

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
MATHEUS REGIS BELISÁRIO

CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA E BIOQUÍMICA E ANÁLISE ESTRUTURAL
DAS ISOFORMAS DE FOSFOLIPASES-D LIRECDT1, LIRECDT2, LIRECDT3 E
LIRECDT1 H12A DO VENENO DE *Loxosceles intermedia* OBTIDAS PELA
EXPRESSÃO RECOMBINANTE EM *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS E
Escherichia coli SHuffle T7 Express lysY

CURITIBA

2013

MATHEUS REGIS BELISÁRIO

**CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA E BIOQUÍMICA E ANÁLISE ESTRUTURAL
DAS ISOFORMAS DE FOSFOLIPASES-D LIRECDT1, LIRECDT2, LIRECDT3 E
LIRECDT1 H12A DO VENENO DE *Loxosceles intermedia* OBTIDAS PELA
EXPRESSÃO RECOMBINANTE EM *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS E
Escherichia coli SHuffle T7 Express lysY**

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

Orientador: Prof. Dr. Silvio Sanches Veiga
Co-orientadora: Prof. Dra. Olga Meiri Chaim

CURITIBA

2013

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

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

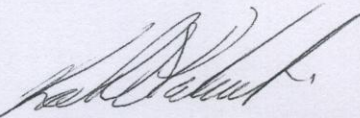
PARECER

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:

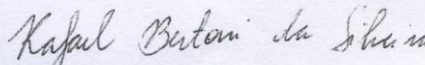
Prof. Dr. Silvio Sanches Veiga
Orientador e presidente da banca
Universidade Federal do Paraná



Profa. Dra. Kátia Sabrina Paludo
Universidade Estadual de Ponta Grossa - UEPG



Prof. Dr. Rafael Bertoni da Silveira
Universidade Estadual de Ponta Grossa - UEPG



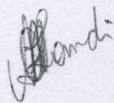
Suplente:

Profa. Dra. Adriana Frohlich Mercadante
Universidade Federal do Paraná - UFPR

Após arguir o mestrando **Matheus Regis Belisário**, em relação ao seu trabalho intitulado: "Expressão em cepas de *E. coli* formadores de pontes dissulfeto e caracterização biológica e bioquímica das isoformas LiRecDT1H12A, LiRecDT1, LiRecDT2 e LiRecDT3", são de parecer favorável à ~~APASVA CASI~~ do acadêmico, habilitando-o ao título de MESTRE em Biologia Celular e Molecular, área de concentração Biologia Celular e Molecular.

A obtenção do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento Interno deste Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 27 de Fevereiro de 2013



Prof. Dr. Marco A. F. Randi
Vice-Coordenador do Programa de Pós-Graduação
em Biologia Celular e Molecular - UFPR

Matheus Regis Belisário

*Bioteecnologista graduado pela Universidade
Tuiuti do Paraná (2006 – 2009).*

DEDICATÓRIA

Aos meus pais José Renato Belisário e Ambrozina Regis Belisário por terem me dado à vida, cuidarem de mim e do meu irmão Julio Regis Belisário por mais difíceis que fossem as situações que cruzaram o nosso caminho e pelos três me amarem incondicionalmente. Com vocês aprendi o valor da união.

Ao meu companheiro Arthur Ferrari pela força concedida em todos os momentos para que eu não desistisse dos meus sonhos, por ter me ensinado muito em tão pouco tempo e por me fazer muito feliz.

Em memória aos meus avós maternos Estela Belão Regis e José Regis por terem sido peças fundamentais na minha criação, educação e por terem me amado. Em especial a minha avó de quem sempre lembrarei e amarei. A minha avó paterna Benedita Ferraz da Silva pelos mesmos motivos. Juntas minhas avós me ensinaram que a vida lhe ensina a amar a todos incondicionalmente, independente de quem e como você seja. Nunca me esquecerei disto.

Aos meus padrinhos Roberto de Lima e Maria Auxiliadora Regis de Lima por sempre acreditarem na minha formação acadêmica e me ajudarem em todos os momentos em que necessitei.

A minha Tia Tereza Cristina Belisário da Silva por todo o conhecimento que me passou e principalmente por ter me ensinado o amor a leitura. Aos meus tios Ademir José Regis e Vera Lucia Matias, pela ajuda oferecida durante a minha graduação, o que me proporcionou finalizar esta etapa. Aos meus tios Cesar Augusto Belisário e Angélica por todo o carinho que tem comigo.

A família do meu companheiro, minha mais nova família, pelos momentos inesquecíveis desde que os conheci, especialmente a Izolde Rejane do Carmo por praticamente ter me adotado.

Em resumo, a toda minha família que sempre teve orgulho da minha trajetória acadêmica, amo todos vocês.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Marco Randi, meu primeiro contato na UFPR que proporcionou meu ingresso no programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular pelo curso de Especialização em Biologia Celular e Tecidual.

A todos os professores do programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular pelos ensinamentos.

Ao professor Dr^o Silvio Sanches Veiga pela escolha do tema deste trabalho, o qual foi gratificante produzir e por abrir as portas do Laboratório de Matriz Extracelular e Biotecnologia de Venenos para que eu pudesse seguir na pós-graduação como seu atual orientado.

A professora Dr^a Olga Meiri Chaim por ter aceitado ser a co-orientadora deste trabalho, pelas dicas e críticas sempre construtivas, pelas ótimas aulas no curso de Especialização mostrando o amor a ciência que me influenciaram a escolher o Laboratório de Matriz Extracelular e Biotecnologia de Venenos para seguir na minha caminhada acadêmica. Por ter lapidado a ideia inicial do professor Silvio até chegar neste resultado final.

A professora Dr^a Luiza Helena Gremski pela paciência e atenção que sempre teve quando precisei da sua ajuda.

A professora Dr^a Andrea Senff-Ribeiro pela contribuição na elaboração das ideias deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Matriz Extracelular e Biotecnologia de Venenos Ana Carolina Martins Wille, Aline Viana Bednaski, Brenda Marin, Daniela Buch, Daniele Chaves, Dilza Trevizan Silva, Eduardo Soares, Eduardo Mendonça, Fernanda Nunes Souza, Fernando Matsubara, Gabriel Meissner, João Stanke, Kiane Freitas, Larissa Vuitika, Lucas Pedrosa, Marta Oliverio, Mariana Magnoni, Marianna Boia, Thiago Lopes De Mari e Valéria Ferrer por todo o apoio e pelos bons momentos que me proporcionaram desde que entrei para a família do LME, em especial ao Adriano Marcelo Morgon e Larissa Vuitika pela amizade durante esses anos e tenho certeza que também pelos outros que virão.

A Secretária do Departamento de Biologia Celular Mirian Rosely Maciel pelos ótimos cafés que fez durante todo o curso de especialização, pelo carinho e dedicação aos alunos.

“Jamais imputei à natureza um propósito ou um objetivo, nem nada que possa ser entendido como antropomórfico. O que vejo na natureza é uma estrutura magnífica que só compreendemos de modo muito imperfeito, e que não tem como não encher uma pessoa racional de um sentimento de humildade.”

Albert Einstein

Resumo

A partir do veneno de *L. intermedia* várias toxinas foram clonadas e vêm sendo caracterizadas bioquímica e biologicamente. Dentre as toxinas clonadas estão as fosfolipases-D que são responsáveis pela maioria dos efeitos biológicos causados pelo veneno, porém, a ação desta e das demais toxinas parece depender de uma ação combinada ou sinérgica que resulta no loxoscelismo. Loxoscelismo é a denominação do quadro clínico provocado em pacientes picados por aranhas do gênero *Loxosceles*. Até o momento, sete isoformas de fosfolipases-D foram clonadas e parcialmente caracterizadas. Todas essas isoformas recombinantes de fosfolipases-D, com exceção da mais recente, foram expressas na cepa bacteriana *E. coli* BL21(DE3)pLysS que não possui controle ou auxílio na formação de pontes dissulfeto intracadeia polipeptídica. Utilizando a primeira isoforma obtida (LiRecDT1), foi demonstrado a partir de cristalografia que essa enzima possui quatro cisteínas na sua cadeia polipeptídica que formam duas pontes dissulfeto e que essas pontes têm relação com a atividade das fosfolipases-D e com a sua estrutura terciária. Todas as sete isoformas possuem estas cisteínas conservadas e mesmo havendo também uma relevante conservação aminoacídica no sítio catalítico das isoformas de fosfolipases-D, o restante dos aminoácidos das sequências varia o suficiente para contribuir em mudanças nos níveis de atividade e solubilidade entre elas. Assim, sabendo-se que alterações nas estruturas podem interferir na intensidade das suas atividades, bem como na solubilidade em ambientes biológicos, realizamos a expressão de quatro isoformas (LiRecDT1, LiRecDT2, LiRecDT3 e LiRecDT1 H12A) na cepa até então utilizada e na cepa *E. coli* SHuffle T7 express LysY, que auxilia na formação de pontes dissulfeto e possui ambiente favorável a proporcionar opções de dobramentos alternativos às proteínas recombinantes. Essas quatro isoformas produzidas em ambas às cepas foram então purificadas e submetidas a ensaios de cunho bioquímico e biológico. Estes ensaios foram realizados com o intuito de serem realizadas comparações para avaliar se haveriam mudanças nos níveis de atividade e/ou solubilidade até então conhecidos para as quatro isoformas escolhidas. Todos os resultados mostraram não haver diferenças estatisticamente significantes nos níveis de atividade para as toxinas testadas, embora expressas em cepas diferentes. Entretanto, algumas características da nova cepa contribuíram para a diminuição do rendimento final de purificação quando comparadas com as purificadas a partir da outra cepa. A predição estrutural acabou revelando novas questões que certamente se tornarão alvos de estudo para melhor compreensão da atividade dessas enzimas. Este trabalho indicou que embora produzidas nesta nova cepa que possui refinamento para proporcionar um melhor dobramento, estas toxinas já estavam obtendo sua conformação correta espontaneamente quando produzidas na cepa bacteriana *E. coli* BL21(DE3)pLysS até então utilizada.

Palavras-chave: Fosfolipases-D, veneno, *Loxosceles*, cisteína, dissulfeto

Abstract

From the venom *L. intermedia* various toxins were cloned and has been characterized biochemical and biologically. Loxoscelism is the name of the clinical picture provoked in patients bitten by *Loxosceles* spiders. Among the cloned toxins are the phospholipases-D, that are responsible for most of the biological effects caused by the poison, however, the action of this and other toxins seems to depend on a combined or synergistic action that results in loxocelism. To date seven phospholipase-D isoforms have been cloned and partially characterized. All these recombinant isoforms of phospholipase-D, except the most recent, were expressed in the bacterial strain *E. coli* BL21(DE3)pLysS that has no control or aid in forming intrachain polypeptide disulfide bonds. Using the first isoform obtained (LiRecDT1) X-ray diffraction crystallography has allowed to demonstrate that this enzyme has four cysteines in its polypeptide chain that form two disulfide bonds, and that these bonds are related to the phospholipase-D activity and its tertiary structure. All of the seven isoforms possess these cysteines conserved and also while there is significant amino acids conservation in the catalytic site of the phospholipases-D isoforms, the remaining amino acid sequence varies enough to contribute to changes in activity levels and solubility among them. So, knowing that changes in the structures can interfere in the intensity of their activities, as well as solubility in biological environments, we performed the expression of four isoforms (LiRecDT1, LiRecDT2, LiRecDT3 LiRecDT1 and H12A) in the strain so far used and in the *E. coli* SHuffle T7 Expression LysY strain, which aids in the disulfide bonds formation and has favorable environment to provide alternative options to the recombinant protein folding. These four isoforms produced in both strains were then purified and subjected to biological and biochemical tests. These assays were performed with the intention to be performed comparisons to assess whether there would be changes in activity levels and/or solubility so far known for the four isoforms chosen. All results showed no statistically significant differences in activity levels for the tested toxins, although expressed in different strains. However, some features of the new strain contributed to the decrease in the final yield of purification when compared with the proteins purified from the other strain. The structural predctions eventually revealed new questions that surely will become targets of study to better understand the activity of these enzymes. This work indicates that although produced on this new strain that has refinement to provide an improved folding, these toxins were already getting their correct conformation spontaneously when produced in the bacterial strain *E. coli* BL21(DE3)pLysS so far used.

