

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

THIAGO LOPES DE MARI

CLONAGEM E EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE UMA PROTEÍNA HOMÓLOGA A  
ALÉRGENO PRESENTE NO VENENO DE ARANHA-MARROM  
(*Loxosceles intermedia*)

CURITIBA

2014



THIAGO LOPES DE MARI

CLONAGEM E EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE UMA PROTEÍNA HOMÓLOGA A  
ALÉRGENO PRESENTE NO VENENO DE ARANHA-MARROM  
(*Loxosceles intermedia*)

Dissertação apresentada como requisito parcial  
à obtenção de grau de Mestre em Biologia  
Celular e Molecular, no Curso de Pós-  
Graduação em Biologia Celular e Molecular,  
Setor de Ciências Biológicas, Universidade  
Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Silvio Sanches Veiga

Co-Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Olga Meiri Chaim

CURITIBA

2014

# PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fisiologia  
Setor de Ciências Biológicas/ Universidade Federal do Paraná  
Instituto Carlos Chagas (ICC/FIOCRUZ)

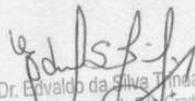
---

## DECLARAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que **Thiago Lopes De Mari**, no dia 26 de Fevereiro de 2014, no Setor de Ciências Biológicas (UFPR) defendeu sua Dissertação de Mestrado em Biologia Celular, intitulada: "Clonagem e expressão heteróloga de uma proteína homóloga a alérgeno presente no veneno de aranha-marrom (*Loxosceles intermedia*)", com a banca examinadora constituída, Profs. Drs.: Kátia Sabrina Paludo (Universidade Estadual de Ponta Grossa - UEPG), Nilson Ivo Tonin Zanchin (Instituto Carlos Chagas - ICC), e Silvio Sanches Veiga (Universidade Federal do Paraná, como orientador e presidente da Banca Examinadora), e foi Aprovado.

A solicitação de emissão do Diploma de Mestre em Biologia Celular e Molecular ficará condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento interno deste Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 26 de Fevereiro de 2014

  
Prof. Dr. Eivaldo da Silva Tináade  
Coordenador do Programa de Pós-Graduação  
em Biologia Celular e Molecular - UFPR  
Matr. 185795

*Dedico essa conquista a minha família.  
Aos meus pais por sempre me demonstrarem apoio,  
amor e compreensão mesmo nas horas em que para  
mim nada fazia sentido.  
A minha noiva, por mostrar definitivamente o sentido  
de tudo que eu custava não enxergar.*

## AGRADECIMENTOS

Mesmo que houvesse todo o espaço disponível para escrever, não seria possível agradecer à altura a atenção e o carinho pelo qual recebi durante esse período. Porém, gostaria de citar alguns nomes que foram de grande importância durante o período do mestrado. Sei que vou cometer o pecado de esquecer alguns, pois quem realmente me conhece sabe que meu endereço é na lua.

Primeiramente gostaria de agradecer a Banca Avaliadora composta pelo Prof. Dr. Nilson Zanchin e pela Profa. Dra. Kátia Paludo. Agradeço a Prof. Dra. Kátia Paludo pela contribuição aos anos dedicados ao estudo da toxicologia, que com certeza foi de grande contribuição para este trabalho e pela amizade desses anos sempre rendendo risadas e situações engraçadas. Ao Prof. Dr. Nilson Zanchin por ter aceitado o convite e ter disponibilizado de seu tempo para avaliar este trabalho, assim como agradeço pela atenção dada durante as aulas, conversas e conselhos dados. Tenho certeza que suas contribuições para esse trabalho serão enriquecedoras.

Embora cada um esteja em um canto do país e do mundo, gostaria de agradecer meus amigos de longa data Fábio, Germano, Jonas, Schuster, André, Gustavo, Luiz, Alison e Felipe pelas memoráveis bagunças na época do Colégio São José.

Devo agradecer a Secretária de Limpeza Renata que mantém a nossa bagunça sempre em ordem e também por ser uma das pessoas mais bem humoradas do departamento. Assim como o Sr. Luiz que sempre nos recebe com um bom e ao Sr. Tião que ao final de um dia cansativo nos deseja um bom descanso.

Gostaria de agradecer os antigos membros do LME que já estão em outros grupos, institutos e universidades. Um muito obrigado para o Youssef, pela amizade, por ser um exemplo de perseverança e inteligência; Daniele Chaves por ser a primeira pessoa a me aguentar no laboratório, uma grande parte de meu conhecimento científico deve-se ao seu esforço; Matheus pela amizade e pelo convívio nesses anos; Jenifer, por ser um exemplo de perseverança.

Pela convivência do dia-dia, pelas brincadeiras, pela amizade e pelos cabelos a menos que ainda restam na minha cabeça, gostaria de agradecer aos atuais e antigos "IC's" do laboratório que sempre dividem conosco a árdua tarefa de fazer ciência. Muito obrigado ao Pedrosa, Boqueirinha, Du, Brenda, João, Marta, Verônica, Hanna e Bruna.

Pelos alunos do grupo de pesquisa do LME, por dividirem comigo a responsabilidade sermos sempre melhores do que ontem e defendermos a ideia de que é possível fazer Ciência em um país que muitas vezes parece ter perdido o rumo. Obrigado Larissa, a atleta; Aline, que veio do Mato Grosso do Sul, não se esqueça, é do sul; Ana Carolina, a Mãe da Gi; Alessandra e Marianna, que entra ano e sai ano não consigo me livrar, mas não seria nada fácil sem vocês por perto.

Tenho que lembrar e agradecer com grande alegria dos meus amigos parceiros da "Bio Mol". Meu muito obrigado ao Fernando por sempre ser uma pessoa com opiniões fortes e de um conhecimento invejável nas mais diversas áreas; Ao professor Pardal, meu amigo Gabriel, sem a menor sombra de dúvidas uma das pessoas mais incríveis que eu já conheci, com todo seu conhecimento, caráter científico e aventureiro, obrigado; Ao Adriano, que nos impressiona com sua responsabilidade, polidez e disciplina, obrigado pelas conversas, pelos conselhos, pelos docinhos da D. Ivone e principalmente pela nossa amizade.

Tem pessoas que vêm a esse mundo para serem exemplos, e nesse quesito, simplesmente não posso deixar de citar e agradecer a Dilza Trevisan. Por ser um exemplo de profissionalismo e coragem. Muito obrigado por ter me dito exatamente aquilo que eu precisava ouvir, sem as suas palavras seria mais difícil.

Valéria Ferrer, meus sinceros agradecimentos por ser para mim um exemplo de paciência e de sabedoria de vida. Desde o início da minha história no LME, da Iniciação científica ao Mestrado, tive seu apoio incondicional. Obrigado pelas conversas, ensinamentos, e experiências que você me proporcionou ao longo desses seis anos, sem a sua ajuda e esforço esse trabalho nem se quer existiria. Obrigado pela amizade que sempre vou guardar.

Aos queridos professores Olga Chaim, Luiza Gremski, Andrea Senff Ribeiro, Silvio Sanches e Waldemiro Gremski por ter me proporcionado a chance de fazer parte de um grupo tão importante. Entrar no grupo de pesquisas do Laboratório de Matriz Extracelular e Biotecnologia de Venenos foi, e ainda é, algo muito importante para mim, e sempre guardo e guardarei os momentos, os ensinamentos e até mesmo as “puxadas de orelha” com carinho. Admiro os profissionais que exercem de sua carreira a árdua tarefa de fazer de sua própria vida um exemplo de disciplina e busca incessante pelo conhecimento. Obrigado pelas conversas, ensinamentos e pela amizade. Obrigado por depositarem seus esforços na construção de nossas carreiras muitas vezes sacrificando horas de sua vida pessoal.

De modo algum poderia deixar de agradecer e lembrar o apoio que meus familiares mais próximos sempre me deram apoio. Tio Chiquinho, Tia Cléia, Mylena vocês sempre estiveram presentes em minha memória nos momentos mais felizes e intensos da minha vida e agora com certeza não é diferente.

Aos meus pais que deram suas vidas para que nunca me faltasse nada para que eu pudesse escolher e me dedicar completamente aos meus sonhos. Sei o quanto sacrificante foram muitas das fases vividas e por isso dedico a vocês grande parte de toda essa conquista. Ao meu pai por sempre ser um porto de paz onde muitas vezes fui buscar um conselho e um caminho para seguir. A minha mãe que sempre teve um colo onde, com todo meu tamanho, eu me encaixava. Quanto mais o tempo passa, mais eu enxergo a sabedoria das palavras e das atitudes desse casal simpático e alegre.

Aproveito também para agradecer Cláudia, Jorge, Isaías, Alan e Carla pelo apoio e pelos ótimos momentos vividos. Saibam que sempre terão um espaço reservado de atenção e carinho.

A Gabriele Luize Pereira, que será em breve Gabriele Luize Pereira De Mari, por simplesmente trazer a tona tudo o que tinha de bom em mim. Das várias vezes em que nada tinha sentido, você foi o sentido de tudo. Sinto muito, mas de agora em diante você não se livra mais de mim, vou até o fim do mundo para arrancar um sorriso seu.

E finalmente, agradeço a força espiritual que se manifesta em mim na forma de bondade, paixão e fé nas coisas boas da vida.

Meu muito obrigado a todos que torceram por mim.

*“Uma pessoa que nunca cometeu um erro  
nunca tentou algo novo”*

Albert Einstein

## RESUMO

O gênero *Loxosceles* inclui várias espécies popularmente conhecidas como aranhas-marrons. O envenenamento pode causar, entre outras manifestações clínicas, reações inflamatórias que incluem aumento da permeabilidade vascular, infiltrado leucocitário, rash cutâneo e exantema pustuloso. Relatos de acidentes com animais peçonhentos comumente causam reações alérgicas assim como choques anafiláticos. As moléculas descritas no veneno de *Loxosceles intermedia* incluem fosfolipases-D, hialuronidasas, metaloproteases e toxinas não-enzimáticas. Devido ao pequeno volume produzido e a baixa representatividade dessas toxinas no veneno, técnicas de biologia molecular permitem a identificação e expressão de várias dessas toxinas. A partir de uma biblioteca de cDNA de *Loxosceles intermedia* foi identificado um transcrito que apresentou identidade com alérgenos presentes em uma espécie de vespa e formiga. A sequência nucleotídica dessa proteína homóloga a alérgeno possui 415aa. Por meio de predição da sequência aminoacídica foram encontrados possíveis sítios de N-glicosilação. Segundo o banco de dados *ProtParam* esta molécula pertence a uma família de proteínas ricas em cisteínas. O objetivo deste trabalho foi a clonagem, expressão heteróloga e avaliação da sua atividade biológica de uma possível toxina alergênica presente no veneno de *Loxosceles intermedia*, com o intuito de compreender o papel desta no loxoscelismo. De acordo com a nomenclatura da área (WHO/IUIS): a toxina recombinante foi denominada *Lox i 1*. Foram utilizados modelos heterólogos de expressão procariótico *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS e modelo eucariótico *Pichia pastoris* X-33. A ligação da sequência nucleotídica do alérgeno *Lox i 1* foi obtida em vetor de expressão pET-20b e pPICZαC, assim como, a transformação destas construções em *E. coli* e *P. pastoris*, respectivamente. Por meio de testes de indução nas concentrações de 0,1 a 1,0mM de indutor a 37° C não houve expressão da proteína recombinante. Entretanto, foi possível obter a toxina recombinante em cultura de leveduras *Pichia pastoris*, cuja a padronização foi feita em 1% de metanol a 30° C por 5 dias. A purificação foi feita por cromatografia de afinidade utilizando resina Ni-NTA em pH 9,0. Análises espectroscópicas em Dicroísmo Circular foram realizadas para a formação de estruturas secundárias da proteína recombinante, o que indicou o dobramento e solubilidade da toxina recombinante em meio aquoso. Os dados da deconvolução indicaram 16% de ±-hélice e 19% de ±-folha. Os dados obtidos permitiram investir na prospecção da atividade biológica de *Lox i 1* por meio de um ensaio de Permeabilidade Vascular em camundongos. O qual foi capaz de aumentar a permeabilidade vascular em camundongos. Portanto, foi pela primeira vez na literatura relatada a expressão e a avaliação da atividade biológica de uma proteína homóloga a alérgeno presente no veneno de *L. intermedia*. Soma-se a isso o fato de que é crescente a utilização de alérgenos recombinantes em imunoterapia e testes diagnósticos para hipersensibilidade. Futuramente estudos estruturais e imunológicos de *Lox i 1* irão contribuir para um maior conhecimento das bases moleculares de alergenicidade no loxoscelismo.

Palavras-chave: Reações alérgicas, Loxoscelismo, Alérgeno, Rash cutâneo.

## ABSTRACT

The *Loxosceles* genus includes several species known as brown spiders. The envenomation can trigger among other clinical manifestations, inflammatory conditions including increased vascular permeability, cutaneous rash, edema and exanthema pustulosus. Reports of accidents involving venomous animals commonly cause allergic reactions like rash, exanthem pustulosus and anaphylactic shock. The molecules described in the *Loxosceles intermedia* venom include phospholipase-D, hyaluronidase, metalloproteases and non-enzymatic toxins. Due to the small volume produced and the low representation of these toxins in the venom, molecular biology techniques allow the identification and expression of several of these toxins. By a cDNA library of *Loxosceles intermedia* a sequence show identity with allergens present in a species of wasp and ant was identified. The nucleotide sequence of this protein homologous to allergen has 415 aminoacids. A putative N-glycosylation site was observed in this sequence. According to the *ProtParam* database this molecule belongs to a family of cysteine-rich proteins. The objective of this work was the cloning, heterologous expression and evaluation of the biological activity of a putative allergen toxin present in the venom of *Loxosceles intermedia*, in order to further the knowledge of the loxoscelism. According to the nomenclature of the allergens (WHO / IUIS) the recombinant toxin *L. intermedia* venom was named *Lox i 1*. The subcloning of *Lox 1* was obtained in vector pET-20b and pPICZαC to use heterologous expression with a prokaryotic model, *E. coli* BL21(DE3)pLysS, and eukaryotic model *Pichia pastoris* X-33. The test of the recombinant protein expression was performed from 0.1 to 1.0 mM IPTG concentrations at 37° C. However, it was only possible to obtain the recombinant toxin in cultured yeast *Pichia pastoris*, whose standardization parameters was 1 % methanol at 30°C for 5 days. Purification was performed by affinity chromatography using Ni-NTA resin with pH 9.0. Analysis by Dichroism Circular were performed for analyses of *Lox i 1* secondary structures and solubility The data indicated the deconvolution of 16 % ± - helix of ± 19% sheet. The biological activity of *Lox i 1* was tested by vascular permeability assay in mice. The *Lox i 1* was able to increase vascular permeability in this model. For the first time is report in the literature the heterologous expression and evaluation of biological activity of a protein homologous to allergens present in the venom of *L. intermedia*. In addition, future structural and immunological studies of *Lox i 1* will contribute to a better understanding of the molecular basis of allergenicity in loxoscelism.

Key words: Allergic reactions, Loxoscelism, Allergen, Cutaneous rash.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – ARANHAS DA ESPÉCIE <i>Loxosceles intermedia</i> REPRESENTANDO O GÊNERO <i>Loxosceles</i>	20
FIGURA 2 - LOXOSCELISMO CUTÂNEO	22
FIGURA 3 - ENXANTEMA PUSTULOSO GENERALIZADO CAUSADO POR PICADA DE ARANHA DO GÊNERO <i>Loxosceles</i>	24
FIGURA 4 - PERFIL DO VENENO DE <i>L. intermedia</i>	25
FIGURA 5 – TRANSCRIPTOMA DA GLÂNDULA DE VENENO DE <i>Loxosceles intermedia</i>	28
FIGURA 6 - EXANTEMA PUSTULOSO GENERALIZADO AGUDO CAUSADO POR PICADA DE ARANHA <i>L. rufescens</i>	31
FIGURA 7 - PCR DE MODIFICAÇÃO COM INICIADORES GENE-ESPECÍFICOS PARA <i>Lox i 1</i> .	62
FIGURA 8 - PCR DE COLÔNIA	63
FIGURA 9 - TESTE DE EXPRESSÃO de <i>Lox i 1</i>	65
FIGURA 10 – ANÁLISE DO PRODUTO DE PCR COM OLIGONUCLEOTÍDEOS ESPECÍFICOS PARA <i>Lox i 1</i> MADURO	66
FIGURA 11– ANÁLISE DA TRANSFORMAÇÃO DA CONSTRUÇÃO <i>Lox i 1</i> /pPICZαC POR PCR DE COLÔNIA	67
FIGURA 12 - ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS DO ALÉRGENO <i>Lox i 1</i>	69
FIGURA 13 - EXPRESSÃO EM PEQUENA ESCALA DE <i>Lox i 1</i>	70
FIGURA 14 – EXPRESSÃO EM MAIOR VOLUME DE <i>Lox i 1</i> em <i>Pichia pastoris</i> X-33	71
FIGURA 15 - ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL PREDITIVA DO ALÉRGENO <i>Lox i 1</i>	73
FIGURA 16 – PREDIÇÃO DE EPÍTOPOS CONFORMACIONAIS ENTRE ALÉRGENOS <i>Lox i 1</i> e <i>Sol i 3</i> .	75
FIGURA 17 - ESPECTRO DE DICROÍSMO CIRCULAR <i>Lox i 1</i> RECOMBINANTE	75
FIGURA 18 – ENSAIO DE PERMEABILIDADE VASCULAR EM CAMUNDOGOS Swiss	77

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 TIPOS DE REAÇÕES DE HIPERSENSIBILIDADE	p.29
TABELA 2 PRINCIPAIS ESPÉCIES NOCIVAS DA ORDEM HIMÓPTERA	p.32
TABELA 3 ALÉRGENOS HYMNOPTERA	p.42
TABELA 4 CONTEÚDOS DE ESTRUTURA SECUNDÁRIA DE <i>Lox i 1</i>	p.76

## LISTA DE SIGLAS e ABREVIATURAS

APS : Persulfato de amônio  
BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool*  
cDNA : DNA complementar  
D.O. : Densidade óptica  
DEPC: Dietilpirocarbonato  
DNA : Ácido desoxirribonucleico  
dNTPs : Desoxirribonucleotídeos fosfatados  
g : Grama  
IPTG : Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo  
IRA: Insuficiência renal aguda.  
kDa: quilodaltons (unidade de massa molecular equivalente a mil daltons)  
L : Litro  
*Lox i*: toxina homóloga a alérgenos presente no veneno de *L.intermedia*  
LB : Luria-Bertani  
M : Mol por litro  
mg : Miligrama  
mL : Mililitro  
mM : Milimol por litro  
nm : Nanômetros  
PCR : Reação em cadeia da polimerase  
pH : Potencial de hidrogeniônico  
RNA : Ácido ribonucleico  
rpm: rotações por minuto  
SDS-PAGE : Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel *electrophoresis*  
TAE: tampão Tris-acetato-EDTA  
TEMED : N,N,N'-dimetilaminoetano  
V : Volts  
v/v: proporção volume/volume  
 $\mu$ g : Micrograma  
 $\mu$ L : Microlitro  
 $\mu$ M : Micromol por litro

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
2.1 ARANHAS DO GÊNERO <i>Loxosceles sp.</i> .....	20
2.2 LOXOSCELISMO E EPIDEMIOLOGIA.....	21
2.2.1 Loxoscelismo cutâneo.....	22
2.2.2 Loxoscelismo sistêmico.....	23
2.3 VENENO DE ARANHAS DO GÊNERO <i>Loxosceles sp.</i> .....	25
2.4.1 Reações alérgicas, eventos de hipersensibilidade e o loxoscelismo.....	29
2.5 EVENTOS DE HIPERSENSIBILIDADE E O LOXOSCELISMO.....	31
2.6 ALÉRGENOS DE ARTRÓPODES.....	33
2.6.1 Apídeos.....	35
2.6.2 Vespídeos.....	36
2.6.3 Formicídeos.....	38
2.7 POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE ALÉRGENOS RECOMBINANTES.....	43
3 OBJETIVOS.....	49
3.1 OBJETIVO GERAL.....	49
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	49
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	50
4.1 REAGENTES.....	50
4.2 MÉTODOS - SISTEMA DE EXPRESSÃO HETERÓLOGA EM <i>E. coli</i> BL21(DE3) pLysS.....	50
4.2.1 Eletroforese de Proteínas em Gel de Poliacrilamida.....	50
4.2.2 Construção do Vetor de Expressão pET-20b/ <i>Lox i 1</i> .....	51
4.2.3 PCR de Colônia.....	52
4.2.4 Miniprep para Sequenciamento.....	52
4.2.5 Transformação Bacteriana.....	53
4.2.6 Expressão do alérgeno recombinante de <i>L. intermedia</i> em <i>E. coli</i> BL21(DE3) pLysS.....	53
4.3 MÉTODOS - SISTEMA DE EXPRESSÃO HETERÓLOGA EM <i>Pichia pastoris</i> .....	54
4.3.1 Gel de agarose.....	54
4.3.2 Ligação em vetor pPICZαC.....	54
4.3.3 Transformação bacteriana por eletroporação.....	54
4.3.4 PCR de colônia.....	55
4.3.5 Pré-inóculo para processamento de sequenciamento.....	55
4.3.6 Sequenciamento.....	56
4.3.7 Desenho de oligonucleotídeos para expressão em <i>Pichia pastoris</i> X-33.....	56
4.3.8 Subclonagem do cDNA em vetor de expressão de levedura (pPICZαC).....	56

4.3.9	Expressão e purificação do alérgeno recombinante em levedura <i>Pichia pastoris</i> .	58
4.3.10	Análise estrutural de <i>Lox i 1</i> por ferramentas de bioinformática.....	59
4.3.11	Dicroísmo circular.....	59
4.3.12	Animais.....	59
4.3.13	Extração do Veneno por Eletrochoque .....	60
4.3.14	Ensaio piloto de permeabilidade vascular em camundongos .....	60
5	RESULTADOS .....	62
5.1	SISTEMA DE EXPRESSÃO EM <i>E. coli</i> BL21(DE3) pLysS .....	62
5.1.1	Desenhos dos oligonucleotídeos com sítio de restrição .....	62
5.1.3	Subclonagem em cepas de <i>E.coli DH5α</i> com a construção <i>Lox i 1/</i> pET-20b .....	63
5.1.4	Teste de mini-indução de expressão de <i>Lox i 1</i> em <i>E. coli</i> BL21(DE3) pLysS .....	64
5.2	SISTEMA DE EXPRESSÃO EM <i>Pichia pastoris</i> X-33.....	66
5.2.1	Desenhos dos oligonucleotídeos com sítio de restrição .....	66
5.2.2	Subclonagem da sequência nucleotídica de <i>Lox i 1</i> maduro .....	68
5.2.3	Análise dos sequenciamentos de <i>Lox i 1</i> madura.....	69
5.2.4	Expressão em pequena escala <i>Pichia pastoris</i> X-33 .....	70
5.2.5	Expressão de <i>Lox i 1</i> recombinante em <i>Pichia pastoris</i> X-33 .....	72
5.2.6	Análise do modelo tridimensional de <i>Lox i 1</i> por ferramentas de bioinformática ..	73
5.2.7	Dicroísmo Circular (DC) .....	76
5.2.8	Ensaio de Permeabilidade Vascular.....	77
6	DISCUSSÃO .....	79
7	CONCLUSÕES .....	91
	REFERÊNCIAS .....	92
	ANEXO 1: Banco de proteínas utilizadas na análise em Dicroísmo Circular .....	105
	ANEXO 2: Artigo publicado durante o período de Mestrado.....	106
	ANEXO 3: Certificado de aprovação do curso de capacitação CEEA.....	107
	ANEXO 4: Certificado de aprovação do CEEA .....	108
	ANEXO 5: Parecer técnico CTNbio .....	109

## 1 INTRODUÇÃO

As aranhas do gênero *Loxosceles* possuem uma coloração que varia entre marrom claro a marrom escuro e devido a isso são popularmente conhecidas como aranhas-marrons. Além disso, também são conhecidas como aranhas-violino, uma vez que apresentam uma marca semelhante ao formato desse instrumento na região dorsal do cefalotórax (HOGAN *et al.*, 2004; DA SILVA *et al.*, 2004; FUTRELL, 1992). No Brasil a ocorrência de espécies de aranhas do gênero *Loxosceles* é ampla, de modo que até a presente data foram identificadas 12 espécies diferentes (GONCALVES-DE-ANDRADE *et al.*, 2012). Dentre estas espécies, 4 podem ser encontradas no Estado do Paraná (MARQUES-DA-SILVA e FISCHER, 2005), sendo que as espécies *Loxosceles intermedia*, *Loxosceles gaucho* e *Loxosceles laeta* possuem maior importância médica por apresentarem maior frequência em acidentes com humanos. Acidentes com aranhas-marrons caracterizam-se como um problema de saúde pública no Estado do Paraná, com um número médio de 5.417 acidentes por ano. No ano de 2013 foram registrados, no referido estado, 4.140 acidentes com *Loxosceles sp* (SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO – SINAN, 2013).

O termo loxoscelismo é empregado para caracterizar o conjunto de manifestações clínicas decorrentes do envenenamento induzido pela picada de espécies do gênero *Loxosceles*. Pode-se apresentar em dois quadros que podem ocorrer concomitantemente ou não, denominados loxoscelismo cutâneo e loxoscelismo sistêmico (DA SILVA *et al.*, 2004; FUTRELL, 1992). O loxoscelismo cutâneo é o quadro clínico relacionado ao local da picada, incluindo sinais e sintomas como: eritema, edema, isquemia do tecido local, rash cutâneo, hemorragia e lesão dermonecroticas com espalhamento gravitacional, além da formação da placa marmórea, caracterizada por uma área de tecido isquêmico circundado por um halo vermelho e zonas pálidas (FUTRELL, 1992; MALAQUE *et al.*, 2011; ISBISTER e FAN, 2011; CHATZAKI *et al.*, 2012). O loxoscelismo sistêmico é comumente relacionado aos casos mais severos, porém ocorre com menor frequência se comparado ao loxoscelismo cutâneo. O sintoma característico do loxoscelismo sistêmico é a anemia hemolítica intravascular. Também podem ser observadas alterações no quadro hemolítico como coagulação intravascular disseminada e

trombocitopenia decorrente da agregação plaquetária, além de outros achados clínicos como a redução do hematócrito, aumento de bilirrubina indireta, icterícia, hemoglobinúria e distúrbios como insuficiência renal aguda (IRA) (MALAQUE *et al.*, 2011).

Estudos demonstram que o veneno loxoscélico é um composto cristalino constituído principalmente por enzimas e peptídeos, sendo produzido por um par de glândulas localizado no cefalotórax do animal (DA SILVA *et al.*, 2004; FUTRELL, 1992; APPEL *et al.*, 2005). O perfil proteico do veneno apresenta predominantemente moléculas de baixa massa molecular (1-45 kDa) (DA SILVA *et al.*, 2004; APPEL *et al.*, 2005; DA SILVEIRA *et al.*, 2002). Dentre elas hialuronidasas, fosfolipases-D, serinoproteases, metaloproteases, e toxinas inseticidas, sendo que as fosfolipases-D são as enzimas do veneno melhor caracterizadas (CHAIM *et al.*, 2011a; SENFF-RIBEIRO *et al.*, 2008, FERRER *et al.*, 2013).

Os eventos inflamatórios relacionados ao loxoscelismo estão sobre constante investigação. Paludo e colaboradores (2009), relacionaram o papel de mastócitos e de receptores de histamina com a atividade inflamatória do veneno. A histamina é uma bioamina classicamente envolvida com o desenvolvimento de quadros de inflamação aguda e reações de hipersensibilidade. Além da histamina presente no veneno, foi sugerido que outros componentes desse podem estar envolvidos na liberação da histamina de mastócitos, sugerindo a participação de mais de uma molécula nos eventos de hipersensibilidade ao veneno. Sade e colaboradores (2012) identificaram e caracterizaram uma proteína (TCTP) que está intimamente ligada com o processo de degranulação de mastócitos e aumento da permeabilidade vascular (RATTMANN *et al.*, 2008; PALUDO *et al.*, 2009; SADE *et al.*, 2012).

Embora muitos dos eventos inflamatórios desencadeados pelo veneno loxoscélico já foram esclarecidos, eventos ainda permanecem sem esclarecimento. Na literatura é possível encontrar poucos relatos envolvendo eventos alérgicos relacionados a acidentes com aranhas do gênero *Loxosceles sp*, porém sabe-se que esses dados são subestimados devido ao baixo número de notificações dos casos (PIPPIRS *et al.*, 2009; MAKRIS *et al.*, 2009; LANE *et al.*, 2011).

Em contrapartida, é crescente o número de estudos relacionados a eventos alérgicos desencadeados por acidentes envolvendo picadas de artrópodes, como por exemplo abelhas, formigas e vespas. Uma significativa quantidade de moléculas

alergênicas clonadas, expressas e cristalizadas em sua forma heteróloga (ARLIAN 2002; VALENTA *et al.*, 2011 SHAH *et al.*, 2011), o que vem identificando um grande número de alérgenos presentes em venenos e secreções bucais de artrópodes principalmente em insetos (ARLIAN 2002; RAMOS *et al.*, 2007; SHAH *et al.*, 2011). A identificação de alérgenos recombinantes provenientes de venenos animais traz consigo uma importante fonte biotecnológica para a elaboração de novas estratégias de imunoterapia utilizando alérgenos recombinantes. Estas moléculas produzidas de forma heteróloga fornecem uma alternativa para testes de diagnóstico para sensibilidade alérgica assim como seu uso em terapias de dessensibilização, como a imunoterapia subcutânea, uma vez que esses alérgenos podem ser manipulados para obtenção de sua forma hipoalergênica (PAULI & DEVILLER *et al.*, 2000; VRTALA *et al.*, 2004) .

Ferrer (2010) obteve por meio técnicas de biologia molecular uma sequência nucleotídica que apresenta identidade com alérgenos a partir de uma biblioteca de cDNA da glândula de veneno de *L. intermedia*. Porém, até o presente trabalho essa molécula na havia sido caracterizada. Sendo assim, é muito importante que sejam feitos estudos prospectivos desta molécula em sua forma ativa.

O uso da tecnologia do DNA recombinante para expressão de proteínas em modelos procarióticos é uma importante alternativa para obtenção de novas ferramentas biotecnológicas para melhor elucidar o loxoscelismo (SENFF-RIBEIRO *et al.*, 2008). Porém essas moléculas, em alguns casos, são obtidas em sua forma insolúvel e presentes em corpos de inclusão, muitas vezes, devido à ausência de modificações co-traducionais e pós-traducionais nos modelos de expressão procarióticos. Frente ao problema da insolubilidade métodos de redobramento e renaturação *in vitro* (*refolding*) demandam tempo e são muitos dispendiosos, revertendo muitas vezes em pouco benefício ou rendimento. Desse modo, em muitos casos, é necessário o uso de modelos eucarióticos, como leveduras (*Pichia pastoris* e *Saccharomyces cerevisiae*), que em alguns casos possibilita a obtenção dessas proteínas recombinantes em sua forma ativa (BUCKHOLZ *et al.*, 1991; SUDBERY *et al.*, 1996; MOKDAD-GARGOURI *et al.*, 2012). É cada vez mais significativo o número de estudos envolvendo expressão de alérgenos em modelo eucariótico de *Pichia pastoris*, devido à exigência das modificações pós-traducionais nessas moléculas, que em sua grande maioria são glicoproteínas de alta massa molecular (VINZÓN *et al.*,2010; BORODINA *et al.*,2011). Um exemplo importante na

literatura relacionado ao tema deste projeto é a caracterização de um dos alérgenos presentes no vestíbulo bucal da mariposa *Polybia scutellaris*, no qual, Vinzón e seus colaboradores (2010) obtiveram em sua forma recombinante o alérgeno denominado *Poly s 5 antigen 5* (VINZÓN *et al.*,2010).

