

YOUSSEF BACILA SADE

**Clonagem, expressão e purificação de uma proteína da superfamília TCTP
(*Translationally Controlled Tumor Protein*) a partir de biblioteca de cDNA da
glândula produtora de veneno de aranha-marrom (*Loxosceles intermedia*)**

CURITIBA

2009

YOUSSEF BACILA SADE

**Clonagem, expressão e purificação de uma proteína da superfamília TCTP
(*Translationally Controlled Tumor Protein*) a partir de biblioteca de cDNA da
glândula produtora de veneno de aranha-marrom (*Loxosceles intermedia*)**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular, Programa de Pós-Graduação do Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Silvio Sanches Veiga

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Andrea Senff-Ribeiro

CURITIBA

2009

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 de Biologia Molecular do Paraná

PARECER

A banca examinadora, instituída pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, composta por:


Dr. Silvio Sanches Veiga

Orientador e presidente da Banca (Universidade Federal do Paraná - UFPR)


Dr. Stênio Perdigão Fragoso

(Instituto Carlos Chagas - Focruz-PR)


Dra. Larissa Magalhães Alvarenga

(Universidade Federal do Paraná - UFPR)

Como Suplente:

Dr^a. Maria Cristina Leme Godoy dos Santos

(Universidade Federal do Paraná - UFPR)

Após argüir o(a) mestrando(a) **Youssef Bacila Sade** em relação ao seu trabalho de dissertação intitulada: "**Clonagem, expressão e purificação de uma proteína da superfamília TCTP (Translationally Controlled Tumor Protein) a partir de biblioteca de cDNA da glândula produtora de veneno de aranha-marrom (*Loxosceles intermedia*)**", é de parecer favorável à **Aprovação** do(a) acadêmico(a), habilitando-o(a) ao título de **Mestre** em Biologia Celular e Molecular, área de concentração em **Biologia Celular e Molecular**.

A obtenção do título de Mestre está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas nas Normas Internas deste curso de pós-graduação.

Curitiba, 29 de outubro de 2009


Andrea Senff Ribeiro
Vice-Coordenadora do Curso



Sade, Youssef Bacila

Clonagem, expressão e purificação de uma proteína da superfamília TCTP (*Translationally Controlled Tumor Protein*) a partir de biblioteca de cDNA da glândula produtora de veneno de aranha-marrom (*Loxosceles intermedia*) – Curitiba, 2009. 90 p.

Dissertação (Mestrado) – Programa de pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

1. TCTP 2. Fator de Liberação de Histamina 3. Aranha-marrom 4. *Loxosceles intermedia* 5. Veneno

À minha mãe, que dedicou sua vida aos filhos e possibilitou a minha formação. Espero que estas palavras possam retribuir ao menos uma fração do amor incondicional que você sempre demonstrou por mim.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Silvio Sanches Veiga, pela oportunidade oferecida para trabalhar com o grupo do Laboratório de Matriz Extracelular e Biotecnologia de Venenos e pelos mais de seis anos de convívio, amizade e aprendizado.

À minha co-orientadora Prof^a. Dr^a. Andrea Senff-Ribeiro, pela influência determinante que teve no início da minha carreira científica e pelo exemplo de profissionalismo. O seu trabalho de doutorado foi a primeira defesa de tese que assisti e o que tenho até hoje como um exemplo a ser seguido.

Ao Prof. Dr. Waldemiro Gremski, pelo exemplo de dedicação de uma vida à ciência e por todos seus esforços a favor do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da UFPR.

À Prof. Dr. Olga Meiri Chaim, minha grande amiga e verdadeira orientadora da minha vida profissional e pessoal. Muito obrigado por todos os anos de aprendizado ao seu lado.

Ao Prof. Dr. Silvio Marques Zanata, pela grande amizade e por ser uma fonte inesgotável de cultura.

À Prof. Dr. Marcia Helena Appel, amiga e um grande exemplo profissional e pessoal. Muito obrigado por todos os conselhos ao longo destes anos.

Ao Prof. Dr. Rafael Bertoni da Silveira, pelo auxílio essencial e pela dedicação de anos ao Laboratório de Matriz Extracelular que permitiu a concretização de muitos projetos do grupo.

Aos colegas do IBMP, pelo acolhimento com que sempre acolheram todos de nosso laboratório e pelo exemplo de profissionalismo. Em especial ao Prof. Dr.

Stenio Perdigão Fragoso, elo exemplo de profissionalismo e competência e por aceitar fazer parte da banca de avaliação deste trabalho.

A todos os professores do Departamento de Biologia Celular da UFPR, em especial à Prof. Dr. Maria Cristina Leme Godoy dos Santos, por ter acompanhado todo o meu trabalho desde o projeto, passando pelos relatórios, e por aceitar fazer parte da banca de avaliação deste trabalho. Obrigado pelos inúmeros conselhos profissionais nas aulas e avaliações, ao menos um deles foi determinante em minha vida pessoal.

A todos os professores do Departamento de Patologia Básica da UFPR, em especial à Prof^a. Dr^a. Larissa Magalhães Alvarenga pela colaboração com os trabalhos do Laboratório de Matriz Extracelular, contribuição ao estudo de toxinas e por aceitar fazer parte da banca de avaliação deste trabalho. Obrigado também à Prof^a. Dr^a. Juliana Ferreira Moura pelos trabalhos desenvolvidos em conjunto com o grupo do laboratório.

À Luiza Helena Gremski, por sua amizade, paciência, auxílio técnico e intelectual. Também pelo exemplo pessoal e profissional.

À Dilza Trevisan Silva, pela amizade incondicional e pelo companheirismo no laboratório durante todos estes anos. Você é um exemplo de dedicação à ciência, família e amigos.

À Daniele Moreira Chaves, pela amizade e exemplo de superação pessoal e profissional.

À Valéria Pereira Ferrer, pela amizade, alegria e exemplo de força de vontade.

Aos amigos do Laboratório de Matriz Extracelular: Kátia, Jenifer, Fernando Hitomi, Thiago, Fernanda, Isabela, Mariana e Gabriel. Muito obrigado pela amizade e por todos os momentos que dividimos no laboratório. Cada um de vocês tem uma

parcela nesse trabalho, seja por sugestões, por trabalho físico ou mesmo por uma palavra de apoio. Obrigado.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Neurobiologia, pelo auxílio constante e troca de informações essenciais para que este trabalho pudesse ser concluído.

À secretária da Pós-Graduação, Marlene de Camargo, pela ajuda sempre fundamental.

A todos os funcionários do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR.

À CAPES, CNPq, Fundação Araucária e SETI, pelo apoio financeiro aos projetos do Laboratório de Matriz Extracelular.

A todos meus amigos do curso de Farmácia da UFPR e do curso de Química Ambiental do CEFET-PR, a amizade e companheirismo de vocês foram fundamentais para que eu passasse por muitas etapas de minha vida.

Aos meus familiares, em especial aos meus irmãos Bruno e Carla e meus sobrinhos Felipe e Leonardo. Obrigado por entenderem muitas de minhas ausências e pelo apoio em todos os momentos de minha vida.

Por fim, à minha esposa Mariah, pelo apoio em muitos momentos deste trabalho, sempre com alegria e palavras de carinho e estímulo. É muito tranquilizante saber que você estará ao meu lado nas etapas futuras da minha vida.

“Trabalhar um pouco para aumentar o acervo geral de conhecimento é um objetivo de vida tão respeitável quanto qualquer outro propósito semelhante.”

Charles Robert Darwin

RESUMO

Aranhas do gênero *Loxosceles*, conhecidas como aranhas-marrons, são responsáveis por acidentes em todo o mundo, com grande importância clínica no Sul do Brasil. Os venenos destas aranhas são compostos por diversas toxinas, entre elas proteínas, responsáveis pelo quadro conhecido como loxoscelismo, que se manifesta em sintomas cutâneos e/ou sistêmicos. O quadro cutâneo é o mais comum e pode levar ao desenvolvimento de uma lesão necrótica com espalhamento gravitacional, resultado de uma inflamação exacerbada que envolve a participação de mastócitos e eventos histaminérgicos. Na biblioteca de cDNA da glândula de veneno de *Loxosceles intermedia* foi identificada uma seqüência que codifica uma proteína da superfamília TCTP (*Translationally Controlled Tumor Protein*). As funções desta proteína ainda não são totalmente entendidas, mas demonstrou-se que ela atua no ambiente extracelular como um fator de liberação de histamina e está ligada a respostas alérgicas em indivíduos parasitados por nematódeos e protozoários. O alinhamento da proteína TCTP de *L. intermedia* com homólogas de outros organismos revelou um alto grau de conservação da proteína, especialmente em resíduos de aminoácidos relacionados com a interação com GTPases monoméricas. A análise filogenética mostrou que a proteína de *L. intermedia* esta agrupada com proteínas TCTP presentes na saliva de carrapatos e para as quais já foi demonstrada a atividade de liberação de histamina. Para investigar a função desta proteína no veneno de aranha-marrom, foi realizada a clonagem do cDNA que codifica a proteína em pET 14b e a expressão da proteína recombinante em *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS. A TCTP recombinante foi expressa como uma proteína fusionada com um His-Tag N-Terminal. A purificação envolveu dois passos de cromatografia, o primeiro em resina Ni²⁺-NTA agarose e o segundo em resina DEAE-Agarose. Com a proteína recombinante purificada foram produzidos anticorpos utilizados em um ensaio de *Western Blot* que evidenciou a presença da proteína TCTP no veneno de *L. intermedia*. Os dados do trabalho sugerem que a proteína possa estar envolvida nos efeitos nocivos do veneno de aranha-marrom, sendo necessários ensaios biológicos para avaliar a atividade desta proteína no veneno e seu possível papel como um fator de liberação de histamina.

Palavras-chave: TCTP, veneno, aranha, *Loxosceles*, histamina

ABSTRACT

Loxosceles genus spiders, known as brown spiders, are responsible for accidents all over the world and have clinical importance in the South of Brazil. The venom of these spiders is made up of several toxins, including proteins, which are responsible for the clinical pattern called loxoscelism, which involves cutaneous and/or systemic symptoms. Cutaneous reactions are more frequent and may lead to the development of a necrotic lesion with gravitational spreading, resulting from a dysregulated inflammatory response that involves the participation of mast cells and histaminergic events. On the cDNA library of *Loxosceles intermedia* venom gland was identified a sequence encoding a protein of the TCTP (*Translationally Controlled Tumor Protein*) superfamily. Functions of this protein are still unclear, but it was shown that it can act as a histamine releasing factor in the extracellular environment, being related to allergic responses in patients parasitized by nematodes and protozoan parasites. Sequence alignment of *L. intermedia* TCTP protein with homologous in other organisms revealed a high degree of conservation, specially in amino acids residues related to the interaction with monomeric GTPases. Phylogenetic analysis showed that *L. intermedia* TCTP protein is grouped with proteins that are present in tick's saliva and for which was demonstrated the activity of histamine releasing. To study the function of this protein in the venom of brown spiders, the cDNA that codes the protein was cloned into pET 14b and the expression of the recombinant protein was carried out in *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS. TCTP recombinant protein was expressed as a fusion protein with an N-Terminal His-Tag. Protein purification had two chromatographic steps, the first in Ni²⁺-NTA agarose resin and the latter in DEAE-Agarose resin. With the purified recombinant proteins, antibodies were produced and used in a Western Blot assay that showed the presence of TCTP protein in *L. intermedia* venom. The data of this work suggest that the protein is involved in the noxious effects of brown spider venom and biological assays are necessary to evaluate the activity of this protein in the venom, as well as its role as a possible histamine releasing factor.

Keywords: TCTP, venom, spider, *Loxosceles*, histamine

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – ARANHA-MARROM (GÊNERO <i>Loxosceles</i>).....	20
FIGURA 2 – LESÃO DERMONECRÓTICA CAUSADA POR PICADA DE ARANHA-MARROM (<i>Loxosceles reclusa</i>).....	23
FIGURA 3 – CONSERVAÇÃO, ESTRUTURA SECUNDÁRIA E MAPEAMENTO FUNCIONAL DA PROTEÍNA TCTP	35
FIGURA 4 – ESTRUTURA DA PROTEÍNA TCTP.....	36
FIGURA 5 – CONSERVAÇÃO DA PROTEÍNA TCTP DE <i>Loxosceles intermedia</i>	53
FIGURA 6 – FILOGENIA DA PROTEÍNA TCTP	55
FIGURA 7 - CLONAGEM DA PROTEÍNA TCTP DE <i>Loxosceles intermedia</i>	58
FIGURA 8 – PCR DA REAÇÃO DE LIGAÇÃO.....	60
FIGURA 9 – PCR DE COLÔNIA.....	61
FIGURA 10 – TESTE DE INDUÇÃO DA EXPRESSÃO.....	62
FIGURA 11 – PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA TCTP RECOMBINANTE EM RESINA Ni ²⁺ -NTA AGAROSE	64
FIGURA 12 – PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA TCTP RECOMBINANTE.....	67
FIGURA 13 – IMMUNOBLOTTING PARA IDENTIFICAÇÃO DA PROTEÍNA TCTP NO VENENO DE ARANHA-MARROM.....	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APS – Persulfato de amônio
BCIP – 5-bromo-4-cloro-indolil-fosfato
BOD – *Biological Oxygen Demand*
BSA – Soroalbumina bovina
cDNA – DNA complementar
DNA – Ácido desoxirribonucléico
dNTPs – Desoxirribonucleotídeos fosfatados
EDTA – Ácido etilenodiaminotetra-acético
ELISA – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*
EST – *Expressed Sequence Tag*
IgG – Imunoglobulina do tipo G
IPTG – Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
LB – Luria-Bertani
mRNA – RNA mensageiro
NBT – *Nitro blue tetrazolium*
Ni²⁺NTA – Níquel ácido nitrilo-triacético
PBS – *Phosphate buffer saline*
PCR – Reação em cadeia da polimerase
RNA – Ácido ribonucléico
SDS – Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE – *Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*
TCTP – *Translationally Controlled Tumor Protein*
TEMED – N,N,N',N'-dimetilaminoetano
UFPR – Universidade Federal do Paraná
L – Litro
mL – Mililitro
 μ L – Microlitro
M – Mol por litro
mM – Milimol por litro
 μ M – Micromol por litro
g – Grama

mg – Miligrama

µg – Micrograma

nm – Nanômetros

V – Volts

kDa – Quilodalton

mA – Miliampére

pH – Potencial de hidrogênio iônico

pI – Ponto isoelétrico

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	Objetivo Geral	19
1.2	Objetivos Específicos	19
2	REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1	Aranha-marrom e Loxoscelismo	20
2.1.1	Aranha-marrom	20
2.1.2	Epidemiologia do loxoscelismo	22
2.1.3	Manifestações clínicas no loxoscelismo	23
2.1.4	Diagnóstico do loxoscelismo	26
2.1.5	Tratamento do loxoscelismo	27
2.2	Venenos Loxoscélicos	29
2.3	TCTP (<i>Translationally Controlled Tumor Protein</i>)	33
2.3.1	O gene da proteína TCTP e características de seus mRNAs	34
2.3.2	Conservação e estrutura da proteína TCTP	35
2.3.3	Interação com proteínas G monoméricas	38
2.3.4	Regulação do ciclo celular	38
2.3.5	Ligação ao íon cálcio	39
2.3.6	Atividade antiapoptótica e câncer	40
2.3.7	A proteína TCTP como um fator de liberação de histamina	40
3	MATERIAIS E MÉTODOS	44
3.1	Reagentes	44
3.2	Animais	44
3.3	Extração do Veneno por Eletrochoque	45
3.4	Eletroforese de Proteínas em Gel de Poliacrilamida	45
3.5	Dosagem de Proteínas pelo Método de Bradford	46
3.6	Construção do Vetor de Expressão de TCTP	46
3.7	Transformação Bacteriana	47
3.8	PCR de Colônia	48
3.9	Miniprep para Sequenciamento	48
3.10	Alinhamento e Análise Filogenética	48

3.11	Expressão da Proteína TCTP Recombinante	49
3.12	Purificação da Proteína TCTP Recombinante	50
3.13	Produção de Anticorpos anti-TCTP.....	51
3.14	Western Blot	51
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
4.1	Análises da Sequência da Proteína TCTP de <i>Loxosceles intermedia</i>	53
4.2	Clonagem da Proteína TCTP de <i>L. intermedia</i>	58
4.3	Expressão e Purificação da Proteína TCTP Recombinante	63
4.4	<i>Immunoblotting</i> para detecção da Proteína TCTP no Veneno.....	69
5	CONCLUSÕES	72
	REFERÊNCIAS	74
	ANEXOS.....	86

1 INTRODUÇÃO

Aranhas-marrons, gênero *Loxosceles*, são as causadoras de maior número de acidentes com animais peçonhentos no Paraná, sendo responsáveis por mais de 50% dos casos notificados. São aranhas que, deslocadas de seu ambiente natural, passaram a viver dentro de casas e em locais de armazenamento de entulhos. Nos domicílios, são encontradas normalmente dentro de calçados, roupas e atrás de móveis ou quadros. Não são aranhas agressivas, mas quando ameaçadas defendem-se com a inoculação de veneno de forma indolor, com a percepção do acidente somente horas depois de ocorrido (DA SILVA *et al.*, 2004; APPEL *et al.*, 2005).

O veneno de aranha-marrom é composto por diversas toxinas que, quando inoculadas, geram um quadro chamado loxoscelismo. Usualmente, o acidente pode evoluir na forma cutânea e/ou sistêmica (DA SILVA *et al.*, 2004). O chamado quadro cutâneo, caracterizado pelo aparecimento de sinais como vermelhidão, coceira e dor, culminando muitas vezes na formação de uma lesão necrótica na pele, com espalhamento gravitacional a partir do ponto da picada e a presença de uma região mais esbranquiçada ao redor da ulceração, chamada placa-marmórea. Já no quadro sistêmico, conhecido também por quadro cutâneo-visceral, podem ocorrer distúrbios hematológicos, danos renais e, em raros casos, morte (CHAIM *et al.*, 2006; PETERSON, 2006).

Atualmente, diversos grupos de pesquisa estão empenhados na caracterização de componentes do veneno e no desenvolvimento de metodologias terapêuticas mais eficazes no tratamento do loxoscelismo. A produção de proteínas recombinantes do veneno da aranha representou um grande avanço na determinação da atividade de toxinas do veneno e o transcriptoma da glândula de veneno abre novas possibilidades de investigação (FERNANDES-PEDROSA *et al.*, 2008; SENFF-RIBEIRO *et al.*, 2008). Além disso, proteínas do veneno de aranha-marrom apresentam um grande potencial biotecnológico, sendo que suas aplicações incluem o estudo de processos inflamatórios, aplicação como pesticidas, ferramentas para o desenvolvimento de imunoterápicos e drogas com atuação sobre o sistema nervoso central. O entendimento molecular das toxinas do veneno e da sua ação no organismo influenciará diretamente o tratamento de pacientes e o desenvolvimento de ferramentas biotecnológicas (SENFF-RIBEIRO *et al.*, 2008).

Achados histopatológicos em pele de coelhos inoculada com veneno de *Loxosceles intermedia* revelaram a presença de trombose em vasos sanguíneos decorrente da deposição de redes de fibrina. Além disso, foi descrita também a degeneração do endotélio de vasos e infiltração de células inflamatórias. O músculo esquelético também sofre a infiltração de neutrófilos, com a presença de edema e mionecrose. Ocorre ainda a destruição da epiderme, necrose e hemorragia (OSPEDAL *et al.*, 2002).

Alguns componentes do veneno foram descritos como os principais envolvidos no desenvolvimento dos quadros cutâneo e sistêmico. No veneno estão presentes enzimas relacionadas com a degradação tecidual no local da picada. Entre elas, metaloproteases, serinoproteases e hialuronidases. Estas facilitam a penetração dos componentes do veneno e podem causar o espalhamento gravitacional e distúrbios hemorrágicos (DA SILVA *et al.*, 2004). Outras enzimas, as fosfolipases D, estão relacionadas com o desenvolvimento da dermonecrose, lesão renal e hemólise intravascular. Estas mesmas proteínas foram relacionadas com aspectos inflamatórios do veneno, como aumento na permeabilidade vascular e formação de edema. Entretanto, certos eventos iniciais no desenvolvimento da inflamação ainda permanecem obscuros. Mediadores inflamatórios liberados no local da picada ainda não foram bem caracterizados, dificultando o entendimento da resposta tecidual em um primeiro contato com o veneno (CHAIM *et al.*, 2006; RIBEIRO *et al.*, 2007).

Recentemente, trabalhos 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 presença de histamina no veneno, foi sugerido que outros componentes podem estar envolvidos na liberação de histamina de mastócitos (RATTMANN *et al.*, 2008; PALUDO *et al.*, 2009).

Na prática clínica são utilizados medicamentos que inibem granulócitos, como a dapsona. Esta inibição evita a ativação de polimorfonucleares que causam a destruição tecidual em uma resposta imune exacerbada. Além da dapsona, no tratamento do loxoscelismo também são utilizados anti-histamínicos. Juntos, estes fatos sugerem a ação presença de um componente histaminérgico no veneno, o qual pode causar a liberação de histamina de maneira direta ou indireta (HOGAN; BARBARO; WINKEL, 2004; PAULI *et al.*, 2006). De fato, são descritas em alguns

pacientes reações cutâneas localizadas, como exantema, além de reações alérgicas e de hipersensibilidade em resposta ao veneno de aranha-marrom (PIPPIRS *et al.*, 2009).

Até o momento, não foi descrita uma toxina do veneno que cause a liberação direta de histamina. Entretanto, os dados na literatura sugerem a presença de um ou mais componentes termolábeis envolvidos com a sinalização mediante receptores histamínicos e promovendo a liberação de histamina a partir de mastócitos isolados. A caracterização de um destes componentes pode representar um avanço no tratamento inicial de acidentes envolvendo aranhas-marrons (PALUDO *et al.*, 2009).

Nosso grupo produziu uma biblioteca de cDNA da glândula de veneno de *Loxosceles intermedia*, onde foi identificada uma seqüência que codifica uma proteína da superfamília TCTP (*Translationally Controlled Tumor Protein*), com alto grau de identidade com proteínas TCTP de carrapatos. Esta proteína foi identificada na saliva do carrapato *Dermacentor variabilis* e apresentou atividade de liberação de histamina em linhagem celular basofílica RBL-2H3, utilizadas como modelo de estudo de vias de sinalização em mastócitos (MULENGA *et al.*, 2003).

Rattmann *et al.* (2008) demonstraram que o veneno de *L. intermedia* apresenta efeitos dependentes de mastócitos e de histamina. Eventos iniciais da inflamação, como o aumento da permeabilidade vascular, foram relacionados com a participação de receptores histaminérgicos e serotoninérgicos. Experimentos com aorta de coelho mostraram que o veneno de aranha-marrom é capaz de causar a liberação regulada de mediadores dos mastócitos, principalmente a histamina, responsável por induzir a vasodilatação. Posteriormente, Paludo *et al.* (2009) identificaram a presença de histamina no veneno em quantidades suficientes para exercer efeitos inflamatórios. Apesar disso, o veneno dialisado, sem a presença de histamina, ainda era capaz de exercer certo efeito inflamatório dependentes de histamina, decorrente de algum outro componente presente no veneno agindo diretamente sobre os mastócitos (RATTMANN *et al.*, 2008; PALUDO *et al.*, 2009).

Tendo em vista o exposto acima, é relevante a pesquisa de uma proteína que seja capaz de atuar sobre mastócitos gerando efeitos inflamatórios no acidente loxoscélico. A TCTP pode ser uma das moléculas responsáveis por efeitos iniciais de inflamação no envenenamento, podendo ser vista como um possível alvo terapêutico para evitar a progressão da lesão dermonecrotica e dos efeitos sistêmicos do veneno.

1.1 Objetivo Geral

Clonagem, expressão e purificação de uma proteína da superfamília TCTP identificada na biblioteca de cDNA da glândula de veneno da aranha-marrom (*Loxosceles intermedia*).

