

**GUSTAVO ANTONIO DE SOUZA**

**“Estudo da Degradação da  
Membrana Basal por Constituintes  
Presentes no Veneno da *Loxosceles  
intermedia* (Aranha Marrom)”**

Monografia apresentada ao Curso de Ciências Biológicas como requisito necessário da disciplina Estágio em Biologia Celular para obtenção do Bacharelado em Ciências Biológicas.

**Orientador:** Prof. Dr. Silvio Sanches Veiga

**Co-orientador:** Prof. Dr. Waldemiro Gremski  
Laboratório de Matriz Extracelular  
Departamento de Biologia Celular

**CURITIBA  
1999**

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Álvaro e Cleide, pelo constante apoio e carinho, e especialmente ao meu irmão, Sandro, que me incentivou ao gosto pela biologia e pela ciência.

Ao Prof. Waldemiro Gremski, pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório, e ao grande amigo e mestre Prof. Silvio Sanches Veiga (Sanchão), por todo aprendizado tanto como bom cientista quanto como bom companheiro.

Aos amigos de laboratório Adriana, Andréa, Ana Isabel, Juliana Dreyfuss, Juliana Haoach, Loara (que infelizmente não se encontra mais entre nós), Rafael, Taniamara, Vera dos Santos (Verinha, responsável pelos ótimos resultados em microscopia eletrônica) e Vera Zanetti, pela agradável convivência diária.

Ao LIPAPE (Laboratório Interdisciplinar de Pesquisa em Animais Peçonhentos, UFPR) pela extração de veneno:

Ao CME (Centro de Microscopia Eletrônica) e ao Maurício P. Cantão (Copel, UFPR) pela facilidade com o microscópio eletrônico de varredura.

Ao Biotério da UFPR (Cândido, Iselen,...) pela manutenção dos animais usados.

Ao CNPq, que financiou este projeto.

## ÍNDICE

<b>Abreviações</b> .....	4
<b>Resumo</b> .....	5
<b>Introdução</b> .....	6
<b>Materiais e Métodos</b>	
Reagentes.....	8
Linhagem celular, condições de cultura e purificação do proteoglicano heparan sulfato e cadeias de polissacarídeos.....	8
Extração do veneno da aranha marrom.....	9
Ensaio proteolítico dos constituintes purificados da membrana basal.....	9
Eletroforeses.....	10
Métodos histológicos citoquímicos para microscopia de luz.....	11
Análise de imunohistoquímica.....	11
Microscopia eletrônica de transmissão.....	12
Microscopia eletrônica de varredura.....	12
Ensaio de agregação plaquetária.....	13
Estudos de dermonecrose.....	13
<b>Resultados</b>	
Padrão da membrana basal de EHS e controle de qualidade da toxicidade do veneno.....	14
Efeito proteolítico do veneno de <i>L. intermedia</i> em cortes de membrana basal do tecido de EHS.....	14
Efeito do veneno na membrana basal de EHS, analisado por microscopia eletrônica.....	14
Efeito do veneno de <i>L. intermedia</i> em componentes purificados da membrana basal: laminina, dímero laminina-entactina, entactina e colágeno IV.....	15
Efeito do veneno no heparan sulfato proteoglicano e cadeias de polissacarídeos heparan sulfato.....	15
Efeito degradativo do veneno de <i>L. intermedia</i> na membrana basal com liberação de laminina.....	16
Efeito inibitório da 1,10-fenantrolina nas atividades proteolíticas do veneno....	16
<b>Discussão</b> .....	18
<b>Figuras</b> .....	22
<b>Referências Bibliográficas</b> .....	32

## ABREVIações

BCIP	- bromocloroindolifenilfosfato
Ci	- Curie
Cpm	- cintilações por minuto
CS	- condroitin sulfato
DS	- dermatan sulfato
EHS	- Engelbreth-Holm-Swarm
GAGs	- glicosaminoglicanos
HS	- heparan sulfato
HSPG	- heparan sulfato proteoglicano
IgG	- gamaimunoglobulina
KDa	- milhares de Daltons
LN	- laminina
NBT	- nitro blue tetrazolium
NEM	- n-etilmaleimida
PAGE	- eletroforese em gel de poliacrilamida
PAS	- ácido periódico de Schiff
PBS	- tampão fosfato salino
PMSF	- fenilmetilsulfonilfluoreto
Rb <sub>1</sub> aLN	- anticorpo policlonal de coelho que reconhece a laminina
Rb <sub>2</sub> aET	- anticorpo policlonal de coelho que reconhece a entactina
rpm	- rotações por minuto
<sup>35</sup> S	- enxofre radioativo
SDS	- dodecil sulfato de sódio
SEM	- microscopia eletrônica de varredura
Tris	- tris hidroximetil aminometano
TEM	- microscopia eletrônica de transmissão

## RESUMO

O efeito do veneno de *Loxosceles intermedia* (aranha marrom) sobre a membrana basal e suas principais moléculas constituintes foi investigado. Observações em microscópio de luz mostraram que o veneno de *L. intermedia* obtido através de choque elétrico e que reproduz dois dos principais sinais do Loxoscelismo em laboratório (provoca dermonecrose em coelho e induz agregação plaquetária), exibe atividade na membrana basal de EHS, reduzindo seus perfis de marcação após coloração com PAS, Alcian Blue e após imunohistoquímica para laminina, comparado aos controles. Estudo de microscopia eletrônica confirmou os resultados acima, mostrando a ação do veneno na membrana basal de EHS e demonstrando que as estruturas deste tecido são susceptíveis ao veneno. Usando moléculas purificadas constituintes de membranas basais, determinamos que o veneno não é ativo contra laminina ou colágeno tipo IV, mas é capaz de clivar entactina e heparan sulfato proteoglicano. Além disso, quando fragmentos de EHS foram incubados com veneno detectamos uma liberação de laminina no sobrenadante, corroborando a ocorrência de algum rompimento na membrana basal. O efeito de degradação do veneno sobre a entactina foi bloqueado por 1,10-fenantrolina, mas não por outros inibidores de proteases como PMSF, NEM ou pepstatina-A. A 1,10-fenantrolina também inibe a degradação da membrana basal causada pelo veneno, indicando que uma metaloprotease do veneno está envolvida nestes efeitos. A degradação destas moléculas da matriz extracelular e a susceptibilidade das membranas basais ao veneno loxoscélico podem levar a perda da integridade vascular e glomerular, resultando em hemorragia e problemas renais comuns após o envenenamento.

## INTRODUÇÃO

Os acidentes com a aranha marrom (*Loxoscelismo*) são característicos por causarem dermonecrose, a mais evidente manifestação produzida pelo envenenamento (Babcock et al., 1981; Rees et al., 1984), com formação de edema, hemorragia e necrose no local da mordida e em alguns casos com efeitos sistêmicos tais como agregação plaquetária causando trombocitopenia (Gates and Rees, 1990; Bascur et al., 1992), hemólise (Forrester et al., 1978), coagulação intravascular disseminada e problemas renais (Danny et al., 1964).

As membranas basais são finas camadas de macromoléculas produzidas e secretadas adjacentes à vários tipos celulares tais como células epiteliais, endoteliais, musculares, adiposas e células nervosas (Timpl et al., 1987; Rohrbach and Timpl, 1993). A principal característica molecular das membranas basais é a presença de uma considerável variedade de componentes bioquimicamente complexos arranjados estruturalmente como uma rede. Todas as membranas basais possuem um grupo particular de proteínas tais como colágeno tipo IV, laminina, entactina e heparan sulfato proteoglicano (Yurchenco and Schittny, 1990). Em mamíferos, as membranas basais atuam em muitas funções essenciais. São substratos para receptores de superfície celular que fornecem informações importantes para a célula promover por exemplo diferenciação celular e crescimento de neuritos. Também estão envolvidos em angiogênese, adesão plaquetária, ultrafiltração no glomérulo do rim onde o filtrado urinário é formado, e também têm muitas outras funções (Farquhar, 1991; Rohrbach and Timpl, 1993).

Proteases hemorrágicas de venenos de cobras (Fox and Bjarnason, 1995) produzem degradação proteolítica dos constituintes das membranas basais isolados de tumores Engelbreth-Holm-Swarm (Baramova et al., 1989) e de membrana basal glomerular (Ohsaka et al., 1973).

A primeira evidência de atividade proteolítica em venenos de *Loxosceles spp* foi descrito por Eskafi e Norment (1976) estudando o veneno de *L. reclusa*. Seus resultados mostraram que o veneno possui atividade proteolítica contra larvas de *Heliothis virescens* e *Musca domestica*. Jong et al. (1979), estudando o mesmo veneno e trabalhando com derivados de L-aminoacil- $\beta$ -naftilamida, observaram que o veneno hidroliza L-leucil- $\beta$ -naftilamida como o melhor

substrato, enquanto derivados de aminoácido básico e alifático tais como valina, alanina, arginina e lisina são hidrolizados menos eficientemente; e aminoácidos aromáticos tais como tirosina e outros derivados de aminoácido tais como prolina, serina, hidroxiprolina, glicina e cistina-di- $\beta$ -derivados não mostraram atividade detectável.

O veneno de *L. intermedia* (aranha marrom) possui uma atividade de degradação da fibronectina e fibrinogênio, duas moléculas solúveis da matriz extracelular, bem como da gelatina (colágeno desnaturado) (Feitosa et al., 1998; Veiga et al., 1999), mas não há trabalhos prévios sobre proteases do veneno de aranha com atividade degradativa da membrana basal. Baseado em suas propriedades patogênicas, tais como a ação dermonecrótica, atividade trombocitopênica, hemorragia tecidual e problemas renais, eventos que podem ser atribuídos a presença de enzimas proteolíticas que degradam moléculas da matriz extracelular e especialmente a membrana basal, especulamos que o veneno da aranha marrom (aranha dermonecrótica) tem um potencial efeito de degradação nesta estrutura. No presente trabalho estudamos a ação do veneno de *Loxosceles intermedia* no sarcoma EHS, um tumor murino transplantável, que produz uma membrana basal com estrutura bem característica como uma cápsula. Em experimentos usando microscopia de luz e microscopia eletrônica detectamos uma atividade do veneno induzindo rompimento morfológico da membrana basal de EHS. Usando moléculas purificadas de membranas basais determinamos o efeito hidrolítico do veneno na entactina e no heparan sulfato proteoglicano, indicando que a membrana basal é susceptível ao veneno. Através de experimentos com inibidores de proteases detectamos que somente a 1,10-fenantrolina bloqueou os efeitos entactinolíticos e disruptivos da membrana basal, indicando que metaloproteases do veneno estão envolvidas nestes efeitos.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### *Reagentes*

Laminina, complexo laminina-entactina e entactina foram purificados do tumor de Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) produzidos em fêmeas de camundongos C57-BL10 de 2 meses de idade como descrito por Timpl et al. (1979) e Paulsson et al. (1987). Colágeno tipo IV de placenta humana foi adquirido da Sigma (St. Louis, USA). Anticorpos policlonais anti-laminina (Rb<sub>1</sub>aLN) e anticorpos policlonais anti-entactina (Rb<sub>2</sub>aET) foram produzidos usando laminina e entactina purificados de EHS submetidos a SDS-PAGE preparativos como descrito por Harlow and Lane (1988).