A obtenção de alérgenos recombinantes traz consigo um potencial de seu uso biotecnológico na área biomédica. E pelo mesmo motivo a prospecção de toxinas recombinantes presentes no veneno de aranhas do Gênero *Loxosceles sp* se torna importante. Mesmo com a escassez de dados sobre moléculas alergênicas de aranhas do Gênero *Loxosceles sp*, acredita-se que estas enzimas possuam ampla aplicação biotecnológica (CHAIM *et al.*, 2011a; SENFF-RIBEIRO *et al.*, 2008). O presente trabalho apresenta a obtenção de uma proteína homóloga a alérgeno presente no veneno de *L.intermedia* prospectada de forma recombinante por expressão em cepas de *Escherichia coli* e *Pichia pastoris*. Esse trabalho contribui para o melhor entendimento do loxoscelismo sistêmico e demonstra pela primeira vez uma toxina presente no veneno de *Loxosceles sp* expressa em modelo de *Pichia pastoris*.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 ARANHAS DO GÊNERO *Loxosceles* sp

As aranhas do gênero *Loxosceles* pertencem à família *Loxoscelidae* (*Sicariidae*), subordem *Labidognatha*, ordem *Araneida*, classe *Arachnida* e filo *Arthropoda* (RUPPERT *et al.*, 2005; PLATNICK, 2013). Estas aranhas são conhecidas popularmente como aranhas-marrons ou aranhas-violino, devido à coloração e à presença de uma marca com um formato de um violino na região dorsal de seu cefalotórax (Figura 1). A marca com o formato de violino é uma das formas de identificação destas aranhas. Outra característica determinante para a identificação deste gênero é disposição e número de olhos, sendo 6 olhos separados em 3 díades formando um semicírculo (HOGAN *et al.*, 2004; DA SILVA *et al.*, 2004; SWANSON e VETTER, 2006; SAUPE *et al.*, 2011).

Possuem coloração característica variando de marrom claro a marrom escuro. Elas podem viver em média de 3 a 7 anos e suportam condições extremas, como a falta de alimento e água, e temperaturas que variam entre 8°C a 43°C (DA SILVA *et al.*, 2004; FUTRELL, 1992; FISCHER e VASCONCELLOS-NETO, 2005). As aranhas do gênero *Loxosceles* geralmente se alimentam de presas vivas, contudo, foi verificado que a espécie *Loxosceles reclusa* possui preferência por presas já mortas (DA SILVA *et al.*, 2004; SANDIDGE, 2003). Acredita-se que a função primária do veneno destes animais é paralisar e matar as presas, bem como iniciar a digestão das mesmas. Apesar de se enquadrarem em um dos gêneros que estão envolvidas em acidentes com humanos, as aranhas-marrons não possuem comportamento agressivo e picam somente para se defender, sendo que a maioria dos acidentes ocorre quando comprimidas no corpo no ato de vestir-se, calçar-se, enxugar-se ou durante o sono (FUTRELL, 1992; VETTER e ISBISTER, 2008; ISBISTER e FAN, 2011; RASH e HODGSON, 2002).

São animais sedentários, com hábitos noturnos e preferem lugares escuros (DA SILVA *et al.*, 2004; MALAQUE *et al.*, 2002 e 2011). Em seu habitat natural, estas aranhas se encontram dentro de fendas, sob pedras, troncos de árvores e restos de vegetais. Contudo, são animais muito bem adaptados às condições intradomiciliares, desta forma favorecendo a ocorrência de acidentes com os

humanos, uma vez que as aranhas-marrons podem se instalar atrás de quadros, dentro da mobília, roupas e sapatos, onde não há contato direto com a luz (FISCHER e VASCONCELLOS-NETO, 2005; GONCALVES-DE-ANDRADE e TAMBOURGI, 2003).

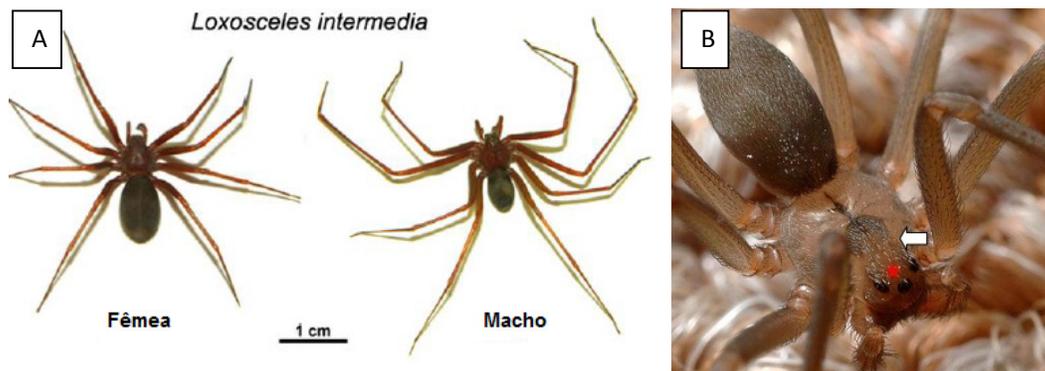


FIGURA 1 – ARANHAS DA ESPÉCIE *Loxosceles intermedia* REPRESENTANDO O GÊNERO *Loxosceles*. (A) Dimorfismo sexual de aranhas da espécie *Loxosceles intermedia*. **Adaptado de CHAIM et al., 2011a.** (B) A seta demonstra o violino, marca característica entre aranha do gênero; A estrela indica a disposição dos olhos agrupados em 3 díades. **Adaptado de CHAVES-MOREIRA, 2008;**

## 2.2 LOXOSCELISMO E EPIDEMIOLOGIA

O termo loxoscelismo é usado para caracterizar manifestações clínicas decorrentes do envenenamento através da picada de espécies de *Loxosceles*, o qual pode se apresentar em dois quadros: loxoscelismo cutâneo e loxoscelismo sistêmico, também conhecido como loxoscelismo viscerocutâneo ou loxoscelismo cutâneo-hemolítico (MALAQUE *et al.*, 2011).

A picada da aranha-marrom é descrita como indolor. Após cerca de 2 a 8 horas após a picada, a dor pode variar de leve a severa e é relatada como “queimação” localizada (FUTRELL, 1992; MADSEN e ELFAR, 2010).

As três espécies de maior importância médica são *L. intermedia*, *L. laeta* e *L. gaucho*, sendo que a *L. intermedia* é a espécie mais abundante no estado e principalmente na cidade de Curitiba e Região Metropolitana (MÁLAQUE *et al.*, 2002; GONÇALVES-DE-ANDRADE *et al.*, 2012). Acidentes com aranhas-marrons caracterizam-se como um problema de saúde pública no Estado do Paraná, com um número médio de 5.417 acidentes por ano (SINAN 2013). A maior ocorrência de

acidentes com estas aranhas se dá nos meses mais quentes do ano, principalmente no verão, onde se verifica maior atividade destes animais (MALAQUE *et al.*, 2011).

### 2.2.1 Loxoscelismo cutâneo

O loxoscelismo cutâneo é o quadro clínico mais comum na maioria dos casos chegando de 84 a 97% dos casos notificados. Os sinais e sintomas iniciais após a picada são dor leve e eritema, sendo que ao longo do desenvolvimento da lesão, poucas horas após a picada, observam-se sintomas como edema, isquemia do tecido local, hemorragia e lesões dermonecroticas com espalhamento gravitacional, além da formação da placa marmórea (FUTRELL, 1992; ISBISTER e FAN, 2011; CHATZAKI *et al.*, 2012).

Após 72 horas do envenenamento, na ausência de intervenção medicamentosa, são encontradas algumas evidências de necrose. Em um período de cerca de 5 a 7 dias, a lesão evolui para uma ferida rígida e seca com bordas bem delimitadas, resultando na formação de uma escara de difícil cicatrização ao longo do tempo (DA SILVA *et al.*, 2004; FUTRELL, 1992; ISBISTER e FAN, 2011; APPEL *et al.*, 2005; CHAIM *et al.*, 2011a; SCHENONE *et al.*, 1989). Como resultado, após 2 a 3 semanas, a formação de úlceras crônicas e destruição do tecido onde ocorreu a inoculação inicial do veneno podem ocorrer, sendo necessário, em muitos casos, reparação cirúrgica (DA SILVA *et al.*, 2004; FUTRELL, 1992) (Figura 2).

Além disso, o loxoscelismo cutâneo está associado a sintomas sistêmicos como dores de cabeça, náusea, vômito, prurido e febre nas primeiras 24 – 48 horas após o acidente (DA SILVA *et al.*, 2004; FUTRELL, 1992; WASSERMAN e ANDERSON, 1983; SAMS *et al.*, 2001).



FIGURA 2 - LOXOSCELISMO CUTÂNEO. (A) Lesão cutânea típica de acidente loxoscélico com local da picada evidenciado pela estrela e característico espalhamento gravitacional demonstrado pela seta. (B) Placa marmórea. (C) Escara necrótica. (D) Cicatriz após 3 meses do acidente. **Adaptado de CABRERIZO *et al.*, 2009.**

### 2.2.2 Loxoscelismo sistêmico

Algumas vítimas podem desenvolver a forma mais grave de loxoscelismo, que corresponde ao quadro cutâneo-visceral ou sistêmico. O loxoscelismo sistêmico severo é raro, no entanto em alguns casos o comprometimento sistêmico pode levar a vítima a óbito (da SILVA *et al.*, 2004; de SOUZA *et al.*, 2008; APPEL *et al.*, 2005). Os registros de pacientes que desenvolveram o loxoscelismo sistêmico variam de acordo com a espécie envolvida no acidente. É relatado que os casos mais frequentes de pacientes que desenvolveram lesões sistêmicas ocorreram após acidentes com aranhas da espécie *Loxosceles laeta* (SCHENONE *et al.*, 1989; SEZERINO *et al.*, 1998), sendo que este tipo de lesão ocorre com menos frequência em acidentes com aranhas das espécies *Loxosceles gaucho* (MALAQUE *et al.*, 2002) e *Loxosceles reclusa* (WRIGHT *et al.*, 1997; MCDADE *et al.*, 2010; ROSEN *et al.*, 2012).

Nos casos de loxoscelismo sistêmico severo são observadas alterações no quadro hemolítico como trombocitopenia decorrente da agregação plaquetária e

coagulação intravascular disseminada, além de outros distúrbios como a redução do hematócrito, aumento de bilirrubina indireta, icterícia, hemoglobinúria e insuficiência renal aguda (IRA) (DA SILVA *et al.*, 2004; FUTRELL, 1992; CHAIM *et al.*, 2006; LUCATO *et al.*, 2011). Apesar de ocorrer em menor incidência, alguns casos de loxoscelismo podem levar a óbito devido a distúrbios hematológicos e lesões renais (DA SILVA *et al.*, 2004; LUCATO *et al.*, 2011).

O quadro de injúria renal foi descrito como sendo resultado dos distúrbios da hemostase e da reação inflamatória exacerbada em resposta ao veneno, porém, mais recentemente, pode-se constatar que componentes do veneno podem ligar-se diretamente a estruturas renais. Foi demonstrada a ação direta sobre tecido renal de uma isoforma da enzima fosfolipase D. A enzima foi capaz de provocar alterações na estrutura renal semelhantes às aquelas causadas pelo veneno total, ligando-se às células renais, com efeito citotóxico dependente de sua atividade catalítica (LUCIANO *et al.*, 2004; CHAIM *et al.*, 2006; KUSMA *et al.*, 2008; LUCATO *et al.*, 2011). O quadro de injúria renal foi descrito como sendo resultado dos distúrbios da hemostase e da reação inflamatória exacerbada em resposta ao veneno, porém, mais recentemente pôde-se constatar que componentes do veneno podem ligar-se diretamente a estruturas renais (TAMBOURGI *et al.*, 1998; CHAIM *et al.*, 2006; KUSMA *et al.*, 2008). É descrito que o quadro mais frequente no loxoscelismo sistêmico é a presença de hemólise intravascular, sendo a insuficiência renal aguda mais rara e associada a um quadro de hemólise maciça (MALAQUE *et al.*, 2011).

Em quadros de loxoscelismo sistêmico são encontrados também outros sintomas não específicos como astenia, febre, episódios eméticos, alterações sensoriais, cefaléia e insônia; dentre os casos mais graves ocorrem convulsões e coma, podendo também ocorrer prurido generalizado e petéquias (SCHENONE *et al.*, 1989; FUTRELL, 1992; ISBISTER e FAN, 2011; ROSEN *et al.*, 2012).

Ainda em relação aos sintomas inespecíficos do loxoscelismo sistêmico, há também relatos de reações sistêmicas de hipersensibilidade causadas após a picada das espécies de *L. reclusa* e *L. rufescens*. Os eventos de hipersensibilidade são mais comuns em indivíduos atópicos (com predisposição a hipersensibilidade) e os principais achados clínicos são *rash* cutâneo e exantema pustuloso generalizado. O qual se caracteriza pelo aparecimento de pústulas de água estéreis ou pustulosas sobre uma pele eritematosa acompanhada, geralmente, de febre e leucocitose (Figura 3). Embora seja de ocorrência incomum, Robb e colaboradores (2007)

destacam que reações sistêmicas a partir do envenenamento podem ser fatais e os estudos sobre loxoscelismo deveriam ter maior atenção para pacientes que apresentam o quadro exantemático generalizado (DONEPUDI *et al.*, 2005; KING *et al.*, 2007; ROBB *et al.*, 2007; MAKRIS *et al.*, 2009; PIPPIRS *et al.*, 2009; LANE *et al.*, 2011).

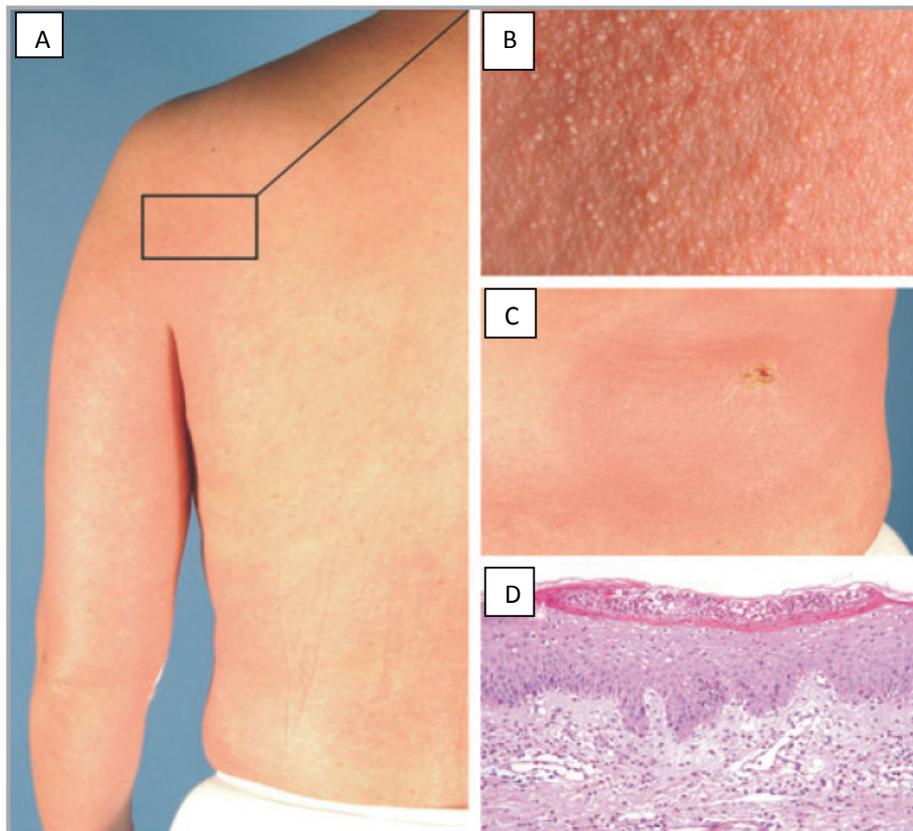


FIGURA 3 - ENXANTEMA PUSTULOSO GENERALIZADO CAUSADO POR PICADA DE ARANHA DO GÊNERO *Loxosceles*. (A) Pústulas generalizadas distribuídas uniformemente sobre todo o corpo. (B) Detalhe da pústulas na região do ombro. (C) Local da picada. (D) Análise histopatológica de pústula subcórnea e intraepidérmicas corada com Hematoxilina e Eosina. A pústula é preenchida com neutrófilos e alguns eosinófilos. A derme exibe intenso infiltrado inflamatório. **Adaptado de PIPPIRS *et al.*, 2009.**

### 2.3 VENENO DE ARANHAS DO GÊNERO *Loxosceles sp*

O veneno de *Loxosceles* é um líquido cristalino e incolor, de natureza essencialmente proteica, produzido por um par de glândulas situadas no cefalotórax, ligadas a um par de quelíceras (dos SANTOS *et al.*, 2000). É composto basicamente por enzimas e moléculas biologicamente ativas. No veneno são encontradas proteínas de alta massa molecular pouco expressa e um grande conteúdo de

proteínas de baixa massa molecular. Os venenos das espécies *L. laeta*, *L. intermedia* e *L. reclusa* possuem o mesmo perfil eletroforético, apresentando as principais bandas entre 30 e 35 kDa (Figura 4). A quantidade de veneno produzida é variável entre as espécies de aranha marrom, pelo tamanho e sexo do animal, entre outros fatores (de OLIVEIRA *et al.*, 2005).

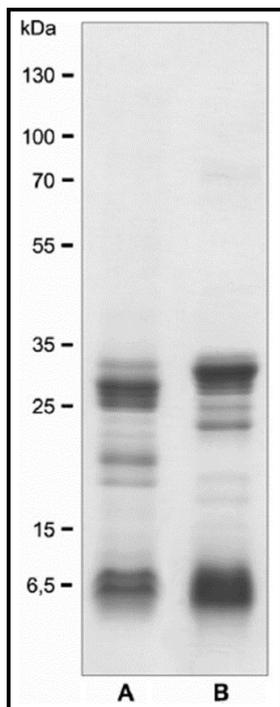


FIGURA 4-PERFIL DO VENENO DE *L. intermedia*. (A) Perfil eletroforético em SDS-PAGE de amostras reduzidas e (B) não reduzidas. As massas moleculares estão representadas a esquerda da figura.  
Adaptado de: GREMSKI *et al.*, 2010

A quantidade de veneno produzida é variável entre as espécies de aranha-marrom, de acordo com o tamanho e sexo do animal, disposição de alimento, entre outros fatores (DE OLIVEIRA *et al.*, 1999; DE OLIVEIRA *et al.*, 2005; TAMBOURGI *et al.*, 2010). O volume médio de veneno inoculado por aranhas adultas do gênero *Loxosceles* durante a picada é de aproximadamente 4 $\mu$ L e contém de 30 a 100 $\mu$ g de proteínas (SAMS *et al.*, 2001; TAMBOURGI *et al.*, 2010). O conteúdo total do veneno ainda não é totalmente esclarecido, sabe-se que além da grande quantidade de proteínas, a mistura também é constituída por ácidos nucléicos, aminoácidos livres, poliaminas neurotóxicas, monoaminas e sais inorgânicos (ESCOUBAS *et al.*, 2000). É consenso de que os eventos desencadeados pela picada de aranhas do gênero *Loxosceles* é devido ao efeito sinérgico de suas toxinas, ainda assim alguns autores destacam o papel da histamina em eventos inflamatórios, causando vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e infiltração de neutrófilos. Assim, os eventos inflamatórios iniciais provocados pelo veneno de aranha marrom poderiam estar relacionados com o conteúdo de histamina no veneno na degranulação de mastócitos (RATTMANN *et al.*, 2008; PALUDO *et al.*, 2009).

A identificação das toxinas presentes no veneno de aranhas do gênero *Loxosceles* tem sido o foco de muitos estudos, sendo que algumas toxinas já foram identificadas e caracterizadas bioquimicamente e biologicamente (DA SILVA *et al.*, 2004; APPEL *et al.*, 2005). Dentre estas toxinas podem ser citadas: fosfatase

alcalina, 5'-nucleotídeo fosfohidrolases (FUTRELL, 1992), nucleosídeos sulfatados (SCHROEDER *et al.*, 2008), hialuronidades (BARBARO *et al.*, 2005; YOUNG e PINCUS, 2001; DA SILVEIRA *et al.*, 2007b; FERRER *et al.*, 2013), fosfolipases-D (CHAIM *et al.*, 2006; DE ANDRADE *et al.*, 2005; DA SILVEIRA *et al.*, 2006; APPEL *et al.*, 2008; DA SILVEIRA *et al.*, 2007c; VUITIKA *et al.*, 2013), serinoproteases (VEIGA *et al.*, 2000b), metaloproteases (FEITOSA *et al.*, 1998; VEIGA *et al.*, 2000a; VEIGA *et al.*, 2001a; VEIGA *et al.*, 2001b; TREVISAN-SILVA *et al.*, 2013), e toxinas inseticidas (DE CASTRO *et al.*, 2004; MATSUBARA *et al.*, 2013).

Dos componentes presentes no veneno de *L. intermedia*, as proteínas melhor caracterizadas são as pertencentes à família de toxinas dermonecróticas ou família *Loxtox*. São enzimas do tipo fosfolipase D, e estão envolvidas com os efeitos mais tóxicos do veneno. Sejam as de origem do veneno bruto ou as obtidas através de técnicas de biologia molecular, estas toxinas são capazes de induzir experimentalmente dermonecrose, resposta inflamatória, agregação plaquetária, hemólise, aumento da permeabilidade vascular, nefrotoxicidade, letalidade em camundongos e efeitos citotóxicos em linhagens celulares estabelecidas, assim como estudos estruturais revelam indícios do mecanismo catalítico dessas enzimas (FUTREL, 1992; da SILVA *et al.*, 2004; APPEL *et al.*, 2005; CHAIM *et al.*, 2006; da SILVEIRA *et al.*, 2006; da SILVEIRA *et al.*, 2007b; RIBEIRO *et al.*, 2007; APPEL *et al.*, 2008; ULLAH *et al.*, 2011; VUITIKA *et al.*, 2013, WILLE *et al.*, 2013).

O mecanismo de ação das fosfolipases ainda não foi totalmente esclarecido, mas acredita-se que a hidrólise de lipídios, gerando mediadores como ceramida-1-fosfato e ácido lisofosfatídico, que possa ativar determinadas vias de sinalização causando as alterações fisiopatológicas e os efeitos deletérios destas toxinas (LEE & LYNCH, 2005; KUSMA *et al.*, 2008; CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2009; ULLAH *et al.*, 2011; VUITIKA *et al.*, 2013; WILLE *et al.*, 2013).

Quanto às metaloproteases, foram caracterizadas como sendo moléculas de baixa massa molecular com atividade fibronectinolítica e fibrinogenolítica (20-28 kDa) e gelatinolítica (32-35 kDa). Foram primeiramente descritas no veneno de *L. intermedia* e posteriormente nos venenos de *L. laeta*, *L. gaucho* e *L. rufescens*. A atividade destas está possivelmente relacionada a distúrbios hemostáticos tais como hemorragia da derme e injúria de vasos sanguíneos (da SILVEIRA *et al.*, 2007; TREVISAN-SILVA *et al.*, 2010; SENFF-RIBEIRO *et al.*, 2008; TREVISAN-SILVA *et al.*, 2013)

São descritas na literatura duas serinoproteases (85 e 95 kDa) com atividade gelatinolítica, possivelmente relacionadas com a atividade tóxica do veneno de *L. intermedia*. Estas proteases degradando proteínas da matriz extracelular ou de membranas basais podem estar envolvidas também com distúrbios hemorrágicos, agravamento da lesão dermonecrótica e aumento da permeabilidade vascular (da SILVA *et al.*, 2004; da SILVEIRA *et al.*, 2002, 2007).

Outras enzimas caracterizadas nos venenos loxoscélicos que exibem ação sobre componentes da matriz extracelular são as hialuronidasas. Acredita-se que estas enzimas atuem degradando glicosaminoglicanos e funcionem como um fator de espalhamento do veneno, contribuindo para sua toxicidade (BARBARO *et al.*, 2005; da SILVEIRA *et al.*, 2007; FERRER *et al.*, 2013).

Em 2010, GREMSKI e seus colaboradores desenvolveram um importante estudo o qual analisou o transcriptoma da glândula produtora de veneno de *L. intermedia*. A análise do perfil dos transcritos da glândula produtora de veneno de *Loxosceles intermedia* (Figura 5) demonstrou que aproximadamente 43% dos transcritos obtidos correspondem a toxinas. Foram identificados transcritos com identidade para metaloproteases astacin-like (23%), peptídeos inseticida similares a notinas (53,5%), alérgenos (0,2%), proteína tumoral controlada traducionalmente (TCTP) (0,4%), inibidores de serinoproteases (0,1%) e neurotoxinas similares a Magi-3 (2,4%) (GREMSKI *et al.*, 2010).

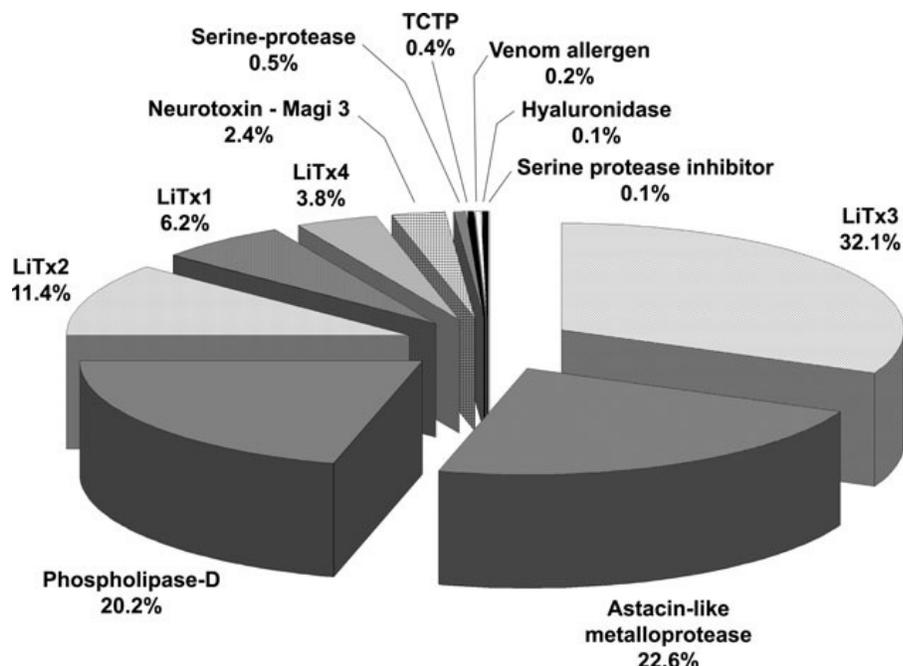


FIGURA 5 – TRANSCRIPTOMA DA GLÂNDULA DE VENENO DE *Loxosceles intermedia*. (A) Proporções dos transcritos agrupados de acordo com suas classes. Adaptado de GREMSKI *et al.*, 2010.

Esses transcritos encontrados demonstraram maior similaridade com moléculas descritas em aranhas da espécie *Lycosa sigoriensis* e com a espécie de escorpião *Opisthacanthus cayaporum* (GREMSKI *et al.*, 2010). O que corrobora com outro estudo de transcriptoma da glândula produtora de veneno de *L. laeta* que revelou um grupo de transcritos com identidade com alérgenos de vespas (*Vespula vulgaris*, *Dolichovespula maculata*) (FERNANDES-PEDROSA *et al.*, 2008). Em um estudo de análise proteômica de *L. reclusa*, feito por dos Santos e colaboradores (2009) foi observado a possível ocorrência de uma proteína alérgênica homóloga a um alérgeno de ácaro (*Ixodes scapularis*) (dos SANTOS *et al.*, 2009)

#### 2.4.1 Reações alérgicas, eventos de hipersensibilidade e o loxoscelismo

Doenças alérgicas são distúrbios imunológicos que afeta 40% da população mundial. As moléculas que induzem reações alérgicas podem ser inaladas, injetadas, ingeridas e absorvidas através da pele ou mucosas. Um imunógeno é uma substância que é capaz de provocar uma resposta imune. Quando este é capaz de

induzir respostas com anticorpo tipo Imunoglobulina E (IgE) é denominado alérgeno. O aumento na produção de IgE é uma resposta comum a antígenos sendo um marcador para doenças atópicas como asma brônquica, rinite alérgica e dermatites atópicas (HAMELMANN *et al.*, 1999; PARHAM, 2001; ARLIAN, 2002).

As pessoas que reagem a alérgenos são ditas ser alérgicas ou atópicas. As reações de hipersensibilidade são agrupadas em quatro tipos, de acordo com os mecanismos efetores que produzem a reação (PARHAM, 2001). A reação de sensibilidade que ocorre dentro de minutos de exposição é referida como hipersensibilidade tipo I ou imediata; é mediada por IgE e o mecanismo se faz através da ativação de mastócitos. Substâncias liberadas durante uma reação imediata podem induzir uma reação inflamatória localizada e tardia (4 - 48h) envolvendo infiltração e acúmulo de neutrófilos, eosinófilos, basófilos, macrófagos e linfócitos. Essas células e seus produtos podem exacerbar a reação inicial (KINET *et al.*, 1990; ARLIAN, 2002) (Tabela 2). Vale ressaltar que embora indivíduos atópicos tenham uma significativa resposta inflamatória bem descrita, alguns indivíduos normais (não atópicos) também podem desenvolver uma leve resposta inflamatória. Isso se deve ao fato de que muitas toxinas podem atuar como moléculas pró-inflamatórias imunógenas desencadeando eventos inespecíficos iniciais de uma inflamação comum. Desse modo, a ação específica de alguma molécula, ou o sinergismo entre as moléculas presentes nos venenos como a histamina presente, por exemplo, no veneno de *L. intermedia* podem auxiliar nos primeiros processos inflamatórios (PALUDO *et al.*, 2009).

A marca de uma reação alérgica é a mediação por IgE, sendo o principal marcador bioquímico em diagnósticos de alergia. Reações alérgicas não mediadas por IgE existem, mas o mecanismo é pobremente entendido ainda como é o caso de fatores de liberação histaminérgicos, cujos quais possuem a capacidade de degranular mastócitos e/ou ativar basófilos diretamente (GALLI *et al.*, 1993; ARLIAN, 2002).

