quais foram muito importantes para que eu pudesse chegar até aqui.

Ao Paulo e aos meus filhos, Herivelton e Ismael, o meu muito obrigado por terem dividido mais esta etapa, com amor, companheirismo e acima de tudo, muita paciência.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Waldemiro Gremski, meu orientador por muitos anos pelo voto de confiança, pelo empenho, por sua seriedade e comprometimento com a pesquisa;

Ao Prof. Dr. Silvio Sanches Veiga, meu co-orientador, que me adotou e mudou o rumo da minha vida de pós-graduanda, homem sério, de alto nível científico e que, acima de tudo, trata a pesquisa com muita dignidade, a minha admiração e respeito;

A Prof<sup>a</sup> Célia Regina C. Franco, por nossa amizade de longos anos, pelos ensinamentos, por sua ajuda nos momentos bons e principalmente nos mais difíceis;

Aos colegas do Laboratório de Matriz Extracelular , Andréia Senff Ribeiro, Gustavo Antonio de Souza, Juliana Lupurini Dreyfuss, Juliana Haoach, Rafael Bertoni da Silveira, Renata Lia Lana Viggiano pela amizade, pelo companherismo e pelo trabalho em equipe;

Aos colegas do Laboratório de Matriz Extracelular - Biologia Tecidual, Prof. Dr. Claudio de Paula Greca, Carlos Alberto Micheloto, Gabriel Mathias Carneiro Leão e Luiz Fernando Bianchini, pela amizade e colaboração.

Aos colegas do Laboratório de Pesquisas em Células Neoplásicas, Ana Paula Azambuja, Jayme Bordini Júnior, Mariana da Rocha Piomonte e Rodrigo Bagattelli, pela amizade e colaboração;

A Maria Laura Assef, pela amizade e por seu jeito expansivo;

A Ana B. da Cunha, pela amizade e por proporcionar vários momentos de descontração;

A Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Dorly de Freitas Buchi, por sua boa vontade em colaborar, pela valiosa ajuda na parte experimental e acima de tudo, por sua agradável companhia;

A Profa Dra Maria Célia Jamur, por sua boa vontade e valiosas sugestões na parte experimental deste trabalho;

Aos Professores, Luiz Fernando Fávaro, Manoel Carlos T. Quintilhan e Sonia Regina Grotzner, pela colaboração;

A secretária do Curso de Pós-Graduação em Morfologia, Departamento de Biologia Celular, Marlene B. de Camargo, por sua ajuda;

Aos colegas do curso de Pós-Graduação, pelo agradável convívio durante estes anos em que passamos juntos;

Aos funcionários e estagiários do Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas em Animais Peçonhentos (LIPAPE), pela ajuda prestada durante a fase experimental deste trabalho;

Ao Laboratório de Histotecnologia, do Departamento de Biologia Celular, nas pessoas do Sr. Herculano Salviano dos Reis Filho (Nino), Rosalina de Moraes e Eliane Regina Nascimento Mendes, pela preciosa ajuda;

Ao Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR, pelo acesso à utilização dos equipamentos e em especial a Sra. Matilde e a Vera Regina Pionteke, pela colaboração e boa vontade;

Ao Sr. Mauricio Pereira Cantão, do Laboratório de Análise da COPEL -UFPR, pelo alto nível profissional e disposição em ajudar;

Aos funcionários e professores do Departamento de Biologia Celular, pelo

incentivo e apoio;

Aos professores do curso de Pós-Graduação, pelos ensinamentos que nos foram passados, para o aprimoramento de nossos conhecimentos;

Aos funcionários da Biblioteca do Setor de Ciências Biológicas, pela presteza e boa vontade no atendimento;

Ao diretor do Setor de Ciências Biológicas da UFPR, Prof. Dr. Oldemir Carlos Mangili, pelo apoio e incentivo durante a realização deste trabalho;

Ao Prof. Mário Portugal Pederneiras, pelo apoio prestado durante o período em que foi diretor do Setor de Ciências Biológicas da UFPR.

Ao coordenador do Curso de Pós-Graduação em Morfologia-Biologia Celular, Prof. Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro, pelo trabalho e valorização do Curso;

À CAPES, pelo apoio financeiro;

Aos meus familiares e a todos, que de uma forma ou outra ajudaram na execução deste trabalho.

## SUMÁRIO

<b>FIGURAS</b>	<b>xi</b>
<b>ABREVIATURAS</b>	<b>xii</b>
<b>MATERIAIS E APARELHOS UTILIZADOS</b>	<b>xiii</b>
<b>RESUMO</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>3</b>
<b>1. INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	
1.1. AS ARANHAS	5
1.2. ARANHAS DO GÊNERO <i>Loxosceles</i>	5
1.3. DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA	7
1.4. O LOXOSCELISMO	7
1.5. O LOXOSCELISMO NO ESTADO DO PARANÁ	10
1.6. GLÂNDULAS PRODUTORAS DE VENENO E QUELÍCERAS	11
1.7. REGIÃO EXTRACELULAR DA GLÂNDULA PRODUTORA DE VENENO	13
1.8. CARACTERÍSTICAS DO VENENO	15
1.9. A GLICOSILAÇÃO	16
1.10. AS LECTINAS	17
1.11. GLICOBIOLOGIA DO VENENO	18
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>20</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	
3.1. MATERIAIS	21
3.2. ANIMAIS	21
3.3. MÉTODOS HISTOLÓGICOS PARA MICROSCOPIA DE LUZ	22
3.3.1. COLORAÇÃO COM HEMATOXILINA E EOSINA	22
3.3.2. COLORAÇÃO COM ÁCIDO PERIÓDICO – REATIVO DE SCHIFF (PAS)	23
3.3.3. COLORAÇÃO COM AZUL DE ALCIAN	23
3.3.4. COLORAÇÃO COM PICROSÍRIUS	24
3.4. ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA	24

3.5. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO	25
3.6. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	26
3.7. OBTENÇÃO DO VENENO	26
3.8. ELETROFORESE EM GEL ANALÍTICO (SDS-PAGE)	27
3.9. REAÇÃO LECTINA-BLOTTING	27
3.10. DEGLICOSILAÇÃO DAS PROTEÍNAS DO VENENO	28
3.11. AVALIAÇÃO DAS CADEIAS DE GLICOSAMINOGLICANOS	28
3.12. CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE-LECTÍNICA	29
3.13. ENSAIO DE AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA	29
3.14. ESTUDO DA DEGRADAÇÃO DA FIBRONECTINA E DO FIBRINOGENO	30
3.15. EXPERIMENTOS DE ZIMOGRAMA	30
3.16. ESTUDO DA DERMONECROSE	31
<b>4. RESULTADOS</b>	
4.1. ESTUDO HISTOLÓGICO DAS GLÂNDULAS PRODUTORAS DE VENENO DE <i>L. intermedia</i> ATRAVÉS DA MICROSCOPIA DE LUZ	32
4.2. ESTUDO ULTRAESTRUTURAL DAS GLÂNDULAS PRODUTORAS DE VENENO DE <i>L. intermedia</i> ATRAVÉS DA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO	32
4.3. ESTUDO ULTRAESTRUTURAL DAS GLÂNDULAS PRODUTORAS DE VENENO DE <i>L. intermedia</i> ATRAVÉS DA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	33
4.4. ANÁLISE MOLECULAR DA MATRIZ EXTRACELULAR	34
4.5. PERFIL HETEROGÊNEO DAS PROTEÍNAS TOTAIS DO VENENO DE <i>L. intermedia</i>	35
4.6. ANÁLISE DOS RESÍDUOS DE OLIGOSSACARÍDEOS DAS PROTEÍNAS DO VENENO DE <i>L. intermedia</i> , BASEADA EM LECTINAS E GLICOSIDASES	35
4.7. ANÁLISE DA ATIVIDADE DE AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA DO VENENO TRATADO COM N-GLICOSIDASE	38
4.8. ANÁLISE DE GLICOCONJUGADOS DAS PROTEÍNAS DO VENENO DE <i>L. intermedia</i> NA ATIVIDADE FIBRONECTINOLÍTICA E FIBRINOGENOLÍTICA	39
4.9. GLICOCONJUGADOS PRESENTES NAS GLICOPROTEÍNAS SÃO IMPORTANTES PARA O EFEITO GELATINOLÍTICO NO VENENO DE <i>L. intermedia</i>	40
4.10. EVIDÊNCIAS DO PAPEL DA GLICOSILAÇÃO NA LESÃO DERMONECRÓTICA PRODUZIDA PELO VENENO	41

<b>5. DISCUSSÃO</b>	<b>63</b>
<b>6. CONCLUSÕES</b>	<b>75</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>77</b>

## FIGURAS

1A-GLÂNDULA DE VENENO DE <i>L. intermedia</i> . CORTE LONGITUDINAL. H.E.	43
1B-GLÂNDULA DE VENENO DE <i>L. intermedia</i> . CORTE TRANSVERSAL. H.E.	44
2-GLÂNDULAS DE VENENO DE <i>L. intermedia</i> . M.E.V.	45
3A-GLÂNDULA DE VENENO DE <i>L. intermedia</i> . M.E.T.	46
3B-GLÂNDULA DE VENENO DE <i>L. intermedia</i> . M.E.T.	45
3C-GLÂNDULA DE VENENO DE <i>L. intermedia</i> . M.E.T.	46
3D-GLÂNDULA DE VENENO DE <i>L. intermedia</i> . M.E.T.	46
3E-GLÂNDULA DE VENENO DE <i>L. intermedia</i> . M.E.T.	47
3F-GLÂNDULA DE VENENO DE <i>L. intermedia</i> . M.E.T.	47
3G-GLÂNDULA DE VENENO DE <i>L. intermedia</i> . M.E.T.	48
3H-GLÂNDULA DE VENENO DE <i>L. intermedia</i> . M.E.T.	48
3I-GLÂNDULA DE VENENO DE <i>L. intermedia</i> . M.E.T.	49
4A-GLÂNDULA DE VENENO DE <i>L. intermedia</i> . PAS.	50
4B-GLÂNDULA DE VENENO DE <i>L. intermedia</i> . AZUL DE ALCIAN – pH 1.0	50
4C e 4D-GLÂNDULA DE VENENO DE <i>L. intermedia</i> . ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA	51
4E e 4F-GLÂNDULA DE VENENO DE <i>L. intermedia</i> . ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA	51
5A-GLÂNDULA DE VENENO DE <i>L. intermedia</i> . M.E.T.	52
5B-GLÂNDULA DE VENENO DE <i>L. intermedia</i> . MÉTODO DO PICROSIRIUS	53
6-PERFIL HETEROGÊNEO DAS PROTEÍNAS DO VENENO TOTAL DE <i>L. intermedia</i>	54
7-REAÇÃO LECTINA-BLOTTING PARA AS PROTEÍNAS DO VENENO DE <i>L. intermedia</i>	55
8-AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA INDUZIDA PELO VENENO DE <i>L. intermedia</i>	57
9-PERFIL ELETROFORÉTICO EM SDS-PAGE DAS MOLÉCULAS DE FIBRINOGENIO E FIBRONECTINA DIGERIDAS PELO VENENO DE <i>L. intermedia</i>	58
10-ANÁLISE DO PAPEL DOS RESÍDUOS DE AÇÚCARES NO EFEITO GELATINOLÍTICO INDUZIDO PELO VENENO DE <i>L. intermedia</i>	59
11-LESÃO DERMONECRÓTICA, EM COELHOS, INDUZIDA PELO VENENO DE <i>L. intermedia</i> , PRÉ E PÓS DEGLICOSILAÇÃO.	61

## ABREVIATURAS

- AAA - Lectina de *Aleuria aurantia*
- ACA - Lectina de *Amaranthus caudatus*
- BSA - Soro albumina bovina
- ConA - Lectina de *Canavalia ensiformis*
- DSA - Lectina de *Datura stramonium*
- EHS - Engelbreth-Holm-Swarm
- GNA - Lectina de *Galanthus nivalis*
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - Peróxido de hidrogênio
- HE - Hematoxilina e Eosina
- HCl - Ácido clorídrico
- IEF - Focalização Isoelétrica
- IRA - Insuficiência Renal Aguda
- kDa - Kilodalton
- LIPAPE – Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas em Animais Peçonhentos. Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
- MAA - Lectina de *Mackia amurensis*
- MET - Microscopia eletrônica de transmissão
- MEV - Microscopia eletrônica de varredura
- MO – Microscopia óptica
- OsO<sub>4</sub> - Tetróxido de ósmio
- PAGE -Eletroforese em Gel de Poliacrilamida
- PAS - Ácido Periódico de Schiff
- PBS – Solução isosmótica de cloreto de sódio tamponada fosfato
- PHA-L - Lectina de *Phaseolus vulgaris*
- PNA - Lectina de *Arachis hypogaea*
- PSA - Lectina de *Pisum sativum*
- SDS - Duodecil Sulfato de Sódio
- SDS-PAGE - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Duodecil Sulfato de Sódio
- SESA - Secretaria de Saúde do Estado do Paraná
- SMS - Secretaria Municipal de Saúde de Curitiba
- SNA - Lectina de *Sambucus nigra*
- WGA - Lectina de *Triticum vulgaris*

## MATERIAIS E EQUIPAMENTOS UTILIZADOS

### MATERIAIS

- Acetato de Uranila – Merck
- Ácido acético - Merck
- Ácido Cacodílico - EMS
- Ácido clorídrico - Merck
- Acrilamida - Bio Rad Laboratories, Hercules, CA
- Agarose – Bio Rad
- Álcool Etilico - Merck
- Azul de Alcian - Merck
- Azul Brilhante de Comassie - Sigma
- Azul de Toluidina - Merck
- Citrato de Chumbo - Merck
- Cloreto de Cálcio - Merck
- Cloreto de Sódio – Merck
- Clorofórmio - Merck
- Concavalina-A-Sepharose – Pharmacia LKB-Biotechnology Inc.
- Duodecil Sulfato de Sódio (SDS) – Bio Rad
- Eosina - Merck
- Entelan - Merck
- Fibrinogênio humano - Sigma
- Fibronectina - purificada de plasma humano (cedida pelo Hospital Antônio C. Camargo - São Paulo - SP)
- Gelatina de suíno - Sigma
- Gelatina – Gibco, BRL
- Glicerol - Merck
- Glicina – Merck
- Hematoxilina – Merck
- IgG conjugada com peroxidase - Sigma
- Lectinas digoxigenadas para detecção de glicoproteínas– kit comercial – Boehringer-Mannheim Biochemica
- Lectina biotinizada de *Pisum sativum* – Sigma
- Marcadores das cadeias de glicosaminoglicanos – Seikagaku, Kogyo, Co.
- Marcadores de massa molecular para proteínas - Sigma
- Metanol – Merck
- Metaperiodato de sódio - Sigma
- 2- mercaptoetanol - Sigma
- Membranas de nitrocelulose – Bio-Rad
- N-glicosidase F - Boehringer
- N,N,N,N-tetrametil etilenodiamina - TEMED - Sigma
- Neuraminidase - Boehringer
- Ovoalbumina- Sigma

- Óxido de Propileno – Merck
- Parafina - Merck
- Picrosirius -Merck
- Peróxido de Hidrogênio – Merck
- Proteinase-K - Sigma
- Persulfato de Amônio - Bio Rad
- Reativo de Schiff - Merck
- Resina Epon - EMS
- Sepharose - Sigma
- Soro Albumina Bovina - Sigma
- Tampão acetato 1,3-diaminopropano – Aldrich Chemical
- Tetróxido de Ósmio - EMS
- Tris- Bio Rad
- Triton X-100 - Bio Rad
- Veneno de *Loxosceles intermedia* - cedido pelo Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas em Animais Peçonhentos (LIPAPE). Curitiba - PR
- Xilol – Merck
- $\alpha$ -D-metil-manosídeo - Sigma

## EQUIPAMENTOS

- Agitador orbital - Shaker - Nova Técnica (Brasil)
- Aparelho para desidratação com CO<sub>2</sub> - BALZERS CPD010
- Aparelho para metalização – BALZERS SCD030
- Centrífuga a vácuo - Concentrator 530 A - Brinkmann Inst. Insc. (Alemanha)
- Estufa a 37°C - Biometric (Porto Alegre, Brasil)
- Estufa a 60°C - Soc. Fabbe Ltda (São Paulo, Brasil)
- Estufa BOD Q315D - Quimis (Brasil)
- Fotomicroscópio Axiophot - Zeiss (Alemanha)
- Microscópio eletrônico de transmissão – JEOL-JEM 1200 EX II
- Microscópio eletrônico de varredura – MEV XL-30 Philips
- Micrótomo - E. Leitz (Alemanha)
- Sistema para eletroforese em gel - Portram II - Bio Rad
- Sistema de eletrotransferência gel-papel - Bio Rad
- Ultra-micrótomo - LKB NOVA

## RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo, estudar, a morfologia das glândulas produtoras de veneno da aranha *L. intermedia*, bem como esclarecer questões relacionadas ao perfil e funções dos oligossacarídeos conjugados às glicoproteínas deste veneno.

A aranha marrom, do gênero *Loxosceles*, tornou-se de grande importância médica, devido aos acidentes de envenenamento (loxoscelismo) que vem ocorrendo em diferentes partes do mundo. As atividades biológicas do veneno da aranha marrom normalmente incluem lesões dermonecroticas no local da picada, acompanhadas por efeitos hemolíticos e hemorrágicos e também pelo quadro clínico de insuficiência renal aguda (IRA).

Pelo uso de microscopia óptica, microscopia eletrônica de transmissão e de varredura, demonstrou-se que a organização das glândulas produtoras de veneno de *Loxosceles intermedia* seguem a arquitetura geral das glândulas de veneno de outras aranhas. A microscopia eletrônica de varredura mostrou que as glândulas de veneno são estruturas pares, situadas no cefalotórax e que descarregam seus produtos de secreção diretamente em um par de tubos ligados a cada quelícera. Usando-se microscopia óptica e microscopia eletrônica de transmissão, observou-se que as glândulas apresentam camadas de fibras de músculos estriados, em contato com uma membrana basal que separa a região muscular da camada epitelial. As células epiteliais possuem um citoplasma rico em retículo endoplasmático rugoso, mitocôndrias, complexo de Golgi e vesículas secretoras contendo o veneno, uma mistura complexa de proteínas.

Com as técnicas de lectina-blotting, cromatografia de afinidade lectínica e tratamentos com glicosidases, detectou-se no veneno estruturas do tipo alta-manose N-ligadas, proteínas com resíduos de fucose N-ligados e proteínas com resíduos de N-acetilgalactosamina O-ligados, mas ausência de glicosaminoglicanos ou estruturas complexas contendo galactose ou ácido siálico terminais. Com veneno deglicosilado enzimática ou quimicamente, demonstrou-se que a agregação plaquetária (atividade trombocitopênica), como também os efeitos fibronectinolítico e fibrinogenolítico (hemorrágicos), são açúcar-independentes quando comparados com os efeitos do veneno glicosilado. Uma análise através de zimograma copolimerizado em géis de gelatina, mostrou que a loxolisina B, uma metaloprotease gelatinolítica de 32-35 kDa, é uma glicoproteína do tipo alta-manose e que após uma N-deglicosilação enzimática teve seu peso molecular reduzido em aproximadamente 2 kDa e seu efeito gelatinolítico residual em 28%, quando comparado com a molécula glicosilada. Nesta condição apontou também uma atividade gelatinolítica dependente da glicosilação pós-traducional. O tratamento químico ou enzimático do veneno de *L. intermedia* (deglicosilação), reduziu significativamente seu efeito dermonecrótico quando testado experimentalmente em coelhos. Este dado sugere fortemente que resíduos de oligossacarídeos exercem um importante papel nos efeitos lesivos do veneno da aranha marrom e abre a possibilidade de se postular uma terapia tópica das lesões cutâneas, baseada em carboidratos.

## ABSTRACT

The objective of the present study was to describe the morphology of the venom glands of *L. intermedia*, and to study the profile and functions of the oligosaccharides in the proteins of the referred venom.

The brown spider, genus *Loxosceles*, is becoming of great medical importance, with envenomation (Loxoscelism) occurring throughout the world. The biological activities of the brown spider venom usually include dermonecrotic lesions at the bite site accompanied by hemolytic and hemorrhagic effects and also by renal failure.

Through light microscopy, transmission electron microscopy and scanning electron microscopy, it was demonstrated that the organization of the venom gland of *Loxosceles intermedia* follows the general architecture of spiders' venom glands. Scanning electron microscopy showed that the venom glands are paired organs located in the cephalothorax, which discharge their secretions directly via a duct to each chelicera. Using light microscopy and transmission electron microscopy we observed that the venom glands of *L. intermedia* present layers of striated muscle fibers in touch with an extracellular matrix which is a basement membrane structure separating the muscular region from epithelial cells of the venom gland. This structure has a cytosol extremely rich in rough endoplasmic reticulum, mitochondria, Golgi apparatus and secretory vesicles that ultimately produce the venom, a complex protein mixture.

Using lectin-immunolabeling, lectin-affinity chromatography, glycosidases and proteinase-K treatments we were able to identify in venom several proteins as N-

glycosylated and bearing high-mannose oligosaccharide structures, complex-type glycoconjugates as fucosylated glycans, but absence of galactose or sialic acid residues as complex sugars or glycosaminoglycan residues. Working with enzymatic or chemically deglycosylated venom we found that platelet aggregation (thrombocytopenic activity) as well as fibronectinolytic and fibrinogenolytic (haemorrhagic) effects were sugar-independent when compared to glycosylated venom. Nevertheless zymograph analysis in co-polymerized gelatin gels showed that loxolysin-B, a high-mannose glycoprotein of the venom with 32-35 kDa and gelatinolytic metalloproteinase activity, after enzymatic N-deglycosylation reduces its molecular weight by approximately 2 kDa and gelatinolytic effect to a residual activity of 28% when compared to the glycosylated molecule, pointing to post-translational glycosylation dependent gelatinolytic effect. Analysis of the chemically or enzymatically N-deglycosylated venom for its dermonecrotic effect detected only residual activity when compared with the glycosylated control. Thus, the present report suggests oligosaccharide moieties playing a role in destructive effects of brown spider venom and opens a possibility for a carbohydrate-based therapy.

# 1. INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

## 1.1. AS ARANHAS

Dentro do grupo dos artrópodes terrestres, a classe dos aracnídeos é a segunda em número de espécies, sendo que as aranhas compõem seu maior subgrupo (RUPPERT e BARNES, 1996).

As aranhas possuem o corpo dividido em 2 segmentos, o cefalotórax (união entre cabeça e tórax) e o abdômen. Apresentam 4 pares de patas, quelíceras e pedipalpos e podem possuir até 8 olhos (RUPPERT e BARNES, 1996).

São encontradas em praticamente todos os habitats e costumam estabelecer-se numa grande variedade de ambientes naturais e domésticos. Apresentam hábito alimentar carnívoro e se alimentam de insetos, desempenhando, com isso, papel importante no equilíbrio ecológico (BARBARO et al., 1995; RUPPERT e BARNES, 1996; SOERENSEN, 1996).

Foram descritas aproximadamente 35.000 espécies de aranhas o que representa, provavelmente, apenas uma parte do número real. Das espécies descritas, estima-se que menos de 100 são potencialmente perigosas ao homem (JORGE et al., 1991; BARBARO et al., 1995; RUPPERT e BARNES, 1996).

## 1.2. ARANHAS DO GÊNERO *Loxosceles*

As aranhas marrons, do gênero *Loxosceles*, pertencem à família Loxoscelidae, sub-ordem Labidognatha, ordem Araneida, classe Arachnida e filo Arthropoda (RUPPERT e BARNES, 1996; SOERENSEN, 1996). Possuem colorido uniforme que varia de marrom claro até marrom escuro, podendo apresentar

mancha clara (*Loxosceles gaucho*,) ou mancha escura (*Loxosceles laeta*), no cefalotórax. São aranhas pequenas e possuem comprimento corporal variando de 8 a 15 mm e suas patas medem de 8 a 30mm. Os machos têm corpo menor e pernas relativamente mais longas do que as fêmeas. Possuem 6 olhos brancos brilhantes reunidos sobre o cefalotórax, em 3 grupos de 2, em semi-círculo. O cefalotórax é baixo, não ultrapassando em altura o abdômen (BÜCHERL, 1972).