### *Linhagem celular, condições de cultura e purificação do proteoglicano heparan sulfato e cadeias de polissacarídeos*

Linhagens estabelecidas de células endoteliais derivadas de aorta de coelho (Buonassisi and Venter, 1976) cresceram em meio de cultura Ham's F-12 (Sigma) suplementado com soro fetal bovino 10% (Cultilab, Campinas, Brasil) e penicilina/estreptomicina (1000 U e 10 mg por litro, respectivamente) (Sigma). As células foram radiomarcadas com sulfato de sódio [<sup>35</sup>S] (IPEN, São Paulo, Brasil) (150 $\mu$ Ci/ml) por 24 horas em estufa à 37°C com 2.5% CO<sub>2</sub> sob condições de umidade padrões. Para a purificação do heparan sulfato proteoglicano, células endoteliais radiomarcadas foram solubilizadas com tampão de lise (50mM Tris-HCl, pH 7.3, 1% Triton X-100, 50mM NaCl, 5mM CaCl<sub>2</sub>, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM PMSF e 2 $\mu$ g/ml aprotinina) por 15 minutos à 4°C. O extrato foi obtido por centrifugação por 10 minutos a 13000g e congelado até o uso. O heparan sulfato proteoglicano radiomarcado foi purificado por uma combinação de cromatografias de afinidade a gelatina, gel filtração e cromatografia de troca iônica como previamente descrito (Nader et al., 1987). Cadeias de polissacarídeos do heparan sulfato radiomarcado foram obtidas após digestão com 50 $\mu$ g de Superase (forma de protease Chas Pfizer Co., NY) por 4 horas à 60°C na presença de 0.8M NaCl, pH 8.0. Ao fim da incubação, a mistura foi aquecida por 7 minutos à 100°C para inativar a enzima proteolítica e o glicosaminoglicano radiomarcado foi precipitado com 2 volumes de metanol à

-20°C na presença de 100µg de carreador de heparan sulfato (Nader et al., 1989).

#### *Extração do veneno da aranha marrom*

O veneno foi extraído de aranhas capturadas na natureza e mantidas por 1 semana sem nenhum tipo de alimentação. O veneno foi extraído das quelíceras das aranhas por eletroestimulação (15V) aplicado no cefalotórax e coletado com uma micropipeta, concentrado sob vácuo e congelado à -85°C até o uso. O veneno puro é um líquido transparente, enquanto que o veneno contaminado com conteúdos estomacais torna-se opaco e é sempre descartado. Uma soma de veneno coletado de aproximadamente 5000 aranhas foi usado nestes experimentos (Barbaro et al., 1992; Feitosa et al., 1998).

#### *Ensaio proteolítico dos constituintes purificados da membrana basal*

Laminina-EHS, complexo laminina-entactina-EHS (0.5mg diluído em 50mM tampão Tris-HCl, pH 7.3, contendo 1mM CaCl<sub>2</sub> e 1mM MgCl<sub>2</sub>) foram incubados com 100µg do veneno de *L. intermedia* à 37°C. Alíquotas das misturas (25µg) foram coletadas ao tempo 0 (zero) e depois de 16 horas de incubação e o efeito proteolítico do veneno foi interrompido pelo congelamento das amostras à -20°C. Como controles, coletamos amostras somente de veneno, ou amostras de moléculas purificadas após 16 horas nas condições experimentais, mas na ausência de veneno, para checar a estabilidade experimental destes substratos. Amostras foram submetidas a um SDS-PAGE gradiente linear 3-15% sob condições redutoras e o efeito proteolítico do veneno foi visualizado por coloração com Azul de Coomassie R. Para os efeitos de inibição de proteases, dímero laminina-entactina foi incubado com veneno por 16 horas nas mesmas condições experimentais como descrito acima, mas na presença de 5mM de 1,10-fenantrolina, ou 10mM PMSF, ou 5mM NEM, ou 5µg/ml pepstatina-A, e analisado como descrito anteriormente. Entactina purificada de EHS (alíquotas de 25µg) foram incubadas com concentrações crescentes de veneno (10, 20, 40 e 100µg) à 37°C por 16 horas. Amostras foram analisadas por SDS-PAGE gradiente linear como descrito acima, transferidas para uma membrana de nitrocelulose que foi imunotestada

com um anticorpo policlonal para entactina de EHS. Para o colágeno tipo IV, o efeito degradativo do veneno foi checado sob as mesmas condições experimentais exceto que a temperatura de incubação foi de 25°C. Para o heparan sulfato proteoglicano (HSPG), o efeito hidrolítico do veneno foi analisado usando 10,000 cpm do HSPG radiomarcado que foi incubado com 10µg de veneno à 37°C por 16 horas, ou incubado na ausência de veneno como controle da estabilidade experimental. As amostras foram submetidas a SDS-PAGE gradiente linear 3-12% sob condições não-redutoras, e o gel foi seco e exposto a um filme de raio-X à temperatura ambiente por 10 dias. Para determinar a ação do veneno nas cadeias de polissacarídeos do heparan sulfato, o HSPG radiomarcado foi incubado com 10µg de veneno à 37°C por 16 horas, ou incubado na ausência de veneno como controle. Os produtos obtidos foram degradados com protease K (clivagem do núcleo protéico do HSPG) e então analisados por eletroforese em gel de agarose, o gel foi seco e exposto a um filme de raio-X por 10 dias.

### *Eletroforeses*

Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS foi realizada como descrito por Laemmli (1970). Amostras sob condições redutoras ou não-redutoras (ver legendas das figuras) foram analisadas em géis de poliacrilamida 4% ou gradientes lineares de 3-12% ou 3-15%. Para as imunoreações, as proteínas submetidas a eletroforese foram transferidas por 16 horas para filtros de nitrocelulose (Towbin et al., 1979). Os marcadores moleculares usados foram a miosina (205 kDa), β-galactosidase (116 kDa), fosforilase b (98 kDa), albumina (67 kDa), ovalbumina (44 kDa) e anidrase carbônica (29 kDa) comprados da Sigma. Proteínas transferidas para membranas de nitrocelulose foram analisadas por western-blotting. Filtros foram bloqueados com PBS contendo 5% leite em pó (Nestlé, São Paulo, Brasil) e incubados seqüencialmente à temperatura ambiente por 2 horas com anticorpo policlonal de coelho que reconhece a laminina (Rb<sub>1</sub>aLN) ou anticorpo policlonal de coelho que reconhece a entactina (Rb<sub>2</sub>aET) diluídos 1:1000 e 1:500, respectivamente, em solução bloqueadora e em seguida com anticorpos conjugados com fosfatase alcalina contra IgG de coelho (Sigma) diluído 1:4000

em solução bloqueadora por 1 hora e então a reação foi revelada em solução de BCIP-NBT (Veiga et al., 1995)

Análise de glicosaminoglicanos (GAGs) foi realizada usando eletroforese em gel de agarose com 0.05M de tampão acetato e 1,3-diaminopropano, pH 9.0 (Aldrich, Milwaukee, USA). Após a corrida eletroforética, os GAGs foram precipitados no gel usando 0.1% Cetavlon por 2 horas à temperatura ambiente (Dietrich and Dietrich, 1976). Após secar, o gel foi marcado com azul de toluidina e exposto a um filme de raio-X (X-Omat, Kodak, USA) por 10 dias à temperatura ambiente. Os marcadores de GAGs usados foram o heparan sulfato de pâncreas bovino, dermatan sulfato de pele de porco e condroitin sulfato de cartilagem de tubarão (Seikagaku, Tóquio, Japão).

#### *Métodos histológicos citoquímicos para microscopia de luz*

Os fragmentos de EHS foram fixados no fixador de Carnoy (Beçak and Paulete, 1976) por 3 horas. Após fixação, os tecidos foram lavados em etanol absoluto, desidratados em etanol absoluto por 30 minutos (3X), processados com etanol/xileno por 16 horas, clareados com xileno por 30 minutos (3X), embebidos em parafina e cortados em seções de 4 $\mu$ m. As seções foram incubadas com PBS ou com veneno de *Loxosceles intermedia* (100 $\mu$ g/ml) por 16 horas à 37°C sob atmosfera úmida. Após a incubação, as seções foram marcadas com ácido periódico e reagente de Schiff (PAS) (McManus, 1948) e Alcian Blue (Beçak and Paulete, 1976). Para o efeito da 1,10-fenantrolina na atividade hidrolítica do veneno contra membrana basal de EHS, os materiais foram processados identicamente como acima e incubados com veneno na presença de 5mM de 1,10-fenantrolina e então marcados usando o método do PAS.

#### *Análise de imunohistoquímica*

Os cortes de fragmento de EHS montados em lâminas de vidro foram desparafinizados em xileno por 16 horas e rehidratados em uma série crescente de etanol e água. Os cortes de tecido do EHS foram incubados com veneno de *Loxosceles intermedia* (100 $\mu$ g/ml) ou com PBS (controle) por 16 horas à 37°C sob condições úmidas. Os cortes foram então lavados com PBS

e incubados com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% à temperatura ambiente por 15 minutos para inibir a atividade da peroxidase endógena, lavados com PBS. Os sítios de ligação protéicos não específicos foram bloqueados com albumina de soro bovino 1% em PBS à temperatura ambiente por 30 minutos em câmara úmida. Após lavagem com PBS, cortes de EHS foram incubados com anticorpo policlonal primário que reconhece a laminina (Rb<sub>1</sub>aLN) diluído 1:500, por 16 horas à 4°C. Excesso de anticorpo foi removido com PBS e os cortes foram incubados com anticorpo de cabra anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase (Sigma) diluído 1:100. Após posterior lavagem com PBS, a diaminobenzidina 0.05% foi usada para visualizar a imunoreatividade. Os cortes foram lavados com PBS e água, desidratados com etanol, clareados em xileno, e montados em Entellan.

#### *Microscopia eletrônica de transmissão*

Os fragmentos de EHS foram fixados com fixador de Karnovsky modificado (paraformaldeído 4% + glutaraldeído 2.5% em ácido cacodílico 0.1M, pH 7.3) (Karnovsky, 1965) por 2 horas, lavados em tampão cacodilato 0.1M (pH 7.3), pós-fixado em OsO<sub>4</sub> 1% em tampão cacodilato 0.1M, pH 7.3, por 1 hora, desidratados com etanol e óxido de propileno e mantidos em Epon 812. Cortes de EHS ultrafinos foram obtidos com uma lâmina de diamante em um ultramicrotomo LKB. Os cortes foram incubados com PBS ou veneno de *Loxosceles intermedia* (100µg/ml) por 16 horas à 37°C sob condições úmidas, contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo e examinados com um microscópio eletrônico de transmissão JEOL-JEM 1200 EX II a uma aceleração de voltagem de 80KV.

#### *Microscopia eletrônica de varredura*

Os fragmentos de EHS foram fixados em fixador de Karnovsky modificado (Karnovsky, 1965) por 1 hora, lavados em tampão cacodilato, pH 7.3, incubados com PBS ou veneno de *Loxosceles intermedia* (100µg/ml) por 16 horas e pós-fixados em OsO<sub>4</sub> em 1% tampão cacodilato 0.1M (pH7.3) por 1 hora. Eles foram então desidratados em etanol, secos no ponto crítico, cobertos com ouro e examinados com um microscópio eletrônico de varredura Philips modelo MEV XL-30.