Keywords: Phospholipases-D, poison, *Loxosceles*, cystein, disulfide,

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - ARANHAS DA ESPÉCIE <i>Loxosceles intermedia</i>	20
Figura 2 - LESÃO DERMONECRÓTICA CAUSADA PELA PICADA DE ARANHAS DO GÊNERO <i>Loxosceles</i>	23
Figura 3 - FOSFOLIPASES.....	27
Figura 4 - ANÁLISE DO TRANSCRIPTOMA DA GLÂNDULA DE VENENO DA ARANHA <i>Loxosceles intermedia</i>	28
Figura 5 - ALINHAMENTO ESTRUTURAL ENTRE LiRecDT1 E SMase I.....	37
Figura 6 - ANÁLISE DO ALINHAMENTO MÚLTIPLO DAS SEQUÊNCIAS DOS AMINOÁCIDOS DAS TOXINAS RECOMBINANTES LiRecDT1, LiRecDT2 E LiRecDT3.	38
Figura 7 - COMPARAÇÃO DA ATIVIDADE FOSFOLIPÁSICA ENTRE AS TOXINAS LiRecDT1, LiRecDT2, LiRecDT3 e LiRecDT1H12A (DT1, DT2, DT3 e H12A respectivamente).....	39
Figura 8 - ELETROFEROGRAMAS DA REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO.	60
Figura 9 - PCR DE COLÔNIA.	62
Figura 10 - TESTE DE MINI-EXPRESSÃO DA TOXINA LiRecDT1 NAS CEPAS <i>E.coli</i> BL21(DE3)pLysS e <i>E.coli</i> SHuffle T7 Express lysY.....	63
Figura 11 - TESTE DE MINI-EXPRESSÃO DAS TOXINAS LiRecDT2, LiRecDT3 e LiRecDT1H12A NAS CEPAS <i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS e <i>E. coli</i> SHuffle T7 Express lysY..	65
Figura 12 - EXPRESSÃO DAS TOXINAS LiRecDT1, LiRecDT2, LiRecDT3 e LiRecDT1H12A NAS CEPAS <i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS e <i>E. coli</i> SHuffle T7 Express lysY..	67
Figura 13 - PURIFICAÇÃO DAS TOXINAS LiRecDT1, LiRecDT2, LiRecDT3 e LiRecDT1H12A DAS CEPAS <i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS e <i>E. coli</i> SHuffle T7 Express lysY.	74
Figura 14 - SEGUNDA PURIFICAÇÃO DA TOXINA LiRecDT3 DA CEPA <i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS.....	74

Figura 15 - GEL REDUTOR DAS TOXINAS LiRecDT1, LiRecDT2, LiRecDT3 E LiRecDT1 H12A DAS CEPAS <i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS E <i>E. coli</i> SHuffle T7 Express lysY.....	76
Figura 16 - GEL NÃO REDUTOR DAS TOXINAS LiRecDT1, LiRecDT2, LiRecDT3 E LiRecDT1 H12A DAS CEPAS <i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS E <i>E. coli</i> SHuffle T7 Express lysY.....	77
Figura 17 - WESTERN BLOT PARA COMPARAÇÃO DA REATIVIDADE IMONOLÓGICA DAS TOXINAS RECOMBINANTES LiRecDT1, LiRecDT2, LiRecDT3 e LiRecDT1 H12A DA CEPA <i>E. coli</i> SHuffle T7 Express lysY.....	78
Figura 18 - WESTERN BLOT PARA COMPARAÇÃO DA REATIVIDADE IMONOLÓGICA DAS TOXINAS RECOMBINANTES LiRecDT1, LiRecDT2, LiRecDT3 e LiRecDT1 H12A DA CEPA <i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS.....	79
Figura 19 - COMPARAÇÃO DA HEMÓLISE DIRETA DAS TOXINAS RECOMBINANTES LiRecDT1 (DT1), LiRecDT2 (DT2), LiRecDT3 (DT3) E LiRecDT1H12A (H12A) DE AMBAS CEPAS BACTERIANAS <i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS E <i>E. coli</i> SHuffle T7 Express lysY.....	84
Figura 20 - ANÁLISES ESTRUTURAIS DAS TOXINAS LiRecDT1H12A, LiRecDT1, LiRecDT2 E LiRecDT3.....	87
Figura 21 - COMPARAÇÃO E ANÁLISE ESTRUTURAL ENTRE OS AMINOÁCIDOS DO SÍTIO CATALÍTICO DAS TOXINAS LiRecDT1 E LiRecDT3.91	
Figura 22 - PREDIÇÃO DA MUTAÇÃO NAS CISTEÍNAS C53 E C201 DA TOXINA LiRecDT1..	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- ESPÉCIES DO GÊNERO *Loxosceles* ENCONTRADOS NO BRASIL.. 21

Tabela 2 - FOSFOLIPASES-D RECOMBINANTES encontradas na literatura disponível no site do Pubmed 33

Tabela 3 - RENDIMENTO DA PURIFICAÇÃO DAS TOXINAS LiRecDT1, LiRecDT2, LiRecDT3 e LiRecDT1H12A DAS CEPAS *E. coli* BL21(DE3)pLysS e *E. coli* SHuffle T7 Express lysY. 75

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - REAÇÃO IMUNOLÓGICA ENTRE LiRecDT1 E ANTI-VENENO DE <i>Loxosceles intermedia</i> - ELISA	80
Gráfico 2 - REAÇÃO IMUNOLÓGICA ENTRE LiRecDT2 E ANTI-VENENO DE <i>Loxosceles intermedia</i> - ELISA	81
Gráfico 3 - REAÇÃO IMUNOLÓGICA ENTRE LiRecDT3 E ANTI-VENENO DE <i>Loxosceles intermedia</i> - ELISA	81
Gráfico 4 - REAÇÃO IMUNOLÓGICA ENTRE LiRecDT1H12A E ANTI-VENENO DE <i>Loxosceles intermedia</i> - ELISA	82
Gráfico 5 - ENSAIO PARA COMPARAÇÃO DA ATIVIDADE ESFINGOMIELINÁSICA DAS ISOFORMAS LiRecDT1, LiRecDT2, LiRecDT3 E LiRecDT1 H12A PRODUZIDAS NAS CEPAS <i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS e <i>E. coli</i> SHuffle T7 Express lysY	83
Gráfico 6 - COMPARAÇÃO DA HEMÓLISE DIRETA DAS TOXINAS RECOMBINANTES LiRecDT1 (DT1), LiRecDT2 (DT2), LiRecDT3 (DT3) E LiRecDT1H12A (H12A) DE AMBAS CEPAS BACTERIANAS <i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS E <i>E. coli</i> SHuffle T7 Express lysY	85

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS.....	18
2.1 OBJETIVO GERAL.....	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
3. REVISÃO DA LITERATURA	19
3.1 Aranhas do gênero <i>Loxosceles</i> : Contexto geral	19
3.2 Loxoscelismo: Conceito e formas de manifestação.....	22
3.3 Veneno loxoscélico	25
3.4 Fosfolipases-D.....	26
3.5 Fosfolipases-D recombinantes	34
3.6 Sistema de expressão bacteriano.....	40
4. JUSTIFICATIVA.....	43
5. MATERIAL E MÉTODOS	44
5.1 Animais	44
5.2 Anticorpos.....	44
5.3 Extração de veneno loxoscélico por eletrochoque.....	45
5.4 Subclonagem dos cDNAs e produção da LiRecDT1 H12A a partir de uma biblioteca de cDNA da glândula produtora de veneno de <i>Loxosceles intermedia</i> ..	45
5.5 Transformação na cepa de subclonagem DH5 α eletricamente competente ...	46
5.6 PCR de colônia.....	46
5.7 Mini preparação plasmidial e precipitação	47
5.8 Reação e análise de sequenciamento	48
5.9 Transformação das cepas de expressão <i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS e <i>E.coli</i> SHuffle T7 Express lysY quimicamente competentes	49
5.10 Teste de Miniexpressão e expressão da LiRecDT1, LiRecDT2, LiRecDT3 e LiRecDT1 H12A.....	50
5.11 Purificação da LiRecDT1, LiRecDT2, LiRecDT3 e LiRecDT1H12A.....	52
5.12 Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida	53
5.13 Dosagem de proteínas pelo método de Bradford	53

5.14	Ensaio de atividade esfingomielinásica	54
5.15	Reação de imunoblotting - Western Blot.....	55
5.16	Ensaio de ELISA.....	56
5.17	Ensaio de hemólise	57
5.17.1	Obtenção de eritrócitos humanos	57
5.17.2	Atividade hemolítica direta das toxinas recombinantes LiRecDT1, LiRecDT2, LiRecDT3 e LiRecDT1 H12A produzidas na <i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS e <i>E. coli</i> SHuffle T7 Express lysY	57
5.18	Análise estatística.....	58
5.19	Análise estrutural das proteínas com ferramentas de Bioinformática	58
6.	RESULTADOS.....	59
6.1	Sequenciamento.....	59
6.2	Transformações das cepas de expressão e PCR de colônia	61
6.3	Testes de Miniexpressão.....	62
6.4	Expressão heteróloga das toxinas recombinantes LiRecDT1, LiRecDT2, LiRecDT3 e LiRecDT1H12A	66
6.5	Purificação das toxinas recombinantes LiRecDT1, LiRecDT2, LiRecDT3 e LiRecDT1H12A.....	69
6.6	Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida	75
6.7	Reação de imunoblotting - <i>Western Blot</i>	78
6.8	Ensaio de ELISA.....	80
6.9	Ensaio de atividade esfingomielinásica	82
6.10	Atividade hemolítica direta das toxinas recombinantes LiRecDT1, LiRecDT2, LiRecDT3 e LiRecDT1 H12A produzidas na <i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS e <i>E. coli</i> SHuffle T7 Express lysY.	83
6.11	Análise estrutural das proteínas com ferramentas de Bioinformática	85
7.	DISCUSSÃO	93
8.	CONCLUSÃO	103
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	105

1. INTRODUÇÃO

As aranhas do gênero *Loxosceles* conhecidas popularmente como aranhas-marrons e em alguns casos como aranhas-violino são encontradas em diversas partes do globo (da SILVA *et al.*, 2004; MARQUES-DA-SILVA, 2005).

Embora não sejam aranhas agressivas, das 11 espécies encontradas no Brasil, três (*L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta*) estão envolvidas nos casos de envenenamento humano, sendo as responsáveis pelo maior número de acidentes causados por animais peçonhentos no Paraná, justamente pela facilidade que possuem em se adaptar ao ambiente intradomiciliar, onde são encontradas com frequência em calçados, roupas e entulhos acumulados nas residências (da SILVA *et al.*, 2004; APPEL *et al.*, 2005; BINFORD *et al.*, 2008; BERTANI *et al.*, 2010).

O termo loxoscelismo é utilizado para descrever os sinais e sintomas resultantes de acidentes envolvendo aranhas do gênero *Loxosceles* (da SILVA *et al.*, 2004). Esses acidentes causados pelo envenenamento podem ser caracterizados por duas variantes clínicas: o quadro cutâneo e o quadro sistêmico (FUTRELL, 1992).

O veneno loxoscélico é uma mistura essencialmente proteica de compostos biologicamente ativos, com a presença abundante de enzimas em sua composição (da SILVA *et al.*, 2004; APPEL *et al.*, 2005). A partir de análises eletroforéticas pode-se constatar a presença predominante de proteínas e peptídeos de baixa massa molecular (3-45KDa) (MARTINEZ-VARGAS, 1987).

As fosfolipases-D, metaloproteases, hialuronidases, serino-proteases, inibidor de serino-proteases, peptídeos inseticidas TCTP (do inglês *Translationally Controlled Tumor Protein*) e alérgenos, estão entre as proteínas que compõem o veneno que já foram descritas (MACHADO *et al.*, 2005; GREMSKI *et al.*, 2010; CHAIM *et al.*, 2011a).

As fosfolipases-D são as enzimas mais estudadas e caracterizadas do veneno de *Loxosceles spp* e são consideradas como os principais componentes do veneno por serem responsáveis por reproduzirem os principais efeitos e sintomas do envenenamento isoladamente (de ANDRADE *et al.*, 2005).

Até o momento, sete isoformas de fosfolipases-D da aranha *Loxosceles intermedia* foram clonadas e expressas em cepas bacterianas pelo nosso grupo, LiRecDT1 (CHAIM *et al.*, 2006), LiRecDT2 e LiRecDT3 (da SILVEIRA *et al.*, 2006), LiRecDT4 e LiRecDT5 (da SILVEIRA *et al.*, 2007), LiRecDT6 (APPEL *et al.*, 2008) e LiRecDT7 (VUITIKA *et al.*, 2012) e estes estudos realizados com todas as isoformas das toxinas dermonecróticas recombinantes mostraram que embora homólogas elas possuem diferentes níveis de atividade.

O nome LiRecDT utilizado para batizar cada isoforma produzida é uma abreviação do termo em inglês *Loxosceles intermedia Recombinant Dermonecrotic Toxins*.