As *Loxosceles spp* são aranhas sedentárias e possuem hábitos noturnos. Preferem a escuridão e algumas vivem sob pedras, troncos de árvores, restos de vegetais, telhas, tijolos empilhados e entulhos. Dentro das casas são encontradas atrás de quadros e móveis, no meio de roupas, livros, caixas de papelão e outros objetos. Constróem teias irregulares semelhantes a algodão esfiapado. Alimentam-se de pequenos insetos e se reproduzem com facilidade, mesmo em ambientes desfavoráveis (HITE et al., 1960; BÜCHERL, 1960-62; GAJARDO-TOBAR, 1966; LUCAS et al., 1983-84; RODRIGUES et al., 1986; JORGE et al., 1991, FUTRELL, 1992). Suportam temperaturas que variam entre 8 à 43°C. Os acidentes com a aranha marrom ocorrem principalmente durante os meses mais quentes do ano, como primavera e verão (74%) (SCHENONE e LETONJA, 1975; MANFREDINI et al., 1993). Ambos os sexos são venenosos e podem sobreviver até 276 dias sem água e alimento (LOWRIE, 1980; GERSTCH e ENNIK, 1983; FUTRELL, 1992).

A maior incidência de acidentes com o homem deve-se ao fato da aranha marrom ter adquirido hábitos intra-domiciliares, pois, ao contrário de outros animais peçonhentos, como ofídios, escorpiões e outros quelicerados, elas não são agressivas e picam o homem quando comprimidas inadvertidamente contra a pele no ato de vestir-se, enxugar-se ou durante o sono (SUAREZ et al., 1971; LUCAS,

1988; FUTRELL, 1992).

### 1.3. DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA

As aranhas do gênero *Loxosceles* têm vasta distribuição pelo mundo tropical, subtropical e temperado, principalmente no continente americano, a começar pelos países da América do Norte, América Central e das Antilhas e em grandes proporções, não poucas vezes alarmantes, em determinadas regiões do Peru, Chile, Argentina, Uruguai e Brasil.

Das espécies do gênero *Loxosceles*, que ocorrem no continente americano, 18 são encontradas na América do Norte, América Central e Antilhas e 30 na América do Sul. No Brasil ocorrem 7 espécies heterogeneamente distribuídas: *Loxosceles gaucho*, encontrada em São Paulo e Rio Grande do Sul; *Loxosceles similis*, encontrada na Paraíba, São Paulo e Minas Gerais; *Loxosceles adelaide*, encontrada no Rio de Janeiro; *Loxosceles hirsuta*, encontrada no Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná; *Loxosceles intermedia*, encontrada do Rio Grande do Sul ao Rio de Janeiro; *Loxosceles amazônica*, encontrada no Amazonas e Ceará e *Loxosceles laeta*, encontrada nas regiões sul e leste (BÜCHERL, 1972; SOERENSEN, 1996).

### 1.4. O LOXOSCELISMO

As aranhas do gênero *Loxosceles* provocam nos acidentados um quadro clínico denominado Loxoscelismo, o qual pode gerar dois tipos de efeitos: o cutâneo ou dermonecrótico e o cutâneo-visceral ou sistêmico. O desenvolvimento de um efeito ou outro, ou de ambos vai depender de alguns fatores relacionados com o

indivíduo acidentado, como estado nutricional, idade, local da picada, quantidade de veneno inoculado, susceptibilidade ao veneno e o tempo em que o indivíduo leva para procurar um tratamento adequado (GAJARDO-TOBAR, 1966; SCHENONE et al., 1989; BARBARO et al., 1994b).

O quadro cutâneo caracteriza-se pela presença de dermonecrose e inclui 80% dos casos de loxoscelismo. Por ser pouco dolorosa, a picada inicial geralmente passa despercebida pelo paciente. Após 2 a 8 horas, a dor pode variar de moderada a severa. É descrita como dor local do tipo “queimação” ou ardência, e pode ser acompanhada de prurido, edema, eritema, sensação de mal-estar geral, podendo em alguns, casos ocorrer febre. Após estes primeiros sinais, pode surgir no local da picada uma lesão de 1 a 30 cm de diâmetro, circundada por um halo vermelho e zona pálida, denominada placa marmórea (FUTRELL, 1992).

Após 3 a 5 dias do acidente pode haver acúmulo de leucócitos polimorfonucleares, necrose e formação de abscesso (SMITH e MICKS, 1970; FUTRELL, 1992).

Em alguns casos pode ocorrer necrose, com formação de úlcera necrótica ou mancha gangrenosa, de difícil cicatrização, e a cura não se completa em menos de um mês. No local da lesão, como sequela, permanece cicatriz que pode ser desfigurante ou até mesmo causar prejuízo funcional. Nesses casos, uma cirurgia reparadora pode, às vezes, solucionar tais problemas (JORGE et al.; 1991, FUTRELL, 1992).

Por razões óbvias, não foram executadas biópsias consecutivas do desenvolvimento de loxoscelismo cutâneo em humanos. Porém, as mudanças histopatológicas informadas, incluem edema e espessamento do endotélio dos

vasos sanguíneos, presença de células inflamatórias, vasodilatação, coagulação intravascular, degeneração da parede dos vasos sanguíneos, hemorragia dérmica e até mesmo subcutânea (SMITH e MICKS., 1970; FUTRELL, 1992).

Em estudos realizados em coelhos, amostras histopatológicas mostraram, após 3 horas, o acúmulo de leucócitos polimorfonucleares ao redor de vênulas e eritrócitos extravasculares, sugerindo perda da integridade vascular. Nas arteríolas, foi verificado somente edema de células endoteliais. Após 6 horas, havia edema da derme e epiderme, infiltração de leucócitos polimorfonucleares nas paredes das vênulas, vasodilatação, coagulação intravascular, hemorragia volumosa subcutânea e na derme, e até mesmo no músculo, necrose, vacuolização das paredes das arteríolas e destruição da sua integridade estrutural. Após 48 horas, o infiltrado de leucócitos polimorfonucleares mostrou continuidade do crescimento (FUTRELL, 1992).

O loxoscelismo cutâneo-visceral ou sistêmico atinge 14% dos casos e ocorre com menos frequência. As primeiras manifestações aparecem após 24 horas e os sintomas incluem astenia, febre, episódios eméticos, alterações sensoriais, cefaléia, insônia e, nos casos mais graves, ocorrem convulsões e coma. Podem também ocorrer prurido generalizado e petéquias (MARTINEZ-VARGAS, 1987; SCHENONE et al., 1989; FUTRELL, 1992; BRAVO et al., 1993).

Nos casos mais graves, as alterações no quadro hematológico incluem anemia hemolítica, trombocitopenia e coagulação intravascular disseminada, as quais podem determinar diminuição do hematócrito, aumento da bilirrubina indireta e icterícia (SCHENONE e SUÁREZ, 1978; REES et al., 1988; SILVA, 1988; FUTRELL, 1992).

Outras consequências decorrentes do envenenamento incluem alterações vasculares nos pulmões, fígado e rins (PIZZI et al., 1957).

Uma das alterações funcionais mais graves é a insuficiência renal aguda (IRA), a qual caracteriza-se por hemoglobinúria e hematúria, que em algumas situações, podem ocasionar a obstrução da luz tubular. A IRA pode ser do tipo oligúrica e não oligúrica, e em casos extremos pode levar o paciente a óbito (WASSERMAN and ANDERSON, 1983-84; SCHENONE et al., 1989; JORGE et al., 1991; FUTRELL, 1992).

Os mecanismos moleculares do loxoscelismo que provocam a IRA são desconhecidos, porém foi detectado que o veneno de *L. intermedia* tem atividade entactinolítica e degradadora do domínio protéico de heparan-sulfato proteoglicano, importantes constituintes moleculares encontrados nas membranas basais. Como as membranas basais são estruturas fundamentais nos glomérulos renais, envolvidas com a formação da urina, tal efeito degradativo sobre alguns dos seus constituintes pode explicar, em parte, os problemas renais provocados pelo veneno (VEIGA et al., 1999b).

## 1.5. O LOXOSCELISMO NO ESTADO DO PARANÁ

O loxoscelismo tornou-se um problema de grande interesse para a área médica e Saúde Pública no Estado do Paraná, pois os índices de acidentes vem aumentando de forma alarmante. Outro fator preocupante é a elevada infestação domiciliar da aranha da espécie *L. intermedia*.

No Brasil, o Estado do Paraná tem sido o que mais notifica esses acidentes. Eles correspondem a mais de 50% daqueles provocados por aracnídeos notificados

no Ministério de Saúde do Brasil.

Segundo dados da Secretaria de Saúde do Estado do Paraná, em 1990 foram diagnosticados 526 casos, passando para 1111 casos no ano seguinte. Já em 1992, o número de casos situou-se em 1057 casos, porém em 1993 voltou a subir, sendo registrados 2148 casos. Em 1994 foram diagnosticados 2428 casos e 2722 em 1995. Já em 1996 o número de casos ficou em 2898 e em 1997 foram 2456 casos (SESA).

Dados parciais da Secretaria Municipal de Saúde de Curitiba, indicam que na cidade de Curitiba e região metropolitana, ocorreram 1093 casos de acidentes no ano de 1998 (SMS).

## 1.6. GLÂNDULAS PRODUTORAS DE VENENO E QUELÍCERAS

Segundo alguns autores, o veneno de *Loxosceles spp* é produzido por glândulas apócrinas, situadas no cefalotórax, que comunicam-se com o exterior através de dois ductos que desembocam no aparelho inoculador, constituído por um par de quelíceras (GAJARDO-TOBAR, 1966; MARTINEZ-VARGAS, 1987). As quelíceras situam-se na parte anterior do cefalotórax e possuem papel comparável às mandíbulas dos insetos, possuindo, porém, origem diferente. São constituídas por dois segmentos, um basal, largo e robusto e um terminal, em forma de ferrão ou garra. São soldadas na base e medem aproximadamente 0.3 mm de comprimento e seus ferrões, fortemente recurvos, não ultrapassam 3 décimos de milímetros (BRAZIL e VELLARD, 1925; BÜCHERL, 1972).

A posição dos ferrões nas aranhas permite dividi-las em duas sub-classes: as

Araneomorphae, que apresentam ferrões inoculadores de veneno, perpendiculares ao eixo longitudinal do corpo e as Megalomorphae, que apresentam os ferrões paralelos entre si e paralelos ao eixo longitudinal do corpo. Todas as espécies do continente americano que podem causar acidentes humanos com necessidade de tratamento médico especializado, pertencem à sub-classe Araneomorphae (BRAZIL e VELLARD, 1925; SOERENSEN, 1996).

Nas aranhas megalomorfas, as glândulas são livres, sem aderências aos órgãos vizinhos. Nas araneomorfas, encontram-se rodeadas por massas musculares, partindo do tórax até as patas anteriores. O canal excretor abre-se um pouco antes da extremidade do ferrão das quelíceras, por um pequeno orifício de forma variável (BRAZIL e VELLARD, 1925). A musculatura das aranhas forma feixes estriados, sendo bem desenvolvida no cefalotórax. Grande parte dos músculos nas araneomorfas serve para movimentar as extremidades das quelíceras e as duas glândulas de veneno (BÜCHERL, 1972).

A organização das glândulas de veneno das aranhas do gênero *Loxosceles* segue a arquitetura vista nas aranhas em geral, onde o epitélio secretor é revestido por uma membrana basal e rodeado por uma espessa musculatura composta por fibras musculares estriadas longitudinais e circulares que envolvem o corpo da glândula e por onde penetra o nervo glandular (BRAZIL e VELLARD, 1925; VELLARD, 1966; JUNQUA e VACHON, 1968; BÜCHERL, 1972; FOIL et al., 1979; RIDLING e PHANUEL, 1986).

O corpo glandular tem sempre o aspecto de um saco. O lúmen central da glândula serve como reservatório das substâncias venenosas elaboradas. Para a completa eliminação do veneno no ato da picada, existem no cefalotórax e no

artículo basal das quelíceras, dois feixes musculares que puxam para a frente o fundo do saco glandular, ao mesmo tempo que os feixes circulares o comprimem (BÜCHERL, 1972).

## 1.7. REGIÃO EXTRACELULAR DA GLÂNDULA PRODUTORA DE VENENO

A camada extracelular situada entre a camada muscular e o epitélio excretor é descrita por diversos autores como membrana basal (BRAZIL e VELLARD, 1925; SMITH e RUSSELL, 1967; FOIL ET AL., 1979; RIDLING e PHANUEL, 1986).

As membranas basais representam uma classe especial de matriz extracelular, descritas em todas as espécies de animais multicelulares. Desempenham diversas funções como suporte e compartimentalização de tecidos, diferenciação e migração celular, e a filtração seletiva de macromoléculas nos glomérulos renais. São produzidas por grande número de células sendo as principais as epiteliais, endoteliais, musculares, nervosas e os adipócitos. São formadas por duas lâminas bastante amorfas, a *lamina lucida* (ou rara) e a *lamina densa*, que, juntas, variam em espessura entre 30 e 300 nm, dependendo da localização e origem do tecido (TIMPL et al., 1987; YURCHENCO e SCHITTNY, 1990).

Os principais componentes encontrados nas membranas basais são laminina, entactina, colágeno tipo IV e heparan sulfato proteoglicano.

A laminina é o principal componente não colagênico presente somente em membranas basais. É a primeira proteína da matriz extracelular a ser sintetizada durante a embriogênese e exibe uma variedade de atividades biológicas como

promoção da adesão das células metastatizantes, crescimento neuronal e diferenciação de vários tipos celulares, como células endoteliais e epiteliais. Foi isolada pela primeira vez do tumor de camundongo EHS (Engelbreth-Holm Swarm). Possui aproximadamente 850 kDa e é formada por três cadeias polipeptídicas, denominadas: cadeia  $\alpha_1$  com pesos aproximados de 440 kDa, cadeia  $\beta_1$  e a cadeia  $\gamma_1$  com peso aproximado de 220 kDa, organizadas na forma de uma cruz assimétrica e ligadas entre si por pontes dissulfeto (TIMPL et al., 1979; BECK et al., 1990; YURCHENCO e SCHITTNY, 1990; TRYGVASON, 1993). Possui vários domínios, ligando as células, além de também interagir com outras moléculas da matriz extracelular como o colágeno tipo IV, o heparan sulfato proteoglicano e a entactina (nidogênio) (YURCHENCO e SCHITTNY, 1990). Sabe-se que hoje existem diferentes isoformas da molécula de laminina, os quais variam em sua organização estrutural e molecular em vários tecidos (TRYGVASON, 1993).

A entactina e nidogênio são nomes diferentes dados a uma mesma macromolécula. Possui aproximadamente 150 kDa e o formato de um haltere, com uma haste central de 27 kDa e em cada porção final um domínio globular de 38 a 85 kDa. É uma outra glicoproteína presente só nas membranas basais, altamente susceptível a proteólise e que possui atividade ligante nas células e em vários constituintes da matriz extracelular como a laminina, colágeno IV e heparan sulfato (YURCHENCO e SCHITTNY, 1990; TIMPL et al., 1992).

O colágeno tipo IV é um dos componentes principais das membranas basais, totalizando de 20 a 70% da sua massa total. É, presumivelmente, a única proteína colagênica encontrada nestas matrizes. O monômero consiste em uma longa tripla hélice com 400 nm e é composto por dois tipos de cadeias  $\alpha$ : duas cadeias  $\alpha_1$  (IV) e

uma cadeia  $\alpha 2$  (IV), enroladas em hélice. Pode ainda formar uma rede tridimensional estável na membrana basal através de três tipos de interações. Na primeira, pares de glóbulos de COOH-terminais unem-se através de pontes dissulfeto para formar dímeros lineares. Na outra interação, quatro NH<sub>2</sub>-terminais ligam-se a outros para formar um domínio (7S) super-enrolado e, na última, os dímeros de colágeno tipo IV interagem em associações laterais, resultando em rede-trama poligonal de geometria irregular (YURCHENCO e SCHITTNY, 1990).

O heparan sulfato proteoglicano é outra macromolécula encontrada nas membranas basais, caracterizada pela presença de um núcleo protéico ligado covalentemente a cadeias de heparan sulfato. Sua presença na membrana basal foi demonstrada pela primeira vez no glomérulo renal. Os proteoglicanos conferem às membranas basais a sua propriedade de semipermeabilidade e filtração seletiva devido a suas cadeias polianiónicas (TIMPL et al., 1979; YURCHENCO e SCHITTNY, 1990).

## 1.8. CARACTERÍSTICAS DO VENENO

Os venenos produzidos pelas aranhas *Loxosceles spp* são essencialmente protéicos, com ação enzimática ou tóxica e podem ser comparados a alguns venenos de cobras, onde os estudos demonstraram a presença de enzimas proteolíticas em sua composição (MARTINEZ-VARGAS, 1987). Entre elas, foram descritas uma esfingomielinase de 32 kDa, envolvida aparentemente na agregação plaquetária (KURPIEWSKI et al., 1981) e outras moléculas de 33, 34 e 35 kDa associadas com atividades nocivas do veneno (GEREN et al., 1976; BARBARO et al., 1992; TAMBOURGI et al., 1995; FEITOSA et al., 1998; VEIGA et al., 1999a). O

veneno contém ainda outros fatores hemorrágicos, uma metaloprotease de 20-28 kDa (loxolisina A), com efeitos sobre a fibronectina e o fibrinogênio e uma metaloprotease gelatinolítica de 32-35 kDa (loxolisina B), provavelmente associada com a atividade dermonecrótica do veneno (FEITOSA et al., 1998).

## 1.9. A GLICOSILAÇÃO

A glicosilação de proteínas é uma das mais importantes modificações pós-traducionais. Ela precede ou atua na incorporação destas proteínas nos vários compartimentos teciduais, assim como na sua ativação funcional ou secreção. Também determina muitas das propriedades funcionais e estruturais, conferindo-lhes funções biológicas essenciais e direcionando sua movimentação transcelular (DAMJANOV, 1987).

As glicoproteínas são classificadas de acordo com o tipo de ligação açúcar-proteína que possuem, podendo no entanto, conter mais de um tipo de ligação. As glicoproteínas nucleares e citoplasmáticas contêm uma ou mais metades de N-acetilglicosamina que são O-ligados a resíduos específicos de serina e treonina (O-GlcNAc). O O-Glc-NAc é altamente dinâmico fisiologicamente, ligado a uma multidão de diferentes proteínas e abundante em todos os eucariontes. As glicoproteínas N-ligadas contêm oligossacarídeos complexos unidos ao grupo amina da asparagina, via ligação glicosamina. Os oligossacarídeos N-ligados são também encontrados em grande número de proteínas transmembranosas ou secretadas nos domínios extracelulares (HART, 1992).

Os carboidratos desempenham muitas funções estruturais nas glicoproteínas, estabilizando a conformação das proteínas, aumentando a solubilidade na água,

protegendo contra a degradação proteolítica, servindo como sinal para secreção e, em alguns instantes, desempenhando um papel importante em atividades biológicas dependentes das interações ligante-receptor (KORNFELD et al., 1985; ELBEIN , 1991; HART, 1992; VEIGA et al., 1995).

## 1.10. AS LECTINAS

As lectinas são proteínas que se ligam a carboidratos. Algumas delas têm a capacidade de aglutinar células (eritrócitos) e/ou precipitar glicoconjugados, sendo por isso também chamadas de aglutininas. Essas moléculas carregam pelo menos dois sítios ligantes de açúcares, não possuem nenhuma atividade enzimática e podem ser de origem bacteriana, animal ou vegetal. O termo lectina foi usado pela primeira vez, como nome genérico para substâncias que têm a capacidade de se ligar como anticorpos, porém sem fazer parte da resposta imune induzida por estimulação antigênica (DAMJANOV, 1987).

As lectinas são classificadas quanto a sua capacidade de se ligar a certos tipos de carboidratos. Podem ainda ser classificadas em cinco grupos, quanto a sua afinidade de ligação a açúcares D-piranoose, sendo eles: a) glicose-manose; b) N-acetilglicosamina; c) galactose-N-acetilgalactosamina; d) L-fucose e e) ácido siálico (DAMJANOV, 1987). Na Tabela 1 encontram-se os nomes e as funções biológicas de algumas lectinas utilizadas em nossos experimentos.

**Tabela 1. Lectinas utilizadas e seus respectivos oligossacarídeos ligantes**

<b>SIGLA</b>	<b>NOME</b>	<b>ESPECIFICIDADE</b>
GNA	<i>Galanthus nivalis</i>	resíduos de alta manose
Con-A	<i>Canavalia ensiformis</i>	
PSA	<i>Pisum sativum</i>	resíduos de N-acetilglicosamina
WGA	<i>Triticum vulgare</i> (wheat germ)	
AAA	<i>Aleuria aurantia</i>	resíduos de fucose
DAS	<i>Datura stramonium</i>	resíduos de 1-4 galactose, polilactosamina
PHA-L	<i>Phaseolus vulgaris</i>	
SNA	<i>Sambucus nigra</i>	resíduos de ácido siálico
MAA	<i>Maackia amurensis</i>	
ACA	<i>Amaranthus caudatus</i>	resíduos de galactose em geral O-ligados
PNA	<i>Arachis hypogaea</i> (peanuts)	

## 1.11. GLICOBIOLOGIA DO VENENO

Pouco se sabe sobre a glicobiologia de enzimas proteolíticas nos venenos. Algumas metaloproteases de cobras contém o sítio consenso de glicosilação para açúcares N-ligados. Isto foi descrito na proteína não hemorrágica H2-proteinase do veneno de *Trimmeresurus flavorides* (TAKEYA et al., 1989); na proteína hemorrágica de alto peso molecular HR1B do mesmo veneno (TAKEYA et al., 1990); em LHFII, uma protease isolada do veneno de *Lachesis muta muta* (SANCHEZ et al., 1991); na Jararhagina, uma protease hemorrágica de alto peso molecular do veneno de *Bothrops jararaca* (PAINE et al., 1992); na protease hemorrágica HR2a de baixo peso molecular do veneno de *Trimmeresurus flavorides* (MIYATA et al., 1989); na atrolisina A (Ht-a), uma protease hemorrágica isolada do veneno de *Crotalus atrox* (HITE et al., 1994) e em rhodostomina, uma protease isolada do veneno de

*Calloscelasma rhodostoma* (AU et al., 1991). Até o presente momento somente em HR1B foram detectadas 2 cadeias de açúcares na posição Asn<sup>73</sup> e Asn<sup>181</sup> (TAKEYA et al., 1990) e na atrolisina A (HT-a) que tem resíduos de açúcar como fucose, glicosamina, galactose, manose e ácido siálico nas posições Asn<sup>517</sup> e Asn<sup>533</sup> (HITE et al., 1994; FOX e BJARNASON, 1995). Contudo, apesar de glicosiladas, as funções e estruturas dos glicoconjugados destas metaloproteases de veneno são atualmente desconhecidas.

Relacionando outras proteases de venenos de cobras, pode-se mencionar a proteína ativadora do Factor-X do veneno de víbora Russell (RVV-X), uma glicoproteína com 6 oligossacarídeos N-ligados, com açúcares do tipo alta-manose, e estruturas complexas bi, tri e tetra-anténar necessárias para a manutenção das atividades biológicas desta enzima (GOWDA et al., 1994; GOWDA et al., 1996), a batroxobina, uma serino-protease do veneno de *Bothrops moojeni*, que é heterogeneamente glicosilada com açúcares do tipo complexo bi-anténar e estruturas do tipo híbridas, mas com funções desconhecidas (LOCHNIT e GEYER, 1995) e a enzima coagulante, bilineobina do veneno de *Agkistrodon bilineatus*, que contém 6 sítios de glicosilação N-ligados, com os resíduos, N-acetilglicosamina, fucose, galactose, manose e ácido N-acetilneuramínico, com os quais, de alguma maneira, regula a atividade da bilineobina visto que esta enzima deglicosilada produz mais rapidamente fibrinopeptídeo A que a bilineobina glicosilada (NIKAI et al., 1995).

## 2. OBJETIVOS

- Analisar as glândulas produtoras de veneno de *Loxosceles intermedia* através de microscopia óptica, microscopia eletrônica de transmissão e microscopia eletrônica de varredura.
- Estudar o perfil oligossacarídico das glicoproteínas constituintes do veneno da *L. intermedia* através da utilização de lectinas, glicanases, proteases e cromatografia de afinidade lectínica.
- Verificar o papel biológico dos resíduos de açúcares das glicoproteínas do veneno, em seus efeitos:
  - trombocitopênico,
  - fibronectinolítico,
  - fibrinogenolítico
  - gelatinolítico,
  - dermonecrótico.