1.2 Objetivos Específicos

- Clonagem da sequência codificadora da proteína TCTP identificada na biblioteca de cDNA da glândula de veneno de *L. intermedia*.
- Expressão da proteína TCTP em sistema heterólogo (*Escherichia coli*).
- Purificação da proteína TCTP por meio de técnicas cromatográficas.
- Produção de anticorpos policlonais anti-TCTP em coelhos para utilização em imunoenensaio.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aranha-marrom e Loxoscelismo

2.1.1 Aranha-marrom

Aranhas são animais artrópodes quelicerados que surgiram possivelmente no período Carbonífero, sendo que o registro fóssil mais antigo conhecido é de 300 milhões de anos atrás. Morfologicamente, são animais que possuem o corpo dividido em um prosoma (cefalotórax) não segmentado, onde estão localizados os olhos, as quelíceras, glândula de veneno e pedipalpos, e a partir do qual partem 4 pares de patas. Ligado ao prosoma está o opistosoma (abdômen), região que possui na extremidade as glândulas responsáveis pela produção do material que compõe a teia. Cada quelícera está dividida em duas partes, o segmento basal e uma porção mais rígida, a presa, que possui comumente um poro, formado a partir do ducto da glândula de veneno (RASH; HODGSON, 2002; BRUSCA; BRUSCA, 2003).

São divididas em dois grupos de acordo com a posição de suas quelíceras: Migalomorfa (quelíceras partem do cefalotórax paralelas ao eixo do corpo do animal e a presa é direcionada para baixo) e Araneomorfa (quelíceras verticais perpendiculares ao corpo do animal que, junto com as presas, movem-se como pinças). Em todo o mundo já foram descritas cerca de 40 mil espécies, divididas em aproximadamente 3.500 gêneros dentro de 110 famílias, porém apenas algumas representam verdadeiros riscos aos seres humanos (RASH; HODGSON, 2002; CORZO; ESCOUBAS, 2003).

Apesar de algumas aranhas perigosas serem encontradas no grupo das Migalomorfos, tais como os gêneros *Atrax*, *Trechona* e *Harpactirella*, no grupo Araneomorfa são encontradas os gêneros das aranhas mais venenosas: *Latrodectus* (viúva-negra), *Loxosceles* (aranha-marrom) e *Phoneutria* (armadeira). Estes gêneros são responsáveis por diversos casos graves de envenenamento, sendo descritas mortes relacionadas aos acidentes envolvendo os gêneros *Loxosceles*, *Latrodectus* e *Atrax* (ESCOUBAS; DIOCHOT; CORZO, 2000; RASH; HODGSON, 2002).

As aranhas do gênero *Loxosceles* pertencem ao filo Arthropoda, subfilo Chelicerata, classe Arachnida, ordem Araneae, sub-ordem Araneomorfa e família Sicariidae. São popularmente denominadas de aranhas-marrons, em função da coloração que varia de marrom claro a escuro, ou aranhas-violino, em função de uma marca semelhante ao instrumento presente no dorso do prosoma do animal. Os

machos possuem corpo menor e pernas relativamente mais longas do que as fêmeas (FIGURA 1). Possuem hábitos noturnos, são sedentárias e não agressivas. Preferindo a escuridão, algumas vivem sob pedras, troncos de árvores, restos vegetais, telhas e tijolos empilhados, mas podem adquirir hábitos intradomiciliares sob condições especiais. Estas aranhas possuem grande capacidade de adaptação, suportando amplas variações de temperatura (8 a 43 °C), bem como longos períodos sem água e comida (DA SILVA *et al.*, 2004; SENFF-RIBEIRO *et al.*, 2008).

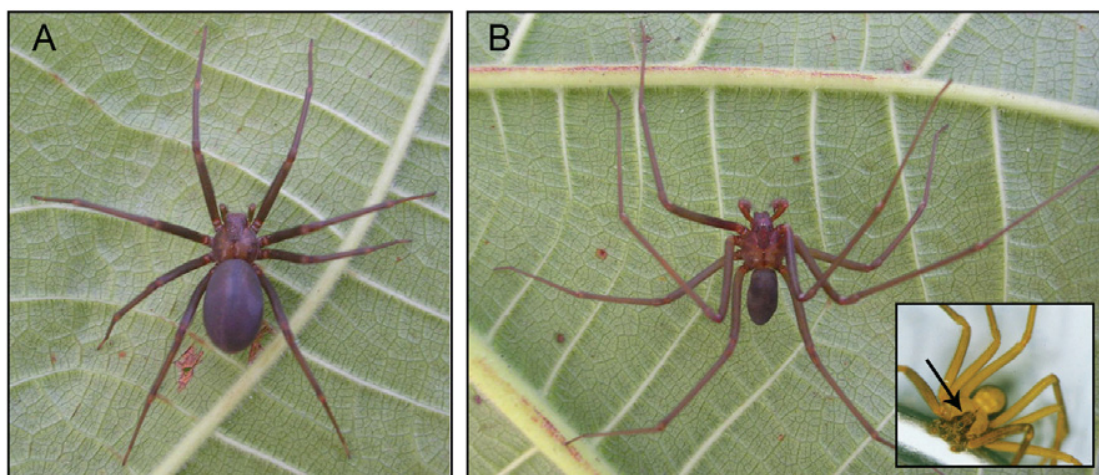


FIGURA 1 – ARANHA-MARROM (GÊNERO *Loxosceles*)

Dois animais do gênero *Loxosceles*. O gênero apresenta marcado dimorfismo sexual. A fêmea (A) possui corpo maior e pernas mais curtas em relação ao macho (B). Os animais apresentam coloração que varia de marrom claro a escuro e apresentam no dorso um sinal com formato semelhante ao de um violino contendo os 3 pares de olhos (seta, no detalhe em B). Adaptado de: Instituto Butantan, disponível no site <<http://www.butantan.gov.br/portal/Ensino>>, acessado entre os dias 20/09 e 01/10 de 2009 e de PETERSON, 2006.

As espécies dentro deste gênero alimentam-se de pequenos insetos, sendo que o veneno possui neurotoxinas com a função de paralisar e matar a presa. Tecem teias irregulares com a aparência de algodão. Possuem três pares de olhos, sendo um par central e dois pares laterais, disposição característica das aranhas do gênero *Loxosceles*. Reproduzem-se com facilidade e podem viver de 3 a 7 anos, sobrevivendo até 276 dias sem alimento. Esta grande capacidade de adaptação explica o fato de que grande número de indivíduos podem ser encontrados mesmo em condições adversas (DOS SANTOS *et al.*, 2000; DA SILVA *et al.*, 2004).

O veneno é produzido em uma glândula que possui epitélio secretor revestido por membrana basal e duas camadas de músculo estriado, uma interna e outra externa. As células do epitélio secretório são ricas em vesículas contendo veneno,

Apesar de alguns autores destacarem que o veneno é produzido por células apócrinas, a morfologia das glândulas e das células indica que o tipo de secreção é holócrina. O volume de veneno inoculado pela aranha é em torno de 4 μ L e dados a respeito da quantidade de proteínas descrevem que cerca de 60 a 100 μ g de proteínas são inoculados no momento da picada (DOS SANTOS *et al.*, 2000; DA SILVA *et al.*, 2004).

2.1.2 Epidemiologia do loxoscelismo

O gênero *Loxosceles* é amplamente distribuído pelo mundo, sendo encontrado na América do Norte, Central e do Sul, Europa, África, Ásia e Oceania. No Brasil são encontradas sete espécies deste gênero, porém apenas três delas estão envolvidas com o envenenamento humano: *Loxosceles intermedia*, *Loxosceles gaucho* e *Loxosceles Laeta*. O acidente envolvendo este tipo de aranha, denominado Loxoscelismo, apresentou um grande aumento no número de notificações na década de 90, passando a ser considerado um problema de saúde pública (SEZERINO *et al.*, 1998; DA SILVA *et al.*, 2004). A aranha normalmente não é violenta, e acidentes ocorrem geralmente em função de uma reação de defesa da aranha quando é comprimida por um indivíduo no ato de vestir roupas ou durante o sono. A grande maioria dos acidentes ocorre em períodos de maior calor, sendo descritos aumentos no número de casos entre outubro e março ou entre setembro e fevereiro (SEZERINO *et al.*, 1998; MÁLAQUE *et al.*, 2002).

No Brasil, o loxoscelismo é mais freqüente na região Sul do País, que contabilizou entre 1990 e 1993, 95% dos casos envolvendo aranhas do gênero *Loxosceles*. Na cidade de Curitiba (PR) e região metropolitana são relatados em torno de dois a três mil casos por ano. Apesar de a espécie *L. laeta* possuir uma distribuição geográfica mais ampla e ser encontrada nos mesmos locais que a *L. intermedia*, esta última responde por grande parte dos acidentes na região sul do País (GONÇALVES DE ANDRADE; LOURENÇO; TAMBOURGI, 2000; MÁLAQUE *et al.*, 2002). O desenvolvimento de hábitos intradomiciliares, alterações climáticas e a grande mobilidade e tolerância para conviver com o filhote, favorecem a proliferação da *L. intermedia* em diferentes ambientes, o que ajuda a explicar o maior número de casos envolvendo esta espécie (MARQUES-DA-SILVA; FISCHER, 2005).

Dados mais atuais do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) do Ministério da Saúde mostram que acidentes com aranhas estão em terceiro lugar na lista de acidentes com animais peçonhentos notificados no período de 2001 a 2008, representando 18,55% do total de acidentes notificados com gênero do animal identificado. O Estado do Paraná concentra 47,86% de todos os casos envolvendo aranhas, sendo o primeiro estado em número de acidentes envolvendo este tipo de animal e o segundo estado em número de acidentes com animais peçonhentos, ficando atrás apenas de Minas Gerais. No mesmo período, do total de acidentes com aranhas, considerando-se somente as notificações com identificação do animal, o gênero *Loxosceles* responde por 65,33% dos casos. Dos acidentes com estes animais, o Sul do país contabiliza 94,33% das notificações e o Paraná 75,80%. Curitiba e Região Metropolitana são responsáveis por 59,21% das notificações nacionais de acidentes com *Loxosceles* e por 78,12% das notificações estaduais envolvendo estes animais (SINAN, 2009).

Os dados do SINAN mostram que o menor número de acidentes com aranhas-marrons em Curitiba ocorre no inverno. O mês de julho geralmente apresenta o menor número de casos. A partir da primavera os casos voltam a subir, tendo seu pico no verão, em janeiro e fevereiro. Em Curitiba, 61% dos acidentes com *Loxosceles* ocorrem com mulheres, e a maioria dos casos (75,32%), considerando homens e mulheres, foram considerados leves. No período de 2001 a 2006, apenas 4 óbitos foram registrados na cidade de Curitiba em decorrência de acidentes com aranhas-marrons. Grande parte dos acidentes (41,05%) ocorreu com adultos jovens na faixa de 20 a 39 anos e 23,46% na faixa de 40 a 59 anos (SINAN, 2009).

2.1.3 Manifestações clínicas no loxoscelismo

O grande número de notificações no sul e sudeste do país fez com que o quadro clínico desenvolvido pelos pacientes acidentados fosse bem caracterizado pelo Ministério da Saúde. O quadro desenvolvido no envenenamento pode evoluir clinicamente de duas formas: quadro cutâneo (87 – 98% dos casos) e a forma sistêmica (1 – 13% dos casos) (FUNASA, 2001). A evolução do loxoscelismo depende de diversos fatores como: da espécie agressora, sexo, estágio de desenvolvimento e do animal, além da quantidade de veneno inoculada. Andrade et

al. (1999) verificou que a fração do veneno de 35 kDa, associada com os eventos tóxicos do veneno, está presente nas aranhas em sua forma ativa a partir do terceiro instar. A partir deste estágio, até a idade adulta, esta fração do veneno apresenta atividade crescente. Características dos pacientes como idade, sexo e local da picada também determinam a evolução clínica nos casos de envenenamento (GUILHERME; FERNANDES; BARBARO, 2001).

O quadro cutâneo ou dermonecrótico caracteriza-se por um ponto avermelhado e pouco dolorido no local da picada, que evolui para uma lesão necrótica na pele com espalhamento gravitacional, em torno de 12 a 48 horas após a picada (FIGURA 2) (APPEL *et al.*, 2005; MILLER; ORTEGON; MCDANIEL, 2007). A lesão característica começa a manifestar-se a partir de 6 horas com dor em queimação, abscesso, pontos de hemorragia e áreas pálidas em função da isquemia (placa marmórea). Existe ainda a ocorrência de edema e eritema, cuja intensidade varia em função do tecido atingido (HOGAN; BARBARO; WINKEL, 2004). Observações de biópsias da pele de indivíduos acidentados mostram intenso infiltrado inflamatório, trombose, hemorragia, eritema, dermatite e necrose da derme e epiderme. Dentro de 3 a 7 dias a lesão pode evoluir para uma grande úlcera auto-limitada. Em alguns casos, é necessária uma cirurgia reparadora no local da lesão (SEZERINO *et al.*, 1998; DA SILVA *et al.*, 2004; APPEL *et al.*, 2005).

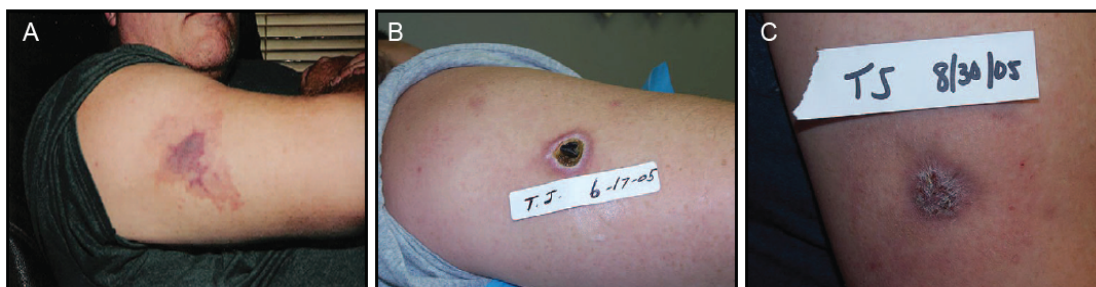


FIGURA 2 – LESÃO DERMONECRÓTICA CAUSADA POR PICADA DE ARANHA-MARROM (*Loxosceles reclusa*)

Loxoscelismo cutâneo em decorrência de acidente envolvendo aranha-marrom (*Loxosceles reclusa*). É possível observar a progressão da lesão, desde o dia de o início da lesão até sua cura (A – C). Em A, é possível observar a placa marmórea, com pontos de hemorragia e regiões mais pálidas em razão da isquemia, além do característico espalhamento gravitacional. Em B, a lesão já instalada, com necrose tecidual e abscesso no centro, circundada por um halo branco isquêmico e mais externamente a coloração violácea devido ao eritema. Em C, a cicatrização dois meses e meio após a picada. Adaptado de: MILLER; ORTEGON; MCDANIEL, 2007.

Análises histológicas de tecidos sob efeito do veneno de aranha-marrom mostram a presença de infiltrado leucocitário, hemorragia, dermatite, eritema, inflamação e necrose da derme e epiderme. Nas primeiras horas já são observados efeitos como edema, grande presença de leucócitos e deposição intravascular de rede de fibrina com o surgimento de trombos. Em 12 horas já é vista a desorganização das células da derme e infiltração leucocitária nas fibras de músculo esquelético. A partir de 24 horas ocorre desorganização das fibras de colágeno, destruição de vasos sanguíneos e necrose muscular e dérmica (OSPEDAL *et al.*, 2002). A ação do veneno como um ativador de células endoteliais, estimulando a liberação de moléculas pró-inflamatórias e a adesão de polimorfonucleares, leva a uma resposta inflamatória descontrolada que resulta nas lesões dermonecroticas (PATEL *et al.*, 1994). Outros sintomas manifestam-se juntamente com o quadro local, tais como: febre, dores de cabeça, prurido, petéquias, exantema, náuseas e vômitos (DA SILVA *et al.*, 2004).

A segunda forma de evolução do loxoscelismo é o envolvimento sistêmico, o chamado quadro cutâneo-visceral. Ocorre em menor parte dos casos, geralmente em acidentes causados pela espécie *Loxosceles laeta*, com maior gravidade em crianças e idosos, podendo ser fatal (MÁLAQUE *et al.*, 2002; HOGAN; BARBARO; WINKEL, 2004; APPEL *et al.*, 2005). Normalmente os sintomas aparecem em entre 48 e 72 horas após a picada, porém existem relatos de casos de manifestação do loxoscelismo sistêmico 24 horas após o acidente (HOGAN; BARBARO; WINKEL, 2004). Os principais sintomas do quadro sistêmico são distúrbios hemolíticos, além do comprometimento local e as manifestações sistêmicas já descritas acima. Pode ocorrer lesão renal, coagulação intravascular disseminada, hemólise intravascular, aumento da bilirrubina indireta, icterícia e trombocitopenia. Quadros sistêmicos podem ainda evoluir para uma insuficiência renal aguda, maior responsável pelas mortes relacionadas ao loxoscelismo (DA SILVA *et al.*, 2004; CHAIM *et al.*, 2006). Alterações hepáticas também já foram descritas, com aumento dos níveis séricos de enzimas hepáticas e alterações do metabolismo do fígado de animais tratados com veneno de aranha-marrom e a enzima fosfolipase D (DE OLIVEIRA CHRISTOFF *et al.*, 2008).

O quadro de injúria renal já foi descrito como sendo resultado dos distúrbios da hemostase e da reação inflamatória exacerbada em resposta ao veneno, porém foi descrito que componentes do veneno podem ligar-se diretamente a estruturas

renais, causando o dano renal de maneira direta (TAMBOURGI *et al.*, 1998; CHAIM *et al.*, 2006). Análises histológicas em rins de camundongos (animais que não desenvolvem lesão dermonecrótica) tratados com veneno de aranha-marrom mostraram eritrócitos presentes na cápsula de Bowman, colapso glomerular, morte de células no epitélio tubular, bem como deposição de material protéico no lúmen dos túbulos renais e, por fim necrose tubular (LUCIANO *et al.*, 2004). 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 àquelas causadas pelo veneno total, além de ligar-se a células renais com efeito citotóxico dependente de sua atividade catalítica (CHAIM *et al.*, 2006; KUSMA *et al.*, 2008).

2.1.4 Diagnóstico do loxoscelismo

O diagnóstico de picadas de aranhas do gênero *Loxosceles* geralmente é feito baseado nos sintomas apresentados pelo paciente e pela evolução da lesão, uma vez que a picada geralmente não é sentida e, frequentemente, então a aranha não é capturada. Ainda não existem ensaios laboratoriais para diagnóstico de envenenamento por *Loxosceles* disponíveis comercialmente, portanto parâmetros laboratoriais como hemoglobinúria, hemoglobina sérica, bilirrubina indireta, lactato desidrogenase, creatina quinase, entre outros, são essenciais para o diagnóstico e avaliação da severidade do envenenamento (HOGAN; BARBARO; WINKEL, 2004).

Foi descrito um ensaio de inibição de hemaglutinação, utilizando exudatos de lesões dermonecróticas, baseado na capacidade de o veneno inibir a hemaglutinação de eritrócitos previamente tratados com veneno. Apesar da alta sensibilidade e especificidade, o teste não chegou a ser testado em humanos e mostrou-se insatisfatório para o diagnóstico laboratorial (BARRETT; ROMINE-JENKINS; BLICK, 1993). Em contrapartida, vários ensaios de ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) para o diagnóstico laboratorial do loxoscelismo já foram descritos (SENEFF-RIBEIRO *et al.*, 2008). A presença de veneno em biópsia das lesões e no soro dos pacientes pode ser detectada vários dias após o acidente, porém são necessárias mais análises de correlação clínica para que estes ensaios venham a ser eficientemente utilizados e, então, disponibilizados comercialmente (DA SILVA *et al.*, 2004; HOGAN; BARBARO; WINKEL, 2004).

Muitas condições clínicas são erroneamente diagnosticadas como acidente loxoscélico, portanto deve ser realizado diagnóstico diferencial para uma série de doenças como vasculite, infecções bacterianas e herpes, entre outras. O diagnóstico precoce da picada abre caminho para evitar o desenvolvimento da lesão, porém, após certa evolução da dermonecrose, o tratamento é apenas sintomático (APPEL *et al.*, 2005; SWANSON; VETTER, 2006).

2.1.5 Tratamento do loxoscelismo

Diversos tratamentos são descritos para o loxoscelismo, porém o tratamento clássico inclui a administração de Dapsona, Ácido Acetilsalicílico e antibióticos. Apesar de seus efeitos adversos, a administração precoce de Dapsona pode reduzir a dor e o desenvolvimento da lesão dermonecrótica, pois atua como um inibidor da degranulação de polimorfonucleares. Apesar dos diversos estudos, a eficácia terapêutica da Dapsona no tratamento do loxoscelismo não é certa. Assim mesmo, o medicamento continua a ser prescrito por médicos nos Estados Unidos e no Brasil. Neste, o tratamento com Dapsona 50 – 100 mg/dia é preconizado pelo Ministério da Saúde (FUNASA, 2001; HOGAN; BARBARO; WINKEL, 2004).

A utilização de corticóides é muito discutida, porém é consenso que os corticóides sejam de preferência administrados nos casos sistêmicos, o que é feito no Brasil. Entretanto, quando a aranha é identificada como sendo *L. intermedia* ou *L. laeta* deve-se iniciar o tratamento com Prednisona, mesmo sem a existência de uma lesão aparente. O papel imunossupressor dos corticóides teria importância fundamental na redução da resposta imune exacerbada gerada pelo envenenamento (DA SILVA *et al.*, 2004; HOGAN; BARBARO; WINKEL, 2004).

O tratamento com soro antiloxosceles iniciou-se no Brasil no início de 1960, com a produção de anticorpos de cavalo que reconhecem o veneno de *Loxosceles*. Apesar disso, ainda existem discordâncias a respeito da efetividade do soro como agente neutralizante do veneno e do período ideal para sua administração (HOGAN; BARBARO; WINKEL, 2004). No Brasil estão disponíveis dois tipos de soro: antiloxoscélico (anticorpos produzidos contra venenos de *L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta*) e antiaracnídico (feito a partir de uma mistura de venenos de aranhas, *L. gaucho* e *Phoneutria nigriventer*, e de escorpiões, *Tityus serrulatus* e *Tityus bahiensis*). Peru e México também produzem comercialmente o soro antiloxoscélico

(PAULI *et al.*, 2006). A utilização do soro, muitas vezes combinado com corticóides ou Dapsona, aparenta ser segura, sendo que são verificadas reações anafiláticas leves (urticária e náuseas) em apenas 20% dos casos (MÁLAQUE *et al.*, 2002).

No Brasil o soro é utilizado como tratamento em aproximadamente 60% dos casos. Em contraste, no estado do Paraná no período de 1990 a 1995 em apenas 11,9% dos casos foi utilizado o soro. A utilização do soro é indicada pelo Ministério da Saúde somente nas 36 primeiras horas após a picada e dependendo do grau de severidade do acidente. A opção por este tratamento fica a cargo dos estados, baseados em suas experiências clínicas (FUNASA, 2001). Enquanto no Paraná o soro só é utilizado nas primeiras 24 horas e em casos considerados moderados e graves, em São Paulo o soro é utilizado em 70% dos casos. Por exemplo, no Hospital Vital Brasil, no Instituto Butantan, o soro é utilizado para lesões cutâneas até 72 horas após a picada e em caso de comprometimento sistêmico a soroterapia é sempre utilizada, independente do momento da picada (PAULI *et al.*, 2006).

O grande problema na administração do soro antiveneno é a demora do paciente em procurar auxílio médico, uma vez que a picada não é percebida de imediato e a eficácia do soro é tempo-dependente. Muitas vezes o paciente procura atendimento médico entre 24 e 72 horas após a picada, quando os sintomas locais já estão instalados e, muitas vezes, em estado avançado (PAULI *et al.*, 2006). Apesar de não existirem estudos que permitam correlacionar o tipo de tratamento com a evolução dos casos de loxoscelismo, estudos em modelos animais mostram que a aplicação do soro antiveneno possui potencial terapêutico. A administração do soro minimiza os efeitos cutâneos e sistêmicos do envenenamento, quando empregada até 12 horas após a picada. A utilização de soro até 48 horas após a picada mostrou efeito na redução da área da lesão dermonecrótica (PAULI *et al.*, 2006; PAULI *et al.*, 2009).