Vários trabalhos já demonstraram os efeitos causados isoladamente por essas enzimas: dermonecrose (da SILVA *et al.*, 2004; APPEL *et al.*, 2005) hemólise (CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2009; CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2011) agregação plaquetária (da SILVEIRA *et al.*, 2006, 2007; APPEL *et al.*, 2008) distúrbios renais, nefrotoxicidade (LUCIANO *et al.*, 2004; CHAIM *et al.*, 2006; KUSMA *et al.*, 2008), citotoxicidade (CHAIM *et al.*, 2006, KUSMA *et al.*, 2008; CHAIM *et al.*, 2011b) alterações na permeabilidade vascular, edema (da SILVEIRA *et al.* 2006, 2007; APPEL *et al.*, 2008) e massiva resposta inflamatória (PALUDO *et al.*, 2009; CHAIM *et al.*, 2011b).

Além disso, dados fundamentais foram coletados sobre a estrutura molecular desta classe de compostos, principalmente quanto ao sítio catalítico (de GIUSEPPE *et al.*, 2011). Já se sabe que as fosfolipases-D de *Loxosceles intermedia* possuem quatro cisteínas conservadas nas suas sequências, e a partir da solução da estrutura da cristalografia da toxina LiRecDT1 produzida por de GIUSEPPE e seus colaboradores (2011) foi possível observar que essas cisteínas formam duas pontes dissulfeto.

Todas as isoformas recombinantes produzidas até o momento pelo nosso grupo, com exceção da LiRecDT7, foram produzidas na mesma cepa bacteriana de expressão, que é a *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS, porém nenhuma das características desta cepa favorece a formação de pontes dissulfeto ou auxilia no dobramento correto das proteínas recombinantes.

Portanto a produção destas toxinas recombinantes em modelos de expressão que favoreçam a formação dessas pontes dissulfeto se torna necessário para avaliar se a atividade dessas toxinas estaria sofrendo alguma alteração devido a possível falta de dobramento correto pela não formação dessas pontes dissulfeto espontaneamente quando produzidas na cepa *E. coli* BL21(DE3)pLysS.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Expressão heteróloga de isoformas de fosfolipases-D recombinantes na cepa de *E. coli* SHuffle T7 express LysY formadora de pontes dissulfeto e que proporciona condições diferenciadas de expressão e dobramentos alternativos às toxinas recombinantes.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterização das isoformas em experimentos de cinho bioquímico.
- Caracterização das isoformas em experimentos de cinho biológico.
- Comparação de todos os resultados obtidos através da realização dos ensaios de caracterização para isoformas LiRecDT1, LiRecDT2, LiRecDT3 e LiRecDT1 H12A expressas em *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS e *E. coli* SHuffle T7 express LysY, para avaliar se houveram mudanças significativas na atividade das toxinas recombinantes quando expressas em cepas com refinamentos para expressão diferenciados.
- Predição e comparação estrutural das isoformas utilizadas.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Aranhas do gênero *Loxosceles*: Contexto geral

Por apresentarem coloração que vai desde o marrom claro ao escuro, essas aranhas são popularmente conhecidas como aranhas-marrons, cujo aspecto auxilia na identificação das diferentes espécies do gênero. Outra característica que possibilita a identificação das aranhas deste gênero é o desenho em forma de violino na superfície dorsal do cefalotórax sendo então também conhecidas como aranhas-violino (FUTRELL, 1992; MÁLAQUE *et al.*, 2002; VETTER; SWANSON, 2007; VETTER; ISBISTER, 2008). Juntamente com os métodos de identificação citados acima é também possível a identificação pela disposição dos olhos, os quais se apresentam em três pares dispostos em semicírculo (FUTRELL, 1992; VETTER; VISSCHER, 1998; da SILVA *et al.*, 2004; APPEL *et al.*, 2005). Essas aranhas apresentam tamanho corporal variando entre 8 a 15 mm e pernas de 8 a 30 mm (da SILVA *et al.*, 2004) e apresentam dimorfismo sexual, sendo as fêmeas com corpos maiores que os machos e pedipalpos adaptados à reprodução nos machos (GILBERT, 1997) (Fig.1).

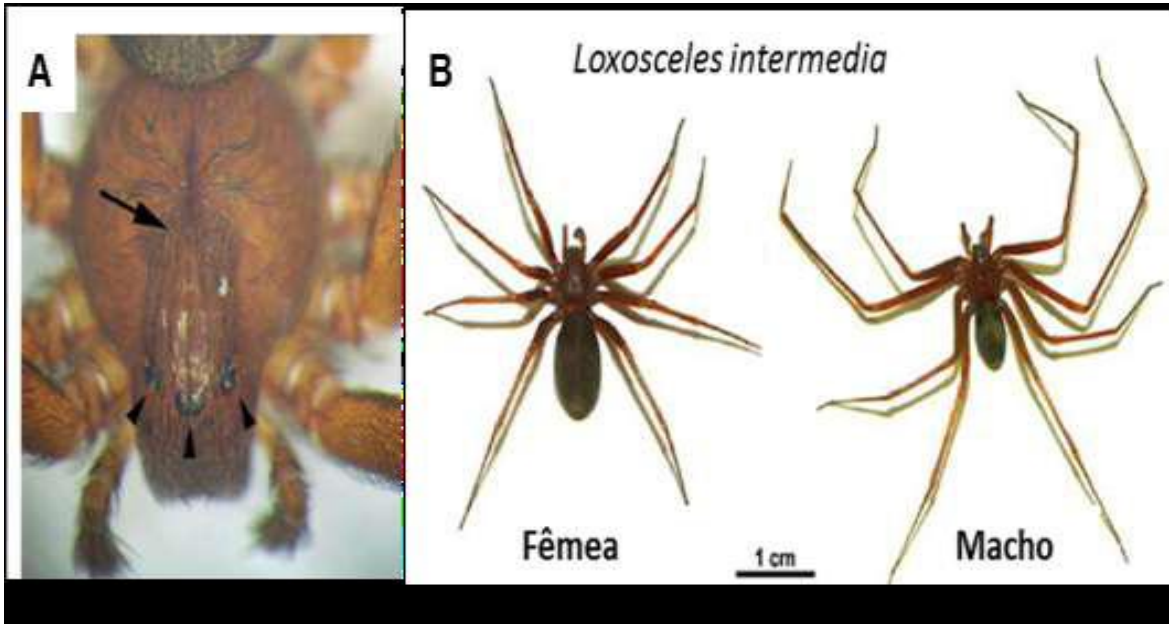


Figura 1 - ARANHAS DA ESPÉCIE *Loxosceles intermedia*. (A) Desenho muito semelhante à de um violino na região dorsal do cefalotórax (seta); os seis olhos agrupados em díades dispostos em semicírculo na região dorsal do cefalotórax (pontas de seta). (B) Aranhas adultas de *Loxosceles intermedia*, demonstrando o dimorfismo sexual entre fêmeas (esquerda) e machos (direita). Adaptado de: CHAIM *et al.*, 2011a.

Ao todo 100 espécies encontram-se descritas para esta família (PLATNICK VERSION 12.5, 2012) e encontram-se distribuídas em cinco continentes (da SILVA *et al.*, 2004), sendo 20 endêmicas do continente Africano, 50 da América do Norte e Central e 30 da América do Sul (MARQUES-DA-SILVA, 2005).

Das 11 espécies registradas no Brasil (BERTANI *et al.*, 2010), quatro estão presentes no estado Paraná: *L. intermedia*, *L. laeta*, *L. gaucho* e *L. hirsuta* (FISCHER & VASCONCELLOS-NETO, 2005; MARQUES-DA-SILVA, 2005) (Tab. 1).

ESPÉCIES DO GÊNERO <i>Loxosceles</i> ENCONTRADOS NO BRASIL
<i>Loxosceles Adelaida</i>
<i>Loxosceles anômala</i>
<i>Loxosceles similis</i>
<i>Loxosceles amazônica</i>
<i>Loxosceles gaucho</i> *
<i>Loxosceles hirsuta</i> *
<i>Loxosceles intermedia</i> *
<i>Loxosceles laeta</i> *
<i>Loxosceles porta</i>
<i>Loxosceles imodesta</i>
<i>Loxosceles chapadensis</i>

Tabela 1- ESPÉCIES DO GÊNERO *Loxosceles* ENCONTRADOS NO BRASIL. *Espécies de aranhas-marrons encontradas no Estado do Paraná.

Por terem adquirido hábitos intradomiciliares houve um aumento dos acidentes com humanos, entretanto essas aranhas não são normalmente agressivas, grande parte das picadas ocorre como forma de defesa quando as aranhas são comprimidas inadvertidamente ao vestir-se, enxugar-se ou durante o sono (FUTRELL, 1992; RIBEIRO *et al.*, 1993).

Acidentes causados por aranhas do gênero *Loxosceles* têm sido descritos desde a década de 1950 (ROSENFELD *et al.*, 1957; ATKINS *et al.*, 1958; GUILHERME, FERNANDES e BARBARO, 2001).

Os acidentes com cada espécie variam de estado a estado no Brasil, onde podemos dividir da seguinte maneira: a *Loxosceles gaucho* é a principal responsável pelos acidentes em São Paulo enquanto que a *Loxosceles intermedia* é comum no Paraná, onde ocorre a maior parte dos acidentes no Brasil e a *Loxosceles laeta* que é a mais venenosa, está presente em Santa Catarina e em vários países latino-americanos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

De acordo com os dados mais recentes do Sistema de Informação de Agravos de Notificação do Ministério da Saúde (SINAN), dos 16.500 casos de acidentes causados por aracnídeos no Brasil, 4.798 são correspondentes aos

acidentes com as aranhas do gênero *Loxosceles* e desses, 2.650 casos ocorreram no Paraná (SINAN, 2013).

3.2 Loxoscelismo: Conceito e formas de manifestação

Loxoscelismo é o nome que se dá ao conjunto de manifestações clínicas induzidas pelo envenenamento envolvendo aranhas do gênero *Loxosceles* (FUTRELL, 1992; APPEL *et al.*, 2005; da SILVA *et al.*, 2004).

Existem duas variantes clínicas características muito bem definidas (BARBARO *et al.*, 1992): o quadro cutâneo ou dermonecrótico que ocorre na maioria dos casos (84-97%) caracterizado por necrose no local da picada com espalhamento gravitacional e o quadro viscerocutâneo ou sistêmico que ocorre na proporção inversa (3-16%), este último caracterizado por efeitos sistêmicos, com destaque para distúrbios na homeostase e função renal. Embora menos comum, o quadro sistêmico é a principal causa da morte por Loxoscelismo e têm sido descritos sinais clínicos gerais como fraqueza, febre, náuseas, vômitos e convulsões (FUTRELL, 1992; SWANSON & VETTER, 2006; VETTER & IBISTER 2008; DA SILVA *et al.*, 2004; LUNG & MALLORY, 2000).

O quadro cutâneo do Loxoscelismo é caracterizado de forma geral por uma dermonecrose na região da picada (REES *et al.*, 1984) (Fig. 2). A lesão não é percebida pelo indivíduo logo no início, pois é pouco dolorosa e somente 2 a 8 horas depois que começa a surgir dor local da lesão que vai de moderada a severa, caracterizada por queimação ou ardência.

Outros sintomas envolvem prurido, edema, mal-estar geral e febre. Estes sintomas são seguidos pelo surgimento de uma lesão circunscrita por halo vermelho, com centro pálido conhecido como placa marmórea (FUTRELL, 1992). Ainda pode ocorrer o acúmulo de leucócitos polimorfonucleares, necrose e formação de abscesso de 3 a 5 dias depois do acidente (FUTRELL, 1992). A lesão dermonecrótica pode evoluir para formação de uma escara de difícil cicatrização entre 2 a 6 semanas após, podendo originar sequelas deformantes (PIZZI *et al.*,

1957). Estas sequelas originadas no local da lesão às vezes podem ser resolvidas com uma cirurgia reparadora (FUTRELL, 1992).