## 3. MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1. MATERIAIS

A fibronectina humana foi purificada a partir de plasma fresco (obtido no Hospital A.C. Camargo, São Paulo, Brasil), por cromatografia de afinidade em gelatina (Sigma-St. Louis-MO, Estados Unidos da América), como descrito anteriormente (ENGVALL e RUOSLAHTI, 1977). O fibrinogênio humano foi adquirido da Sigma e a gelatina suína da Gibco, BRL, Bethesda, USA. A peptídeo-N<sup>4</sup>-(N-acetil- $\beta$ -glicosaminil) asparagina amidase F (N-glicosidase F), é proveniente de *Flavobacterium meningosepticum*, a O-glicopeptídeo endo-D-galactosil-N-acetil- $\alpha$ -galactosamino hidrolase (O-glicosidase) de *Diplococcus pneumoniae*, a sialidase de *Arthrobacter ureafaciens*, e o kit comercial contendo lectinas digoxigenadas para detecção de glicoproteínas, foi adquirido da Boehringer-Mannheim Biochemica (Mannheim, Alemanha). A lectina biotinizada de *Pisum sativum* foi adquirida da Sigma e a Conavalina-A-sepharose da Pharmacia LKB-Biotechnology Inc. (Uppsala, Suécia). As membranas de nitrocelulose da Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, Estados Unidos da América.

### 3.2. ANIMAIS

Foram utilizados indivíduos adultos de *L. intermedia*, coletados na cidade de Curitiba e região metropolitana. As aranhas foram anestesiadas com clorofórmio (Merck, Rio de Janeiro, Brasil) e as glândulas de veneno foram removidas para estudos histológicos e ultraestruturais.

Para o estudo da dermonecrose, foram utilizados coelhos neozelandeses

adultos do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR.

### **3.3. MÉTODOS HISTOLÓGICOS PARA MICROSCOPIA DE LUZ**

As glândulas de veneno foram fixadas em solução de Carnoy (álcool etílico 60% + clorofórmio 30% + ácido acético 10%) (BEÇAK e PAULETE, 1976), por 2 horas, desidratadas em soluções crescentes de etanol (Merck) (70% a 100%, durante 10 minutos cada etapa), diafanizadas em xilol (4 etapas de 100%, durante 10 minutos cada) (Merck), emblocadas em parafina (Merck), seccionadas em micrótomo (4  $\mu$ m) e coradas conforme metodologia descrita abaixo.

#### **3.3.1- COLORAÇÃO COM HEMATOXILINA E EOSINA (BEÇAK e PAULETE, 1976)**

Após a desparafinização e hidratação, os cortes foram corados com hematoxilina de Harris (Merck), por 50 segundos, lavados em água corrente por 10 minutos, 2 vezes com água destilada e corados com eosina (Merck), durante 1 minuto. Após a coloração, foram lavados com água destilada, desidratados em soluções crescentes de etanol (70 a 100%, durante 5 minutos cada etapa), diafanizados com xilol (2 etapas de 100%, durante 5 minutos cada) e montados com Entelan (Merck).

### **3.3.2. COLORAÇÃO COM ÁCIDO PERIÓDICO - REATIVO DE SCHIFF (PAS) (McMANUS, 1948)**

Após a desparafinização e hidratação, os cortes foram colocados em solução de ácido periódico 0,5% durante 5 minutos e lavados em água destilada (3 banhos rápidos). Permaneceram em reativo de Schiff durante 20 minutos e posteriormente em solução de água sulfurosa (10 ml de bissulfito de sódio 10%, 10 ml de HCl 1 N em água destilada q.s.p. 200 ml) (3 banhos, por 2 minutos cada), sendo lavados a seguir em água corrente por 10 minutos. Em seguida, foram desidratados em soluções crescentes de etanol (70 a 100%, durante 5 minutos cada etapa), diafanizados com xilol (2 vezes, durante 5 minutos cada etapa) e montados com Entelan. Para controle negativo da reação, foi omitida a etapa em que os cortes passam pela solução de ácido periódico.

### **3.3.3. COLORAÇÃO COM AZUL DE ALCIAN(BEÇAK e PAULETE, 1976)**

Os cortes desparafinizados e hidratados, foram corados com solução de azul de Alcian, pH 1.0, durante 30 minutos. Foram, em seguida, lavados em água destilada e desidratados em soluções crescentes de etanol (95 a 100%, por 1 minuto cada etapa), diafanizados com xilol (2 vezes, durante 1 minuto cada etapa) e montados com Entelan.

Para controle negativo, foi realizada uma reação de metilação. Após a hidratação, os cortes passaram por uma solução contendo álcool metílico mais HCl

concentrado, durante 5 horas, em estufa à 60°C, sendo, em seguida, lavados em água destilada e corados como descrito acima.

### 3.3.4. COLORAÇÃO COM PICROSIRUS (JUNQUEIRA et al., 1979)

Após a desparafinização e hidratação, os cortes foram corados com picrosirus por 1 hora, passados por uma solução de HCl 0.01N por 2 minutos e lavados em água destilada durante 2 minutos. Foram então corados com hematoxilina de Harris por 1 minuto, lavados em água corrente por 10 minutos e desidratados em soluções crescentes de etanol (90 a 100%, durante 5 minutos cada etapa), diafanizados com xilol (2 vezes de 100%, durante 5 minutos cada etapa) e montados com Entelan.

## 3.4. ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA

Os cortes obtidos através de microtomia e aderidos em lâminas de vidro foram desparafinizados em xilol (1 etapa de 100%, durante 12 horas e 2 etapas de 100%, durante 5 minutos) e rehidratados em soluções decrescentes de etanol (100% a 70%, durante 5 minutos cada etapa) e água destilada. O material foi lavado com PBS e incubado em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Merck), a 3%, em temperatura ambiente, por 15 minutos, para inibir a atividade das peroxidases endógenas, e em seguida foi lavado com PBS. Para bloquear os sítios inespecíficos foi utilizado BSA (albumina de soro bovino) (Sigma) a 1% em PBS à temperatura ambiente por 30 minutos em câmara úmida. Depois de ser lavado em PBS, o material foi incubado com anticorpo primário

policlonal anti-laminina (gentilmente cedido pelo Dr. R.R. Brentani do Instituto Ludwig de Pesquisa contra o Câncer) diluído em PBS na proporção 1:500 ou anticorpo primário policlonal anti-entactina diluído em PBS na proporção de 1:500 (produzido em nosso laboratório) usando-se entactina purificada do tumor de EHS, como descrito por HARLOW e HANE, (1988) por 2 horas à 37°C. O excesso de anticorpo foi removido com PBS, sendo então o material incubado com anticorpos contra IgG de coelho, conjugados com peroxidase (1:100) (Sigma), por 2 horas. Em seguida foi lavado com PBS e a imunorreatividade foi visualizada através de diaminobenzidina (Sigma). O material foi novamente lavado em PBS, desidratado em soluções crescentes de etanol (70 a 100%, durante 2 minutos cada etapa), diafanizado com xilol (2 vezes de 100%, durante 2 minutos cada etapa) e montado com Entelan. As reações de controle negativo foram realizadas por incubação dos cortes com soro normal de coelho em PBS, em vez do respectivo soro hiperimune, mantendo-se as demais etapas.

### 3.5. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (GREMSKI, 1986, 1991)

Para microscopia eletrônica de transmissão, as glândulas de veneno foram fixadas em solução de Karnovsky modificada (KARNOVSKY, 1965) por 2 horas. Depois da fixação, as glândulas foram passadas em solução de ácido cacodílico 0,1M (pH 7.3) (SEM, Fort Washington, Estados Unidos da América), pós-fixadas em solução de OsO<sub>4</sub> 1% (Polysciences, Inc., Warrington, Estados Unidos da América) em solução de ácido cacodílico 0,1M (pH 7.3) por 1 hora, desidratadas em soluções crescentes de etanol (50% a 100%, durante 30 minutos cada etapa) óxido

de propileno 100%, por 30 minutos e, finalmente, emblocadas em Epon 812. Os cortes semi-finos e ultra-finos foram obtidos em ultramicrótomo LKB, sendo contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo e examinados em microscópio eletrônico de transmissão JEOL-JEM 1200 EX II (SANTOS et al., 1999).

### 3.6. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (FRANCO, 1994)

As glândulas de veneno foram fixadas em solução de Karnovsky modificada (paraformaldeído 4% + glutaraldeído 2,5% em ácido cacodílico 0.1M (pH 7.3) (KARNOVSKY, 1965) por 2 horas. Depois da fixação, as glândulas foram lavadas em solução de ácido cacodílico 0.1M (pH 7.3), pós-fixadas com solução de OsO<sub>4</sub> 1% em solução de ácido cacodílico 0,1M (pH 7.3) por 1 hora. Foram então desidratadas em soluções crescentes de etanol (70% a 100%, durante 20 minutos cada etapa). A desidratação com CO<sub>2</sub> líquido foi realizada no aparelho BALZERS CPD010 e a metalização com ouro no aparelho BALZERS SCD030.

As glândulas foram então analisadas no microscópio eletrônico de varredura MEV XL-30 Philips (SANTOS et al., 1999).

### 3.7. OBTENÇÃO DO VENENO

O veneno de *L. intermedia* (uma mistura, coletada de aproximadamente 500 aranhas), foi obtido de aranhas adultas mantidas sob condições apropriadas e submetidas a aplicação de eletrochoque de 15 volts no cefalotórax (FEITOSA et

al.,1998). Para o ensaio da agregação plaquetária, experimentos de zimograma e estudos de dermonecrose, foram usadas 40 $\mu$ g de proteínas totais do veneno, representando uma provável concentração de veneno injetado numa picada (COUTINHO, 1996).

### 3.8. ELETROFORESE EM GEL ANALÍTICO (SDS-PAGE)

A eletroforese em gel de poliacrilamida com duodecil sulfato de sódio (SDS), foi realizada com 5% (m/v), 12% (m/v) ou em gradiente contínuo de 3-20% de acrilamida em condições redutoras ou não redutoras (LAEMMLI et al.,1970). Para a detecção de proteínas, os géis foram corados com azul de Coomassie ou pelo método da prata (WRAY et al., 1981). Para western-blotting, as proteínas foram transferidas para as membranas de nitrocelulose durante a noite, como previamente descrito (TOWBIN et al., 1979). Os marcadores de massa molecular usados foram laminina não reduzida, 850 kDa; miosina, 205 kDa;  $\beta$ -galactosidade, 116 kDa; fosforilase-b, 98 kDa; soro albumina, 67 kDa; ovoalbumina, 44 kDa, anidrase carbônica, 29 kDa, adquiridos da Sigma.

### 3.9. REAÇÃO LECTINA-BLOTTING

As proteínas do veneno (5 $\mu$ g), foram manualmente transferidas ou eletrotransferidas (como descrito acima), para as membranas de nitrocelulose. A detecção de glicoproteínas foi realizada usando-se um kit com diferentes lectinas ligadas a digoxigenina (Boehringer Mannheim) ou biotinilada (Sigma), de acordo com as instruções dos fabricantes. As reações foram desenvolvidas como previamente

descrito (VEIGA et al., 1995).

### 3.10. DEGLICOSILAÇÃO DAS PROTEÍNAS DO VENENO

As proteínas do veneno de *L.intermedia* (1 mg/ml em 0,1 M de tampão fosfato de sódio pH 7.3, 0,1% de SDS, e Triton X-100 1%), foram tratadas enzimaticamente com a peptídeo-N<sup>4</sup>-(N-acetil-β-glicosaminil) asparagina amidase F (N-glicosidase) (10 unidades), à 37° C por 48 horas. O veneno não deglicosilado, usado como controle nos experimentos para estudo da atividade biológica dos oligossacarídeos N-ligados, foi tratado de modo idêntico ao descrito acima, porém sem a N-glicosidase. O tratamento para a remoção de açúcares O-ligados foi feito pela incubação sequencial do veneno de *L.intermedia* (1 mg/ml em 0,1 M de tampão fosfato de sódio, pH 7.3, SDS a 0,1% e Triton X-100 a 1% com neuroaminidase (20 mUnidades), à 37° C por 2 horas e O-glicosidase (25 mUnidades), à 37° C durante a noite (16 h). Alternativamente, para a oxidação de resíduos de açúcar, o material eluído da Con-A-sepharose (1 mg/ml em PBS) foi incubado com metaperiodato de sódio (0,005 M) à 37° C, no escuro, por 15 minutos.

### 3.11. AVALIAÇÃO DAS CADEIAS DE GLICOSAMINOGLICANOS

As proteínas do veneno (3 mg), foram digeridas usando-se excesso de proteinase-K (50µg; Sigma), à 58° C durante a noite. Os produtos obtidos foram analisados por eletroforese em gel de agarose em 0,05 M de tampão acetato 1,3-diaminopropano pH 9.0 (Aldrich Chemical, Milwaukee, Estados Unidos da América).

Após a corrida eletroforética, os compostos foram precipitados no gel usando-se Cetavlon 0,1% por 2 horas à temperatura ambiente. Após secagem, o gel foi corado com azul de Toluidina (DIETRICH e DIETRICH, 1976). Os marcadores das cadeias de glicosaminoglicanos usados foram CS - coindroitin sulfato de cartilagem de tubarão, DS - dermatan sulfato de pele de porco e HS - heparan sulfato de pâncreas bovino (VEIGA et al., 1999a).

### 3.12. CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE-LECTÍNICA

Para cromatografia de afinidade lectínica à Con-A, as proteínas do veneno de *L.intermedia* (5mg), diluídas em tampão de partida (0,02 M de Tris-HCl pH 7.3, 0,5 M de NaCl, 0,001 M de  $MnCl_2$  e 0,001 M de  $CaCl_2$ ), foram aplicadas em coluna de Con-A-sepharose (Pharmacia) e incubadas durante a noite à 4° C. Após a incubação, a coluna foi lavada com o mesmo tampão e eluída com 0,2 M de  $\alpha$ -D-metil-manosideo (Sigma) (VEIGA et al., 1999a).

### 3.13. ENSAIO DE AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA

Plasma humano rico em plaquetas foi obtido através de centrifugação diferencial de sangue fresco coletado com anticoagulante do tipo ácido-cítrico-citrato-dextrose. A agregação plaquetária, na presença do veneno antes ou após a N-deglicosilação enzimática (40 $\mu$ g), foi realizada à 37° C sob centrifugação de 1000 rpm utilizando-se um agregador Becton-Dickinson como previamente descrito (PLOW et al., 1985; VEIGA et al., 1999a).

### 3.14. ESTUDO DA DEGRADAÇÃO DA FIBRONECTINA E DO FIBRINOGENIO

Fibronectina e fibrinogênio humanos (0,5 mg em 0,05 M de tampão Tris-HCl, pH 7.3, com 0,005 M  $\text{CaCl}_2$  e 0,005 M de  $\text{MgCl}_2$ ), foram incubados com veneno N-deglicosilado enzimaticamente (obtido como descrito acima), ou veneno glicosilado (controle), na proporção substrato: veneno de 100:1, mantido durante a noite à 37° C, como descrito previamente (FEITOSA et al., 1998). Os materiais digeridos e controles foram analisados em SDS-PAGE 5%, em condições não redutoras para fibrinogênio e condições redutoras para fibronectina e corados com azul de Coomassie (VEIGA et al., 1999a).

### 3.15. EXPERIMENTOS DE ZIMOGRAMA

O Zimograma foi feito usando SDS-PAGE 12%, contendo 3mg/ml de gelatina de pele suína copolimerizada com a poliácridamida. As amostras (obtidas do veneno de *L. intermedia* eluídas da Con-A-Sepharose: 40 $\mu$ g) enzimaticamente deglicosiladas e os respectivos controles, foram diluídas em tampão Laemmli em condições não redutoras e submetidas a eletroforese (20mA), à 4° C. Após a corrida, os géis foram lavados duas vezes em Triton X-100 a 2,5% (v/v), por 40 minutos cada e, em seguida, incubados durante a noite, à 37° C, em 0,05 M de tampão Tris-HCl, pH 7.3, contendo 0,2 M de NaCl, 0,005 M de  $\text{CaCl}_2$  e 0,005 M de  $\text{MgCl}_2$ , sendo então corados pelo azul de Coomassie. As zonas claras lisadas do substrato contra um fundo de coloração azul indicam a presença da degradação enzimática (FEITOSA et al., 1998; VEIGA et al, 1999a).

### 3.16. ESTUDO DA DERMONECROSE

Para a avaliação do efeito dermonecrótico, o veneno deglicosilado enzimaticamente ou quimicamente (amostras de 40  $\mu\text{g}$  diluídas em PBS), obtido como descrito acima, foi injetado intra-dermicamente em área raspada da pele de coelhos. Como controle foi usado veneno glicosilado, processado identicamente ao tratamento para a deglicosilação, mas na ausência dos agentes deglicosilantes, na mesma concentração (40  $\mu\text{g}$  diluídos em PBS). A lesão dermonecrótica foi checada em períodos de 3 horas, 1 dia, 5 dias e 10 dias após as injeções (VEIGA et al., 1999a).

## 4.RESULTADOS

### 4.1.ESTUDO HISTOLÓGICO DAS GLÂNDULAS PRODUTORAS DE VENENO DE *L.intermedia* ATRAVÉS DA MICROSCOPIA DE LUZ

Através da coloração de hematoxilina e eosina observa-se que a glândula de veneno de *L. intermedia* possui uma arquitetura semelhante a outras glândulas de veneno de aranhas e possui forma bulbar (Fig. 1A). Apresentando externamente uma tênue serosa, a glândula possui uma camada muscular, relativamente espessa, a qual circunda o corpo do órgão, sem porém emitir septos que penetrem o seu interior (Fig. 1A e 1B). Segue-se a região epitelial secretora, constituída por células polimorfas, com seus núcleos dispostos na região basal. O produto de secreção acumula-se na região do lúmen (Fig. 1A e 1B).

### 4.2.ESTUDO ULTRAESTRUTURAL DAS GLÂNDULAS DE VENENO DE *L. intermedia*, ATRAVÉS DA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Os resultados obtidos através da microscopia eletrônica de varredura mostram que as glândulas de veneno de *L. intermedia* são estruturas pares localizadas na cavidade cefalotorácica (Fig. 2A). Os ferrões das quelíceras apresentam sua porção terminal em forma de pinça (Fig. 2B). As glândulas de veneno apresentam forma bulbar (Fig. 2C) e são encapsuladas completamente por blocos de feixes musculares (Fig. 2D).

### 4.3. ESTUDO ULTRAESTRUTURAL DAS GLÂNDULAS DE VENENO DA *L. intermedia*, ATRAVÉS DA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Em microscopia eletrônica de transmissão observa-se que as glândulas de *L. intermedia* apresentam fibras musculares estriadas, em contato com uma matriz extracelular, que separa a camada muscular das células epiteliais produtoras de veneno (Fig. 3A).

A eletromicrografia das fibras musculares, em corte transversal, mostra que elas são compostas por feixes musculares com um grande número de filamentos contráteis co-alinhados, os quais ocupam a maior parte do conteúdo citoplasmático (Fig. 3B).

O epitélio secretor das glândulas é glandular simples e suas células apresentam um núcleo alongado, situado na porção basal (Fig. 3C). O citoplasma é rico em retículo endoplasmático rugoso e mitocôndrias (Fig. 3D) e o complexo de Golgi é facilmente reconhecido (Fig. 3E).

Na região apical das células, próximo ao lúmen da glândula, nota-se a presença de muitos grânulos, de diferentes tamanhos e elétrondensidades. Os produtos de secreção são armazenados em bolsões limitados por membranas, no lúmen central da glândula (Fig. 3F).

Entre as células, nota-se a presença de grande quantidade de interdigitações, aumentando assim a superfície das células secretoras (Fig. 3G).

As eletromicrografias da glândula de veneno de *L. intermedia* sugerem que o mecanismo de secreção é do tipo holócrino, pois são visualizados debris e

estruturas celulares que possivelmente serão eliminados com o veneno (Fig. 3H e 3I).

#### 4.4. ANÁLISE MOLECULAR DA MATRIZ EXTRACELULAR

A estrutura que separa o tecido muscular do tecido epitelial secretor na glândula produtora de veneno (matriz extracelular), foi analisada. Cortes histológicos da glândula de *L.intermedia* foram corados através do método do ácido periódico de Schiff (PAS), uma técnica amplamente empregada para demonstrar a presença de glicoproteínas. É possível observar a positividade desta estrutura matricial em toda sua continuidade, indicando forte presença de resíduos de oligossacarídeos nesta região da glândula (Fig. 4A).

Verifica-se ainda, que esta estrutura matricial é positiva para o método de azul de Alcian, mostrando a presença de resíduos de glicosaminoglicanos sulfatados nesta região, co-localizados com a região positiva no método PAS (Fig. 4B).

Usando um anticorpo policlonal anti-laminina (Fig. 4D) e um anticorpo policlonal mono específico anti-entactina (Fig. 4F), observa-se a positividade para a laminina e entactina nesta região matricial, também co-localizadas com as estruturas ricas em glicosaminoglicanos e glicoproteínas (positivo para técnicas do PAS e azul de Alcian). Os resultados mostram o perfil positivo da região da matriz extracelular, sugerindo tratar-se de membrana basal.

Através de microscopia eletrônica de transmissão, observa-se fibrilas nesta região, sugerindo serem de colágeno (Fig. 5A). Através da coloração de picrosirus em microscopia de luz polarizada, verificou-se que as glândulas de veneno de *L. intermedia* mostram ter a camada da matriz extracelular rica em fibrilas, contendo

colágeno (Fig. 5B).

#### 4.5.PERFIL HETEROGÊNICO DAS PROTEÍNAS TOTAIS DO VENENO DE *L. intermedia*

A figura 6 mostra o perfil total das proteínas do veneno de *L. intermedia* em SDS-PAGE, gradiente linear 3-20%, sob condições não redutoras e coradas pelo método monocromático da prata (WRAY et al., 1981). Foi observado que o veneno é rico em proteínas de baixo peso molecular, de 40 kDa até 5 kDa. No entanto, é também possível visualizar, em uma menor extensão, a presença de proteínas de alto peso molecular (850 kDa a 60 kDa).

#### 4.6.ANÁLISE DOS RESÍDUOS DE OLIGOSSACARÍDEOS DAS PROTEÍNAS DO VENENO DE *L. intermedia*, BASEADA EM LECTINAS E GLICOSIDASES

Não existem estudos da estrutura ou do papel biológico dos resíduos de oligossacarídeos nas proteínas do veneno de *Loxosceles spp.* Inicialmente, a ligação a lectinas e o tratamento com glicosidases foram realizados de modo a avaliar a existência e determinar o tipo da glicosilação nas proteínas do veneno de *L. intermedia*. Proteínas do veneno total foram manualmente transferidas (Fig. 7A), ou eletrotransferidas (após submetidas a SDS-PAGE, gradiente linear de 3-20%), para membranas de nitrocelulose, antes (Fig. 7B), ou após tratamentos sequenciais com N-glicosidase, neuraminidase e O-glicosidase (Fig. 7C), sendo adicionalmente tratadas com lectinas que reconhecem açúcares específicos. O veneno, diretamente

aplicado na nitrocelulose, foi positivo para aglutinina de *Galanthus nivalis* (GNA) e *Canavalia ensiformis* (Con-A), sugerindo a presença de proteínas glicosiladas com alta-manose. O veneno foi também positivo para aglutinina de *Pisum sativum* (PSA) e para a aglutinina de germen de trigo (WGA), revelando proteínas contendo resíduos de N-acetilglicosamina, além de positivo para a aglutinina de *Aleuria aurantia* (AAA), indicando proteínas com resíduos de fucose. As reações foram negativas para aglutinina de *Datura stramonium* (DSA) e para a aglutinina de *Phaseolus vulgaris* (PHA-L), demonstrando ausência de resíduos terminais (1-4 galactose e glicanas do tipo polilactosamina). Foram negativas também para aglutinina de *Sambucus nigra* (SNA) e para a aglutinina de *Maackia amurensis* (MAA), mostrando ausência de resíduos de ácido N-acetilneuramínico (ácido siálico), nas proteínas do veneno. Além disso, as proteínas foram também positivas para a aglutinina de *Amaranthus caudatus* (ACA) e para a aglutinina de amendoim (PNA), evidenciando a presença de proteínas glicosiladas com resíduos de galactose (1-3-N-acetilgalactosamina, tipicamente oligossacarídeos Ser/Thr-ligados).