Alguns autores descrevem a possibilidade do uso de Tetraciclina tópica para o tratamento e neutralização da lesão dermonecrótica causada pela picada de aranha-marrom. Apesar do pouco entendimento a respeito de seu mecanismo na inibição da lesão, a Tetraciclina agiria por um mecanismo não antimicrobiano ligando metais divalentes e inibindo a ação de metaloproteases endógenas cuja expressão seria estimulada pela ação do veneno sobre a pele (KING, 2007). A utilização de antibióticos também é indicada para prevenção de infecções secundárias por

patógenos presentes na pele ou mesmo nas presas da aranha (HOGAN; BARBARO; WINKEL, 2004).

Alguns autores sugerem o uso de anti-histamínicos para o tratamento do loxoscelismo, apesar da eficácia no tratamento ser controversa (ANDERSON, 1997; WENDELL, 2003; PAULI *et al.*, 2006). Enquanto a administração tópica de anti-histamínicos parece ineficaz, o uso parenteral do medicamento foi relacionado com a atenuação das manifestações cutâneas 12 horas após o início do tratamento (SCHENONE, 2003; YIGIT *et al.*, 2008). Apesar de não ser um protocolo no Brasil, a administração de anti-histamínicos no tratamento do loxoscelismo está de acordo com trabalhos que relacionam efeitos inflamatórios iniciais do veneno com eventos dependentes de receptores de histamina. A utilização de anti-histamínicos teria efeito reduzindo a degranulação de mastócitos e, conseqüentemente, a quantidade de histamina liberada no acidente com a aranha-marrom. Mesmo com todas as evidências, ainda não foi identificada no veneno uma molécula que promova a liberação de histamina a partir de mastócitos, o que embasaria ainda mais o tratamento com anti-histamínicos (RATTMANN *et al.*, 2008; PALUDO *et al.*, 2009).

2.2 Venenos Loxoscélicos

A utilização do veneno pelas aranhas aparenta ter sido um acontecimento precoce na história evolutiva desta ordem. A grande função do veneno é paralisar e matar a presa, ainda que possua provavelmente a função secundária de iniciar a digestão externa da vítima. Uma função de defesa contra predadores também não pode ser descartada, uma vez que algumas aranhas só injetam o veneno quando em perigo. Aranhas do gênero *Loxosceles* utilizam o veneno para matar suas presas, mas também podem utilizá-lo como um mecanismo de defesa quando comprimidas, motivo pelo qual ocorrem os acidentes com seres humanos. Todas as aranhas, com exceção da família Uloboridae, possuem todo o aparato para produção e injeção de um veneno geralmente composto por proteínas com ação tóxica e enzimática, além de peptídeos e compostos orgânicos e inorgânicos (RASH; HODGSON, 2002; CORZO; ESCOUBAS, 2003).

O veneno de *Loxosceles* é composto basicamente por enzimas e moléculas biologicamente ativas produzidas por glândulas situadas no cefalotórax da aranha.

No veneno são encontradas proteínas de alta massa molecular pouco expressas 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. A análise proteômica do veneno destas três espécies confirmou a presença de inúmeras proteínas com diferentes pontos isoelétricos nesta região. Além disso, o perfil eletroforético em gel bidimensional revela que o veneno de *L. intermedia* possui mais componentes de baixa massa molecular (14 a 25 kDa) do que o veneno das outras espécies avaliadas. Polipeptídios (3 a 8 kDa) podem estar envolvidos com a neurotoxicidade do veneno, o que facilitaria a captura de insetos. Estudos de identificação e caracterização das toxinas presentes no veneno de *Loxosceles* revelaram a presença de metaloproteases, fosfolipases D, hialuronidases, serino-proteases, além de fosfatase alcalina e 5'-fosfohidrolase ribonucleotídica (VEIGA *et al.*, 2000; DA SILVA *et al.*, 2004; DE CASTRO *et al.*, 2004; MACHADO *et al.*, 2005).

O grande conteúdo de proteases levantou a questão a respeito da pureza do veneno, uma vez que a extração por eletrochoque poderia causar a liberação do conteúdo estomacal causando a contaminação do veneno proveniente da glândula. No veneno de *L. intermedia* extraído por eletrochoque foram identificadas duas serino-proteases específicas, fato que sugere a ausência de contaminantes estomacais, uma vez que o esperado seria a presença de proteases de amplo espectro no caso de contaminação. Posteriormente, proteases já descritas anteriormente foram identificadas no veneno obtido diretamente das glândulas de aranhas do gênero *Loxosceles*. Foi demonstrada também a similaridade do conteúdo protéico dos venenos obtidos pelos dois métodos. Juntos, os dados minimizam a interferência da egesta como contaminante do veneno analisado em laboratório, o que não pode ser descartado quando são considerados os acidentes envolvendo a aranha (VEIGA *et al.*, 2000; DA SILVEIRA *et al.*, 2002).

Uma vez que a função do veneno é paralisar e matar a presa, grande parte de seus componentes são toxinas que atuam no sistema nervoso. Até o momento, as neurotoxinas identificadas nos venenos de aranhas pertencem a um dos três grupos: proteínas, polipeptídios e acilpoliaminas. Proteínas de alta massa molecular (cerca de 110 kDa), como as latrotoxinas, são responsáveis pela liberação de neurotransmissores. As acilpoliaminas possuem alta atividade inseticida, causando a paralisação de insetos mediante bloqueio da transmissão neuromuscular.

Polipeptídios, com massa entre 3 e 8 kDa têm como alvo canais iônicos de membrana (ESCOUBAS; DIOCHOT; CORZO, 2000; RASH; HODGSON, 2002).

No veneno de *Loxosceles intermedia* foram identificados três componentes relacionados com sua atividade inseticida. A partir da sequência aminoacídica parcial foi possível clonar os inseticidas a partir do cDNA da glândula de veneno de aranha-marrom (*L. intermedia*). Assim, foi possível obter as sequências que codificam três diferentes polipeptídios inseticidas (LiTx 1, 2 e 3), com peso molecular entre 5,6 – 7,9 kDa. As análises filogenéticas sugerem que estes polipeptídios atuem em canais de sódio e cálcio (DE CASTRO *et al.*, 2004).

Dos componentes presentes no veneno de *Loxosceles intermedia*, as proteínas melhor caracterizadas são as pertencentes à família de toxinas dermonecróticas ou família Loxtox, e estão envolvidas com os efeitos mais tóxicos do veneno. Esta família é composta por 6 grupos de proteínas, separadas com base na análise filogenética das toxinas descritas por diversos autores. As proteínas desta família são expressas na glândula de veneno de *Loxosceles*, possuem diversas regiões conservadas, apresentam resíduos de aminoácidos conservados em seu sítio catalítico, exibem um peptídeo sinal hidrofóbico e possuem massa molecular em torno de 30 a 33 kDa. A nomenclatura das proteínas da família deve ser feita utilizando o termo Loxtox (Lox, de *Loxosceles* e tox, de toxina), acrescentando a inicial do segundo nome da espécie e uma numeração adequada. (KALAPOTHAKIS *et al.*, 2007).

As toxinas dermonecróticas são encontradas em diversas espécies do gênero *Loxosceles* e são enzimas do tipo fosfolipase D. Muitas delas estão envolvidas com a formação da lesão dermonecrótica, indução de resposta inflamatória, hemólise, agregação plaquetária, citotoxicidade, aumento da permeabilidade vascular, nefrotoxicidade e letalidade. O mecanismo de ação destas toxinas ainda não foi totalmente esclarecido, mas acredita-se que a hidrólise de lipídios, gerando mediadores como ceramida-1-fosfato e ácido lisofosfatídico, possa ativar determinadas vias de sinalização, causando alterações fisiopatológicas e os efeitos deletérios destas toxinas (KUSMA *et al.*, 2008; SENFF-RIBEIRO *et al.*, 2008; CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2009).

Outros componentes do veneno possivelmente relacionados com a atividade tóxica são as metaloproteases. Primeiramente descritas no veneno de *L. intermedia*, foram caracterizadas como sendo moléculas de baixa massa molecular com

atividade fibronectinolítica e fibrinogenolítica (20-28 kDa) e gelatinolítica (32-35 kDa). Posteriormente foram descritas metaloproteases nos venenos de *L. laeta*, *L. gaucho* e *Loxosceles rufescens*. Recentemente foi descrita a identificação de uma metaloprotease do tipo astacina (dependente de zinco) no veneno de *L. intermedia*, com massa molecular próxima de 29 kDa, semelhante à massa de metaloproteases descritas anteriormente para esta espécie. A atividade dessas metaloproteases está possivelmente relacionada a distúrbios hemostáticos decorrentes tais como hemorragia da derme, injúria de vasos sanguíneos e como um fator de espalhamento gravitacional (característico do loxoscelismo) e sistêmico, facilitando a penetração dos outros componentes do veneno (DA SILVEIRA; WILLE *et al.*, 2007; SENFF-RIBEIRO *et al.*, 2008).

As hialuronidases também estão possivelmente relacionadas com os efeitos nocivos do veneno de aranha-marrom. Foram descritas hialuronidases de diferentes massas moleculares em diferentes espécies do gênero *Loxosceles* (no caso da *L. intermedia* foram descritas duas hialuronidases, com massas de 41 e 43 kDa). A enzima possui atividade de hidrolase e é capaz de degradar ácido hialurônico e condroitin sulfato, presentes na matriz extracelular, funcionando como um fator de espalhamento do veneno. Da mesma maneira, proteases que degradam componentes da matriz extracelular ou de membranas basais podem estar envolvidas com distúrbios hemorrágicos, agravamento da lesão dermonecrótica e aumento da permeabilidade vascular. Também são descritas na literatura duas serino-proteases (85 e 95 kDa) com atividade gelatinolítica, possivelmente relacionadas com a atividade tóxica do veneno de *L. intermedia* (DA SILVA *et al.*, 2004; DA SILVEIRA; CHAIM *et al.*, 2007).

Todos os componentes descritos agem de maneira sinérgica para produzir o efeito nocivo do veneno. Os mecanismos pelos quais ocorre a lesão celular e tecidual não são totalmente conhecidos, bem como os mediadores inflamatórios envolvidos no acidente com a aranha-marrom. Diversos autores destacam o papel da histamina e mastócitos 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 a degranulação de mastócitos e com o conteúdo de histamina no veneno, suficiente para induzir respostas inflamatórias (RATTMANN *et al.*, 2008; PALUDO *et al.*, 2009).

2.3 TCTP (*Translationally Controlled Tumor Protein*)

A proteína TCTP, do inglês *Translationally Controlled Tumor Protein*, foi identificada no final dos anos 80, por três grupos diferentes que pesquisavam proteínas reguladas a nível traducional. À época, a proteína foi chamada por diferentes nomes (P21, Q23 e P23). Atualmente, alguns autores ainda enfatizam alguma atividade específica da proteína ao nomeá-la: fortilina, relacionado com sua atividade antiapoptótica, e HRF (do inglês *histamine releasing factor*), que enfatiza a atividade extracelular da proteína. Entretanto, o nome TCTP é o mais utilizado atualmente na literatura, e sugerido como um nome menos específico. Nas últimas três décadas, diversos grupos passaram a mostrar interesse no entendimento da função biológica desta proteína, uma vez que ela possui diversas propriedades biológicas e seu papel nos organismos não é bem esclarecido (GACHET *et al.*, 1999; BOMMER; THIELE, 2004).

Esta proteína de baixa massa molecular (aproximadamente 20 kDa) é amplamente expressa em diversos organismos e em 26 tecidos humanos, o que aponta para um papel fundamental em vias bioquímicas ou de sinalização. De fato, a proteína TCTP é essencial para o desenvolvimento embrionário e proliferação celular em camundongos e em *Drosophila*. Além disso, ela possui a capacidade de ligar cálcio e estabilizar microtúbulos, sendo esta propriedade relacionada com um possível envolvimento no controle do ciclo celular (BOMMER; THIELE, 2004; HINOJOSA-MOYA *et al.*, 2008).

Extracelularmente, é capaz de degranular mastócitos provocando a liberação de histamina, normalmente em pacientes parasitados ou com alergia. Esta liberação de histamina pode ser dependente ou independente de IgE e acredita-se que possa existir a participação de um receptor específico de TCTP que leva à ativação dos mastócitos. Um fato curioso é que, apesar de ser encontrada em fluidos biológicos de pacientes asmáticos ou parasitados e na saliva de carrapatos, o mRNA que codifica a proteína não codifica um peptídeo sinal de secreção e até o momento nenhuma proteína precursora foi descrita. Acredita-se que esta proteína seja secretada com auxílio de uma proteína transmembrana, utilizando um via não-

clássica de secreção, chamada de exossomos (BHEEKHA-ESCURA *et al.*, 2000; HINOJOSA-MOYA *et al.*, 2008).

A proteína TCTP possui um alto grau de conservação em todo o reino animal. Aproximadamente 50% de todos seus resíduos de aminoácidos são conservados. O grau de conservação desta proteína em plantas é semelhante. As TCTPs de eucariotos possuem alto grau de identidade e são totalmente conservadas em espécies do mesmo gênero. Não existe descrição de uma proteína semelhante em bactérias, indicando que o seu surgimento ocorreu após a separação entre procariotos e eucariotos. Além disso, a análise filogenética da proteína TCTP mostra que a sua evolução reflete a história evolutiva dos organismos eucariotos. (VENUGOPAL, 2005; HINOJOSA-MOYA *et al.*, 2008).

2.3.1 O gene da proteína TCTP e características de seus mRNAs

O gene da proteína TCTP, chamado TPT1, foi estudado em coelhos e foi descrito que o gene é organizado em cinco íntrons e seis éxons, totalizando cerca de 3820 pares de base. O promotor flanqueia a região 5', distante 1200 pares de base e possui a *TATA Box* na posição -30, bem como sítio para ligação de fatores de transcrição. A transcrição do gene gera dois RNAs mensageiros de diferentes tamanhos (com diferentes regiões 3'-UTR, formadas por poliadenilação alternativa), sendo o mRNA longo mais estável e menos abundante em tecidos humanos, quando comparado ao mRNA curto. A região 5'-UTR do mRNA possui uma região rica em pirimidina (THIELE *et al.*, 1998; THIELE *et al.*, 2000). Foi demonstrado ainda que alterações nos níveis de cálcio intracelular podem estimular a transcrição do gene TPT1 e também regular a tradução do mRNA (XU; BELLAMY; TAYLOR, 1999). Diversas outras situações já foram relacionadas com a expressão do gene TPT1, tais indução do crescimento celular, ciclo circadiano, ativação de macrófagos, resposta a diferentes tipos de estresse e indução de apoptose (BOMMER *et al.*, 2002).

Estudos da estrutura do mRNA codificador da proteína TCTP revelaram que ele forma uma estrutura secundária extensa. Esta estrutura secundária foi relacionada com a ativação do eIF4E (fator eucariótico de iniciação da tradução), da quinase p70^{S6K} (que fosforila a proteína ribossomal S6) e com a ativação de uma

quinase dependente de RNA dupla-fita (PKR). A ativação desta última suprime a tradução do mRNA de TCTP. Portanto, fica claro que a estrutura secundária do mRNA regula outros componentes celulares envolvidos na tradução deste RNA. Os mecanismos moleculares de regulação da tradução ainda não foram totalmente compreendidos, porém é consenso que a proteína TCTP é regulada nos níveis traducional e transcricional (BOMMER *et al.*, 2002; BOMMER; THIELE, 2004). O gene da proteína em plantas ainda não foi estudado, mas foi demonstrado que a proteína TCTP possui papel fundamental na regulação do crescimento (BERKOWITZ *et al.*, 2008).

Alguns autores destacam a possibilidade de que a TCTP possa estar presentes em dois *pools* celulares, um relacionado com a proliferação celular e outro relacionado com a comunicação celular e liberação de histamina. Esta hipótese é reforçada pela evidência de que o gene desta proteína em mamíferos é transcrito em dois diferentes mRNAs, e que estes aparecem em proporções desiguais em diferentes tecidos. Existem outras possibilidades, como a existência em alguns animais de mais de um gene para TCTP ou a ocorrência de *splicing* alternativo. Porém, o fato de que animais que possuem um único gene codificando TCTP podem ou não secretar a proteína deixa claro que a diferente expressão tecidual e a regulação da sua localização são fatores determinantes da função (THIELE *et al.*, 2000; AMZALLAG *et al.*, 2004; HINOJOSA-MOYA *et al.*, 2008).

2.3.2 Conservação e estrutura da proteína TCTP

A análise da estrutura secundária da seqüência de TCTP de diferentes grupos taxonômicos mostra que resíduos de aminoácidos totalmente conservados estão localizados principalmente em um lado do núcleo de segmentos em conformação β , sugerindo que esta região possa ser relevante para interações moleculares da proteína. Foi mapeado o domínio de ligação a microtúbulos, semelhante ao domínio presente na proteína MAP-1B (proteína de associação a microtúbulos), contendo predominância de resíduos de ácido glutâmico e lisina. Também foi mapeado um novo sítio de ligação a cálcio, diferente dos sítios comumente associados à ligação do metal. Tanto o sítio de ligação a microtúbulos como o sítio de ligação a cálcio são coincidentes e estão em uma porção α -hélice da proteína entre os resíduos 79 – 123 (numeração para seqüência protéica de TCTP de rato), sendo esta a porção mais

básica e carregada da proteína (FIGURA 3) (GACHET *et al.*, 1999; KIM *et al.*, 2000; BOMMER; THIELE, 2004).

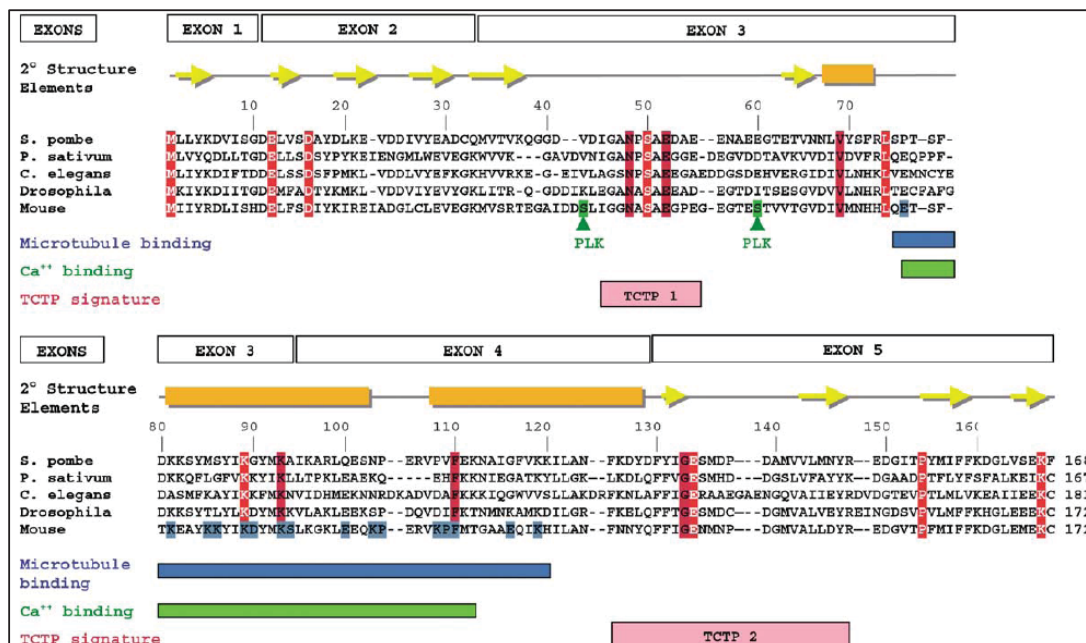


FIGURA 3 – CONSERVAÇÃO, ESTRUTURA SECUNDÁRIA E MAPEAMENTO FUNCIONAL DA PROTEÍNA TCTP

Alinhamento das proteínas TCTP de *Schizosaccharomyces pombe*, *Pisum sativum*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* e *Mus musculus*. A numeração é referente à seqüência de *S. pombe*. Resíduos conservados estão destacados em vermelho. Resíduos da seqüência de camundongo envolvidos na ligação de microtúbulos em MAP-1B estão destacados em azul. As regiões de ligação a microtúbulos e de ligação a cálcio estão indicadas por uma barra azul e verde, respectivamente. Resíduos de Serina fosforilados pela quinase Plk estão destacados em verde. Elementos da estrutura secundária de TCTP de *S. pombe* estão localizados acima do alinhamento, sendo folhas β representadas por flechas amarelas e α -hélices representadas por barras laranjadas. As assinaturas TCTP1 e TCTP 2 estão indicadas por barras cor-de-rosa (BOMMER; THIELE, 2004).

A estrutura do sítio de ligação a cálcio de TCTP humana determinada por ressonância magnética nuclear mostrou que o sítio de ligação a cálcio é maior do que o previamente determinado. Existe a participação de resíduos Asn131, Gln133 e Asp150, conservados em espécies contendo proteínas TCTP ligantes de cálcio (FENG *et al.*, 2007). Existem ainda duas seqüências consenso: a assinatura TCTP1 ([IFAED] - [GA] - [GASF] - N - [PAK] - S - [GTA] - E - [GDEVCF] - [PAGEQV] - [DEQGAV]), na região do *loop* móvel que une dois segmentos da folha β C, e a assinatura TCTP2 ([FLIV] - x(4) - [FLVH] - [FY] - [MIVCT] - G - E - x(4,7) - [DENP] - [GAST] - x - [LIVM] - [GAVI] - x(3) - [FYWQ]), que contém resíduos conservados de um segmento da folha β A e da folha β D bem como do *loop* que une as duas folhas.

A região C-terminal (102 – 172) que contém a assinatura TCTP2 é responsável pela interação da proteína TCTP com a uma porção citoplasmática da bomba $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase e inibindo sua atividade (THAW *et al.*, 2001; JUNG *et al.*, 2004).

Até o momento, foram determinadas as estruturas terciárias de TCTP em solução de *Schizosaccharomyces pombe* e *Homo sapiens* (por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear) e a estrutura cristalográfica de TCTP de *Plasmodium knowlesi* e *Homo sapiens* (Difração de Raio-X) (THAW *et al.*, 2001; FENG *et al.*, 2007; HINOJOSA-MOYA *et al.*, 2008). A análise destas estruturas revela que a proteína é composta por 4 folhas beta (A – D) e 3 α -hélices (H1, H2 e H3). As hélices H2 e H3 estão compactadas formando um grampo que contém aminoácidos dos sítios de ligação a microtúbulos e cálcio (FIGURA 4).

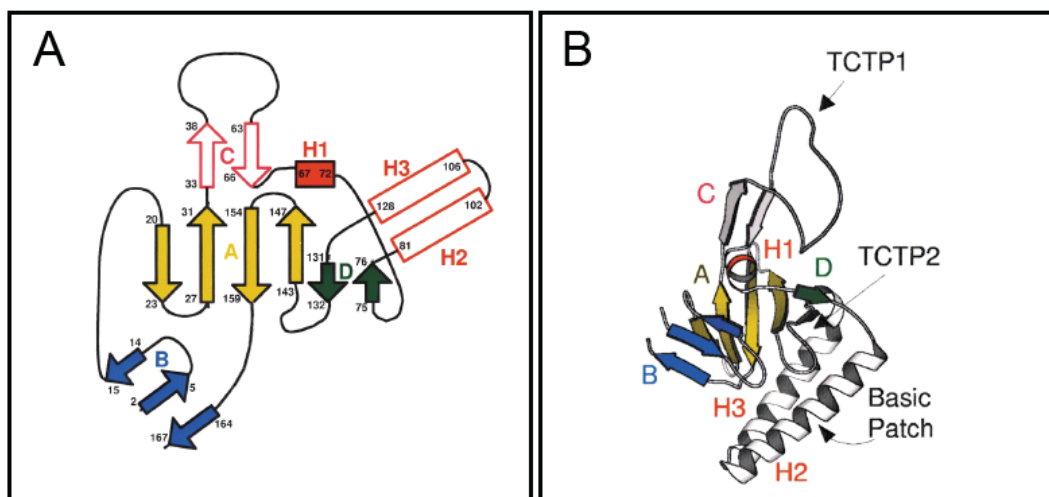


FIGURA 4 – ESTRUTURA DA PROTEÍNA TCTP

Estrutura secundária e terciária da proteína TCTP. Em A, um esquema de como estão organizados os elementos da estrutura secundária da proteína TCTP. A proteína possui quatro folhas β (A – D), representadas por setas, e três α -hélices (H1, H2 e H3), representadas por retângulos. Em B, a estrutura tridimensional da proteína TCTP, onde estão apontadas por setas as regiões onde se localizam as assinaturas TCTP1 e TCTP2, bem como o domínio mais básico da molécula na α -hélice H2. Adaptado de: THAW *et al.*, 2009.