As reações de hipersensibilidade do tipo II são causadas por moléculas pequenas que se ligam covalentemente a alguns componentes da superfície das células, produzindo estruturas modificadas que são reconhecidas como estranhas. A resposta de células B a esses novos epítopos produz Imunoglobulina do tipo G (IgG). A hipersensibilidade do tipo III é causada pelos imunocomplexos que se depositam na parede dos vasos sanguíneos ou pulmões causando uma resposta

inflamatória. Já a hipersensibilidade do tipo IV é causada pelos produtos de células T efetoras específicas para o antígeno (PARHAM, 2001).

TABELA 1- TIPOS DE REAÇÕES DE HIPERSENSIBILIDADE

características	tipo-I (anafilático)	tipo-II (citotóxico)	tipo-III (complexo imune)	tipo-IV (tipo tardio)
anticorpo	IgE	IgG, IgM	IgG, IgM	Nenhum
antígeno	exógeno	superfície celular	solúvel	tecidos & órgãos
tempo de resposta	15-30 minutos	minutos-horas	3-8 horas	48-72 horas
aparência	inflamação	lise e necrose	eritema e edema, necrose	eritema e calosidade
histologia	basófilos e eosinófilos	anticorpo e complemento	complemento e neutrófilos	monócitos e linfócitos

FONTE: PARHAM, 2001

A IgE é responsável pela maioria das respostas alérgicas. A produção de IgE é favorecida quando o sistema imune é desafiado com pequenas quantidades de antígeno e tendo ainda a citocina IL-4 presente no momento em que as células T CD4 virgens são apresentadas ao antígeno. Nessas circunstâncias, tende-se a ter uma resposta do linfócito T CD4 *helper 2* (PARHAM, 2001).

## 2.5 EVENTOS DE HIPERSENSIBILIDADE E O LOXOSCELISMO

A prevalência de alergia tem aumentado de forma global nos últimos 25 anos juntamente com o aumento da industrialização. O termo *Indoor allergens* é utilizado para classificar alérgenos cujos quais estão em contato diariamente com humanos no ambiente doméstico e peridomiciliar. A principal fonte de *indoor allergens*

conhecida é a de alérgenos derivado de artrópodes que contabilizam cerca de 80% do Reino Animalia. As duas classes de artrópodes são Insecta, que inclui baratas, moscas, mosquitos, vespas, abelhas, formigas e Aracnídeos, que inclui ácaros, aranhas, carrapatos e escorpiões e são importantes fontes de potentes alérgenos. Acredita-se que os alérgenos de artrópodes domésticos, sejam os principais responsáveis pela sensibilização e desenvolvimento de doenças atópicas.

Embora pouco estudado e com baixa frequência, existem relatos que demonstram que algumas vítimas manifestam reações alérgicas após o envenenamento por aranha do gênero *Loxosceles*, como brevemente citado no item 2.2.2 (Figura 3).

O exantema causado pela picada de *L. reclusa* e *L. rufescens* é uma ocorrência incomum. Porém, reações sistêmicas a partir do envenenamento podem ser fatais e o loxoscelismo deveria ser considerado em pacientes que vivem em áreas endêmicas e que apresentam generalizada vasculite exantemática após o acidente (KING *et al.*, 2007; ROBB *et al.*, 2007; MAKRIS *et al.*, 2009; PIPPIRS *et al.*, 2009).

O eczema caracteriza-se por uma resposta inflamatória que causa um exantema crônico pruriginoso (Figura 6) e frequentemente está associado a altos níveis de IgE. Porém a severidade da dermatite não é facilmente correlacionada com a exposição à alérgenos particulares ou a níveis de IgE específicos para o alérgeno (PARHAM, 2001).



FIGURA 6 - EXANTEMA PUSTULOSO GENERALIZADO AGUDO CAUSADO POR PICADA DE ARANHA *L. rufescens*. Presença de pústulas eritematosas após 72h depois do envenenamento. **Adaptado MAKRIS *et al.*, 2009.**

Peles de coelhos foram estudadas após o envenenamento experimental com veneno de *L. reclusa*. Foram estudadas amostras histológicas de 41 coelhos e os resultados principais incluíram um infiltrado misto de células inflamatórias, necrose do tecido de coagulação, e vasculite. Todas as amostras demonstraram uma zona bem delineada de coloração eosinofílica reconhecida como necrose coagulativa da epiderme e da derme. A presença de eosinófilos e neutrófilos degranulados e macrófagos repletos de grânulos eosinofílicos eram comuns. O autor ressalta que

eosinófilos podem ter um papel no dano tecidual após o envenenamento (ELSTON, 2000).

## 2.6 ALÉRGENOS DE ARTRÓPODES

Alérgenos presentes em venenos e salivas de artrópodes têm sido extensivamente estudados desde meados de 1970. Estudos que anteriormente somente eram possíveis de serem feitos por meio de observações sintomáticas e purificações parciais de extratos. Com o início do uso de técnicas de biologia molecular, algumas moléculas puderam ser caracterizadas isoladamente em sua forma recombinante ou sintética durante a década de 90. Deste modo, foi possível identificar e utilizar alérgenos que até o momento eram estudados e usados em terapias de imunodessensibilização a partir de extratos de glândulas de venenos e salivares expondo paciente a riscos de efeitos colaterais e choque anafilático (GUPTA *et al.*, 2004; HAMILTON *et al.*, 2004).

Além dos alérgenos de artrópodes, muitas moléculas alergênicas também estão presentes nas mais variadas fontes como alimentos, plantas, poeira, saliva, entre tantos outros e causam sérios agravos na saúde de pacientes atópicos. A identificação do agente que desencadeia a reação de hipersensibilidade assim como sua fonte é um fator determinante no diagnóstico e no tratamento. Devido a isso, criou-se a necessidade de classificar e diferenciar as fontes, as moléculas e verificar a similaridade entre elas, com intuito de melhor entender a evolução e a composição desses venenos. Os métodos para classificar e designar as fontes de alérgenos caracterizados foi descrita por King em 1995 e Larsen em 1996, e seus respectivos colaboradores. Brevemente, um alérgeno é descrito pelas três primeiras letras do gênero, espaçado da primeira letra que define a espécie, espaçado de um numeral arábico. O numeral indica a ordem sequencial de caracterização do alérgeno para aquela determinada espécie. No caso de coincidir as mesmas três primeiras letras e a primeira da espécie deve-se adicionar mais uma letra ao gênero ou a espécie (KING *et al.*, 1995; LARSEN *et al.*, 1996; BOUSQUET *et al.*, 1998).

Alérgenos que compartilham propriedades bioquímicas, funções biológicas e possuem mais de 50% de identidade de sequência aminoacídica são classificados no mesmo grupo. O uso dos prefixos “r”, “s” e “n”, é opcional, e serve para designar

moléculas recombinantes, sintéticas e naturais, respectivamente. Somente alérgenos com mais de 5 % de reatividade (definido por RAST\*<sup>1</sup>) são incluídos nessa nomenclatura (LARSEN *et al.*, 1996).

Segundo o banco de dados do *Allergen Nomenclature Sub-committee* (WHO/IUIS) (disponível em: <http://www.allergen.org>), o número de alérgenos descritos e já caracterizados chega a 767 moléculas, sendo que 27% dessas moléculas correspondem a alérgenos do filo dos artrópodes em especial da ordem himenóptera, considerada a mais danosa a humanos (Tabela 2).

TABELA 2- PRINCIPAIS ESPÉCIES NOCIVAS DA ORDEM HIMÓPTERA

<i>Família</i>	<i>Espécies</i>
Vespidae	
Subfamily Vespinae	
Genus <i>Vespula</i> (yellow jackets)	
<i>Vespula vulgaris</i> species group	<i>V. flavopilosa</i> , <i>V. germanica</i> , <i>V. maculifrons</i> , <i>V. pennsylvanica</i> , <i>V. vulgaris</i>
<i>Vespula rufa</i> species group	<i>V. acadica</i> , <i>V. consorbina</i> , <i>V. vidua</i>
<i>Vespula squamosa</i> species group	<i>V. aquamosa</i>
Genus <i>Dolichovespula</i> (aerial yellow jackets) <sup>2</sup>	<i>D. maculata</i> , <i>D. arenaria</i>
Genus <i>Vespa</i> (hornets) <sup>3</sup>	<i>V. crabo</i> , <i>V. mandarinia</i>
Subfamily Polistinae	
Genus <i>Polistes</i> (paper wasps)	
Subgenus <i>Aphanilopterus</i>	<i>P. annularis</i> , <i>P. apachus</i> , <i>P. exlamans</i> , <i>P. fuscata</i> , <i>P. metricus</i>
Subgenus <i>Polistes</i>	<i>P. dominulus</i>
Apidae	
Subfamily Apinae	
Genus <i>Apis</i> (honey bees) <sup>4</sup>	<i>A. mellifera</i> , <i>A. cerana</i> , <i>A. dorsata</i>
Genus <i>Bombus</i> (bumble bees)	<i>B. pennsylvanicus</i>
Formicidae	
Subfamily Myrmicinae	
Genus <i>Solenopsis</i> (fire ants)	<i>S. invicta</i>
Genus <i>Pogonomyrmex</i> (harvester ants)	

FONTE: Adaptado de King *et al.*, 2000

Como já citado no item 2.3 (Figura 5), Gremski e seus colaboradores (2010) encontraram 0.2% de transcritos na glândula produtora de veneno de *L. intermedia*

\*<sup>1</sup> RAST é um teste *in vitro* utilizado para identificar a origem do processo alérgico, através da detecção de anticorpo IgE específico, presente na amostra analisada (Método: Fluorescência Enzimática – ImmunoCAP)

que correspondem a alérgenos. Interessantemente na base de dados *Allergome* (disponível em: <http://www.allergome.org/>) é possível encontrar a descrição de relatos publicados e reações alérgicas desencadeadas por picadas de *L. reclusa* e *L. rufescens* (item 2.4.2) (PIPPIRS *et al.*, 2009). Porém, na literatura não há nenhuma descrição que faça menção a um alérgeno já caracterizado presente em uma espécie de aranha do gênero *Loxosceles sp.* Assim como não há nenhuma descrição de alérgeno derivado de aracnídeos nos bancos de dados citados acima (*Allergen Nomenclature Sub-committee WHO/IUIS e Allergome*). Embora eventos de hipersensibilidade decorrentes do acidente com outras espécies de aranhas sejam observados (IBISTER *et al.*, 2003; HASAN *et al.*, 2005, JEONG *et al.*, 2007).

No item 2.4, foi ressaltado que 40% da população sejam susceptíveis a manifestar um evento de hipersensibilidade frente a uma molécula alergênica. Devido a esses significantes dados, muitos desses alérgenos, têm sido extensivamente estudados, purificados e imuno-bioquimicamente caracterizados: em alguns casos sendo produzidos em sua forma recombinante. A seguir, é apresentado um compilado de dados referente aos principais toxinas já descritas nos venenos das principais espécies da Ordem Himenóptera (Tabela 3):

### 2.6.1 Apídeos

Estudos demonstram que o veneno de abelha *Apis mellifera* contém 10 proteínas entre 8 e 52 kDa que se ligam a IgE de pacientes alérgicos (JEEP *et al.*, 1996). Perfis de ligação de IgE para estes alérgenos podem variar entre pacientes. Além disso, o veneno da abelha do mel contém outros componentes tais como peptídeos e histamina que também podem contribuir para a reação alérgica. Nove alérgenos no veneno da abelha *A. mellifera* já foram caracterizados: *Api m 1* (fosfolipase A2) , *Api m 2* (hialuronidase), *Api m 3* (fosfatase ácida) e *Api m 4* (melitina). Até o dado momento, somente os alérgenos *Api m 1*, *Api m 2* e *Api m 4* tem sua estruturas resolvidas por cristalografia e difração por raio-x (EWAN *et al.*, 1998; KING *et al.*, 1995; KING *et al.*, 2000; HOFFMAN *et al.*, 1977; YUNGINGER *et al.*, 1998; SCOTT *et al.*, 1990; MARKOVI-HOUSLEY *et al.*, 1999; TERWILLIGER *et al.*, 1982). Com a exceção de *Api m 5* (100 kDa), *Api m 12* (200 kDa) e *Api m 4* (3kDa) -- que é um peptídeo considerado *non-allergen* -- todos os outros alérgenos

possuem de baixa a média massa molecular de 16-50kDa. Isso demonstra uma complexa composição com um amplo espectro de proteínas. Outros alérgenos estão sendo caracterizados, porém pouco se sabe sobre suas estruturas ou mecanismos de ação (BLANK *et al.*, 2010; KETNER *et al.*, 2001; PEIREN *et al.*, 2006; GEORGIEVA *et al.*, 2010; BLANK, 2012 e 2013).

As picadas da abelha *Bombus pennsylvanicus* conhecida popularmente na América do norte, onde são mais encontradas, como mamangaba, não são muito comuns (especialmente na América do sul), porém, alguns casos de reações alérgicas desencadeadas por suas picadas já foram relatados (BARNARD *et al.*, 1966, DONNAVAN *et al.*, 1978, KOCHUYT *et al.*, 1993; BUCHER *et al.*, 2001; GROOT *et al.*, 2006). A abelha *B. pennsylvanicus* contém dois alérgenos já caracterizados em seu veneno. *Bom p 1* (fosfolipase A2) e *Bom p 4* (protease) . Interessantemente *Api m 1* e *Bom p 1*, duas fosfolipases A2, demonstram identidade entre si, enquanto que quando comparada a Fosfolipase A1 do veneno de vespídeos não demonstra nenhuma homologia (KING *et al.*, 1996; HEMMER *et al.*, 2001). Fato que corrobora com alguns componentes dos venenos de *A. melífera* e *B. pennsylvanicus* apresentarem imunoreatividade cruzada (HEMMER *et al.*, 2001; STEEN *et al.*, 2005). No entanto *B. pennsylvanicus* apresenta uma quantidade muito menor de proteínas em seu veneno.

## 2.6.2 Vespídeos

Alérgenos já descritos do veneno da vespa *Dolichovespula maculata* inclui os alérgenos *Dol m 1* (fosfolipase A1), *Dol m 2* (hialuronidase), e *Dol m 5* (Antígeno 5) (KING *et al.*, 1978). Outras espécies de vespas possuem alérgenos relacionados a *Dol m 1*, *Dol m 2* e *Dol m 5* como o alérgeno *Vesp c 1* (fosfolipase A1) e o *Vesp c 5* (antígeno 5). A vespa *Polistes annularis* tem em seu veneno as moléculas alergênicas *Pol a 1* (Fosfolipase A1) , *Pol a 2* (hialuronidase) , e *Pol a 5* (Antígeno 5). E do mesmo modo a espécie (*Vespula vulgaris*) contém o alérgeno *Ves v 1* (fosfolipase A1) , *Ves v 2* (hialuronidase) e o *Ves v 5* (antígeno 5).

Estes grupos 1, 2 e 5 presentes nos venenos das espécies de vespas citadas apresentam marcha eletroforética de 23-38 kDa. De uma forma interessante o antígeno 5 é uma molécula com múltiplos epítomos e é encontrada amplamente nos

venenos de himenópteros. O alérgeno correspondente ao antígeno 5 da *V. vulgaris* (*Ves v 5*) contém 204 resíduos de aminoácidos e apresenta cerca de 65% de homologia entre *Dol m 5* (*D. maculata*) e o *Pol a 5* (*P. annularis*) (KING *et al.*, 1996; HOFFMAN 1997; KING *et al.*, 2001). Da mesma forma, a hialuronidase da *V. vulgaris* (*Ves v 2*) e sua fosfolipase A1 (*Ves v 1*) contém 331 e 300 aminoácidos, respectivamente, e apresenta 92 % e 67 % de homologia de entre suas sequências quando comparadas aos alérgenos de *P. annularis* (KING *et al.*, 1996;).

Uma das consequências do estudo proteínas de venenos de insetos foi a descoberta de famílias de proteínas que têm funções biológicas importantes em outros organismos. É relatado que o Antígeno 5 é importante para o desenvolvimento de helmintos, sendo que o delineamento de uma série de vacinas é baseado nisso. Anand e colaboradores (1999) descreveram um protótipo de vacina para Filariose Linfática causada pela *Wuchereria bancrofti*, contendo o homólogos do antígeno 5. Estudos semelhantes estão em progresso com proteínas de ancilóstomos relacionados com o Antígeno 5 (ANAND *et al.*, 1999). Além de alérgenos das espécies listadas acima, tem sido caracterizados alérgenos em diversas outras espécies de vespídeos, dentre estas a vespa *Polybia scutellaris* (*Poly s 5*) (VINZÓN *et al.*, 2010; BORODINA *et al.*, 2011). Interessantemente essa espécie apresenta o alérgeno Antigen 5 da vespa *Polybia scutellaris* (*Poly s 5*) demonstra ter uma alta identidade aminoacídica com *Sol i 3* (homólogo ao Antígeno 5) (HOFFMAN *et al.*, 1993; VINZÓN *et al.*, 2010). Em 2001 King e seus colaboradores caracterizaram uma isoforma recombinantes hipoalergênica de um Antígeno 5 derivado de vespa (KING *et al.*, 2001).

Vale ressaltar com atenção que Ferrer em 2010, constatou que a sequência nucleotídica do alérgeno de *L. intermedia* pertence a família CAP/CRiSP (GIBBS *et al.*, 2008) de proteínas secretadas ricas em cisteínas. Nessa família estão agrupados moléculas como o Antígeno 5 e o mais recentemente CRiSP/Allergen/PR-1 que pela primeira vez foi identificado no veneno de aranha Migalomorfa (GIBBS *et al.*, 2008; UDHEIM *et al.*, 2013).

Os alérgenos das vespas *V. vulgaris* e *P. annularis* são os que apresentam mais reatividade cruzada entre as espécies. Em 14 espécies de vespas analisadas por King e seus colaboradores (1996), ao menos um dos alérgenos, dos três principais grupos caracterizados, estava presente nos venenos analisados. O fenômeno da imunoreatividade cruzada entre os alérgenos de diferentes venenos

pode explicar eventos de múltipla sensibilização e até mesmo reações alérgicas a fontes que tem baixa representatividade de alérgenos propriamente ditos. Os resultados acima citados podem fornecer suporte parcial para a hipótese de que a reatividade cruzada entre alérgenos do veneno com imunoglobulina do tipo E do hospedeiro, podendo promover a imunogenicidade do alérgenos presentes no veneno, mesmo que pouco representativos. Isso se torna interessante ao analisarmos a propensão de indivíduos atópicos serem facilmente sensibilizados com quantidades pequenas de alérgenos (microgramas). Em geral o que se observa, é que imunizações experimentais em animais normais (não sensibilizados), somente ocorrem com grandes quantidades de adjuvante (KING *et al.*, 1996).

### 2.6.3 Formicídeos

As formigas de fogo (*Fire ant*), *Solenopsis invicta* e *Solenopsis richteri*, habitam porções da América do Sul sendo muito comum em regiões do sudeste do Brasil. Seu veneno é composto por alguns dos alérgenos mais bem descritos. Por meio de ensaios de *crossed-radioimmuno-electrophoresis* (CRIE), extratos da formiga *S. invicta* mostraram 14 proteínas, analisadas por RAST com soros de 24 pacientes atópicos (NORDVALL *et al.*, 1998). O *immunoblotting* revelou a ligação de IgE a várias proteínas com pesos moleculares variando de 13 a 42 kDa.

Quanto a sua caracterização, quatro alérgenos já foram descritos até o momento, *Sol i 1*, *Sol i 2*, *Sol i 3* e *Sol i 4*. Inicialmente todos foram isolados e purificados a partir de veneno da formiga de fogo, *S. invicta*, porém, *Sol i 2* e *3* já foram obtidos em sua forma recombinante. O alérgeno *Sol i 2 r* foi obtido utilizando sistema de expressão em *Baculovirus* e foi cristalizado em sua forma dimérica sendo sua estrutura determinada com uma resolução de 2.6 Å (HOFFMAN *et al.*, 1988; SHIMIDT *et al.*, 1993 E 1996; PADAVATTAN *et al.*, 2008; BORER *et al.*, 2012; LOCKWOOD *et al.*, 2012)

*Sol i 1* é uma fosfolipase A1 de 37 kDa que apresenta reatividade cruzada com venenos de vespídeos. Já *Sol i 2*, *3* e *4* são proteínas com pesos de 13 , 24 , e 13 kDa , respectivamente . De uma forma interessante *Sol i 3* e *Sol i 4* apresentam 35% de similaridade entre suas sequências. Sendo dessa forma, *Sol i 3*, considerado um homólogo ao Antígeno 5 com 50% de homologia ao Antígeno 5 de

espécies de vespas, porém não apresenta reatividade cruzada (HOFFMAN *et al.*, 1988 e 1993; LOCKWOOD *et al.*, 2012).

Um estudo feito com 703 protocolos de atendimento no hospital de Wilford (*Medical Center Venom Clinic*), Texas, entre 1985 e 1995, mostrou que a picada de formigas da espécie *S. invicta* foram responsáveis por 42% dos atendimentos (FREEMAN *et al.*, 1997). Picadas de formiga do fogo são um caso de saúde pública e a imunoterapia é indicada em muitos casos. A imunoterapia para dessensibilização e redução da alergenicidade, da picada de formigas do gênero *Solenopsis sp*, é consenso entre alergiólogistas a imunoterapia sendo amplamente praticada nos estados onde as formigas de fogo são endêmicas (MOFFITT *et al.*, 1997). Em uma pesquisa, Moffitt e seus colaboradores relataram que 96,7% da comunidade médica entendem como essencial a imunoterapia como procedimento terapêutico.

TABELA 3- ALÉRGENOS HIMENÓPTERA

<b>Apídeos-Bee, Bumble bee (Abelhas)</b>						
<i>Apis mellifera (Bee)</i>						
<b>Nome</b>	<b>ID</b>	<b>Classe</b>	<b>Est. 3D</b>	<b>Nativa/ Recombinante</b>	<b>MM</b>	<b>Fonte</b>
<i>Api m 1</i>	X16709	Fosfolipase A2	1POC	<i>Escherichia coli</i> -expressao	16 kDa	Scott, 1990; Dudler, 1992
<i>Api m 2</i>	L10710	Hialuronidase	1FCQ	<i>Baculovirus/SF9/ E. coli</i>	39 kDa	Housley, 2000; Soldatova, 2007
<i>Api m 3</i>	DQ058012	Fosfatase ácida		<i>Baculovirus/SF9</i>	43 kDa	Soldatova, 1998; Rendic, 2007
<i>Api m 4</i>	X02007	Melitina	2MLT	<i>Baculovirus/SF9/ E. coli</i>	3 kDa	Hoffman, 1977; King, 1976, 1984 e 2000; Yunginger, 1998
<i>Api m 5</i>	EU564831	Alérgeno C		<i>Detecção por ligação a IgE/RAST</i>	100 kDa	Blank, 2010
<i>Api m 6</i>		Inibidor de Serino protease		<i>Baculovirus/SF9/ E. coli</i>	8 kDa	Ketner, 2001; Peiren, 2006; Michel 2012
<i>Api m 7</i>	AY127579	Serino protease-Like		<i>cDNA-modelo 3D predito</i>	39 kDa	Georgieva, 2010
<i>Api m 11</i>	DQ000307	Presente na geléia real		<i>Putativo</i>	50 kDa	Blank, 2012
<i>Api m 12</i>	AJ517411	Vitelogenina		<i>Purif. Do veneno/ RAST</i>	200 kDa	Blank, 2013
<i>Bombus pennsylvanicus (Bumblee bee)</i>						
<b>Nome</b>	<b>ID</b>	<b>Classe</b>	<b>Cristal</b>	<b>Nativa/ Recombinante</b>	<b>MM</b>	<b>Fonte</b>
<i>Bom p 1</i>	Q7M416*	Fosfolipase A2		<i>Detecção por ligação a IgE/RAST</i>	16 kDa	Barnard, 1966; Hoffman, 1982 e 1996; Kochuyt, 1993
<i>Bom p 4</i>	Q7M413*	Protease		<i>Detecção por ligação a IgE/RAST</i>	27 kDa	Barnard, 1966; Hoffman, 1982 e 1996; Kochuyt, 1993

---

**Vespídeos-Wasp, Hornet, Yellow jacket (vespas)**


---

*Dolichovespula maculata (Wasp)*


---

Nome	ID	Classe	Cristal	Nativa/ Recombinante	MM	Fonte
<i>Dol m 1</i>	X66869	Fosfolipase A1		<i>Detecção por ligação a IgE</i>	34 kDa	King, 1978
<i>Dol m 2</i>	L34548	Hialuronidase		<i>Detecção por ligação a IgE</i>	42 kDa	King, 1978
<i>Dol m 5</i>	J03601	Antigen5		<i>RAST</i>	23 kDa	King, 1978, 1986 e 1997

---

*Polistes annularis, Polybia scutellaris (Hornet)*


---

Nome	ID	Classe	Cristal	Nativa/ Recombinante	MM	Fonte
<i>Pol a 1</i>	AF174527	Fosfolipase A1		<i>E. coli M15 / RAST</i>	34 kDa	King, 1996
<i>Pol a 2</i>	AF174528	Hialuronidase		<i>RAST</i>	38 kDa	King, 1996
<i>Pol a 5</i>	M98857	Antigen5		<i>Pichia pastoris</i>	23 kDa	Lu, 1993; King, 1996
<i>Poly s 5</i>		Antigen5		<i>Pichia pastoris</i>	23 kDa	Vinzon, 2010

---

*Vespula vulgaris (yellow jacket)*


---

Nome	ID	Classe	Cristal	Nativa/ Recombinante	MM	Fonte
<i>Ves v 1</i>	L43561	Fosfolipase A1		<i>Purif. Do veneno/ RAST</i>	34 kDa	Borodina, 2010
<i>Ves v 2</i>	AJ920395	Hialuronidase		<i>Purif. Do veneno/ RAST</i>	38 kDa	Binder, 2002
<i>Ves v 3</i>	EU420987	AllergenC		<i>Células de Inseto Sf9</i>	100 kDa	Blank, 2010
<i>Ves v 5</i>	M98858	Antigen5	1QNX	<i>Pichia pastoris/ E. coli-expressa</i>	23 kDa	Lu, 1993, Monsalve, 1999; King, 2001 Mitermann, 2010
<i>Ves v 6</i>	JN794080	Vitelogenina		<i>Purif. Do veneno/ RAST</i>	200kDa	Blank, 2013

---

---

**Formicídeos-Fire ants (formigas)**


---

*Solenopsis invicta (Fire ant)*


---

<b>Nome</b>	<b>ID</b>	<b>Classe</b>	<b>Cristal</b>	<b>Nativa/ Recombinante</b>	<b>MM</b>	<b>Fonte</b>
<i>Sol i 1</i>	AY684998	Fosfolipase A1		<i>Purif. Do veneno/ RAST</i>	37 kDa	Hoffman, 1988; Hoffman, 2005
<i>Sol i 2</i>	L09560	Fosfolipase	2YGU	<i>Baculovirus/SF9</i>	28 kDa	Hoffman, 1988; Shimidt, 1993 e 1996; Borer, 2012
<i>Sol i 3</i>	AF012919	Homólogo ao Ag5	2VZN	<i>Baculovirus/SF9</i>	24 kDa	Hoffman, 1988; Padavattan, 2008
<i>Sol i 4</i>	AF103805	Antigen5		<i>RAST</i>	13 kDa	Hoffman, 1988; Padavattan, 2008

---

**Sigla-** Nome do alérgeno conforme nomenclatura internacional

**ID-** Número de entrada no GeneBank/\*Número de entrada no PDB

**Classe-** caracterização bioquímica

**Est. 3D-** Número de entrada no PDB

**Nativa/recombinante-** Correspondente ao método de expressão utilizado para caracterização

**MM-** Massa molécula -SDS-PAGE

**Fonte-** Referência simplificada contendo primeiro autor e ano de publicação

---

## 2.7 POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE ALÉRGENOS RECOMBINANTES

Há cerca de cem anos atrás, Leonard Noon e Prausnitz & Kustner (1911) conduziram estudos em pacientes alérgicos. Utilizando os extratos de plantas Noon determinou o que seria os princípios da base das modernas terapias de dessensibilização. Foi determinado que as reações alérgicas observadas eram dependentes de um “fator sorológico” (i.e., IgE) em paciente alérgicos, o qual reagia de uma maneira específica quando na presença “antígeno-causador de doença” (i.e., alérgeno) e um componente tecidular (i.e., mastócitos). Dando seguimento aos estudos Prausnitz & Kustner estabeleceram uma nova metodologia para investigar os mecanismos da Imunoterapia Alérgeno-Específica (SIT, do inglês *allergen-specific immunotherapy*). Esses estudos permitiram a observação, posterior, de um segundo tipo de resposta tardia contra esses alérgenos. Foi verificado que o soro de pacientes anteriormente sensibilizados apresentavam agora IgG alérgeno-específica que bloqueavam os eventos inflamatórios de uma maneira específica (LARCHE *et al.*,2006; BOUSQUET *et al.*,1998; DURHAM *et al.*,1999; VALENTA *et al.*,2010; DIWAKAR *et al.*,2008).

A imunoterapia subcutânea consiste na aplicação de doses repetidas e crescentes de alérgenos em pacientes atópicos. Pacientes tratados apresentaram aumentos rápidos de imunoglobulinas do tipo G (IgG's) alérgeno-específicas e diminuições lentas em suas imunoglobulinas do tipo E IgE's específicas. Assim como apresentam mudanças em seu perfil de citocinas de células T, IL-4 e IL-5 (BOUSQUET *et al.*, 1998; TANABE *et al.*, 2007; VALENTA *et al.*, 2007; ROLLAND *et al.*, 2008). Estudos têm demonstrado que a imunoterapia com elevadas doses de alérgenos foram mais eficazes do que com doses baixas na redução dos sintomas. No entanto, as doses eficazes são limitadas pelas potenciais reações sistêmicas causadas por alérgenos. Alergenicidade depende da interação de um alérgeno com basófilos ou mastócitos sensíveis a ativação por IgE. Portanto, o uso de alérgenos recombinantes permite reduzir a alergenicidade dessas moléculas diminuindo a sua densidade de epítomos de célula B (NORMAN *et al.*, 1993; KING *et al.*, 2001; VALENTA *et al.*, 2011). Para fins de tratamento é importante a verificação das principais fontes que iniciam o processo de

sensibilização imunológica em quadros de hipersensibilidade (MONSALVE *et al.*, 2011; LINHART *et al.*, 2012; TREUDLER *et al.*, 2012).