### *Ensaio de agregação plaquetária*

Plasma humano rico em plaquetas foi obtido por centrifugação diferencial de sangue humano fresco mantido em dextrose-ácido cítrico. A agregação plaquetária na presença de veneno (ver Legendas para as concentrações) foi realizada à 37°C a um nível de 1,000 rpm usando um agregômetro Becton-Dickinson como descrito (Plow et al., 1986).

### *Estudos de dermonecrose*

Para avaliação do efeito dermonecrótico, veneno obtido com descrito acima (amostras de 40µg diluídas em PBS), foram injetados intradermicamente em uma área raspada da pele de coelho. A lesão dermonecrótica foi checada 1, 2, 6 e 12 horas, 1, 2 e 5 dias após a injeção.

## RESULTADOS

### *Padrão da membrana basal de EHS e controle de qualidade da toxicidade do veneno*

Figura 1 mostra a estrutura do tecido de EHS visualizado por microscopia de luz (1A), microscopia eletrônica de transmissão (1B) e microscopia eletrônica de varredura (1C). Figura 1D e 1E representa o controle de qualidade da habilidade do veneno liberado por eletrochoque de produzir os principais sinais do Loxoscelismo. Figura 1D mostra uma lesão dermonecrotica, o mais característico dos sinais provocado por envenenamento com *Loxosceles spp.* A lesão progride de uma aguda reação inflamatória local com edema, eritema e hemorragia na derme até uma lesão escamosa negra produzida pela necrose e deslocamento gravitacional. Figura 1E demonstra a atividade de agregação plaquetária induzido pelo veneno in vitro, um efeito dependente da concentração. Quando desnaturado por aquecimento o veneno não induz agregação plaquetária, suportando uma atividade dependente da conformação.

### *Efeito proteolítico do veneno de *L. intermedia* em cortes de membrana basal de tecido de EHS*

Primeiramente investigamos um efeito degradativo provocado pelo veneno total de *L. intermedia* em membrana basal de EHS. Figura 2 mostra que a membrana basal de EHS tratada com 100µg de veneno (VEN) em PBS por 16 horas e marcada com Ácido Periódico de Schiff (PAS), Alcian Blue (Alcian Blue), ou testada imunohistoquimicamente para laminina, demonstrando uma redução no perfil de coloração quando comparadas com as amostras controle incubadas com PBS sob as mesmas condições experimentais.

### *Efeito do veneno na membrana basal de EHS, analisado por microscopia eletrônica*

Uma vez que microscopia de luz tem algumas limitações, realizamos um experimento adicional para checar a possível ação do veneno de *L. intermedia* em membranas basais. Como mostrado na Figura 3, cortes do tecido tumoral

de EHS foi incubado por 16 horas à 37°C com 100µg/ml de veneno diluído em PBS, ou similarmente incubado com PBS (controle) e então processados para microscopia eletrônica de transmissão ou microscopia eletrônica de varredura. Imagens da microscopia eletrônica de alta resolução confirmaram que o veneno tem uma atividade hidrolítica na membrana basal de EHS, como previamente observado por microscopia de luz. Controles mostraram uma membrana basal regular rodeando o tumor. O material tratado com veneno mostrou uma membrana basal com borda irregular (flecha) com muitos pontos de ruptura. A microscopia eletrônica de varredura mostrou a membrana basal como uma cápsula no controle. Por outro lado, esta membrana basal capsular aparenta estar rompida no material tratado com veneno.

*Efeito do veneno de L. intermedia em componentes purificados da membrana basal: laminina, dímero laminina-entactina, entactina e colágeno IV*

Para confirmar a atividade degradativa do veneno contra a membrana basal, incubamos laminina purificada, complexo laminina-entactina e entactina purificada com veneno à 37°C por 16 horas. Colágeno tipo IV foi incubado à 25°C uma vez que colágeno tipo IV purificado é desnaturado à temperaturas acima de 30°C (Mackay et al., 1990). Como visto na figura 4A, nem a cadeia  $\alpha_1$  da laminina nem as cadeias  $\beta_1$  ou  $\gamma_1$  sofreram algum tipo de degradação proteolítica pelo veneno. O veneno também não possui um efeito degradativo em colágeno tipo IV (4D), mas clivou a entactina quando complexada com laminina (4B) ou como molécula purificada (4C).

*Efeito do veneno no heparan sulfato proteoglicano e cadeias de polissacarídeos heparan sulfato*

Para completar a análise molecular da ação do veneno de *L. intermedia* em constituintes da membrana basal checamos a atividade degradativa do veneno no proteoglicano heparan sulfato endotelial, uma molécula importante encontrada em membranas basais. O heparan sulfato proteoglicano endotelial foi incubado com veneno à 37°C por 16 horas e PBS foi usado como controle negativo. Como pode ser observado na Figura 5A, o veneno hidroliza o núcleo

protéico do heparan sulfato proteoglicano, mas não possui atividade contra a cadeia de glicosaminoglicano heparan sulfato (5B).

*Efeito degradativo do veneno de L. intermedia na membrana basal com liberação de laminina*

Baseado no fato de que as membranas basais são uma rede intrincada formada por interações específicas entre seus constituintes (Yurchenco and Schittny, 1990) e no fato de que o veneno degrada a entactina e o núcleo protéico do heparan sulfato proteoglicano, mas aparenta não ter nenhuma ação em laminina e colágeno tipo IV, investigamos uma possível atividade desintegradora do veneno na estrutura da membrana basal, uma vez que após a clivagem da entactina e do proteoglicano heparan sulfato, moléculas conectadas na rede da membrana basal podem sofrer algum tipo de separação e desrupção. Tecido de EHS (aproximadamente 1mg) foi incubado com 100µg de veneno e o sobrenadante foi testado para laminina por um western-blotting usando um anticorpo policlonal que reconhece a laminina. Como pode ser visto na Figura 6, o tratamento da membrana basal com veneno libera laminina mas, de acordo com experimentos anteriores, não possui atividade hidrolítica aparente nesta molécula.

*Efeito inibitório da 1,10-fenantrolina nas atividades proteolíticas do veneno*

Para obter informação sobre a natureza dos efeitos proteolíticos produzidos pelo veneno de *L. intermedia* sobre a membrana basal de EHS, estudamos sua ação degradativa da entactina na presença de inibidores para os quatro principais grupos de enzimas proteolíticas, tais como a 1,10-fenantrolina (inibidor de metaloproteases), PMSF (inibidor de serino-proteases), NEM (inibidor de tiol-proteases) e pepstatina-A (inibidor de proteases ácidas). Como demonstrado na Figura 7A, o efeito entactinolítico do veneno foi bloqueado somente pela fenantrolina. Nosso próximo objetivo foi estudar a atividade da 1,10-fenantrolina sob o efeito destrutivo do veneno contra membrana basal de EHS. Como demonstrado na Figura 7B, cortes do tecido de EHS tratados com 100µg de veneno na presença de 5mM de fenantrolina e corado com PAS mostraram um perfil de marcação idêntico ao controle negativo (incubado com PBS), comparado ao controle positivo (incubado

somente com veneno) que mostra o perfil da membrana basal de EHS degradada.

## DISCUSSÃO

No presente estudo checamos a possibilidade de o veneno da aranha marrom agir diretamente em moléculas da membrana basal. Realizamos experimentos usando membrana basal de EHS, a mais útil e conveniente fonte para estudos com membrana basal e um modelo na área (Timpl et al., 1987). Nossa hipótese de trabalho se baseou nos efeitos ativados pelo veneno da aranha marrom *in vivo*, e trabalhos anteriores mostram que vários venenos de cobra podem hidrolizar membranas basais. Ohsaka et al. (1973) descreveu as atividades de hemorraginas isoladas do veneno de *Trimeresurus flavoridis*, sobre membrana basal renal, postulando que seus efeitos tóxicos podem causar hemorragia pelo enfraquecimento de capilares após degradar a matriz extracelular subendotelial. Civello et al. (1983) reportou que a proteinase hemorrágica IV (HP-IV) do veneno de *Crotalus horridus horridus* catalisa a hidrólise completa de membranas basais, sugerindo que este efeito está envolvido no mecanismo de ação hemorrágica do HP-IV. Baramova et al. (1989), estudando quatro metaloproteases hemorrágicas, Ht-a, Ht-c, Ht-d e Ht-e, do veneno de *Crotalus atrox*, determinaram sua habilidade de clivagem do colágeno tipo IV, laminina e entactina, principais constituintes das membranas basais, sugerindo que estas degradações podem levar a perda da integridade capilar resultando em hemorragia.

Nossos dados iniciais se baseiam em estudos de microscopia de luz de membranas basais de EHS incubados com veneno de *L. intermedia* e marcados para glicoproteínas (PAS), proteoglicanos (Alcian Blue) ou laminina (imunohistoquímica usando um anticorpo policlonal anti-laminina). Os resultados, ilustrados na Figura 2, indicam claramente que o veneno age em membranas basais, com significativa redução nos padrões de marcação comparado às marcações obtidas por preparações controle. Figura 2C (imunohistoquímica para laminina) posteriormente suporta esta conclusão, mostrando um rompimento apreciável da membrana basal comparado ao controle.

Estudos por microscopia eletrônica de membrana basal de EHS tratadas com veneno (Figura 3) indicaram a atividade do veneno contra esta estrutura. Análises por microscopia eletrônica de transmissão e microscopia eletrônica de

varredura mostraram regiões da membrana basal rompidas. As lesões estavam ausentes nos experimentos controle.

Testamos também se constituintes moleculares purificados da membrana basal representam substratos para o veneno. Como visto na Figura 4, o veneno de *L. intermedia* aparentemente não tem atividade contra a laminina, ou colágeno tipo IV, as principais moléculas desta estrutura. Em contraste, o veneno possui habilidade para hidrolizar a entactina, uma molécula ligante de laminina, colágeno tipo IV e heparan sulfato proteoglicano, atuando como uma ponte na organização da membrana basal (Yurchenco and Schittny, 1990). A ação hidrolítica do veneno na entactina (150kDa) resultaram em fragmentos de aproximadamente 100kDa e 50kDa, quando o complexo laminina-entactina foi checado a uma razão de 5:1 substrato:veneno (4B e 7A), indicando uma habilidade degradativa contra esta molécula. Quando a entactina foi testada contra o veneno, fragmentos similares foram obtidos, mas estes fragmentos foram subseqüentemente degradados com crescentes concentrações de veneno (4C). Resultados similares para digestão da entactina têm sido descritos para componentes de venenos de cobras (Baramova et al., 1989; Fox and Bjarnason, 1995). Esta diferença nos padrões de clivagem para o complexo laminina-entactina e para entactina purificada tratados com veneno pode ser explicado pelo fato de que a laminina, por interagir com a entactina, pode esconder regiões da entactina mais susceptíveis à ação degradativa do veneno, como previamente detectado para atrolisinas de veneno de cobra (Fox and Bjarnason, 1995). Por outro lado, uma vez que a entactina é geralmente considerada desnaturada após os procedimentos usados durante a sua purificação (Paulsson et al., 1987; Fox et al., 1991), podemos também supor que esta diferença no padrão de clivagem produzido pelo veneno está relacionado a uma alteração conformacional da entactina que facilita a atividade degradativa do veneno pela exposição de sítios normalmente escondidos. O veneno de *L. intermedia* também degrada o núcleo protéico do heparan sulfato proteoglicano de células endoteliais (5A), mas tem uma aparente falta de atividade nas cadeias de polissacarídeos de heparan sulfato (5B). Uma vez que proteoglicanos contribuem para as propriedades de semipermeabilidade da membrana basal e o heparan sulfato proteoglicano, no glomérulo renal, aparentam ser importantes em prevenir a

passagem de macromoléculas do sangue para a urina (Farquhar, 1991), é possível que a injúria renal com proteinúria provocado pelo envenenamento da aranha marrom pode ser atribuído a este efeito hidrolítico no núcleo protéico do heparan sulfato proteoglicano da membrana basal.