Essa análise da composição de carboidratos foi posteriormente confirmada através de western-blotting de afinidade lectínica (Fig. 7B), onde foi possível detectar bandas de 98, 69, 67, 60, 35, 28 e 20 kDa que foram reconhecidas por GNA e Con-A, antes do tratamento com N-glicosidase, mas não após digestão (Fig. 7C), demonstrando estruturas N-ligadas do tipo alta-manose presentes nestas proteínas do veneno. Foi possível observar proteínas de 98, 28 e 20 kDa, positivas para PSA e WGA antes da digestão com N-glicosidase (Fig. 7B), mas negativas após tratamento enzimático (Fig. 7C), confirmando preliminarmente os ensaios de dot-blotting com marcação lectínica e mostrando resíduos de N-acetilglucosamina N-ligados. Ainda

as figuras 7B e 7C, ilustram proteínas do veneno incubado com aglutinina de *Aleuria aurantia* (AAA), antes e após tratamento com N-glicosidase, respectivamente. Pode-se observar que existem duas proteínas na região de 28 e 20 kDa, positivas para resíduos de fucose N-ligados. As Figuras 7B e 7C também retratam respectivamente proteínas do veneno antes (Fig. 7B) e após (Fig. 7C), digestão por N-glicosidase, incubadas com aglutinina *Datura stramonium* (DSA), aglutinina de *Phaseolus vulgaris* (PHA-L), aglutinina de *Sambucus nigra* (SNA) e aglutinina de *Maackia amurensis* (MAA). Estes resultados demonstram a ausência de açúcares N-ligados do tipo Gal ( $\beta$ 1-4) GlcNac e polilactosamina, além de oligossacarídeos do tipo NeuNac (2-3)Gal e NeuNac (2-6) Gal. As figuras 7B e 7C, também mostram proteínas do veneno incubado com aglutinina de *Amaranthus caudatus* (ACA) e aglutinina de amendoim (PNA), antes (Fig. 7B) e após (Fig. 7C), digestão com neuraminidase e O-glicosidase. Como descrito, foi observada a presença de uma proteína de 67 kDa, dando suporte a presença de resíduos do tipo Gal  $\beta$ (1-3) GalNac O-ligados.

Adicionalmente, para completar o perfil de oligossacarídeos das proteínas do veneno de *L. intermedia*, pesquisou-se a presença de moléculas de proteoglicanos (os proteoglicanos são as mais bem caracterizadas moléculas sulfatadas, contendo cadeias de glicosaminoglicanos ligados a núcleo proteico) (KJELLÉN e LINDAHL, 1991; BIRKEDAL-HANSEN et al., 1993). O veneno total (3 mg de proteínas) foi submetido a digestão por proteinase-K (uma serino- protease de larga especificidade), um procedimento que cliva as cadeias de glicosaminoglicanos (GAG), do núcleo protéico. O material digerido foi aplicado a um gel de agarose, como descrito previamente (DIETRICH e DIETRICH, 1976), usando-se padrões de

glicosaminoglicanos como referência. Como demonstrado na figura 7D, o perfil eletroforético do veneno em gel de agarose não mostrou sinal de cadeias de GAG, o que significa a ausência destes açúcares nas proteínas do veneno.

#### 4.7. ANÁLISE DA ATIVIDADE DE AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA, NO VENENO TRATADO COM N-GLICOSIDASE

Como exposto na introdução, um efeito sistêmico produzido pela picada de *Loxosceles spp* é uma trombocitopenia causada por proteínas de baixo peso molecular, presentes no veneno (KURPIEWSKI et al., 1981). Para verificar o envolvimento de resíduos de açúcares presentes nas glicoproteínas do veneno, com atividade na agregação plaquetária, foi usado plasma rico em plaquetas, num ensaio da agregação plaquetária "in vitro" na presença do veneno de *L. intermedia*, antes e após, o tratamento com N-glicosidase. A eficiência do tratamento das proteínas com a N-glicosidase foi verificada pela incubação de fitas de nitrocelulose contendo glicoproteínas do veneno, pré e pós-tratamento enzimático, com as lectinas GNA e AAA (VEIGA et al, 1999a) (dados não mostrados). Como mostra a figura 8, não existe diferença significativa na agregação plaquetária causada por proteínas do veneno glicosiladas ou deglicosiladas, sugerindo fortemente que resíduos de açúcares N-ligados não estão envolvidos com a atividade trombocitopênica do veneno.

#### 4.8. ANÁLISE DE GLICOCONJUGADOS DAS PROTEÍNAS DO VENENO DE *L.intermedia* NA ATIVIDADE FIBRONECTINOLÍTICA E FIBROGENOLÍTICA

Como discutido previamente, foi identificada uma metaloprotease de 20-28 kDa no veneno de *L.intermedia*, com atividade fibronectinolítica e fibrinogenolítica, denominada loxolisina A (FEITOSA et al., 1998). Como função de sua atividade proteolítica, a loxolisina A provavelmente está envolvida com a propriedade hemorrágica do veneno. Como foi possível identificar glicosilação do tipo alta-manose N-ligada, além de resíduos de N-acetilglicosamina e fucose na região do perfil protéico do veneno de *L. intermedia* entre 20 e 28 kDa (ver figuras 7B e 7C), decidiu-se caracterizar a importância destes resíduos de açúcar N-ligados nestas propriedades hidrolíticas. As figuras 9A e 9B revelam que os efeitos fibrinogenolítico e fibronectinolítico do veneno não sofreram qualquer tipo de alteração após a deglicosilação com N-glicosidase. Além disso, a oxidação química dos açúcares presentes nas proteínas do veneno com metaperiodato de sódio, mostrou os mesmos resultados, evidenciando o não envolvimento de oligossacarídeos nestas atividades proteolíticas.

## 4.9. GLICOCONJUGADOS PRESENTES NAS GLICOPROTEÍNAS SÃO IMPORTANTES PARA O EFEITO GELATINOLÍTICO DO VENENO DE *L. intermedia*

Em trabalho anterior foi detectado no veneno de *L. intermedia* uma metaloproteinase gelatinolítica de 33-35 kDa, a loxolisina B (FEITOSA et al., 1998). Como mostrado nas figuras 7B e 7C, foi possível identificar estruturas N-ligadas do tipo alta-manose, presentes na região de 33-35 kDa das proteínas do veneno. A confirmação de que a loxolisina B, é uma glicoproteína com estruturas do tipo alta manose, foi evidenciada pela sua eluição em cromatografia de afinidade à Con-A-sepharose, e com posterior zimograma usando-se gelatina como substrato (Fig. 10A). Determinou-se então a importância dos resíduos de açúcares N-ligados na atividade gelatinolítica desta proteína. A figura 10B decreve resultados do zimograma, usando gelatina como substrato, das proteínas eluídas da Con-A-sepharose a partir do veneno de *L. intermedia*, antes e depois do tratamento com N-glicosidase. Pode-se notar que após a remoção dos açúcares N-ligados, ocorreu um forte decréscimo do efeito gelatinolítico (atividade residual de 28% comparada com o controle glicosilado) (Fig. 10C), e um aumento da mobilidade no SDS-PAGE de aproximadamente 2 kDa (Fig. 10B), sugerindo algum envolvimento de açúcares N-ligados nesta atividade proteolítica.

Estes dados levam a sugerir que os oligossacarídeos participam da atividade catalítica da metaloproteinase de 33-35 kDa de *L. intermedia* na degradação da gelatina.

## 4.10. EVIDÊNCIAS DO PAPEL DA GLICOSILAÇÃO NA LESÃO DERMONECRÓTICA PRODUZIDA PELO VENENO

Como discutido acima, um sinal do envenenamento por *L. intermedia* é a lesão dermonecrótica no local da picada. Visto que a propriedade gelatinolítica da loxolisina B está muito relacionada à atividade das gelatinases de vertebrados, metaloproteases envolvidas na degradação da matriz extracelular em condições normais ou patológicas (BIRKEDAL-HANSEN et al., 1993), assim como as reprotinas que são metaloproteases do veneno de cobras envolvidas nos efeitos dermonecróticos produzidos por envenenamento (BJARNASON e FOX, 1995), postula-se que a loxolisina B, em alguns momentos, participa do efeito dermonecrótico do veneno de *L. intermedia* (FEITOSA et al., 1998). Uma vez detectado o envolvimento de açúcares no efeito gelatinolítico produzido "in vitro" pela Loxolisina B, de modo a determinar "in vivo" se os glicoconjugados estão envolvidos no efeito dermonecrótico, o veneno de *L. intermedia* foi deglicosilado usando-se N-glicosidase (Fig. 11A) e metaperiodato de sódio (Fig. 11B) e em seguida injetado intradermicamente no coelho, usando-se veneno glicosilado como controle. Como mostrado, tanto na deglicosilação enzimática quanto na química, o efeito dermonecrótico do veneno diminuiu fortemente, evidenciando o envolvimento de oligossacarídeos nas glicoproteínas presentes no veneno, nesta lesão da pele.

## **FIGURAS**

**FIGURA 1A: Glândula de veneno de *L. intermedia*. Corte longitudinal. H.E.**

Notar o revestimento externo muscular (M), a região secretora epitelial (seta) e o lúmen da glândula preenchido por veneno (V) (100X).

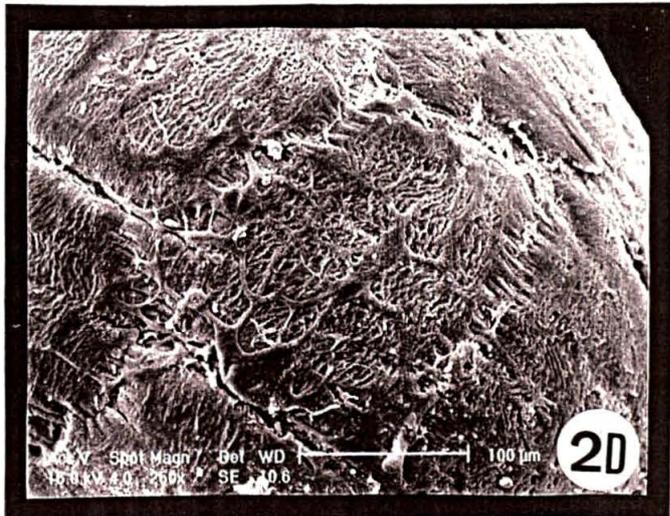
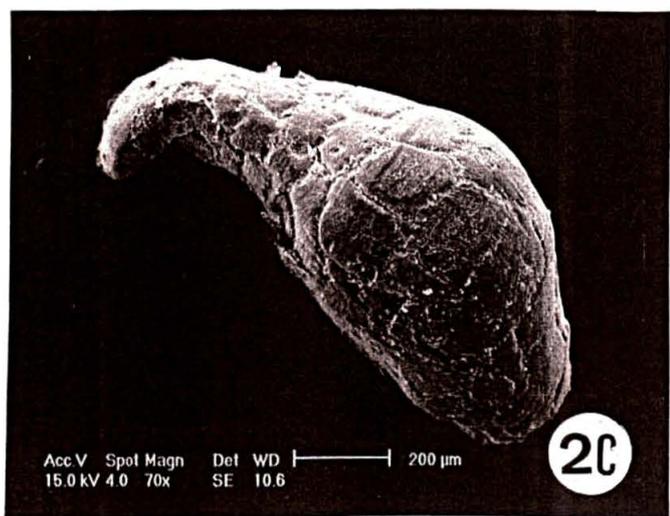
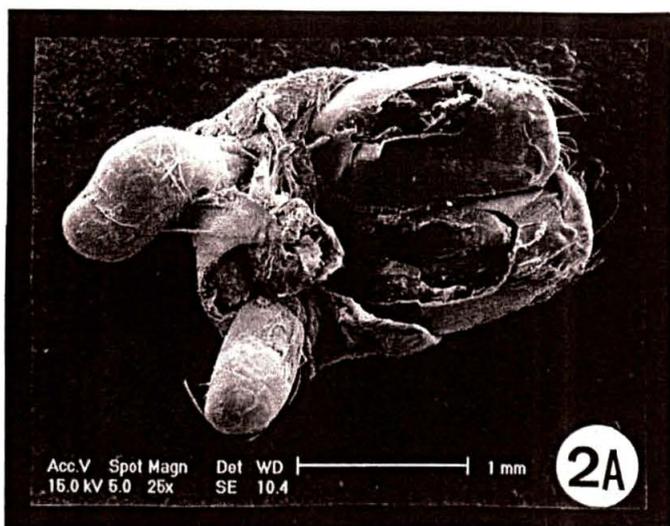
**FIGURA 1B: Glândula de veneno de *L. intermedia*. Corte transversal. H.E.**

Revestimento externo muscular (M), região secretora epitelial (seta) e presença de veneno no lúmen glandular (V) (200X).



**FIGURA 2: Glândulas de veneno de *L. intermedia*. M.E.V.**

As glândulas são estruturas pares localizadas na cavidade cefalotorácica (A) (25X) . Detalhe das quelíceras(B) (200X). Notar a sua forma bulbar (C) (70X) e a cápsula muscular envolvente (D) (250X).



**FIGURA 3A: Glândula de veneno de *L. intermedia*. M.E.T.**

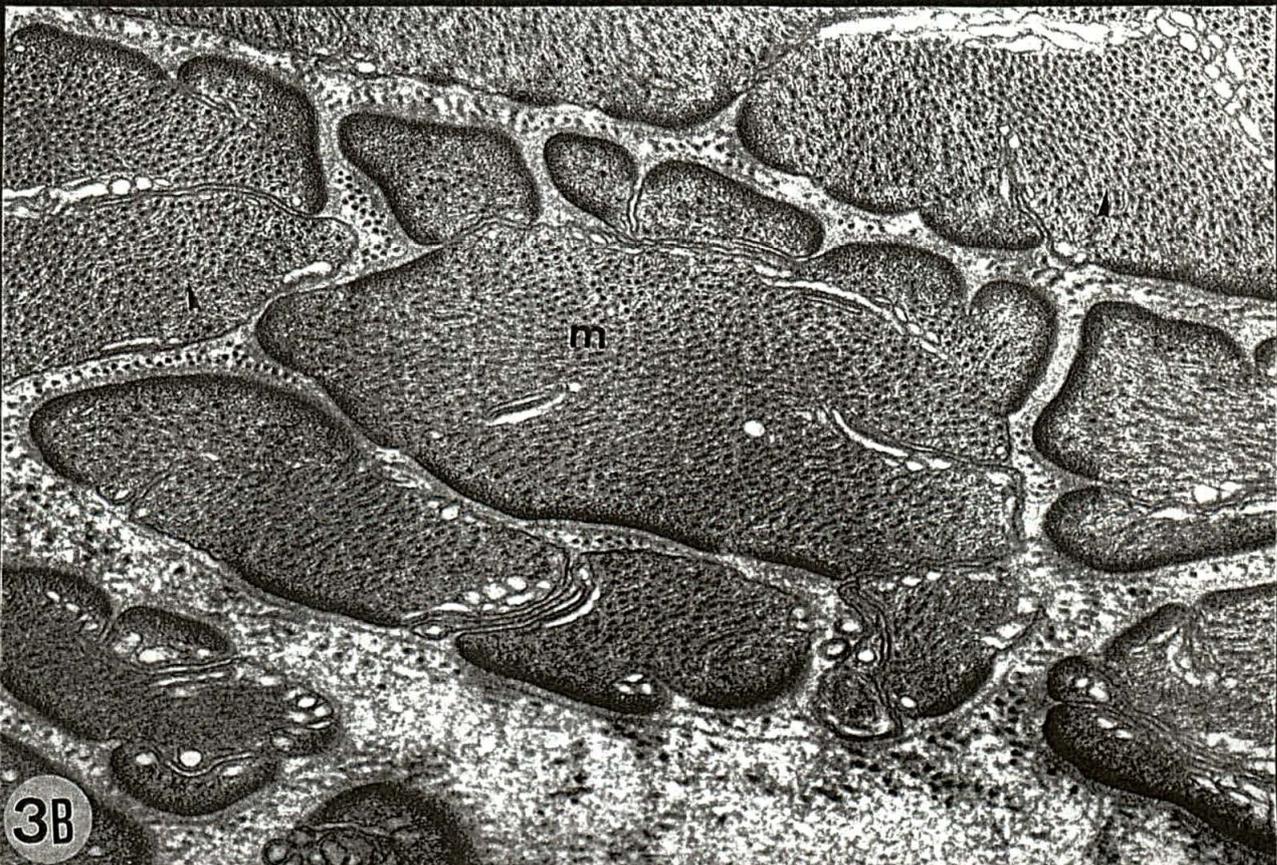
Observar a presença de fibras musculares estriadas (m), em contato com uma matriz extracelular (setas), que separa a camada muscular das células epiteliais secretoras (ec), da glândula. As células epiteliais são polimorfas, com núcleo basal e o lúmen glandular é preenchido com produto de secreção (V) (2.600X).

**FIGURA 3B: Glândula de veneno de *L. intermedia*. M.E.T.**

Corte transversal de fibras musculares (m). Notar grande número de filamentos contráteis co-alinhados (cabeça de setas) (30.000X).



3A



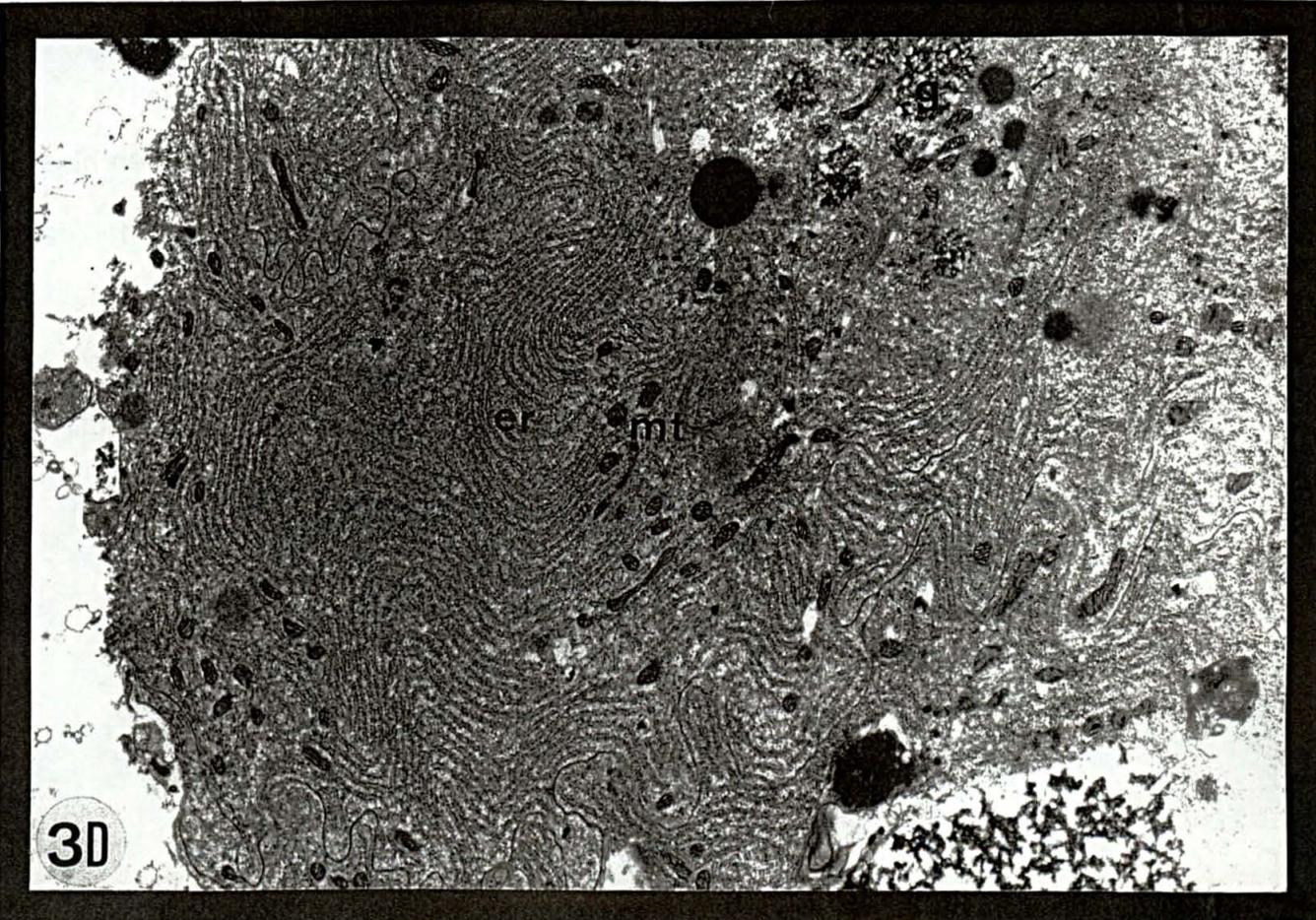
3B

**FIGURA 3C: Glândula de veneno de *L. intermedia*. M.E.T.**

Observar o núcleo alongado de uma célula epitelial (n) situado na porção basal, na qual são encontradas numerosas interdigitações (i). Nota-se ainda a presença de uma matriz extracelular (setas) e de uma camada muscular (m). (14.000X).

**FIGURA 3D: Glândula de veneno de *L. intermedia*. M.E.T.**

A figura mostra que o citoplasma da célula epitelial é rico em retículo endoplasmático rugoso (er) e mitocôndrias (mt) (10.000X)

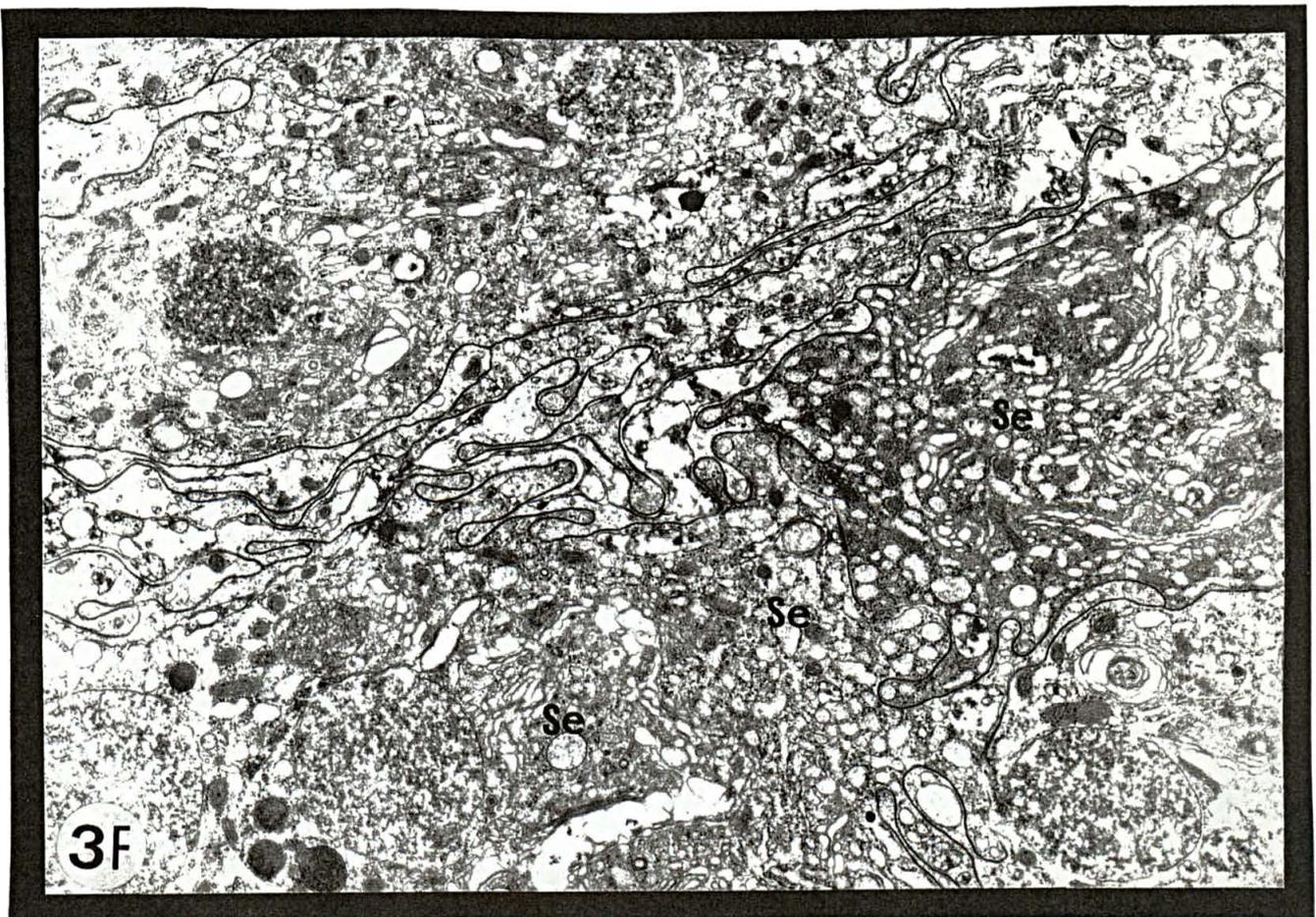
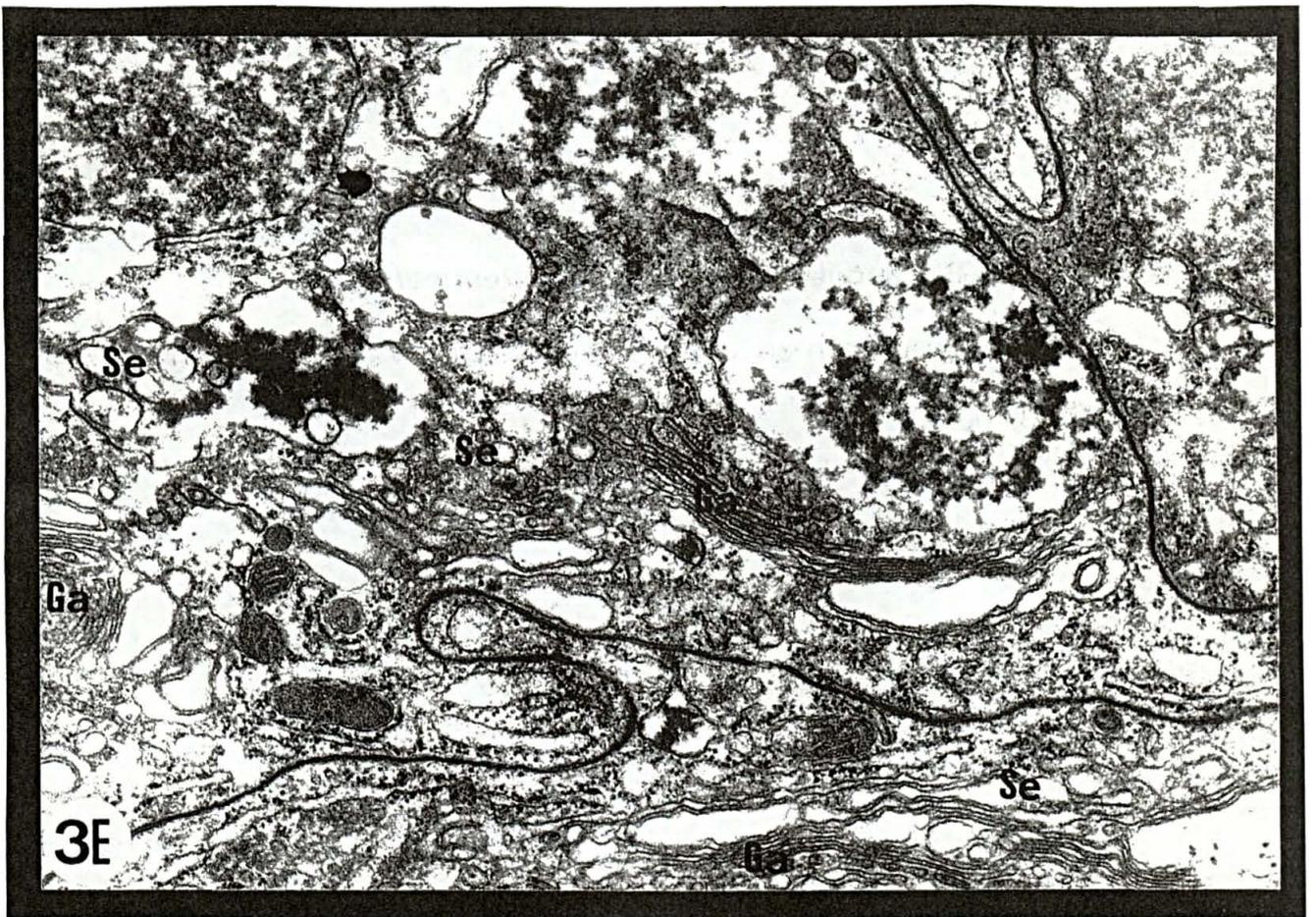


**FIGURA 3E: Glândula de veneno de *L. intermedia*. M.E.T.**

Notar a presença de complexo de Golgi (Ga) e vesículas de secreção (Se), (36.000X).