Desde então numerosos estudos e metodologias foram utilizadas em terapias para doenças alérgicas das mais diversas fontes. Até hoje muito das bases estabelecidas nesses estudos pivotais são utilizadas em procedimentos de diagnósticos e terapias, como o uso de extratos totais ou parciais de alérgenos (BILÓ *et al.*, 2005; BROWN & TANKERSLEY, 2011). No entanto, desde a sua introdução em 1911, um dos principais problemas da SIT tem sido o uso de extratos alérgenos que são muitas vezes responsáveis pela baixa eficácia e efeitos colaterais observados (INCORVAIA *et al.*, 2011). Determinação de proteínas, avaliação da atividade biológica foram formas de padronizar os extratos utilizados, com o intuito de reduzir os efeitos colaterais e indesejados, porém com pouco sucesso. Estes problemas incluem variações de lote, imunogenicidade reduzida de determinados alérgenos assim como a presença de materiais não alergênicos (contaminação). Alguns estudos recentes vêm investigando e demonstrando a ineficiência da composição de extratos alergênicos comerciais (BILÓ *et al.*, 2005; FOCKE *et al.*, 2008 e 2009; CURIN *et al.*, 2010; BRUNETTO *et al.*, 2010; KOROSSEC *et al.*, 2011).

A introdução da tecnologia do DNA recombinante na área biomédica estimulou vários pesquisadores a aplicar essa nova tecnologia na caracterização de alérgenos. A utilização de técnicas de biologia molecular tem contribuído para a identificação e caracterização de um crescente número de alérgenos. No entanto, os principais determinantes e propriedades desses alérgenos, que impulsionam respostas alérgicas, são mal compreendidos. A caracterização biológica de alérgenos irá fornecer uma compreensão da patogênese de doenças alérgicas e contribuir para o desenvolvimento de novas abordagens de diagnóstico e terapia (BILÓ *et al.*, 2005; VALENTA *et al.*, 2011).

E é baseado nisso que a utilização de moléculas recombinantes tem se tornado um viés de sucesso na imunoterapia para dessensibilização e testes de alergia (BILÓ *et al.*, 2005; VALENTA *et al.*, 2011; NIEDERBERGER *et al.*, 2013). Atualmente o foco dos estudos de imunoterapia e testes diagnósticos (i.e. *Prick*

*test*<sup>\*2</sup>) volta-se para o uso dos alérgenos recombinantes e seus derivados hipoalergênicos. Alérgenos recombinantes, e seus variantes alergenidade reduzida são promissores candidatos para uma imunoterapia específica mais segura (VALENTA *et al.*, 2002).

Já consta na literatura alguns estudos iniciais do uso de alérgenos hipoalergênicos de ocorrência natural (nativo) em artrópodes (Antígeno 5) (VINZÓN *et al.*, 2012). Neste estudo, Vinzón e colaboradores, constataram que o alérgeno *Poly s 5* de *Polybia scutellaris* apresenta uma redução em seu potencial alergênico em relação a sua isoforma *Pol a 5* presente em *Poliste annularis*. Devido à presença de epítomos conservados entre as isoformas, porém sem a capacidade de degranular basófilos, *Poly s 5* abre uma discussão para seu uso como agente hipoalergênico. Uma vez que ao entrar em contato com hospedeiro não desencadeie uma reação alérgica e induza a produção de IgG-antiIgE alérgeno-específicas.

Neste trabalho, avaliamos o comportamento imunológico e atividade alergênica da *Poly s 5*, em comparação com as do seu homólogo mais alergênicos de *Polistes annularis*, *Pol a 5* (VINZÓN *et al.*, 2012). Não somente alérgenos de ocorrência natural são candidatos a hipoalérgenos na imunoterapia antígeno-específica. O uso de técnicas de biologia molecular, como mutação sítio-dirigida permitem atenuar o reconhecimento de epítomo descontínuos, permitindo a produção de IgGs anti IgE com maior segurança, porém ainda há pouca aplicação dessa técnica na terapêutica (VRTALA *et al.*, 2004).

Se tratando de alérgenos de artrópodes, vários dos alérgenos da Ordem himenóptera (Tabela 3) foram obtidos em sua forma recombinante expressos em bactérias, leveduras ou em células de inseto. Os sistemas de expressão, suas vantagens e desvantagens irão ser discutidos a seguir.

O sistema procariótico, embora seja de fácil manuseio e baixo custo, apresenta certas desvantagens quando a proteína de estudo exige modificações pós-traducionais como glicosilação e formação de pontes dissulfeto. Muitas vezes essas moléculas se encontram em sua forma inativa ou presente em corpos de inclusão devido à ausência de modificações pós-traducionais nos modelos de

---

\*<sup>2</sup> *Prick test*- teste de diagnóstico para alergia. Inoculação experimental dérmica ou intradérmica com alérgenos purificados, ou extratos. Como controle é utilizado histamina e têm-se positivo para o teste após 15 min a formação de uma pápula superior a 3mm (halo da histamina).

expressão procarióticos (DUDLER *et al.*, 1992; SOLDATOVA *et al.*, 1998). Alternativamente as proteínas desdobradas podem se estruturar novamente por métodos de redobramento e renaturação *in vitro* próximo a sua estrutura nativa. Como exemplo desta técnica tem-se o alérgeno *Api m 1* (PLA2) da abelha *A. mellifera* que foi obtido em *E. coli strain X-Blue* e posteriormente submetida a *refolding* (DUDLER *et al.*, 1992). Outro estudo que demonstra o sucesso do uso do sistema de expressão em procarioto foi feito por Mittermann e seus colaboradores (2010). Nesse estudo, alérgenos recombinantes de abelha e vespa, expressos em *E. coli* em sua forma glicosilada e não glicosilada foram utilizados em testes de diagnóstico de alergia. Quando comparado as metodologia que usam extratos de alérgenos, as formas recombinantes der *Api m 1* (não glicosilada), *rApi m 2*, e *rVes 5* apresentaram uma melhoria no diagnóstico baseado-IgE para sensibilidade alérgica para abelha e vespa.

O modelo heterólogo eucariótico em levedura (*Pichia pastoris* e *Saccharomyces cerevisiae*) é um sistema útil para a expressão de alto rendimento fornecendo grandes quantidades de proteínas para a pesquisa laboratorial básica e fabricação industrial. Os parâmetros de oxigenação, pH e taxa de alimentação de fonte de carbono, podem facilmente ser controlados quando em comparação com células de mamíferos (SPADIUT *et al.*, 2010).

Retomando um dado relevante em relação ao Antígeno 5, é que algumas formas recombinantes, dos alérgenos do grupo 5 acima citados, foram obtidos em sistema de expressão em levedura *Pichia pastoris* (LU *et al.*, 1993; MONSALVE *et al.*, 1999).

Isso se deve ao fato de *Pichia pastoris* possuir metabolismo metilotrófico adequado para a expressão devido à facilidade de manipulação genética e expressão de proteínas eucarióticas. Essa cepa fornece altas frequências de transformação de DNA, níveis elevados de expressão de proteínas ao nível intra ou extracelular e a capacidade de realizar modificações pós-traducionais, tais como glicosilação, formação de ligações dissulfeto e splicing. Assim como permite que a purificação de proteínas recombinantes secretadas seja possível, devido aos níveis relativamente baixos de proteínas nativas segregadas (CREGG *et al.*, 1993; SUDBERY *et al.*, 1996; BUCKHOLZ *et al.*, 1991; CEREGHINO *et al.*, 2000; HIGGINS *et al.*, 2001; MACAULEY *et al.*, 2005; SPADIUT *et al.*, 2010; MATTANOVICH *et al.*, 2012; MOKDAD-GARGOURI *et al.*, 2012).

Alguns estudos comprovam a eficiência do sistema de expressão em *Pichia pastoris* quando comparado ao sistema procariótico. Um exemplo disso é um estudo feito por POKOJ e seus colaboradores (2010), o qual compara a expressão de uma molécula alergênica em modelo procariótico *E. coli* e modelo eucariótico *Pichia pastoris*. Os resultados desse estudo apontam que o modelo eucariótico se mostrou ser muito mais eficiente para obtenção do alérgeno recombinante *nsLTP*, uma vez que o dobramento e a atividade da molécula é importante sua alergenicidade (POKOJ *et al.*, 2010). Outro relato importante, consiste na produção recombinante do alérgeno presente no amendoim, *Ara h 6*. Zhuang e seus colaboradores (2012) obtiveram as formas recombinantes de *Ara h 6 r* em *Pichia pastoris* e em *E. coli*, e observaram que somente houve reconhecimento de IgE's frente a molécula recombinante produzida em *Pichia pastoris*. Levando a conclusão de que o sistema eucariótico promoveu um melhor enovelamento estrutural, favorecendo a formação de epítomos conformacionais para reconhecimento de células T, sendo o modelo procariótico ineficiente (ZHUANG *et al.*, 2012).

O sistema baculovírus de expressão heterólogo de proteínas vem sendo extensivamente utilizado para a produção de alérgenos recombinantes visando a sua utilização em imunoterapias de dessensibilização. O motivo do sucesso dessa aplicação biotecnológica na produção de recombinantes se dá pelas vantagens que esse sistema heterólogo apresenta: Um ambiente eucariótico (i.e. células de inseto Sf9) para expressão de proteínas, que possibilita a obtenção de proteínas biologicamente ativas; Variedade de linhagens celulares que suportam a replicação viral; Promotores fortes como o *polh* (O'REILLY *et al.*, 1992). A exemplo disso têm-se os alérgenos *Sol i 2* e *Sol i 3* assim como, o alérgeno de *A. melífera Api m 2* (hialuronidase), que foram expressos em células de inseto Sf9 e tendo inclusive suas estruturas tridimensionais já resolvidas por cristalografia e difração de raio-X (SCHIMIDT *et al.*, 1996 SOLDATOVA *et al.*, 1998 SCHIMIDT *et al.*, 2000; PADAVATTAN *et al.*, 2008; BORER *et al.*, 2012).

Como consta na literatura, a obtenção de isoformas recombinantes de alérgenos apresenta um grande potencial de seu uso na biotecnologia, farmacologia e terapêutica. Frente a isso de toxinas recombinantes presentes no veneno de aranhas do Gênero *Loxosceles sp* se relaciona com esse objetivo. Algumas destas aplicações podem incluir o uso destas enzimas em estudos envolvendo processos como processos inflamatórios, diferenciação celular, tumorigênese e metástase,

resposta imunológicas e permeabilidade vascular entre outros eventos que podem ser melhor entendidos utilizando da obtenção de toxinas recombinantes a partir do veneno de *Loxosceles sp* (CHAIM *et al.*, 2011a; SENFF-RIBEIRO *et al.*, 2008).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Subclonagem, expressão heteróloga, purificação e caracterização bioquímica e biológica de uma proteína homóloga a alérgeno identificado na biblioteca de cDNA da glândula de veneno da aranha-marrom (*Loxosceles intermedia*).

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter a forma recombinante pura, solúvel e ativa de uma proteína homóloga a alérgeno do veneno de *L. intermedia* em quantidade suficiente para os testes de caracterização;

- Obter informações sobre a estrutura tridimensional da proteína homóloga a alérgeno de *L. intermedia*.

- Verificar se a proteína homóloga a alérgeno é uma toxina capaz de ativar reações alérgicas assim como sua capacidade dos eventos de hipersensibilidade do loxoscelismo

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 REAGENTES

Tris, Uréia, Glicina, SDS e Azul de Coomassie R-250 foram obtidos da GibcoBRL (Grand Island, NY, EUA); EDTA da USB (Cleveland, OH, EUA) e brometo de etídio da GE Healthcare Life Sciences (Piscataway, NJ, EUA). Hidroclorato de guanidina, Imidazol, OPD, BSA e Biotina foram obtidos da Sigma (St. Louis, MI, EUA). Os componentes para meio de cultura, tais como peptona, extrato de levedura e triptona foram adquiridos da BD (Sparks, MD, EUA) e HIMEDIA (Mumbai, Índia). Fenol e YNB foram adquiridos da Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA). Os oligonucleotídeos empregados em PCR foram sintetizados pela IDT (Coralville, IA, EUA). Os demais reagentes químicos, tais como sais, ácidos, bases e solventes orgânicos foram todos adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha).

### 4.2 MÉTODOS - SISTEMA DE EXPRESSÃO HETERÓLOGA EM *E. coli* BL21(DE3) pLysS

#### 4.2.1 Eletroforese de Proteínas em Gel de Poliacrilamida

Eletroforeses foram realizadas em géis de poliacrilamida (12,5 %) contendo detergente aniônico Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE) em condições redutoras ou não. Os géis foram preparados utilizando o aparato comercial (Bio-Rad, Hercules, EUA). A solução de poliacrilamida, contendo os catalisadores APS e TEMED, foi colocada entre placas de vidro e isolada com uma camada de isobutanol. Após a polimerização, foi removida a camada de água e isobutanol acima do gel com auxílio de papel filtro. A solução de empacotamento, contendo 5% de poliacrilamida e os catalisadores, foi colocada acima do gel e nela foi posicionado o pente para formação dos poços. Após a polimerização, o pente foi removido e os poços secos com auxílio de papel filtro. A separação das proteínas foi obtida mediante aplicação de corrente de 25 mA constante, até a separação total das proteínas. Os géis foram corados em solução contendo Azul de Coomassie Brilhante R-250 a 0,25%, metanol 50% e ácido acético 10% em água deionizada, durante 10 minutos à

temperatura ambiente sob agitação constante. A descoloração foi realizada com metanol 50% em água deionizada, com sucessivas trocas da solução de metanol (HARLOW; LANE, 1988).

#### 4.2.2 Construção do Vetor de Expressão pET-20b/*Lox i 1*

Com base nos clones obtidos no projeto de FERRER (2010) foi dado seguimento a subclonagem em vetor de expressão pET-20b. A construção contendo a sequência referente ao alérgeno presente na glândula produtora de veneno de *L. intermedia* estavam clonados em plasmídeos de clonagem pGEM-T e cepas de *E. coli DH5α*. Inicialmente antes do início da parte experimental do projeto esses clones foram sequenciados para verificar sua integridade. Para identificar a sequência codificadora foi utilizado o programa de alinhamento local *BLAST* (“Basic Local Alignment Search Tool”) na página do NCBI (“National Center for Biotechnology Information”) ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)) (ALTSCHUL *et al.*, 1990). Para a clonagem da sequência em um vetor de expressão, foram desenhados oligonucleotídeos específicos para adição as extremidades da sequência dos sítios de restrição *XhoI* e *BamHI*, presente em vetor pET-20b. Foi realizada reação de PCR para amplificação da sequência e inserção dos sítios de restrição utilizando a enzima *Pfu* Polimerase. Para esta reação foram utilizados tampão para *Pfu* Polimerase (1X) contendo MgSO<sub>4</sub>, dNTPs (0,2 mM), oligonucleotídeos específicos (0,4 μM), cDNA em pPGEM-T (100 ng) e enzima *Pfu* Polimerase (1,25 U/50 μL). A mistura foi incubada em termociclador (My Cyclor – Thermal Cyclor Bio-Rad, Hercules, EUA) no seguinte protocolo: 1 ciclo a 94°C/ 2 min; 35 ciclos a 94°C/ 30 s – 50°C/ 30 s – 72°C/1 min; 1ciclo 72°C/ 10 min; 1 ciclo de espera a 4°C/ infinito. O produto desta reação foi analisado em gel de agarose 2% com brometo de etídio (0,5 μg/mL) em tampão TAE (Tris 40 mM, acetato de sódio 20 mM e EDTA 1 mM), sendo a corrida eletroforética realizada em cuba horizontal a 5 V/cm. A visualização do gel foi feita em aparelho de análise de imagens Chemidoc – XRS e programa *Quantity One – SW* (Bio-Rad, Hercules, EUA). A banda correspondente à sequência de interesse foi recortada com auxílio de bisturi e o DNA extraído com kit de extração de DNA (*PerfectPrep Gel Extraction Kit*, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha). O fragmento extraído foi digerido sequencialmente com as enzimas *XhoI* e *BamHI* a

(0,5 U/ $\mu$ g DNA, 16h a 37°C) e inserido em vetor pET-20b, também digerido com as mesmas enzimas nas mesmas condições. A reação de ligação foi feita utilizando: tampão ligase (1X); T4 DNA ligase (3 U/  $\mu$ l); inserto e vetor provenientes da digestão. O volume final da reação foi de 20  $\mu$ l e a ligação feita durante 16 h a 4°C. Após a ligação, a enzima ligase foi inativada com a incubação do produto final da reação a 65°C durante 5 minutos.

#### 4.2.3 PCR de Colônia

Para identificar as colônias que incorporaram a construção, foi realizado PCR de colônia com oligonucleotídeos específicos. Cada colônia escolhida foi recolhida com auxílio de palito de madeira estéril e colocada em tubo de PCR. Para amplificação do fragmento, foi realizada reação de PCR nas seguintes condições: Tampão *Taq* DNA polimerase (1X); dNTPs (0,2 mM); MgCl<sub>2</sub> (1,5 mM); oligonucleotídeo específico *reverse* e oligonucleotídeo T7 *promoter* (0,2 mM); *Taq* Polimerase (1,25 U/50  $\mu$ l). A mistura foi incubada em termociclador no protocolo a seguir: 1 ciclo a 95°C/5 min; 35 ciclos a 95°C/30s – 50°C/30s – 72°C/1min; 1 ciclo 72°C/10 min; 1 ciclo de espera a 4 °C/ infinito. O produto do PCR foi analisado em gel de agarose 1,5%.

#### 4.2.4 Miniprep para Sequenciamento

Os clones contendo o inserto de interesse foram inoculados em 10 mL de meio LB contendo ampicilina e incubados por 16h a 37°C em incubadora do tipo Shaker, com agitação vigorosa. A partir da cultura bacteriana obteve-se o sedimento bacteriano que foi processado por *miniprep* (*QIAprep Spin Miniprep Kit*, QIAGEN, Valencia, EUA) para extração dos plasmídeos para reação de sequenciamento. Para o PCR de sequenciamento foi utilizado o *DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit* (GE Healthcare, Piscataway, EUA), utilizando a miniprep descrita anteriormente como molde e oligonucleotídeos específicos e oligonucleotídeos T7 e T7 Terminator. O sequenciamento foi realizado em sequenciador BD 3500 (Applied Biosystems, Foster City, EUA). As sequências obtidas foram, então, analisadas e os clones escolhidos dar seguimento para transformação em cepa de expressão. A

sequência nucleotídica obtida foi traduzida e analisada no programa *ProtParam* (Disponível no site: < <http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>>) para predição de peso molecular e ponto isoelétrico da proteína.

#### 4.2.5 Transformação Bacteriana

A construção foi então transformada em cepa bacteriana *Escherichia coli* BL21(DE3) pLysS quimiocompetente. Todos os materiais utilizados no procedimento foram previamente refrigerados. À uma alíquota de 100 µl contendo bactérias *E. coli* BL21(DE3) pLysS competentes foi adicionado 1 µl do produto da reação de ligação realizada anteriormente. As bactérias foram colocadas em tubos de polipropileno e levadas ao gelo por 30 minutos. Posteriormente, o tubo foi passado para banho-maria a 42°C por 90 segundos e novamente colocado no gelo por 2 minutos. Após o choque térmico foram adicionados 900 µl de meio SOC (triptona 20 g/L, extrato de levedura 5 g/L, NaCl 0,5 g/L, KCl 2,5 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, MgSO<sub>4</sub> 10 mM e glicose 0,2 M) para recuperação das bactérias. O tubo foi mantido a 37°C por uma hora sob agitação leve. Após a recuperação, as bactérias foram plaqueadas em meio LB ágar (triptona 10 g/L, extrato de levedura 5 g/L, NaCl 10 g/L e ágar-ágar 15 g/L) suplementado com ampicilina (100 µg/mL) e incubadas a 37°C em incubadora do tipo BOD, por 16h.

#### 4.2.6 Expressão do alérgeno recombinante de *L. intermedia* em *E.coli* BL21(DE3) pLysS

A proteína foi expressa como uma proteína de fusão, contendo um His-Tag N-Terminal para possibilitar sua purificação. As construções corretas confirmadas por sequenciamento foram transformadas em cepas bacterianas de expressão *E. coli* BL21(DE3) pLysS competentes e as bactérias plaqueadas em meio LB Agar contendo ampicilina (100 µg/mL) e cloranfenicol (34 µg/mL). Os clones transformados foram identificados por PCR de colônia, como descrito anteriormente. Um teste piloto de expressão foi realizado para determinar o tempo ótimo de expressão e a concentração ideal do indutor IPTG. Uma colônia isolada foi inoculada em 10 mL de meio LB contendo ampicilina (100 µg/mL) e cloranfenicol (34 µg/mL)

incubada por 37 °C durante 16h. Esta cultura foi inoculada na diluição 1:100 em 50 mL de meio LB com os antibióticos, e o crescimento monitorado pela determinação da densidade óptica em 550 nm. Quando as culturas atingiram absorvância de 0,4 a 0,6 em 550nm, foi adicionado o indutor IPTG em diferentes concentrações ( 0,1; 0,2; 0,4 e 1,0 mM) e coletadas amostras em diferentes tempos (0; 1; 2; 3; 4; 5 horas) de expressão a 37 °C . As amostras foram analisadas por eletroforese em gel SDS-PAGE 10% em condições redutoras (5% de  $\beta$ -mercaptoetanol).

#### 4.3 MÉTODOS - SISTEMA DE EXPRESSÃO HETERÓLOGA EM *Pichia pastoris*

##### 4.3.1 Gel de agarose

As análises dos produtos de PCR foram realizadas em gel de agarose 1,5% e as bandas extraídas com auxílio de bisturi no local de visualização das massas correspondentes foram colocadas em microtubos e extraídas com auxílio de kit para extração de DNA em gel (Quick Gel Extraction Kit, Eppendorf®/ Gel Band Purification kit GE®).

##### 4.3.2 Ligação em vetor pPICZ $\alpha$ C

O DNA amplificado foi diluído em água e este inserto ligado a 100ng do vetor pPICZ $\alpha$ C (Invitrogen). Para reação utilizou-se um volume final de no máximo 10 $\mu$ l; a qual continha tampão ligase (1X); T4 DNA ligase (3U/ $\mu$ l).

##### 4.3.3 Transformação bacteriana por eletroporação

Uma alíquota de solução de *Escherichia coli TOP10F'* eletrocompetente foi descongelada e mantida em gelo adicionando 1 $\mu$ l da reação de ligação e a eletroporando-a em eletroporador Gene Pulser X-Cell, BioRad.

Estas bactérias foram colocadas em meio LB *Low Salt* (triptona 10g/L, extrato de levedura 5g/L, NaCl 5g/L, ágar-ágar 15g/L a 37°C por 1 hora sobre agitação, para adquirir resistência ao antibiótico específico e recuperarem-se da alta voltagem.

#### 4.3.4 PCR de colônia

Para confecção de PCR de colônia cada uma das colônias escolhidas foi tocada com auxílio de palito de madeira estéril, parte do material esfregado no fundo de um tubo de 0,2ml acrescidos de Tampão *Taq* DNA polimerase (1X); dNTPs (0,2mM);  $MgCl_2$  (1,5mM); oligonucleotídeo Forward  $\alpha$  Factor (0,5  $\mu$ M); oligonucleotídeo reverse 3AOX (0,5 $\mu$ M); *Taq* DNA polimerase (1,25U/50 $\mu$ l). Esta mistura foi incubada em termociclador, para amplificação do inserto conforme protocolo: 95°C/5min (1 ciclo); 95°C/30s – temperatura média do  $T_m$  dos oligonucleotídeos iniciadores descontado de 5°C/45s – 72°C/4min (35 ciclos); 72°C/10min (1 ciclo); 4°C/ infinito. O produto do PCR de colônia foi analisado em gel de agarose 1,5%. E o resultado foi visualizado e registrado em aparelho de captura de imagem *Chemidoc* (*BioRad*).

#### 4.3.5 Pré-inóculo para processamento de sequenciamento

A partir dos clones escolhidos um pré-inóculo LB *Low Salt* (triptona 10g/L, extrato de levedura 5g/L, NaCl 5g/L, ágar-ágar 15g/L) Zeocina (25 $\mu$ g/ml) líquido e incubado por 16h a 37°C (em incubadora 430 RDB com agitação orbital, Nova Ética) em tubo de 50ml com tampa de rosca. Cada cultura (com crescimento saturado) foi centrifugada (14000xg por 1min) a temperatura ambiente e se obteve um pellet bacteriano consistente. De cada um dos centrifugados bacterianos foi feita a extração do plasmídeo com auxílio de reagentes Miniprep da Invitrogen (*Pure Link Quick Plamid Miniprep Kit, Invitrogen®*).

#### 4.3.6 Sequenciamento

Foi utilizado o protocolo de sequenciamento Big Dye com um volume total de reação de 10µl, sendo destes 4µl do reagente Big Dye e 6µl de DNA molde, oligonucleotídeos e água estéril. Essa reação é incubada no termociclador 95°C/20min - 50°C/15s - 60°C/1min (29ciclos); 4°C/ infinito.

A precipitação foi realizada com acetato de amônio 7,5M e etanol absoluto. Deixando secar 16h em ambiente escuro. O produto é ressuspensão em solução de corrida para a leitura em *BD 3500 Sequencer*, (*Applied Biosystems*). O resultado do sequenciamento foi analisado em programa *ChromasPro*, o alinhamento das sequências analisada através do site <<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>> e a sequência mais representativa analisada no site <<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>

#### 4.3.7 Desenho de oligonucleotídeos para expressão em *Pichia pastoris* X-33

Tomando como base o plasmídeo escolhido para expressão pPICZαC foram desenhados um oligonucleotídeo iniciador gene - específico *Forward* para o alérgeno completo e um para a proteína madura e outro *Reverse* contendo uma região adaptadora com o sítio de restrição utilizada para ambas as reações de clonagem direcional das enzimas *Clal* e *Xbal*. Os oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados seguindo informações em Sambrook & Russel (2001).

#### 4.3.8 Subclonagem do cDNA em vetor de expressão de levedura (pPICZαC)

Em trabalhos anteriores feitos no grupo de Biotecnologia de Venenos UFPR por FERRER (2010) foi elucidada a sequência nucleotídica completa do alérgeno presente na glândula produtora de veneno de *L. intermedia*. Deste modo o cDNA referente ao alérgeno completo (contendo peptídeo sinal) e maduro (sem o peptídeo sinal) foi modificado por PCR com alta fidelidade, da mesma forma como descrito acima para *Pfu* DNA Polimerase, utilizando-se os oligonucleotídeos *Forward* *Loxi1* | *Clal*: 5'-AAATCGATGATGTCTGCGATGTATC-3' e *Reverse* *Loxi1* | *Xbal*: 5'-AATCTAGACCCACAGCT TCCGGATTTTAC -3' para o alérgeno completo e os oligonucleotídeos *Forward* *Loxi1* | *Clal* mad: 5'-GA ATC GAT

GGAATCTTGTCCGTCAC-3' para o alérgeno maduro, sendo que para ambas reações foi utilizados o mesmo oligo reverso. Dessa forma o produto foi obtido contendo as extremidades sítios para as enzimas de restrição *Cla* I e *Xba* I (negrito) e bases adicionais (sublinhado) de tal forma que o produto fosse clonado em fase com o vetor pPICZ $\alpha$ C (Invitrogen). Desta maneira, a proteína recombinante seria um produto de fusão, contendo uma cauda de 6 histidinas na extremidade carboxi do polipeptídeo e o epítipo *cmyc* (EGKLISEEDL). Além disso, a proteína recombinante também estaria fusionada, no amino-terminal, a um peptídeo sinal de secreção em levedura (Fator- $\alpha$  de *Saccharomyces cerevisiae*), processado no momento da secreção do produto recombinante.

Após a amplificação, o produto foi purificado e submetido então à digestão com as enzimas de restrição *Cla* I (Fermentas) e *Xba* I (Invitrogen) à 37°C por 16 horas. Após a digestão, o produto foi submetido à separação eletroforética e purificação por extração do gel, como mencionado anteriormente. O inserto preparado desta maneira foi ligado (16°C por 16 horas, com T4 DNA Ligase) ao vetor pPICZ $\alpha$ C, pré-digerido com as enzimas de restrição *Cla* I e *Xba* I e tratado com fosfatase (CIAP). Esta reação de ligação foi utilizada na transformação de *E. coli* TOP10F' (Invitrogen) eletrocompetente (ver sessão 4.2.3), e a seleção dos clones foi feita em ágar LB *Low Salt* (triptona 10g/L, extrato de levedura 5g/L, NaCl 5g/L, ágar-ágar 15g/L) contendo Zeocina (Invitrogen) 25 $\mu$ g/ml.

A presença do inserto foi confirmada por PCR de colônia e, após a purificação do plasmídeo por minipreparação plasmidial, a construção foi confirmada por sequenciamento em ambas as fitas, utilizando-se os oligonucleotídeos “Pichia alpha-factor” e “Pichia 3' AOX1”, que anelam em regiões do vetor flanqueando o inserto. A construção pró-LiRecMP1/pPICZ $\alpha$ C foi linearizada na região 5' do promotor da álcool oxidase 1 (AOX1) pela incubação com a enzima de restrição *Sac* I (Fermentas), sendo então o produto da digestão utilizado na transformação da levedura *Pichia pastoris* X-33 competente utilizando o *Pichia* EasyComp™ *Transformation Kit* (Invitrogen). Após a transformação, as células que receberam a construção foram selecionadas em ágar YPD (SAMBROOK e RUSSEL, 2001) contendo zeocina 100 $\mu$ g/ml e 500  $\mu$ g/ml, sendo as placas incubadas a 30°C por 72 horas.

#### 4.3.9 Expressão e purificação do alérgeno recombinante em levedura *Pichia pastoris*

O protocolo de expressão foi delineado conforme sugere o fabricante do *kit Easy select kit Pichia expression* (Invitrogen). Uma colônia isolada de *P. pastoris* X-33 contendo a construção *Lox i 1/pPICZ $\alpha$  C* integrada ao cromossomo foi utilizada para inocular 30ml de meio BMGY (peptona 2%; extrato de levedura 1%; fosfato de potássio 100mM, pH 6,0; YNB 1,34%; biotina 4 x 10<sup>-5</sup>%; glicerol 1%), sendo esta cultura incubada à 30 °C por 20 horas sob agitação (250 rpm). Após este período, este pré-inóculo foi diluído em meio BMGY (peptona 2%; extrato de levedura 1%; fosfato de potássio 100mM, pH 6,0; YNB 1,34%; biotina 10<sup>-5</sup>%; Glicerol 10%). A cultura foi então adicionalmente incubada até que atingisse a fase logarítmica mediana na absorvância de 2-6 em 600nm. Neste momento, as células foram recuperadas por centrifugação à 3000xg por 5min à temperatura ambiente. O sobrenadante da centrifugação foi descartado e as células ressuspensas em meio BMMY (peptona 2%; extrato de levedura 1%; fosfato de potássio 100mM, pH 6,0; YNB 1,34%; biotina 10<sup>-5</sup>%; metanol 1%). A indução da expressão recombinante foi feita incubando-se a cultura por 3 dias à 30 °C, sob constante agitação. A indução foi mantida pelo acréscimo de metanol para uma concentração final de 1% a cada 24 horas de incubação, de modo a compensar a perda do indutor por evaporação. Após este período a cultura foi centrifugada à 3000xg por 10min à temperatura ambiente e o sobrenadante separado e filtrado em membrana de 0,45 $\mu$ m.