A análise destas estruturas revela que a proteína é composta por 4 folhas β e 3 α -hélices, sendo que regiões pertencentes a 3 folhas β e uma α -hélice apresentam similaridade estrutural com chaperonas Mss4, ligante de proteínas Rab quando livre de nucleotídeos. Esta proteína é classificada como uma GFC (do inglês, *guanine nucleotide-free chaperones*). Foi postulado que três resíduos de aminoácidos conservados (Glu12, Leu74 e Glu134, sendo que neste caso a numeração é para

seqüência de TCTP de *S. pombe*) estão envolvidos na ligação da proteína TCTP a proteínas G, sugerindo que o controle da proliferação pela TCTP ocorra através de interação com GTPases (THAW *et al.*, 2001).

2.3.3 Interação com proteínas G monoméricas

Foi descrito que em *Drosophila* a TCTP atua como um GEF (do inglês, *guanine exchange factor*) ou uma proteína acessória para ativação da GTPase Rheb, um importante componente da via de sinalização da proteína mTOR, que tem papel central no controle do ciclo e da proliferação celular (HSU *et al.*, 2007). A mesma atividade foi descrita para proteínas Mss4. Entretanto, a atividade de GEF foi questionada por outros autores, em função da modesta taxa de troca de nucleotídeos e pelo fato de que alterações nos níveis de TCTP não afetam algumas proteínas na via mTOR em que a Rheb está presente, como seria esperado. A atuação da proteína TCTP como um GEF da Rheb ainda é muito controversa e recentemente Dong *et al.* (2009) sugeriram o mecanismo molecular desta possível função biológica da proteína, afirmando que a TCTP acelera a troca GDP-GTP da Rheb e regula positivamente a via mTOR (REHMANN *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2008; DONG *et al.*, 2009).

Outro exemplo da interação com proteínas G é seu envolvimento inibindo fatores de alongamento na síntese proteica eEF1A e eEF1Bbeta (CANS *et al.*, 2003; LANGDON; VONAKIS; MACDONALD, 2004). É sugerido que proteínas TCTP secretadas com atividade de liberação de histamina não possuem conservação nos aminoácidos responsáveis pela ligação a proteínas G. Porém, a análise de seqüências de proteínas TCTP sabidamente liberadoras de histamina não corrobora esta hipótese, pois é evidenciada a liberação de histamina mesmo por proteínas que possuem os três resíduos Glu12, Leu74 e Glu134 conservados (HINOJOSA-MOYA *et al.*, 2008).

2.3.4 Regulação do ciclo celular

Entre as possíveis funções da proteína TCTP está a regulação do ciclo celular. Durante o ciclo celular, a proteína permanece ligada a microtúbulos e desliga do fuso mitótico após a metáfase. Antes da entrada da célula no ciclo celular ocorre um

grande aumento na concentração de TCTP, que permanece estável durante as fases G1, S e G2. É possível observar a proteína ligada ao fuso mitótico durante a mitose, sendo que da anáfase em diante não é mais observada ligação aos microtúbulos. Além disso, células que superexpressam a proteína TCTP têm sua morfologia alterada e crescimento reduzido. Durante a mitose, a TCTP é fosforilada por uma pólo-quinase (Plk), sendo que em camundongos os sítios de fosforilação da TCTP foram identificados como sendo dois resíduos de serina. A ação da pólo-quinase causa o desligamento da TCTP do fuso mitótico no final da metáfase e possui um papel fundamental na progressão da anáfase. Por suas propriedades de estabilização dos microtúbulos, a TCTP superexpressa em células leva a uma redução no crescimento celular e alterações de morfologia. É sugerido ainda que a TCTP possa servir como uma proteína mediadora da interação entre microtúbulos do citoesqueleto e mitocôndrias (GACHET *et al.*, 1999; YARM, 2002; RINNERTHALER *et al.*, 2006).

2.3.5 Ligação ao íon cálcio

Além das propriedades descritas anteriormente, a TCTP foi descrita como uma nova proteína ligadora de cálcio. Os sítios de ligação do metal foram identificados e não possuem homologia com regiões já descritas de proteínas ligadoras de cálcio. O primeiro sítio foi descrito para a TCTP de rato, na região entre os aminoácidos 81 e 112. Estudos estruturais mostraram que os aminoácidos Asn131, Gln133 e Asp150 (numeração relativa à proteína TCTP de *Homo sapiens*) podem formar um sítio de coordenação para o metal, o que poderia ser feito por qualquer aminoácido Glx e Asx. Este sítio não coincide com a região descrita primeiramente e é possível que a diferença dos dois trabalhos resida no fato de que os primeiros autores trabalharam com a proteína desnaturada para determinação da região ligante de cálcio. O estudo da estrutura do sítio sugere que é fundamental a disposição tridimensional dos aminoácidos Glx e Asx para que ocorra a ligação ao íon cálcio. Apesar de um estudo sugerir o papel da TCTP no transporte de cálcio em células de trofoblastos e de acreditar-se que a ligação ao cálcio pode estar relacionada com o controle do ciclo celular, nada mais preciso foi descrito (KIM *et al.*, 2000; ARCURI *et al.*, 2005; FENG *et al.*, 2007; HINOJOSA-MOYA *et al.*, 2008).

2.3.6 Atividade antiapoptótica e câncer

A atividade antiapoptótica da TCTP fez com que alguns autores a chamassem de fortalina. Esta proteína é capaz de interagir e estabilizar a proteína Mcl-1 (da família das proteínas Bcl-2, que regulam a ativação de procaspases), homóloga da própria Bcl-2, que liga Bax e inibe a liberação do citocromo c da mitocôndria. Inicialmente, Zhang *et al.* (2002) sugeriram que a Mcl-1 seria uma chaperona da proteína TCTP, estabilizando-a. Entretanto, trabalhos posteriores mostraram que a proteína TCTP liga-se a Mcl-1 e a estabiliza por impedir sua degradação pela via de ubiquitinação. Portanto, a chaperona seria a TCTP, que quando não é expressa, impede que a proteína Mcl-1 seja dobrada de maneira correta, acelerando sua degradação pela via de ubiquitinação dependente de proteossomo. Outra hipótese é que a TCTP atue como um co-fator de Mcl-1, permitindo sua atividade biológica (LI; ZHANG; FUJISE, 2001; ZHANG *et al.*, 2002; LIU *et al.*, 2005).

Apesar de ter sido nomeada uma proteína de tumor, a TCTP pode ser encontrada em diversos tecidos normais. Sua expressão tende a ser aumentada em alguns tipos de tumores e a proteína já foi indicada como candidata a marcador tumoral ou alvo terapêutico em câncer pulmonar, colorretal, hepático e ósseo (KIM *et al.*, 2008; NIFOROU *et al.*, 2008; ZHU *et al.*, 2008; SLABY *et al.*, 2009). Além disso, o silenciamento do gene da proteína TCTP por siRNA em células de câncer de próstata reduz o crescimento celular e induz a apoptose (GNANASEKAR *et al.*, 2009). Foi ainda verificada a redução da expressão da proteína TCTP em células de câncer de cólon em resposta ao tratamento com Oxilaplatin (YAO *et al.*, 2009). A proteína TCTP também foi identificada como um possível alvo da droga Artemisina (fármaco antimalárico e tóxico para células cancerosas) capaz de alquilar e inativar a proteína presente no citoplasma de *Plasmodium falciparum* (BHISUTTHIBHAN; MESHNICK, 2001; EFFERTH, 2007; TELERMAN; AMSON, 2009).

2.3.7 A proteína TCTP como um fator de liberação de histamina

Cerca de dez anos após sua identificação, a proteína TCTP foi descrita como uma molécula que possui a capacidade de liberar histamina de basófilos e foi chamada de fator de liberação de histamina (HRF). Este foi encontrado no plasma de pacientes alérgicos na fase tardia e agranulócitos de pacientes com dermatite

atópica. Posteriormente, verificou-se que a proteína não possuía somente a capacidade de liberar histamina, mas também induzia a liberação de interleucinas de basófilos (IL-4 e IL-13) e eosinófilos (IL-8). Além disso, no ambiente extracelular, a TCTP funciona como um fator de crescimento e de ativação de linfócitos do tipo B (MACDONALD *et al.*, 1995; KANG *et al.*, 2001; MACDONALD *et al.*, 2001).

A princípio, acreditava-se que a TCTP agia como um fator de liberação de histamina apenas de basófilos de doadores humanos que possuíam em sua superfície um tipo específico de IgE, denominado então IgE+. Moléculas de IgE que não causavam liberação de histamina dependente de TCTP foram denominadas IgE-. Assim, acreditava-se que a liberação de histamina em basófilos dependia da ligação da proteína TCTP a moléculas de IgE na superfície. Posteriormente, verificou-se que mesmo células que não expressavam receptor de IgE em sua superfície sofriam ação do fator de liberação de histamina, mostrando que existe uma via independente de IgE na liberação de histamina mediada por TCTP. Atualmente, a hipótese mais difundida é de que a proteína TCTP possui seu próprio receptor em basófilos, o que ainda não foi demonstrado (MACDONALD *et al.*, 1995; WANTKE *et al.*, 1999; VONAKIS *et al.*, 2008).

Até os dias de hoje, o mecanismo pelo qual a TCTP induz a liberação de histamina é pouco conhecido. Análises de citometria de fluxo revelaram que a proteína liga-se à superfície de basófilos humanos de doadores responsivos ou não à TCTP. O tratamento de basófilos com TCTP inicia um processo de sinalização semelhante ao mediado por IgE, pela ativação da enzima Syk quinase com fosforilação de MEK e ERK, entretanto sem a fosforilação do receptor de IgE e por uma via diferente da que é induzida por IL-3. A degranulação de basófilos em resposta à proteína TCTP depende ainda de PIP3, ativação de PI3K e Akt (VONAKIS *et al.*, 2008).

O aumento da expressão de TCTP foi relacionado com diversos eventos de sinalização intracelular. Foi demonstrada a fosforilação do receptor de fator de crescimento EGFR, sugerindo-se que esta ativação seja mediada por Src quinase em razão da inativação da bomba Na⁺-K⁺ ATPase, como ocorre no tratamento de células com oubaína. A ativação do EGFR gera a conseqüente ativação das vias que envolvem Ras/Raf/Erk, PI3K/Akt e PLC- γ /PKC. Como evidenciado em tumores, a superexpressão de TCTP é um estímulo à sobrevivência celular. A via PI3K/Akt está relacionada com a redução da apoptose, e a inibição de Akt aumenta a

apoptose mesmo em células com a expressão de TCTP aumentada (KIM; JUNG; LEE, 2009).

Além de ser encontrada em pacientes com alergia, a proteína TCTP com atividade liberadora de histamina é secretada por diversos nematódeos no organismo hospedeiro, induzindo eosinofilia e liberação de histamina a partir de basófilos. Estes dados sugerem que a TCTP está envolvida com a resposta inflamatória em indivíduos parasitados. Parasitas como *Schistosoma mansoni*, *Brugia malayi* e *Wuchereria bancrofti* possuem a capacidade de secretar a proteína TCTP no organismo hospedeiro (GNANASEKAR *et al.*, 2002; RAO *et al.*, 2002).

Além destes, o *Plasmodium falciparum*, causador da malária, também secreta TCTP no organismo hospedeiro e a TCTP recombinante de *P. falciparum* é capaz de causar a liberação de histamina de basófilos e de IL-8 de eosinófilos. Acredita-se que a TCTP possa ter um papel na proliferação celular do *P. falciparum*, bem como sua capacidade de liberar histamina possa auxiliar o parasita em dispersão pelo organismo hospedeiro. Sabe-se que a droga artemisinina, utilizada para o tratamento da malária, liga-se diretamente à proteína TCTP e que cepas resistentes à droga apresentam maior expressão desta proteína (WALKER *et al.*, 2000; MACDONALD *et al.*, 2001).

Em artrópodes, a proteína TCTP já foi descrita em 62 espécies. O maior número de proteínas descritas está na classe dos insetos, sendo que apenas na família Drosophilidae já foram encontradas 14 proteínas. Na classe dos aracnídeos foram descritas 9 proteínas TCTP, sendo 8 de carrapatos e apenas duas em aranhas, uma delas da aranha *Lycosa singoriensis* e outra na aranha-marrom *Loxosceles laeta*. Mulenga *et al.* (2003) demonstraram que a proteína TCTP é expressa em diversos tecidos do carrapato *Dermacentor variabilis*, inclusive na glândula salivar. A partir da biblioteca de cDNA desta glândula, foi clonada e expressa uma proteína TCTP recombinante que mostrou-se capaz de liberar histamina a partir da linhagem celular basofílica RBL-2H3. A saliva do carrapato, na qual foi demonstrada a presença da proteína TCTP, também possuiu atividade de liberação de histamina. Posteriormente, o mesmo grupo de pesquisadores mostrou que outros três carrapatos (*Dermacentor andersoni*, *Boophilus microplus* e *Amblyomma americanum*) expressam a proteína TCTP, todas com alto grau de similaridade com a TCTP de *D. variabilis* (MULENGA *et al.*, 2003; MULENGA; AZAD, 2005). Uma TCTP com atividade liberadora de histamina também foi

identificada no carrapato de galinhas *Dermanyssus gallinae* e foi utilizada como alvo dos anticorpos em uma potencial vacina (BARTLEY *et al.*, 2009).

Em carrapatos, a função de liberação de histamina da proteína TCTP pode estar envolvida com a alimentação, aumentando a vasodilatação e facilitando a ingestão de sangue, mas esta hipótese não é um consenso (BARTLEY *et al.*, 2009). Com base nos dados de que a proteína TCTP de diversos parasitas é secretada no organismo hospedeiro fundamenta-se a hipótese de que ela possa estar envolvida em processos patológicos na resposta do hospedeiro e na resistência dos parasitas a drogas. O alto grau de conservação da proteína desde eucariotos unicelulares até plantas e animais sugere que a atividade de citocina foi adquirida tardiamente na história evolutiva da proteína (BOMMER; THIELE, 2004).

Os dados da literatura mostram que a proteína TCTP no ambiente extracelular pode apresentar uma atividade do tipo citocina. Apesar de ser uma proteína citoplasmática, ela é secretada por uma via não clássica ainda pouco estudada. Apesar da grande quantidade de dados gerados a respeito das funções desta proteína, suas funções, tanto como citocina quanto como proteína *housekeeping*, ainda não são completamente entendidas. O estudo da proteína TCTP em outros animais pode ajudar na compreensão de sua função celular, bem como revelar novas características desta proteína.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes

Os sais, compostos orgânicos, ácidos e solventes orgânicos utilizados no trabalho foram adquiridos da Merck (Darmstad, Alemanha). Da Sigma (St. Louis, EUA) foram adquiridos a Soro Albumina Bovina, β -mercaptoetanol, marcadores de massa molecular utilizados nos géis de poliacrilamida, adjuvante de Freund completo e incompleto, além dos anticorpos anti-IgG de coelho conjugados com fosfatase alcalina utilizados no ensaio de Western Blot. A imunoglobulina G (IgG) antiveneno utilizada no Western Blot foi produzida em coelhos neozelandeses por nosso laboratório. Os reativos BCIP e NBT, bem como o brometo de etídio, utilizado para visualização de géis de DNA, foram adquiridos da Promega (Madison, EUA). Da GibcoBRL (Bethesda, EUA) foram adquiridos Glicina, Tris, Acrilamida e bis-Acrilamida (para preparo da solução de poliacrilamida), TEMED e Dodecil Sulfato de Sódio (SDS). O corante Azul de Coomassie Brilhante R-250 foi adquirido da Amresco (Solon, EUA). Para quantificação de proteínas, foi adquirido da Bio-Rad (Hercules, EUA) o reativo Dye Reagent Concentrate, contendo corante Azul de Coomassie, Ácido Fosfórico e Metanol. Da empresa Fermentas (Burlington, Canadá) foram adquiridos os reagentes para biologia molecular: marcadores de massa molecular, enzimas *Pfu* e *Taq* polimerase, ligase e enzimas de restrição XhoI e BamHI, juntamente com os tampões necessários, além dos dNTPs e do IPTG. Os oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR foram produzidos sob encomenda pela Bioneer (Daejeon, Coréia do Sul). Para o cultivo de bactérias foram utilizados no preparo dos meios de triptona, extrato de levedura e ágar-ágar adquiridos da HiMedia (Mumbai, Índia). Os antibióticos ampicilina e cloranfenicol foram adquiridos da USB (Cleveland, EUA). A agarose e a resina Ni^{2+} -NTA agarose foram adquiridas da Invitrogen (Carlsbad, EUA).

3.2 Animais

Para extração de veneno foram utilizadas aranhas adultas da espécie *Loxosceles intermédia* 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 produção de anticorpos foram utilizados coelhos neozelandeses pesando entre 2 e 3 kg. 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 340 (Em anexo).

3.3 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).

3.4 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 Mini-PROTEAN 3 (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 (Amresco, Ohio, EUA) 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).

3.5 Dosagem de Proteínas pelo Método de Bradford

A dosagem de proteínas foi realizada pelo método de Azul de Coomassie, descrito por Bradford (1976), adaptado para leitura em leitor de placas de 96 *wells* (Meridian ELX 800). O método baseia-se na diferença de coloração em que o Azul de Coomassie pode se encontrar. Ao ligar-se a proteínas, o reativo passa da coloração vermelha para azul, sendo sua absorvância determinada em 595 nm. A curva padrão foi construída com diferentes quantidades (0,25 µg – 2,00 µg) de Soro Albumina Bovina e as amostras foram diluídas para entrarem na região de linearidade da curva. O volume total de cada ponto da curva e das amostras foi de 20 µL. O reativo para dosagem de proteínas Dye Reagent Concentrate foi diluído adicionando uma parte do reativo em 4 partes de água. Foram adicionados 200 µL do reativo diluído em cada ponto da curva e nas amostras, e após 5 minutos de incubação foi determinada a absorvância em 595 nm. Os pontos da curva e as amostras foram lidos em duplicatas.

3.6 Construção do Vetor de Expressão de TCTP

Com base nos clones presentes na biblioteca de cDNA da glândula de veneno de aranha-marrom (*Loxosceles intermedia*) produzida em nosso laboratório (CHAIM *et al.*, 2006), foi realizada uma busca de possíveis seqüências que codificassem proteínas com potencial biotecnológico ou possivelmente relacionadas com os efeitos nocivos do veneno de aranha-marrom. Utilizando o programa de alinhamento local BLAST (disponível no site <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>>) foi identificada a seqüência completa codificadora de uma proteína da superfamília TCTP. Após a pesquisa bibliográfica, decidiu-se pela expressão da proteína, uma vez que ela poderia estar envolvida com a liberação de histamina em resposta ao veneno da aranha. Para a clonagem da seqüência em um vetor de expressão, foram desenhados primers específicos para adição dos sítios de restrição *Xho*I e *Bam*HI às extremidades da seqüência presente em vetor pSPORT. Foi realizada reação de PCR para amplificação da seqüência e inserção dos sítios utilizando a enzima *Pfu* Polimerase. Para esta reação foram utilizados tampão para *Pfu* Polimerase (1X) contendo MgSO₄, dNTPs (0,2 mM), primers específicos (0,4 µM), cDNA em pSPORT (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; 1 ciclo 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 software Quantity One – SW (Bio-Rad, Hercules, EUA). A banda correspondente à seqüência de interesse foi recortada com auxílio de bisturi e o DNA extraído com kit de extração de DNA (PerfectPrep Gel Extractio Kit, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha). O fragmento extraído foi digerido seqüencialmente com as enzimas *XhoI* e *BamHI* a (0,5 U/µg DNA, 16h a 37 °C) e inserido em vetor pET14b, também digerido com as mesmas enzimas nas mesmas condições. A reação de ligação foi feita utilizando: tampão ligase (1X); T4 DNA ligase (3 U/ µl); inserto e vetor provenientes da digestão. O volume final da reação foi de 20 µl 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.

3.7 Transformação Bacteriana

A construção foi então transformada em cepa bacteriana *Escherichia coli* DH5α quimiocompetente. Todos os materiais utilizados no procedimento foram previamente refrigerados. À uma alíquota de 100 µl contendo bactérias *E. coli* DH5α 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, com leve homogeneização em alguns momentos. 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, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 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 agar-ágar 15 g/L) suplementado com ampicilina (100 µg/mL) e incubadas a 37 °C em incubadora do tipo BOD, por 16h.

3.8 PCR de Colônia

Para identificar as colônias que incorporaram a construção, foi realizado PCR de colônia com primers 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); MgCl₂ (1,5 mM); primer específico reverse e primer T7 promoter (0,2 mM); *Taq* Polimerase (1,25 U/50 µl). 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; 1ciclo 72 °C/10 min; 1 ciclo de espera a 4 °C/ infinito. O produto do PCR foi analisado em gel de agarose 2%.

3.9 Miniprep para Sequenciamento

Os clones transformados escolhidos 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 plasmídios para reação de seqüenciamento. Para o PCR de seqüenciamento foi utilizado o DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit (GE Healthcare, Piscataway, EUA), utilizando a miniprep descrita anteriormente como molde e primers específicos e primers T7 e T7 Terminator. O seqüenciamento foi realizado em seqüenciador automático ABI Prism 377 (Applied Biosystems, Foster City, EUA). As seqüências obtidas foram analisadas e então escolhidos os clones para transformação em cepa de expressão. A seqüência 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.

3.10 Alinhamento e Análise Filogenética

A análise filogenética da proteína TCTP de *Loxosceles intermedia* foi construída com base em 29 seqüências de proteínas TCTP de diferentes organismos obtidas no banco de dados GenBank (acesso no site:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=protein>>). As espécies e os números de acesso das sequências utilizadas foram os seguintes: *Giardia lamblia* (XP_768559), *Leishmania major* (CAJ05086), *Trypanosoma cruzi* (XP_806523), *Entamoeba histolytica* (XP_656616), *Plasmodium falciparum* (NP_703454), *Plasmodium knowlesi* (P84152), *Schistosoma mansoni* (AAL11633), *Schizosaccharomyces pombe* (NP_594328), *Candida albicans* (EAK99010), *Hydra vulgaris* (Q94587), *Homo sapiens* (AAG17927), *Bos Taurus* (XP_589936), *Pan troglodytes* (XP_513682), *Mus musculus* (NP_033455), *Rattus norvegicus* (XP_576332), *Wuchereria bancrofti* (AAK71499), *Brugia malayi* (P90697), *Caenorhabditis elegans* (CAB02099), *Drosophila melanogaster* (AAF54603), *Apis mellifera* (XP_623154), *Aedes aegypti* (Q1HR79), *Dermacentor andersoni* (AAY67699), *Dermacentor variabilis* (AAL75585), *Ixodes scapularis* (AAY66972), *Boophilus microplus* (AAY67698) e *Amblyomma americanum* (AAY67700). O alinhamento das proteínas foi realizado no programa ClustalX2 no modo de alinhamento múltiplo. A árvore filogenética foi construída com auxílio do programa MEGA 4.0 a partir do alinhamento gerado anteriormente pelo programa ClustalX2. Na construção da árvore foi utilizado o método de Máxima Parcimônia e a árvore consenso foi obtida a partir de 1000 replicatas e enraizada com a seqüência da proteína TCTP de *Giardia lamblia*, organismo mais próximo de um ancestral eucarioto (HINOJOSA-MOYA *et al.*, 2008).

3.11 Expressão da Proteína TCTP Recombinante

A proteína TCT foi expressa como uma proteína de fusão, contendo um His-Tag N-Terminal para possibilitar sua purificação. As construções corretas confirmadas por seqüenciamento 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 e cloranfenicol 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 absorbância em

550 nm. Quando as culturas atingiram a absorbância entre 0,4 e 0,6 foi adicionado o indutor IPTG em diferentes concentrações (0,05; 0,1; 0,5; 1,0; 2,5 e 5,0 mM) e coletadas amostras em diferentes tempos (0,5; 1; 2; 3; 4; 5 e 6h) de expressão a 30 °C . As amostras foram analisadas por eletroforese em gel SDS-PAGE 12,5% em condições redutoras (5% de β -mercaptoetanol).