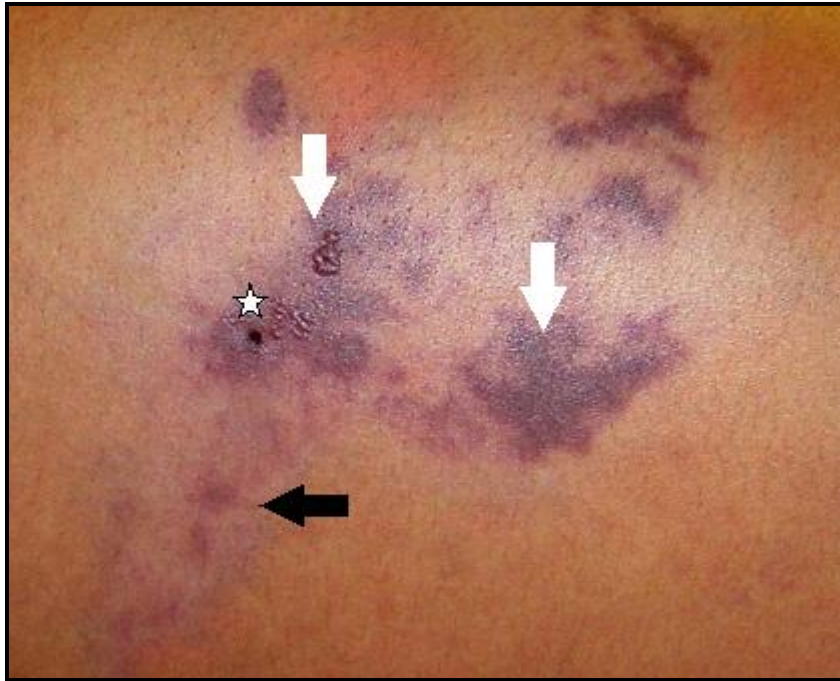


Figura 2 - LESÃO DERMONECRÓTICA CAUSADA PELA PICADA DE ARANHAS DO GÊNERO *Loxosceles*. O paciente desenvolveu edema, vesículas e equimoses (setas brancas) em volta do provável local da picada (estrela). A marca registrada da picada por aranhas do gênero *Loxosceles* é o espalhamento gravitacional (seta preta). Adaptado a partir de DE SOUZA *et al.*, 2008.

O outro quadro conhecido como viscerocutâneo ou sistêmico por sua vez é observado nos casos mais graves, com o aparecimento dos sintomas 24 horas após a picada. Os sintomas vão desde a reação no local da picada até astenia, febre, episódios eméticos, alterações sensoriais, cefaleia e insônia; dentre os casos mais graves ocorrem convulsões e coma, podendo também ocorrer prurido generalizado e petéquias (MARTINEZ-VARGAS, 1987; SCHENONE *et al.*, 1989; FUTRELL, 1992; BRAVO *et al.*, 1993).

Em casos ainda mais graves são notadas alterações hematológicas como anemia hemolítica, agregação plaquetária causando trombocitopenia (BASCUR *et al.*, 1982) e coagulação intravascular disseminada (DENNY *et al.*, 1964).

Atribui-se um papel central ao efeito hemolítico do veneno para a injúria renal (COUTINHO, 1996), sendo a principal causa de óbito dos pacientes envenenados

(WILLIAMS *et al.*, 1995; FUTRELL, 1992; da SILVA *et al.*, 2004, LUNG; MALLORY, 2000).

O quadro sistêmico pode desenvolver-se antes da reação local ser percebida e basicamente tem relação com a quantidade de veneno injetada e a condição imunológica do paciente, descartando-se a ligação com sexo, idade, estação do ano e gravidade da lesão cutânea (MORÁN *et al.*, 1981; CICARELLI *et al.*, 1983; HEREDIA *et al.*, 1989). É importante ressaltar que um quadro não exclui o outro, podendo o acometido pelo envenenamento apresentar tanto ambos os quadros, quanto apenas somente um deles.

De acordo com o Portal da Saúde do Ministério da Saúde brasileiro os primeiros socorros que devem ser seguidos no caso de um eventual acidente por animais peçonhentos são: lavar o local da picada com água e sabão; não fazer torniquete ou garrote, não furar, cortar, queimar, espremer ou fazer sucção no local da ferida, nem aplicar folhas, pó de café ou terra para não provocar infecções; não dar à vítima bebida alcoólica, querosene, ou fumo, como é costume em algumas regiões do país; levar a vítima imediatamente ao serviço de saúde mais próximo para que possa receber o tratamento adequado em tempo (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

Segundo CUPO e colaboradores (2003), anti-inflamatórios corticosteróides tópicos e sistêmicos e dapsona também têm sido recomendados para o tratamento do Loxoscelismo e em casos de suspeita de hemólise intravascular, deve-se realizar hidratação e alcalinização da urina, com intuito de evitar a precipitação de hemoglobina nos túbulos, o que elevaria o risco de necrose tubular aguda hemoglobinúrica.

Não existe uma unanimidade quando se trata do tratamento do Loxoscelismo. Pauli e colaboradores (2009) apontam para essa questão das várias intervenções propostas onde além das citadas acima, também é indicado o uso de antibióticos e agentes quelantes, ou ainda o uso de antivenenos como tratamento para neutralização do veneno.

Os antivenenos loxoscélicos são produzidos no Brasil, México e Peru. No Brasil são produzidos os soros antiloxoscélico e antiaracnídico. O soro

antilooscélico brasileiro contém anticorpos das três espécies de *Loxosceles* clinicamente mais importantes (*L. intermedia*, *L. laeta* e *L. gaucho*) e o antiaracnídico os anticorpos contra os venenos de *L. gaucho*, *Phoneutria nigriventer*, *Tityus serrulatus* and *Tityus bahiensis* (PAULI *et al.*, 2006).

Também, segundo o Protocolo Técnico para Atenção aos Acidentes Loxoscélicos da Secretaria da Saúde de Curitiba, não existe exame complementar diagnóstico específico. Em geral, o diagnóstico, estadiamento e conduta são definidos através da avaliação do quadro clínico. Alterações laboratoriais dependem da forma clínica do envenenamento, podendo ser solicitados hemograma com reticulócitos (em caso de palidez), bilirrubinas (em casos de icterícia), potássio e creatinina (para casos de hemólise com suspeita de insuficiência renal aguda), coagulograma e contagem de plaquetas (para casos graves) (SECRETARIA DA SAÚDE DE CURITIBA, 2006).

3.3 Veneno loxoscélico

O veneno Loxoscélico é um líquido incolor e cristalino, de natureza essencialmente proteica, produzida por um par de glândulas situadas no cefalotórax, ligadas a um par de quelíceras (dos SANTOS *et al.*, 2000).

O volume de veneno produzido pelas glândulas é variável de acordo com a espécie, tamanho, sexo e outros fatores (de OLIVEIRA *et al.*, 2005), mas dificilmente ultrapassa 4 µl e contém de 65 µg a 100 µg de proteínas totais (SAMS *et al.*, 2001).

Algumas proteínas do veneno da espécie *L. intermedia* exibem intensa N-glicosilação, com estruturas dos tipos alta-manose, complexas e fucosiladas. Em menor grau também são O-glicosiladas predominando o açúcar N-acetilgalactosamina (VEIGA *et al.*, 1999).

O veneno de *Loxosceles intermedia* possui maior quantidade de proteínas de baixo peso molecular e peptídeos, variando entre 5-40 kDa e em menor proporção proteínas de alto peso molecular, 60-850 kDa (VEIGA *et al.*, 2000).

O conteúdo total do veneno ainda não é totalmente esclarecido, mas sabe-se que além da grande quantidade de proteínas, a mistura também é constituída por ácidos nucleicos, aminoácidos livres, poliaminas neurotóxicas, monoaminas e sais inorgânicos (ESCOUBAS *et al.*, 2000). Estudos mostram que a toxicidade do veneno é dependente do efeito combinado ou sinérgico de seus constituintes (GEREN *et al.*, 1976; da SILVA *et al.*, 2004; APPEL *et al.*, 2005).

Diversas toxinas do veneno loxoscélico com ação enzimática já foram encontradas e caracterizadas bioquimicamente: fosfolipases-D (CHAIM *et al.*, 2006; da SILVEIRA *et al.*, 2006; da SILVEIRA *et al.*, 2007; APPEL *et al.*, 2008), metaloproteases e serinoproteases (FEITOSA *et al.*, 1998; VEIGA *et al.*, 2000a; da SILVEIRA *et al.*, 2007b) e hialuronidasas (FUTRELL, 1992; YOUNG; PINCUS, 2001; BARBARO *et al.*, 2005; da SILVEIRA *et al.*, 2007a).

3.4 Fosfolipases-D

A ação do veneno loxoscélico pode ser mais bem compreendida quando se observa a ação das fosfolipases-D, pois como anteriormente dito esta toxina quando estudada isoladamente é capaz de reproduzir quase todos os efeitos observados no loxoscelismo (de ANDRADE *et al.*, 2005).

As fosfolipases do tipo D (PLDs) catalisam a hidrólise da ponte fosfodiéster dos fosfolipídios, por exemplo, fosfatidilcolina, liberando a colina como subproduto. Interessantemente todas as PLDs recombinantes de venenos encontradas pertencem às aranhas do gênero *Loxosceles* (Fig. 3).

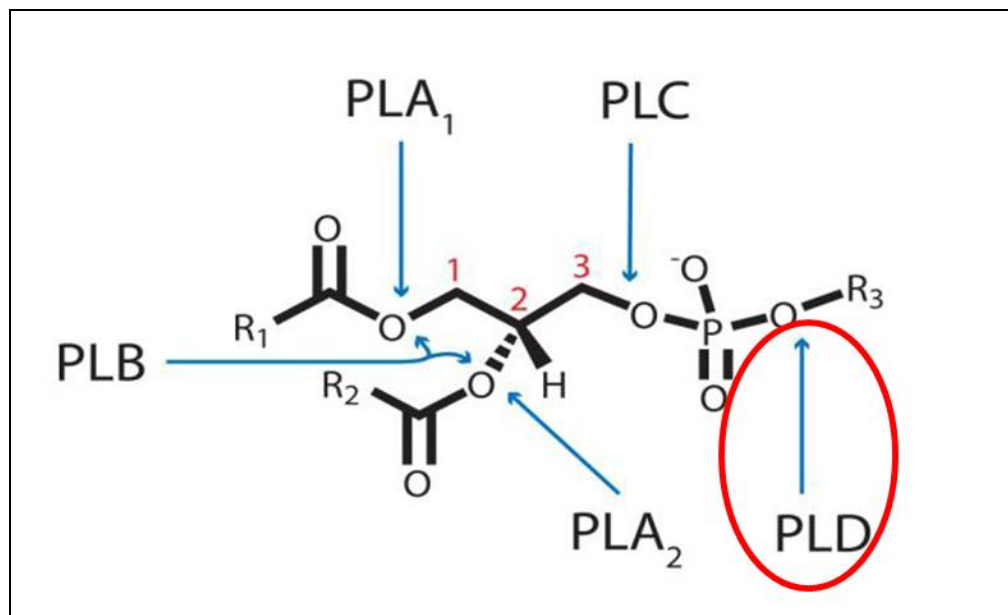


Figura 3 - FOSFOLIPASES. Local de clivagem da ponte éster pelas fosfolipases. As PLA₁, PLA₂, e PLC catalisam a hidrólise da ponte éster da região dos carbonos sn-1(1), sn-2 (2) e sn-3 (3) respectivamente. A PLB cliva ambas as pontes ésteres sn-1 e sn-2. A PLD destacada em vermelho hidrolisa a ponte fosfodiéster oposta da PLC. R₁, R₂ e R₃ variados grupos radicais.

Essas enzimas possuem massa molecular média de 30 a 35 kDa, apresentam um peptídeo-sinal seguido de um propeptídeo e exibem alto grau de identidade de acordo com as sequências amioacídicas, estando entre 55% e 99% da conservação dos resíduos no sítio catalítico. Baseado nos estudos filogenéticos as fosfolipases-D foram distribuídas em seis grupos distintos dentro de uma mesma família que foi denominada *Loxtox* (CHAIM *et al.*, 2006; KALAPOTHAKIS *et al.*, 2007).

As fosfolipases-D são também conhecidas como pertencentes da família das toxinas dermonecróticas (fator dermonecrótico), decorrente da sua principal característica biológica de isoladamente induzir dermonecrose quando aplicada subcutaneamente em coelhos (APPEL *et al.*, 2005).

Várias isoformas de fosfolipases-D já foram encontradas no veneno total da *L. gaucho* pelo método de análise proteômica, onde foi possível encontrar 11 isoformas (MACHADO *et al.*, 2005), assim como Gremski e seus colaboradores (2010) fizeram a análise transcriptômica do veneno total da *L. intermedia* e

mostraram que 20,2% dos transcritos codificantes para as toxinas pertenciam a fosfolipases-D (Fig. 4).