As proteínas expressas e secretadas para o meio de cultura foram precipitadas pela adição de sulfato de amônio a 80% de saturação e pela centrifugação à 9000xg por 30min à temperatura ambiente. O precipitado foi redissolvido e o material dialisado contra cloreto de sódio 150mM. Após a diálise, a amostra foi equilibrada em tampão fosfato de sódio 50mM, pH 10, contendo Cloreto de sódio 500mM e Imidazol 10mM, sendo então incubada com 200 $\mu$ l de Ni-NTA agarose (previamente equilibrada no mesmo tampão) por 1 hora à 4 °C. Esta suspensão foi então empacotada numa coluna, sendo o gel exaustivamente lavado com tampão apropriado (fosfato de sódio 50mM, pH 10; cloreto de sódio 500mM; imidazol 20mM) e a proteína recombinante eluída com imidazol 350mM (em fosfato de sódio 50mM, pH 10; cloreto de sódio 500mM). A proteína purificada foi analisada

por SDS-PAGE 10% e dialisada contra PBS à 4°C, sendo então quantificada pelo método do Azul de Coomassie (BRADFORD, 1976).

#### 4.3.10 Análise estrutural de *Lox i 1* por ferramentas de bioinformática

A análise estrutural preditiva foi feita utilizando a versão mais recente do programa *SWISS-MODEL*. Para a construção da estrutura tridimensional da proteína homóloga a alérgeno de *L. intermedia* foi utilizado como modelo um dos alérgenos da espécie de formiga *Solenopsis invicta*, o *Sol i 3* (código PDB: 2VZN) (PADAVATTAN *et al.*, 2008). As produções das predições foram feitas no programa de visualização molecular *Astex* e *Swiss-pdbViewer 4.1.0*.

#### 4.3.11 Dicroísmo circular

Para realizar a medição do espectro de Dicroísmo Circular, o alérgeno recombinante foi dialisado contra tampão contendo 10 mM de fosfato de sódio, pH 7,4. O espectro foi obtido em espectropolarímetro Jasco J-810 (Jasco Corp., Tóquio, Japão) utilizando cubeta de 1 mm de espessura. Cada espectro (intervalo de 0,5 nm) consistiu na média de 8 medições realizadas na taxa de 50 nm/min utilizando tempo de resposta de 8 segundos e largura da banda de 1 nm. A temperatura foi mantida constante (25°C). As estruturas secundárias da proteína recombinante foram estimadas pelo programa *CDNN Secondary Structure Analysis (Applied Photophysics Ltd)* confrontando os dados contra um banco de proteínas específicas (ANEXO1). Não foi possível comparar o perfil gerado pelo Dicroísmo Circular da proteína recombinante com a proteína nativa putativa presente no veneno de *L. intermedia*, pois ainda não foi possível o isolamento dessa toxina no veneno total.

#### 4.3.12 Animais

Para extração de veneno foram utilizadas aranhas adultas da espécie *Loxosceles intermedia* coletadas em Curitiba e Região Metropolitana e mantidas em condições apropriadas no Laboratório de Matriz Extracelular e Biotecnologia de Venenos da Universidade Federal do Paraná.

Para o ensaio piloto de permeabilidade vascular foram utilizados camundongos *Swiss* pesando entre 20 e 30g. Os animais foram fornecidos pelo Biotério do Setor de ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. A utilização dos animais foi aprovada pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da UFPR, sob o número de protocolo 553 (Em anexo).

#### 4.3.13 Extração do Veneno por Eletrochoque

O veneno *Loxosceles intermedia* foi obtido pela aplicação de eletrochoque de 15 V no cefalotórax da aranha e coleta do veneno liberado por micropipeta. Um *pool* do veneno de diferentes aranhas foi diluído com tampão PBS para uma concentração de 2 mg/mL e congelado a -20 °C até o uso (FEITOSA et. al, 1998).

#### 4.3.14 Ensaio piloto de permeabilidade vascular em camundongos

A metodologia empregada para verificar a capacidade do alérgeno de *L. intermedia* alterar a permeabilidade vascular foi adaptada do que consta na literatura (UDAKA et al., 1970 *apud* SADE et al., 2012). Azul de Evans diluído em solução salina foi administrada por via intravenosa (30mg/kg de camundongo) 5 minutos antes da aplicação das toxinas. O tampão salino (Controle negativo), o veneno total (Controle positivo) e as proteínas recombinantes Likp (Controle-Recombinante expressa em *Pichia pastoris*) e *Lox i 1* foram inoculados subcutaneamente (10ug) na região ventral lateral do camundongo. Após 30 minutos, os animais foram anestesiados e sacrificados. O tecido não foi seccionado e o corante extraído devido ao baixo número de amostragem, pois trata-se de um ensaio piloto, o que poderia superestimar ou subestimar a dosagem.

A proteína recombinante LiKp em um peptídeo agrupado como sendo da família das Notinas (ICK do inglês, *Inhibitor Cystine Knot*) (MATSUBARA et al., 2013). Esse peptídeo foi expresso em sistema eucariótico de expressão heterólogo *Pichia pastoris* X-33 na mesma condição que foi obtida o proteína *Lox i 1*. Trata-se de uma molécula não relacionada bioquimicamente com a proteína *Lox i 1* e que foi utilizada no ensaio piloto com a intenção de descartar qualquer artefato derivado da

purificação da proteína recombinante. A análise do ensaio foi feita qualitativamente e foram feitas duas repetições com  $n=2$ .

## 5 RESULTADOS

### 5.1 SISTEMA DE EXPRESSÃO EM *E. coli* BL21(DE3) pLysS

Segundo a nomenclatura usual para alérgenos preconizada por King em 1995 e Larsen em 1996 e adotada por WHO/IUIS como oficial, segue a normativa (KING *et al.*, 1995; LARSEN *et al.*, 1996): Três primeiras letras do gênero; Primeira letra que define a espécie; Numeral arábico. Como o objeto de estudo trata-se do gênero *Loxosceles sp*; espécie *Loxosceles intermedia* e não consta na literatura nenhum alérgeno descrito para a espécie *Loxosceles intermedia*. Logo, a nomenclatura utilizada, neste trabalho, a partir de agora para a proteína homóloga a alérgeno presente na glândula de veneno de *L. intermedia* é **Lox i 1**.

#### 5.1.1 Desenhos dos oligonucleotídeos com sítio de restrição

Com a construção contendo a proteína completa em vetor de clonagem pGEM-T, obtida em trabalhos anteriores (FERRER,2010), foi realizado o desenho de oligonucleotídeos no intuito de obter a subclonagem da proteína madura em vetor de expressão procariótico pET-20. As enzimas de restrição escolhidas foram XhoI e BamHI. O vetor de expressão pET-20b além de fusionar uma etiqueta de histidina (C-terminal) à proteína recombinante, possui a indução da expressão regulada pelo promotor forte T7. Abaixo estão demonstradas as sequências dos oligonucleotídeos iniciadores de *Lox i 1* madura para expressão em sistema procarioto *E. coli* BL21(DE3) pLysS o Forward *Loxi1* | BamHI mad: <ATGGATCCTGAATCTTGTCCGTCAC> e o Reverse *Loxi1* | XhoI mad: <ATCTCGAGACAGCTTCCGGATTT>. Sublinhados estão os sítios de reconhecimento para enzimas de restrição e em negrito contém as bases corretivas para a fase de leitura. Os oligonucleotídeos desenhados contem os sítios de restrição das enzimas precedidos de algumas bases para um melhor reconhecimento pela enzima de restrição. A Tm (*melting temperature*) dos iniciadores *forward* e *reverse* foram de 65,6 °C e 65,1 °C, respectivamente.

Utilizando os iniciadores acima citados na reação de amplificação, o tamanho da sequência nucleotídica obtida de *Lox i* madura demonstrou uma banda em torno

de 1000 pares de base (pb) em gel de agarose 1,5% (Figura 7). Na eletroforese, observa-se duas bandas presentes com massa superiores as do marcador utilizado correspondentes ao molde utilizado (construção obtida anteriormente em pGEM-T). Abaixo de 100pb é possível verificar um sinal disperso, que é referente aos reagentes não incorporados na reação de PCR.

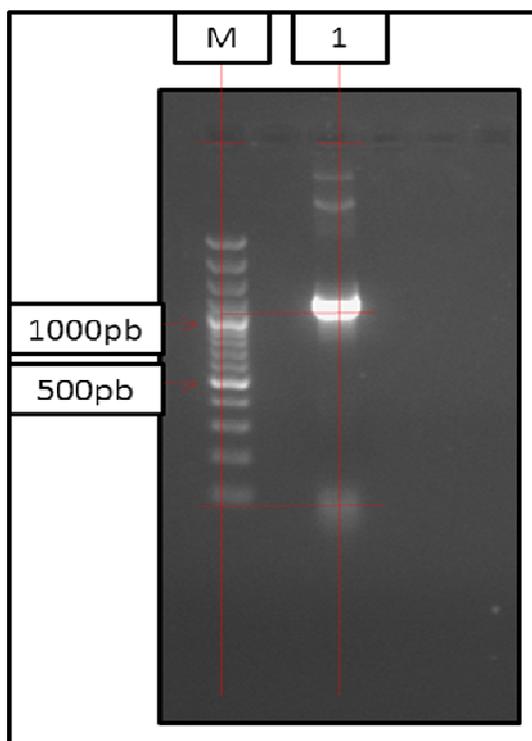


FIGURA7 - PCR DE MODIFICAÇÃO COM INICIADORES GENE-ESPECÍFICOS PARA *Lox i 1*. Subclonagem em pET-20b com iniciadores específicos para *Lox i 1*. M. Marcador de massa molecular; 1. Produto da reação de PCR. É possível observar na reação de amplificação um produto na altura de 1000 pares de bases, correspondente ao tamanho do inserto. Gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio.

### 5.1.3 Subclonagem em cepas de *E.coli DH5α* com a construção *Lox i 1/ pET-20b*

Após extração, purificação e digestão do inserto referente à sequência nucleotídica de *Lox i 1* de *L. intermedia*, foi feita a ligação no plasmídeo de expressão pET-20b. A construção foi inserida por eletroporação em cepa *E. coli DH5α*. Após o crescimento em LB ágar, foi realizado PCR de 25 colônias utilizando os iniciadores T7 *promoter* e o gene-específico *reverse* (Figura 8).

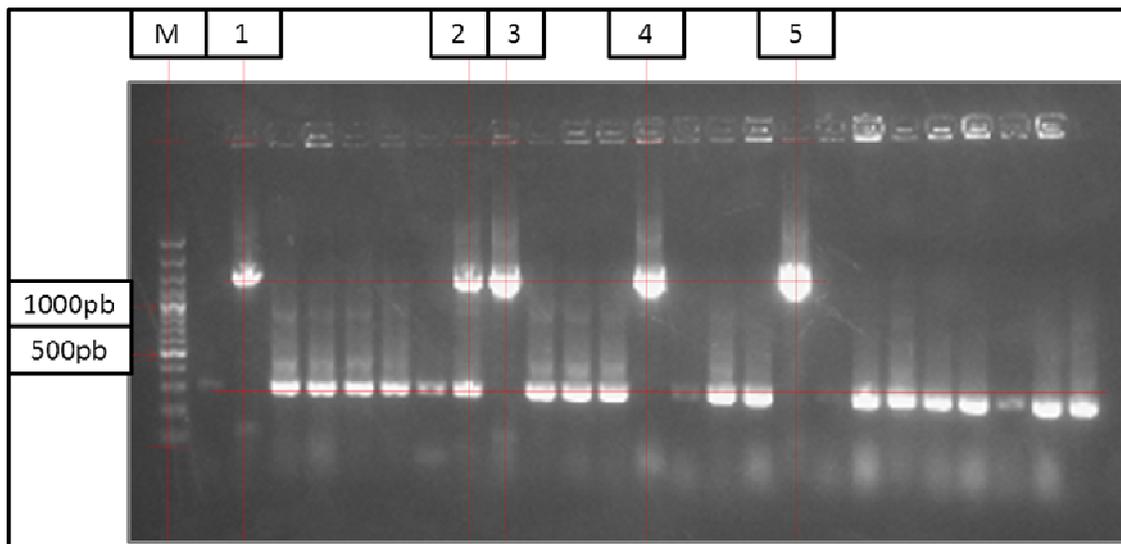


FIGURA 8- PCR DE COLÔNIA. PCR de colônia após transformação de bactérias DH5 $\alpha$  eletrocompetentes. Os números acima da figura indicam cinco clones que internalizaram a construção e apresentaram amplificação do inserto. À esquerda se encontra os tamanhos referentes ao marcador (M) de massa molecular. Gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio.

Conforme demonstrado na Figura 8 a amplificação do inserto ocorreu em 24 das colônias testadas. Nas reações de PCR de colônia em que ocorreu a amplificação, podem ser vistas 3 bandas. A maior, em torno de 1200 pares de base (pb), corresponde à amplificação do inserto e uma pequena porção do vetor, uma vez que o oligonucleotídeo *forward* (T7 *promoter*) anela com o plasmídeo. Logo abaixo, pode ser vista uma banda fraca na altura de 500 pb, possivelmente em razão de amplificação inespecífica, e outra abaixo de 100 pb, relativa ao iniciadores em excesso na reação (Figura 8).

#### 5.1.4 Teste de mini-indução de expressão de *Lox i 1* em *E. coli* BL21(DE3) pLysS

Após a confirmação da fidelidade da sequência por meio de sequenciamento um dos clones analisados foi submetido à purificação plasmidial (Miniprep) e posteriormente transformado em cepa de expressão *E. coli* BL21(DE3) pLysS.

Para obter as melhores condições de expressão da proteína recombinante inicialmente foram analisadas condições de expressão em volumes pequenos com o intuito de padronizar os melhores parâmetros. O teste de mini-expressão foi realizado sob as concentração de 0,1; 0,2; 0,4 e 1,0 mM de IPTG a 37°C. A análise

preditiva feita pelo programa *ProtParam* (Disponível em: <<http://web.expasy.org/protparam/>>) demonstrou que a molécula possui massa molecular calculada de 46 kDa e ponto isoeletrico de 8.4, portanto; para uma melhor visualização a análise do teste de mini-expressão foi feita em SDS-PAGE 10% (Figura 9). Quando analisamos a Figura 9 não é possível observar nenhuma banda crescente do tamanho estimado para *Lox i 1* nas condições analisadas. Como resultado, em nenhuma das condições de concentrações de indutor testadas foi obtida a expressão da proteína recombinante (Figura 9). A análise da fração solúvel e do sedimentado bacteriano (fração insolúvel) foi submetida a *Western Blotting* com o anticorpo anti-His no intuito de verificar se havia uma pequena fração de expressão, porém em nenhuma imunoreação realizada foi observado reconhecimento (dados não mostrados). Outros testes de expressão com *E. coli BL21(DE3) pLysS* a 30°C e também em cepas de *E. coli AD494* foram feitos porém foram obtidos o mesmo perfil de não expressão.

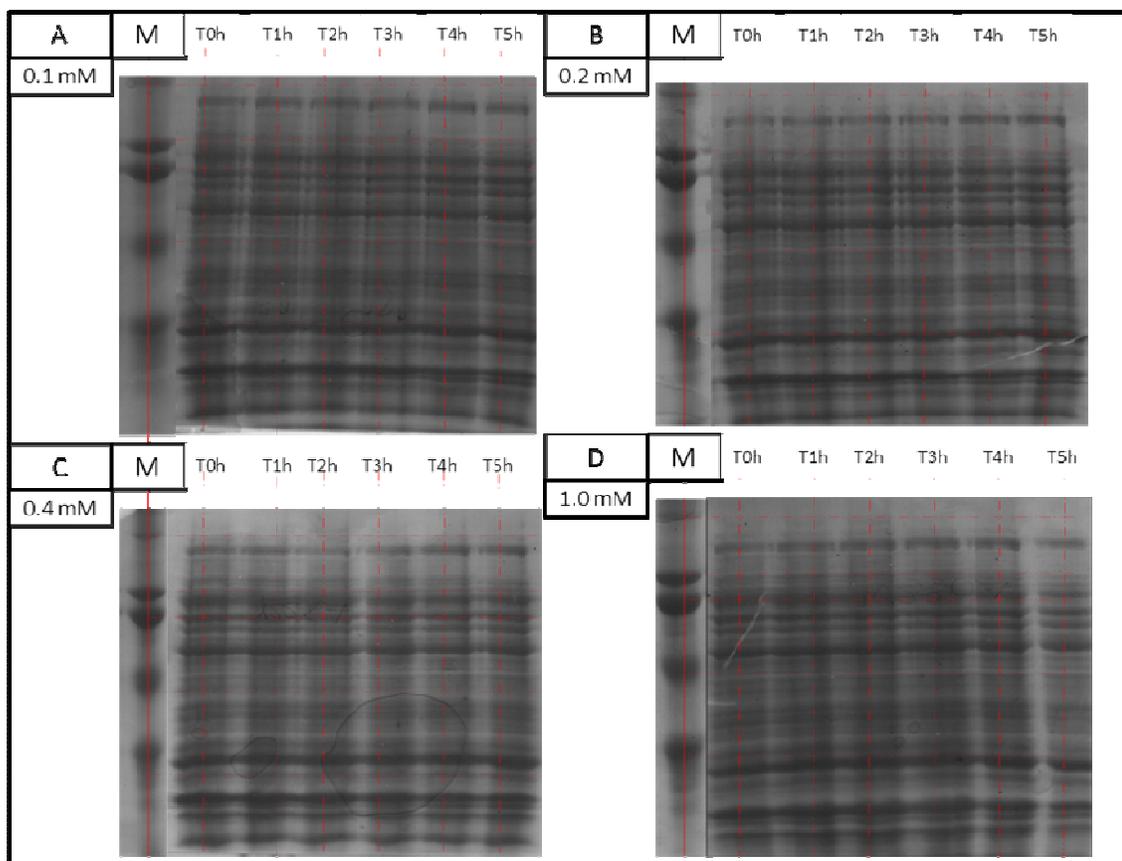


FIGURA 9- TESTE DE EXPRESSÃO de *Lox i 1*. Teste de indução para expressão da proteína *Lox i 1* recombinante. A proteína foi expressa a 37°C, em diferentes concentrações de IPTG (0,1; 0,2; 0,4; e 1,0 mM) e tempos (0; 1; 2; 3; 4 e 5 horas). Na figura, em cada gel, estão demarcados os tempos e a concentração de IPTG. Não foi possível observar a expressão da proteína recombinante. SDS-PAGE 10% em condições redutoras.

## 5.2 SISTEMA DE EXPRESSÃO EM *Pichia pastoris* X-33

### 5.2.1 Desenhos dos oligonucleotídeos com sítio de restrição

Com base nos resultados negativos obtidos em *E. coli* o objetivo foi realizar a expressão de *Lox i 1* em modelo eucariótico. Dois oligonucleotídeos específicos foram desenhados para a clonagem direcional de *Lox i 1* madura em vetor de expressão em *Pichia pastoris*.

Foram desenhados dois oligonucleotídeos para a sequência nucleotídica sem o sinal de endereçamento. Oligonucleotídeos iniciadores *Lox i 1* madura Forward *Loxi1* Clal mad <GAATCGATGGAATCTTGTCGGTCAC> e Reverse *Loxi1* XbaI <AATCT AGACCCACAGCT TCCGGATTTTAC>. Sublinhados estão os sítios de

reconhecimento para enzimas de restrição e em negrito contém as bases corretivas para a fase de leitura. As enzimas XbaI e ClaI foram escolhidas para clonagem em vetor de expressão pPICZαC.

A reação de PCR utilizando os oligonucleotídeos contendo os sítios de restrição XbaI e ClaI foi feita analisada conforme item 4.3.1.

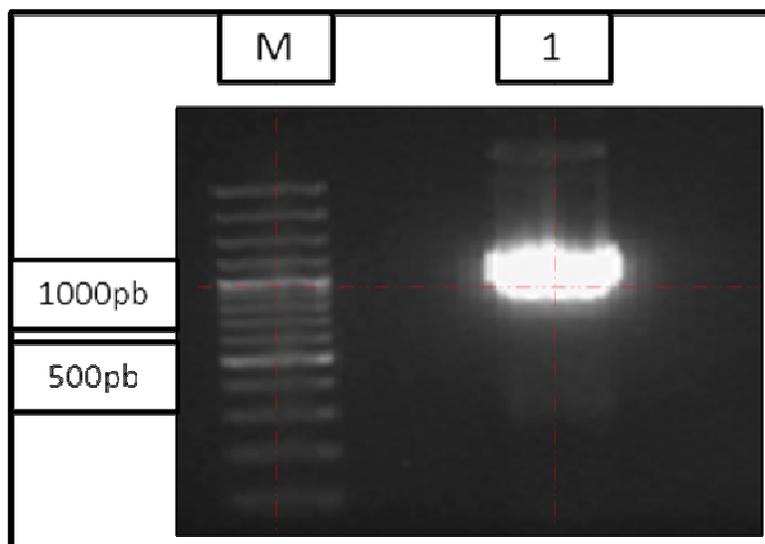


FIGURA 10 – ANÁLISE DO PRODUTO DE PCR COM OLIGONUCLEOTÍDEOS ESPECÍFICOS PARA *Lox i 1* MADURO. No gel observa-se uma banda forte e bem delineada na altura de aproximadamente 1000pb. Gel de agarose 1% com Brometo de Etídeo

O resultado da reação de amplificação por PCR foi avaliado em gel de agarose 1% com brometo de etídio (Figura 10). O gel de agarose demonstra o marcador de massa molecular e o produto da reação de PCR. Na reação ocorreu a amplificação de uma banda de aproximadamente 1000 pb, correspondente ao tamanho esperado da sequência nucleotídica de *Lox i 1*, sem o peptídeo sinal. Um pouco acima do marcador de massa molecular, no poço correspondente ao produto reação de PCR, pode ser vista uma banda menos intensa, provavelmente resultado de uma amplificação inespecífica, uma vez que pode ocorrer um anelamento do oligonucleotídeo com regiões do vetor (FIGURA 10).

### 5.2.2 Subclonagem da sequência nucleotídica de *Lox i 1* maduro

Após a gel-extração, purificação e digestão das extremidades do produto de PCR e do plasmídeo pPICZαC pelas enzimas adequadas a ligação foi realizada e transformada por eletroporação em cepas de *E. coli* TOP10 F'. Para verificação dos clones transformantes foi realizada um PCR de colônia com os iniciadores do vetor pPICZαC que flanqueiam os sítios de clonagem. Como resultado foi observado a presença de cinco clones positivos (Figura 11), evidenciando sucesso na ligação e na transformação das cepas de *E. coli*. TOP10 F'.

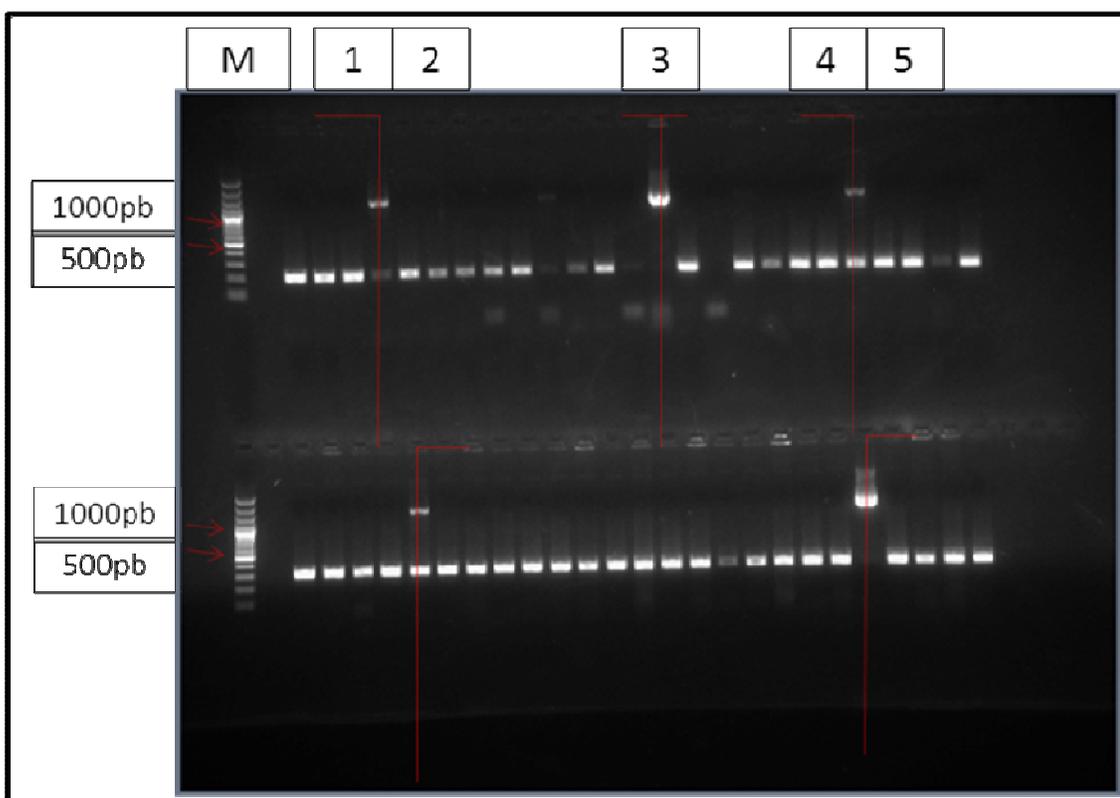


FIGURA 11– ANÁLISE DA TRANSFORMAÇÃO DA CONSTRUÇÃO *Lox i 1/pPICZαC* POR PCR DE COLÔNIA. Gel de agarose 1,5% com Brometo de Etídeo, observam-se bandas na altura de aproximadamente 1000pb correspondentes ao clones positivos.

Constatada a ligação e êxito na transformação de *E. coli* TOP 10 F' (Figura 11), foi realizado PCR de sequenciamento para confirmação da fase de leitura da construção. O sequenciamento da construção possibilita verificar se o inserto foi inserido no quadro correto de leitura, além de ser possível identificar possíveis

trocas de bases que eventualmente possam ter ocorrido nas reações de PCR a partir da construção pGEM-T/ *Lox i 1*, obtida por FERRER (2010).

### 5.2.3 Análise dos sequenciamentos de *Lox i 1* madura

A construção foi preparada e submetida ao PCR de sequenciamento e obtida em sequenciador *BD applied biosystems 3500* e analisada no programa *fourpeaks*.

Embora a clonagem do produto de PCR de *Lox i 1* tenha sido direcional e levado em conta a adição de bases para a correção fase de leitura da proteína, o sequenciamento serve para verificar sua integridade. A sequência nucleotídica obtida foi classificada como pertencente da família CAP (do inglês, cysteine-rich secretory proteins (CRISPS), antigen 5 (Ag5), and pathogenesis-related1) segundo o programa *ProtParam* (Figura 12) conforme Ferrer (2010) descreve. A sequência nucleotídica obtida em 2010 foi tomada como referência para verificar se havia ocorrido alguma mutação, porém nenhuma alteração foi encontrada. Na figura 12 é possível verificar o peptídeo sinal, a sequência nucleotídica clonada. Em destaque (Figura 12, em vermelho) é possível observar a ampla distribuição dos resíduos de cisteína na sequência aminoacídica referente à *Lox i 1* madura e nas extremidades a região de alinhamento do iniciadores com os sítios de restrição para *Clal* e *Xbal* (Figura 12, flechas). A estratégia escolhida de clonagem da proteína madura, sem peptídeo sinal, deve-se ao fato de o vetor utilizado (pPICZαC) possuir um peptídeo sinal reconhecido por leveduras e que será o responsável por sinalizar a secreção da *Lox i 1* recombinante.

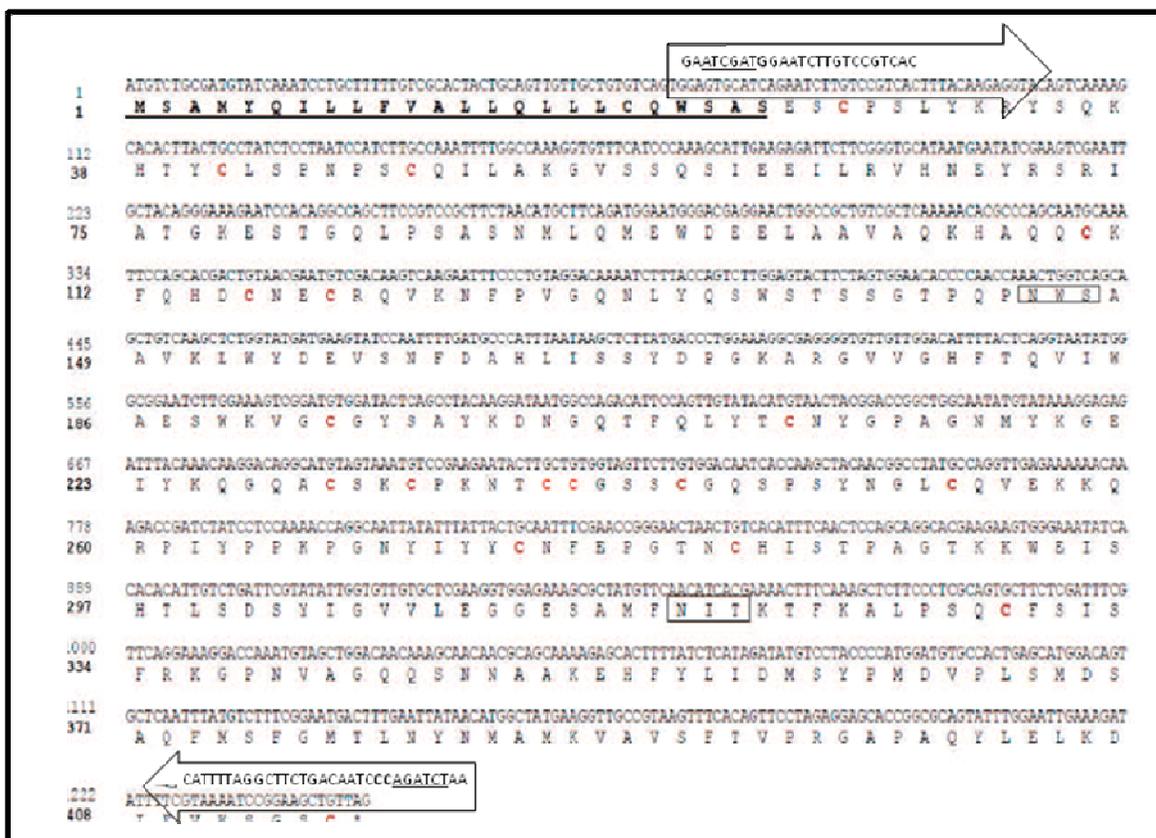


FIGURA 12 - ANÁLISE DA SEQUÊNCIA NUCLEOTÍDICA DO ALÉRGENO Lox i 1. Sequência nucleotídica de Lox i 1 com oligonucleotídeos para pPICZαC. As sequências das obtidas pelo sequenciamento foram identificadas pelo software de alinhamento BLAST como pertencente a superfamília SCP e agrupadas na família CAP de proteínas secretórias ricas em cisteínas pelo banco de proteínas *ProtParam*. Aminoácidos sublinhados compreendem o peptídeo sinal, identificado com auxílio da ferramenta *SignalP*. em vermelho está destacados as cisteínas nos retângulos possíveis sítios de N-glicosilação. Nas setas, as regiões onde os iniciadores anelam.