Para expressão em larga escala, uma colônia isolada contendo a construção foi inoculada em 10 mL de meio LB contendo ampicilina e cloranfenicol e incubada por 16h a 37 °C em incubadora do tipo *shaker*, com agitação vigorosa. A cultura saturada foi inoculada na diluição de 1:100 em 1 litro de meio LB contendo antibióticos. Quando a cultura atingiu absorbância entre 0,4 e 0,6 foi adicionado o indutor IPTG na concentração de 0,1 mM e a cultura incubada por 4 h a 23 °C. A temperatura mais baixa possibilita o aumento na solubilidade da proteína recombinante. A cultura foi centrifugada (9000 x g, 9 minutos) e ressuspensa em 40 mL de tampão de ligação (fosfato sódico 50 mM pH 8,0, NaCl 500 mM, imidazol 10 mM e lisozima 1 mg/mL). A suspensão bacteriana foi congelada a -80 °C por 16h.

3.12 Purificação da Proteína TCTP Recombinante

A purificação da proteína recombinante expressa foi realizada por cromatografia de afinidade em resina Ni²⁺-NTA. A suspensão de células foi descongelada e lisada por 6 ciclos de 10s de sonicação a baixa intensidade. O lisado foi centrifugado (9000 x g, 15 minutos) e o sobrenadante incubado por 1h a 4 °C com 1 mL de resina Ni²⁺-NTA agarose em agitação moderada. A suspensão foi empacotada em coluna plástica e lavada exaustivamente com o tampão de lavagem (fosfato sódico 50 mM pH 8,0, NaCl 500 mM, imidazol 20 mM), sendo a absorbância em 280 nm monitorada durante todo o procedimento de purificação. A proteína foi eluída quando a absorbância atingiu 0,01, utilizando-se tampão de eluição (fosfato sódico 50 mM pH 8,0, NaCl 500 mM, imidazol 250 mM). O eluato foi analisado por eletroforese em gel SDS-PAGE 12,5% sob condições redutoras e a proteína obtida dialisada contra PBS pH 7,2.

Uma vez que a proteína obtida não se encontrava pura, o eluato da cromatografia de afinidade foi dialisado contra tampão Bis-Tris (Bis-Tris 20 mM, 10 mM NaCl, pH 7,2) e ligado em resina trocadora de ânions DEAE-Agarose Bio-Gel (Bio-Rad, Hercules, EUA) por 30 minutos a 4 °C em agitação moderada. A

suspensão foi empacotada em coluna de vidro e a eluição realizada mediante incremento na concentração de cloreto de sódio, sendo o pico da eluição na concentração de 25 mM de NaCl. A ligação e a eluição da proteína foram monitoradas pela leitura da absorbância em 280 nm e alíquotas da proteína purificada foram analisadas por eletroforese em gel SDS-PAGE 12,5% sob condições redutoras. A proteína purificada foi dialisada contra PBS pH 7,2.

3.13 Produção de Anticorpos anti-TCTP

Para verificar a presença da proteína TCTP no veneno bruto de *L. intermedia*, foram produzidos anticorpos anti-TCTP. Para isso, a proteína recombinante purificada emulsionada com adjuvante completo de Freund foi injetada em coelhos em 3 pontos de aplicação (sendo uma aplicação subcutânea e duas intramusculares), num total de 20 µg de proteína. Foram realizados mais 3 reforços, com intervalo de duas semanas entre cada um e utilizando adjuvante de Freund incompleto. Doze dias após a última imunização, o sangue foi coletado da veia auricular em tubos de vidro. Os tubos de vidro permaneceram em incubadora do tipo BOD a 37 °C durante uma hora, para a formação de coágulo. A retração do coágulo foi obtida pela manutenção dos tubos em refrigerador a 4 °C durante 16 h. A presença de anticorpos no soro analisada por Western Blot.

3.14 Western Blot

O ensaio de Western Blot foi realizado para identificar a presença da proteína de TCTP no veneno de aranha-marrom. Após eletroforese em SDS-PAGE 12,5%, as proteínas foram transferidas do gel para membranas de nitrocelulose (Whatman, Dassel, Alemanha) com aplicação de voltagem constante (25 V) por 16 horas em tampão de transferência. As membranas de nitrocelulose foram cortadas em fitas e bloqueadas com PBS contendo caseína por 1 hora à temperatura ambiente. Para detecção da proteína TCTP no veneno, fitas contendo 40 µg de veneno de aranha-marrom foram incubadas com soro de coelhos pré-ímmunes e hiperímmunes à proteína TCTP recombinante (1:2000) por 2 horas à temperatura ambiente. Para verificar a reatividade de IgG anti-veneno com a proteína TCTP, fitas contendo 5 µg da proteína TCTP recombinante foram incubadas com 25 µg/mL de IgG de coelhos pré-

imunes e hiperimunes ao veneno de aranha marrom. Em seguida, as membranas foram lavadas e incubadas com anticorpo secundário anti-IgG de coelho na diluição 1:1000, conjugado à fosfatase alcalina. Para revelação é utilizado um substrato para enzima fosfatase alcalina, o composto BCIP. Após a remoção do grupamento fosfato pela enzima, o BCIP forma um dímero insolúvel na reação com composto NBT (Promega, Madison, EUA) (HARLOW; LANE, 1988).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análises da Sequência da Proteína TCTP de *Loxosceles intermedia*

Analisando-se as sequências presentes na biblioteca de cDNA da glândula de veneno da aranha marrom (*Loxosceles intermedia*), foi identificada uma sequência que codifica uma proteína da superfamília TCTP (*Translationally Controlled Tumor Protein*). Além de suas funções de regulação do ciclo celular, é conhecida a ação desta proteína como fator de liberação de histamina no ambiente extracelular. Como já destacado anteriormente, alguns autores relacionaram os efeitos nocivos do veneno à sua ação histaminérgica (BOMMER; THIELE, 2004; RATTMANN *et al.*, 2008; PALUDO *et al.*, 2009). Juntos, estes dados baseiam a hipótese de que a proteína TCTP, produzida na glândula de veneno da aranha marrom, seja inoculada juntamente com o veneno, causando danos teciduais relacionados à liberação de histamina. A seqüência protéica obtida a partir da tradução da sequência de TCTP presente na biblioteca de cDNA possui alto grau de identidade com proteínas homólogas de parasitas como *Plasmodium falciparum*, *Schistosoma mansoni* e o carrapato *Dermacentor variabilis*, todas já descritas como fatores de liberação de histamina (FIGURA 5).

O alinhamento da sequência da proteína TCTP de *Loxosceles intermedia* com a sequência de proteínas TCTP de outros 13 organismos mostra que a proteína TCTP é muito conservada em diferentes espécies. Dos 172 aminoácidos que compõem a proteína, 9 estão em posições totalmente conservadas e outros 19 estão em posições em que ocorre conservação ou substituição conservativa. A proteína TCTP de aranha marrom apresenta conservados os aminoácidos relacionados com a ligação a GTPases e aminoácidos total ou parcialmente conservados nos sítios de ligação a microtúbulos e a cálcio. A proteína apresenta aminoácidos do tipo Glx e Asx no sítio de coordenação do íon cálcio (Asp129, Gln131 e Glu148), além de conservação nos aminoácidos do sítio de ligação a cálcio descrito inicialmente. Este fato sugere que a capacidade de ligar cálcio pode estar preservada na proteína TCTP de *L. intermedia*. Entretanto, foi demonstrado que proteínas TCTP de carrapatos que possuem o sítio de coordenação conservado são incapazes de ligar cálcio, indicando que a conformação do sítio é crucial para a capacidade de interação com o íon (FIGURA 5) (FENG *et al.*, 2007).

A conservação dos aminoácidos necessários para interação com proteínas G ocorre na maioria dos organismos, inclusive na proteína TCTP de *L. intermedia* (Glu12, Leu74 e Glu136), o que sugere que a atividade de regulação do crescimento e proliferação celular pela proteína TCTP é amplamente difundida. Ainda assim, proteínas TCTP que apresentam a conservação destes aminoácidos podem possuir atividade de liberação de histamina, como é o caso das proteínas de *Homo sapiens*, *Plasmodium falciparum* e *Dermacentor variabilis*. A conservação dos 3 resíduos não é condição suficiente para a interação com proteínas G, pois a molécula deve estar estruturada de maneira que os três aminoácidos formem uma superfície para o encaixe de GTPases. Assim, não é possível postular uma determinada atividade da proteína TCTP com base apenas em sua estrutura primária antes de ensaios biológicos, ainda mais pelo fato de que esta proteína pode apresentar diferentes atividades no ambiente extra e intracelular (HINOJOSA-MOYA *et al.*, 2008). Neste caso, a expressão da proteína TCTP recombinante de *L. intermedia* é de grande importância para que possam ser realizados ensaios que irão auxiliar na determinação da função biológica da proteína na aranha e em seu veneno.

A análise do alinhamento das sequências de TCTP mostra que os sítios de fosforilação pela pólo-quinase (Plk) são conservados somente nas proteínas TCTP de camundongo, rato e homem, que são próximas em termos evolutivos. De fato, foi descrita interação desta enzima com proteínas TCTP de camundongo e homem, sendo que a fosforilação da proteína causa seu desligamento dos microtúbulos e permite a progressão da mitose, especificamente na passagem da metáfase para anáfase. A sequência da TCTP de *L. intermedia* não possui os dois sítios de fosforilação conservados e nenhuma de suas serinas é um sítio para fosforilação pela Plk [E-G-(A/E)-(I/G)-(D/T)-(D/E)-S-(L/T)-(I/V)]. Isto indica que em aranha marrom, bem como em outros organismos, esta proteína não parece estar envolvida diretamente com a estabilização dos microtúbulos durante o ciclo celular (YARM, 2002).

A análise filogenética mostrou que a proteína TCTP de *L. intermedia* tende a ficar agrupada com as proteínas TCTP de carrapatos, já descritas como fatores de liberação de histamina (FIGURA 6). Em carrapatos, a atividade de liberação de histamina foi descrita primeiramente na espécie *Dermacentor variabilis*. Esta proteína foi identificada por Western Blot na saliva do animal e sua proteína

recombinante foi capaz de promover a liberação de histamina em linhagem celular basofílica RBL-2H3 (MULENGA *et al.*, 2003).

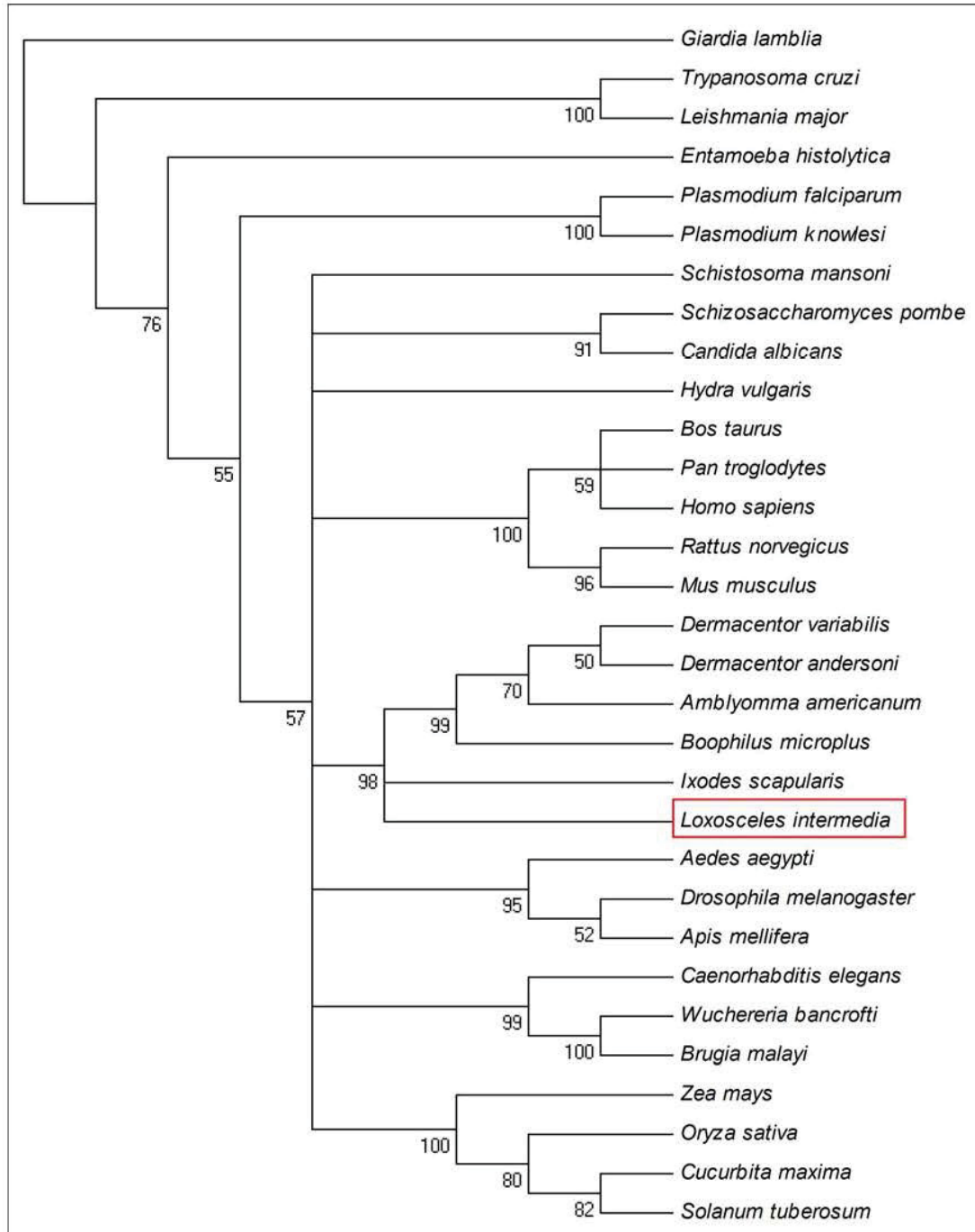


FIGURA 6 – FILOGENIA DA PROTEÍNA TCTP

Árvore filogenética gerada pelo programa MEGA a partir do alinhamento das proteínas TCTP de diferentes organismos feito no programa ClustalX2. Somente ramos com valor de corte superior acima de 50% são mostrados. Clados com valores inferiores foram unidos. A árvore foi enraizada com a sequência da proteína TCTP de *Giardia lamblia*. A

filogenia da proteína é consistente com a classificação dos eucariotos, e sugere a origem prematura de um ortólogo da proteína na história evolutiva deste super-reino. A posição da proteína TCTP de *Loxosceles intermedia* está destacada em vermelho, mostrando um agrupamento com proteínas TCTP de carrapatos caracterizadas como fatores de liberação de histamina.

A alimentação dos carrapatos duros, como o *D. variabilis*, é um processo complexo que envolve a fixação do parasita em seu hospedeiro, o corte da epiderme e inserção das partes bucais no local da ferida. A fixação do carrapato gera uma resposta inflamatória e a migração de células de reparação (fibroblastos, queratinócitos e células endoteliais) para o local da ferida. Os carrapatos podem permanecer longos dias alimentando-se, e para isso precisam secretar no organismo hospedeiro algumas moléculas que facilitem a sucção de sangue e minimizem a resposta imunológica do hospedeiro (KRAMER *et al.*, 2008). A secreção de uma proteína que atua como um fator de liberação de histamina aumentaria o fluxo de sangue no local da ferida e permitiria a rápida alimentação do animal em alguns estágios de seu desenvolvimento (MULENGA *et al.*, 2003).

Proteínas TCTP foram identificadas em outras três espécies de carrapatos: *Dermacentor andersoni*, *Boophilus microplus* e *Amblyomma americanum*, todas com alto grau de identidade com a TCTP descrita em *D. variabilis* (>90%) (MULENGA; AZAD, 2005). Também foi identificada a secreção de proteínas TCTP por parasitas no organismo hospedeiro, promovendo a liberação de histamina. Esta proteína é amplamente conservada em diversos grupos taxonômicos e suas funções biológicas, bem como sua capacidade de induzir a liberação de histamina, só recentemente começaram a ser estudadas (HINOJOSA-MOYA *et al.*, 2008).

A árvore filogenética foi enraizada com a sequência da proteína de *Giardia lamblia*, uma vez que alguns autores sugerem que este protozoário seria o mais próximo de um eucarioto ancestral, por não possuir mitocôndrias e genes que codifiquem para miosina, dineína e algumas proteínas do citoesqueleto, além de possuir genes que codificam proteínas bacterianas e contar com uma maquinaria metabólica simples. Apesar destas evidências, ainda existem muitas controvérsias com relação à posição da *Giardia lamblia* na filogenia dos eucariotos (KEELING, 2007; MORRISON *et al.*, 2007).

A análise filogenética da proteína TCTP praticamente reflete a filogenia dos eucariotos, apesar da limitação do pequeno número de sequências consideradas (30). No início da árvore, observam-se organismos protozoários parasitas, os quais

são distantes filogeneticamente de seus hospedeiros, o que é também descrito mesmo quando são utilizados outros critérios para determinar a filogenia dos eucariotos. Observa-se então uma grande politomia quando a proteína TCTP diverge a partir dos protozoários, em decorrência da junção dos ramos com valores de corte menores que 50%. Os fungos formam um clado único, próximo do cnidário *Hydra vulgaris* e do platelminto *Schistosoma mansoni*. O agrupamento de platelmintos com fungos em análises filogenéticas da proteína TCTP já foi descrito, e acredita-se que possa ocorrer em razão de funções semelhantes da proteína nestes organismos, apesar da grande distância evolutiva entre eles (HINOJOSA-MOYA *et al.*, 2008). Dentro da politomia, os ramos formados são baseados em valores de corte altos, e formam-se ramos distintos para plantas, mamíferos, nematódeos, insetos e aracnídeos. A proteína TCTP de *L. intermedia* e de *Ixodes scapularis*, que apresentam alto grau de identidade (69%), originou-se a partir de um mesmo ancestral ortólogo, o qual deu origem também à proteína TCTP do carrapato hematófago *Dermacentor variabilis*, que apresenta atividade de liberação de histamina. Com base na árvore filogenética e nas funções já descritas da proteína TCTP em diferentes organismos, não é possível inferir a função da proteína com base na sua filogenia. Fica claro, entretanto, que a proteína surgiu cedo na história evolutiva dos eucariotos e após a divergência entre este grupo e os procariotos, não sendo encontrada uma proteína relacionada em bactérias (VENUGOPAL, 2005; HINOJOSA-MOYA *et al.*, 2008).

4.2 Clonagem da Proteína TCTP de *L. intermedia*

Uma vez identificada na biblioteca de cDNA da glândula de veneno de *L. intermedia* a sequência codificadora de uma proteína intimamente relacionada com fatores de liberação de histamina, foram desenhados primers para clonagem da proteína em um vetor de expressão. Os primers inseriram sítios de restrição para enzimas *Xho*I e *Bam*HI nas extremidades da sequência amplificada a partir da biblioteca de cDNA, permitindo sua clonagem em pET 14b, o vetor de expressão. Os primers desenhados contem o sítio de restrição das enzimas, precedidos de algumas bases para o melhor reconhecimento pela enzima de restrição (CCG no caso da enzima *Xho*I e CG no caso da enzima *Bam*HI), os códons de iniciação (primer *forward*) e terminação (primer *reverse*), além de uma porção da sequência

alvo (cerca de 26 bases) para permitir o anelamento. A T_m (*melting temperature*) dos primers *forward* e *reverse* foi de 66,6 °C e 67,9 °C, respectivamente (FIGURA 7).

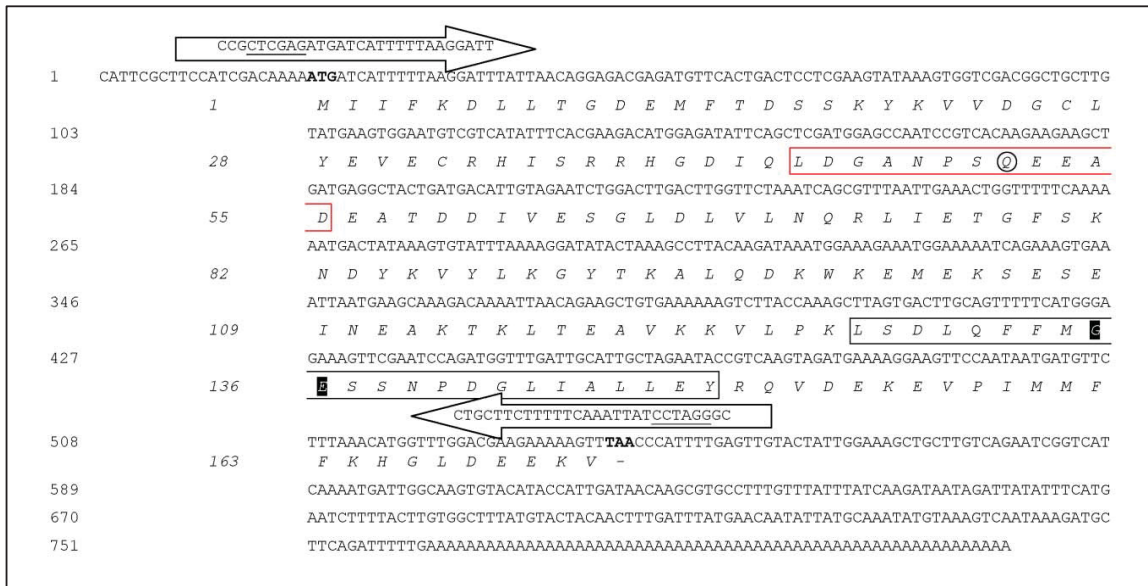


FIGURA 7 - CLONAGEM DA PROTEÍNA TCTP DE *Loxosceles intermedia*

Sequência de nucleotídeos e aminoácidos da proteína TCTP glândula de veneno de *L. intermedia*. Os primers desenhados para clonagens estão dentro das setas. Os sítios de restrição das enzimas *Xho*I (primer forward) e *Bam*HI (primer reverse) estão sublinhados. Os códons de iniciação (ATG) e terminação (TAA) estão em negrito. A assinatura TCTP2 está marcada pelo retângulo preto, com destaque para os aminoácidos conservados, em preto. A assinatura TCTP1 está destacada pelo retângulo vermelho. No interior, o aminoácido circulado (Glutamina) não é conservado em outros organismos, não permitindo a identificação da assinatura na Base de Dados ProSite.

A sequência obtida a partir da biblioteca não contém peptídeo sinal que direcione a proteína para o retículo endoplasmático, apesar de ser descrita a secreção da proteína por diversos autores. Recentes trabalhos sugerem a secreção por uma via alternativa ao complexo de Golgi, a via dos exossomos. Esta via foi descrita em 1985, quando um trabalho baseado em microscopia eletrônica de transmissão identificou vesículas que se desprendiam de reticulócitos levando em suas membranas receptores de transferrina (PAN *et al.*, 1985). Estas vesículas passam pelo sistema de endomembranas, com a internalização de proteínas de membrana em vesículas revestidas por clatrina. Forma-se então o endossomo inicial e, após a fusão de várias vesículas e invaginações, os corpos multivesiculares, contendo vesículas intraluminais. O destino destes pode ser a degradação via lisossomo ou a fusão com a membrana, liberando as vesículas intraluminais, agora chamadas exossomos (FÉVRIER; RAPOSO, 2004).

A proteína TCTP é uma proteína citosólica e apesar de não possuir peptídeo sinal N-terminal é secretada por uma via independente do retículo endoplasmático e complexo de Golgi. Amzallag *et al.* (2004) utilizando linhagens celulares provenientes de seres humanos demonstrou que a secreção da proteína TCTP ocorre possivelmente pela interação com a proteína transmembrana TSAP6, cuja função ainda não é totalmente conhecida, mas parece estar relacionada com a supressão tumoral e regulação da via endossomal. A proteína TSAP6 é essencial para formação dos exossomos e parece exportar seletivamente algumas proteínas através de vesículas (AMZALLAG *et al.*, 2004; LESPAGNOL *et al.*, 2008).