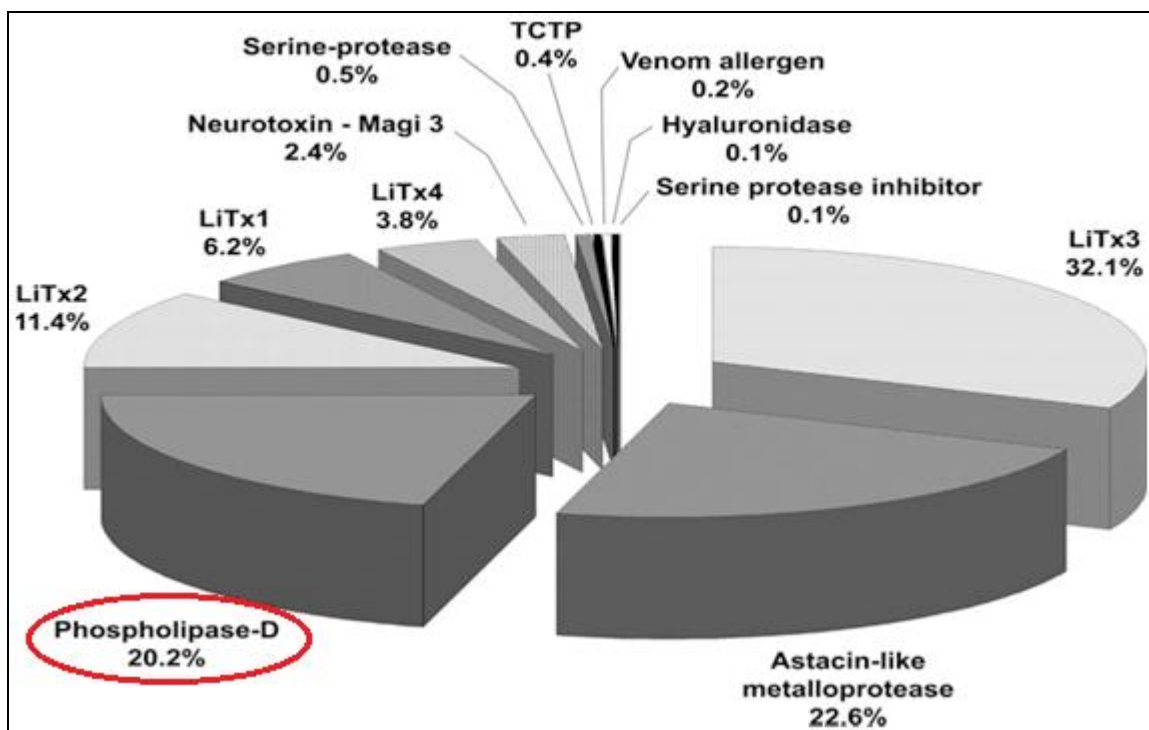


Figura 4 - ANÁLISE DO TRANSCRIPTOMA DA GLÂNDULA DE VENENO DA ARANHA *Loxosceles intermedia*. As proporções relativas de cada grupo de toxinas sobre o total de transcritos codificantes para toxinas, adaptado de GREMSKI *et al.* 2010. Em vermelho está destacado a proporção de fosfolipase-D no veneno total.

Além de isoladamente serem capazes de induzir a dermonecrose, as fosfolipases-D são capazes de causar agregação plaquetária, hemólise, letalidade, nefrotoxicidade e hipermeabilidade vascular (TAMBOURGI *et al.*, 1998; da SILVA *et al.*, 2004; KALAPOTHAKIS *et al.*, 2007; RATTMANN *et al.*, 2008).

A principal importância da atividade catalítica das fosfolipases-D se deve ao metabolismo da esfingomielina e acredita-se que os metabólitos gerados possam modular uma variedade de eventos biológicos, que englobam desde a proliferação e diferenciação celular até fenômenos de apoptose (MARCHESINI, HANNUN, 2004; TANI, ITO, IGARASHI, 2007).

Dentre todos os trabalhos listados na tabela abaixo o que mais chamou a atenção foi o de CATALÁN e seus colaboradores (2011), por afirmar a clonagem e

expressão de uma isoforma de fosfolipase-D de *Loxosceles laeta* inativa. Neste trabalho duas isoformas foram clonadas e expressadas e foram chamadas de rLIPLD1 e rLIPLD2 sendo a segunda toxina teoricamente inativa, não fosse o fato de que uma importante parte já conhecida das fosfolipases-D estivesse claramente omitida na sequência desta toxina recombinante.

Já foi reportado por MURAKAMI e colaboradores (2006) que o aminoácido Histidina da posição 12 tem papel importante na atividade catalítica das fosfolipases-D das aranhas do gênero *Loxosceles*. O aminoácido Histidina na posição 47 participa no ataque nucleófilo atacando a ligação fosfodiéster do substrato. A Histidina da posição 12 doa um átomo de hidrogênio para o substrato intermediário penta-coordenado gerado, formando a colina. A Histidina 12 então desprotonada retira um próton de uma molécula de água, num segundo ataque nucleófilo sobre este intermediário da reação, formando e liberando a então ceramida-1-fosfato como subproduto da reação.

Numa rápida olhada nas sequências depositadas por CATALÁN e colaboradores (2011) sob os números de acesso no *GenBank* GU121905 e GU121906, ou mesmo no próprio trabalho publicado, é possível notar que a segunda isoforma (rLIPLD2) não possui o aminoácido Histidina da posição 12, nem os aminoácidos precursores. Ficando assim claro o motivo pelo qual esta isoforma não possui atividade catalítica hidrolítica como as outras isoformas de fosfolipases das aranhas do gênero *Loxosceles*.

Em KUSMA e colaboradores (2008) é reportada no trabalho a produção de uma forma recombinante da isoforma LiRecDT1 da aranha *Loxosceles intermedia* com uma mutação sítio-dirigido na Histidina da posição número 12, substituindo pelo aminoácido Alanina. A então proteína recombinante mutada LiRecDT1 H12A mostrou em ensaios realizados possuir sua atividade catalítica praticamente anulada, corroborando com a hipótese sugerida por MURAKAMI e colaboradores (2006) sobre a importância deste aminoácido na atividade destas toxinas dermonecróticas.

Em todos os trabalhos listados na tabela abaixo (tab. 2) houve a produção da toxina recombinante na sua forma solúvel. O uso da bactéria *E. coli* foi unânime

e a cepa BL21(DE3) e BL21(DE3)pLysS foram as mais utilizadas, com apenas um trabalho relatando o uso da cepa *E. coli* BL21trxB-DE3, outro a cepa *E. coli* SHuffle Express T7 LysY (VUITIKA, 2012) e o trabalho de KALAPOTHAKIS e colaboradores (2002) a cepa *E. coli* XLORL.

Autor	Espécie	Nome	Mobilidade eletroforética	Vetor	Cepa de expressão	Protocolo expressão e purificação
Kalapothakis <i>et al.</i> , 2002	<i>Loxosceles intermedia</i>	recLiD1	37 kDa	pBK-CMV	<i>E. coli</i> XLORL	37 °C, D ₆₀₀ de 0.5, 0.5 mM de IPTG por 8h-12h. Coluna Sephacryl S-200, ELISA e purificação usando coluna de afinidade anti- <i>L. intermedia</i> Sepharose-IgGs F(ab') ₂ .
Araujo <i>et al.</i> , 2003	<i>Loxosceles intermedia</i>	Li-rec	35 kDa	pBK-CMV	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	37 °C, D ₆₀₀ de 0.5, 0.5 mM de IPTG por 8h-12h. Coluna Sephacryl S-200, ELISA e purificação usando coluna de afinidade anti- <i>L. intermedia</i> Sepharose-IgGs F(ab') ₂ .
Fernandes-Pedrosa <i>et al.</i> , 2002 Zela <i>et al.</i> , 2004 van Meeteren <i>et al.</i> , 2004 Murakami <i>et al.</i> , 2005 Murakami <i>et al.</i> , 2006	<i>Loxosceles laeta</i>	SMase I	33 kDa	pAE	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	D ₆₀₀ de 0.6, 1.0 mM de IPTG por 2h à 37°C. Purificação usando coluna de afinidade Ni(2+)-Chelating Sepharose Fast Flow.
Tambourgi <i>et al.</i> , 2004 Paixão-Cavalcante <i>et al.</i> , 2007 de Almeida <i>et al.</i> , 2008	<i>Loxosceles intermedia</i> e <i>Loxosceles laeta</i>	P1, P2 e SMase I	37kDa, 36kDa e 33 kDa	pRSET-B e pAE	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	D ₆₀₀ de 0.6, 1.0 mM de IPTG por 2h à 37°C. Purificação usando coluna de afinidade Ni(2+)-Chelating Sepharose Fast Flow.
Lee e Linch 2005	<i>Loxosceles reclusa</i>	SMaseD e mutantes	42kDa	pET30	<i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS	1.0 mM de IPTG. Purificação com coluna de ligação Niquel Sepharose e S-protein agarose.
de Andrade <i>et al.</i> , 2006	<i>Loxosceles intermedia</i>	P1 e P2	37kDa, 36kDa	pRSET-B	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	D ₆₀₀ de 0.6, 1.0 mM de IPTG por 2h à 37°C. Purificação usando coluna de afinidade Ni(2+)-Chelating Sepharose Fast Flow.
Chaim <i>et al.</i> , 2006 de Oliveira Christoff <i>et al.</i> , 2008 de Giuseppe <i>et al.</i> , 2011	<i>Loxosceles intermedia</i>	LiRecDT1	34kDa	pET-14b	<i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS	D ₅₅₀ de 0.5, 0.05 mM de IPTG por 3.5h à 30°C. Purificação usando coluna de Ni-NTA agarose.

Autor	Espécie	Nome	Mobilidade eletroforética	Vetor	Cepa de expressão	Protocolo expressão e purificação
da Silveira <i>et al.</i> , 2006	<i>Loxosceles intermedia</i>	LiRecDT2 e LiRecDT3	33.8 kDa e 34 kDa	pET-14b	<i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS	D ₅₅₀ de 0.5, 0.025 mM de IPTG por 3.5h à 30°C. Purificação usando coluna de Ni-NTA agarose.
Felicori <i>et al.</i> , 2006 Dias-Lopes <i>et al.</i> , 2010	<i>Loxosceles intermedia</i>	recLiD1	32.7kDa	pET11a	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	D ₆₀₀ de 0.5, 0.5 mM de IPTG por 4h à 37 °C. Purificação em cromatografia de fase-reversa (HPLC) usando coluna C8 Vydac.
Olvera <i>et al.</i> , 2006	<i>Loxosceles boneti</i> , <i>Loxosceles reclusa</i> e <i>Loxosceles laeta</i>	Lb1N, Lb1C, Lr1N, LI1N e LI2C	30-32kDa	pQE30 e pQE60	<i>E. coli</i> BL21trxB-DE3	100 uM IPTG por 16h à 20°C. Purificação usando coluna de afinidade Ni-NTA-Sepharose.
da Silveira <i>et al.</i> , 2007	<i>Loxosceles intermedia</i>	LiRecDT4 e LiRecDT5	34kDa e 37kDa	pET-14b	<i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS	D ₅₅₀ de 0.5, 0.025 mM de IPTG por 3.5h à 30°C. Purificação usando coluna de Ni-NTA agarose.
Ribeiro <i>et al.</i> , 2007	<i>Loxosceles intermedia</i>	LiRecDT1, LiRecDT2 e LiRecDT3	34kDa, 33.8 kDa e 34 kDa	pET-14b	<i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS	D ₅₅₀ de 0.5, 0.025 mM de IPTG por 3.5h à 30°C. Purificação usando coluna de Ni-NTA agarose.
Appel <i>et al.</i> , 2008	<i>Loxosceles intermedia</i>	LiRecDT6	33 kDa	pET-14b	<i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS	D ₅₅₀ de 0.5, 0.025 mM de IPTG por 3.5h à 30°C. Purificação usando coluna de Ni-NTA agarose.
Kusma <i>et al.</i> , 2008 Chaves-Moreira <i>et al.</i> , 2009 Paludo <i>et al.</i> , 2009 Ullah <i>et al.</i> , 2011 Chaim <i>et al.</i> , 2011b	<i>Loxosceles intermedia</i>	LiRecDT1 e LiRecDT1 H12A	34kDa	pET-14b	<i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS	D ₅₅₀ de 0.5, 0.05 mM de IPTG por 3.5h à 30°C. Purificação usando coluna de Ni-NTA agarose.
de Santi Ferrara <i>et al.</i> , 2009	<i>Loxosceles laeta</i>	Smase I e SMase II	33 kDa e 35kDa	pAE e pRSET- B	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	D ₆₀₀ de 0.6, 1.0 mM de IPTG por 2h à 37°C. Purificação usando coluna de afinidade Ni(2+)-Chelating Sepharose Fast Flow.