As membranas basais consistem principalmente de moléculas conectadas que podem ligar diretamente uma com as outras (Yurchenco and Ruben, 1987; Yurchenco and Schittny, 1990) e, como demonstrado acima, o veneno de *L. intermedia* não possuía atividade lamininolítica nem colagenolítica tipo IV, mas possui a habilidade de hidrolizar entactina e o proteoglicano heparan sulfato (Figuras 4,5 e 7). Baseado no experimento da Figura 6 (liberação de laminina de membrana basal de EHS), podemos propor que o efeito degradativo do veneno de aranhas na entactina e no núcleo protéico do proteoglicano heparan sulfato torna a estrutura em rede da membrana basal mais susceptível a avarias, com liberação de laminina nos sítios afetados pelo veneno. O sítio ligante de laminina da entactina está localizado no domínio globular C-terminal que consiste aproximadamente em 330 resíduos de aminoácidos. Interessantemente é o mesmo fragmento da entactina que promove a interação com colágeno tipo IV (Mann et al., 1988). Podemos especular que a liberação da laminina de membranas basais de EHS ocorre em função da atividade degradativa dos princípios do veneno em regiões sensíveis a proteinases dos domínios da entactina, envolvidas na ligação à laminina, assim rompendo a interação com laminina e efetivamente dissociando a laminina do colágeno IV. Aumailley et al. (1989) detectaram que mesmo os braços longo e curto da laminina se encontram associados com colágeno tipo IV, uma vez a entactina é extraída da laminina, significante interação entre laminina com colágeno IV não pode ser detectado o que pode ser interpretado pelo fato que o ligante entactina é a principal interação (de maior afinidade) entre laminina e colágeno tipo IV. Similarmente, o efeito hidrolítico dos princípios do veneno no núcleo protéico do heparan sulfato proteoglicano pode também ser efetivo em dissociar a laminina da membrana basal. A interação do heparan sulfato proteoglicano com outros constituintes da membrana basal pode permitir regulação coordenada da estrutura e função da membrana basal (Yurchenco and Schittny, 1990). A atividade do veneno contra o núcleo protéico do heparan sulfato proteoglicano pode alterar a estabilidade e

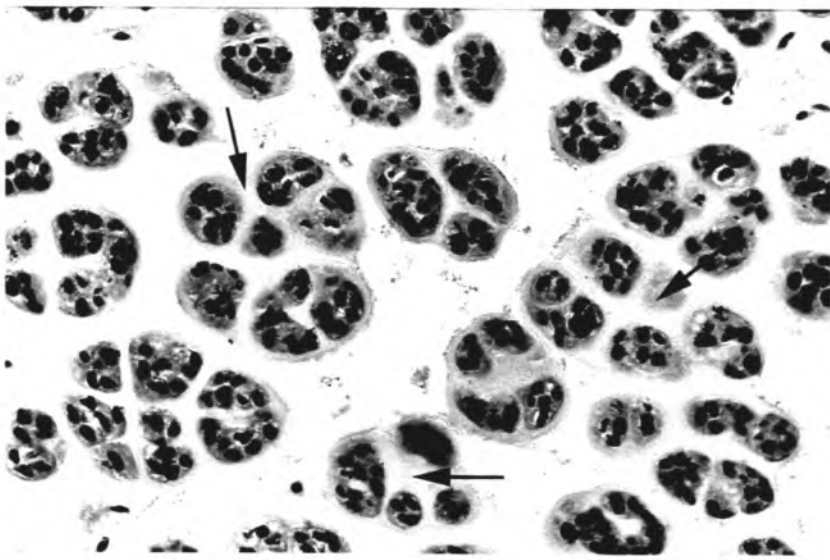
porosidade da membrana basal, resultando em modificações na arquitetura da matriz.

Baseado na observação que o veneno de *L. intermedia* hidroliza a entactina e o heparan sulfato proteoglicano e libera laminina da membrana basal, e no fato de que estas moléculas são importantes no suporte da integridade funcional-estrutural desta estrutura tecidual, podemos especular que o efeito de rompimento da membrana basal do veneno é um mecanismo plausível para a hemorragia e conseqüências da deficiência renal, que junto com outras propriedades anti-coagulantes (Futrell, 1992; Feitosa et al., 1998) provem um mecanismo plausível para a toxicidade do veneno da aranha marrom. O efeito inibitório da 1,10-fenantrolina sobre a atividade entactinolítica e o efeito degradativo do veneno contra membrana basal de EHS, indicam a participação de metaloprotease(s) nestas atividades e sugerem uma possibilidade de uma terapia baseado em inibidores de proteases no Loxoscelismo.

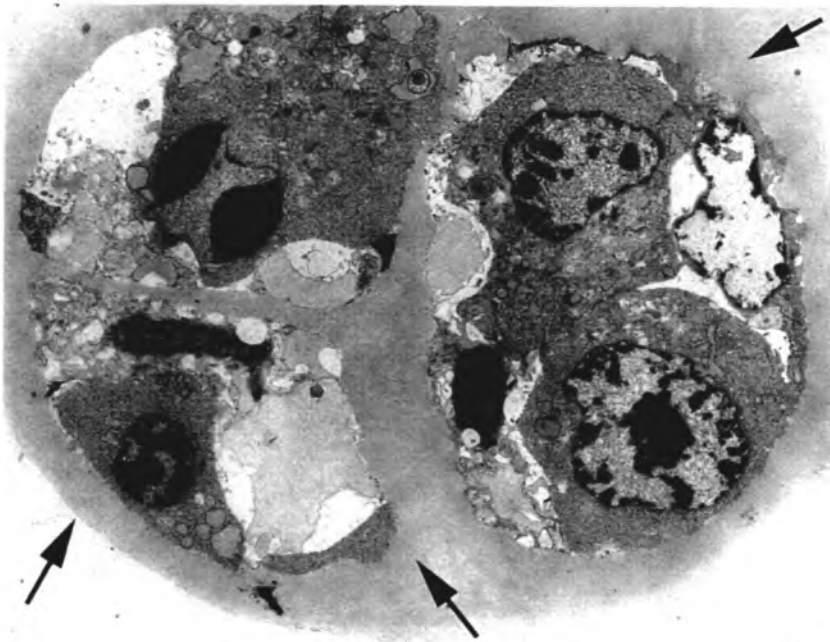
## FIGURAS

Figura 1: Padrão da Membrana Basal de EHS e Controle de Qualidade da Toxicidade do Veneno.

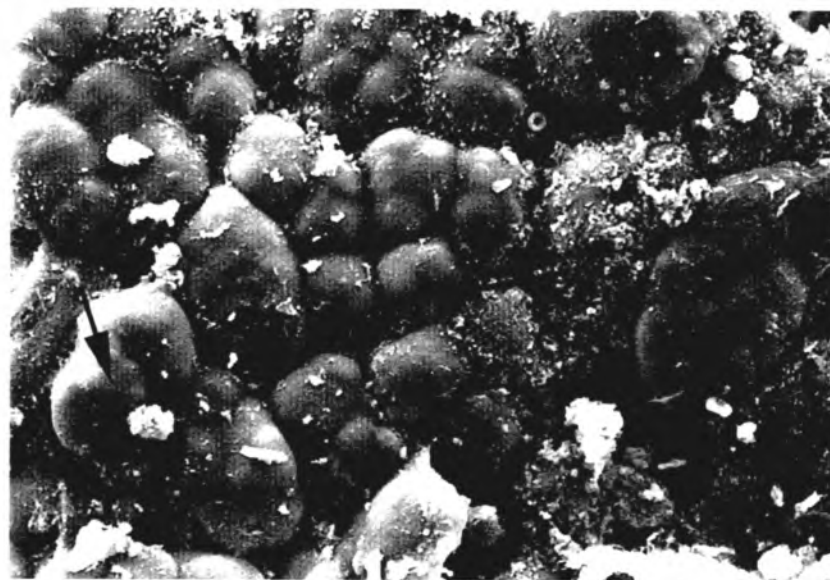
1A – Microscopia de luz de células do tumor de EHS marcadas com hematoxilina-eosina (ampliação, 600X). 1B – Eletromicrografia de microscópio eletrônico de transmissão (ampliação, 2000X) e 1C – Eletromicrografia de microscópio eletrônico de varredura (ampliação, 579X) do tecido de EHS. Flechas apontam a cápsula do tumor o qual é uma fina matriz extracelular.