A tradução da sequência nucleotídica revelou somente a presença da assinatura TCTP2, mas não da assinatura TCTP1, em função da presença de uma Glutamina em uma posição conservada (Figura 3). As duas assinaturas são regiões conservadas ainda não relacionadas com uma função específica da proteína TCTP. Na assinatura TCTP2, está presente um aminoácido (Glu136) envolvido na interação com proteínas G, além dos três (Asp129, Gln131 e Glu148) envolvidos na formação de um sítio para coordenação do íon cálcio. Já a assinatura TCTP1 está presente em um loop flexível da molécula que liga os dois segmentos da folha β C, sendo crucial para a correta conformação da molécula. É possível que a substituição não conservativa de uma alanina por uma glutamina não afete a conformação da folha β C, uma vez que ocorre em uma região flexível da molécula e que comportaria a maior cadeia lateral polar da glutamina sem grandes alterações estruturais. Análises de predição da estrutura secundária e terciária não revelaram alterações em função desta substituição, e uma análise mais conclusiva poderá ser feita quando for descrita a implicação funcional da folha β C e do *loop* que une os dois segmentos da folha.

Para avaliar o êxito da reação de ligação do inserto ao vetor, foi realizado PCR do produto da ligação de com os primers específicos descritos anteriormente. Neste caso, a amplificação pela reação de PCR foi suficiente para comprovar o sucesso na reação de ligação, uma vez que a clonagem é direcional e o inserto só poderá estar orientado em um sentido. O resultado desta reação de PCR foi avaliado em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. A reação foi feita em duplicata, e o gel mostra o marcador de massa molecular e as duas reações de PCR. Nas duas reações de PCR ocorreu a amplificação de uma banda entre 500 e 600 pares de base, correspondente ao tamanho esperado de 536 pares de base.

Um pouco abaixo de 400 pares de base, nos poços correspondentes às duas reações de PCR, pode ser vista uma banda mais fraca, provavelmente resultado de uma amplificação inespecífica, uma vez que pode ocorrer um anelamento mais fraco do primer com regiões do vetor (FIGURA 8).

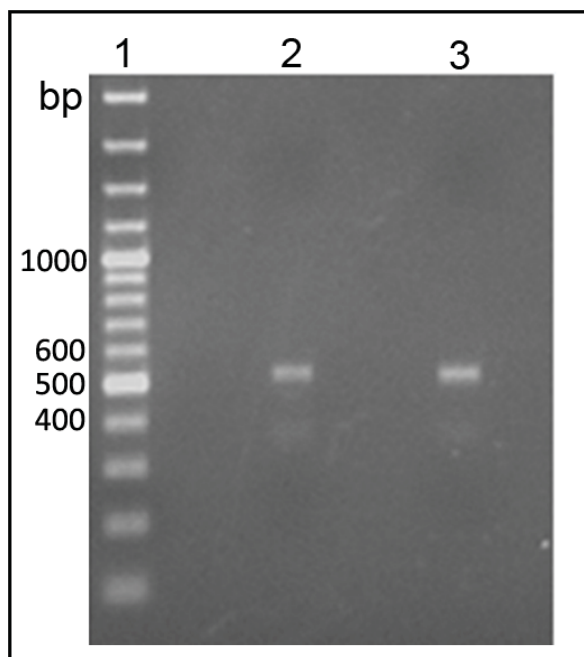


FIGURA 8 – PCR DA REAÇÃO DE LIGAÇÃO

PCR da reação de ligação com primers específicos para TCTP. 1 marcador de massa molecular; 2 e 3 produtos das reações de PCR da ligação. A reação de PCR foi feita em duplicata e é possível observar nas duas reações a amplificação de um produto na altura de 530 pares de bases, correspondente ao tamanho do inserto. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.

Constatada a ligação, foi realizado PCR de seqüenciamento para confirmação da construção, a qual estava correta. O seqüenciamento 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 durante o procedimento de subclonagem do inserto em pET14b a partir do vetor pSPORT, utilizado na biblioteca de cDNA.

A construção foi inserida em cepa de expressão *E. coli* BL21 (DE3) pLysS por eletroporação e foi realizado PCR de 48 colônias utilizando o primer T7 *promoter* e o *primer* específico *reverse*. A amplificação do inserto ocorreu em 8 das colônias testadas. Nas reações de PCR de colônia em que ocorreu a amplificação, podem ser vistas 3 bandas. A mais alta, em torno de 700 pares de base, corresponde à amplificação do inserto e uma pequena porção do vetor, uma vez que o primer *foward* (T7 *promoter*) anela com o plasmídeo. Logo abaixo, pode ser vista uma banda fraca na altura de 500 pares de base, possivelmente em razão de amplificação inespecífica, e outra abaixo de 100 pares de base, relativa ao RNA bacteriano. A

presença de outras bandas é comum no PCR de colônia, já que o DNA molde utilizado está contaminado com todo material genético da bactéria (FIGURA 9).

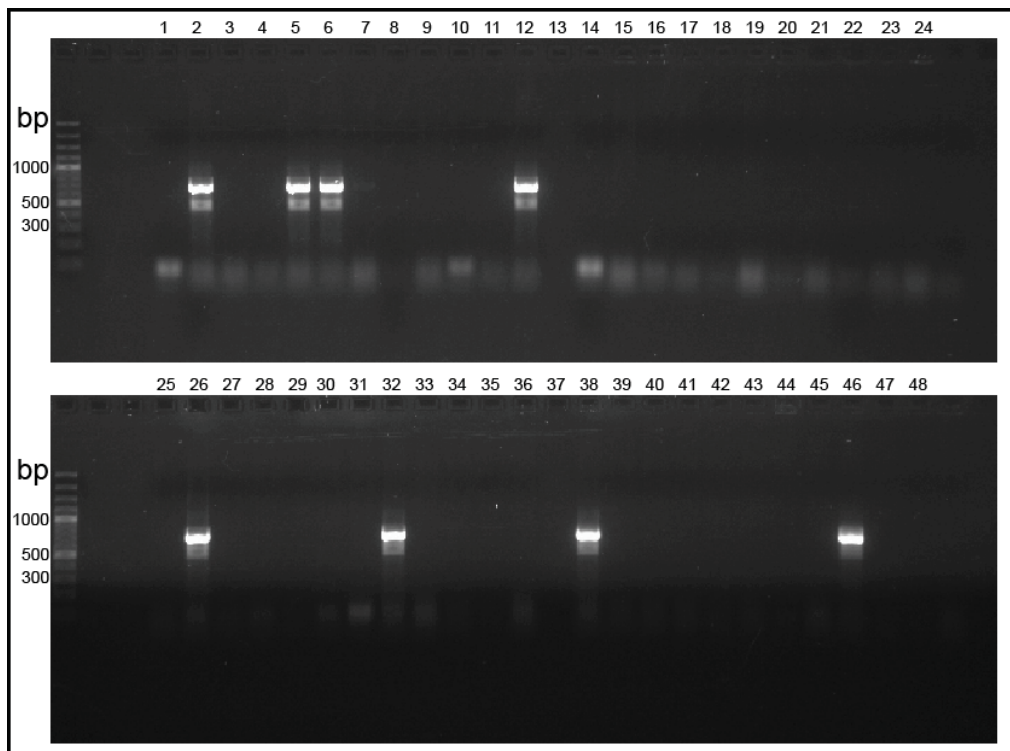


FIGURA 9 – PCR DE COLÔNIA

PCR de colônia após transformação de bactérias quimiocompetentes. Clones 2, 5, 6, 12, 26, 32, 38, e 46 internalizaram a construção e apresentaram amplificação do inserto. À esquerda é indicado o marcador de massa molecular. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.

A baixa eficiência da transformação pode ser explicada pelo fato de que não foi realizada a precipitação do produto da ligação antes da transformação. A presença da enzima ligase reduz a eficiência da transformação, o que pode ser minimizado com a inativação da enzima. Neste caso, o tempo e a temperatura de inativação da enzima ligase podem não ter sido suficientes, resultando em uma baixa eficiência na transformação. Além disso, a transformação por choque térmico gera menos clones transformantes em relação a uma transformação realizada com eletroporação. Apesar disso, as colônias positivas foram suficientes para o prosseguimento. Cada clone teve o inserto seqüenciado e um deles (clone 12) foi escolhido para expressão da proteína recombinante.

4.3 Expressão e Purificação da Proteína TCTP Recombinante

O clone 12, escolhido por possuir a construção correta, confirmada por sequenciamento, foi utilizado para expressão da proteína recombinante. A massa da proteína expressa ficou em torno de 23 kDa, correspondente à massa de 22,3 kDa predita pelo programa Protparam para a TCTP mais o HisTag fusionado. Com base no teste de indução, a concentração de indutor (IPTG) determinada foi de 0,1 mM e o tempo de expressão de 4 horas (FIGURA 10). Apesar de os tempos de 5 e 6 horas apresentarem visualmente uma banda da proteína visualmente maior em todas as concentrações de IPTG, assim como a partir de 3h na concentração de IPTG 0,05 mM, a maior quantidade de proteína não se reflete em sua solubilidade, que fica diminuída quando um excesso de proteína é expresso.

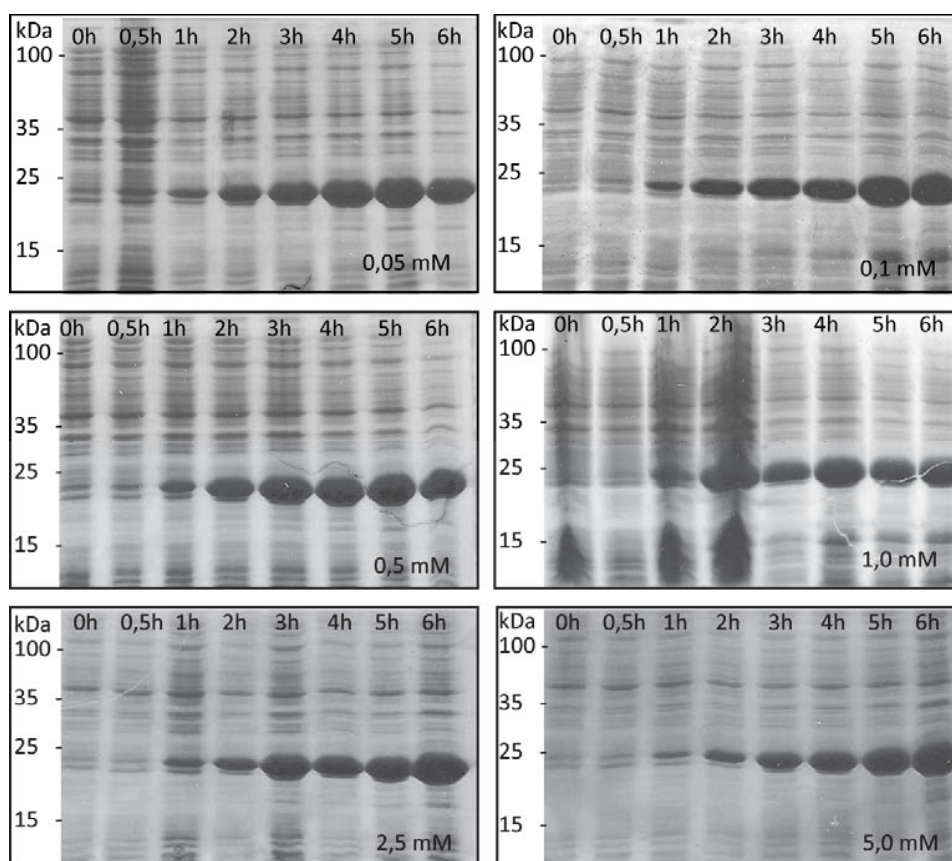


FIGURA 10 – TESTE DE INDUÇÃO DA EXPRESSÃO

Teste de indução para expressão da proteína TCTP recombinante. A proteína foi expressa a 30 °C, em diferentes concentrações de IPTG (0,05; 0,1; 0,5; 1,0; 2,5 e 5,0 mM) e tempos (0; 0,5; 1; 2; 3; 4; 5 e 6 horas). Na figura, em cada gel estão indicadas as massas moleculares, os tempos e a concentração de IPTG. A proteína TCTP recombinante apresenta massa de aproximadamente 23 kDa. SDS-PAGE 12,5% em condições redutoras.

Na literatura, a metodologia utilizada para expressão de proteínas recombinantes da superfamília TCTP é muito variável. Grande parte dos autores realiza a expressão da proteína em *E. coli*, produzindo proteínas fusionadas com a cauda de 6 histidinas ou GST (*glutathione-S-transferase*) para permitir a purificação. Os tempos de expressão variam de 3 a 24 horas em temperaturas de 16 a 37 °C. Apenas um grupo, a atividade de liberação de histamina da proteína TCTP de humanos, realizou a expressão em células de insetos (BHEEKHA-ESCURA *et al.*, 2000; MACDONALD *et al.*, 2001). A purificação de proteínas TCTP recombinantes geralmente foi feita mediante apenas um passo de cromatografia, utilizando os *tags* fusionados às proteínas. Em alguns casos foram utilizadas outras metodologias de cromatografia para purificação das proteínas recombinantes, sempre após a purificação por cromatografia de afinidade. Foi utilizada gel filtração em resina Sephadex G75 e G50 (BHEEKHA-ESCURA *et al.*, 2000; FENG *et al.*, 2007; DONG *et al.*, 2009), cromatografia líquida (KIM *et al.*, 2009) e cromatografia de troca iônica em resina DEAE-Sepharose (KANG *et al.*, 2001). Em um caso foram utilizadas três etapas cromatográficas, com a cromatografia de afinidade seguida por cromatografia de troca iônica em resina DEAE-Sephadex e por fim uma etapa de gel filtração em resina Sephadex G50 (GACHET *et al.*, 1999).

A temperatura padrão para o teste de expressão é de 30 °C, porém o usual é determinar a temperatura empiricamente. Assim, para a concentração de IPTG 0,1 mM e tempo de 4h, a melhor temperatura, determinada experimentalmente, foi de 23 °C. Nestas condições de expressão foi possível produzir em torno de 40 mg de proteína a cada litro de cultura (dado não mostrado). Apesar da grande quantidade de proteína produzida, a purificação em resina Ni²⁺-NTA agarose não foi satisfatória. Em 5 µg de proteína purificada aplicadas no gel de poli-acrilamida, podem ser observadas duas bandas de contaminantes em torno de 70 e 30 kDa, além de diversas bandas de contaminantes abaixo da proteína TCTP recombinante (FIGURA 11 – 5). No gel de purificação da proteína, é possível observar ainda que existe pequena expressão basal da proteína pela bactéria no tempo 0h (FIGURA 11 –1). O plasmídeo pLysS reprime a expressão na ausência de IPTG, evitando que uma proteína tóxica para a bactéria seja expressa sem a presença do indutor. No tempo de 4h (FIGURA 11 –2), a quantidade de proteína expressa é grande, porém pode ser observado que apenas parte dela é solúvel e está presente no lisado (FIGURA

11 –3). A ligação à resina de níquel é satisfatória, pois não é observada uma banda considerável da proteína no *void* da cromatografia (FIGURA 11 –4).

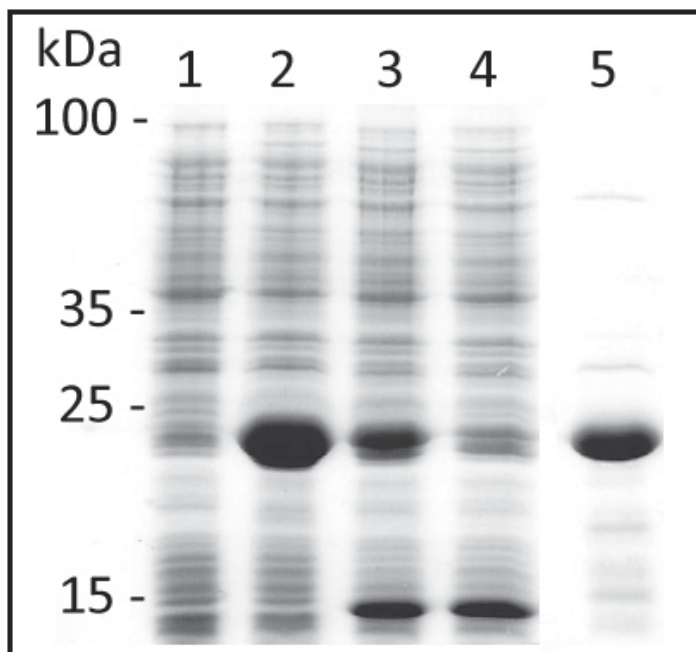


FIGURA 11 – PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA TCTP RECOMBINANTE EM RESINA Ni^{2+} -NTA AGAROSE

À esquerda estão indicadas as massas moleculares; 1 - cultura bacteriana antes da expressão; 2 - cultura bacteriana 4 horas após adição de IPTG; 3 - lisado bacteriano contendo a fração de proteínas solúveis; 4 - void da cromatografia após incubação do lisado com resina Ni^{2+} -NTA; 5 - proteína recombinante eluída da resina. A banda de baixa massa presente em 3 e 4 corresponde à enzima lisozima. SDS-PAGE 12,5% em condições redutoras.

A presença de contaminantes em preparados de proteínas recombinantes não é incomum. Usualmente é necessário estabelecer quais contaminantes não podem estar presentes, pois irão afetar os experimentos, e qual deve ser proporção da proteína em relação aos contaminantes. Purificações utilizando IMAC (*Immobilized metal-ion affinity chromatography*), como a cromatografia em resina Ni^{2+} -NTA agarose, geralmente geram produtos com pureza de 70 a 90%. É uma metodologia simples e rápida, com o resultado de um grau de pureza relativamente bom. A pureza da proteína recombinante produzida depende de diversos fatores como o tipo de célula em que a proteína foi expressa, condições cromatográficas como pH, concentração de sal e tensoativos, além da presença de proteínas que interajam com a matriz ou com o metal (CROWE et. al., 1995; GUPTAA et. al., 2003).

Diversas estratégias foram usadas para tentar aumentar a pureza da proteína recombinante purificada por cromatografia de afinidade em resina Ni^{2+} -NTA. Primeiramente, foi padronizada a relação entre a quantidade de resina e de proteína recombinante. Um excesso de resina em relação à proteína recombinante resulta

em sítios livres para uma interação inespecífica com outras proteínas. A melhor relação observada, resultando em uma proteína de maior pureza e menor perda da proteína no *void*, foi de 1 mL de resina Ni²⁺-NTA para cada litro de cultura ressuspendido em 40 mL de tampão de ligação. O pH da cromatografia pode ser um ponto chave na remoção de contaminantes, uma vez que pHs alcalinos (acima de 8,0) facilitam a interação de proteínas com o metal. Em pHs mais baixo, apenas proteínas que interagem fortemente com o metal permanecem ligadas. Inclusive a eluição pode ser realizada com um gradiente de pH, fazendo com que uma fração de alta pureza possa ser obtida. Foi realizada uma tentativa de eluição utilizando um gradiente de passos de pH. Entretanto, ainda foi observada a presença de contaminantes na proteína purificada e a precipitação em pHs abaixo de 6,0 (SAMBROOK & RUSSEL, 2001; CUTLER, 2004)..

A concentração de sal no tampão de cromatografia também influencia a força e especificidade da ligação. Altas concentrações impedem interações menos específicas, reduzindo a ligação de contaminantes. Foram utilizadas concentrações crescentes de cloreto de sódio no tampão de ligação, até um total de 2 M. Porém, concentrações mais altas de sal não reduziram a presença de contaminantes e ocasionaram a perda da proteína no *void*. Por fim, foram adicionados ao tampão de ligação substâncias que reduzem interações hidrofóbicas e inespecíficas, e, conseqüentemente, a ligação dos contaminantes. O agente tensoativo OTG (*octyl-β-glucoside*) foi utilizado para purificação, porém não foi efetivo na redução dos contaminantes bacterianos. O glicerol, utilizado no tampão de ligação na concentração de 30% (v/v) foi o mais efetivo para remoção dos contaminantes, e poderá ser utilizado em purificações futuras (SAMBROOK & RUSSEL, 2001; CUTLER, 2004).

Em outra estratégia de purificação, foram utilizadas condições desnaturantes na purificação, com incremento na pureza final. A proteína foi recuperada dos corpos de inclusão a partir do *pellet* da cultura de bactérias, utilizando tampão desnaturante (tampão de ligação contendo 8 M de uréia). A ligação da proteína à resina foi realizada em tampão desnaturante e as lavagens realizadas com o mesmo tampão contendo 20 mM de imidazol. A renaturação da proteína foi realizada na própria coluna, com as seguintes etapas da lavagem realizadas sem a presença de uréia. A eluição da proteína foi feita sem a utilização de uréia. Apesar da redução na quantidade de contaminantes, a proteína purificada ainda apresentava bandas de

proteínas bacterianas. Como o processo de desnaturação e renaturação pode resultar em uma proteína com uma conformação diferente da conformação nativa, optou-se por não utilizar a purificação em condições desnaturantes.

Como a idéia de expressar proteína TCTP recombinante é utilizá-la em ensaios que dependem diretamente da degranulação de mastócitos, sua pureza deve estar em um nível aceitável (> 98%), uma vez que mesmo pequenas quantidades de contaminantes bacterianos podem ligar-se a mastócitos causando liberação de histamina. A maioria dos autores que trabalha com a expressão de proteína TCTP recombinante não descreve problemas em sua purificação, sendo que o número de autores que utiliza apenas a cromatografia de afinidade para purificação é superior ao número de autores que utilizam mais de uma etapa cromatográfica. Em alguns trabalhos que utilizaram a proteína TCTP como um fator de liberação de histamina foi realizada a remoção de endotoxinas, especialmente lipopolisacarídeos (LPS), com a passagem da proteína purificada em colunas de polimixina B (BHEEKHA-ESCURA *et al.*, 2000; KANG *et al.*, 2001; MACDONALD *et al.*, 2001; VONAKIS *et al.*, 2003). A interferência do LPS em ensaios de liberação de histamina pode ainda ser descartada comparando-se a atividade da proteína purificada com preparados protéicos fervidos (KANG *et al.*, 2001; BARTLEY *et al.*, 2009), apesar de ser descrito que a quantidade de LPS presente na proteína TCTP purificada por cromatografia de afinidade não seria suficiente para mimetizar os efeitos da proteína TCTP (BHEEKHA-ESCURA *et al.*, 2000).

A utilização da cromatografia de troca iônica foi útil para remoção dos contaminantes observados no eluato proveniente da cromatografia de afinidade em resina Ni²⁺-NTA. Após a purificação em resina DEAE-Agarose, não são mais observadas bandas de contaminantes bacterianos quando 5 µg de proteína são aplicados em gel de poliacrilamida 12,5%. É possível observar ainda que grande parte da proteína TCTP recombinante ligou na resina DEAE-Agarose, sendo que detectada uma pequena quantidade no *void* após incubação da proteína purificada por cromatografia de afinidade com a resina de troca iônica (FIGURA 12).

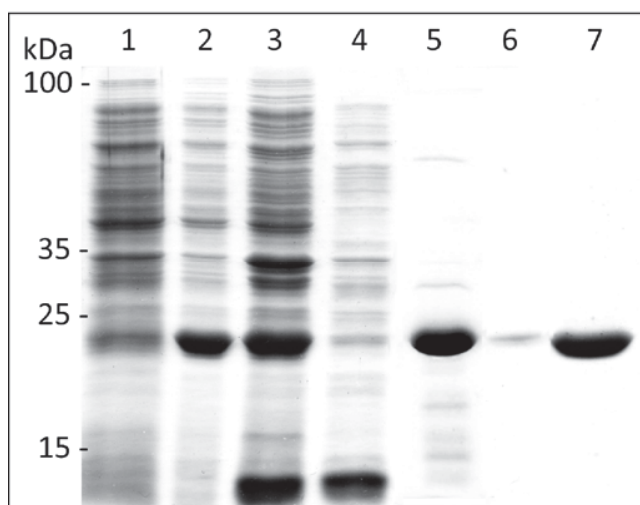


FIGURA 12 – PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA TCTP RECOMBINANTE

À esquerda estão indicadas as massas moleculares; 1 - cultura bacteriana antes da expressão; 2 - cultura bacteriana 4 horas após adição de indutor IPTG; 3 - lisado bacteriano contendo a fração de proteínas solúveis; 4 - *void* da cromatografia após incubação do lisado com resina Ni^{2+} -NTA; 5 - proteína recombinante eluída da resina Ni^{2+} -NTA; 6 - *void* da cromatografia após ligação da proteína à resina DEAE-Agarose; 7 - proteína eluída da resina DEAE-Agarose. SDS-PAGE 12,5% em condições redutoras.