Autor	Espécie	Nome	Mobilidade eletroforética	Vetor	Cepa de expressão	Protocolo expressão e purificação
Catalán <i>et al.</i> , 2011	<i>Loxosceles laeta</i>	rLIPLD1 e rLIPLD2	48kDa e 44kDa	pET-SUMO	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	D ₆₀₀ de 0.5, 0.05 mM de IPTG por 7h à 25°C. Purificação usando coluna de afinidade Ni(2+)-Chelating Sepharose Fast Flow.
Chaves-Moreira <i>et al.</i> , 2011	<i>Loxosceles intermedia</i>	LiRecDT1, LiRecDT2, LiRecDT3, LiRecDT4, LiRecDT5, LiRecDT6 e LiRecDT1 H12A	34kDa, 33.8kDa, 34kDa, 34kDa, 37kDa, 33kDa e 34kDa	pET-14b	<i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS	D ₅₅₀ de 0.5, 0.05 mM de IPTG por 3.5h à 30°C. Purificação usando coluna de Ni-NTA agarose.
Gomes <i>et al.</i> , 2011	<i>Loxosceles intermedia</i> e <i>Loxosceles laeta</i>	LiRecDT1, LiRecDT1 H12A e LiD1r	34kDa, 34kDa e 32.7kDa	pET-14b e pET11a	<i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS e <i>E. coli</i> BL21 (DE3)	D ₅₅₀ de 0.5, 0.05 mM de IPTG por 3.5h à 30°C. Purificação usando coluna de Ni-NTA agarose. D ₆₀₀ de 0.5, 0.5 mM de IPTG por 4h à 37°C. Purificação em cromatografia de fase-reversa (HPLC) usando coluna C8 Vydac.
Vuitika 2012*	<i>Loxosceles intermedia</i>	LiRecDT7	34.4kDa	pET-14b	<i>E. coli</i> SHuffle T7 Express LysY	D ₆₀₀ de 0.4 – 0,6, 0.05 mM de IPTG por 4h à 30°C. Purificação usando coluna de Ni-NTA agarose.

Tabela 2 - FOSFOLIPASES-D RECOMBINANTES encontradas na literatura disponível no site do Pubmed. *Dissertação de mestrado, trabalho não publicado.

3.5 Fosfolipases-D recombinantes

Uma das principais dificuldades no estudo dos componentes do veneno da aranha marrom é o baixo rendimento nas extrações, uma vez que a quantidade obtida (em conteúdo protéico) por aranha é bastante variável e frequentemente abaixo de 50µg. Isto implica na coleta de veneno de centenas de aranhas para a obtenção de alguns miligramas de veneno total. Em última análise isto representa um grande obstáculo, pois os processos de purificação (especialmente de proteínas) são baseados em múltiplas etapas e implicam em baixo rendimento final. Dessa maneira, a clonagem e a expressão de toxinas recombinantes vêm se firmando como alternativas bastante acertadas na solução deste problema, não apenas no estudo do veneno loxoscélico, mas também com outros venenos animais (SENFF-RIBEIRO *et al.*, 2008; CHAIM *et al.*, 2011a).

Nos últimos anos, o grupo construiu uma biblioteca de cDNA a partir das glândulas produtoras de veneno de *L. intermedia*. Inicialmente, o rastreamento desta biblioteca de cDNA foi feito por sequenciamento aleatório dos clones obtidos. O resultado da varredura desta biblioteca foi o isolamento de cDNAs codificantes para 6 diferentes isoformas de toxinas dermonecróticas (bioquimicamente caracterizadas como fosfolipases-D) (CHAIM *et al.*, 2006; da SILVEIRA *et al.*, 2006; da SILVEIRA *et al.*, 2007; APPEL *et al.*, 2008; VUITIKA, 2012), 3 isoformas de metaloproteases (da SILVEIRA *et al.*, 2007b; TREVISAN *et al.*, 2010) e outros cDNAs codificantes para produtos semelhantes a peptídeos neurotóxicos, fator liberador de histamina e proteína alergênica (GREMSKI *et al.*, 2010).

Todos os 7 cDNAs das toxinas dermonecróticas foram subclonados em vetor de expressão pET-14b e as proteínas recombinantes solúveis foram expressas em bactéria. Uma vez disponíveis, na sua forma ativa e em grande quantidade, as toxinas foram alvo de diversos estudos, que, por sua vez, geraram trabalhos com resultados bastante promissores (CHAIM *et al.*, 2006; da SILVEIRA *et al.*, 2006; da SILVEIRA *et al.*, 2007; APPEL *et al.*, 2008; VUITIKA, 2012).

Além disso, dados fundamentais foram coletados sobre a estrutura molecular desta classe de compostos, principalmente quanto ao sítio catalítico (de GIUSEPPE *et al.*, 2011), resultados estes que puderam ser relacionados com as atividades enzimáticas particulares de cada isoforma (CHAIM *et al.*, 2006; da SILVEIRA *et al.*, 2006; da SILVEIRA *et al.*, 2007; APPEL *et al.*, 2008; VUITIKA, 2012).

Estudos realizados com as três primeiras isoformas das toxinas dermonecróticas recombinantes LiRecDT1, LiRecDT2 e LiRecDT3 sob os números de acesso DQ218155, DQ266399 e DQ267927 respectivamente, mostraram diferença nos níveis de atividade dermonecrótica geradas. Estes ensaios mostraram que existe uma homologia entre as isoformas LiRecDT1 e LiRecDT2 pois os resultados obtidos foram próximos, diferente da isoforma LiRecDT3 que mostrou atividade fosfolipásica significativamente menor com relação às duas primeiras. Contudo todas as três foram capazes de gerar as mesmas reações, porém em proporções diferentes. Foi sugerido que a semelhança dos resultados obtidos nos ensaios entre LiRecDT1 e LiRecDT2 tem relação com a homologia entre a estrutura secundária aminoácídica de cada, o que já não é válido para a LiRecDT3 que apresenta diversas substituições importantes nos aminoácidos vizinhos ao do sítio catalítico (da SILVEIRA *et al.*, 2006).

Também foi possível mostrar que mesmo existindo sítios catalíticos comuns e alta similaridade aminoacídica, cada uma das três isoformas gerou resultados diferentes de citotoxicidade *in vitro*, letalidade em camundongos e efeitos edematogênicos e além das diferenças nas estruturas secundárias, também apresentaram diferentes epítomos, reforçando o importante papel da estrutura funcional na atividade fosfolipásica das fosfolipases-D (RIBEIRO *et al.*, 2007).

Outro estudo realizado produziu uma isoforma mutada da LiRecDT1 chamada LiRecDT1 H12A com o intuito de extinguir sua atividade fosfolipásica e embora isso não foi possível, houve um considerável decréscimo da sua atividade no ensaios realizados, com resultados mostrando atividade catalítica residual em comparação com a LiRecDT1 (KUSMA *et al.*, 2008; CHAIM *et al.*, 2011).

Recentemente foi divulgada a estrutura da cristalografia da toxina LiRecDT1 (de GIUSEPPE *et al.*, 2011). Neste trabalho foi possível observar que a LiRecDT1 possui duas pontes dissulfeto, tendo como diferencial o fato de ter uma ponte adicional em relação a fosfolipase-D da *Loxosceles laeta* (SMase I), que possui apenas uma ponte dissulfeto presente no seu loop catalítico (Fig. 5). Essa ponte dissulfeto adicional faz a ligação do loop catalítico com o loop flexível e acredita-se que essa ligação modifica a fenda catalítica das fosfolipases-D diminuindo-a de modo que a interação proteína-substrato é diferenciada em comparação com as que não possuem essa ponte dissulfeto adicional.

Com base nessa característica, as fosfolipases-D das aranhas do gênero *Loxosceles* foram divididas em duas classes, onde as de classe I que é o caso da SMase I são as que possuem apenas uma ponte dissulfeto localizada no loop catalítico e as de classe II são que possuem 2 pontes dissulfeto onde a ponte adicional faz a ligação dos loops catalítico e flexível, como é o caso da LiRecDT1 e das demais isoformas de fosfolipases-D de *Loxosceles intermedia* que já forma clonadas. Ainda dentro desta classificação as fosfolipases-D pertencentes à classe II são subdivididas em classe II A e classe II B dependendo da capacidade de hidrolizar esfingomiéline ou não respectivamente (MURAKAMI *et al.*, 2006).

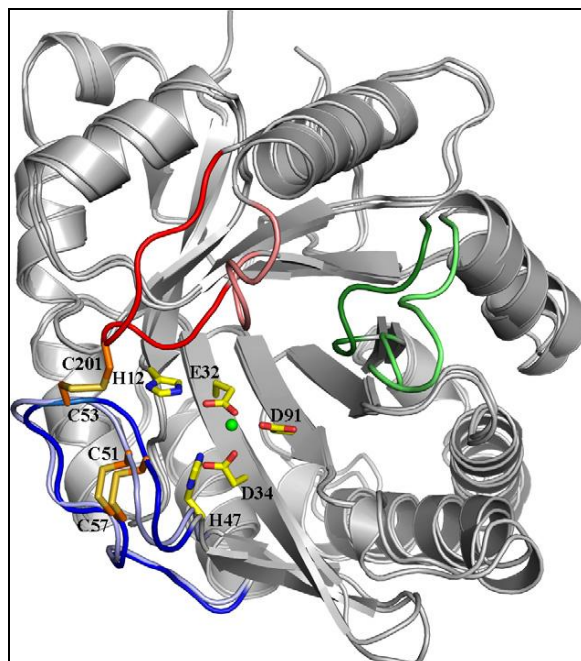


Figura 5 - ALINHAMENTO ESTRUTURAL ENTRE LIRECDT1 E SMase I. Os resíduos envolvidos na ligação do íon-metal e catalise mostrado na figura, pertencem a LiRecDT1 e estão representados por átomos coloridos (código PDB: 3RLH). O íon Mg^{2+} está representado pela esfera verde no centro da figura e está rodeado pelos átomos envolvidos na catalise. Os três loops, catalítico, flexível e variável estão representados pelas cores azul, vermelho e verde respectivamente. As pontes dissulfeto estão representadas pelos bastões laranja. (Adaptado de de GIUSEPPE *et al.*, 2011)

Fazendo o alinhamento aminoacídico das toxinas que serão utilizadas neste trabalho podemos observar que as quatro cisteínas (C51, C53, C57 e C201) que formam as duas pontes dissulfeto estão conservadas em todas as estruturas e analisando a mesma figura é possível notar que todos os aminoácidos envolvidos na atividade catalítica estão conservados (Fig. 6).

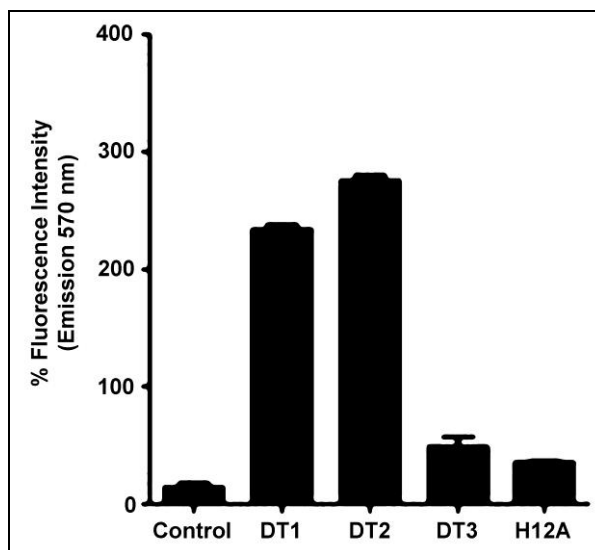


Figura 7 - COMPARAÇÃO DA ATIVIDADE FOSFOLIPÁSICA ENTRE AS TOXINAS LiRecDT1, LiRecDT2, LiRecDT3 e LiRecDT1H12A (DT1, DT2, DT3 e H12A respectivamente). A atividade das fosfolipases-D recombinantes purificadas foi avaliada usando o método fluorimétrico com o kit de ensaio Amplex Red a 37°C durante 30 minutos. O controle era uma reação na ausência de qualquer toxina. O produto da reação foi determinado a 540 nm (absorção) com detecção de emissão a 570 nm. Foram utilizadas nas reações 10 mg de cada toxina em triplicata. (Adaptado de CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2011)

Ainda na figura 7 podemos observar que a isoforma LiRecDT3 possui uma atividade muito reduzida em comparação com as isoformas LiRecDT1 e LiRecDT2, chegando a ser quase que residual como no caso da isoforma mutada LiRecDT1H12A.

CHAIM e seus colaboradores (2011b) propuseram possíveis e promissoras aplicações biotecnológicas para as fosfolipases-D presentes no veneno da *Loxosceles intermedia*, já clonadas, expressadas e caracterizadas pelo grupo. Essas sugestões são favorecidas devido ao grande acúmulo de conhecimento das propriedades estruturais, bioquímicas e biológicas das fosfolipases-D, podendo ser empregadas em estudos de desenvolvimento de novas drogas, biofármacos, testes diagnósticos e outras aplicações industriais.