A



B



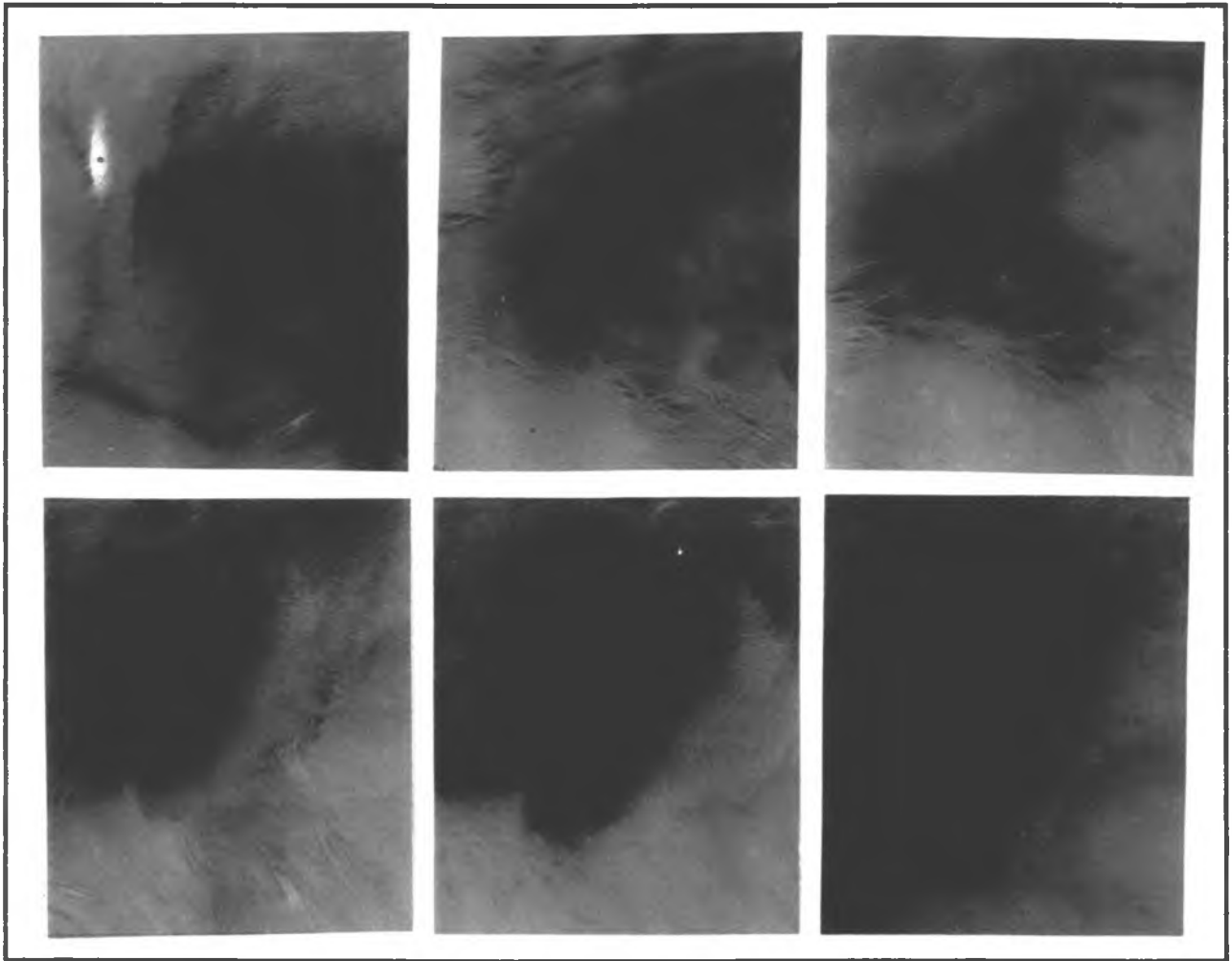
C

1D – Coelhos foram injetados intradermicamente com 40 $\mu$ g do veneno bruto de *L. intermedia*. Lesões foram avaliadas a 1, 6 e 12 horas, 1, 2 e 5 dias após a injeção.

1h

6 h

12h



1 d

2 d

5 d

FIGURE 1D Veiga et al., 1999

1E – Plasma rico em plaquetas foi incubado com veneno a concentração de 100 $\mu$ g (I), 25 $\mu$ g(II) ou 100 $\mu$ g de veneno previamente desnaturado pelo aquecimento (5 minutos à 100°C) (III). A abscissa representa o tempo em segundos e a ordenada representa a porcentagem de agregação plaquetária.

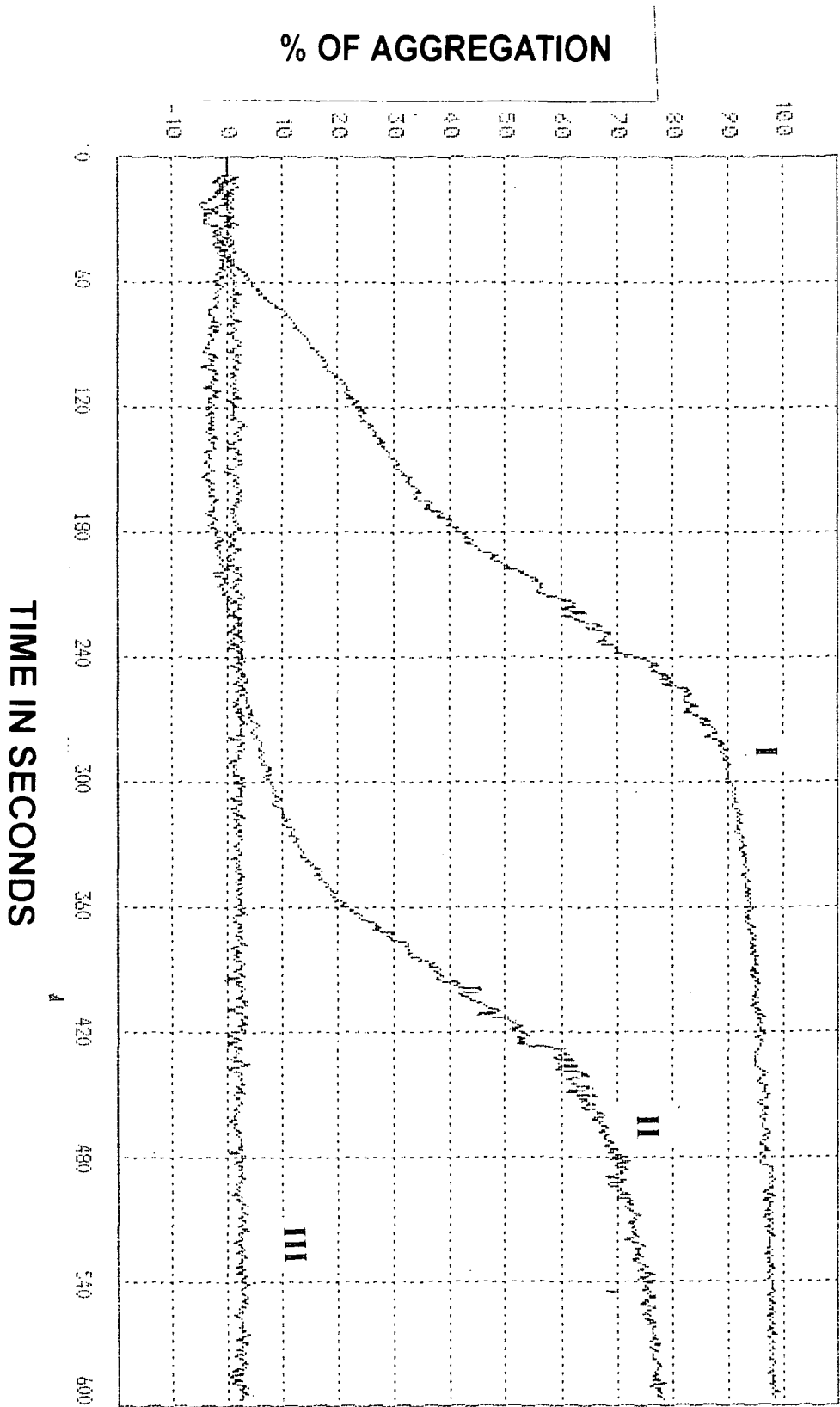
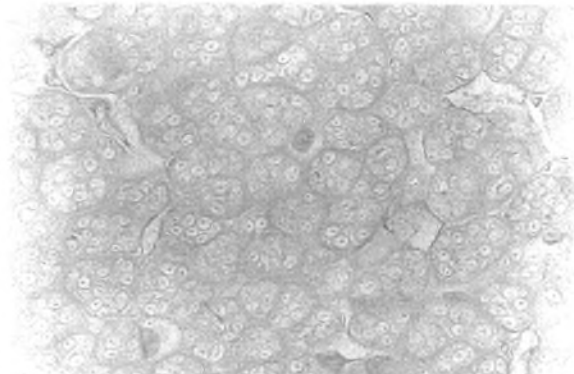
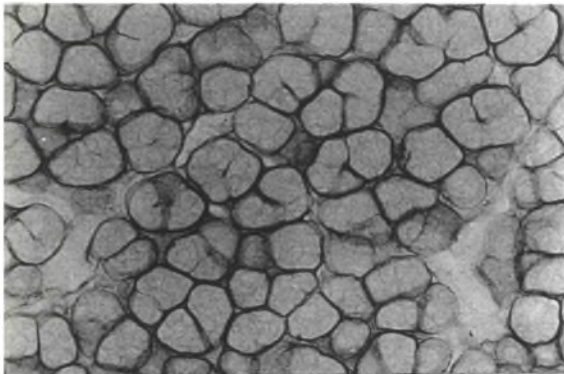


Figura 2: Atividade do Veneno de *L. intermedia* em Membrana Basal de EHS.

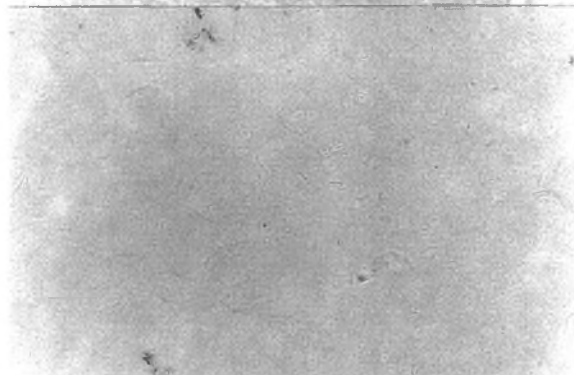
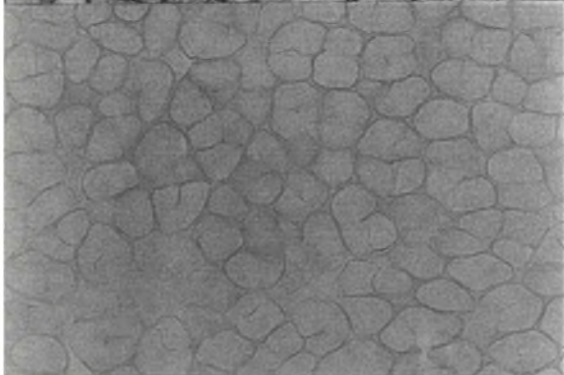
Cortes de tecido de EHS foram incubados com veneno de *L. intermedia* por 16 horas à 37°C (VENOM) ou com PBS como controle (PBS) e então marcados para glicoproteínas (PAS) e proteoglicanos (Alcian Blue) ou testados para a laminina por uma reação de imunohistoquímica (anti-LN) (ampliação da microscopia de luz, 200X).

PBS

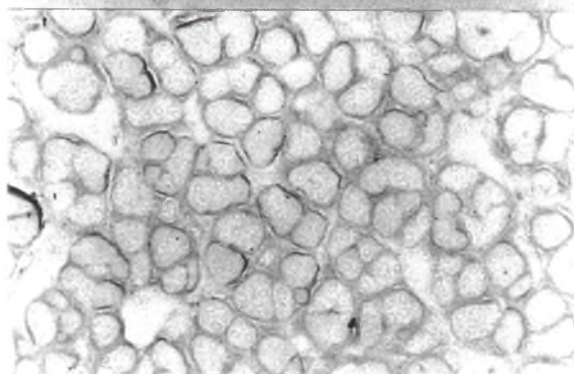
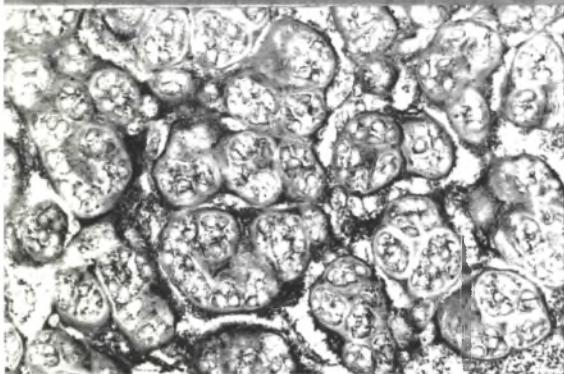
VENOM



PAS



Alcian  
Blue

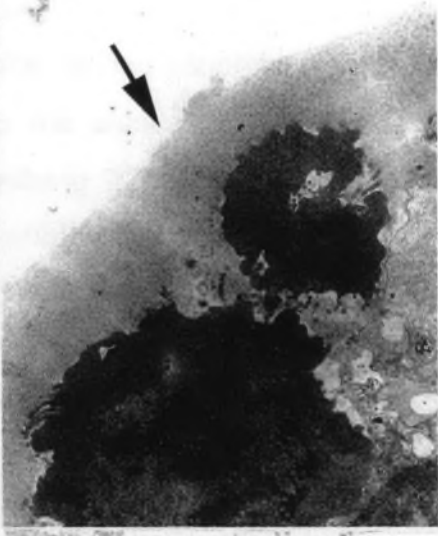


Anti-LN

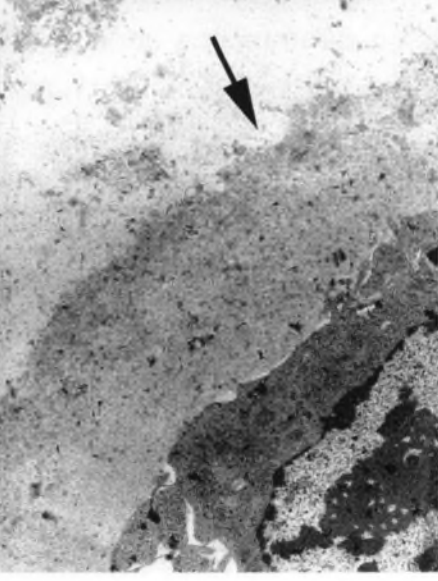
Figura 3: Ação do Veneno de *L. intermedia* em Membrana Basal de EHS Analisadas por Microscopia Eletrônica.