#### 5.2.4 Expressão em pequena escala *Pichia pastoris* X-33

Após a subclonagem do cDNA referente ao alérgeno no vetor pPICZαC e a transformação em cepa de *P. pastoris* X-33 foram selecionadas 10 colônias crescidas sob alta concentração de Zeocina (500µg/mL) com o intuito de verificar a presença de clones que obtenham multicópias do cassete recombinante contendo a sequência nucleotídica de *Lox i 1*.

A expressão da enzima recombinante foi induzida pela adição de metanol em meio base BMMY (100mL) por 72h o sobrenadante da cultura contendo as proteínas secretadas foi precipitado com sulfato de amônio e a proteína Lox i 1 foi purificada utilizando cromatografia de afinidade Ni-NTA agarose. Após a precipitação, para concentrar as proteínas do sobrenadante, foi feita uma análise por eletroforese em

gel de poliacrilamida 10% (SDS-PAGE) (Figura 13 – Colunas 1 e 2) e *Western Blotting* (WB) com anti-6xHis (Sigma-Aldrich) (Figura 13 – Colunas 3 e 4). Em SDS-PAGE, corado com Azul de Coomase, não foi possível visualizar a expressão da proteína *Lox i1* recombinante (Figura 13, colunas 1 e 2) assim como após a purificação em Ni-NTA agarose. Já pela análise feita por WB, pode-se observar na fração não ligante (Void) (Figura 13 - Coluna 3) a presença de duas bandas difusas da forma recombinante esperada (aproximadamente 46kDa) e provavelmente uma forma dimerizada resistente a redução utilizada no preparo das amostras (Figura 13 - Coluna 3, seta).

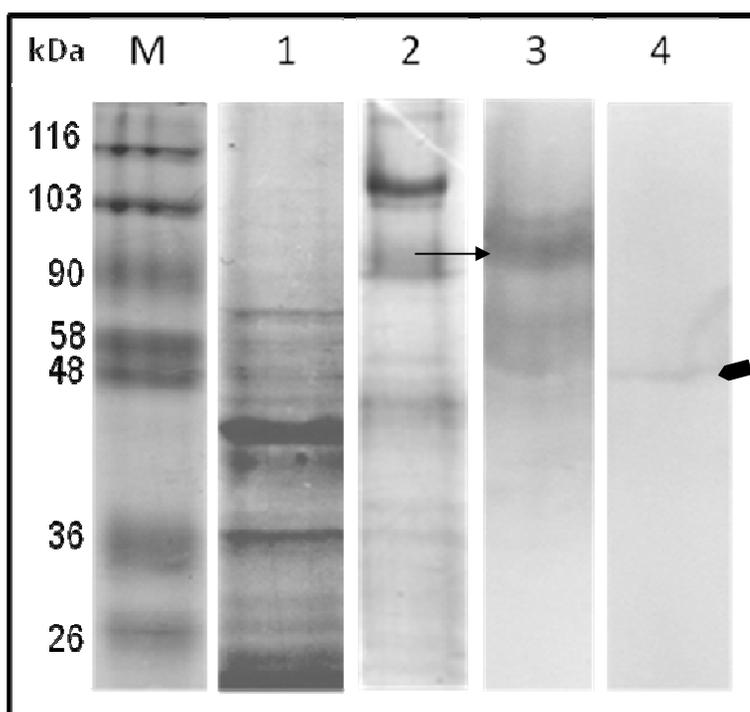


FIGURA 13 - EXPRESSAO EM PEQUENA ESCALA DE *Lox i1*. A construção obtida foi transformada em *Pichia pastoris* X-33. O teste de expressão em pequena escala foi feito com 1% de metanol a 30°C. **1.** SDS-PAGE. Meio de cultura após a precipitação com sulfato de amônio (saturação 80%). **2.** SDS PAGE. Fração não ligante da resina Ni-NTA (Void). **3.** *Western Blotting* anti-hexa-histidina da fração não ligante da resina NI-NTA. **4.** *Western Blotting* anti-hexa-histidina da recombinante *Lox i1* purificada enriquecida em dispositivo de filtro (Amicon 30 kDa).

Na fração purificada da mini-expressão foi observado uma banda na altura de 48 kDa condizente com a massa molecular predita para a *Lox i1* recombinante, comprovando que o teste de expressão foi efetivo (Figura 13 - Coluna 4, cabeça de seta). Devido ao pequeno volume e baixo rendimento de expressão nos testes em

escala reduzida (100 ml) somente foi possível observar a expressão por WB (Figura 13 - Coluna 4, cabeça de seta). Porém, o objetivo de detectar o melhor clone para dar seguimento as expressões em maiores volumes foi alcançado.

#### 5.2.5 Expressão de *Lox i 1* recombinante em *Pichia pastoris* X-33

Posteriormente, foi realizado a indução da expressão por 72 horas com metanol em maior escala (meio BMMY - 2000ml). Após o tempo de expressão a cultura foi centrifugada e o meio de cultura precipitado com sulfato de amônio (saturação com 80%) (Figura 14- coluna 1). A precipitação foi ressuspensa e dialisada contra *native buffer* e purificada por cromatografia de afinidade em resina NI-NTA. Por meio de SDS-PAGE 10%, podemos verificar a presença de uma única banda na altura de aproximadamente 40 kDa (Figura 14- Coluna 4). Do mesmo modo, podemos verificar na análise por Western blotting (anti-6xHis) a imunomarcção em altura semelhante.

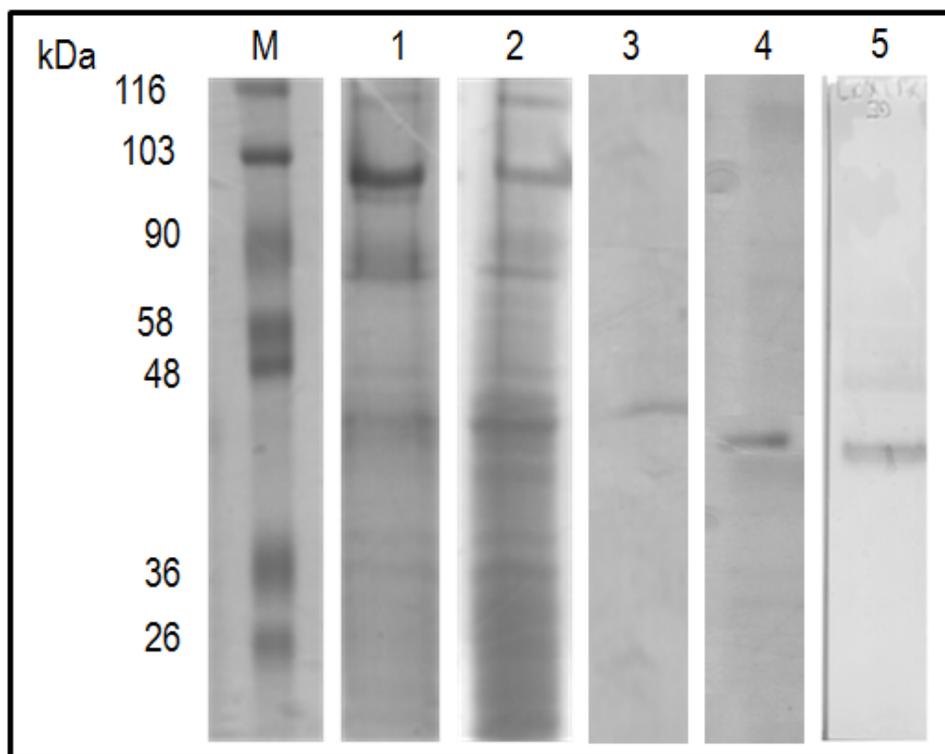


FIGURA 14 – EXPRESSAO EM MAIOR VOLUME DE *Lox i 1* em *Pichia pastoris* X-33. O teste de expressão em larga escala foi feito com 1.0% de metanol a 30°C. **1.** SDS PAGE. Meio de cultura precipitado após 72horas de expressão. **2.** SDS PAGE.VOID. **3.** Amostra purificada em SDS-PAGE em condições não redutoras. **4.** *Lox i 1* purificado e enriquecido em amicon 30 kDa. **5.** *Western Blotting* antiHIStag com *Lox i 1* purificado em amicon 30 kDa.

Como pode ser observado na Figura 14, a obtenção de *Lox i 1* demonstrou um baixo rendimento. Foram purificados a partir de 2 Litros da fração solúvel do meio de cultura 100µg de proteína purificada. Será importante verificar melhores condições como as citadas anteriormente para se obter maiores quantidades de alérgeno para dar continuidade dos objetivos anteriormente propostos.

#### 5.2.6 Análise do modelo tridimensional de *Lox i 1* por ferramentas de bioinformática

Inicialmente, FERRER (2010), observou que a sequência nucleotídica *Lox i 1* possuía identidade com alérgenos de diversas espécies de artrópodes. Dentre as identidades aminoacídica analisadas as que apresentaram maior identidade aminoacídica (positividade) foram os alérgenos de espécies de formiga (*Pachycondyla chinensis* e *Solenopsis invicta*) e piolho (*Pediculus humanus corporis*). Devido a isso, na predição da estrutura tridimensional feita pelo programa *SwissModel*, foi eleito como modelo o cristal alérgeno *Sol i 3*, de *Solenopsis invicta*, com resolução de 3.05 Å, do (PADAVATTAN *et al.*, 2008). O cristal do alérgeno *Sol i 3* demonstrou o menor *E-value* (aproximadamente 5.6).

A estrutura tridimensional preditiva apresenta uma distribuição homogênea de estrutura  $\alpha$  hélices e folhas  $\beta$ , assim como a presença de estruturas do tipo *coil* cuja conformação não foi predita com elevado grau de confiabilidade (Figura 15- A/B/C). Embora seja classificada como uma proteína pertencente ao grupo CAP de proteínas ricas em cisteínas, a única predição de ponte dissulfeto com grau de confiabilidade, segundo o programa *Deepview.pdb*, é observada em uma fenda coordenando a interação entre duas estruturas folha- $\beta$  (Figura 15- D).

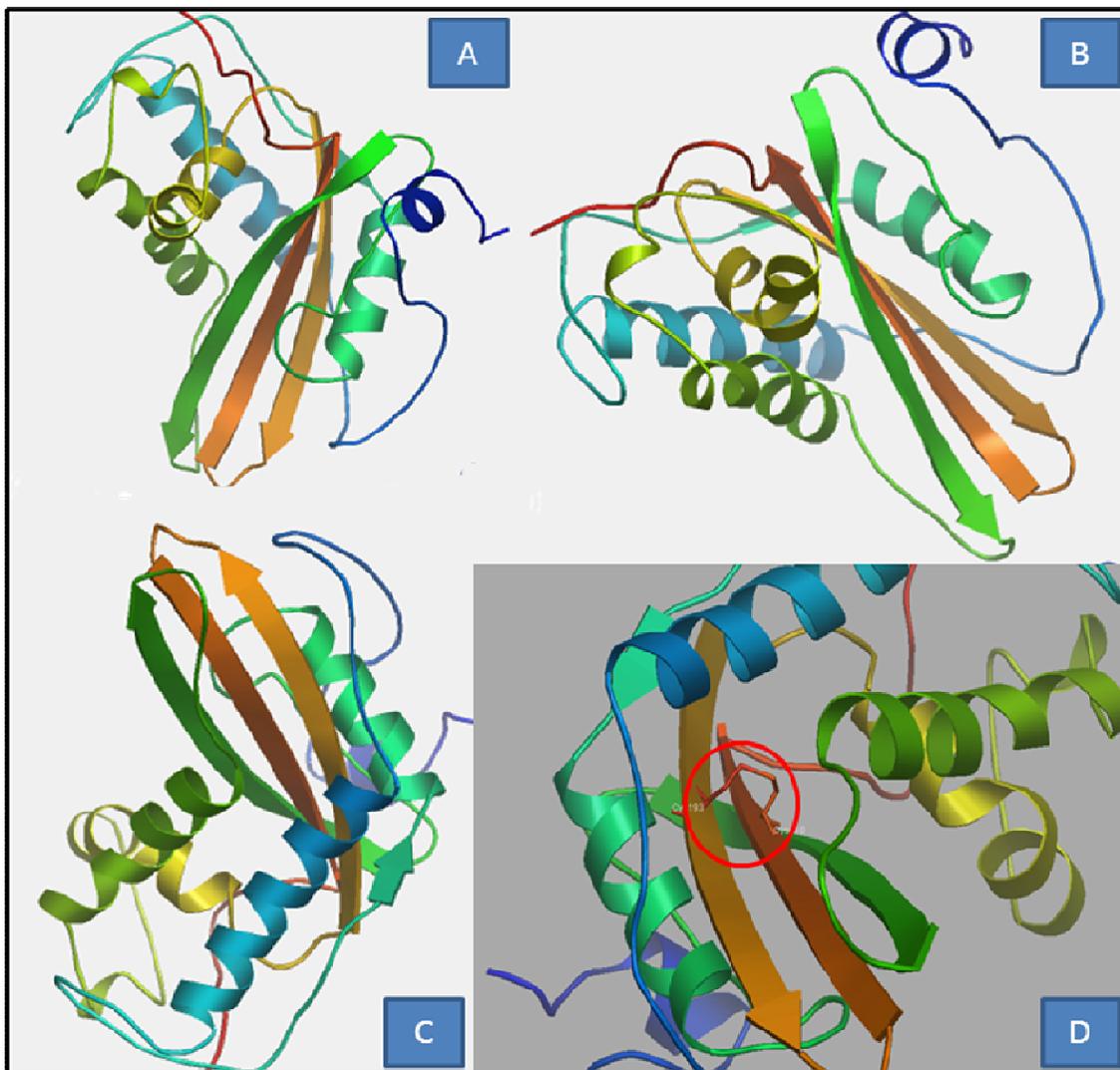


FIGURA 15 - ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL PREDITIVA DO ALÉRGENO *Lox i 1*. Em A, B e C é demonstrada a estrutura predita em fitas de *Lox i 1* em diferentes ângulos. Essa foi a estrutura que obteve os melhores parâmetros de validação utilizando como modelo o cristal do alérgeno *Sol i 3* (*S. invicta*). Em D, o detalhe da interação do tipo ponte dissulfeto entre folhas- $\beta$ .

Inicialmente como resultado dessa análise, o alinhamento da sequência aminoacídica entre *Lox i 1* e *Sol i 3* apresenta uma região conservada de vários aminoácidos que se apresentam de forma não sequencial. Tendo isso como parâmetro, foi construída a estrutura tridimensional do alérgeno *Lox i 1*, desta vez utilizando o programa *Deep View.pdb*, onde em detalhe é possível verificar proximidade das regiões conservadas observadas no alinhamento (Figura 16-acima).



programa (Figura 15/16). Isso sugere que essa região possa ser importante para o reconhecimento, uma vez que ambos os alérgenos apresentam essa conservação na sequência de aminoácidos (Figura 16 - em vermelho).

### 5.2.7 Dicroísmo Circular (DC)

Com o objetivo de analisar a estrutura e a conformação correta da proteína recombinante *Lox i 1* obtida em *Pichia pastoris*, foi realizado o espectro de Dicroísmo Circular (DC). O Espectro de DC foi coletado na região de 190-260 nm. A análise de deconvolução foi obtida utilizando o programa *CDNN Secondary Structure Analysis*. A proteína recombinante foi submetida ao procedimento descrito no item 4.3.11. A deconvolução dos dados da proteína recombinante *Lox i 1* mostrou uma distribuição significativa na fração de  $\alpha$ -hélice (16%) e no conteúdo de folha- $\beta$  (19%) (Tabela 4). Assim foi obtido o perfil do espectro do Dicroísmo Circular de *Lox i 1* recombinante (Figura 17).

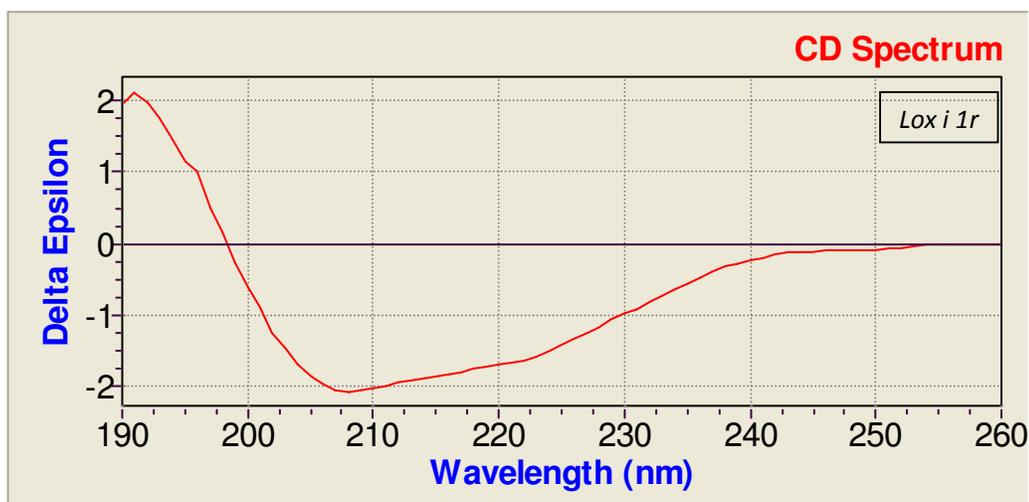


FIGURA 17 - ESPECTRO DE DICROÍSMO CIRCULAR *Lox i 1* RECOMBINANTE. O espectro foi obtido utilizando a proteína em tampão contendo 10 mM de fosfato de sódio, pH 7,4, à 25°C. A estimativa da estrutura secundária foi realizada utilizando o programa *CDNN Secondary Structure Analysis*.

TABELA 4 - CONTEÚDOS DE ESTRUTURA SECUNDÁRIA DE *Lox i 1*

	180-260 nm	185-260 nm	190-260 nm	195-260 nm	200-260 nm	205-260 nm	210-260 nm
<b>Helix</b>	n.d.	n.d.	16,90%	16,50%	16,10%	16,20%	15,90%
<b>Antiparalel</b>	n.d.	n.d.	28,90%	29,40%	29,90%	29,90%	30,10%
<b>Paralel</b>	n.d.	n.d.	5,10%	5,50%	5,50%	5,50%	5,40%
<b>Beta-Turn</b>	n.d.	n.d.	19,70%	19,80%	20,00%	20,10%	20,00%
<b>Rndm. Coil</b>	n.d.	n.d.	32,70%	33,40%	34,90%	34,80%	34,50%
<b>Total Sum</b>	-	-	103,30%	104,60%	106,40%	106,60%	106,10%

### 5.2.8 Ensaio de Permeabilidade Vascular

Após verificar por análise de dicroísmo circular que a proteína *Lox i 1* encontrava-se solúvel e com estruturas secundárias estabelecidas, o próximo passo foi avaliar a atividade biológica de *Lox i 1*, por um método que exigisse quantidades pequenas de proteína. Desse modo, surgiu a intenção de avaliar por um ensaio piloto de permeabilidade vascular se a proteína *Lox i 1* apresentava essa capacidade de participar do processos iniciais da inflamação.

As alterações na permeabilidade vascular de camundongos *Swiss* foram avaliadas através da visualização extravasamento de corante Azul de Evans no compartimento extravascular da pele (Figura 18). Uma diluição do corante em solução de PBS (30 mg/kg de camundongo) foi injetado por via intravenosa antes da injeção subcutânea das amostras de *Lox i 1* (massa de 10 µg/camundongo). Foram utilizados como controles: veneno total de *L. intermedia* (controle positivo); PBS (controle negativo) e Likp recombinante (controle negativo de recombinante expressa em *Pichia pastoris*) (Figura 18).

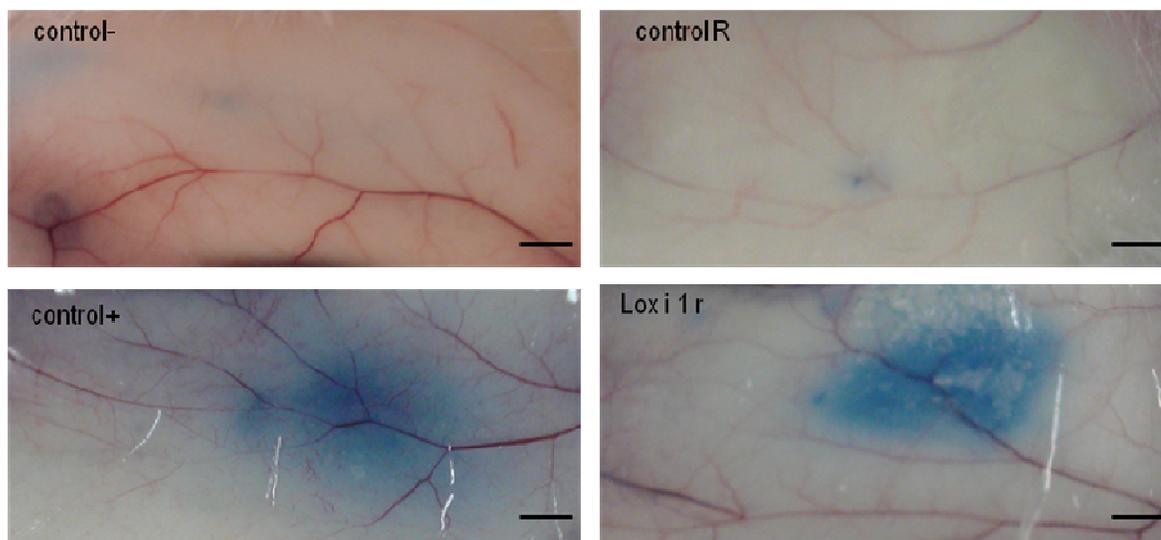


FIGURA 18 – ENSAIO DE PERMEABILIDADE VASCULAR EM CAMUNDOGOS Swiss. Capacidade da proteína recombinante *Lox i 1* alterar a permeabilidade vascular de camundongos. Como controles foram utilizados veneno total de *L. intermedia* (+), PBS (-) e LiKp recombinante (Recombinante-expressa em *Pichia pastoris* não relacionada com inflamação). A proteína *Lox i 1*, o veneno de *L. intermedia* e a recombinante LiKp foram utilizados na massa de 10 $\mu$ g (n=2).

Em comparação aos controles observa-se que a proteína recombinante *Lox i 1* foi capaz de alterar a permeabilidade vascular de camundongos *Swiss* na massa utilizada. Observa-se que o veneno também foi capaz de aumentar a permeabilidade vascular dos vasos. O veneno foi utilizado como controle positivo nesse ensaio por já ter sido avaliado sua capacidade de alterar a permeabilidade vascular em camundongos (da SILVEIRA *et al.*, 2006). Verifica-se, que tanto o controle negativo (PBS) quanto o controle recombinante LiKp não apresentam nenhum extravasamento do corante Azul de Evans. Isso demonstra que a alteração da permeabilidade observada não foi causada pela aplicação das amostras e sim por uma capacidade inerente da molécula analisada (Figura 18- *Lox i r*).

## 6 DISCUSSÃO

Durante os últimos anos têm crescido o número de estudos de expressão e resolução de estruturas tridimensionais de alérgenos presentes em venenos (ARLIAN, 2002; HOFFMAN, 2008). Esses estudos têm nos ajudado a entender os mecanismos moleculares de reações de hipersensibilidade, bem como, compreender a conservação entre os grupos presentes nas mais diversas fontes de alérgenos. Os alérgenos presentes nos venenos de aranhas são muito pouco estudados, e assim como os alérgenos da ordem himenóptera, que inclui espécies de vespas, formigas e abelhas, possuem um grande potencial biotecnológico e terapêutico.

Quanto aos eventos de hipersensibilidade desencadeados após o acidente loxoscélico, muito ainda deve ser investigado. A produção de uma isoforma recombinante de uma proteína homóloga a alérgenos presente na glândula de veneno de *L. intermedia* fornece uma bioferramenta para uma melhor elucidação desses eventos pouco conhecidos no loxoscelismo.

Embora algumas toxinas já descritas e caracterizadas no veneno de *L. intermedia* participem dos eventos de hipersensibilidade como liberação de histamina (PALUDO *et al.*, 2009; SADE *et al.*, 2012). Essa dissertação representa o primeiro trabalho no qual foi realizado a expressão, purificação e caracterização parcial de uma proteína homóloga a alérgeno presente na glândula de veneno de *L. intermedia*. Esse trabalho consiste na continuação dos resultados obtidos por Ferrer (2010) e traz à luz a discussão do que sugere ser o primeiro, potencial, alérgeno descrito para o veneno dessas aranhas.

Como se trata dos primeiros resultados que descreve a primeira expressão heteróloga de uma proteína homóloga a alérgeno presente na glândula produtora de veneno de *L. intermedia* foi utilizada a denominação segundo a nomenclatura oficial: *Lox i 1*. Pelo fato de toda a caracterização ter sido feita com a isoforma recombinante, tomamos a liberdade de dispensar o uso do sufixo “r” para diferenciar a isoforma recombinante da nativa.

Para obter a expressão do alérgeno de *L. intermedia* foi escolhido inicialmente o sistema mais simples de expressão, o bacteriano, pois é um sistema relativamente simples de se trabalhar quando comparado aos sistemas eucarióticos (SOLDATOVA *et al.*, 1998; TEO *et al.*, 2006). Visto que o alérgeno apresenta prováveis sítios de N-

glicosilação e é sabido que estes carboidratos possivelmente ajudem no dobramento proteico, ou, até mesmo no reconhecimento de epítomos por IgE's, tinha-se consciência que a escolha do sistema procariótico poderia comprometer a solubilidade e atividade biológica dessa proteína. Em contrapartida, alérgenos de outras espécies expressos em sistema procariótico apresentaram ligação à IgEs de soro de pacientes (DUDLER *et al.*, 1992, SOLDATOVA *et al.*, 1998; VARASTEJ *et al.*, 2009; BORGES *et al.*, 2009). Algumas dessas moléculas alergênicas obtidas em sistemas procarióticos após a purificação foram submetidas a processos de renaturação *in vivo*. O alérgeno *Api m 1* (PLA2) da abelha *A. mellifera* que foi obtido em *E. coli strain X-Blue* e após ser redobrado *in vitro* teve seu reconhecimento por IgE positivo (RAST) com o soro de pacientes sensíveis a apídeos (DUDLER *et al.*, 1992). Outro exemplo de sucesso do uso do sistema de expressão em procarioto foi feito por Mittermann e seus colaboradores (2010). Os alérgenos recombinantes de abelha e vespa, expressos em *E. coli* (*rApi m 2*, e *rVes v 5*) foram utilizados em testes de diagnóstico de alergia e apresentaram uma melhoria no diagnóstico baseado-IgE para sensibilidade alérgica para abelha e vespa quando comparado ao uso de extratos purificados. Corroborando com estes dados, outras toxinas do veneno de *L. intermedia* foram expressas em sistema procariótico pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Matriz Extracelular e Biotecnologia de Venenos de forma ativa e modelos de expressão procarióticos ou renaturadas *in vitro* (da SILVEIRA *et al.*, 2006, 2007; APPEL *et al.*, 2007; FERRER *et al.*, 2012).

Outro motivo pelo qual foi optado trabalhar inicialmente com o sistema de expressão procariótico foi visando à produção de anticorpos policlonais. Pois, mesmo que a obtenção da proteína recombinante produzida em modelo de expressão procariótico fosse obtida em sua forma desnaturada e em corpos de inclusão, o que é comum, a produção de anticorpos policlonais produzidos a partir de proteínas recombinantes desnaturadas poderia manter o reconhecimento de epítomos lineares (HARLOW & LANE, 1998). A produção dos anticorpos policlonais, pode vir a ser uma importante bioferramenta para a compreensão dos mecanismos do loxoscelismo (SENFF-RIBEIRO *et al.*, 2008), assim como detectar a molécula de interesse no veneno total. Essa metodologia é utilizada amplamente em estudos de toxilogia. Um exemplo disso são estudos de toxilogia das espécies *Loxocles laeta* e *Loxosceles gaucho* relatado por Barbaro e colaboradores em 1996 e 2005 e por Trevisan-Silva e seus colaboradores em 2009 os quais demonstram a

importância dessa bioferramenta. Esses trabalhos demonstraram a capacidade de reação cruzada entre diferentes venenos loxoscélicos, demonstrando a conservação de epítomos entre os venenos utilizando como ferramenta soro policlonal.

Quanto ao modelo procariótico de escolha lançou-se mão da cepa *E. coli* BL21(DE3) pLysS. Trata-se de uma cepa bacteriana relativamente simples, porém, que possui o possui DE3 *lysogen* que codifica a produção de T7 *RNA polimerase* que possui afinidade pelo promotor t7 de bacteriófago lambda, o que permite um melhor controle da indução da expressão. Assim como possui o plasmídeo pLysS (4886 *pb*), que expressa constitutivamente baixos níveis de lisozima T7, reduzindo a expressão basal de genes recombinantes, inibindo os níveis basais de T7 RNA polimerase, esse mecanismo age como um repressor de expressão basal (INVITROGEN). Após a purificação plasmidial e transformação em *E. coli* BL21(DE3) pLysS, com o objetivo de obter a enzima recombinante, deu-se início para os testes de expressão em pequena escala.

No teste de mini-expressão utilizando o modelo procarioto foi possível observar que não houve a produção da proteína recombinante *Lox i 1*. Em nenhuma das condições analisadas (0,1; 0,2; 0,4 e 1,0 mM de IPTG) verifica-se a expressão de *Lox i 1* (Figura 9). Essa ausência de expressão pode ser devido a inúmeras situações como, existência de códons raros de *E. coli*, necessidade de modificações pós-traducionais como o dobramento auxiliado por chaperonas e a glicosilação a nível de complexo de golgi. Como analisado por FERRER (2010), a predição da sequência do alérgeno de *L. intermedia* foi agrupado como pertencente da família CAP de proteínas secretadas ricas em cisteínas (CRiSP) (GIBBS *et al.*, 2008). Essa família de proteínas é composta por uma série de moléculas secretadas (i.e. Antígeno 5), cujas quais, necessitam de modificações pós-traducionais realizadas no Retículo Endoplasmático e Complexo de Golgi (CG) (GIBBS *et al.*, 2008; MILNE *et al.*, 2003). Como procariotos não possuem um sistema de secreção via CG, a produção de uma proteína desse tipo pode ser abortada logo no início devido ao acúmulo de formas mal enoveladas em corpos de inclusão no citoplasma bacteriano. Porém, pouco pode se afirmar já que nem mesmo a presença de corpos de inclusão foi observada na fração insolúvel, assim como também, não foi possível observar a produção da recombinante na expressão em *E. coli* AD494.