A produção de isoformas mais ativas seria de grande valia para o uso em alguns dos estudos propostos por CHAIM e colaboradores (2011b), para tanto, mais estudos estruturais das fosfolipases-D precisam ser conduzidos para que possamos saber com propriedade o papel que cada resíduo desencadeia na estrutura da toxina e para que assim possamos através de modificações

planejadas, produzir novas formas recombinantes com aplicações biotecnológicas em diversos segmentos, seja nas já previamente propostas ou em novas possibilidades que surgirem no decorrer dos estudos.

3.6 Sistema de expressão bacteriano

O sistema bacteriano é o mais usado para expressão de proteínas heterólogas, isso devido as suas inúmeras vantagens como, rápido crescimento, baixo custo, facilidade de manutenção da cultura, resistência a várias condições ambientais entre outros e, além disso, possui genética bem caracterizada. Mas a vantagem mais citada sobre o uso do sistema bacteriano é a grande quantidade de proteína recombinante que se pode obter quando este sistema funciona corretamente, podendo chegar a mais de 80% da massa seca da bactéria (DEMAIN, VAISHNAV, 2009; PACHECO *et al.*, 2011). Portanto, como pretendemos utilizar as proteínas purificadas para diversos experimentos de cunho bioquímico e biológico, é de suma importância que obtenhamos uma quantidade relativamente grande de proteína purificada a partir de cada litro de cultura produzido.

Optamos por trabalhar com a *Escherichia coli* por ser a bactéria mais usada para expressão de proteínas recombinantes atualmente (DEMAIN, VAISHNAV, 2009; PACHECO *et al.*, 2011; VINCENNELLI *et al.*, 2011), onde aproximadamente 60% de todas as proteínas recombinantes citadas na literatura provem desta cepa, a qual foi a primeira a ser usada a quase 40 anos atrás na expressão das primeiras proteínas recombinantes. Além disso, a existência de vários vetores de clonagem e de cepas mutantes disponíveis no mercado para uso científico é uma das outras vantagens desse sistema, graças à sua genética bem caracterizada (CORREA, OPPEZZO, 2011).

Mas o uso de bactérias para expressão de proteínas recombinantes também possui suas desvantagens.

A limitada capacidade na modificação pós-traducional das proteínas no sistema procaríoto (SAHDEV *et al.*, 2008; ALBERTS, 2008; BRONDYK, 2009) é

uma das barreiras enfrentadas quando se trata de expressar proteínas recombinantes, especialmente as eucarióticas, que podem formar corpos de inclusão e levando até a perda da função.

Porém essa é uma realidade que vem mudando, pois muito continuou sendo feito para solucionar esse aspecto existente nas cepas bacterianas usadas para expressão de proteínas recombinantes que necessitam de modificações pós-traducionais. E esse é o ponto que buscamos avaliar neste trabalho.

Dentre as cepas de *E. coli* disponíveis no mercado, deve-se levar em consideração determinadas características da proteína heteróloga de interesse, para a escolha da mais adequada para expressão.

Quando se trata da presença de pontes dissulfeto na estrutura da proteína de interesse que é o caso das fosfolipases-D da *Loxosceles intermedia*, conforme já foi mostrado por de GIUSEPPE e colaboradores 2011, podemos encontrar no mercado algumas cepas com modificações essenciais para formação dessas pontes no citoplasma bacteriano durante a expressão.

A cepa Origami (Novagen) apresenta mutações em dois genes (*trxB*) e (*gor*), cuja ausência destes proporciona um ambiente citoplasmático menos redutor e conseqüentemente mais favorável a formação de pontes dissulfeto. Esta cepa é compatível com plasmídios que conferem resistência ao antibiótico ampicilina e ainda existe a possibilidade de se melhorar o dobramento das proteínas no citoplasma, usando vetores que contém uma cauda de fusão de tiorredoxina.

Outra cepas produzidas pela mesma empresa, AD494 e BL21*trxB* possuem características semelhantes, com a diferença que apresentam mutação somente no gene da tiorredoxina redutase (*trxB*) e adicional deficiência em proteases no caso da BL21*trxB*.

Quando o mRNA da proteína de interesse possui códons raramente usados pela *E. coli*, existem no mercado cepas como a Rosetta (Novagen), que são derivadas da BL21 e possuem tRNAs para os códons raros AUA, AGG, AGA, CUA, CCC e GGA, assim como a BL21 CodonPlus (Stratagene) também possui genes que codificam para tRNAs que reconhecem os códons raros AGA, AGG, AUA e CUA.

Não só a BL21 *trxB*, mas outras cepas também possuem acúmulo de características, como no caso da Rosetta-gami (Novagen) que é derivada da Origami e portanto apresenta mutações nos dois genes (*trxB*) e (*gor*), favorecendo a formação de pontes dissulfeto no citoplasma, com a característica adicional de que também possui genes que codificam para tRNAs que reconhecem os códons raros como na cepa Rosetta.

Quando se deseja aumentar a expressão da proteína heteróloga de interesse é possível testar o uso da cepa *E. coli* BL21 Star (Invitrogen) que tem como diferencial a mutação no gene *rne131*, codificando a enzima RNase E truncada, portanto o mRNA não é degradado e tem um aumento na sua estabilidade, levando ao aumento na expressão da proteína.

As proteínas heterólogas podem em certos casos serem tóxicas para algumas cepas de *E. coli*, diminuindo a eficiência na expressão, o que felizmente não foi demonstrado no caso das fosfolipases-D. A cepa de *E. coli* C43 (Lucigen) possui uma mutação que previne a morte celular durante a expressão de muitas proteínas recombinantes tóxicas para a bactéria, sendo uma boa alternativa de uso para proteínas que apresentam esta característica.

A atividade de algumas proteínas pode ser afetada pela ausência ou incorreta formação de pontes dissulfeto na sua estrutura tridimensional, o que acarreta perda ou mau funcionamento da proteína e/ou agregação, tudo isso causado pelo dobramento incorreto da proteína (ZHANG *et al.*, 2011). Em cepas de *E. coli* essa modificação pós-traducional está presente no periplasma que possui o sistema Dsb (Isomerase) e que é um ambiente menos redutor, enquanto que o citoplasma é um ambiente redutor, o que dificulta na formação correta destas pontes dissulfeto (ZHANG *et al.*, 2011; BRONDYK, 2009). A cepa *E. coli* SHuffle T7 Express *lysY* da empresa **New England Biolabs** (U.K, Hitchin) traz como diferencial a expressão da proteína DsbC no citoplasma, que propõe atuar como uma isomerase na formação correta das pontes dissulfeto da proteína e ao mesmo tempo como uma chaperona, auxiliando no dobramento correto tanto de proteínas com ou sem pontes dissulfeto na estrutura. Além disso, essa cepa possui a deleção dos genes para as proteínas redutoras glutarredoxina redutase e

tioredoxina redutase, o que favorece ainda mais na formação de pontes dissulfeto no citoplasma (LOBSTEIN *et al.*, 2012).

4. JUSTIFICATIVA

Um melhor entendimento do mecanismo molecular dessas toxinas bem como sua aplicação depende da caracterização bioquímica destas, da determinação da estrutura/conformação, da elucidação das atividades biológicas e finalmente do seu modo de ação em diferentes modelos celulares e ainda seus receptores celulares (SENF-FRIBEIRO *et al.*, 2008).

O uso de técnicas de biologia molecular se torna essencial para estes estudos visto que a quantidade proteica obtida nas extrações do veneno das aranhas do gênero *Loxosceles* tem rendimento muito baixo, sendo assim insuficientes para utilização nos mais variados ensaios biológicos.

As técnicas de expressão e purificação de proteínas específicas representam uma formidável ferramenta para obtenção destas moléculas em grandes quantidades, suficientes para o uso em estudos de caráter funcional.

Face às informações discutidas torna-se fundamental o estudo da expressão das toxinas já isoladas do veneno de *L. intermedia* em cepas diferenciadas que possam gerar modificações nas estruturas das toxinas bem como nas suas atividades.

Estudos comparativos podem revelar importantes aspectos dessas toxinas e possibilitar o melhor entendimento da sua atividade catalítica e biológica, e por fim prospectar novas aplicações biotecnológicas.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Animais

Para extração do veneno, foram utilizadas aranhas adultas da espécie *Loxosceles intermedia* coletadas em Curitiba e Região Metropolitana (Paraná). As aranhas foram mantidas em condições apropriadas no Laboratório de Matriz Extracelular e Biotecnologia de Venenos da Universidade Federal do Paraná. A utilização de animais para finalidade científica foi aprovada pelo Sistema de Autorização em Informação da Biodiversidade (SISBIO), sendo o número do documento da autorização: **29801-1**. O certificado de liberação para realização dos experimentos utilizando animais foi emitido pela Comissão de Ética no uso de animais (CEUA) do setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná sob o número de protocolo **618**.

5.2 Anticorpos

Os soros hiperimunes utilizados nos ensaios de ELISA e de imunodeteção foram produzidos anteriormente pelo nosso Laboratório (Laboratório de Matriz Extracelular e Biotecnologia de Venenos da UFPR).

Brevemente, para o protocolo de imunização foram utilizados coelhos adultos neo-zelandeses, que ficaram sob os cuidados do biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR, com água e comida *ad libitum*. As etapas de imunização foram descritas por Meissner (2009). O soro hiperimune anti-LiRecDT1 utilizado neste trabalho foi produzido e armazenado seguindo protocolos estabelecidos e descritos em trabalhos anteriores (CHAIM *et al.*, 2006, TREVISAN-SILVA *et al.*, 2010, SADE *et al.*, 2012).

5.3 Extração de veneno loxoscélico por eletrochoque

O veneno das aranhas *Loxosceles intermedia* foi obtido de aranhas adultas selvagens, submetidas à eletrochoque de 15 volts na região do cefalotórax. Após a coleta, o veneno foi diluído em PBS em uma concentração de 2 mg/mL e congelado a -20°C como descrito por FEITOSA e colaboradores (1998).

5.4 Subclonagem dos cDNAs e produção da LiRecDT1 H12A a partir de uma biblioteca de cDNA da glândula produtora de veneno de *Loxosceles intermedia*

As toxinas utilizadas nesse trabalho foram obtidas a partir de uma biblioteca de cDNA da glândula produtora de veneno como descrito em CHAIM e colaboradores (2006); DA SILVEIRA e colaboradores (2006 e 2007) e APPEL e colaboradores (2008). A sequência dos cDNAs clonados estão depositadas no GenBank sob os números DQ218155 para LiRecDT1, DQ266399 para LiRecDT2 e DQ267927 para LiRecDT3.

A toxina mutada foi obtida pelo método de PCR Megaprimer adaptado de SAMBROOK e RUSSELL (2001) por KUSMA e colaboradores (2008). Basicamente o procedimento foi realizado em três etapas de PCR, com o intuito de introduzir uma mutação sítio dirigida na sequência original da toxina LiRecDT1; a toxina mutada resultante foi nomeada LiRecDT1 H12A. A primeira etapa de PCR incluiu a mutação do primeiro resíduo de histidina para alanina na posição 12 da sequência nucleotídica utilizando o primer forward T7, o qual se anela a porção 5' do vetor pSPORT, e o primer reverse especialmente desenhado P1H12A.

Em resumo, os cDNAs codificantes para as proteínas maduras foram amplificados por PCR utilizando primers desenhados para conter sítios de restrição na extremidade 5' para Xho I forward e BamH I reverse. O produto de PCR foi, então, digerido com tais enzimas e subclonado em pET-14b digerido com as mesmas enzimas, resultando na construção de uma proteína de fusão com uma cauda "6x His-Tag" na região N-terminal.

5.5 Transformação na cepa de subclonagem DH5 α eletricamente competente

Cepas de *E. coli* DH5 α foram transformadas pelo método de eletroporação com as construções LiRecDT1, LiRecDT2, LiRecDT3, LiRecDT1H12A todas em vetor de expressão pET-14b. Quatro alíquotas da bactéria DH5 α eletrocompetente foram retiradas do refrigerador -80°C, descongeladas e o conteúdo de cada alíquota foi adicionado em tubos contendo 1,5 μ L dos plasmídios de cada construção. Para a reação eletroporou-se sob as condições de 1.8kV, 25MF, 200% no eletroporador *Gene PulserX-Cell® BioRad* (Hercules-EUA). As bactérias foram ressuspensas em 1 mL 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, glicose 0,2 M) a 37°C por 1 hora sobre agitação de 200rpm, para adquirirem resistência ao antibiótico específico. Os clones transformados foram selecionados em meio LB-ágar (luria-bertani-ágar) contendo o antibiótico ampicilina (100 μ g/ml), pois o vetor de expressão pET-14b confere resistência a este antibiótico. Sendo assim somente as colônias contendo os plasmídeos conseguiram crescer (VUITIKA, 2012).