Cortes finos do tecido de EHS foram incubados por 16 horas à 37° com veneno de *L. intermedia* (VENOM) ou PBS como controle negativo (PBS), marcados com tetróxido de ósmio, e analisados por microscopia eletrônica de transmissão (ampliação, 4000X) (TEM), ou alternativamente cobertos com ouro e então examinados com microscopia eletrônica de varredura (ampliação, 3865X) (SEM). Flechas apontam a membrana basal.

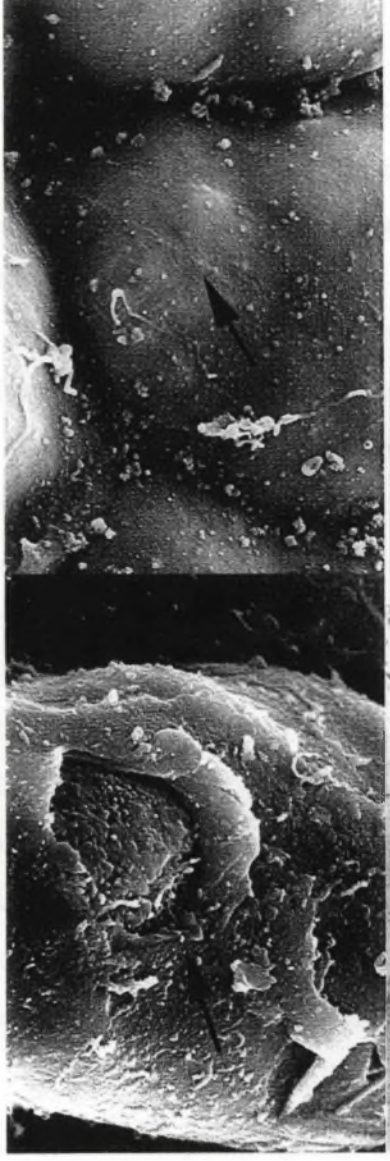
PBS



VENOM



SEM



TEM

Figura 4: Efeito de Veneno de *L. intermedia* em Laminina Purificada, Complexo Laminina-Entactina, Entactina Purificada e Colágeno Tipo IV.

Laminina purificada (4A), complexo laminina-entactina (4B), 0.5mg diluído em 1ml de tampão Tris-HCl 50mM, pH 7.3, contendo 1mM  $\text{CaCl}_2$  e 1mM  $\text{MgCl}_2$ , ou colágeno tipo IV (4D), 0.5mg diluído em 1ml de ácido acético 0.5M e então neutralizado a pH 7.3 contendo 1mM  $\text{CaCl}_2$  e 1mM  $\text{MgCl}_2$ , foram incubados com 100 $\mu\text{g}$  de veneno à 37°C para laminina e complexo laminina-entactina ou à 25°C para colágeno tipo IV. Alíquotas das misturas de incubação (25 $\mu\text{g}$  de proteínas) foram removidas em diferentes intervalos de tempo e submetida a eletroforese (SDS-PAGE gradiente linear 3-15%) sob condições redutoras. Coluna 1: somente veneno; coluna 2: misturas no tempo 0; coluna 3: misturas no tempo 16 horas; coluna 4: somente substrato no tempo 16 horas. Os géis foram corados com Coomassie Blue. Marcadores de peso molecular são mostrados à esquerda. Flechas escuras apontam para a cadeia  $\alpha_1$  da laminina, cabeça de flecha escura mostra as cadeias  $\beta_1$  e  $\gamma_1$  da laminina que comigram, a flecha cinza representa a entactina, e a cabeça de flecha cinza mostra o fragmento da entactina após a hidrólise pelo veneno. Os principais componentes de 100, 130, 160 e 170 kDa do colágeno tipo IV extraído da placenta humana pela pepsina pode ser visto na figura 4D. O asterisco representa a principal migração eletroforética do veneno. Em 4C, amostras de entactina purificadas (25 $\mu\text{g}$ ) foram incubadas com concentrações crescentes de veneno. Coluna 1: entactina mais 10 $\mu\text{g}$  de veneno; coluna 2: entactina mais 20 $\mu\text{g}$  de veneno; coluna 3: entactina mais 40 $\mu\text{g}$  de veneno; e coluna 4: entactina mais 100 $\mu\text{g}$  de veneno. A atividade proteolítica do veneno foi visualizada após SDS-PAGE gradiente linear 3-15% e imunoblotting usando um anticorpo policlonal que reconhece a entactina.

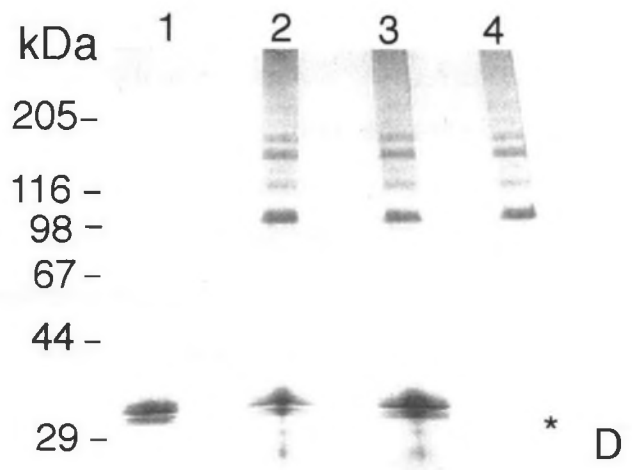
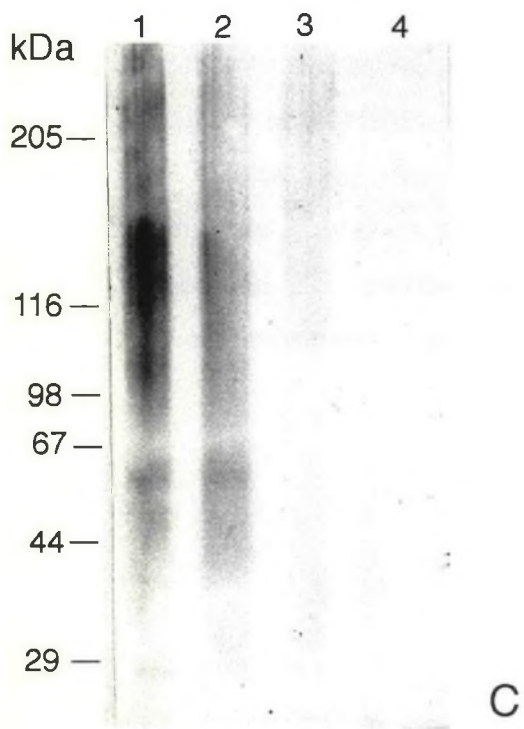
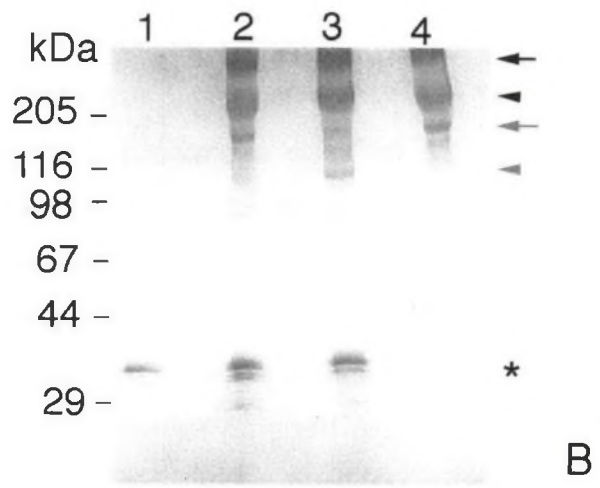
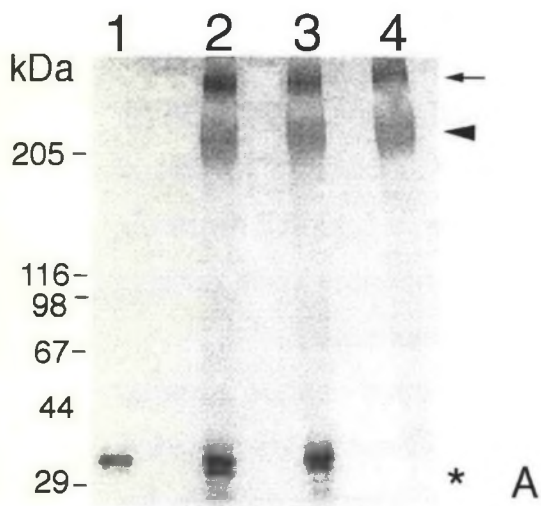


Figura 5: Ação do Veneno de *L. intermedia* no Heparan Sulfato Proteoglicano Endotelial e Cadeias de Polissacarídeos Heparan Sulfato.

5A – Células endoteliais foram marcadas com sulfato de sódio ( $^{35}\text{S}$ ),  $150\mu\text{Ci}$  por  $1\text{ml}$  de meio. O heparan sulfato proteoglicano purificado radiomarcado ( $10,000\text{cpm}$ ) foi incubado com veneno ( $10\mu\text{g}$ ) ou com PBS (controle) à  $37^\circ\text{C}$  por 16 horas. Amostras foram analisados por SDS-PAGE 3-12% e o gel foi seco e exposto a um filme de raio-X. Coluna 1 mostra a autoradiografia do proteoglicano heparan sulfato (controle) e coluna 2 mostra o proteoglicano heparan sulfato incubado com veneno. Componentes do veneno degradam o heparan sulfato proteoglicano, liberando fragmentos.

5B – O mesmo procedimento experimental foi repetido usando cadeias de polissacarídeos heparan sulfato como substrato para o veneno. Os produtos obtidos foram analisados por uma eletroforese em gel de agarose em tampão 1,3-diaminopropano acetato  $0.05\text{M}$ ,  $\text{pH } 9.0$ . Após a corrida os compostos foram precipitados com  $0.1\%$  cetavlon por 2 horas, e o gel foi então seco e exposto a um filme de raio-X. Coluna 1 mostra as cadeias de polissacarídeos de heparan sulfato incubados com PBS (controle) e coluna 2 mostra as cadeias de polissacarídeos de heparan sulfato após o tratamento com veneno. À esquerda os marcadores de glicosaminoglicanos: CS condroitin sulfato, DS dermatan sulfato e HS heparan sulfato. Componentes do veneno não possuem ação na cadeia de polissacarídeo heparan sulfato.