Frente a isso, concomitante aos resultados insatisfatórios obtidos no sistema de expressão procarioto, optou-se por iniciar a subclonagem da sequência

nucleotídica de *Lox i 1* em vetor próprio para expressão em *Pichia pastoris*. O sistema de expressão em leveduras é um sistema útil para a expressão de alto rendimento fornecendo grandes quantidades de proteínas para a pesquisa laboratorial básica e fabricação industrial. Os parâmetros de arejamento, pH e taxa de alimentação de fonte de carbono, podem facilmente ser controlados quando em comparação com células de mamíferos (CEREGHINO *et al.*, 2000; HIGGINS *et al.*, 2001; MACAULEY *et al.*, 2005; SPADIUT *et al.*, 2010; MATTANOVICH *et al.*, 2012; MOKDAD-GARGOURI *et al.*, 2012). Como as instalações e estruturas disponíveis para o projeto ainda não possibilitam a utilização de um sistema efetivo de expressão em células de insetos, por exemplo, a expressão em levedura mostrou ser uma alternativa que poderia trazer bons resultados.

Portanto, deu-se início aos processos de clonagem em cepa *E. coli* TOP10F', utilizada como uma etapa anterior a clonagem homóloga em *Pichia pastoris*, pois permite a clonagem no vetor específico para expressão em levedura (vetores pPICZ) de uma maneira rápida e flexível que somente o sistema procarioto permite.

O vetor pPICZ $\alpha$ C, escolhido para a expressão de *Lox i 1* em *Pichia pastoris*, funde na região amino-terminal um peptídeo sinalizador de secreção em levedura (Fator- $\alpha$  de *Saccharomyces cerevisiae*), que induz a secreção do produto recombinante. Por esse motivo somente a construção contendo a sequência nucleotídica madura foi escolhida para clonagem e expressão em modelo eucariótico. Desse modo tendo essa construção teria somente um sinal de peptídeos hidrofóbicos (proveniente do vetor de expressão) que ao ser expresso seria processado endereçando a proteína recombinante para a via biossintética de secreção.

A transformação em cepas de *Pichia pastoris* pode originar dois fenótipos devido ao tipo de inserção gênica nos cromossomos durante a recombinação nos genes AOX1 e AOX2. Esses fenótipos são denominados Mut+ e MutS, e resultam em um aumento ou diminuição significativo na produção de proteínas recombinantes devido a preservação ou o rompimento do gene AOX1, respectivamente (CEREGHINO, 2000).

Sugere-se que pelo fato da cepa de escolha ser a cepa X-33 ser a mais próxima da cepa selvagem, a inserção gênica tende a gerar quase 90% de fenótipos Mut+ (CEREGHINO, 2000). Os clones obtidos após a transformação foram transferidos para placa YPD contendo 500 $\mu$ g de Zeocina com o intuito de selecionar

clones que continham multicópias. Isso pode ocorrer, pois a integração da construção recombinante no genoma da levedura pode carrear diversas cópias do gene recombinante de forma sequencial, o que permite obter maiores quantidade da proteína recombinante. Como o gene de resistência a Zeocina participa do cassete recombinante é possível selecionar esses clones por meio de uma suplementação de antibiótico superior ao comum (5x).

Após a seleção dos clones foi necessário uma seleção de clones para a expressão em pequena escala, com o intuito de verificar não somente a expressão da proteína recombinante, mas também a sua secreção para o meio extracelular, sua solubilidade, dimerização e padrão de glicosilação. Portanto, no momento são apresentados os resultados obtidos com um dos 10 clones analisados por meio de expressão em escala reduzida (Figura 13).

O teste de indução foi analisado por SDS-PGE e Western Blotting (WB) (anti-6xHis). Na figura 13, coluna 3, podemos observar a presença de duas bandas difusas e com massa acima de 48 kDa com reconhecimento positivo (WB) para a cauda de Histidina (His6x) presente na proteína recombinante o que leva a crer que o processo de purificação não foi efetivo e que provavelmente esteja ocorrendo dimerização da proteína, uma vez que a massa de uma das bandas observadas é de aproximadamente 90kDa (Figura 13, seta vermelha), porém nos testes em escala maior, por meio de SDS-PAGE em condições não-redutoras, não foi observado a presença de dímero (Figura 14, coluna3). Já na fração purificada, por meio de WB é possível verificar o reconhecimento positivo para a cauda de Histidina (His6x).

Apesar da análise da sequência nucleotídica de *Lox i 1* possuir dois sítios preditos para N-glicosilação em mamíferos. Somado ao fato que o sistema de expressão em *Pichia pastoris* promove glicosilação. Nos resultados obtidos não foram observados indícios de glicosilação. É sabido que as proteínas do veneno bruto de *L. intermedia* exibem intensa N-glicosilação com estruturas do tipo alta-manose e em menor grau, as proteínas do veneno desta espécie também são O-glicosiladas e, neste caso, o açúcar predominante é N-acetil-galactosamina (VEIGA *et al.*, 1999).

Do mesmo modo que ocorre com *Saccharomyces cerevisiae*, a levedura *P. pastoris* promove N-glicosilação semelhante ao tipo alta-manose (de eucariotos superiores) em proteínas da via secretória assim como O-glicosilação em menor escala (CEREGHINO e CREGG, 2000). O grau de N-glicosilação é variável, mas no

caso de hiperglicosilação de proteínas o número de unidades de manose pode chegar a muitas unidades. A grande maioria dos alérgenos são glicoproteínas, porém em alguns casos é verificado que embora a forma recombinante produzida em levedura se apresente na forma glicosilada é constatado que em sua forma nativa a molécula alergênica encontra-se em uma forma não glicosilada. Uma alternativa para evitar esse tipo de fenômeno é utilizar técnicas de mutação sítio-dirigida (VINZÓN *et al.*,2010).

Com os resultados obtidos até o momento, não foi possível afirmar qual é o padrão de glicosilação da proteína nativa em questão presente no veneno, pois somente um estudo mais aprofundado por técnicas de espectrometria de massas poderia conduzir a essa observação.

O baixo rendimento obtido na fase de expressão em escala reduzida permitiu estabelecer algumas condições e exigiu algumas modificações como o uso de erlenmeyers modificados (com haletas de vidro) que proporcionam o aumento da taxa de aeração dos frascos, assim como algumas alterações no protocolo de purificação como o aumento da quantidade de resina Ni-NTA e a modificação do pH das soluções utilizadas durante a purificação. Não foi observado um padrão difuso de bandas na fração purificada como encontrado nos testes de escala reduzida. O que se observa é uma banda com massa próximo a 40kDa, demonstrando uma redução na massa do produto recombinante (Figura 14-Coluna 4). Do mesmo modo é possível observado na análise por WB da fração purificada (Figura 14-Coluna 5). As mudanças nas condições de expressão como o aumento da taxa de aeração, podem explicar a diferenças observadas entre as expressões de pequena e maior escala. Isso é sugerido devido ausência de bandas referente ao dímero da proteína na expressão em maior escala (Figura 14, coluna 3), o que indica que a banda encontrada no WB do Void possa ser devido a redução parcial da proteína (Figura 13, coluna 3).

Como citado anteriormente sistemas de expressão são amplamente utilizados em escala industrial devido ao rendimento favorável que podem proporcionar. Porém, os resultados obtidos até o momento demonstram um baixo rendimento de expressão (600 µg/L). Embora o trabalho apresente resultados nunca antes obtidos, assim como uma forma recombinante de uma proteína homóloga a alérgeno ainda não descrito, os protocolos de expressão podem ser novamente alterados visando melhorar o rendimento. O uso de biorreatores, assim como a otimização de códons

e melhoria nos sinais de secreção demonstram ser uma alternativa viável, uma vez que permite trabalhar com volumes maiores e taxas de aeração superiores (YANG *et al.*, 2013).

Buscando obter o máximo de informações possíveis dos resultados obtidos durante o período do projeto de mestrado, foram feitas análises preditivas por meio dos programas *SwissModel* e *DeepView.pdb*. Essas análises fornecem indícios interessantes de estrutura, formação de epítomos e classificação de *Lox i 1*. Por meio de análise de bioinformática FERRER (2010), já havia observado que a sequência nucleotídica do alérgeno de *L.intermedia* possui identidade com alguns alérgenos de diversas espécies de artrópodes, como os alérgenos de espécies de formiga (*Pachycondyla chinensis* e *Solenopsis invicta*) e piolho (*Pediculus humanus corporis*). A análise da predição de estrutura tridimensional por programas de bioinformática é interessante, pois pode sugerir quais as semelhanças estruturais entre moléculas, permitindo a melhoria na abordagem das análises bioquímicas ou até mesmo na obtenção do cristal, embora isso seja somente atestado na prática.

Frente a grande quantidade de moléculas alergênicas já caracterizadas e resolvidas, criou-se o interesse, por meio de ferramentas de bioinformática alinhadas ao PDB (Do inglês, *Protein Data Bank*), comparar dados referente a esses alérgenos com o recém obtido *Lox i 1*. Segundo o *PDB*, esse cristal foi o que apresentou as melhores condições de similaridade (40%) assim como os melhores parâmetros para a construção da estrutura tridimensional preditiva. Vale ressaltar que já foi verificado que o alérgeno *Sol i 3* apresenta imunoreatividade cruzada com o Antígeno 5, cujo qual pertence a mesma família onde *Lox i 1* foi agrupada nas análises obtidas por FERRER em 2010 (PADAVATTAN *et al.*, 2008; GIBBS *et al.*, 2008).

A análise dos resultados de um alinhamento executado por meio de programas de alinhamento como o *BLAST* e o *PDB*, por exemplo, se dão em função de dois valores: o score e principalmente o *E-value*. Os algoritmos desses programas tentam identificar caracteres, com o intuito de fornecer maior segurança de que esse valor não seja reflexo de uma aleatoriedade, utiliza-se o *E-value*. Portanto, o *E-value* corresponde à probabilidade de um evento de pareamento aleatório estar ocorrendo. Com isso, quanto mais próximo o valor de *E-value* for de zero, melhor é o resultado. Sendo que alguns programas têm uma linha de corte de 10.0 para o *E-value* (SOUZA e LIFSCHITZ, 2007; ARNOLD *et al.*, 2006).

Por meio de análise preditiva estrutural, foi proposto analisar regiões conservadas que apresentaram maior identidade entre os alinhamentos da sequência aminoacídica de *Lox i 1* e *Sol i 3*. A intenção é verificar se os alinhamentos de regiões conservadas descontínuas poderiam de algum modo formar estruturas tridimensionais vizinhas que caracterizariam uma região de epítomos. Vale ressaltar que uma análise de distribuição de epítomos necessita de uma evidência de distribuição de cargas eletrostáticas de superfície mais detalhada. Porém a análise de epítomos pode sugerir de que maneira essas moléculas alergênicas podem ativar o sistema imune, uma vez que um dos principais mecanismos de hipersensibilidade é por reconhecimento de epítomos por IgE. Assim como é comum relatos de reatividade cruzada entre alérgenos de espécies diferentes (HOPP *et al.*, 1981; KING *et al.*, 1996; JENSEN *et al.*, 2007; MULLER *et al.*, 2008).

A análise preditiva sugere uma estrutura globular (Figura 15-A, B e C), sendo que a coloração é sugerida pelo programa e não possuem significância. Quanto aos parâmetros validados, é importante citar, que devido ao fato do alérgeno de *L. intermedia* possuir 415 aminoácidos e o alérgeno de *S. invicta* possuir 218 aminoácidos, a qualidade da predição feita com toda a sequência aminoacídica gerava uma estrutura de baixa qualidade com um *E-value* acima de 10.0. Para tanto, foi utilizado somente os primeiros 227 aminoácidos com o intuito de reduzir a probabilidade de eventos de pareamento aleatórios com o restante da sequência aminoacídica. Essa diferença no tamanho entre o alérgeno *Sol i 3* e *Lox i 1* leva a uma discussão interessante, pois ao analisarmos a composição dos venenos de *S. invicta* (HOFMAN, 2010) e *L. intermedia* (CHAIM *et al.*, 2011) verifica-se uma certa similaridade como a presença de fosfolipases, serinoproteases, hialuronidases e alérgenos. Talvez sugerindo um passo evolutivo em comum dos alérgenos *Lox i 1* e *Sol i 3* provenientes de um ancestral comum. A diferença de tamanho entre as moléculas em questão talvez possa ter uma explicação na evolução da natureza predatória que a aranha *L. intermedia* teve, exigindo a duplicação de genes referentes a outras toxinas como as fosfolipases, as quais se encontram em grande número de isoformas (da SILVEIRA *et al.*, 2006; CHAIM *et al.*, 2011; VUITIKA *et al.*, 2013) e desse modo impedindo a duplicação de genes “menos” utilizados como do alérgeno *Lox i 1*. Porém isso somente pode ser corroborado e comprovado com estudos de filogenia mais aprofundados.

A análise da modelagem tridimensional por predição permitiu verificar não somente a distribuição de estruturas proteicas, mas também forneceu indícios de semelhanças entre estruturas proteicas classificadas dentro de um mesmo grupo (Figura 16). Por meio de outro programa *Deep View.pdb* também alinhado ao *PDB* foi possível observar a co-marcação de epítomos não lineares conservados entre os alérgenos *Lox i 1* e *Sol i 3*. Desse modo fornecendo embasamento teórico para sugerir mecanismos de ação, formação de epítomos e coordenação de sítios catalíticos (ARNOLD *et al.*, 2006; JENSEN *et al.*, 2007).

De certo modo, ainda se tratando de análises estruturais, os dados obtidos na modelagem estrutural preditiva são corroborados pelos dados obtidos na análise por Dicroísmo Circular. Os dados da deconvolução demonstram que a proteína recombinante possui uma estrutura secundária bem estabelecida (Tabela 4). O perfil do espectro do Dicroísmo Circular sugere que a proteína recombinante encontra-se solúvel e com um enovelamento estabelecido.

A caracterização de moléculas alergênicas é feita pelo perfil de ligação a imunoglobulinas do tipo E presentes no soro de pacientes (*RAST*), sendo classificado como o principal alérgeno presente em um veneno total aquele que é responsável por 50% do reconhecimento de epítomos. Em contrapartida, moléculas que tenham um reconhecimento menor que 5% não entram na classificação de alérgenos uma vez que são incluídos como componente *non-allergen* dos venenos. Atualmente vem crescendo a atenção para essas moléculas *non-allergen* uma vez que seu potencial alergênico reduzido (Hipoalérgeno) pode apresentar um potencial biotecnológico na imunoterapia de dessensibilização (VALENTA *et al.*, 2010). Esses alérgenos, muitas vezes compartilham epítomos conformacionais com suas isoformas de maior potencial alergênico, podendo ser utilizadas com maior eficácia na terapia de dessensibilização (NIEDERBERGER *et al.*, 2013).

Essa discussão é importante, pois a caracterização mediante ao soro de pacientes sensibilizados se torna um problema para a caracterização de um alérgeno presente no veneno de uma aranha do gênero *Loxosceles sp* (HAGEN, 1981). O número de relatos de acidentes com essas aranhas é grande, porém a descrição da lesão muitas vezes não inclui reações sistêmicas inespecíficas típicas de reações alérgicas (HAGEN, 1981), ou seja, não é dada muita atenção na notificação de casos com eventos de hipersensibilidade aparente. Enquanto isso, exames que poderiam melhor direcionar o diagnóstico como a dosagem de IgE

circulante, são negligenciados. Devido ao fato das reações alérgicas relacionadas ao loxoscelismo serem pouco notificadas, a pesquisa de indivíduos alérgicos a picada de aranhas do gênero *Loxosceles sp* se torna uma tarefa difícil. Frente a isso o fenômeno da imunoreatividade cruzada entre alérgenos (KING *et al.*, 1996) com epítomos conformacionais conservados pode ser uma alternativa para que desse modo possa vir a comprovar o potencial alergênico do alérgeno *Lox i 1*. A imunoreatividade cruzada é um evento comum entre os alérgenos da ordem Himenóptera como discutido no item 2.5 (BIRCHER *et al.*, 2005; STEEN *et al.*, 2005; HEMMER *et al.*, 2008), e corroborando com isso, um estudo interessante trouxe a luz da literatura uma nova detecção de reatividade cruzada entre alérgenos provenientes organismos de ordens taxonômicas diferentes. Esse estudo baseado em observações clínicas e estudos de correlação entre diferentes parâmetros biológicos, sugere um mecanismo biológico IgE-dependente para a imunoreatividade cruzada entre veneno de vespa e extratos derivados de uma espécie de mosquito (BIRCHER *et al.*, 2005; SABBAH *et al.*, 1999 e 2000). Desse mesmo modo, além dos propósitos para caracterização dos alérgenos (pelo perfil de ligação de IgE) a imunoreatividade cruzada entre os alérgenos pode vir a ser uma explicação para os eventos de hipersensibilidade observados após a picada de aranhas do gênero *Loxosceles sp*. Pois é de se considerar que, uma vez presente no soro da vítima acometida por uma picada de aranha *Loxosceles intermedia*, um tipo de IgE que reconheça algum epítomo conservado entre outro alérgeno e *Lox i 1*, seja o suficiente para desencadear uma reação de hipersensibilidade mediada por imunoglobulinas do tipo E. Essa discussão traz consigo mais um agravante na complexidade do mecanismo que possa estar envolvido nos relatos já observados no loxoscelismo (HAGEN, 1981; DONEPUDI *et al.*, 2005; KING *et al.*, 2007; ROBB *et al.*, 2007; MAKRIS *et al.*, 2009; PIPPIRS *et al.*, 2009; LANE *et al.*, 2011).

Mesmo com a indisponibilidade de soros de pacientes alérgicos ao alérgeno de *L. intermedia*, e de outra espécie da Ordem Himenóptera, objetivou-se analisar atividade biológica de *Lox i 1* por um método de inflamação já padronizado e utilizado em estudos anteriores (UDAKA *et al.*, 1970; Da SILVEIRA *et al.*, 2006; APPEL *et al.*, 2008; SADE *et al.*, 2012). Já foi descrito que o veneno da aranha-marrom possui um componente termolábil e não dialisável relacionado com a atividade histaminérgica (PALUDO *et al.*, 2009). Ensaio *in vitro* avaliando a liberação de histamina a partir de linhagem celular basofílica e análises *in vivo* de

eventos relacionados com a degranulação de mastócitos em resposta à proteína TCTP recombinante mostrou que esta proteína está relacionada com a liberação de histamina nos eventos inflamatórios iniciais. Porém, como já citado, os eventos de hipersensibilidade mediados por IgE descritos na literatura como o exantema pustuloso e o rash cutâneo ainda não foram esclarecidos (HAGEN, 1981; DONEPUDI et al., 2005; KING et al., 2007; ROBB et al., 2007; MAKRIS et al., 2009; PIPPIRS et al., 2009; LANE et al., 2011). Nesse contexto, o alérgeno *Lox i 1* recombinante é uma ferramenta importante para o estudo da hipersensibilidade relacionada ao loxoscelismo.

Por meio de um ensaio piloto de permeabilidade vascular foi analisado a capacidade do alérgeno *Lox i 1* alterar a permeabilidade de vasos de camundongos *Swiss*. O aumento da permeabilidade vascular é um evento inicial relacionado à quimioatração de moléculas pró-inflamatórias como citocinas, assim como auxilia na locomoção e passagem de células de defesa (i.e. Diapedese) (PARHAM, 2001).

Pode-se observar (Figura 18) que quando comparado aos controles o alérgeno *Lox i 1* foi capaz de aumentar a permeabilidade vascular (Figura 18). O perfil de permeabilidade obtido entre *Lox i 1* e o veneno total de *L. intermedia* foram similares. Inicialmente houve a preocupação de que esse evento poderia estar sendo desencadeado por contaminações derivadas do sistema de expressão em leveduras. Para isso, foi analisado o ensaio na presença de uma proteína não relacionada bioquimicamente expressa em *Pichia pastoris* e purificada sob as mesmas condições descritas para a proteína *Lox i 1*. Desse modo, demonstrou-se que a atividade observada é provinda da proteína recombinante e não de contaminantes da levedura.

Para elucidar melhor esse evento é necessário realizar um ensaio de permeabilidade vascular dose-dependente para obter resultados mais esclarecedores assim como outros ensaios *in vitro* com linhagem basofílica (i.e. RBL-2H3). Desse modo, verificar se esse evento observado está relacionado com a liberação de histamina, sendo *Lox i 1* um fator liberador de histamina. Depois de realizado isso, pode-se investigar se os mecanismos desse evento ocorrem de maneira direta ou indireta.

Estudos adicionais se fazem necessários. Para tanto já estão em andamento a padronização da expressão do alérgeno recombinante em outras cepas de *Pichia pastoris* como *KM71H*, *GS115* e *SMD1168 (Protease-free)* (AUISTIN et al., 1998); a

produção de soro policlonal contra *Lox i 1*; assim como a purificação da proteína para dar seguimento aos ensaios biológicos *in vivo* e *in vitro*. Quanto a obtenção do monocristal do alérgeno recombinante e a subsequente análise por difração de raio-X já está sendo proposta uma colaboração por um convênio estabelecido com o Departamento de Física da UNESP. O papel desta proteína no veneno ainda permanece incerto e poderá ser elucidado com ensaios biológicos em animais e linhagens celulares relacionadas à mastócitos. Fica ainda a perspectiva de utilizar os anticorpos produzidos em coelhos para a detecção desta proteína no veneno total produzido por *L. intermedia*. Frente a isso, pode-se constatar que o seguimento desses estudos pode trazer novas ferramentas para melhor elucidar os eventos de hipersensibilidade no loxoscelismo assim como em outros estudos de toxicologia envolvendo reações alérgicas.

## 7 CONCLUSÕES

O presente trabalho demonstrou pela primeira vez a expressão, purificação e caracterização biológica parcial de uma proteína homóloga a alérgeno presente na glândula de veneno de *Loxosceles intermedia*. Embora estudos adicionais sejam necessários, foi possível obter na forma solúvel e ativa uma isoforma recombinante do possível primeiro alérgeno descrito no veneno de uma aranha do Gênero *Loxosceles sp.* Contudo, não houve sucesso na obtenção da proteína homóloga a alérgenos em sistemas de expressão em procarioto. O sistema de expressão em levedura demonstrou ser uma alternativa bem sucedida para a expressão da proteína de interesse. A análise estrutural preditiva demonstrou conservação dos epítomos conformacionais entre os diversos alérgenos, o que sugere estar também relacionado com a proteína homóloga a alérgeno, *Lox i 1*. Também foi possível observar que a proteína recombinante demonstra a capacidade de aumentar a permeabilidade vascular em camundongo, dando indícios de sua participação desde os primeiros eventos inflamatórios presentes no loxoscelismo.

## REFERÊNCIAS

AN, S., CHEN, L., WEI, J.F., YANG, X., MA, D., XU, X., LAI, R. Purification and characterization of two new allergens from the venom of *Vespa magnifica*. **PLoS One**. v.7, p. 319 2012.

ANAND S.B.; GNANASEKAR M.; THANGADURAI M. Immune response studies with *Wuchereria bancrofti* vespidual allergen homologue (WbVAH) in human lymphatic filariasis. **Parasitol Res**; v.4 p.101:981–988, 2007.

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

area. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* v.78 p.369–72, 1997.

ARLIAN, L.G. Arthropod allergens and human health. **Annu Rev Entomol.** v.47, p.395-433, 2002.

AUSTIN A.J.; JONES C.E.; HEEKE G.V. Production of human tissue factor using the *Pichia pastoris* expression system. *Protein Expr Purif.* v. 13 p.136-178, 1998.

B.J.; CALIXTO, J.B. Antiedematogenic and antinociceptive actions of NPC 18521, a novel bradykinin B2 receptor agonist. **Eur. J. Pharmacol.** v. 16, p.277-286, 1996.

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

BARNARD J.H. Severe hidden delayed reactions from insect stings. **J. Med.** V.66 p.1206–10, 1966.

BILÓ B.M.; RUEFF F.; MOSBECH H.; BONIFAZI F.; OUDE-ELBERINK J.N. Diagnosis of Hymenoptera venom allergy. **Allergy**. v.11 p.1339-49, 2005.

BONIFAZI F.; JUTEL M.; BILÓ B.M.; BIRNBAUM J.; MULLER U. Prevention and treatment of hymenoptera venom allergy: guidelines for clinical practice. **Allergy**, v.60(12), p.1459-70, 2005.

BORODINA I, JENSEN BM, WAGNER T, HACHEM MA, SØNDERGAARD I, POULSEN LK. Expression of enzymatically inactive wasp venom phospholipase A1 in *Pichia pastoris*. **Allergy** v.6, p. 256, 2011.

BOUSQUET J.; LOCKEY R.; MALLING H.J. Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases. A WHO position paper. **J Allergy Clin Immunol.** V.102 p.558–562, 1998.

BROWN T.C.; TANKERSLEY M.S. The sting of the honeybee: an allergic perspective. **Ann Allergy Asthma Immunol.** V.107 p.463-70, 2011.

BRUNETTO B.; TINGHINO R.; BRASCHI M.C.; ANTONICELLI L.; PINI C.; IACOVACCI P. Characterization and comparison of commercially available mite extracts for in vivo diagnosis. **Allergy.** V.65 p.184–190, 2010.

BUCHER C.; KORNER P.; WÜTHRICH B. Allergy to bumblebee venom. **Curr Opin Allergy Clin Immunol.** V.4 p.361-5, 2001.

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

CHAIM, O. M.; TREVISAN-SILVA, D.; CHAVES-MOREIRA, D.; WILLE, A. C.; FERRER, V. P.; MATSUBARA, F. H.; MANGILI, O. C.; DA SILVEIRA, R. B.; GREMSKI, L. H.; GREMSKI, W.; SENFF-RIBEIRO, A.; VEIGA, S. S. Brown Spider (*Loxosceles* genus) Venom Toxins: Tools for Biological Purposes. **Toxins.** v.3 p.309-344, 2011.

CHATZAKI, M.; HORTA, C. C.; ALMEIDA, M. O.; PEREIRA, N. B.; MENDES, T. M.; DIAS-LOPES, C.; GUIMARAES, G.; MORO, L.; CHAVEZ-OLORTEGUI, C.; HORTA, M. C.; KALAPOTHAKIS, E. Cutaneous loxoscelism caused by *Loxosceles similis* venom and neutralization capacity of its specific antivenom. **Toxicon.** V.60 p.21-30, 2012.

COOKE R.A.; BARNARD J.H.; HEBALD S.; STULL A. Serological evidence of immunity with coexistingsensitization in a type of humanallergy. *J Exp Med* v.62 p.733–750, 1935.

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

CURIN M.; REININGER R.; SWOBODA I.; FOCKE M.; VALENTA R.; SPITZAUER S. Skin prick test extracts for dog allergy diagnosis show considerable variations

regarding the content of major and minor dog allergens. **Int Arch Allergy Immunol** v.154 p.258–263, 2010.

DA SILVA, P. H.; DA SILVEIRA, R. B.; APPEL, M. H.; MANGILI, O. C.; GREMSKI, W.; VEIGA, S. S. Brown spiders and loxoscelism. **Toxicon**, v.44 p.693-709, 2004.

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

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

DE ANDRADE, S. A.; PEDROSA, M. F.; DE ANDRADE, R. M.; OLIVA, M. L.; VAN DEN BERG, C. W.; TAMBOURGI, D. V. Conformational changes of *Loxosceles* venom sphingomyelinases monitored by circular dichroism. **Biochem Biophys Res Commun**. V.327 p.117-123, 2005.

de CAMPOS, R.O.; ALVES, R.V.; KYLE, D.J.; CHAKRAVARTY, S.; MAVUNKEL, DE CASTRO, C. S.; SILVESTRE, F. G.; ARAUJO, S. C.; GABRIEL DE, M. Y.; MANGILI, O. C.; CRUZ, I.; CHAVEZ-OLORTEGUI, C.; KALAPOTHAKIS, E. Identification and molecular cloning of insecticidal toxins from the venom of the brown spider *Loxosceles intermedia*. **Toxicon**. V.44 p.273-280, 2004.

DIWAKAR L.; NOORANI S.; HUISSOON A. P.; FREWW A. J. Practice of venom immunotherapy in the United Kingdom: a national audit and review of literature. **Clinical and Experimental Allergy**. V.38 p.1651–1658, 2010.

DONEPUDI, S.K.; AHMED, K.A.; STOCKS, R.M.; NELSON, D.; THOMPSON, J.W. Aural involvement in loxoscelism: case report and literature review. **Int J Pediatr Otorhinolaryngol**, v.69 p.1559-61, 2005.

DONNOVAN B.J. Anaphylactic shock and strong cardiac stimulation caused by stings of the bumble bee *Bombus terrestris*. **NZ Entomol**. V.6 p.385–89, 1978.

dos SANTOS L.D.; DIAS N.B.; ROBERTO J.; PINTO A.S.; PALMA M.S. Brown recluse spider venom: proteomic analysis and proposal of a putative mechanism of action. **Protein Pept Lett**. v.16 p.933-43, 2009.

DUDLER T.; CHEN W.; WANG S.; SCHNEIDER T; ANNAND R.R.; DEMPCY R.O.; CRAMERI R.; GMACHL M.; SUTER M.; GELB M.H. High-level expression in *Escherichia coli* and rapid purification of enzymatically active honey bee venom phospholipase A2. **Biochim Biophys Acta**; v.1165 p.201–210, 1992.

DURHAM SR.; WALKER S.M.;, VARGA E.M.; JACOBSON M.R.; O'BRIEN F. Venom allergy. **Br. Med.J.** v.316 p.1365–6, 1998.

ELSTON, D. M., EGGERS, J. S., SCHMIDT, W. E., STORROW, A. B., DOE, R. H., MCGLASSON, D.; FISCHER, J. R. Histological findings after brown recluse spider envenomation. **Am J Dermatopathol**, v. 22 p.242-246, 2000.

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

FERRER V.P.; DE MARI T.L.; GREMSKI L.H.; TREVISAN SILVA D.; DA SILVEIRA R.B.; GREMSKI W.; CHAIM O.M.; SENFF-RIBEIRO A.; NADER H.B.; VEIGA S.S. A novel hyaluronidase from brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom (Dietrich'sHyaluronidase): from cloning to functional characterization. **PLoS Negl Trop Dis**. v.5 e.2206. 2013.

FERRER, V.P. Clonagem e Expressão Heteróloga de Hialuronidase e Alérgeno presentes no veneno de aranha marrom (*Loxosceles intermedia*). 102 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Biologia Molecular)- Setor Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

FOCKE M.; MARTH K.; FLICKER S.; VALENTA R. Heterogeneity of commercial timothy grass pollen extracts. **Clin Exp Allergy** v.38 p.1400–1408, 2008.

FREEMAN T.M. Hymenoptera hypersensitivity in an imported fire ant endemic clinical efficacy of grass-pollen immunotherapy. **N Engl J Med** v.341 p.468–475 1999.

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

GIBBS, K.R.; MOIRA K.; O'BRYAN M. The CAP Superfamily: Cysteine-Rich Secretory Proteins, Antigen 5, and Pathogenesis-Related 1 Proteins—Roles in Reproduction, Cancer, and Immune Defense. **Endocrine Reviews**. v.7 p.865–897, 2008.

GONCALVES-DE-ANDRADE, R. M.; TAMBOURGI, D. V. First record on *Loxosceles laeta* (Nicolet, 1849) (Araneae, Sicariidae) in the West Zone of Sao Paulo City, Sao Paulo, Brazil, and considerations regarding its geographic distribution. **Rev Soc Bras Med Trop.** V.36 p.425-426, 2003.