A resina de troca iônica DEAE-Agarose utilizada é composta por *beads* de agarose contendo o grupamento funcional dietilaminoetil (DEAE). Funciona como uma resina trocadora de ânions fraca, por começar a perder sua carga em pHs acima de 9,0. A proteína TCTP de *L. intermedia* possui ponto isoelétrico (pI) de 4,7, de acordo com a predição do programa ProtParam. De fato, em pH abaixo de 6,0 inicia-se a precipitação da proteína e em pH 4,0 a proteína está totalmente precipitada, sendo possível sua renaturação com a elevação do pH. Assim, optou-se por realizar a troca iônica em um pH acima de 6,0. Em pH acima do ponto isoelétrico, a proteína encontra-se carregada negativamente, sendo assim necessário o uso de uma resina com um grupamento trocador de ânions, como o DEAE. Neste caso, o tampão de escolha deve possuir a mesma carga do grupamento da resina de troca iônica, caso contrário o tampão irá participar do processo de troca iônica causando alterações no pH e reduzindo a capacidade de ligação da proteína. O tampão utilizado foi o Bis-Tris 20 mM, por possuir carga negativa e capacidade de tamponamento em um pH menor que tampões contendo Tris. O pH do tampão deve ser no mínimo uma unidade acima do ponto isoelétrico, e como o pH deveria ser acima de 6,0 (neste pH já ocorre precipitação da proteína), optou-se pelo pH 7,2. O tampão utilizado continha ainda 10 mM de cloreto de sódio, pois em um teste com tubos observou-se que esta força iônica ainda permitia a ligação da proteína, possivelmente reduzindo a ligação de contaminantes.

A eluição de proteínas ligadas em resinas trocadoras de ânions pode ser feita com redução do pH ou com aumento da força iônica. Como uma redução no pH

poderia ocasionar precipitação da proteína, optou-se pela eluição com aumento gradual na concentração de cloreto de sódio. O ideal em uma troca iônica é realizar a eluição com um gradiente contínuo de concentração ou de pH, porém a eluição foi feita em um gradiente de passos, em que o mesmo tampão com concentrações crescentes de sal é aplicado sobre a amostra. Este tipo de eluição apresenta a desvantagem de uma menor resolução, podendo fazer com que duas proteínas sejam eluídas juntamente. A eluição em gradiente de passos foi satisfatória, uma vez que a proteína obtida não apresentou os contaminantes presentes antes da cromatografia de troca iônica. Estes contaminantes não aparecem no *void* após a incubação da proteína com a resina DEAE-Agarose, o que sugere que os contaminantes permanecem ligados na resina, sendo a proteína TCTP a primeira a eluir em concentrações de 20 e 25 mM de cloreto de sódio.

4.4 Immunoblotting para detecção da Proteína TCTP no Veneno

O soro anti-TCTP recombinante foi produzido em coelhos durante três meses. Ao final do processo de imunização, o soro foi testado por Western Blot em diferentes diluições com tiras de nitrocelulose contendo a proteína TCTP recombinante. Em diluições de 1:8000, o soro ainda foi capaz de reconhecer a proteína TCTP recombinante, porém com uma reação fraca e pouco específica. A diluição de 1:2000 apresentou boa sensibilidade, sendo a diluição escolhida para o ensaio de Western Blot. Para o reconhecimento da proteína TCTP no veneno, foi preciso aumentar a sensibilidade incubando a tira de nitrocelulose com o soro 1:2000 por 16 horas a 4 °C.

No ensaio de Western Blot, foram utilizados anticorpos produzidos no laboratório para verificar a presença da proteína TCTP no veneno de aranha marrom extraído por eletrochoque e o reconhecimento da proteína TCTP recombinante por imunoglobulinas antiveneno. Na fita contendo 40 µg de veneno, o soro de coelhos imunizados com a proteína TCTP recombinante reconheceu uma proteína na altura de 22 kDa, massa aproximada da predita pelo programa ProtParam. Já a IgG purificada de coelhos imunizados com veneno de *L. intermedia* reagiu com a proteína TCTP recombinante, revelando uma banda na mesma altura da banda identificada no veneno. A reação foi específica e os anticorpos de coelhos pré-

imunes não tiveram reação com proteínas do veneno ou com a proteína recombinante (FIGURA 13).

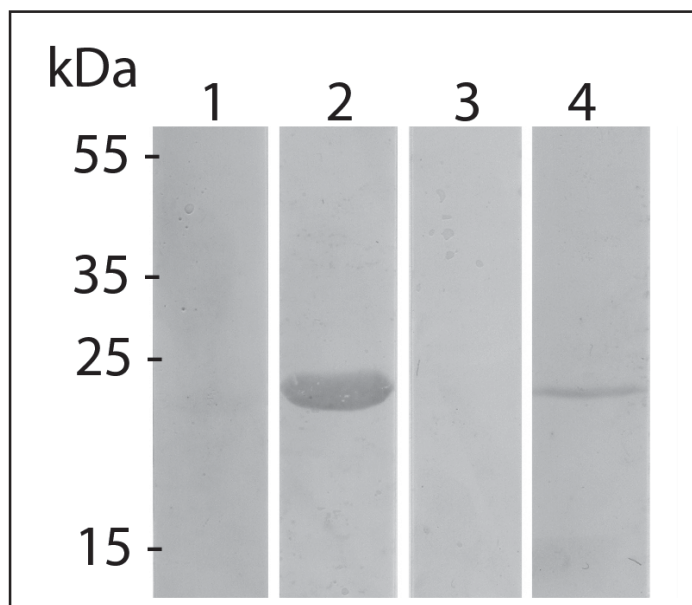


FIGURA 13 – IMMUNOBLOTTING PARA IDENTIFICAÇÃO DA PROTEÍNA TCTP NO VENENO DE ARANHA-MARROM

À esquerda estão indicadas as massas moleculares. 1 e 2 – 5 μ g de proteína TCTP incubada com 25 μ g/mL de IgG de coelhos pré-imunes (1) e hiperimunes (2) ao veneno de aranha-marrom. 3 e 4 – 40 μ g de veneno de aranha-marrom incubados com soro de coelhos (1:2000) pré-imunes e hiperimunes (4) à proteína TCTP recombinante. As proteínas foram separadas por SDS-PAGE 12,5% em condições redutoras e transferidas para membrana de nitrocelulose. A revelação foi feita com anticorpos secundários conjugados com fosfatase alcalina.

O resultado no ensaio de *immunoblotting* sugere a presença da proteína TCTP no veneno de aranha-marrom. A massa de veneno utilizada foi alta quando comparada com outros trabalhos que utilizaram a mesma estratégia para identificação de proteínas dermonecroticas no veneno de *L. intermedia*, que utilizaram apenas 2,5 μ g de veneno para a reação de Western Blot (DA SILVEIRA *et al.*, 2006; APPEL *et al.*, 2008). A maior quantidade de veneno é necessária, uma vez que a proteína TCTP parece estar presente em pequena quantidade no veneno analisado. A expressão da proteína TCTP é regulada na tradução, portanto existe a possibilidade de que diferentes quantidades da proteína estejam presentes em diferentes momentos da vida do animal. Entretanto, já foi descrita que as fosfolipases D são um dos principais componentes do veneno, sendo detectadas mais facilmente em uma quantidade menor de veneno (MACHADO *et al.*, 2005).

Além disso, a proteína TCTP não é secretada pela via clássica do retículo endoplasmático e complexo de Golgi. A presença da proteína TCTP no veneno deve ocorrer pela sua secreção via exossomos ou pela secreção holócrina que ocorre na glândula de veneno. Por possuir um papel intracelular e não ser uma proteína dedicada à secreção, é compreensível a presença de pequenas quantidades da proteína no veneno.

Mesmo estando presente em pequena quantidade no veneno, a proteína TCTP pode ser responsável pela liberação de histamina observada nos eventos inflamatórios desencadeados pelo envenenamento. Não foram descritos ensaios *in vivo* utilizando a proteína como fator de liberação de histamina, porém em ensaios utilizando basófilos e a linhagem celular basofílica RBL-2H3 a proteína TCTP foi capaz de promover a liberação de histamina na concentração de 0,1 µg/mL e da interleucina IL-8 na concentração de 1,8 µg/mL (MACDONALD *et al.*, 2001; MULENGA *et al.*, 2003).

Já foi descrito que o veneno de aranha marrom possui um componente termolábil e não dialisável, relacionado com a atividade histaminérgica do veneno. A proteína TCTP de *Loxosceles intermedia* identificada na glândula de veneno da aranha poderia ser estar envolvida com a ação histaminérgica do veneno, uma vez que possui alto grau de identidade com fatores de liberação de histamina descritos em diversas espécies. Ensaios *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 poderão auxiliar a determinação da função desta proteína no veneno da aranha-marrom.

5 CONCLUSÕES

O presente estudo identificou uma proteína da superfamília TCTP, expressa na glândula de veneno de aranha-marrom *Loxosceles intermedia*. Homólogas desta proteína já foram descritas em diversos organismos eucariotos, porém este é o primeiro trabalho a relatar a identificação, clonagem, expressão e purificação de um homólogo da proteína TCTP em aranhas. Até o momento, haviam sido anotadas no GenBank apenas duas ESTs, identificadas nos transcriptomas das aranhas *Lycosa singoriensis* (aranha-de-jardim) e *Loxosceles laeta*. Como em outros organismos, a proteína TCTP da aranha é muito conservada. O alinhamento com homólogas de outros organismos revelou conservação nas regiões de suas assinaturas TCTP1 e TCTP2, nos sítios de ligação a cálcio e microtúbulos e na superfície responsável pela interação com proteínas G monoméricas com atividade de GTPase. A filogenia da proteína TCTP está em acordo com a filogenia dos eucariotos, e a proteína de *L. intermedia* parece estar relacionada com homólogas de carrapatos liberadoras de histaminas.

A expressão e purificação da proteína TCTP recombinante foi padronizada durante o estudo. Autores não relatam dificuldades na purificação da proteína recombinante, porém alguns trabalhos apresentam mais de uma etapa cromatográfica para a purificação da proteína. Neste estudo, a purificação da proteína por utilizando cromatografia de afinidade e posterior troca iônica foi suficiente para remover os contaminantes detectáveis em gel de poliacrilamida. A remoção dos contaminantes é crucial para a continuidade dos estudos de atividade da proteína. Com a produção de anticorpos, foi possível detectar a proteína no veneno de *L. intermedia*. O papel desta proteína no veneno ainda permanece incerto e poderá ser elucidado com ensaios biológicos em animais e linhagens celulares relacionadas a mastócitos.

Diversos artigos relacionam o papel da TCTP como um fator de liberação de histamina com a capacidade de a proteína liberar de maneira dose-dependente o conteúdo de histamina presente na linhagem basofílica RBL-2H3. Apesar da controvérsia a respeito do uso desta linhagem para o estudo de mastócitos, a liberação de histamina por células RBL-2H3 é aceita como uma medida da atividade HRF da proteína TCTP. Uma alternativa para o uso da linhagem RBL-2H3 é a

purificação de mastócitos peritoneais de camundongos ou ratos. A grande vantagem no uso dos mastócitos é o maior conteúdo de histamina presente nestas células o que facilitaria a determinação da atividade de liberação de histamina.

Eventos inflamatórios relacionados à histamina em resposta à TCTP também poderão ser avaliados com a utilização de ensaios de formação de edema e aumento da permeabilidade vascular. Até o momento, não foi descrita atividade HRF *in vivo* da proteína TCTP. O tratamento de animais com a proteína TCTP e antagonistas histamínicos permitirá elucidar farmacologicamente a ação da proteína, bem como comparar o seu efeito biológico com a resposta inflamatória desenvolvida no acidente com veneno de aranha-marrom.

Outra perspectiva de pesquisa é estudar uma das diversas funções biológicas em que a TCTP está implicada. Os anticorpos produzidos em coelhos para a detecção desta proteína poderão servir como um marcador em células tumorais. A partir desta perspectiva, poderão ser implantadas novas metodologias para o estudo da proteína, como siRNA e transfecção de células eucarióticas com vetores contendo o gene da proteína TCTP. Estes ensaios permitirão determinar a influência dos níveis de expressão da proteína no comportamento de células cancerosas, abrindo caminho para o estudo de novas drogas que tenham esta proteína como alvo.

REFERÊNCIAS

AMZALLAG, N.; PASSER, B. J.; ALLANIC, D.; SEGURA, E.; THERY, C.; GOUD, B.; AMSON, R.; TELERMAN, A. TSAP6 facilitates the secretion of translationally controlled tumor protein/histamine-releasing factor via a nonclassical pathway. **Journal of biological chemistry**, v. 279, p. 46104-46112, 2004.

ANDERSON, P. C. Spider bites in the United States. **Dermatologic Clinics**, v. 15, p. 307-312, 1997.

APPEL, M. H.; BERTONI DA SILVEIRA, R.; GREMSKI, W.; VEIGA, S. S. Insights into brown spider and loxoscelism. **Invertebrate survival journal**, v. 2, p. 152-158, 2005.

APPEL, M. H.; DA SILVEIRA, R. B.; CHAIM, O. M.; PALUDO, K. S.; SILVA, D. T.; CHAVES, D. M.; DA SILVA, P. H.; MANGILI, O. C.; SENFF-RIBEIRO, A.; GREMSKI, W.; NADER, H. B.; VEIGA, S. S. Identification, cloning and functional characterization of a novel dermonecrotic toxin (phospholipase D) from brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1780, p. 167-178, 2008.

ARCURI, F.; PAPA, S.; MEINI, A.; CARDUCCI, A.; ROMAGNOLI, R.; BIANCHI, L.; RIPARBELLI, M. G.; SANCHEZ, J. C.; PALMI, M.; TOSI, P.; CINTORINO, M. The translationally controlled tumor protein is a novel calcium binding protein of the human placenta and regulates calcium handling in trophoblast cells. **Biology of reproduction**, v. 73, p. 745-751, 2005.

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

BARTLEY, K.; NISBET, A. J.; OFFER, J. E.; SPARKS, N. H.; WRIGHT, H. W.; HUNTLEY, J. F. Histamine release factor from *Dermanyssus gallinae* (De Geer): characterization and in vitro assessment as a protective antigen. **International journal for parasitology**, v. 39, p. 447-456, 2009.

BERKOWITZ, O.; JOST, R.; POLLMANN, S.; MASLE, J. Characterization of TCTP, the translationally controlled tumor protein, from *Arabidopsis thaliana*. **Plant Cell**, v. 20, p. 3430-3447, 2008.

BHEEKHA-ESCURA, R.; MACGLASHAN JR, D. W.; LANGDON, J. M.; MACDONALD, S. M. Human recombinant histamine-releasing factor activates human eosinophils and the eosinophilic cell line, AML14-3D10. **Blood**, v. 96, p. 2191, 2000.

BHISUTTHIBHAN, J.; MESHNICK, S. R. Immunoprecipitation of [(3)H]dihydroartemisinin translationally controlled tumor protein (TCTP) adducts from Plasmodium falciparum-infected erythrocytes by using anti-TCTP antibodies. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 45, p. 2397-2399, 2001.

BOMMER, U. A.; BOROVJAGIN, A. V.; GREAGG, M. A.; JEFFREY, I. W.; RUSSELL, P.; LAING, K. G.; LEE, M.; CLEMENS, M. J. The mRNA of the translationally controlled tumor protein P23/TCTP is a highly structured RNA, which activates the dsRNA-dependent protein kinase PKR. **Rna**, v. 8, p. 478-496, 2002.

BOMMER, U. A.; THIELE, B. J. The translationally controlled tumour protein (TCTP). **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 36, p. 379-385, 2004.

BRUSCA, R. C.; BRUSCA, G. J. **Invertebrates**. Sinauer Associates, Inc. 2. ed. Sunderland, 2003.

CANS, C.; PASSER, B. J.; SHALAK, V.; NANCY-PORTEBOIS, V.; CRIBLE, V.; AMZALLAG, N.; ALLANIC, D.; TUFINO, R.; ARGENTINI, M.; MORAS, D.; FIUCCI, G.; GOUD, B.; MIRANDE, M.; AMSON, R.; TELERMAN, A. Translationally controlled tumor protein acts as a guanine nucleotide dissociation inhibitor on the translation elongation factor eEF1A. **Proceedings of the national academy of sciences**, v. 100, p. 13892-13897, 2003.

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. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 211, p. 64-77, 2006.

CHAVES-MOREIRA, D.; CHAIM, O. M.; SADE, Y. B.; PALUDO, K. S.; GREMSKI, L. H.; DONATTI, L.; DE MOURA, J.; MANGILI, O. C.; GREMSKI, W.; DA SILVEIRA, R. B.; SENFF-RIBEIRO, A.; VEIGA, S. S. Identification of a direct hemolytic effect dependent on the catalytic activity induced by phospholipase-D (dermonecrotic toxin) from brown spider venom. **Journal of cellular biochemistry**, 2009.

CORZO, G.; ESCOUBAS, P. Pharmacologically active spider peptide toxins. **Cellular and molecular life sciences**, v. 60, p. 2409-2426, 2003.

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.

DA SILVEIRA, R. B.; PIGOZZO, R. B.; CHAIM, O. M.; APPEL, M. H.; DREYFUSS, J. L.; TOMA, L.; MANGILI, O. C.; GREMSKI, W.; DIETRICH, C. P.; NADER, H. B.; VEIGA, S. S. Molecular cloning and functional characterization of two isoforms of dermonecrotic toxin from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom gland. **Biochimie**, v. 88, p. 1241-1253, 2006.

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

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.

DE OLIVEIRA CHRISTOFF, A.; DE OLIVEIRA, A.; CHAIM, O. M.; LUGARINI, D.; BASTOS PEREIRA, A. L.; PALUDO, K. S.; QUEIROZ TELLES, J. E.; BRACHT, A.; VEIGA, S. S.; ACCO, A. Effects of the venom and the dermonecrotic toxin LiRecDT1 of *Loxosceles intermedia* in the rat liver. **Toxicon**, v. 52, p. 695-704, 2008.

DONG, X.; YANG, B.; LI, Y.; ZHONG, C.; DING, J. Molecular Basis of the Acceleration of the GDP-GTP Exchange of Human Ras Homolog Enriched in Brain by Human Translationally Controlled Tumor Protein. **Journal of biological chemistry**, v. 284, p. 23754, 2009.

DOS SANTOS, V. L. P.; FRANCO, C. R. C.; VIGGIANO, R. L. L.; DA SILVEIRA, R. B.; CANTÃO, M. P.; MANGILI, O. C.; VEIGA, S. S.; GREMSKI, W. Structural and ultrastructural description of the venom gland of *Loxosceles intermedia* (brown spider). **Toxicon**, v. 38, p. 265-285, 2000.

EFFERTH, T. Antiplasmodial and antitumor activity of artemisinin--from bench to bedside. **Planta medica**, v. 73, p. 299, 2007.

ESCOUBAS, P.; DIOCHOT, S.; CORZO, G. Structure and pharmacology of spider venom neurotoxins. **Biochimie**, v. 82, p. 893-907, 2000.

FENG, Y.; LIU, D.; YAO, H.; WANG, J. Solution structure and mapping of a very weak calcium-binding site of human translationally controlled tumor protein by NMR. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 467, p. 48-57, 2007.

FERNANDES-PEDROSA, F.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, L.; GONCALVES-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.

FÉVRIER, B.; RAPOSO, G. Exosomes: endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages. **Current opinion in cell biology**, v. 16, p. 415-421, 2004.

FUNASA. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. 2. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2001.

GACHET, Y.; TOURNIER, S.; LEE, M.; LAZARIS-KARATZAS, A.; POULTON, T.; BOMMER, U. A. The growth-related, translationally controlled protein P23 has properties of a tubulin binding protein and associates transiently with microtubules during the cell cycle. **Journal of cell science**, v. 112 (Pt 8), p. 1257-1271, 1999.

GNANASEKAR, M.; RAO, K. V.; CHEN, L.; NARAYANAN, R. B.; GEETHA, M.; SCOTT, A. L.; RAMASWAMY, K.; KALIRAJ, P. Molecular characterization of a calcium binding translationally controlled tumor protein homologue from the filarial parasites *Brugia malayi* and *Wuchereria bancrofti*. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 121, p. 107-118, 2002.

GNANASEKAR, M.; THIRUGNANAM, S.; ZHENG, G.; CHEN, A.; RAMASWAMY, K. Gene silencing of translationally controlled tumor protein (TCTP) by siRNA inhibits cell growth and induces apoptosis of human prostate cancer cells. **International journal of oncology**, v. 34, p. 1241-1246, 2009.

GONÇALVES DE ANDRADE, R. M.; LOURENÇO, W. R.; TAMBOURGI, D. V. Comparison of the fertility between *Loxosceles intermedia* and *Loxosceles laeta* spiders (Araneae, Sicariidae). **Journal of Arachnology**, v. 28, p. 245-247, 2000.

GUILHERME, P.; FERNANDES, I.; BARBARO, K. C. Neutralization of dermonecrotic and lethal activities and differences among 32-35 kDa toxins of medically important *Loxosceles* spider venoms in Brazil revealed by monoclonal antibodies. **Toxicon**, v. 39, p. 1333-1342, 2001.

HARLOW, E.; LANE, D. **Antibodies: a laboratory manual**. CSHL Press. 1. ed. New York, 1988.

HINOJOSA-MOYA, J.; XOCONOSTLE-CAZARES, B.; PIEDRA-IBARRA, E.; MENDEZ-TENORIO, A.; LUCAS, W. J.; RUIZ-MEDRANO, R. Phylogenetic and structural analysis of translationally controlled tumor proteins. **Journal of molecular evolution**, v. 66, p. 472-483, 2008.

HOGAN, C. J.; BARBARO, K. C.; WINKEL, K. Loxoscelism: old obstacles, new directions. **Annals of emergency medicine**, v. 44, p. 608-624, 2004.

HSU, Y. C.; CHERN, J. J.; CAI, Y.; LIU, M.; CHOI, K. W. Drosophila TCTP is essential for growth and proliferation through regulation of dRheb GTPase. **Nature**, v. 445, p. 785-788, 2007.

JUNG, J.; KIM, M.; KIM, M. J.; KIM, J.; MOON, J.; LIM, J. S.; KIM, M.; LEE, K. Translationally controlled tumor protein interacts with the third cytoplasmic domain of Na,K-ATPase alpha subunit and inhibits the pump activity in HeLa cells. **Journal of biological chemistry**, v. 279, p. 49868-49875, 2004.

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

KANG, H. S.; LEE, M. J.; SONG, H.; HAN, S. H.; KIM, Y. M.; IM, J. Y.; CHOI, I. Molecular Identification of IgE-Dependent Histamine-Releasing Factor as a B Cell Growth Factor 1. **The journal of immunology**, v. 166, p. 6545-6554, 2001.

KEELING, P. J. GENOMICS: Deep Questions in the Tree of Life. **Science**, v. 317, p. 1875, 2007.

KIM, J. E.; KOO, K. H.; KIM, Y. H.; SOHN, J.; PARK, Y. G. Identification of potential lung cancer biomarkers using an in vitro carcinogenesis model. **Experimental & molecular medicine**, v. 40, p. 709-720, 2008.

KIM, M.; JUNG, J.; LEE, K. Roles of ERK, PI3 kinase, and PLC-c pathways induced by overexpression of translationally controlled tumor protein in HeLa cells. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 485, p. 82-87, 2009.

KIM, M.; JUNG, Y.; LEE, K.; KIM, C. Identification of the calcium binding sites in translationally controlled tumor protein. **Archives of pharmacal research**, v. 23, p. 633-636, 2000.

KIM, M.; MIN, H. J.; WON, H. Y.; PARK, H.; LEE, J. C.; PARK, H. W.; CHUNG, J.; HWANG, E. S.; LEE, K. Dimerization of Translationally Controlled Tumor Protein Is Essential For Its Cytokine-Like Activity. **PloS one**, 2009.

KING, L. E., JR. Common ground?: Tetracyclines, matrix metalloproteinases, pustular dermatoses, and loxoscelism. **Journal of investigative dermatology**, v. 127, p. 1284-1286, 2007.