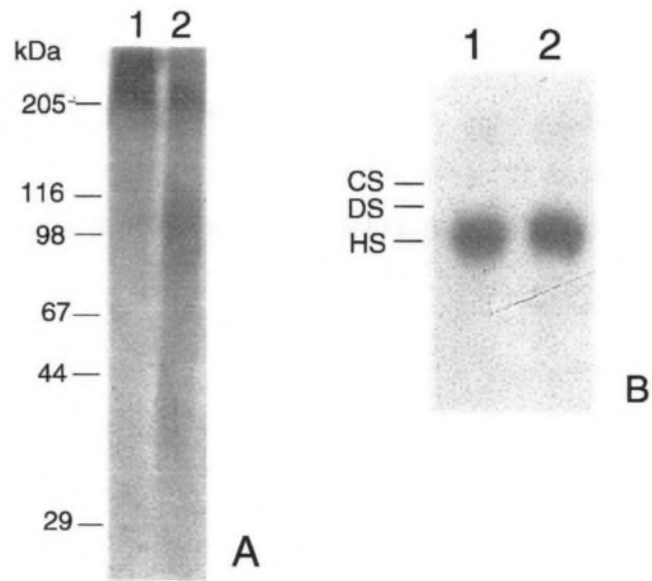


Figura 6: Atividade do Veneno de *L. intermedia* na Liberação da Laminina da Membrana Basal de EHS.

Tecido de EHS (1mg) foi incubado com veneno (100 $\mu$ g) por 16 horas à 37°C. O sobrenadante (50 $\mu$ l) foi submetido a SDS-PAGE 4% sob condições não-redutoras e transferidos para membrana de nitrocelulose que foi testada com um soro hiperimmune policlonal anti-laminina de coelho. Coluna 1 mostra laminina purificada de EHS (5 $\mu$ g) usado como controle e coluna 2 mostra material obtido do sobrenadante após tratamento da membrana basal de EHS com veneno. Marcadores de peso molecular são mostrados à esquerda.

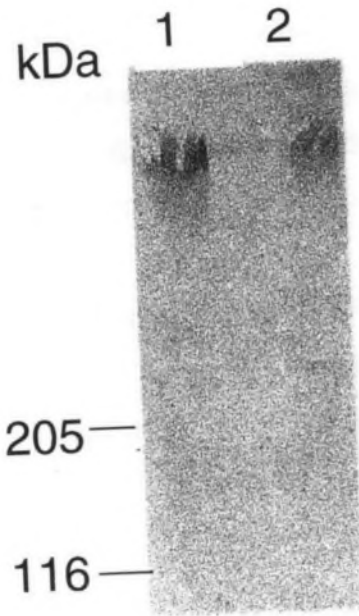
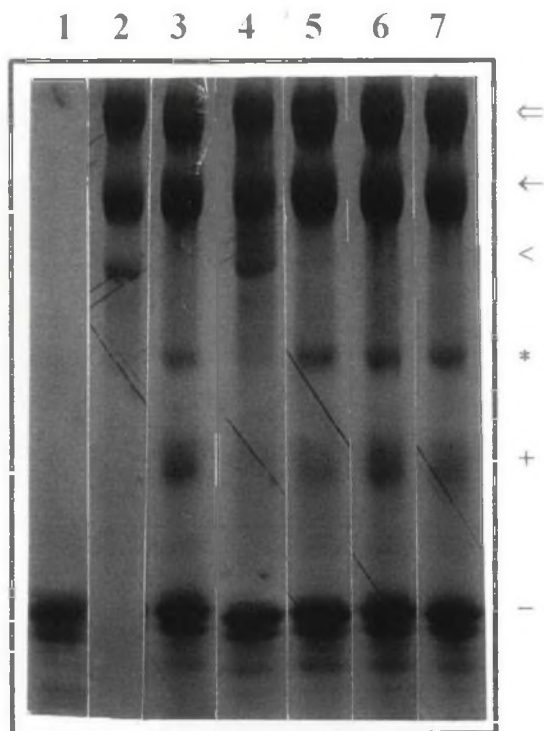


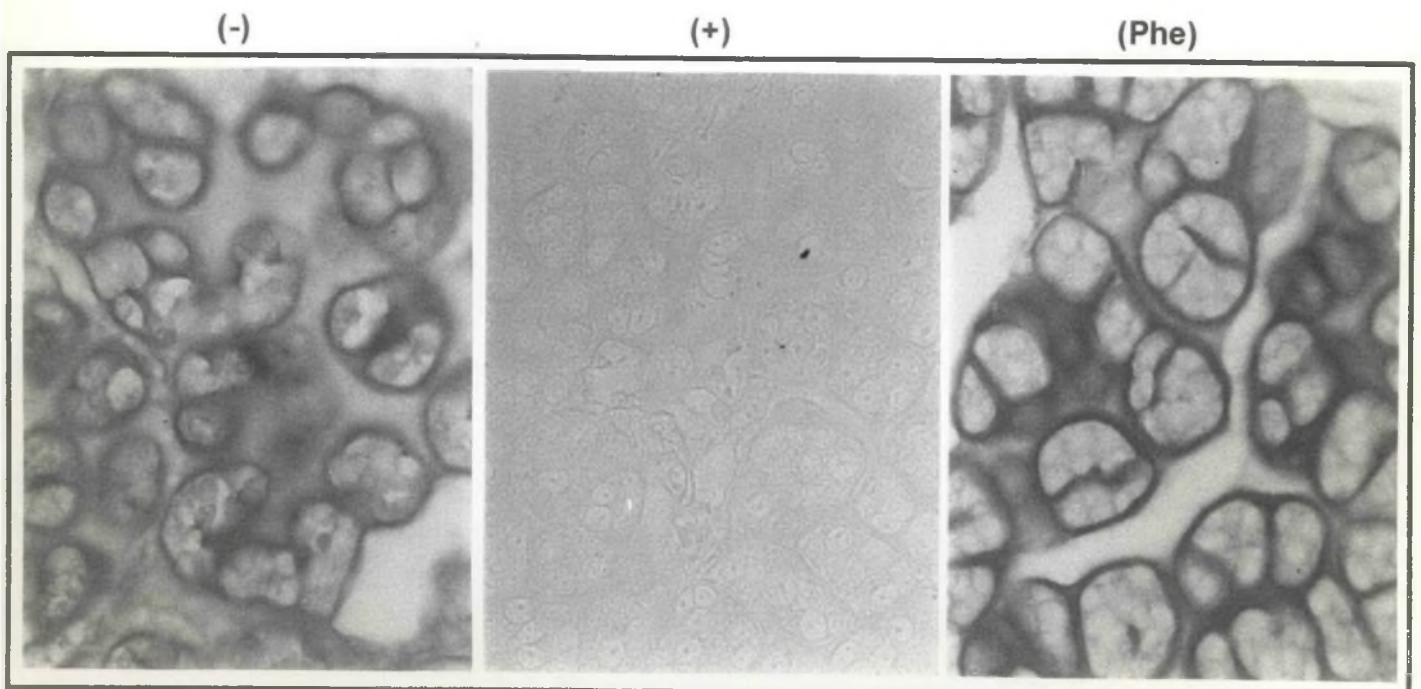
Figura 7: Ação Inibitória da 1,10-fenantrolina no Efeito Proteolítico do Veneno de *L. intermedia*.

7A – Complexo laminina-entactina purificado foi incubado por 16 horas (mesmo procedimento experimental descrito para a figura 4) com veneno na presença de diferentes inibidores de proteases: fenantrolina (coluna 4), PMSF (coluna 5), NEM (coluna 6) e pepstatina-A (coluna 7). Coluna 1 mostra somente veneno, coluna 2 mostra somente laminina-entactina e coluna 3 mostra laminina-entactina na presença de veneno e ausência de inibidores. Flecha aberta mostra cadeia  $\alpha_1$  da laminina, flecha escura mostra cadeias  $\beta_1$  e  $\gamma_1$  da laminina, cabeça de flecha mostra a entactina intacta, asterisco mostra o fragmento da entactina de 100 kDa, sinal de adição mostra o fragmento da entactina de 50 kDa e o sinal de subtração indica a principal posição das proteínas do veneno.

7B – Cortes do tecido de EHS foram incubados com veneno de *L. intermedia* por 16 horas à 37°C (+), com PBS como controle negativo (-) e com veneno na presença de 1,10-fenantrolina (Phe) e marcados para glicoproteínas (PAS). A ampliação das micrografias foi de 400X.



A



B

FIGURE 7 Veiga et al., 1999

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AUMAILLEY, M., WIEDEMANN, H., MANN, K. and TIMPL, R.: Binding of nidogen and the laminin-nidogen complex to basement membrane collagen type IV. *Eur. J. Biochem.* **184**: 241-248, 1989.
- BARAMOVA, E.N., SHANNON, J.D., BJARNASON, J.B. and FOX, J.W.: Degradation of extracellular matrix proteins by hemorrhagic metalloproteinases. *Arch. Biochem. Biophys.* **275**: 63-71, 1989.
- BARBARO, K.C., CARDOSO, J.L.C., EICKSTEDT, V.R.D and MOTA, I.: Dermonecrotic and lethal components of *Loxosceles gaucho* spider venom. *Toxicon* **30**: 331-338, 1992.
- BASCUR, L., YEVENES, I. and BARJA, P.: Effects of *Loxosceles laeta* spider venom on blood coagulation. *Toxicon* **20**: 795-796, 1982.
- BEÇAK, W. and PAULETE, J.: Técnicas de Citologia e Histologia. Rio de Janeiro, Livros Técnicos e Científicos Editora S.A, 1976.
- BUONASSISI, V. and VENTER, J.C.: Hormone and neurotransmitter receptors in an established vascular endothelial cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**: 1612-1616, 1976.
- CIVELLO, D.J., MORAN, J.B. and GEREN, C.R.: Substrate specificity of a hemorrhagic proteinase from Timber Rattlesnake venom. *Biochemistry.* **22**: 755-762, 1983.
- DENNY, W.F., DILLAHA, and MORGAN, P.N.: Hemotoxic effect of *Loxosceles reclusa* venom: *in vivo* and *in vitro* studies. *J. Lab. Clin. Med.* **64**: 291-298, 1964.
- DIETRICH, C.P. and DIETRICH, S.M.C.: Electrophoretic behaviour of acidic mucopolysaccharides in diamine buffers. *Anal. Biochem.* **70**: 645-647, 1976.
- ESKAFI, F.M. and NORMENT, B.R.: Physiological action of *Loxosceles reclusa* venom on insect larvae. *Toxicon* **14**: 7-12, 1976.
- FARQUHAR, M.G.: The glomerular basement membrane: a selective macromolecular filter. *In Cell Biology of Extracellular Matrix*, New York, Plenum Press, 1991.
- FEITOSA, L., GREMSKI, W., VEIGA, S.S., ELIAS, M.C.Q.B., GRANER, E., MANGILI, O.C. and BRENTANI, R.R.: Detection and characterization of