**FIGURA 3F: Glândula de veneno de *L. intermedia*. M.E.T.**

Notar a presença de muitos grânulos de secreção (Se), de diferentes tamanhos e elétrons-densidades, na região apical das células, próximo ao lúmen da glândula, (6.200X).



**FIGURA 3G: Glândula de veneno de *L. intermedia*. M.E.T.**

A figura mostra em aumento maior, detalhe das interdigitações (cabeça de seta) (30.000X).

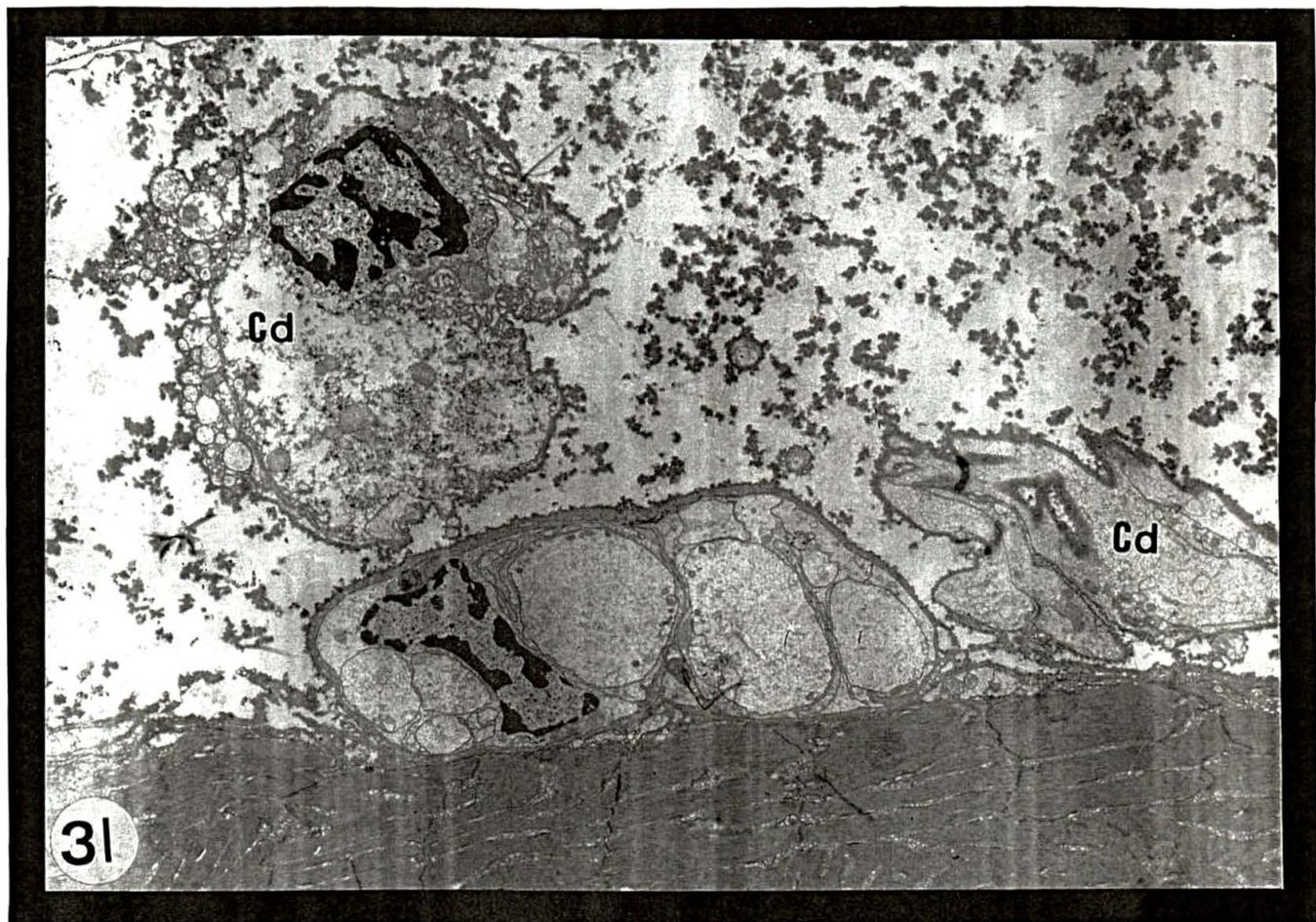
**FIGURA 3H: Glândula de veneno de *L. intermedia*. M.E.T.**

A eletromicrografia sugere que o mecanismo de secreção é do tipo holócrino. Notar a presença de debris celulares (Cd) (6.800X).



**FIGURA 3I: Glândula de veneno de *L. intermedia*. M.E.T.**

Estruturas celulares (Cd) que possivelmente serão eliminadas com o veneno, sugerem uma secreção holócrina (4.000X).

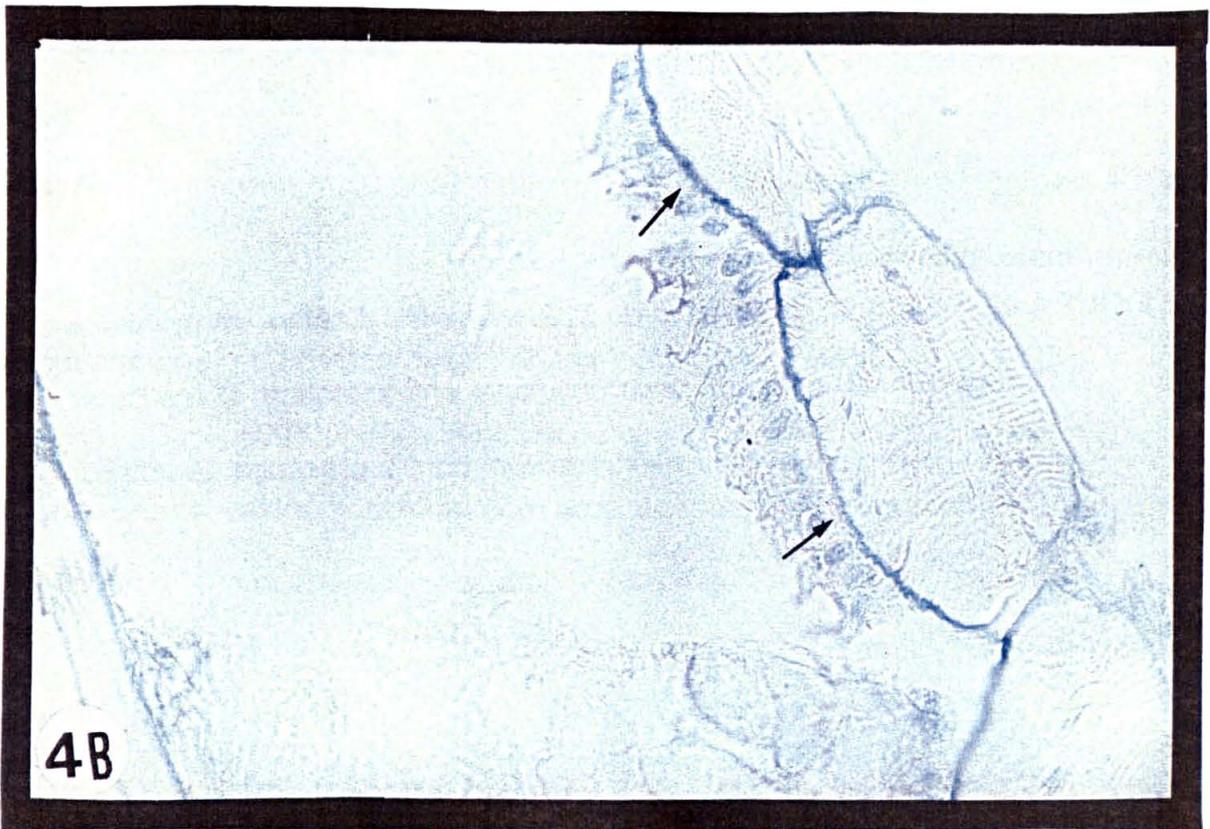


**FIGURA 4A: Glândula de veneno de *L. intermedia*. PAS.**

Nota-se que a estrutura da matriz extracelular é rica em glicoproteínas (setas), (400X).

**FIGURA 4B: Glândula de veneno de *L. intermedia*. Azul de Alcian – pH 1.0.**

A reação positiva demonstra a presença de glicosaminoglicanos sulfatados (setas), (600X).



**FIGURA 4C e 4D: Glândula de veneno de *L. intermedia*. Análise imunohistoquímica.**

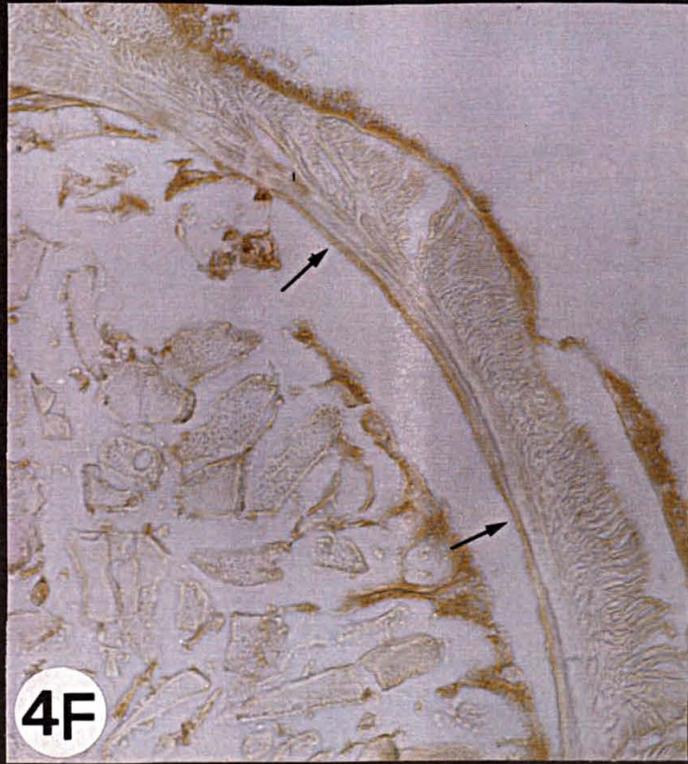
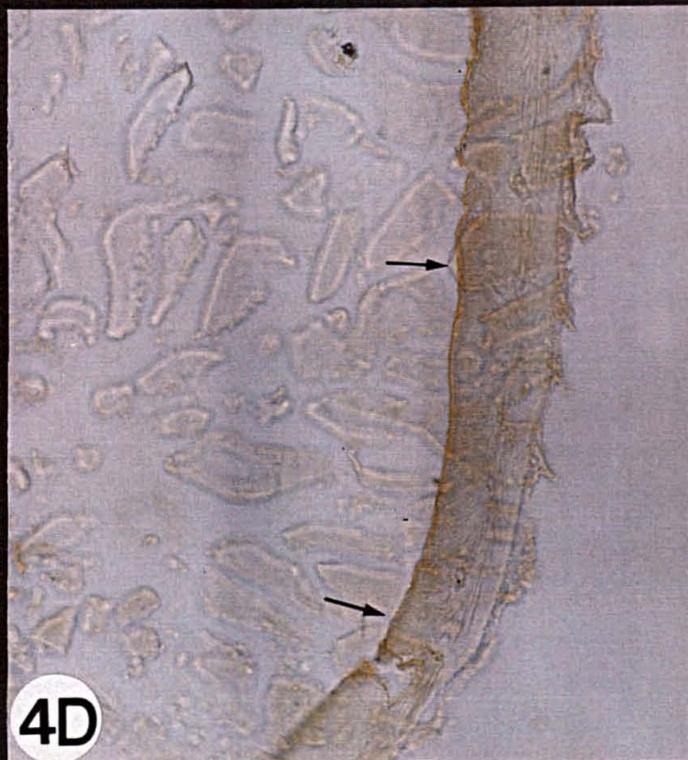
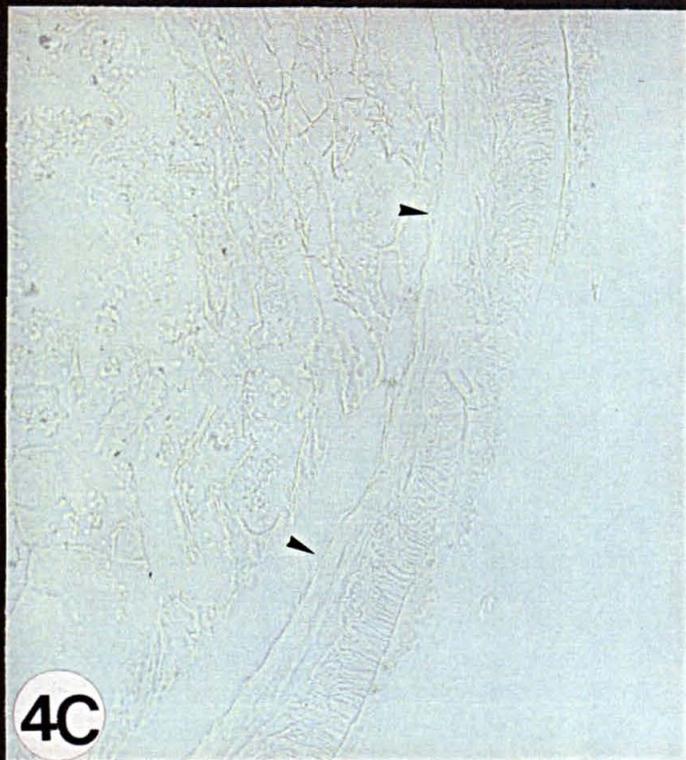
(C) Corte incubado com soro normal de coelho em PBS. O resultado mostra o controle negativo para a molécula de laminina (setas), (600X).

(D) Corte incubado com anticorpo policlonal anti-laminina. O resultado mostra o perfil positivo da região da matriz extracelular, com a presença de laminina (setas), (600X).

**FIGURA 4E e 4F: Glândula de veneno de *L. intermedia*. Análise imunohistoquímica.**

(E) Corte incubado com soro normal de coelho em PBS. O resultado mostra o controle negativo para a molécula de entactina (setas), (600X).

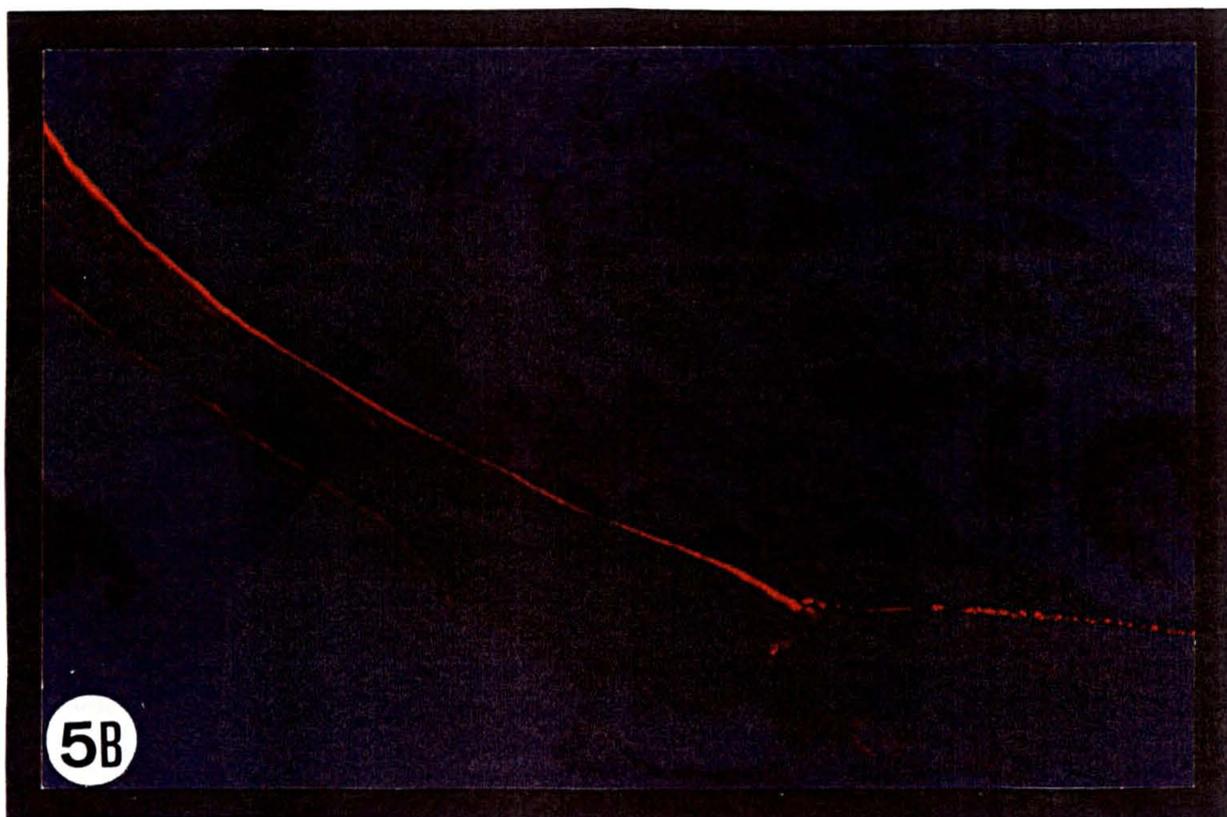
(F) Corte incubado com anticorpo policlonal anti-entactina. O resultado mostra o perfil positivo da região da matriz extracelular, com a presença de entactina (setas), (600X).





**FIGURA 5A: Glândula de veneno de *L. intermedia*. M.E.T.**

Observar a presença de fibrilas de colágeno na região da matriz extracelular (setas) (20.000X).

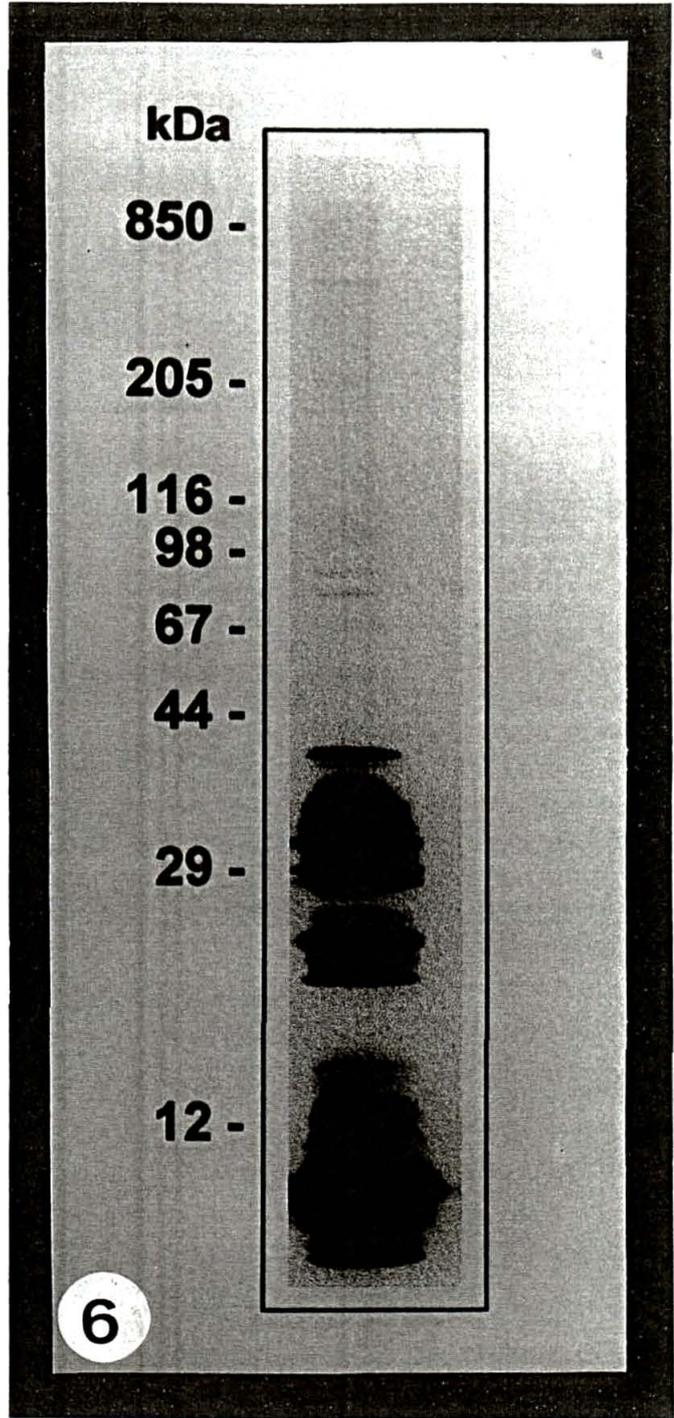


**FIGURA 5B:** Glândula de veneno de *L. intermedia*. Método do Picrosirius.

Notar a resposta positiva para colágeno na região da matriz extracelular (600X).