GREMSKI, L. H.; DA SILVEIRA, R. B.; CHAIM, O. M.; PROBST, C. M.; FERRER, V. P.; NOWATZKI, J.; WEINSCHUTZ, H. C.; MADEIRA, H. M.; GREMSKI, W.; NADER, H. B.; SENFF-RIBEIRO, A.; VEIGA, S. S. A novel expression profile of the *Loxosceles intermedia* spider venomous gland revealed by transcriptome analysis. **Mol Biosyst,** v.6 p.2403-2416, 2010.

GROOT H. Allergy to bumblebees. **Curr Opin Allergy Clin Immunol.** V.6 p.294 2006.

GUPTA P.; GREENBERGER P.A. Stinging insect allergy and venom immunotherapy. **Allergy Asthma Proc.** V.4 Suppl 1p.9-10, 2004.

HAGEN M.D. Urticaria in loxoscelism. **South Med J.** v.74 p.1427, 1981.

HAMILTON R.G. Diagnostic methods for insect sting allergy. **Curr Opin Allergy Clin Immunol.** V.4 p.297-306, 2004.

HEMMER W.; FOCKE M KOLARICH D.; WILSON IB.; ALTMANN F.; WÖHRL S.; GÖTZ M.; JARISCH R. Antibody binding to venom carbohydrates is a frequent cause for double positivity to honeybee and yellow jacket venom in patients with stinging-insect allergy. **J Allergy Clin Immunol.** V.108 p.1045-52, 2001.

HOFFMAN D.R. Allergens in Hymenoptera venom XXIV: the amino acidsequences of imported fire ant venom allergens Sol i II, Sol i III, and Sol i IV. **J. Allergy Clin. Immunol.** V.91 p.1–79, 1993.

HOFFMAN D.R. Allergenic crossreactivity between honeybee and bumblebee venoms. **J. Allergy Clin. Immunol.** 69:139, 1982.

HOFFMAN D.R. Allergens in bee venom III: identification of allergen Bas acid phosphatase. **J. Allergy Clin. Immunol.** V.59 p.64–66, 1977.

HOFFMAN D.R.; DOVE D.E.; MOFFITT J.E.; STAFFORD C.T. Allergens in Hymenoptera venom. XXI. Cross-reactivity and multiple reactivity between fire ant

venom and bee and wasp venoms. **J. Allergy Clin. Immunol.** V.82 p.828–34, 1988.

HOFFMAN D.R.; MILLER J.S.; SUTTON J.L. Hymenoptera venom allergy: a geographic study. **Ann. Allergy.** V.45 p.276–79, 1980.

HOFFMAN D.R.; SCHMIDT J.O. Amino acid sequences of allergens from *Vespa mandarinia*, an Asian hornet. **J. Allergy Clin. Immunol.** V.103 p.164, 1999.

HOFFMAN, D.R. Allergens in bee venom III: identification of allergen B as acid phosphatase. **J. Allergy Clin. Immunol.** v.59, p.364–66, 1977.

HOFFMAN, D.R. Hymenoptera venom allergens. **Rev Allergy Immunol.** V.30 p.109-28, 2006.

HOFFMAN, D.R. Structural biology of allergens from stinging and biting insects. **Curr Opin Allergy Clin Immunol**, v.8 p.338-42, 2008.

HOFFMAN, D.R; DOVE, D.E.; JACOBSON, R.S. Allergens in Hymenoptera venom. XX. Isolation of four allergens from imported fire ant (*Solenopsis invicta*) venom. **J. Allergy Clin. Immunol.** v.82 p.818–27, 1988.

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

HOPP, T. P.; WOODS, K. R. Prediction of protein Antigenic Determinants from Amino Acid Sequences. **Proc Natl Acad Sci.** v. 78, p. 3824-3828, 1981. **Immunol.** V.2 p.446–453, 2002.

INCORVAIA C.; FRATI F.; DELL'ALBANI I.; ROBINO A.; CATTANEO E.; MAURO M.; DAVID M.; QUALIZZA R.; PASTORELLO E. Safety of hymenoptera venom immunotherapy: a systematic review. **Expert Opin Pharmacother.** V.16 p.2527-32, 2011.

ISBISTER, G. K.; FAN, H. W. Spider bite. **Lancet**, 378 (9808):2039-2047, 2011.  
JEEP S.; PAUL M.; MÜLLER U.; KUNKEL G. Honeybee venom allergy: immunoblot studies in allergic patients after immunotherapy and before sting challenge. **Allergy** v.51 p.540–46, 1996.

JENSEN, P. E. Recent advances in antigen processing and presentation. **Nat**

**Immunol**, v.8. p.1041-1048, 2007.

JIN C.; FOCKE M.; LÉONARD R.; JARISCH R.; ALTMANN F.; HEMMER W. Reassessing the role of hyaluronidase in yellow jacket venom allergy. **J Allergy Clin Immunol**. V.1 p.84-90, 2010.

JOHANSSON, S.G.O. Prevention of allergy and asthma, interim report—introduction. Eur. **J. Allergy Clin. Immunol**, v.55 p.1073–74, 2000.

KETTNER A.; HUGHES G.J.; FRUTIGER S. ASTORI M.; ROGGERO M.; SPERTINI F.; CORRADIN G. Api m 6: a new bee venom allergen. **J Allergy Clin Immunol**. v. 7 p.914-20, 2001.

KING T.P. Immunochemical studies of stinging insect venom allergens. **Toxicon**. v.34 p.1455–58, 1996.

KING T.P.; HOFFMAN D.; LOWENSTEIN H.; MARSH D.G.; PLATTS-MILLS T.A.E.; THOMAS W. Allergen nomenclature. **J. Allergy Clin. Immunol**. V.96 p.5–14, 1995.

KING T.P.; HOFFMAN D.; LOWENSTEIN H.; MARSH D.G.; PLATTS-MILLS T.A.E.; THOMAS W. Allergen nomenclature. **J. Allergy Clin. Immunol**. v.96 p.5–14, 1995.

KING T.P.; KOCHOUMIAN L.; JOSLYN A. Melittin-specific monoclonal and polyclonal IgE and IgG1 antibodies from mice. **J. Immunol**. V.133 p.2668–73, 1984.

KING T.P.; SOBOTKA A.; ALAGON A.; KOCHOUMIAN L.; LICHTENSTEIN L.M. Protein allergens of white-faced hornet, yellow hornet and yellowjacket venoms. **Biochemistry** v.17 p.5165–74, 1978.

KING, L. E., JR. Common ground?: Tetracyclines, matrix metalloproteinases, pustular dermatoses, and loxoscelism. **J Invest Dermatol**, v.127 p.1284- 1286, 2007.

KOCHUYT A.M.; VANHOEYVELD E.; STEVENS E.A.M. Occupational allergy to bumble bee venom. **Clin. Exp. Allergy**. v.23 p.190– 95, 1993.

KOROŠEC P, VALENTA R, MITTERMANN I, CELESNIK N, ERŽEN R, ZIDARN M, KOŠNIK M. Low sensitivity of commercially available r*Api m 1* for diagnosis of honeybee venom allergy. **J Allergy Clin Immunol**. v.128 P.671-3, 2011.

KUSMA, J.; CHAIM, O. M.; WILLE, A. C.; FERRER, V. P.; SADE, Y. B.; DONATTI, L.; GREMSKI, W.; MANGILI, O. C.; VEIGA, S. S. Nephrotoxicity caused by brown spider venom phospholipase-D (dermonecrotic toxin) depends on catalytic activity. **Biochimie**, v. 90 p. 722-1736, 2008.

LANE L.; MCCOPPIN HH.; DYER J. Acute generalized exanthematous pustulosis and Coombs-positive hemolytic anemia in a child following *Loxosceles reclusa* envenomation. **Pediatr Dermatol**. v.28 p.685-8, 2011.

LARCHE´ M.; AKDIS C.A.; VALENTA R. Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. **Nat Rev Immunol** v.6 p.761–771, 2006.

LARSEN J.N.; LOWENSTEIN H.; Allergen nomenclature. **J. Allergy Clin. Immunol.** v.6 p.761–771, 2006.

LEE S.; LYNCH K.R.; Brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*) venom phospholipase D (PLD) generates lysophosphatidic acid (LPA). **Biochem J.** v. 391p.317-23, 2005.

LINHART, B.; VALENTA, R. Vaccines for allergy. **Current Opinion in Immunology.** v.8 p.273-281, 2012.

LOCKWOOD S.A.; HAGHIPOUR-PEASLEY J.; HOFFMAN D.R.; DESLIPPE R.J. Identification, expression, and immuno-reactivity of Sol i 2 & Sol i 4 venom proteins of queen red imported fire ants, *Solenopsis invicta* Buren (Hymenoptera: Formicidae). **Toxicon**. v.60 p.752-9, 2012.

LUCATO R.V. Jr; ABDULKADER R.C.; BARBARO K.C.; MENDES G.E.; CASTRO I.; BAPTISTA M.A.; CURY P.M.; MALHEIROS D.M.; SCHOR N.; YU L.; BURDMANN E.A. *Loxosceles gaucho* venom-induced acute kidney injury--in vivo and in vitro studies. **PLoS Negl Trop Dis**. V. 5 p.1182, 2011.

MADSEN, W.; ELFAR, J. Spider bites. **J Hand Surg Am**, v.35 p.1698-1699, 2010.

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

MARKOVI-HOUSLEY Z.; SCHIRMER T.; SOLDATOVA L.N.; MUELLER U.R.; A preliminary crystallographic structure of a recombinant bee venom hyaluronidase. **J Allergy Clin Immunol.** v.7 p.103, 1999.

MARQUES-DA-SILVA, E.; FISCHER, M. L. [Loxosceles Heineken & Lowe, 1835 (Araneae; Sicariidae) species distribution in the State of Parana]. **Rev Soc Bras Med Trop.** v.38 p.331-335, 2005.

MATSUBARA F.H.; GREMSKI L.H.; MEISSNER G.O.; CONSTANTINO LOPES E.S. GREMSKI W.; SENFF-RIBEIRO A.; CHAIM O.M.; VEIGA S.S. A novel ICK peptide from the **Loxosceles** intermedia (brown spider) venom gland: cloning, heterologous expression and immunological cross-reactivity approaches. **Toxicon.** v.71 p.147-58, 2013.

MCDADE, J.; AYGUN, B.; WARE, R. E. Brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*) envenomation leading to acute hemolytic anemia in six adolescents. **J Pediatr,** v.156 p.155-157, 2010.

MILNE, T.J.; ABBENANTE, G.; TYNDALL, J.D.; HALLIDAY, J.; LEWIS, R.J. Isolation and characterization of a cone snail protease with homology to CRISP proteins of the pathogenesis-related protein superfamily **J Biol Chem,** v.278, p.31105-31110, 2003.

MOFFITT J.E.; BARKER J.R.; STAFFORD C.T. Management of imported fire ant allergy: results of a survey. **Ann. Allergy Asthma Immunol.** v79 p.125–30, 1997.

MONSALVE R.I., VEGA A., MARQUE´ S. L., MIRANDA A., FERNA´NDEZ J., SORIANO V., CRUZ S., DOMI´NGUEZ-NOCHE C., SA´NCHEZ-MORILLAS L., ARMISEN-GIL M, GUSPI´ R, BARBER D. Component-resolved diagnosis of vespid venom-allergic individuals: phospholipases and antigen 5s are necessary to identify *Vespula* or *Polistes* sensitization. **Allergy.** v67 p.528–536, 2012.

NOON L.; PRAUSNITZ C.; KUESTNER H.; Prophylactic inoculation against hay fever. **Lancet** v.1 p.1572–1573, 1911.

NORDVALL S.L.; JOHANSSON S.G.O; LEDFORD D.K; LOCKEY R.F. Allergens of the imported fire ant. **J. Allergy Clin. Immunol.** v.82 p.567–76, 1988.

O'REILLY, D. R.; MILLER, L. K.; & LUCKOW, V. A. Baculovirus expression vectors: A laboratory manual. New York: W. H. Freeman and Company, v.368 p.345-380, 1992.

OSPEDAL, K. Z., APPEL, M. H., FILLUS NETO, J., MANGILI, O. C., SANCHES PALUDO, K. S.; BISCAIA, S. M.; CHAIM, O. M.; OTUKI, M. F.; NALIWAIKO, K.; DOMBROWSKI, P. A.; FRANCO, C. R.; VEIGA, S. S. Inflammatory events induced by brown spider venom and its recombinant dermonecrotic toxin: a pharmacological investigation. **CompBiochemPhysiol C Toxicol Pharmacol**, v.149, p.323-333, 2009.

PARHAM, P. O sistema Imune. Porto Alegre, Editora Artes Médicas, 2001.  
PEIREN N.; DE GRAAF D.C.; EVANS J.D.; JACOBS F.J. Genomic and transcriptional analysis of protein heterogeneity of the honeybee venom allergen Api m 6. **Insect Mol Biol**. v.15 p.577–581, 2006.

PIPPIRS, U.; MEHLHORN, H.; ANTAL, A.S.; SCHULTE, K.W.; HOMEY, B. Acute generalized exanthematous pustulosis following a *Loxosceles* spider bite in Great Britain. **Br J Dermatol**, v. 161 p.208-9, 2009.

POKOJ S., LAUER I., FOTISCH K., HIMLY M., MARI A., ENRIQUE E., MIGUEL-MONCIN M.D.M.S S. *Pichia pastoris* is superior to *E. coli* for the production of recombinant allergenic non-specific lipid-transfer proteins **Protein Expression and Purification**, v.69 p. 68-75, 2010.

RASH, L. D.; HODGSON, W. C. Pharmacology and biochemistry of spider venoms. **Toxicon**, 40 (3):225-254, 2002.

ROBB, C.W.; HAYES, B.B.; BOYD, A.S. Generalized vasculitic exanthema following *Loxoscelesreclusa* envenomation. **J CutanPathol**, v. 34 p. 513-4, 2007.

ROLLAND J.M.; GARDNER L. M.; O'HEHIR R.E. Allergen-related approaches to immunotherapy. **Pharmacology & Therapeutics** v.121 p.273–284, 2009.

ROSEN, J. L.; DUMITRU, J. K.; LANGLEY, E. W.; MEADE OLIVIER, C. A. Emergency department death from systemic loxoscelism. **Ann Emerg Med**. v.60 p.439-441, 2012.

RUPPERT, E. E.; FOX, R. S.; BARNES, R. D. Zoologia dos Invertebrados. **Editora Roca**, 7 ed., 2005.

SABBAH A.; HASSOUN S.; DROUET M.; LAURET M.G.; DOUCET M. The wasp-mosquito syndrome: extension of cross-allergenicity to the horsefly **Allerg Immunol**. v.32 p.16-9, 2000.

SABBAH A.; HASSOUN S.; DROUET M.; LAURET M.G.; DOUCET  
The wasp/mosquito syndrome M.**Allerg Immunol.** v.31 p.175-84,1999.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W.; Molecular cloning: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Lab. Press. **Cold Spring Harbor**, 3ed. 2001.

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

SANDIDGE, J. S. Arachnology: scavenging by brown recluse spiders. **Nature.** v.426 p.30, 2003.

SCHENONE, H.; SAAVEDRA, T.; ROJAS, A.; VILLARROEL, F. [Loxoscelism in Chile. Epidemiologic, clinical and experimental studies]. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo.** v.31 p.403-415, 1989.

SCHROEDER, F. C.; TAGGI, A. E.; GRONQUIST, M.; MALIK, R. U.; GRANT, J. B.; EISNER, T.; MEINWALD, J. NMR-spectroscopic screening of spider venom reveals sulfated nucleosides as major components for the brown recluse and related species. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.105 p.14283-14287, 2008.

SCOTT D.L.; OTWINOWSKI Z.; GELB M.H.; SIGLER P.; Crystal structure of bee venom phospholipase A2 in a complex with a transition-state analogue. **Science** v.250 p.1563–1566, 1990

SENFF-RIBEIRO, A.; HENRIQUE DA SILVA, P.; CHAIM, O. M.; GREMSKI, L. H.; PALUDO, K. S.; BERTONI DA SILVEIRA, R.; GREMSKI, W.; MANGILI, O. C.; VEIGA, S. S. Biotechnological applications of brown spider (*Loxosceles* genus) venom toxins. **Biotechnol Adv.** v.26 p.210-218, 2008.

SOUZA, D. X.; LIFSCHITZ, S. Avaliação do E-value para Execução do BLAST sobre Bases de Dados Fragmentados. 2007. Monografia – Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

STEEN C.J.; JANNIGER C.K.; SCHUTZERS .E.; SCHWARTZ R.A. Insect sting reactions to bees, wasps, and ants. **Int J Dermatol.** v.44 p.91-4, 2005.

TERWILLIGER T.C.; EISENBERG D. The structure of melittin. II. **Interpretation of the structure.** J Biol Chem v.257 p.6016–6022, 1982.

TREVISAN-SILVA D.; BEDNASKI A.V.; GREMSKI L.H.; CHAIM O.M.; VEIGA S.S.; SENFF-RIBEIRO. A. Differential metalloprotease content and activity of three *Loxosceles* spider venoms revealed using two-dimensional electrophoresis approaches. **Toxicon**. v.15 p.11-22, 2013.

ULLAH A.; DE GIUSEPPE P.O.; MURAKAMI M.T.; TREVISAN-SILVA D.; WILLE A.C.; CHAVES-MOREIRA D.; GREMSKI L.H.; DA SILVEIRA R.B.; SENNF-RIBEIRO A.; CHAIM O.M.; VEIGA S.S.; ARNI R.K.; **Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun**. v.67 p.234-6, 2011.

UNDHEIM A. B.; KARTIK S.; VOLKER H.; LAURENCE K.; DOLYCE H.W.; TIMOTHY N. W.; KURNIAWAN N.; KING G.F.; ALI A.S.; FRY G.B. A Proteomics and Transcriptomics Investigation of the Venom from the Barychelid Spider *Trittame loki* (Brush-Foot Trapdoor). **Toxins**. v.6 p.2488-2503, 2013.

VALENTA R.; FERREIRA F.; FOCKE-TEJKL M.; LINHART B.; NIEDERBERGER V.; SWOBODA I. From allergen genes to allergy vaccines. **Annu Rev Immunol**. v.28 p.211–241, 2010.

VALENTA, R. The future of antigen-specific immunotherapy of allergy, **Nat. Rev.** v.257 p.6016–6022, 1982.

VALENTA, R.; NIEDERBERGER V. Recombinant allergens for immunotherapy, **J.Allergy Clin. Immunol**. v.119 p.826–830, 2007.

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

VEIGA, S.; GREMSKI, W. Histopathological findings in rabbits after experimental acute exposure to the *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. **Int J Exp Pathol**, v.83, p. 287-294, 2002.

Venom Allergens. **Int Arch Allergy Immunol**. v.123 p.99–106, 2000

VETTER, R. S.; ISBISTER, G. K. Medical aspects of spider bites. **Annu Rev Entomol**, v.53 p.409-429, 2008.

VETTER, R. S.; VISSCHER, P. K. Bites and stings of medically important venomous arthropods. **Int J Dermatol**, v.37 p.481-496, 1998.

VRTALA S.; FOCKE-TEJKL M.; SWOBODA I.; KRAFT D.; VALENTA R. Strategies for converting allergens into hypoallergenic vaccine candidates. v.32, p. 313–320, 2004.

WASSERMAN, G. S.; ANDERSON, P. C. Loxoscelism and necrotic arachnidism. **J Toxicol Clin Toxicol**, v.21 p. 451-472, 1983.

WILLE A.C.; CHAVES-MOREIRA D.; TREVISAN-SILVA D.; MAGNONI M.G.; BOIA-FERREIRA M.; GREMSKI L.H.; GREMSKI W.; CHAIM O.M.; SENFF-RIBEIRO A.; VEIGA SS. Modulation of membrane phospholipids, the cytosolic calcium influx and cell proliferation following treatment of B16-F10 cells with recombinant phospholipase-D from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. **Toxicon**. v.67 p.17-30, 2013.

WRIGHT, S. W.; WRENN, K. D.; MURRAY, L.; SEGER, D. Clinical presentation and outcome of brown recluse spider bite. **Ann Emerg Med**, v.30 p.28-32, 1997.

YANG S.; KUANG Y.; LI H.; LIU Y.; HUI X. Enhanced Production of Recombinant Secretory Proteins in *Pichia pastoris* by Optimizing Kex2 P1' site. **PLoS ONE**. v.8 p.75-347, 2013.

YOUNG, A. R.; PINCUS, S. J. Comparison of enzymatic activity from three species of necrotising arachnids in Australia: *Loxosceles rufescens*, *Badumna insignis* and *Lampona cylindrata*. **Toxicon**, v39 p.391-400, 2001.

**ANEXO 1: Banco de proteínas utilizadas na análise em Dicroísmo Circular**

CDNN Secondary Structure Analysis		
1	Alpha-chemotrypsin	Alpha-chemotrypsin
2	Cytochrome C	Cytochrome C
3	Elastase	Elastase
4	Hemoglobin	Hemoglobin
5	Lactate dehydrngense	Lactate dehydrngense
6	Lysozyme	Lysozyme
7	Myoglobin	Myoglobin
8	Papain	Papain
9	Ribonuclease	Ribonuclease
10	Subtilisin BPN	Subtilisin BPN
11	Flavodoxin	Flavodoxin
12	GAPDH	GAPDH
13	Prealbumin	Prealbumin
14	Subtilisin NOVO	Subtilisin NOVO
15	Triosephosphate isomerase	Triosephosphate isomerase
16	polygutamic acid	polygutamic acid
17	Thermolysin	Thermolysin
18	Hemerythrin	Hemerythrin
19	T4 Lysozyme	carboxypeptidase A
20	EcoR1	concavalin A
21	Bea-Lactoglobulin	Bence-Jones Protein
22	Superoxide Dismutase	Rubredoxin
23	Phosphoglycerate kinase	T4 Lysozyme
24		EcoR1
25	<i>Above for advanced</i>	TNF-Alpha
26		Gamma-Crystallin
27		Azurin
28		Bea-Lactoglobulin
29		pepsinogen
30		Trypsin
31		Superoxide Dismutase
32		Phosphoglycerate kinase
33		Bungarotoxin
		<i>Above for complex</i>

**ANEXO 2: Artigo publicado durante o período de Mestrado**

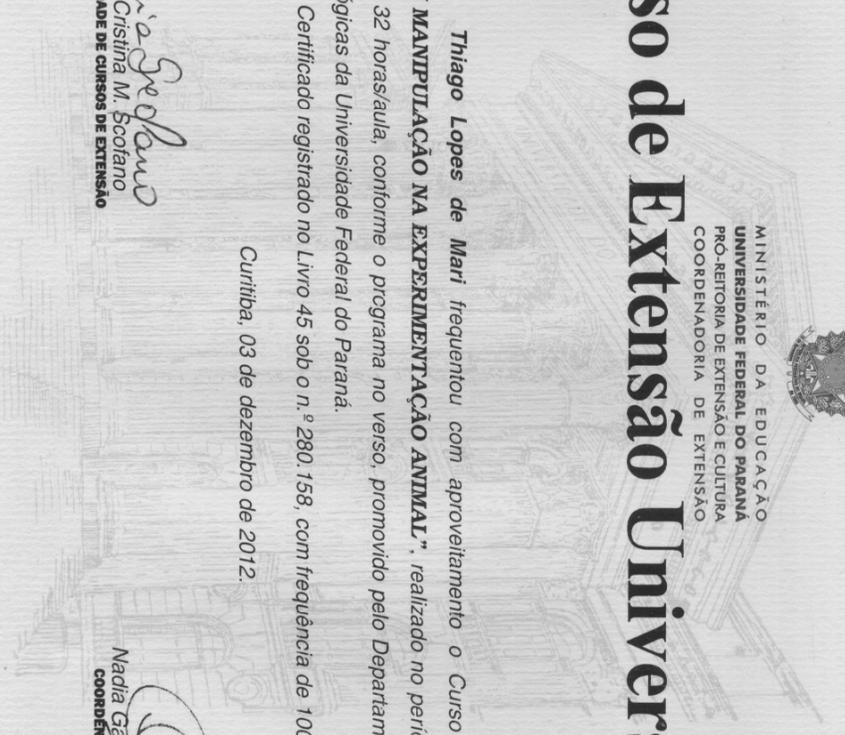
OPEN ACCESS Freely available online

 PLOS | NEGLECTED TROPICAL DISEASES

## A Novel Hyaluronidase from Brown Spider (*Loxosceles intermedia*) Venom (Dietrich's Hyaluronidase): From Cloning to Functional Characterization

Valéria Pereira Ferrer<sup>1</sup>, Thiago Lopes de Mari<sup>1</sup>, Luiza Helena Gremski<sup>1,2</sup>, Dilza Trevisan Silva<sup>1</sup>, Rafael Bertoni da Silveira<sup>1,3</sup>, Waldemiro Gremski<sup>4</sup>, Olga Meiri Chaim<sup>1</sup>, Andrea Senff-Ribeiro<sup>1</sup>, Helena Bonciani Nader<sup>5</sup>, Silvio Sanches Veiga<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Cell Biology, Federal University of Parana, Curitiba, Parana, Brazil, <sup>2</sup> Department of Clinical Pathology, Clinical Hospital, Federal University of Parana, Curitiba, Parana, Brazil, <sup>3</sup> Department of Structural, Molecular Biology and Genetics, State University of Ponta Grossa, Ponta Grossa, Brazil, <sup>4</sup> Catholic University of Parana, Health and Biological Sciences Institute, Curitiba, Parana, Brazil, <sup>5</sup> Department of Biochemistry, Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil

**ANEXO 3: Certificado de aprovação do curso de capacitação CEEA**

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRO-REITORIA DE EXTENSÃO E CULTURA  
COORDENADORIA DE EXTENSÃO

# Curso de Extensão Universitária

*Thiago Lopes de Mari frequentou com aproveitamento o Curso de Extensão Universitária "TREINAMENTO EM MANIPULAÇÃO NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL", realizado no período de 17 a 20 de setembro de 2012, num total de 32 horas/aula, conforme o programa no verso, promovido pelo Departamento de Patologia Básica do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.*

*Certificado registrado no Livro 45 sob o n.º 280.158, com frequência de 100% e nota 7.*

*Curitiba, 03 de dezembro de 2012.*

  
Marcia Cristina M. Scottano  
CHIEFE DA UNIDADE DE CURSOS DE EXTENSÃO

  
Nadia Galafato Gonçalves  
COORDENADORA DE EXTENSÃO

## ANEXO 4: Certificado de aprovação do CEEA



Ministério da Educação  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
Setor de Ciências Biológicas  
Comitê de Ética em Experimentação Animal  
(CEEA)



Nº 356

### CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituído pela PORTARIA Nº 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento do CEEA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO Nº 01/03-BL, de 09 de maio de 2003 e considerando o contido no Regimento Interno do CEEA, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado, estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

### CERTIFICATION

The Ethics Animal Experiment Committee of the Setor de Ciências Biológicas of the Federal University of Paraná, established by the DECREE Nº 787/03-BL on June 11th 2003, based upon the RESOLUTION Nº 01/03-BL from May 9th 2003, and upon the CEEA internal regiment, CERTIFIES that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the ethical principals established by the Experimental Animal Brazilian Council (COBEA), and with the requirements of the "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

**PROCESSO:** 23075.052088/2008-32

**APROVADO:**  
07/04/2009 – R.O. 03/2009

**TÍTULO:** Clonagem, expressão heteróloga e caracterização de alérgeno e hialuronidases presentes no veneno de *Loxosceles intermedia*

**AUTORES:** Silvio Sanches Veiga, Valéria Pereira Ferrer, Luiza Helena Gremski, Márcia Helena Appel, Andréa Senff-Ribeiro, Olga Meiri Chaim, Isabela Castro Rossato, Thiago Lopes de Mari

**DEPARTAMENTO:** Biologia Celular

## ANEXO 5: Parecer técnico CTNBio

	<b>Ministério da Ciência e Tecnologia - MCT</b> <b>Comissão Técnica Nacional de Biossegurança - CTNBio</b>	
<b>PARECER TÉCNICO Nº 542/2006</b>		
<p> <b>Processo nº:</b> 01200.000022/1997-37  <b>Requerente:</b> Setor de Ciências Biológicas - UFPR.  <b>CNPJ:</b> 000.348.003/0055-03  <b>Endereço:</b> Centro Politécnico da UFPR, Setor de Ciências Biológicas - 2º Piso, Sala 795 - Caixa Postal 10031 Parani/PR.  <b>Assunto:</b> Solicitação de Extensão do CQB 009/97  <b>Extrato Prévio:</b> 350/2006 Publicado no D.O.U. de 21 de fevereiro de 2006  <b>Reunião:</b> 90ª Reunião Ordinária da CTNBio, ocorrida em 19 de abril de 2006  <b>Decisão:</b> DEFERIDO         </p>		
<p>           A CTNBio, após apreciação do processo de pedido de Parecer Técnico referente à Solicitação de Extensão do CQB (Certificado de Qualidade em Biossegurança) 009/97, conclui pelo DEFERIMENTO, nos termos deste Parecer Técnico. No âmbito das competências dispostas na Lei 11.105/05 e seu decreto 5.591/05, a Comissão concluiu que o presente pedido atende às normas da CTNBio e à legislação pertinente que visam garantir a biossegurança do meio ambiente, agricultura, saúde humana e animal.         </p>		
<b>PARECER TÉCNICO</b>		
<b>1) Fundamentação técnica</b>		
<p>           Solicita à CTNBio Parecer Técnico para a extensão de seu CQB do Setor de Ciências Biológicas (UFPR) para a sala de número 198B e sala Preparativa, ambas do departamento de Biologia Celular do mesmo setor. Foram apresentados no processo os currículos dos pesquisadores, a planta baixa do laboratório, o projeto a ser desenvolvido nele assim como as medidas de biossegurança.         </p>		
<b>2) Medidas de biossegurança descritas no processo.</b>		
<p>           Os microrganismos a serem manipulados no projeto (bactérias e leveduras) são da classe de segurança I mas, como os genes a serem expressos (toxinas de animais peçonhentos), apresentam riscos à saúde humana o laboratório que solicita a extensão de CQB tem que ser do tipo NB-2. Embora no processo não haja menção específica sobre a classe laboratorial na qual se encaixa este laboratório, todos os equipamentos apresentados são perfeitamente compatíveis com a classe NB-2, portanto, adequados para as manipulações propostas no projeto. Também foram apresentadas as medidas adequadas para o transporte dos microrganismos da sala de manipulação (198B) para a sala de esterilização (sala Preparativa). Além disso, foi informado que as instalações acima mencionadas têm acesso a serviço médico emergencial no próprio setor de Ciências Biológicas da UFPR que contém um centro de atendimento médico para alunos, funcionários e professores além do Hospital Universitário.         </p>		
<p>           Atendidas as recomendações e as medidas de biossegurança, recomenda-se, contudo, que sejam devidamente observadas as práticas laboratoriais compatíveis com a classe laboratorial NB-2.         </p>		
 <b>Dr. Walter Coll</b> <b>Presidente da CTNBio</b>		