- metalloproteinases with gelatinolytic, fibronectinolytic and fibrinogenolytic activities in brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. *Toxicon* **36**: 1039-1051, 1998.
- FORRESTER, L.J., BARRET, J.T. and CAMPBELL, B.J.: Red blood cell lysis induced by the venom of brown recluse spider. The role of sphingomyelinase D. *Arch. Biochem. Biophys.* **187**: 335-365, 1978.
- FOX, J.W. and BJARNASON, J.B.: Atrollysins: metalloproteinases from *Crotalus atrox* venom. *Methods Enzymol.* **248**, 368-387, 1995.
- FOX, J.W., MAYER, U., NISCHT, R., AUMAILLEY, M., REINHARDT, D., WIEDMANN, H., MANN, K., TIMPL, R., KREIG, T., ENGEL, J. and CHU, M.-L.: Recombinant nidogen consists of three globular domains and mediates binding of laminin to collagen type IV. *EMBO J.* **10**: 3137-3146, 1991.
- FUTRELL, J.: Loxocelism. *Am. J. Med. Sci.* **304**: 261-267, 1992.
- HARLOW, E. and LANE, D.: *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold spring Harbor, New York, 1988.
- JONG, Y.-S., NORMENT, B.R. and HEITZ, J.R.: Separation and characterization of venom components in *Loxosceles reclusa*-II. Protease Enzyme Activity. *Toxicon* **16**: 529-537, 1979.
- KARNOVSKY, M.J.: A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.* **27**: 137A, 1965.
- LAEMMLI, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685, 1970.
- MACKAY, A.R., HARTZLER, J.L., PELINA, M.D. and THORGEIRSSON, U.P.: Studies on the ability of 65- and 92-kDa tumor cell gelatinases to degrade type IV collagen. *J. Biol. Chem.* **265**: 21929-21934, 1990.
- MANN, K., DEUTZMANN, R. and TIMPL, R.: Characterization of proteolytic fragments of the laminin-nidogen complex and their activity in ligand-binding assays. *Eur. J. Biochem.* **178**: 71-80, 1988.
- MCMANUS, J.F.A.: Histological demonstration of mucin after periodic acid. *Nature* **158**: 202, 1948.
- NADER, H.B., DIETRICH, C.P., BUONASSISI, V. and COLBURN, P.: Heparin sequences in the heparan sulfate chains of an endothelial cell proteoglycan. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 3565-3569, 1987.

- NADER, H.B., BUONASSISI, V., COLBURN, P. and DIETRICH, C.P.: Heparan stimulates the synthesis and modifies the sulfation pattern of heparan sulfate proteoglycan from endothelial cells. *J. Cell. Physiol.* **140**: 305-310, 1989.
- OHSAKA, A., JUST, M. and HABERMANN, E.: Action of snake venom hemorrhagic principles on isolated glomerular basement membrane. *Biochim. Biophys. Acta.* **323**: 415-428, 1973.
- PAULSSON, M., AUMAILLEY, M., DEUTZMANN, R., TIMPL, R. and BECK, K.: Laminin-nidogen complex: extraction with chelating agents and structural characterization. *Eur. J. Biochem.* **166**: 11-19, 1987.
- PLOW, E.F., PIERSCHBACHER, M.D., RUOSLAHTI, E. and 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* **82**: 8057-8061, 1985.
- REES, R.S., NANNEY, L.B., YATES, R.A. and KING, L.E.: Interaction of brown recluse spider venom on cell membranes: the inciting mechanism? *J. Invest. Derm.* **83**: 270-275, 1984.
- ROHRBACH, D.H. and TIMPL, R.: *Molecular and cellular aspects of basement membranes*. San Diego, CA, Academic Press, 1993.
- TIMPL, R., PAULSSON, M., DZIADEK, M. and FUJIWARA, S.: Basement membranes. *Meth. Enzymol.* **145**: 363-391, 1987.
- TIMPL, R., ROHDE, H., ROBEY, P.G., RENNARD, S.I., FOIDART, J.M. and MARTIN, G.R.: Laminin - a glycoprotein from basement membranes. *J. Biol. Chem.* **254**: 9933-9937, 1979.
- TOWBIN, H., STAHELIN, T. and GORDON, J.: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedures and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **76**: 4350-4354, 1979.
- VEIGA, S.S., CHAMMAS, R., CELLA, N. and BRENTANI, R.R.: Glycosylation of beta-1 integrins in B16-F10 mouse melanoma cells as determinant of differential binding and acquisition of biological activity. *Int. J. Cancer* **61**: 420-424, 1995.
- VEIGA, S.S., GREMSKI, W., SANTOS, V.L.P., FEITOSA, L., MANGILI, O.C., NADER, H.B., DIETRICH, C.P. and BRENTANI, R.R.: Oligosaccharide residues of *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom proteins:

dependence on glycosylation for dermonecrotic activity. *Toxicon* **37**: 587-607, 1999.

YURCHENCO, P. and SCHITTNY, J.: Molecular and cellular aspects of basement membranes. *FASEB J.* **4**: 1577-1590, 1990.

YURCHENCO, P. and RUBEN, G.C.: Basement membrane structure in situ: evidence for lateral associations in the type IV collagen network. *J. Cell Biol.* **105**: 2559-2568, 1987.

## CURRICULUM VITAE

**Nome: Gustavo Antonio de Souza**

Nascido em 19 de fevereiro de 1978 em Assis, SP.

### **Formação:**

1985 – 1992: Colégio Nossa Senhora Menina, Curitiba, PR

1993 – 1995: Colégio Positivo, Curitiba, PR

1996 – 1999: Universidade Federal do Paraná, Curso de Ciências Biológicas

### **Participações em Congressos:**

3 a 6 de Maio de 1997 - XXVIª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, Caxambu, MG.

23 a 26 de Maio de 1998 – XXVIIª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, Caxambu, MG.

7 a 10 de Setembro de 1998 – 5º Simpósio Brasileiro sobre Matriz Extracelular, Angra dos Reis, Rio de Janeiro.

13 a 18 de Setembro de 1998 – V Simpósio da Sociedade Brasileira de Toxinologia, Angra dos Reis, Rio de Janeiro.

7 a 9 de Outubro de 1998 – 6º EVINCI, Curitiba, Paraná.

26 e 27 de Março de 1999 – Simpósio em Técnicas de Microscopia PR-SC, Curitiba, PR.

22 a 25 de Maio de 1999 – XXVIIIª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, Caxambu, MG.

9 a 11 de Setembro de 1999 – 7º EVINCI, Curitiba, Paraná.

### **Trabalhos apresentados em Congressos:**

FEITOSA, L., GREMSKI, W., VEIGA, S.S., ELIAS, M.C.Q.B., GRANER, E., RIBEIRO, A.S., de SOUZA, G.A., MANGILI, O.C. and BRENTANI, R.R.: *Identification of Metalloproteinases Involved in Fibronectinolytic and Fibrinogenolytic Activities in Brown Spider Venom.* XXVIª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, Caxambu, MG.

de SOUZA, G.A., DREYFUSS, J.L., SILVEIRA, R.B., VIGGIANO, R.L.L., RIBEIRO, A.S., MANGILI, O.C., VEIGA, S.S. and GREMSKI, W.: *Study of*

*Basement Membrane Degradation by Loxosceles intermedia (Brown Spider) Venom Proteins. XXVII<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, Caxambu, MG.*

RIBEIRO, A.S., de SOUZA, G.A., DREYFUSS, J.L., PEREIRA, A.M., VEIGA, S.S. and GREMSKI, W.: *Production of Monospecific Polyclonal Antibodies Against Extracellular Matrix Molecules. XXVII<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, Caxambu, MG.*

de SOUZA, G.A., SILVEIRA, R.B., RIBEIRO, A.S., MANGILI, O.C., VEIGA, S.S. and GREMSKI, W.: *Proteolytic Effect of Loxosceles intermedia (Brown Spider) Venom Proteins on Basement Membrane. 5<sup>o</sup> Simpósio Brasileiro sobre Matriz Extracelular, Angra dos Reis, RJ.*

RIBEIRO, A.S., de SOUZA, G.A., VEIGA, S.S., BRENTANI, R.R. and GREMSKI, W.: *Production of Research Tools: Monospecific Polyclonal Antibodies Against ECM. 5<sup>o</sup> Simpósio Brasileiro sobre Matriz Extracelular, Angra dos Reis, RJ.*

de SOUZA, G.A., DREYFUSS, J.L., SILVEIRA, R.B., VIGGIANO, R.L.L., RIBEIRO, A.S., MANGILI, O.C., VEIGA, S.S. and GREMSKI, W.: *Effects of Loxosceles intermedia (Brown Spider) Venom Proteins on Basement Membrane Degradation. V Simpósio da Sociedade Brasileira de Toxinologia, Angra dos Reis, RJ.*

de SOUZA, G.A., VEIGA, S.S. and GREMSKI, W.: *Condroitin Sulfato Proteoglicano e Adesão Celular à Laminina. Modulação do Fenótipo Adesivo pela Dexametasona. 6<sup>o</sup> EVINCI, Curitiba, PR.*

de SOUZA, G.A., SANTOS, V.L.P., VEIGA, S.S., MANGILI, O.C. and GREMSKI, W.: *Estudo Estrutural, Ultraestrutural e Bioquímico do Efeito do Veneno de Loxosceles intermedia (Aranha Marrom) Sobre a Membrana Basal. Simpósio em Técnicas de Microscopia PR-SC, Curitiba, PR.*

de SOUZA, G.A., SANTOS, V.L.P., VEIGA, S.S., MANGILI, O.C. and GREMSKI, W.: *Characterization of Entactinolytic Activity from Loxosceles intermedia (Brown Spider) Venom*. XXVIIIª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, Caxambu, MG.

de SOUZA, G.A., VEIGA, S.S. and GREMSKI, W.: *Estudo da Degradação da Membrana Basal por Constituintes Presentes no Veneno de Loxosceles intermedia (Aranha Marrom)*. 7º EVINCI, Curitiba, PR.

### **PRÊMIOS RECEBIDOS**

de SOUZA, G.A., SILVEIRA, R.B., RIBEIRO, A.S., MANGILI, O.C., VEIGA, S.S. and GREMSKI, W.: *Proteolytic Effect of Loxosceles intermedia (Brown Spider) Venom Proteins on Basement Membrane*. 5º Simpósio Brasileiro sobre Matriz Extracelular, Angra dos Reis, RJ. **SIMEC 98 Young Investigator Award**.

### **ARTIGOS**

VEIGA, S.S., FEITOSA, L., SANTOS, V.L.P., de SOUZA, G.A., RIBEIRO, A.S., MANGILI, O.C., PORCIONATTO, M.A., NADER, H.B., DIETRICH, C.P., BRENTANI, R.R. and GREMSKI, W.: *Effect of Loxosceles intermedia (brown spider) venom on basement membrane structures*. **Submetido**, 1999.

de SOUZA, G.A., RIBEIRO, A.S., SANTOS, V.L.P., VEIGA, S.S., MANGILI, O.C. and GREMSKI, W.: *Proteolytic Effect of Loxosceles intermedia (Brown Spider) Venom Proteins on EHS-Basement Membrane Structures*. *Acta Biologica Paranaense*, **in press**.