**FIGURA 6: Perfil heterogêneo das proteínas do veneno total de *L. Intermedia***

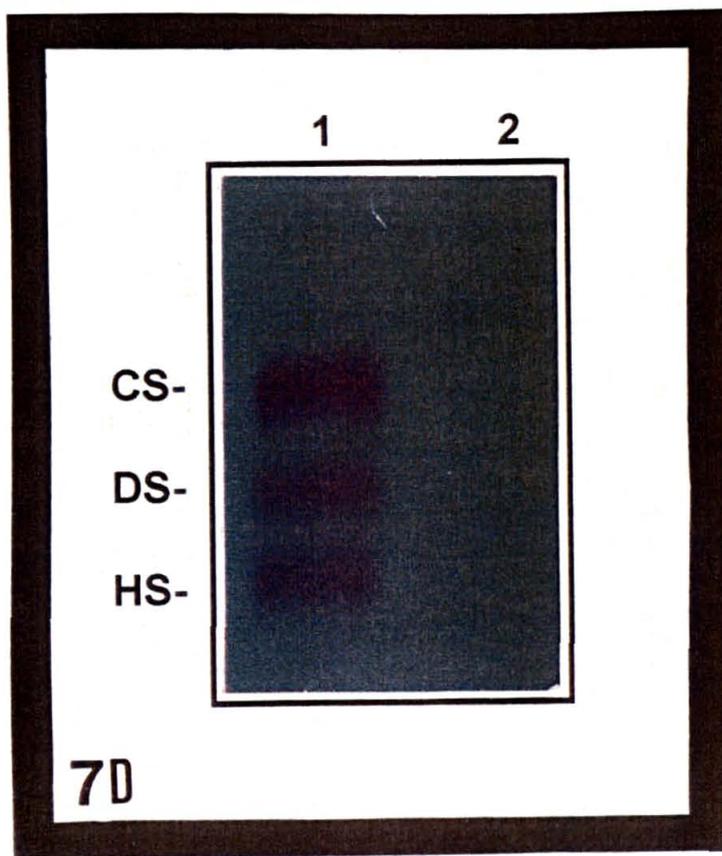
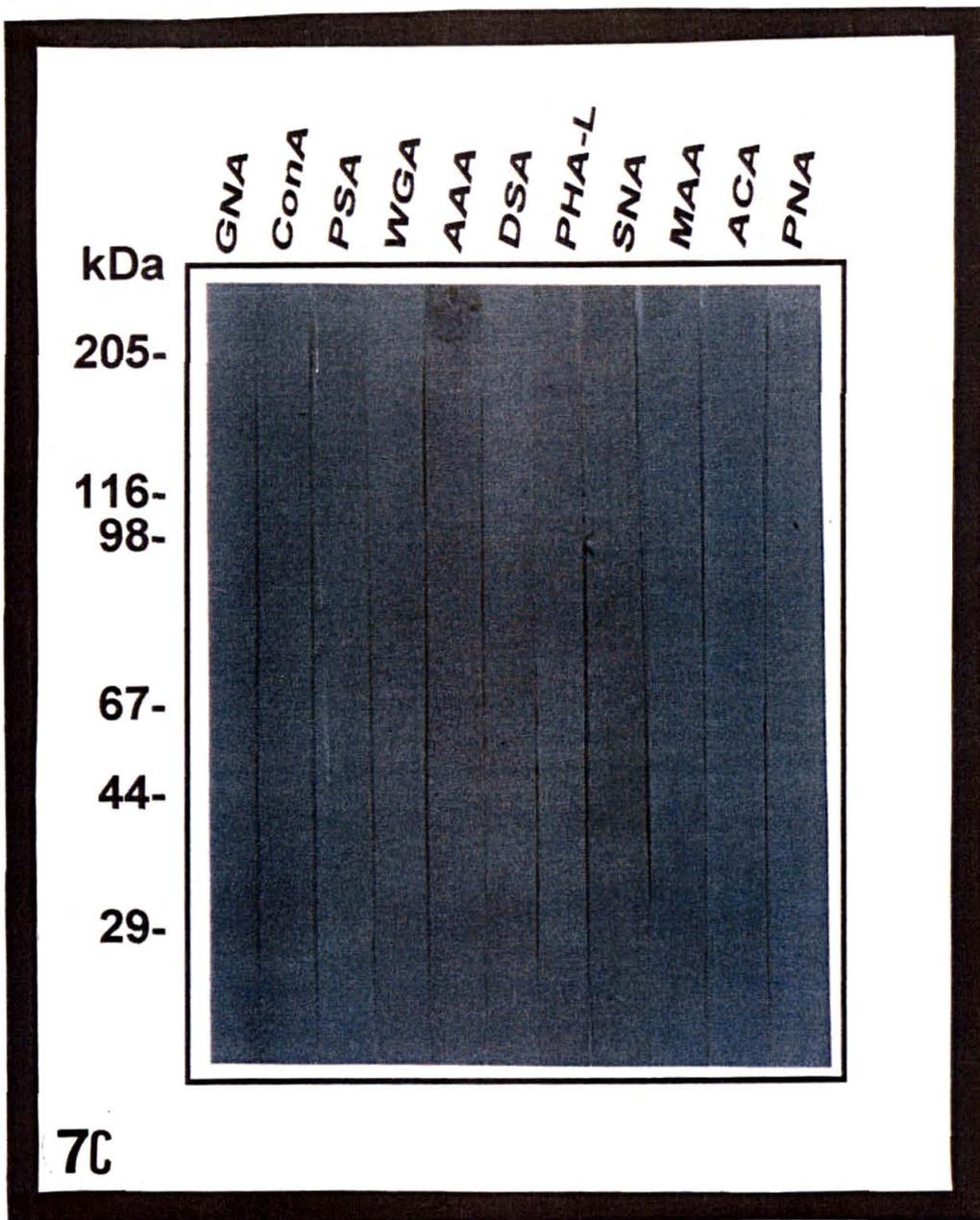
Perfil das proteínas do veneno total de *L. intermedia* em SDS-PAGE 3-20% (gradiente linear), sob condições não-redutoras. Método da prata monocromática. Pode-se observar que o veneno é rico em proteínas de baixo peso molecular na faixa de 40 kDa a 5 kDa. Pode-se visualizar, em menor extensão, a presença de proteínas com alto peso molecular (850 a 60 kDa).



**FIGURA 7: Reação lectina-blotting para as proteínas do veneno de *L. Intermedia***

O veneno (5 µg por ponto (A) ou linha, nas fitas de nitrocelulose (B,C)) foi aplicado diretamente (A) ou eletrotransferido depois de um gradiente linear de 3 a 20%, (p/v) em SDS-PAGE, sob condições não redutoras, para membranas de nitrocelulose antes de tratamentos com glicosidases (B) e depois de tratamentos com glicosidases (C), as quais foram então incubadas com lectinas ligadas com digoxigenina ou biotiniladas. As linhas representam as reações com GNA, Con-A, PSA, WGA, AAA, DSA, PHA, SNA, MAA, ACA e PNA. (PON), na figura A, representa as proteínas do veneno coradas por Ponceau-S. Os marcadores de peso molecular são mostrados à esquerda. (D) O veneno total de *L. intermedia* foi digerido com proteinase-K. O material obtido foi analisado por eletroforese em gel de agarose com 50 mM de tampão acetato de 1,3-diaminopropano pH 9.0. Os padrões foram precipitados no gel usando-se 0,1% de Cetavlon e corados com azul de Toluidina. Na linha 1, padrões de glicosaminoglicanos: condroitin sulfato (CS); dermatan sulfato (DS); heparan sulfato (HS) e na linha 2, material do veneno digerido.

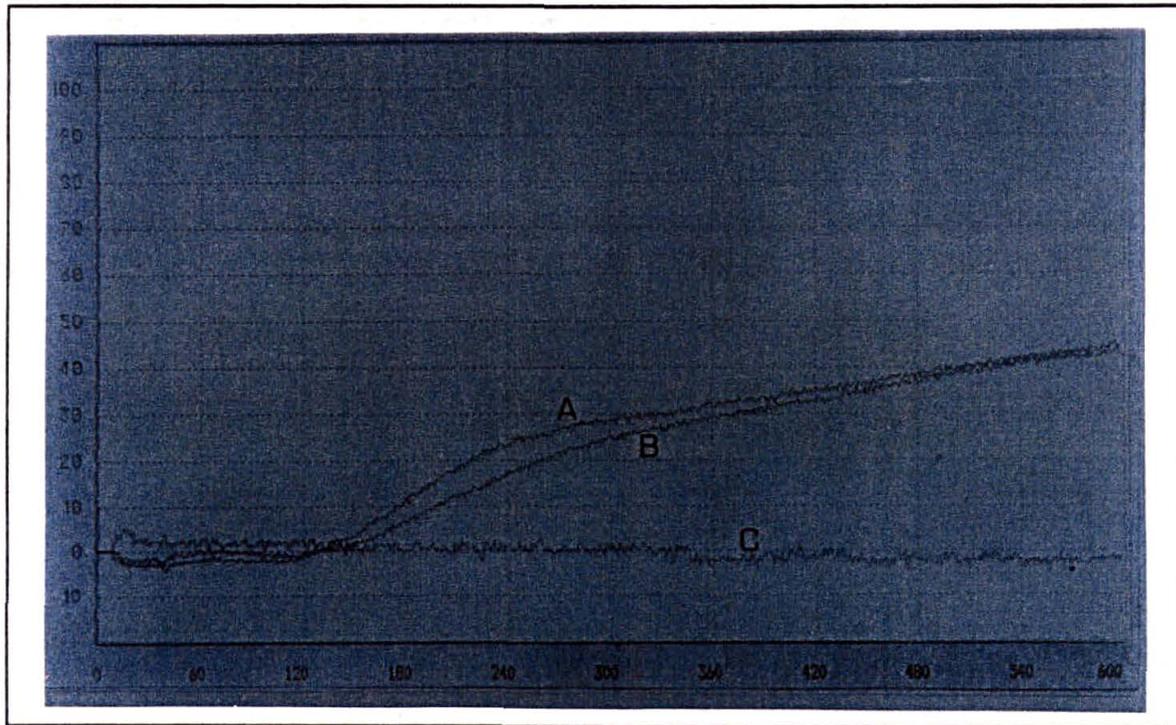




**FIGURA 8: Agregação plaquetária induzida pelo veneno de *L. intermedia***

Plasma rico em plaquetas foi incubado com veneno glicosilado em A, ou veneno tratado com N-glicosidase em B (na mesma concentração de 40 µg) ou com tampão usado no procedimento de deglicosilação (controle negativo) em C. A abcissa representa o tempo em segundos e a ordenada representa a porcentagem de agregação plaquetária. Percebe-se que não há diferença significativa na agregação plaquetária causada por proteínas glicosiladas ou deglicosiladas do veneno.

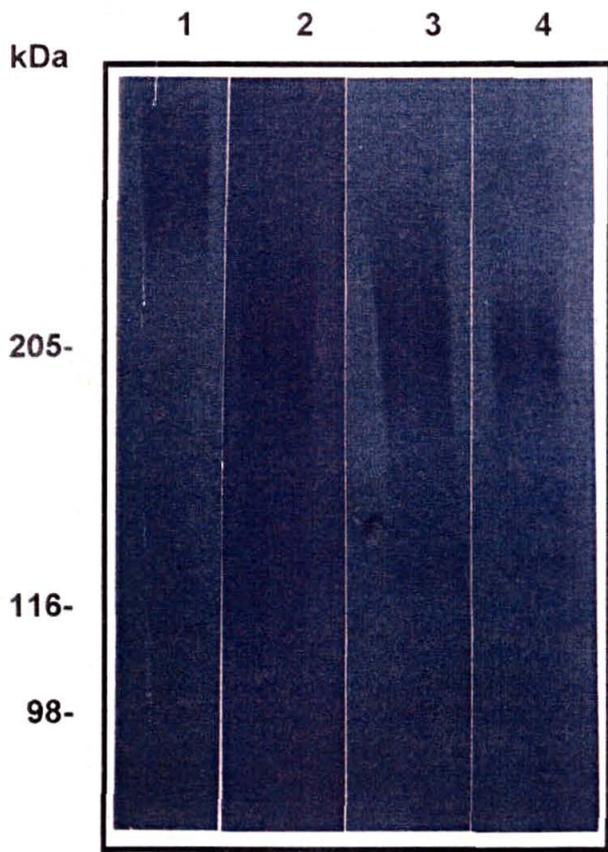
**% OF AGGREGATION**



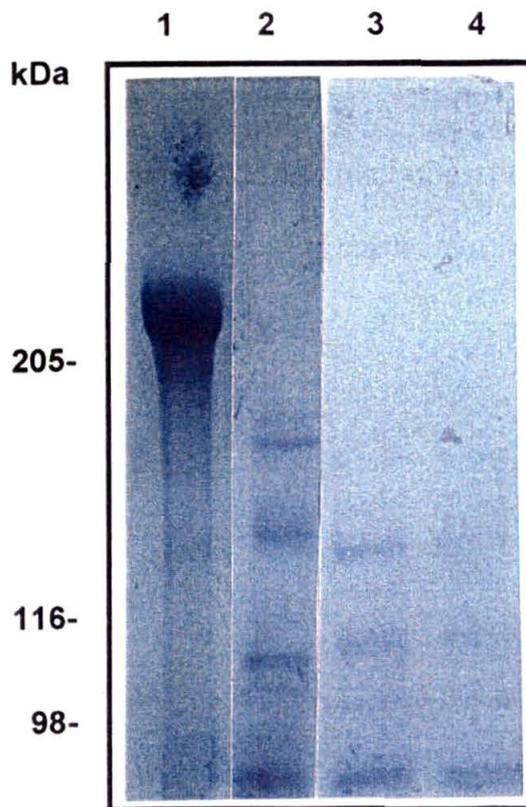
**TIME IN SECONDS**

**FIGURA 9: Perfil eletroforético em SDS-PAGE das moléculas de fibrinogênio e fibronectina digeridas pelo veneno de *L. Intermedia***

Fibrinogênio e fibronectina humanos (A e B respectivamente), foram incubados por 16 horas a 37°C com veneno glicosilado (linhas 2); veneno enzimaticamente N-deglicosilado (linhas 3) ou veneno tratado com metaperiodato de sódio (linhas 4), numa proporção substrato:veneno de 100:1. As linhas 1 representam os substratos incubados nas mesmas condições do experimento, porém na ausência do veneno (controle de estabilidade experimental). Os materiais dos experimentos foram submetidos a SDS-PAGE a 5% (p/v) sob condições não redutoras ou condições redutoras. Os marcadores de peso molecular são mostrados à esquerda das figuras.



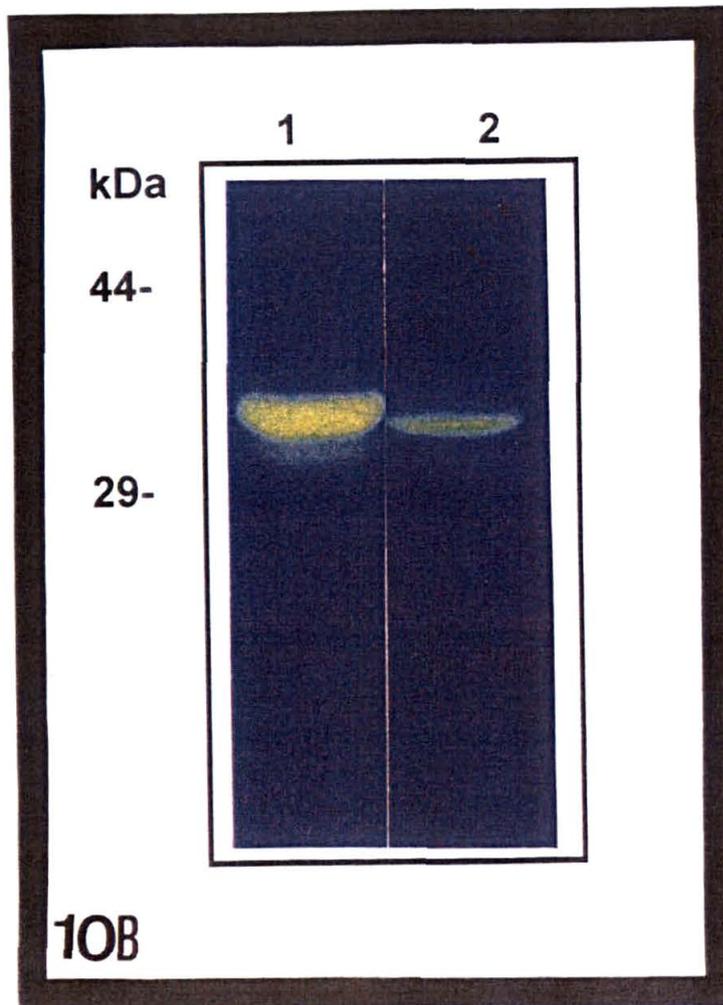
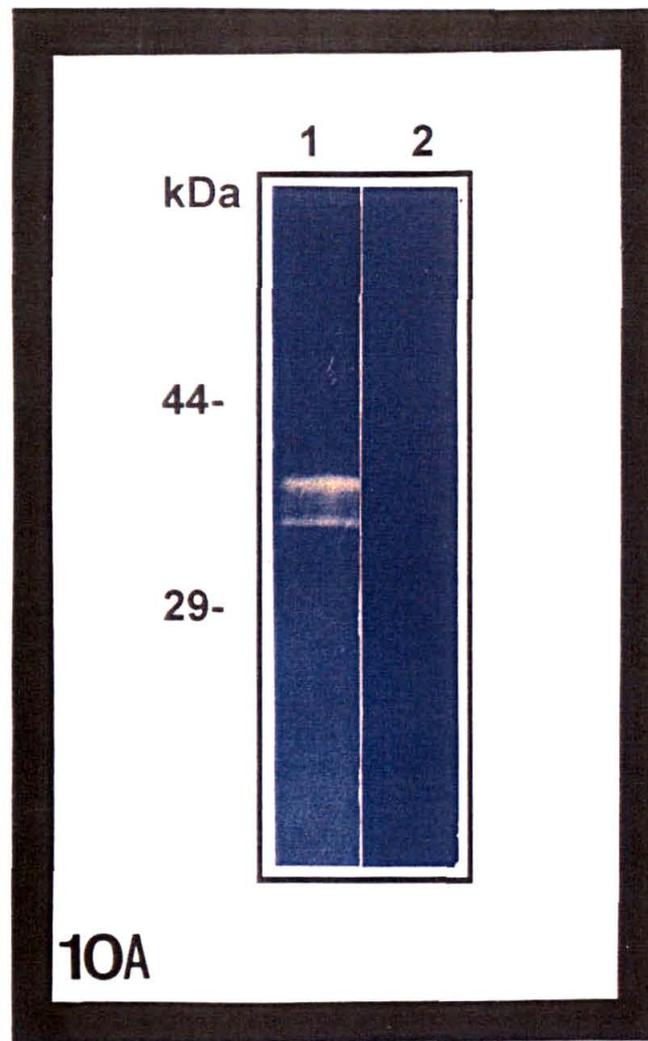
9A

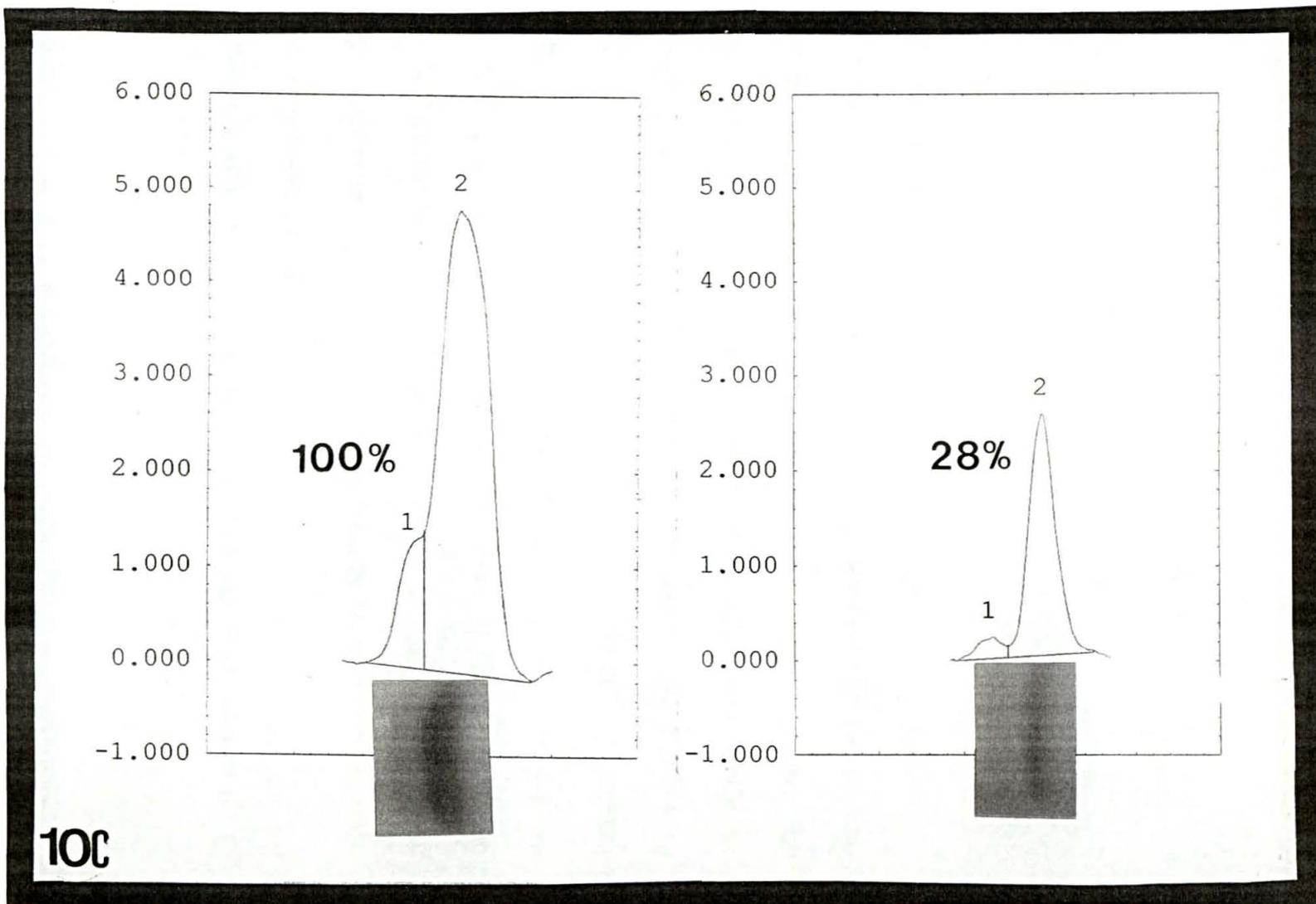


9B

**Figura 10: Análises dos resíduos de açúcares no efeito gelatinolítico induzido pelo veneno de *L. Intermedia***

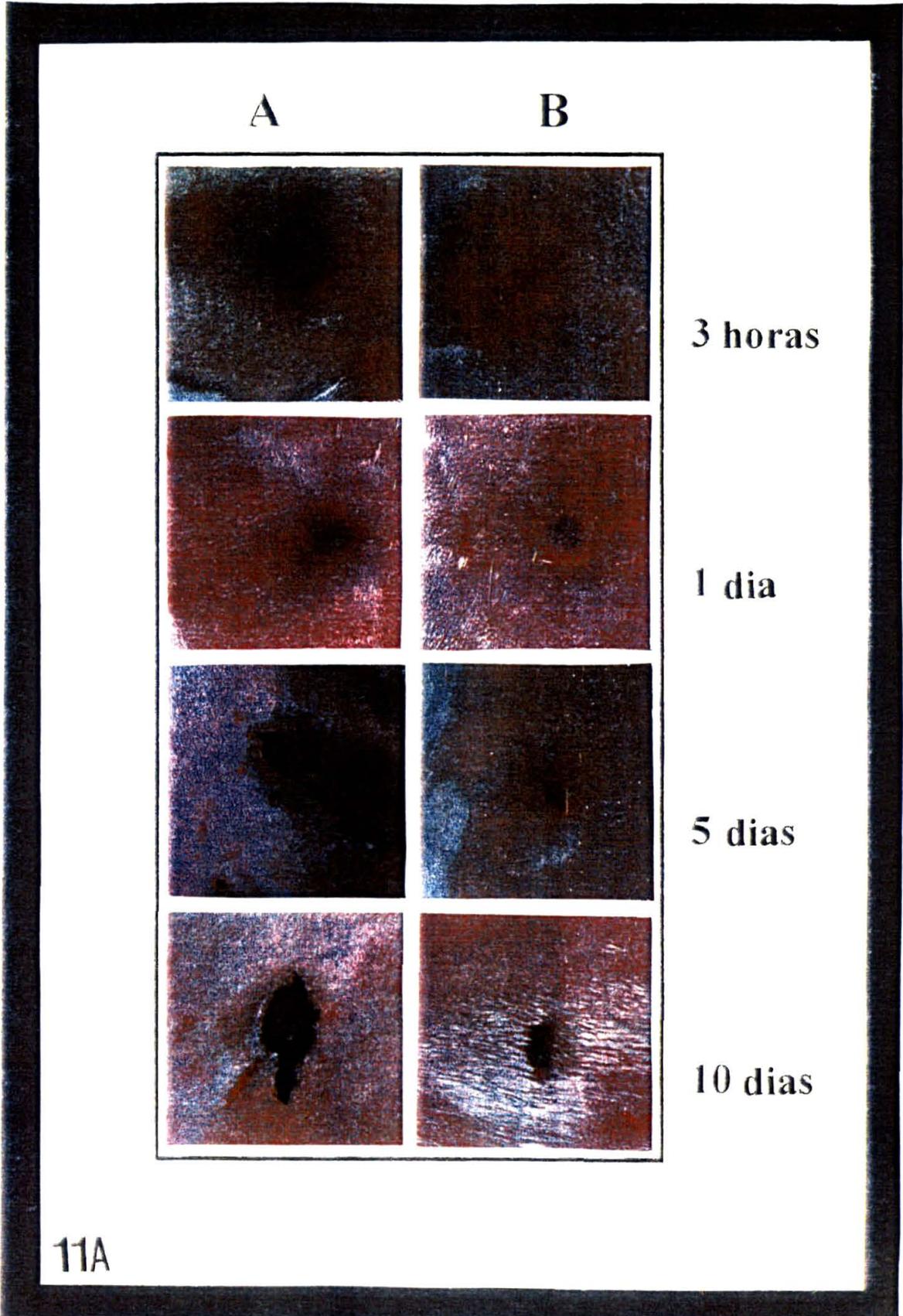
(A) O veneno total de *L. intermedia* foi cromatografado em coluna de Con-A sepharose. O material eluído com  $\alpha$ -D-metilmanosídeo (linha 1) e o material pós-cromatografia (linha 2), foi submetido a um zimograma (SDS-PAGE 12%), com gelatina copolimerizada. Os marcadores são mostrados à esquerda. (B) Os materiais eluídos da Con-A sepharose foram digeridos com N-glicosidase e submetidos a um zimograma (SDS-PAGE 12%), com gelatina copolimerizada. A linha 1 representa as proteínas glicosiladas antes do tratamento com enzima e a linha 2 representa o material após a digestão. (C) As zonas lisadas de gelatina nos zimogramas do experimento em (B), tiveram sua densidade óptica analisada e graduada (área). Os resultados apontam, em porcentagem, a atividade gelatinolítica do controle glicosilado (100%) e mostram uma atividade gelatinolítica residual (28%), da amostra deglicosilada.