KRAMER, C.; NAHMIAS, Z.; NORMAN, D. D.; MULVIHILL, T. A.; COONS, L. B.; COLE, J. A. Dermacentor variabilis: Regulation of fibroblast migration by tick salivary gland extract and saliva. **Experimental parasitology**, 2008.

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. 1722-1736, 2008.

LANGDON, J. M.; VONAKIS, B. M.; MACDONALD, S. M. Identification of the interaction between the human recombinant histamine releasing factor/translationally controlled tumor protein and elongation factor-1 delta (also known as eElongation factor-1B beta). **Biochimica et biophysica acta**, v. 1688, p. 232-236, 2004.

LESPAGNOL, A.; DUFLAUT, D.; BEEKMAN, C.; BLANC, L.; FIUCCI, G.; MARINE, J. C.; VIDAL, M.; AMSON, R.; TELERMAN, A. Exosome secretion, including the DNA damage-induced p53-dependent secretory pathway, is severely compromised in TSAP6/Steap3-null mice. **Cell death and differentiation**, v. 15, p. 1723-1733, 2008.

LI, F.; ZHANG, D.; FUJISE, K. Characterization of fortilin, a novel antiapoptotic protein. **Journal of biological chemistry**, v. 276, p. 47542-47549, 2001.

LIU, H.; PENG, H. W.; CHENG, Y. S.; YUAN, H. S.; YANG-YEN, H. F. Stabilization and enhancement of the antiapoptotic activity of mcl-1 by TCTP. **Molecular and cellular biology**, v. 25, p. 3117-3126, 2005.

LUCIANO, M. N.; DA SILVA, P. H.; CHAIM, O. M.; DOS SANTOS, V. L.; FRANCO, C. R.; SOARES, M. F.; ZANATA, S. M.; MANGILI, O. C.; GREMSKI, W.; VEIGA, S. S. Experimental evidence for a direct cytotoxicity of *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom in renal tissue. **The journal of histochemistry and cytochemistry**, v. 52, p. 455-467, 2004.

MACDONALD, S. M.; BHISUTTHIBHAN, J.; SHAPIRO, T. A.; ROGERSON, S. J.; TAYLOR, T. E.; TEMBO, M.; LANGDON, J. M.; MESHNICK, S. R. Immune mimicry in malaria: *Plasmodium falciparum* secretes a functional histamine-releasing factor homolog in vitro and in vivo. **Proceedings of the national academy of sciences**, v. 98, p. 10829-10832, 2001.

MACDONALD, S. M.; RAFNAR, T.; LANGDON, J.; LICHTENSTEIN, L. M. Molecular identification of an IgE-dependent histamine-releasing factor. **Science**, v. 269, p. 688-690, 1995.

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

MÁLAQUE, C. M. S.; CASTRO-VALENCIA, J. E.; CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; BARBARO, K. C.; HUI, W. Clinical and epidemiological features of definitive and presumed loxoscelism in Sao Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 44, p. 139-143, 2002.

MARQUES-DA-SILVA, E.; FISCHER, M. L. *Loxosceles Heinecken & Lowe, 1835* (Araneae; Sicariidae) species distribution in the State of Parana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, p. 331-335, 2005.

MILLER, M. S.; ORTEGON, M.; MCDANIEL, C. Negative pressure wound therapy: treating a venomous insect bite. **International wound journal**, v. 4, p. 88-92, 2007.

MORRISON, H. G.; MCARTHUR, A. G.; GILLIN, F. D.; ALEY, S. B.; ADAM, R. D.; OLSEN, G. J.; BEST, A. A.; CANDE, W. Z.; CHEN, F.; CIPRIANO, M. J. Genomic minimalism in the early diverging intestinal parasite *Giardia lamblia*. **Science**, v. 317, p. 1921, 2007.

MULENGA, A.; AZAD, A. F. The molecular and biological analysis of ixodid ticks histamine release factors. **Experimental & applied acarology**, v. 37, p. 215-229, 2005.

MULENGA, A.; MACALUSO, K. R.; SIMSER, J. A.; AZAD, A. F. The American dog tick, *Dermacentor variabilis*, encodes a functional histamine release factor homolog. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 33, p. 911-919, 2003.

NIFOROU, K. M.; ANAGNOSTOPOULOS, A. K.; VOUGAS, K.; KITTAS, C.; GORGOULIS, V. G.; TSANGARIS, G. T. The proteome profile of the human osteosarcoma U2OS cell line. **Cancer genomics & proteomics**, v. 5, p. 63-78, 2008.

OSPEDAL, K. Z.; APPEL, M. H.; FILLUS NETO, J.; MANGILI, O. C.; SANCHES VEIGA, S.; GREMSKI, W. Histopathological findings in rabbits after experimental acute exposure to the *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. **International journal of experimental pathology**, v. 83, p. 287-294, 2002.

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. **Comparative biochemistry and physiology. Toxicology and pharmacology: CBP**, v. 149, p. 323-333, 2009.

PAN, B. T.; TENG, K.; WU, C.; ADAM, M.; JOHNSTONE, R. M. Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. **Journal of cell biology**, v. 101, p. 942-948, 1985.

PATEL, K. D.; MODUR, V.; ZIMMERMAN, G. A.; PRESCOTT, S. M.; MCINTYRE, T. M. The necrotic venom of the brown recluse spider induces dysregulated endothelial cell-dependent neutrophil activation. Differential induction of GM-CSF, IL-8, and E-selectin expression. **The journal of clinical investigation**, v. 94, p. 631-642, 1994.

PAULI, I.; MINOZZO, J. C.; HENRIQUE DA SILVA, P.; CHAIM, O. M.; VEIGA, S. S. Analysis of therapeutic benefits of antivenin at different time intervals after experimental envenomation in rabbits by venom of the brown spider (*Loxosceles intermedia*). **Toxicon**, v. 53, p. 660-671, 2009.

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

PETERSON, M. E. Brown spider envenomation. **Clinical techniques in small animal practice**, v. 21, p. 191-193, 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. **The british journal of dermatology**, 2009.

RAO, K. V.; CHEN, L.; GNANASEKAR, M.; RAMASWAMY, K. Cloning and characterization of a calcium-binding, histamine-releasing protein from *Schistosoma mansoni*. **Journal of biological chemistry**, v. 277, p. 31207-31213, 2002.

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

RATTMANN, Y. D.; PEREIRA, C. R.; CURY, Y.; GREMSKI, W.; MARQUES, M. C.; DA SILVA-SANTOS, J. E. Vascular permeability and vasodilation induced by the *Loxosceles intermedia* venom in rats: involvement of mast cell degranulation, histamine and 5-HT receptors. **Toxicon**, v. 51, p. 363-372, 2008.

REHMANN, H.; BRUNING, M.; BERGHAUS, C.; SCHWARTEN, M.; KOHLER, K.; STOCKER, H.; STOLL, R.; ZWARTKRUIS, F. J.; WITTINGHOFER, A. Biochemical characterisation of TCTP questions its function as a guanine nucleotide exchange factor for Rheb. **FEBS Letters**, v. 582, p. 3005-3010, 2008.

RIBEIRO, R. O.; CHAIM, O. M.; DA SILVEIRA, R. B.; GREMSKI, L. H.; SADE, Y. B.; PALUDO, K. S.; SENFF-RIBEIRO, A.; DE MOURA, J.; CHAVEZ-OLORTEGUI, C.; GREMSKI, W.; NADER, H. B.; VEIGA, S. S. Biological and structural comparison of recombinant phospholipase D toxins from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. **Toxicon**, v. 50, p. 1162-1174, 2007.

RINNERTHALER, M.; JAROLIM, S.; HEEREN, G.; PALLE, E.; PERJU, S.; KLINGER, H.; BOGENGRUBER, E.; MADEO, F.; BRAUN, R. J.; BREITENBACH-KOLLER, L.; BREITENBACH, M.; LAUN, P. MMI1 (YKL056c, TMA19), the yeast orthologue of the translationally controlled tumor protein (TCTP) has apoptotic functions and interacts with both microtubules and mitochondria. **Biochimica et Biophysica acta**, v. 1757, p. 631-638, 2006.

SCHENONE, H. Toxic pictures produced spiders bites in Chile: latrodectism and loxoscelism. **Revista médica de Chile**, v. 131, p. 437-444, 2003.

SEFF-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. **Biotechnology advances**, v. 26, p. 210-218, 2008.

SEZERINO, U. M.; ZANNIN, M.; COELHO, L. K.; GONCALVES JUNIOR, J.; GRANDO, M.; MATTOSINHO, S. G.; CARDOSO, J. L.; VON EICKSTEDT, V. R.; FRANCA, F. O.; BARBARO, K. C.; FAN, H. W. A clinical and epidemiological study of *Loxosceles* spider envenoming in Santa Catarina, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 92, p. 546-548, 1998.

SLABY, O.; SOBKOVA, K.; SVOBODA, M.; GARAJOVA, I.; FABIAN, P.; HRSTKA, R.; NENUTIL, R.; SACHLOVA, M.; KOCAKOVA, I.; MICHALEK, J.; SMERDOVA, T.; KNOFLICKOVA, D.; VYZULA, R. Significant overexpression of Hsp110 gene during colorectal cancer progression. **Oncology reports**, v. 21, p. 1235-1241, 2009.

SWANSON, D. L.; VETTER, R. S. Loxoscelism. **Clinics in dermatology**, v. 24, p. 213-221, 2006.

TAMBOURGI, D. V.; PETRICEVICH, V. L.; MAGNOLI, F. C.; ASSAF, S. L.; JANCAR, S.; DIAS DA SILVA, W. Endotoxemic-like shock induced by *Loxosceles* spider venoms: pathological changes and putative cytokine mediators. **Toxicon**, v. 36, p. 391-403, 1998.

TELERMAN, A.; AMSON, R. The molecular programme of tumour reversion: the steps beyond malignant transformation. **Nature reviews. Cancer**, v. 9, p. 206-216, 2009.

THAW, P.; BAXTER, N. J.; HOUNSLOW, A. M.; PRICE, C.; WALTHO, J. P.; CRAVEN, C. J. Structure of TCTP reveals unexpected relationship with guanine nucleotide-free chaperones. **Nature structural biology**, v. 8, p. 701-704, 2001.

THIELE, H.; BERGER, M.; LENZNER, C.; KUHN, H.; THIELE, B. J. Structure of the promoter and complete sequence of the gene coding for the rabbit translationally controlled tumor protein (TCTP) P23. **European journal of biochemistry**, v. 257, p. 62-68, 1998.

THIELE, H.; BERGER, M.; SKALWEIT, A.; THIELE, B. J. Expression of the gene and processed pseudogenes encoding the human and rabbit translationally controlled tumour protein (TCTP). **European journal of biochemistry**, v. 267, p. 5473-5481, 2000.

VEIGA, S. S.; DA SILVEIRA, R. B.; DREYFUS, J. L.; HAOACH, J.; PEREIRA, A. M.; MANGILI, O. C.; GREMSKI, W. Identification of high molecular weight serine-proteases in *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. **Toxicon**, v. 38, p. 825-839, 2000.

VENUGOPAL, T. Evolution and expression of translationally controlled tumour protein (TCTP) of fish. **Comparative biochemistry and physiology. Part B, biochemistry & molecular biology**, v. 142, p. 8-17, 2005.

VONAKIS, B. M.; MACGLASHAN, D. W., JR.; VILARINO, N.; LANGDON, J. M.; SCOTT, R. S.; MACDONALD, S. M. Distinct characteristics of signal transduction events by histamine-releasing factor/translationally controlled tumor protein (HRF/TCTP)-induced priming and activation of human basophils. **Blood**, v. 111, p. 1789-1796, 2008.

VONAKIS, B. M.; SORA, R.; LANGDON, J. M.; CASOLARO, V.; MACDONALD, S. M. Inhibition of Cytokine Gene Transcription by the Human Recombinant Histamine-Releasing Factor in Human T Lymphocytes 1. **The journal of immunology**, v. 171, p. 3742-3750, 2003.

WALKER, D. J.; PITSCH, J. L.; PENG, M. M.; ROBINSON, B. L.; PETERS, W.; BHISUTTHIBHAN, J.; MESHNICK, S. R. Mechanisms of artemisinin resistance in the rodent malaria pathogen *Plasmodium yoelii*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 44, p. 344-347, 2000.

WANG, X.; FONSECA, B. D.; TANG, H.; LIU, R.; ELIA, A.; CLEMENS, M. J.; BOMMER, U. A.; PROUD, C. G. Re-evaluating the roles of proposed modulators of mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) signaling. **Journal of biological chemistry**, v. 283, p. 30482-30492, 2008.

WANTKE, F.; MACGLASHAN, D. W.; LANGDON, J. M.; MACDONALD, S. M. The human recombinant histamine releasing factor: functional evidence that it does not bind to the IgE molecule. **The journal of allergy and clinical immunology**, v. 103, p. 642, 1999.

WENDELL, R. P. Brown Recluse Spiders: A Review to Help Guide Physicians in Nonendemic Areas. **Southern medical journal**, v. 96, p. 486, 2003.

XU, A.; BELLAMY, A. R.; TAYLOR, J. A. Expression of translationally controlled tumour protein is regulated by calcium at both the transcriptional and post-transcriptional level. **The biochemical journal**, v. 342 Pt 3, p. 683-689, 1999.

YAO, Y.; JIA, X. Y.; TIAN, H. Y.; JIANG, Y. X.; XU, G. J.; QIAN, Q. J.; ZHAO, F. K. Comparative proteomic analysis of colon cancer cells in response to Oxaliplatin treatment. **Biochimica et biophysica acta**, 2009.

YARM, F. R. Plk phosphorylation regulates the microtubule-stabilizing protein TCTP. **Molecular and cellular biology**, v. 22, p. 6209-6221, 2002.

YIGIT, N.; BAYRAM, A.; ULASOGLU, D.; DANISMAN, T.; CORAK OCAL, I.; SANCAK, Z. Loxosceles spider bite in Turkey (*Loxosceles rufescens*, Sicariidae, Araneae). **Journal of venomous animals and toxins including tropical diseases**, v. 14, p. 178-187, 2008.

ZHANG, D.; LI, F.; WEIDNER, D.; MNJOYAN, Z. H.; FUJISE, K. Physical and functional interaction between myeloid cell leukemia 1 protein (MCL1) and fortilin the potential role of mcl1 as a fortilin chaperone. **Journal of biological chemistry**, v. 277, p. 37430-37438, 2002.

ZHU, W. L.; CHENG, H. X.; HAN, N.; LIU, D. L.; ZHU, W. X.; FAN, B. L.; DUAN, F. L. Messenger RNA expression of translationally controlled tumor protein (TCTP) in liver regeneration and cancer. **Anticancer research**, v. 28, p. 1575-1580, 2008.

ANEXOS

Anexo I – Créditos Obtidos Durante o Mestrado



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Programa de Pós-Graduação em Biologia
Celular, Molecular e Fisiologia



HISTÓRICO ESCOLAR

Aluno(a): Youssef Bacila Sade					
Curso: Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular					
Instituição: Universidade Federal do Paraná					
Área de Concentração: Biologia Celular e Molecular					
Nível: Mestrado					
Data de Matrícula no Curso: Março de 2008					
Orientador(a): Prof. Dr. Silvio Sanches Veiga					
Conceito do Curso: 5 (Portaria do MEC 524. DOU 30/04/2008 – Parecer CES/CNE 33/2008 – 29/04/2008).					
Curso reconhecido pela Portaria nº 8531/01-72, da Resolução Nº: 89/01 A-CEPE - Currículo disciplinas: 2001/2005.					
Código / Disciplinas	Cursadas no Mestrado	Ano	C. H.	N. de Cr.	Conc.
BC-756	Biologia Celular	2008	120	08	A
BC-773	Técnicas Básicas em Microscopia	2008	90	05	A
BC-757	Seminários	2008	30	02	A
BC-784	Fundamentos em Biologia Molecular	2008	60	04	A
BC-783	Estágio de Docências em Biologia Celular	2008	60	02	A
BC-770	Matriz Extracelular	2008	45	03	A
BQ-744	Análise Conformacional de Proteínas	2008	60	03	B
Total Créditos / Carga Horária Cursados(a):			465	27	
Apresentação de projeto: outubro de 2008 - Aprovado					
Exame de proficiência em Inglês: 25 de abril de 2009 – DELEM/UFPR - Aprovado					
Serão considerados aprovados em disciplinas, os candidatos que lograrem os conceitos A, B, ou C . Obter no mínimo 18 créditos em disciplinas .					
Data da Defesa da Dissertação:					
Título da <input type="checkbox"/> Dissertação: "".					
Resultado Final:					
Composição da Banca Examinadora					
Nome:		Instituição:			
Prof. Dr. Silvio Sanches Veiga (Universidade Federal do Paraná - UFPR)					
Prof. Dr.					
Prof. Dr.					

Curitiba, 01 de Maio de 2009


Prof. Dr. Silvio Sanches Veiga
 Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Biologia
 Celular e Molecular



Anexo II – Artigos Publicados na Área de Loxoscelismo

2009

ARTICLE
Journal of Cellular Biochemistry 9999:1-12 (2009)

JCB-08-0555.R2(22148)

Journal of **Cellular Biochemistry**

Author Proof


Identification of a Direct Hemolytic Effect Dependent on the Catalytic Activity Induced by Phospholipase-D (Dermonecrotic Toxin) From Brown Spider Venom

Daniele Chaves-Moreira,¹ Olga M. Chaim,^{1,2} Youssef B. Sade,¹ Kátia S. Paludo,^{1,3} Luiza H. Gremski,^{1,2} Lucélia Donatti,¹ Juliana de Moura,⁴ Oldemir C. Mangili,⁵ Waldemiro Gremski,^{1,6} Rafael B. da Silveira,⁷ Andrea Senff-Ribeiro,¹ and Silvio S. Veiga^{1*}

¹ Department of Cell Biology, Federal University of Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil
² Department of Biochemistry, Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil
³ Medical Clinic Discipline, Department of Medicine, Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil
⁴ Department of Basic Pathology, Federal University of Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil
⁵ Department of Physiology, Federal University of Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil
⁶ Catholic University of Paraná, Health and Biological Sciences Institute, Curitiba, Paraná, Brazil
⁷ Department of Structural, Molecular Biology and Genetics, State University of Ponta Grossa, Ponta Grossa, Paraná, Brazil

2008

Available online at www.sciencedirect.com

 **ScienceDirect**

Biochimie 90 (2008) 1722–1736

BIOCHIMIE
www.elsevier.com/locate/biochi

Research paper

Nephrotoxicity caused by brown spider venom phospholipase-D (dermonecrotic toxin) depends on catalytic activity

J. Kusma^a, O.M. Chaim^{a,b}, A.C.M. Wille^c, V.P. Ferrer^a, Y.B. Sade^a, L. Donatti^a, W. Gremski^{a,d}, O.C. Mangili^e, S.S. Veiga^{a,*}



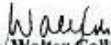
^a Department of Cell Biology, Federal University of Paraná, Jardim das Américas, 81531-990, Curitiba, Paraná, Brazil
^b Department of Biochemistry, Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil
^c Department of Structural, Molecular Biology and Genetics, State University of Ponta Grossa, Ponta Grossa, Paraná, Brazil
^d Catholic University of Paraná, Health and Biological Sciences Institute, Curitiba, Paraná, Brazil
^e Department of Physiology, Federal University of Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil

Received 16 May 2008; accepted 30 July 2008
 Available online 9 August 2008

Anexo III – Certificado do Comitê de Ética em Experimentação Animal (UFPR)

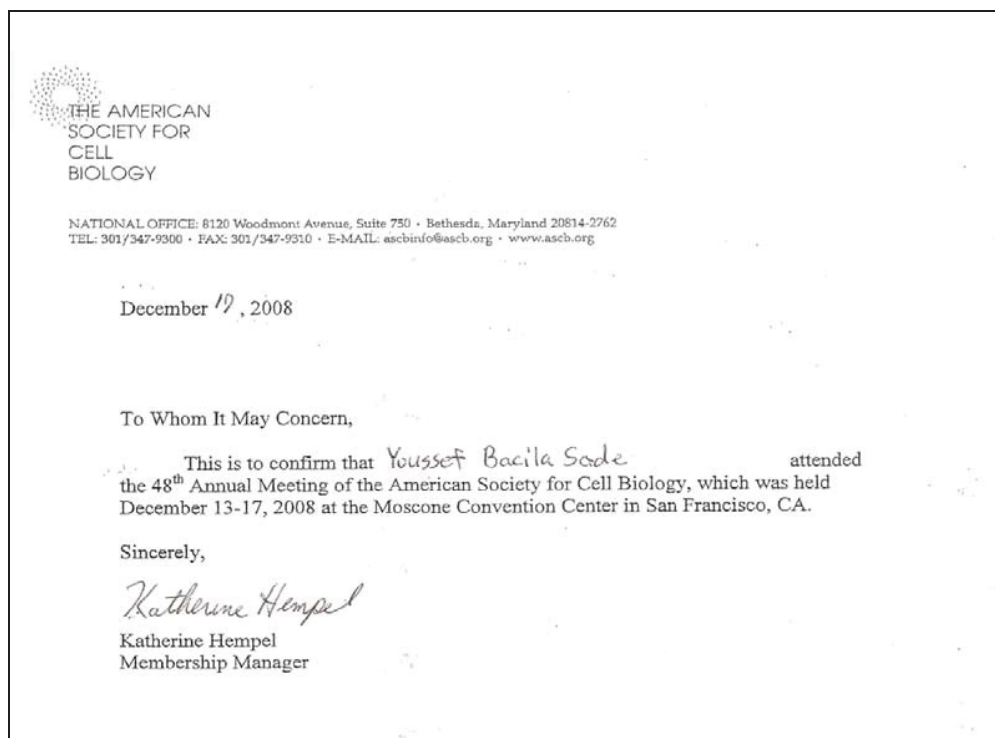
 <p>UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ</p>	<p>Ministério da Educação UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ Setor de Ciências Biológicas Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA)</p>	
<p>Nº 340</p>		
<p>CERTIFICADO</p>		
<p>O Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Setor de Ciências Biológicas da 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)".</p>		
<p>CERTIFICATION</p>		
<p>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)".</p>		
<p>PROCESSO: 23075.051253/2008-39</p>	<p>APROVADO: 09/12/2008 – R.O. 11/2008</p>	
<p>TÍTULO: Clonagem, expressão e caracterização de um fator de liberação de histamina a partir de biblioteca de cDNA da glândula produtora de veneno da aranha marrom (<i>Loxosceles intermedia</i>)</p>		
<p>AUTORES: Silvio Sanches Veiga, Youssef Bacila Sade, Andréa Senff-Ribeiro, Olga Meiri Chaim, Kátia Sabrina Paludo</p>		
<p>DEPARTAMENTO: Biologia Celular</p>		
<p> Prof.ª Dr.ª Ana Maria C. Filadelfi Coordenadora do CEEA</p>		

Anexo V – Parecer Técnico CTNBio

	Ministério da Ciência e Tecnologia - MCT Comissão Técnica Nacional de Biossegurança - CTNBio	
PARECER TÉCNICO Nº 542/2006		
<p>Processo nº: 01200.000022/1997-37 Requerente: Setor de Ciências Biológicas – UFPR. CNPJ: 000.348.003/0055-03 Endereço: Centro Politécnico da UFPR- Setor de Ciências Biológicas - 2º Piso, Sala 295 - Caixa Postal 19031 Paraná/PR. Assunto: Solicitação de Extensão do CQB 009/97 Extrato Prévio: 350/2006 Publicado no D.O.U. de 21 de fevereiro de 2006 Reunião: 90ª Reunião Ordinária da CTNBio, ocorrida em 19 de abril de 2006 Decisão: 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>		
PARECER TÉCNICO		
<p>1) Fundamentação técnica</p>		
<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>		
<p>2) Medidas de biossegurança descritas no processo.</p>		
<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 apresentados 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>		
 Dr. Walter Coll Presidente da CTNBio		
<p>Secretaria Executiva da CTNBio SPO – Área 05 – Quadra 03 Bloco B – Térreo – Salas 08 a 10 Brasília, DF – CEP: 70610-200 Fones: (55)(61) 3411 5516 – FAX: (55)(61) 3317-7475</p>		

Anexo VI – Participação em Congressos

2008 – 48ª Annual Meeting of the American Society for Cell Biology



2008 – XIV Congresso da Sociedade Brasileira de Biologia Celular