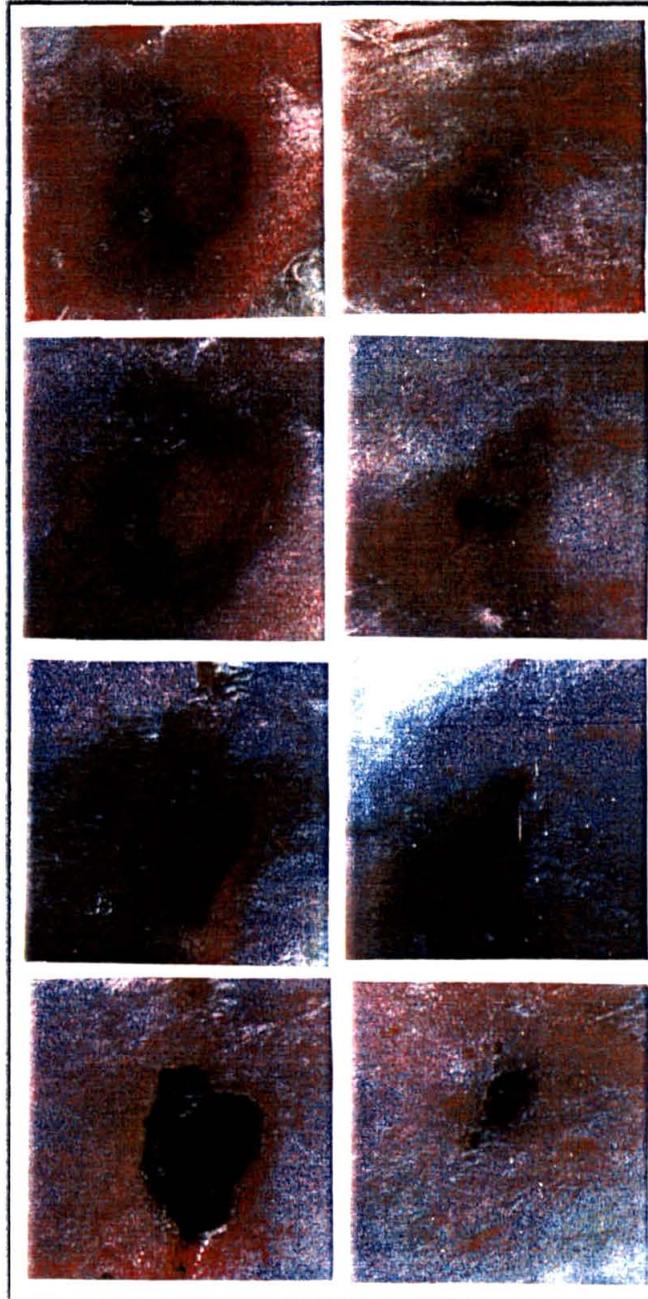
**FIGURA 11: Lesão dermonecrótica em coelhos induzida pelo veneno de *L. intermedia*, pré e pós deglicosilação**

Os coelhos receberam intradermicamente injeções de veneno total (40 µg) - painel A - ou enzimaticamente N-deglicosilado - painel B. As reações foram observadas 3 horas, 1 dia, 5 dias e 10 dias após as injeções (11A). O mesmo experimento foi repetido com 40 µg de veneno glicosilado (linhas A) ou tratado quimicamente com metaperiodato de sódio (0,005 M, à 37°C ao abrigo da luz, por 15 minutos) (linhas B). As lesões foram avaliadas após 3 horas, 1 dia, 5 dias e 10 dias após as injeções (11B). Observa-se que, apesar das lesões dermonecróticas (placas escariadas) fortemente diminuídas após os procedimentos de deglicosilação, o edema local, a hemólise e a hemorragia parecem ser açúcar-independentes, concordando com os resultados previamente descritos acima.



**A**

**B**



**3 horas**

**1 dia**

**5 dias**

**10 dias**

**11B**

## 5. DISCUSSÃO

As glândulas produtoras de veneno da *Loxosceles intermedia* são estruturas pares, situadas no cefalotórax, que comunicam-se com o exterior através de dois ductos que desembocam no aparelho inoculador que é constituído por um par de quelíceras. Estas características são encontradas também em *Latrodectus mactans* (SMITH e RUSSELL, 1967), *Loxosceles reclusa*, uma araneomorfa (FOIL et al., 1979) e em *Ctenedus medius* (BRAZIL e VELLARD, 1925). Já em *Plesiophrictus collinus*, uma aranha megalomorfa, as glândulas de veneno estão situadas dorsalmente na porção basal das quelíceras entre os músculos adutor e abductor. Já em *Heteropoda venatoria* e *Lycosa indagatrix*, aranhas araneomorfas, as glândulas de veneno estão situadas no cefalotórax, sustentadas pelos músculos adutor e abductor (RIDLING e PHANUEL, 1986). No escorpião amarelo *Buthus famulus*, da família Buthidae, a mais importante, tanto em número de espécies quanto por serem causadores de acidentes humanos, as glândulas de veneno estão localizadas no telson, em vesículas, ligando-se a dois canais que percorrem o ferrão internamente e abrem-se subapicalmente (KANWAR et al. 1981).

Diferenças no formato e posição das glândulas em diferentes gêneros de aranhas são descritas por BERTKAU (1891). Este descreve em *Atypus*, glândulas compostas, em *Filistata* glândulas do tipo multilobular e em *Scytodes*, glândulas bilobulares. No presente trabalho pudemos detectar que em *L. intermedia* as glândulas de veneno apresentam-se na forma bulbar, característica esta encontrada na *L. reclusa* (FOIL et al., 1979). Glândulas de veneno na forma cilíndrica são encontradas em *Heteropoda venatoria* e *Lycosa indagatrix* (RIDLING and PHANUEL, 1986), bem como em *L. mactans* (SMITH e RUSSELL, 1967). Em

*Ctnedus medius*, uma aranha megalomorfa, a glândula apresenta um aspecto sacular (BRAZIL e VELLARD, 1925), bem como no escorpião amarelo, *Buthus famulus* (KANWAR et al., 1981). Já em *P. collinus* as glândulas apresentam-se na forma cônica (RIDLING e PHANUEL, 1986).

No presente trabalho verificou-se que a organização anatômica das glândulas de veneno de *L. intermedia* mostra duas camadas de fibras musculares estriadas, uma externa e uma interna em contato com uma matriz extracelular, onde se apoia o epitélio secretor. Resultados similares foram encontrados em *L. reclusa* (FOIL et al., 1979) e em *C. medius* (BRAZIL e VELLARD, 1925). Segundo RIDLING e PHANUEL (1986), as glândulas de veneno de *P. collinus*, *H. venatoria* e *L. indagatrix*, apresentam duas camadas principais, a muscular externa e a secretora interna. As glândulas de veneno de *L. mactans* são revestidas por uma camada de fibras musculares estriadas (SMITH e RUSSELL, 1967). Em *B. famulus* as glândulas de veneno estão encapsuladas, parcialmente, por uma camada muscular (KANWAR et al., 1981).

Em *L. intermedia*, a musculatura que reveste as glândulas de veneno é composta por feixes contendo um número enorme de filamentos contráteis co-alinhados, os quais ocupam a maior parte do conteúdo citoplasmático das células musculares. As fibras musculares mais internas, presumivelmente, são utilizadas para forçar a saída do veneno através da redução da glândula durante sua contração. A mesma descrição foi mencionada em *L. reclusa* (FOIL et al., 1979), em *L. indagatrix* e em *P. collinus* (RIDLING e PHANUEL., 1979). Já em *L. mactans*, SMITH e RUSSELL (1987), descrevem as glândulas de veneno revestidas por uma camada de fibras musculares intrínsecas as quais quando analisadas em corte

transversal, apresentam-se organizadas tanto no sentido transversal como levemente oblíquas.

Pelas técnicas de microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão, foi possível evidenciar em *L. intermedia* entre as camadas musculares e o epitélio secretor, uma estrutura extracelular. Já em *C. medius* é descrita uma matriz extracelular bem espessa, da qual partem septos para o interior da glândula (BRAZIL e VELLARD, 1925). Segundo RIDLING e PHANUEL (1986), em *L. indagatrix* e *P. collinus*, a superfície dos músculos é circundada pela membrana basal, a qual forma uma camada contínua dentro da musculatura. Apresentam ainda alguns processos que penetram dentro do lúmen central e formam uma rede de fibrilas. Estes processos não foram descritos por estes autores em *H. ventoria*. Em *L. mactans*, esta matriz extracelular contém fibrilas de colágeno (SMITH e RUSSELL, 1967), as quais são também visualizadas em *L. intermedia*. Já em *L. reclusa* estas fibrilas de colágeno não são descritas (FOIL et al., 1979).

Através do método de coloração pelo ácido periódico de Schiff-PAS, esta região foi evidenciada como tendo grande quantidade de glicoproteínas. Também usando-se o método de azul de Alcian, em pH 1.0, a reação foi positiva, demonstrando a presença de proteoglicanos sulfatados.

Utilizando-se a técnica de imunohistoquímica, com anticorpos policlonais anti-laminina ou anti-entactina, demonstrou-se a presença de laminina e entactina, fazendo parte desta estrutura. As eletromicrografias e a técnica de sirius red (JUNQUEIRA et al., 1979), revelam que esta camada contém fibrilas do tipo colágeno, firmemente entrelaçadas, contidas em uma esparsa matriz. Todos esses dados experimentais indicam tratar-se de membrana basal, além de matriz

conectiva, que separa a camada muscular da camada epitelial na glândula de veneno de *L. intermedia*. A presença da laminina, a principal molécula não colagênica presente apenas na membrana basal, bem como da entactina (BECK et al., 1980, YURCHENCO e SCHITNY, 1990), comprovam que parte desta matriz extracelular é uma membrana basal.

Em *L. mactans* (SMITH e RUSSELL, 1967), a membrana basal também contém fibrilas de colágeno, porém em *L. reclusa* estas fibrilas não são descritas por FOIL et al. (1979). Tanto as fibrilas quanto a matriz se estendem na região entre as fibras musculares adjacentes, onde, talvez, tenham função mecânica quando da contração e compressão da glândula (SMITH e RUSSELL, 1967).

O epitélio secretor das glândulas de veneno de *L. intermedia* é formado por um epitélio glandular simples. O mesmo tipo de epitélio é encontrado em *L. reclusa* (FOIL et al., 1979), em *H. venatoria* (RIDLING e PHANUEL, 1986) e em *C. medius* (BRAZIL e VELLARD, 1925). Em *L. mactans* são encontradas várias camadas de células variando na posição e na forma (SMITH e RUSSELL, 1967). *P. collinus* e *L. indagatrix*, possuem numerosos processos basais que estendem-se para o lúmen da glândula, aumentando assim a área de superfície para acomodar numerosas células secretoras (RIDLING e PHANUEL, 1986). No escorpião amarelo *B. famulus*, o epitélio glandular inclui dois tipos celulares, células pequenas basais e células grandes colunares, responsáveis pela secreção do veneno (KANWAR et al., 1981).

Segundo FOIL et al. (1979), as células epiteliais produtoras de veneno em *L. reclusa* apresentam núcleo basal, citoplasma rico em retículo endoplasmático rugoso, mitocôndrias e complexo de Golgi. A porção apical destas células é preenchida por um grande vacúolo limitado por uma parede citoplasmática.

Em *L. intermedia*, a porção basal das células apresenta uma membrana plasmática com ausência de invaginações, sendo que em sua porção lateral nota-se a presença de grande quantidade de interdigitações, aumentando a superfície das células secretoras. Este achado sugere um alto grau de “stress” celular consequente da própria dinâmica de excreção do veneno, bem como amplificação de adesão celular. As células apresentam um núcleo alongado, situado próximo à sua porção basal. Neste, observa-se grande quantidade de eucromatina, o que caracteriza um núcleo em intensa atividade de síntese. Regiões mais elétron-densas (heterocromatina) também são visíveis em íntimo contato com a membrana nuclear. Seu citoplasma é rico em retículo endoplasmático rugoso, bem como em poliribossomos, o que está de acordo com os dados preliminares que mostram o veneno de *L. intermedia* rico em proteínas (FEITOSA et al., 1998; VEIGA et al., 1999a). Inúmeras vesículas de transferência são também observadas em contato íntimo e nas proximidades do proeminente complexo de Golgi. Este apresenta-se na forma de pilhas achatadas com a característica dilatação nas bordas de cada pilha. As porções do Golgi, facilmente reconhecidas, são responsáveis pelas alterações pós-traducionais, como clivagens e glicosilações, coerente com os dados que mostram o veneno de *L. intermedia* rico em glicoproteínas N-ligadas (VEIGA et al., 1999a). Mitocôndrias de formas ovais estão distribuídas ao longo de todo o eixo celular, principalmente na porção centro apical. Na região mais apical das células, próximo ao lúmen glandular, são encontrados grânulos de diferentes tamanhos e elétron-densidades. Os produtos de secreção são armazenados em bolsões limitados por membranas.

Em *L. reclusa* (FOIL et al., 1979), a porção apical e lateral das células

secretoras maduras são limitadas por microvilos irregularmente distribuídos. KEEGAN e LOCKWOOD (1971) descrevem a presença de microvilos apicais semelhantes aos existentes no epitélio secretor das glândulas de veneno de escorpião *Centruroides Marx*. Estes autores propuseram que os microvilos podem estabelecer um aumento da superfície celular, para auxiliar a liberação dos processos secretores vacuolares ou um meio de movimento dos conteúdos em direção ao ducto. Em *L. intermedia*, tais estruturas não foram encontradas.

Segundo alguns autores, em aranhas do gênero *Loxosceles* o veneno é produzido por glândulas apócrinas (GAJARDO-TOBAR, 1966; MARTINEZ-VARGAS, 1987). Porém, os resultados obtidos em microscopia eletrônica de transmissão, que mostram debris celulares e estruturas celulares sendo eliminadas juntamente com a secreção do veneno, sugerem ser as glândulas de veneno de *L. intermedia*, do tipo holócrino. Um mecanismo de secreção holócrino foi descrito para *Latrodectus mactans* (ANCONA, 1931), *Ctenus* (BORDAS, 1905) e em *P. collinus*, *H. venatoria* e *L. indagatrix* (RIDLING e PHANUEL, 1986). Embora BARTH (1962), tenha descrito uma sequência de eventos de secreção mais complexa e não degenerativa em glândulas de certas espécies de *Latrodectus*, os dados do presente trabalho sugerem fortemente que o mecanismo de secreção de *L. intermedia* é do tipo holócrino.

A glicosilação protéica é a mais abundante e distinta modificação pós-traducional dentre as várias descritas na literatura (HART, 1992). As funções das glicoproteínas em alguns eventos biológicos permanecem enigmáticas, mas em diversos casos a glicosilação tem uma evidente influência na conformação molecular. Os açúcares são muito importantes para a manutenção da estabilidade

molecular de proteínas e parecem participar de interações intramoleculares, ocupando papel central numa série de atividades biológicas (ELBEIN, 1991; HART, 1992). Pouco se sabe sobre a glicosilação de enzimas e outras proteínas em venenos animais. As reprotinas, as proteases dos venenos de cobras, são bioquimicamente as mais bem caracterizadas e talvez os mais destrutivos agentes dos venenos (BJARNASON e FOX, 1995). Têm sequência consenso potencial de ligação de carboidratos (BJARNASON e FOX, 1995) e na metaloproteinase hemorrágica a HR1B de *Trimerosurus flavoviridis* (TAKEYA, et al., 1990) e na metaloproteinase Atrolisina A de *Crotalus atrox* (HITE et al., 1994; FOX e BJARNASON, 1995), já foram detectados açúcares Asn-ligados, mas sem conhecimento das funções estruturais ou biológicas até o presente.

Com relação a venenos de aranha, a glicobiologia de enzimas destes venenos é identicamente desconhecida e enigmática. Os venenos de aranhas do gênero *Loxosceles* (aranha-marrom), são conhecidos pela produção de lesões dermonecroticas no local da picada, provocando hemorragia dérmica e algumas vezes hemorragia sistêmica (ver introdução), e deste modo, em algumas atividades necróticas e hemorrágicas assemelham-se a metaloproteinases do veneno de cobra (FUTRELL, 1992; FOX e BJARNASON, 1995).

Baseados em experiências prévias de nosso laboratório em bioquímica de carboidratos e na glicobiologia de moléculas da matriz extracelular e seus receptores (VEIGA et al., 1995; VEIGA et al., 1996; VEIGA et al., 1997) e visto que está descrito, no veneno de *Loxosceles intermedia*, a atividade de duas metaloproteinases com efeitos degradantes sobre a matriz extracelular (FEITOSA et al., 1998), discute-se aqui o padrão de glicosilação e algumas atividades biológicas

relacionadas aos carboidratos das proteínas do veneno.

Através da técnica de SDS-PAGE em gradiente linear 3-20% e método de coloração de proteínas pela prata, foi possível mostrar que o veneno de *L. intermedia* é uma mistura heterogênea de proteínas, com moléculas de 850 a 5 kDa. Além disso, estes resultados também indicam que as proteínas de alto peso molecular de 850 a 60 kDa são pouco expressas em comparação com as proteínas de baixo peso molecular. Esta observação contradiz estudos prévios que relatam a presença de somente nove proteínas de baixo peso molecular no veneno de *L. gaucho* (BARBARO et al., 1992). Os resultados destes estudos podem ser explicados possivelmente, pelo estreito gradiente eletroforético empregado, além de coloração de baixa sensibilidade.

Usando-se reações de blotting lectínico, cromatografia de afinidade lectínica e tratamento com glicosidases e proteases, foi determinado o perfil de oligossacarídeos das proteínas do veneno de *L. intermedia*. Foi possível mostrar que o veneno é particularmente rico em proteínas com resíduos de alta manose N-ligados (positivo para as lectinas GNA e Con-A), que possui três proteínas nas regiões de 98, 28 e 20 kDa com N-acetilglicosamina N-ligada (positivas para PSA e WGA) e que possui duas proteínas de 28 e 20 kDa com resíduos de fucose N-ligados (positivos para lectina AAA). Além disso, nossos estudos indicaram que o veneno não contém açúcar Asn-ligado do tipo complexo, biossintetizados no trans Golgi, como resíduos de  $\beta$ 1-4 galactose, ramificações de polilactosamina e resíduos de ácido siálico, mas que contém uma proteína de 67 kDa com resíduos Gal  $\beta$  (1-3) GalNac Ser/Thr-ligados (positiva para ACA e PNA). Não foi detectada a presença de resíduos de glicosaminoglicanos como heparan sulfato, dermatan sulfato ou

condroitin-sulfato no veneno digerido com proteinase-K.

Visto que não existem estudos prévios sobre a glicobiologia dos venenos de aranhas, investigou-se o envolvimento dos oligossacarídeos nos efeitos do loxoscelismo (trombocitopenia, hemorragia local e sistêmica e lesão dermonecrotica). A agregação plaquetária e a lise de eritrócitos, provocadas por *Loxosceles spp*, parecem estar relacionadas com uma proteína de 32 kDa caracterizada como uma esfingomielinase D (KURPIEWSKI et al., 1981). Como foi constatado, usando veneno de *L. intermedia* antes e depois da N-deglicosilação enzimática, não foi detectada diferença na agregação plaquetária, evidenciando que carboidratos não estão envolvidos nesta atividade biológica do veneno.

As consequências hemorrágicas logo após acidentes com *Loxosceles spp* parecem ser mais complexas do ponto de vista molecular. A hemorragia pode ser causada diretamente pelo efeito trombocitopênico, como discutido acima, ou como consequência dos efeitos deletérios das enzimas do veneno sobre as principais moléculas da matriz extracelular plasmática, tais como a fibronectina e o fibrinogênio. Estes componentes estão relacionados com a cascata de coagulação sanguínea (FEITOSA et al., 1998), como já demonstrado para metaloproteases hemorrágicas dos venenos de cobra (BARANOVA et al., 1989; BJARNASON e FOX, 1995; BARANOVA et al., 1989). Nossos resultados evidenciaram que, mesmo após a N-deglicosilação enzimática ou oxidação química de açúcares, as atividades fibronectinolítica e fibrinogenolítica do veneno foram essencialmente as mesmas em relação ao veneno glicosilado. Parece portanto claro que as atividades hemorrágicas do veneno são independentes dos açúcares, já que os efeitos trombocitopênico, fibronectinolítico ou fibrinogenolítico não sofreram mudança após

a N-deglicosilação química e enzimática.

Também foi relatada anteriormente a existência de uma molécula gelatinolítica de 33-35 kDa (loxolisina B) no veneno de *L. intermedia* (FEITOSA et al., 1998). A loxolisina B é uma proteína do tipo alta manose uma vez que ela pode ser eluída na cromatografia de afinidade à Con-A-sepharose. A N-deglicosilação enzimática, ao contrário do que foi mostrado para outras propriedades do veneno, reduziu grandemente a atividade gelatinolítica a um efeito residual. Uma avaliação do efeito gelatinolítico residual, comparando com a atividade gelatinolítica inicial (100% versus 28%), e das mudanças no peso molecular (35 versus 33 kDa), indica a glicosilação pós-traducional como responsável por aproximadamente 2 kDa no tamanho da loxolisina B. Estes dados, obtidos juntos, sugerem que o efeito gelatinolítico da loxolisina B é açúcar-dependente.

Estes achados evidenciam, pela primeira vez na literatura que uma metaloproteinase do veneno de aranha tem sua atividade modulada por resíduos de carboidratos. Visto que muitos estudos mostram que o volume (volume hidrodinâmico), ocupado pelas cadeias de açúcares é, em muitos casos, enorme (PERKINS et al., 1988; HART, 1992), postula-se que a glicosilação da Loxolisina B é essencial para a conformação e enovelamento protéico, como descrito previamente para outros glicoconjugados (ELBEIN, 1991; HART, 1992). Uma vez que o veneno é secretado em um ambiente aquoso, o processamento da loxolisina B com resíduos de oligossacarídeos (como uma função do balanço hidrofílico), poderia aumentar o sítio de ligação da enzima a seus respectivos ligantes, além de conferir maior estabilidade através de interações secundárias entre esta enzima e ligantes como previamente evidenciado em outros modelos (TAKEUCHI e KOBATA, 1991;

HOWARD et al., 1991; DANIELSEN, 1992; VEIGA et al., 1995).

Embora não se conheça a função da loxolisina B, o efeito gelatinolítico a relaciona como um provável alvo integrante dos componentes dermonecróticos presentes no veneno de *Loxosceles spp.* Uma proteína de 34 kDa envolvida no efeito dermonecrótico após o envenenamento foi identificada no veneno de *L. reclusa* (GEREN et al., 1976; NORMENT et al., 1979). Estudos com o veneno de *L. gaucho* identificaram proteínas de 33 e 35 kDa, as quais foram tidas como responsáveis pela atividade dermonecrótica (BARBARO et al., 1992). Por outro lado, os estudos de TAMBOURGI et al. (1995), evidenciaram a presença de uma proteína de 35 kDa no veneno de *L. intermedia*, envolvida nos efeitos hemolítico e dermonecrótico. O veneno de *L. intermedia* N-deglicosilado pelo tratamento com N-glicanase, após a injeção em coelhos, tem sua habilidade dermonecrótica fortemente diminuída a um efeito residual, comparado com o veneno bruto. Esta descoberta foi, mais adiante, confirmada por deglicosilação química do veneno. O fato de que as deglicosilações química e enzimática do veneno não alteram o edema e os efeitos hemorrágicos no local das injeções, bem como a agregação plaquetária (atividade trombocitopênica), e os efeitos fibronectinolítico e fibrinogenolítico, exclui a degradação das proteínas do veneno como um efeito colateral dos procedimentos de deglicosilação. Uma idéia atrativa é que a glicosilação das proteínas do veneno de *L. intermedia* (especialmente na loxolisina B gelatinolítica), pode exercer um papel central nas lesões necróticas produzidas pelo veneno. Esta atividade glicobiológica do veneno conduz para a possibilidade de uma terapia da dermonecrose baseada na utilização de drogas semelhantes a carboidratos como sugerido para outros exemplos patológicos (HODGSON, 1991; WINKELHAKE, 1991;

HART, 1992).

## 6. CONCLUSÕES

### 6.1. AS GLÂNDULAS SECRETORAS DE VENENO DA ARANHA

#### *Loxosceles intermedia* (ARANHA MARROM)

- São estruturas pares, situadas no cefalotórax e que descarregam seus produtos de secreção diretamente em um par de tubos ligados a cada quelícera.
- Possuem a forma bulbar e são encapsuladas por músculos estriados.
- Apresentam camadas de fibras de músculos estriados, em contato com uma membrana basal que separa a região muscular da camada epitelial.
- Suas células epiteliais possuem um citoplasma rico em retículo endoplasmático rugoso, mitocôndrias, complexo de Golgi e vesículas secretoras contendo o veneno, uma mistura complexa de proteínas.

### 6.2. O VENENO DA DA ARANHA *Loxosceles intermedia* (ARANHA MARROM)

- Possui glicoproteínas com estruturas do tipo alta-manose N-ligadas, proteínas com resíduos de fucose N-ligados e proteínas com resíduos de N-acetilgalactosamina O-ligados, mas ausência de glicosaminoglicanos ou estruturas complexas contendo galactose ou ácido siálico terminais.
- Seus efeitos sobre a agregação plaquetária (atividade trombocitopênica), como também os efeitos fibronectinolítico e fibrinogenolítico (hemorrágicos), são açúcar-independentes.
- A loxolisina B, uma metaloprotease gelatinolítica de 32-35 kDa, é uma glicoproteína do tipo alta-manose e que, após uma N-deglicosilação enzimática, tem reduzido seu peso molecular em aproximadamente 2 kDa e seu efeito

gelatinolítico residual em 28%, quando comparada com a molécula glicosilada. Mostra também uma atividade gelatinolítica dependente da glicosilação pós-traducional.

- Analisando-se o efeito dermonecrótico, através do veneno N-deglicosilado, química ou enzimaticamente, verificou-se que ocorreu uma atividade somente residual quando comparado com o controle glicosilado.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANCONA, L. Anatomia a histologia del aparato venenoso de *Lactodrextus mactans*, arano capulina. **An. Inst. Biol.**, v. 2, p. 177, 1931.

AU, L.C.; HUANG, Y.B.; HUANG, T.F.; TEH, G.W.; LIN, H.H. AND CHOO, K.B. A common precursor for a putative haemorrhage protein and rodhostomin, a platelet aggregation inhibitor of the venom of *Calloselasma rhodostoma*: molecular cloning and sequence analysis. **Biochem. Biophys Res. Commun.**, v. 181, p. 585-593, 1991.

BARANOVA, E.N.; SHANONN, J.D.; BJARNASON, J.B.; FOX, J.W. Degradation of extracellular matrix proteins by hemorrhagic metalloproteinases. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 275, p. 63-71, 1989.

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

BARBARO, K.C.; EICKSTEDT; V.R.D. and MOTA, I. Adjuvant effect of *Loxosceles gaucho* (South American brown spider) venom. **Toxicon**, Oxford, v. 32, n. 6, p. 687-693, 1994.

BARBARO, K.C.; JARED, C.; MOTA, I. Aranhas venenosas no Brasil. **Ciência Hoje**,

Rio de Janeiro, v. 19, n. 114, p. 48-52, 1995.

BARTH, R. Estudos histológicos sobre as glândulas peçonhentas da "viúva negra", *Latrodectus mactans*. **Mem. Inst. Osw. Cruz**, v. 60, p. 275, 1962.

BEÇAK, W.; PAULETE, J. **Técnicas de Citologia e Histologia**. Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., 1976.

BECK, K., HUNTER, I.; ENGEL, J. Structure and function of laminin: anatomy of a multidomain glycoprotein. **FASEB J.**, v. 4, p. 148-160, 1990.

BERTKAU, L. Bau der Giftdrusen einheimischer spinnen. **Verh. Nat. Ver. Bonn.**, v. 48, p. 59, 1891.

BIRKEDAL-HANSEN, H.; MOORE, W.G.I.; BODDEN, M.K.; WINDSOR, L.J.;  
BIRKEDAL-HANSEN, B.; De CARLO, A.; ENGLER, J.A. Matrix metalloproteinases: a review. **Crit. Rev. Oral Biol. Med.**, v. 4, p. 197-250, 1993.

BJARNASON, J.B.; FOX, J.W. Snake venom metalloendopeptidases: reprotolysins. **Methods Enzymol.**, v. 248, p. 345-368, 1995.

BRAVO, L.M.; PURATIC, S.O.; BEHN, T.C.; FARDELLA, B.C.; CONTREPA, F.A. Estudio de la hemólisis inducida por veneno de *Loxosceles laeta*. Experiência *in vitro*. **Rev. Med. Chile**, Santiago, v. 121, p. 16-20, 1993.

BRAZIL, V.; VELLARD, J. Estudo histologica da glandula de venene da *Ctnedus*

*medieus*. **Mem. Inst. Butantan**, n. 2, p. 24-73, 1925.

BORDAS, L.M. Rechercher anatomiques, histologiques et physiologiques sur les glands venimeuses ou glands des cheliceres des Malnignantes. **Ann. Sci. Nat.**, v. 9, p. 147, 1905.

BÜCHERL, W. Aranhas do gênero *Loxosceles* e "loxoscelismo" na América do Sul. **Mem. Inst. Butantan.**, São Paulo, v. 30, p. 167-186, 1960-62.

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

COUTINHO, N.L.R. **Avaliação funcional e histopatológica das alterações renais induzidas pelo veneno da "aranha-marrom", *Loxosceles intermedia* (Mello-Leitão, 1934)**. Curitiba (Dissertação de Mestrado em Morfologia, Biologia Celular, Universidade Federal do Paraná, 1996).

DAMJANOV, I. Biology and disease. Lectin Cytochemistry and histochemistry. **Lab. Invest.**, v. 57, n. 1, p. 5-20, 1987.

DANIELSEN, E.M. Folding of intestinal brush border enzymes: evidence that high-mannose glycosylation is an essential early event. **Biochemistry**, v. 31, p. 2266-2272, 1992.

DIETRICH, C.P.; DIETRICH, S.M.C. Eletrophoretic behaviour of acidic

- mucopolysaccharides in diamine buffers. **Anal. Biochem.**, v. 70, p. 645-647, 1976.
- ELBEIN, A.D. Glycosidase inhibitors: inhibitors of N-linked oligosaccharide processing. **FASEB J**, v. 5, p. 3055-3063, 1991.
- ENGVALL, E.; RUOSLAHTI, E. Binding of soluble form of fibroblast surface protein, fibronectin, to collagen. **Int. J. Cancer**, v. 20, p. 1-5, 1977.
- FEITOSA, L., GREMSKI, W., VEIGA, S.S., ELIAS, M.C.Q.B., GRANER, E., MANGILI, O.C.; BRENTANI, R.R. Detection and characterization of metalloproteinases with gelatinolytic, fibronectinolytic and fibrinogenolytic activities in brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. **Toxicon**, Oxford, v. 36, p. 1039-1051, 1998.
- FOIL, L.D.; COONS, L.B.; NORMENT, B.R. Ultrastructure of the venom gland of the brown recluse spider, *Loxosceles reclusa* Gertsch and Mulaik (Araneae:Loxoscelidae). **Int. J. Insect. Morphol. & Embryol.**, v. 8, p. 325-334, 1979.
- FOX, J.W.; BJARNASON, J.B. Atrollysins: metalloproteinases from *Crotalus atrox* venom. **Methods Enzymol.**, v. 248, p. 368-387, 1995.
- FRANCO, C.R.C. **Estudo ultraestrutural do estômago de dois teleósteos**

- Hypostomus commersonii* (Reis et al., 1911) e *Rhamdia branneri* (Hasemann, 1911).** Curitiba (Dissertação de Mestrado em Morfologia, Biologia Celular, Universidade Federal do Paraná, 1994).
- FUTRELL, J. Loxoscelism. **Am J Med Sci.**, v. 304, n. 4, p. 261-267, 1992.
- GAJARDO-TOBAR, R.R. Mi experiência sobre loxoscelismo. **Mem. Inst. Butantan.**, São Paulo, v. 33, n. 3, p. 689-698, 1966.
- GEREN, C.R.; CHAN, T.K.; HOWELL, D.E.; ODELL, G.V. Isolation and characterization of toxins from brown recluse spider venom (*Loxosceles reclusa*). **Archs. Biochem. Biophys.**, v. 174, p. 90-99, 1976.
- GERTSCH, W.J.; ENNIK, F. The spider genus *Loxosceles* in North America, Central America and West Indies (Aranae, Loxoscelidae). **Bull. Am. Mus. Nat. Hist.**, v. 175, n. 3, p. 264-360, 1983.
- GOWDA, D.C.; JACKSON, C.M.; HENSLEY, P.; DAVIDSON, E.A. Factor X-activating glycoprotein of Russell's viper venom. Polypeptide composition and characterization of the carbohydrate moieties. **J. Biol. Chem.**, v. 269, p. 10644-10650, 1994.
- GOWDA, D.C.; JACKSON, C.M.; KURZBAN, G.P.; McPHIE, P.; DAVIDSON, E.A. Core sugar residues of the N-linked oligosaccharides of Russell's viper venom

- factor X-activator maintain functionally active polypeptide structure. **Biochemistry**, v. 35, p. 5833-5837, 1996.
- GREMSKI, W.; CUTLER, L.S. Immunocytochemical localization of glycosaminoglycans in the rat submandibular gland. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 34, p. 118-27, 1986.
- GREMSKI, W.; CUTLER, L.S. Immunocytochemical localization of heparan sulfate proteoglycan in the submandibular gland. **Histochem. J.**, v. 23, n. 8, p. 339-344, 1991.
- GREMSKI, W. Embryo submandibular gland. Characterization of proteoglycans. **An. V Congres. Ibero-Americano de Biol. Cel. (Málaga-Espanha)**, p. 73-74, 1992.
- HARLOW, E.; LANE, D. **Antibodies: A Laboratory Manual**, Cold Spring Harbor, New York, 1988.
- HART, G.W. Glycosylation. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 4, p. 1017-1023, 1992.
- HITE, J.M.; GLANY, W.J.; LANCASTER, J.C.; WHITCOMB, W.H. Biology of the brown recluse spider. **Arkansas Agri. Exp. St. Bull.**, v. 711, p. 26, 1960.
- HITE, L.A.; JIA, L.G.; BJARNASON, J.B.; FOX, J.W. cDNA sequences for four snake venom metalloproteinases: structure, classification, and their relationship to mammalian reproductive proteins. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 308, p.182-191,

1994.

HODGSON, J. Carbohydrate-based therapeutics. **Biotechnology**, v. 9; p. 609-613, 1991.

HOWARD, S.C.; WITTWER, A.J.; WELPHY, J.K. Oligosaccharides at each glycosylation site make structure-dependent contributions to biological properties of human tissue plasminogen activator. **Glycobiology**, v. 1, p. 411-417, 1991.

JORGE, T.M; EICKSTEDT, V.R.D.; KNYSAK, I.; FISMAN, L.F.Z.; RIBEIRO, L. Curso sobre acidentes com animais peçonhentos. **Arq. Bras. Med.**, v. 65, n. 5, 1991.

JUNQUA, C.; VACHON, M. Les arachnides et leurs venin. **Acad. R. Sci. d'Outre-Mer.**, Bruxelles, v. 17, p. 1-36, 1968.

JUNQUEIRA, L.C.U.; BIGNOLAS, G. and BRENTANI, R.R. Picrosirus staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. **Histochemical Journal** , v. 11, p. 447-455, 1979.

KANWAR, U.; SHARMA, A. and NAGPAL, N. Morphological and cytochemical studies on the venom secreting cells of the scorpion, *Buthus famulus*. **J. Anim. Morphol. Physiol.**, v. 28, p. 206-209, 1981.

KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **J. Cell Biol.**, v. 27, p. 137A, 1965.

KEEGAN, H.L.; W.R. LOCKWOOD, W.R. Secretory epithelium in venom glands of two species of scorpion of the genus *Centruroides Marx*. **Amer. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 20, p. 770-85, 1971.

KJELLÉN, L.; LINDAHL, U. Proteoglycans: structures and interactions. **Ann. Rev. Biochem.**, v. 54, p. 631-664, 1991.

KORNFELD, R.; KORNFELD, S. Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. **Ann Rev Biochem**, v. 54, p. 631-664, 1985.

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

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LOCHNIT, G.; GEYER, R. Carbohydrate structure analysis of batroxobin a thrombin-like serine protease from *Bothrops moojeni* venom. **Eur. J. Biochem.**, v. 228, p. 805-816, 1995.

LOWRIE, D.C. Starvation longevity of *Loxosceles laeta* (Nicolet) (Araneae), **Entom.**

**News**, Philadelphia, v. 9, n. 4, p. 130-132, 1980.

LUCAS, S.; CARDOSO, J.L.; MORAES, A.C. Loxoscelismo: Relato de um caso atribuído a *Loxosceles amazonica* GERSTCH, 1967. **Mem. Inst. Butantan**, São Paulo, v. 7; n. 48, p.127-131, 1983-84.

LUCAS, S. Spiders in Brazil. **Toxicon**, Oxford, v. 26, n. 9, p. 759-772, 1988.

McMANUS, J.F.A. Histological demonstration of mucin after periodic acid. **Nature**, v. 158, p. 202, 1948.

MANFREDINI, L.; MALUF, E.M.C.P.; CARVALHO, D.S.; OPABE, I.; MANGILI, O.C. *Loxosceles*: A "aranha marrom". **Cadernos de Saúde da Prefeitura da Cidade de Curitiba**. v.1, n.2, 1993.

MARTINEZ-VARGAS, A.Z. Loxoscelismo, um problema de salud en el *Perú*. **Bol. San. Panam.**, v. 103, n. 4, p. 378-386, 1987.

MIYATA, T.; TAKEYA, H.; OZEKI, Y.; ARAKAWA, M.; TOKUNAGA, F.; IWANAGA, S.; SATOH, T.O. Primary structure of hemorrhagic protein, HR2a, isolated from the venom of *Trimeresurus flavoviridis*. **J. Biochem.**, v. 105, p. 847-853, 1989.

NIKAI, T.; OHARA, A.; KOMORI, Y., FOX, J.W.; SUGIHARA, H. Primary structure of a coagulant enzyme, bilineobin, from *Agkistrodon bilineatus* venom. **Arch.**

**Biochem. Biophys.**, v. 318, p. 89-96, 1995.

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

PAINE, M.J.I.; DESMOND, H.P.; THEAKSTON, R.D.G.; CRAMPTON, J.M. Purification, cloning, and molecular characterization of a high molecular weight hemorrhagic metalloprotease, jararhagin, from *Bothrops jararaca* venom. **J. Biol. Chem.**, v. 267, p. 22869-22876, 1992.

PERKINS, S.J.; WILLIAMS, A.F.; RADEMACHER, T.W.; DWEK, R.A. The thy-I glycoprotein: a three-dimensional model. **Trends Biochem. Sci.**, v. 13, p. 302-303, 1988.

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

PLOW, E.F.; PIERSCHBACHER, M.D.; RUOSLAHTI, E.; MARGUERIE, G.A. The effect of arg-gly-asp-containing peptides on fibrinogen and von Willebrand factor binding to platelets. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 82, p. 8057-8061, 1985.

REES, S.R.; GATES, C.; TIMONS, S; DES-PRES, R.M.; KING, L.E. Jr. Plasma components are required for plattelet activation by the toxin of *Loxosceles*

*reclusa*. **Toxicon**, v. 26, n. 11, p. 1035-1046, 1988.

REESE, A.M. The anatomy of the venom glands in the black widow spider, *Latrodectus mactans*. **Trans. Am. Micr. Soc.**, v. 63, p. 170, 1944.

RIDLING, M. W.; PHANUEL, G.J. Functional morphology of the poison apparatus and histology of the venom glands of three indian spiders. **Journal, Bombay Natural Hist. Society**, v.86, p.344-354, 1986.

RODRIGUES, C.J.H.; PARAS, Z.M.S.; NOBREGA, M.M.; TORRES, J.B. Acidentes com aracnídeos. **Revista HCPA**, v.6, n.2, p.91-96, 1986.

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

SANCHEZ, E.F.; DINIZ, C.R. and RICHARDSON, M. The complete amino acid sequence of the haemorrhagic factor LHFII, a metalloproteinase isolated from the venom of the bushmaster snake (*Lachesis muta muta*). **FEBS Lett.**, v. 282, p. 178-182, 1991.

SANTOS. V.L.P.; FRANCO, C.R.C.; VIGGIANO, R.L.L.; SILVEIRA, R.B.; MANGILI, O.C.; VEIGA, S.S.; GREMSKI, W. Structural and ultrastructural description of venom gland (Brown Spider) *Loxosceles intermedia*. **Submetido**, 1999.

SCHENONE, H.; LETONJA, T. Notas sobre la biologia y distribuicion geográfica de

las arañas del género *Loxosceles*. **Bol. Chil. Parasitol.**, v. 30, p. 27-29, 1975.

SCHENONE, H.; SUÁRES, G. Venom of scytodidae, genus *Loxosceles*. In BETINI, S. **Arthropod. venoms**, New York, v. 48, p. 245-247, 1978.

SCHENONE, H.; SAAVEDRA, T.; ROJAS, A.; VILLARROEL, F. Loxoscelismo en Chile. Estudios epidemiológicos, clínicos y experimentales. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, São Paulo, v. 31, n. 6, p. 403-415, 1989.

SMITH, D.S.; RUSSELL, F.E. Structures of the venom gland of the black widow spider *Lactrodectus mactans*. A preliminary light and electron microscopy study, 1-15. In F.E. Russel and P.R. Saunders (eds.) **Animals Toxins**, Pergamon Press, Oxford, 1967.

SMITH, W.C.; MICKS, W.D. The role of polimorphonuclear leukocytes in the lesion caused by the venom of the brown spider, *Loxosceles reclusa*. **Lab. Invest.**, Baltimore, v. 22, p. 90-93, 1970.

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

SUAREZ, G.; BIGGERMANN, U.; SCHENONE, H. Estudios bioquímicos del veneno de *Loxosceles laeta* y sus mecanismos de acción. **Bol. Chil. Parasitol.**, Chiba, n. 26, p. 60-62, 1971.

TAKEYA, H.; ARAKAWA, M.; MIYATA, T.; IWANAGA, S.; OMORI-SATOH, T.  
Primary structure of H<sub>2</sub>-proteinase, a non-haemorrhagic metalloproteinase,  
isolated from venom of the Habu snake, *Trimeresurus flavoviridis*. **J. Biochem.**, v.  
106, p. 151-157, 1989.

TAKEYA, H.; ODA, K.; MIYATA, T.; OMORI-SATOH, T. and IWANAGA, S. The  
complete amino acid sequence of the high molecular mass hemorrhagic protein  
HR1B isolated from the venom of *Trimeresurus flavoviridis*. **J. Biol. Chem.**, v.  
265, p. 16068-16073, 1990.

TAKEUCHI, M.; KOBATA, A. Structures and functional roles of the sugar chains of  
human erythropoietins. **Glycobiology**, v. 1, p. 337-346, 1991.

TAMBOURGI, D.V.; MAGNOLI, F.C., EICKSTEDT, V.R.D.; BENEDETTI, Z.C.;  
PETRICEVICH, V.L.; SILVA, W.D. Incorporation of a 35-kilodalton purified protein  
from *Loxosceles intermedia* spider venom transforms human erythrocytes into  
activators of autologous complement alternative pathway. **J. Immunol.**, v. 155, p.  
4459-4466, 1995.

TIMPL, R.; Rohde, H.; Robey, P.G.; RENNARD, S.I.; FOIDART, J.M; MARTIN, G.R.  
Laminin – a glycoprotein from basement membranes. **J. Biol. Chem.**, v. 254, p.  
9933-9937, 1979.

TIMPL, R.; PAULSSON, M.; DZIADEK, M.; FUJIWARA, S. Basement membranes. **Methods in Enzymology**, v. 145, p. 363-391, 1987.

TRYGVASSON, K. The laminin family. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 5, p. 877-882.

TOWBIN, H.; STAHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 76, p. 4350-4354, 1979.

VEIGA, S.S.; CHAMMAS, R.; CELLA, N.; BRENTANI, R.R. Glycosylation of  $\beta$ 1-integrins in B16-F10 melanoma cells as determinant of differential binding and acquisition of biological activity. **Int. J. Cancer**, v. 61, p. 420-424, 1995.

VEIGA, S.S.; ELIAS, M.C.Q.B.; GREMSKI, W.; PORCINATTO, M.A.; NADER, H.B.; BRENTANI, R.R. Detection of post-translational sulfation of  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 integrin and its role integrin-fibronectin binding. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 00, p. 1235-1238, 1996.

VEIGA, S.S.; ELIAS, M.C.Q.B.; GREMSKI, W.; PORCINATTO, M.A.; SILVA, M.; NADER, H.B.; BRENTANI, R.R. Post-translational modifications of  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 integrin by glycosaminoglycan chains. The  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 integrin is a facultative proteoglycan. **J. Biol. Chem.**, v. 272, p. 12529-12535, 1997.

VEIGA, S.S.; GREMSKI, W.; SANTOS, V.L.P.; FEITOSA, L.; MANGILI, O.C.;

- NADER, H.B.; DIETRICH, C.P.; BRENTANI, R.R. Oligosaccharide residues of *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom proteins: dependence of glycosylation for dermonecrotic activity. *Toxicon*, Oxford, *in press*, 1999a.
- VEIGA, S.S.; FEITOSA, L.; SANTOS, V.L.P.; SOUZA, G.A.; RIBEIRO, A.S.; MANGILI, O.C.; PORCINATO, M.A.; NADER, H.B.; DIETRICH, C.P.; BRENTANI, R.R.; GREMSKI, W. Effect of *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom on basement membrane structures. **Submetido**, 1999b.
- VELLARD, J. La fonction venimeuse chez les araignées. *Mem. Inst. Butantan, Simp. Internac.*, São Paulo, v. 33, n. 1, p. 35-44, 1966.
- WASSERMAN, W.J.; ANDERSON, P.C. Loxoscelism and arachnidism necrotic. *Toxicol-Clin. Toxicol.*, v. 21, n. 465, p. 451-472, 1983-84.
- WINKELHAKE, J.L. Will complex carbohydrate ligands of vascular selectins be the next generation of non-steroidal anti-inflammatory drugs? *Glycoconjugate J.*, v. 8, p. 381-386, 1991.
- WRAY, W.; BOULIKAS, T.; WRAY, V.P.; HANCOCK, R. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.*, v. 118, p. 197-203, 1981.
- YURCHENCO, P.; SCHITTNY, J. Molecular and cellular aspects of basement membranes. *FASEB J.*, v. 4, p. 1577-1590, 1990.