Todas as construções estavam em pET-14b como mencionado anteriormente, esse vetor é um sistema plasmidial que fusiona uma cauda N-terminal de 6 histidinas (*6xHis-tag*) à proteína recombinante de interesse, o que permite a purificação em uma única etapa de cromatografia de afinidade por metal níquel (Ni⁺²) (Novagen, Madison, USA).

5.6 PCR de colônia

Foram selecionados três clones de cada placa e todos foram submetidos a PCR de colônia, para identificar as colônias que incorporaram as construções na etapa de transformação das cepas de subclonagem e de expressão.

Cada clone escolhido foi picado com auxílio de palitos de madeira estéreis. Parte do material foi esfregado no fundo de um tubo de 0,2 mL e outra parte foi picada na placa que seria a *Master plate*, devidamente quadriculada e enumerada.

Nos tubos foram adicionados os seguintes reagentes: Tampão Taq DNA polimerase (1X); dNTPs (0,2 mM); MgCl₂ (1,5 mM); oligonucleotídeo *sense* universal T7 (0,2 µM); oligonucleotídeo universal *antisense* T7 terminator (0,2 µM) e Taq polimerase (1,25 U/50 µl), água estéril e a amostra respectiva de cada tudo. Esta mistura foi incubada em termociclador, para amplificação do inserto no seguinte protocolo: 94°C/2 minutos (1 ciclo); 94°C/30 segundos (35 ciclos) – temperatura média das TMs dos primers diminuídos de 55°C/30 segundos (35 ciclos) – 72°C/1 minuto (35 ciclos); 72°C/10 minutos (1 ciclo); 4°C/ infinito. O produto do PCR de colônia foi analisado em gel de agarose 1,5%. O resultado foi visualizado com luz UV (ultravioleta) e registrado em aparelho de captura de imagem *Chemidoc*® (VUITIKA *et al.*, 2012).

5.7 Mini preparação plasmidial e precipitação

A partir da placa mãe contendo os clones positivos escolhidos foram repicados com auxílio de pinça e palitos de madeira estéreis para um pré-inóculo em LB líquido com ampicilina (100 µg/ml) 1 µl/mL. Foram incubados por 16h a 37°C sob agitação vigorosa (em incubadora 430 RDB tipo agitador orbital Nova Ética) em tubos de aeração de polipropileno. Cada cultura com crescimento saturado foi centrifugada (3000xg por 3 minutos) a temperatura ambiente e se obteve um sedimento bacteriano consistente. De cada um dos centrifugados bacterianos foi feita a extração do plasmídeo com auxílio de do protocolo do Kit e de reagentes de Miniprep da Promega (*WizardPlus SV Minipreps DNA Purification Systems*®).

Realizou-se a precipitação das *minipreps* de cada plasmídeo contendo as respectivas construções (LiRecDT1, LiRecDT2, LiRecDT3, LiRecDT1H12A) para aumentar a pureza das amostras.

5.8 Reação e análise de sequenciamento

Foi utilizado o protocolo de sequenciamento para o reagente *Big Dye* (Applied Biosystems) com um volume total de reação de 20 μL . Destes, 2 μL era o reagente *Big Dye*, 0,8 μL do primer, 3 μL do Tampão e o restante eram a somatória do volume das amostras e água estéril. Cada clone foi submetido à duas reações de sequenciamento, uma utilizando o iniciador universal *sense* T7 e outra o iniciador universal *antisense* T7 Terminator. Essas reações foram levadas ao termociclador de placa a 96°C/ 1minuto (1 ciclo); 96°C/15 segundos - 50°C/15 segundos - 60°C/4 minutos (35 ciclos); 4°C/infinito.

Para a precipitação do produto a ser sequenciado, adicionou-se acetato de sódio 1,5 M/EDTA 0,25 M (1/10 do volume inicial da reação) e em seguida adicionou-se etanol absoluto (3 vezes o volume da reação), homogeneizou-se bem e incubou-se em gelo por 10 minutos. Centrifugou-se por 20 minutos a 4 °C com velocidade de 20.000 xg. O sobrenadante foi retirado, o sedimento lavado com etanol 70% e centrifugado por 10 minutos a 4 °C com velocidade de 20.000 xg. O sobrenadante foi descartado e secado em temperatura ambiente. Finalmente, o produto foi ressuscitado em 10 μl formamida, incubado a 95°C em banho-maria por 5 minutos e submetido ao sequenciamento (VUITIKA, 2012).

O sequenciamento foi realizado em sequenciador por eletroforese capilar 3500xL *Genetic Analysers* (Applied Biosystems® 3500) e os resultados analisados em software *ChromasPro version 1.5*. O alinhamento das sequências foi realizado através do software *ClustalW* <<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>> e as sequências aminoacídicas foram analisadas usando a ferramenta *ProtParam* (disponível no site: <<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>>).

5.9 Transformação das cepas de expressão *E. coli* BL21(DE3)pLysS e *E. coli* SHuffle T7 Express lysY quimicamente competentes

As *minipreps* das construções LiRecDT1, LiRecDT2, LiRecDT3 e LiRecDT1H12A foram diluídas 1:10 para concentração final de 200 ng/ μ l, quantidade necessária para a transformação e então 1 μ l de cada foi transferido para tubos de aeração. Quatro alíquotas de *E. coli* BL21(DE3)pLysS e *E. coli* SHuffle T7 Express lysY foram retiradas do refrigerador -80°C e mantidas no gelo para prosseguimento imediato das próximas etapas pelo método de transformação química.

Cada alíquota foi adicionada dentro dos tubos de aeração contendo as construções, onde as bactérias foram submetidas ao seguinte protocolo para a *E. coli* BL21(DE3)pLysS: 30 minutos de incubação no gelo, 1 minuto e 30 segundos em banho-maria a 42°C e 3 minutos de incubação no gelo. Ao final do protocolo foi adicionado 950 μ l de SOC para completar 1 mL de solução com os 50 μ l de cada alíquota das bactérias. O seguinte protocolo foi realizado para a *E. coli* SHuffle T7 Express lysY: 30 minutos de incubação no gelo, 30 segundos em banho-maria a 42°C e 3 minutos de incubação no gelo. Ao final do protocolo foi adicionado 950 μ l de SOC para completar 1 mL de solução com os 50 μ l de cada alíquota das bactérias.

Levou-se os tubos de aeração para incubarem por 1 hora a 37°C (*E. coli* BL21(DE3)pLysS) e 30°C (*E. coli* SHuffle T7 Express lysY) sob rotação de 200 rpm para a recuperação das bactérias. No final realizou-se o plaqueamento em meio LB-ágar (luria-bertani-ágar) contendo os antibióticos ampicilina (100 μ g/mL) e cloranfenicol (34 μ g/mL) para a cepa *E. coli* BL21(DE3)pLysS e somente ampicilina na mesma concentração para a cepa *E. coli* SHuffle T7 Express lysY, as placas foram incubadas na B.O.D a 37°C e 30°C respectivamente por 16 horas, os volumes plaqueados foram 100 μ l e 900 μ l. Os clones transformados foram selecionados, pois o vetor de expressão pET-14b confere resistência ao antibiótico ampicilina (VUITIKA, 2012).

5.10 Teste de Miniexpressão e expressão da LiRecDT1, LiRecDT2, LiRecDT3 e LiRecDT1 H12A

O teste de miniexpressão das construções foi conduzido com as cepas *E. coli* BL21(DE3)pLysS e *E. coli* SHuffle T7 Express lysY, baseando-se nas adaptações do protocolo do SAMBROOK e RUSSEL (2001) realizadas por CHAIM e colaboradores (2006), da SILVEIRA e colaboradores (2006) e KUSMA e colaboradores 2008. Este teste piloto foi realizado com o intuito de avaliar a viabilidade do uso da nova cepa *E. coli* SHuffle T7 Express lysY para a expressão das fosfolipases-D utilizando-se os mesmos parâmetros já estabelecidos pelo grupo, para a expressão na cepa *E. coli* BL21(DE3)pLysS (CHAIM *et al.*, 2006; da SILVEIRA *et al.*, 2006; da SILVEIRA *et al.*, 2007; KUSMA *et al.*, 2008; APPEL *et al.*, 2008).

Uma colônia de cada construção foi inoculada em 3 mL de LB líquido com seus respectivos antibióticos, ampicilina (100 µg/mL) 1 µL/mL para ambas cepas e cloranfenicol (34 µg/mL) 1 µL/mL somente para *E. coli* BL21(DE3)pLysS. Cada pré-inóculo foi submetido a crescimento por 16°C a 220 rpm em temperaturas diferentes, 37°C para a *E. coli* BL21(DE3)pLysS e a 30°C para a *E. coli* SHuffle T7 Express lysY. Estas culturas foram inoculadas na diluição 1:100 em meios de cultura contendo 100 mL de LB líquido já acrescido com os respectivos antibióticos. Cada cultura foi monitorada pelo método de determinação por densidade óptica. Quando a D.O. (550 nm) entre 0,4 e 0,5 foi alcançada, as bactérias foram induzidas a expressão das proteínas adicionando-se IPTG na concentração final de 0,025 mM para ambas culturas das construções de LiRecDT2 e LiRecDT3 e 0,05 mM para ambas culturas das construções de LiRecDT1 e LiRecDT1H12A, e foram coletadas amostras em diferentes tempos (0 hora, 1 hora, 2 horas, 3 horas, 3,5 horas e 4 horas) de expressão.

No final as culturas foram centrifugadas a 9.000 xg por 7 minutos a 4°C e tiveram seus sobrenadantes descartados. Cada sedimento foi ressuspendido em 10 mL de tampão de ligação (fosfato sódico 50 mM pH 8,0, NaCl 500 mM, imidazol 10 mM e lisozima 1 mg/mL). As suspensões bacterianas foram

congeladas a -20°C por 16 horas e submetidas à lise bacteriana pelo método da Prensa de French que lisa as bactéria sobre pressão mecânica.

As amostras e o sobrenadante do lisado foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5% em condições redutoras (5% de β -mercaptoetanol).

Após a padronização das condições de expressão, o próximo passo foi à expressão em larga escala. Uma colônia isolada foi inoculada em 12 mL de meio LB líquido contendo os antibióticos citados acima a 37°C para a *E. coli* BL21(DE3)pLysS e a 30°C para a *E. coli* SHuffle T7 Express lysY durante 16 horas. Posteriormente, esta cultura foi inoculada em diluição 1:100 em 1L de meio LB líquido acrescido dos respectivos antibióticos. O crescimento foi monitorado pela determinação da densidade óptica (D.O) em 550 nm. Quando as culturas atingiram a D.O. entre 0,4 - 0,5 a indução da expressão das toxinas foi realizada pela adição de IPTG nas mesmas concentrações utilizadas nos testes de miniexpressão e as culturas foram incubadas por um período de 3 horas e meia a 30°C para ambas cepas, seguindo as mesmas condições utilizadas nos trabalhos realizados anteriormente com estas mesmas toxinas (CHAIM *et al.*, 2006; da SILVEIRA *et al.*, 2006; KUSMA *et al.*, 2008).

Alíquotas de 1 mL foram coletadas antes e ao final da indução para análise por eletroforese em gel poliacrilamida 12,5% em condições redutoras (5% de β -mercaptoetanol).

Todas as culturas foram centrifugadas a 9000 xg por 7 minutos e ressuspendidas 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). As suspensões bacterianas foram congeladas a -20°C por 16 horas e lisadas por lise mecânica através da Prensa de French. Uma alíquota de sobrenadante do lisado de cada expressão também foi também analisada por gel de poliacrilamida 12,5% sob condições redutoras e o restante submetido ao processo de purificação por cromatografia de afinidade em resina Ni⁺²-NTA agarose.

O marcador utilizado na corrida dos géis foi o SIGMA 200-30 kDa, visto que as fosfolipases possuem tamanho aproximado de 35kDa. Para observação das proteínas, os géis foram corados com azul de *Coomassie*.

5.11 Purificação da LiRecDT1, LiRecDT2, LiRecDT3 e LiRecDT1H12A

A purificação de todas as proteínas expressas nas cepas *E. coli* BL21(DE3)pLysS e *E. coli* SHuffle T7 Express lysY foi realizada por cromatografia de afinidade em resina Ni²⁺-NTA agarose. A suspensão de células em tampão de ligação foi descongelada e lisada pelo método de lise mecânica através da “*Prensa de French*”. O lisado foi centrifugado a 9000 xg por 30 minutos a 4°C e o sobrenadante incubado e deixado em agitação moderada por 1 hora a 4°C com 700 uL de resina Ni²⁺-NTA agarose para o lisado da LiRecDT1 e LiRecDT1H12A e 500 uL para LiRecDT2 e LiRecDT3 para cepa *E. coli* BL21(DE3)pLysS e 500 uL de resina Ni²⁺-NTA agarose para o lisado da LiRecDT1 e LiRecDT1H12A e 300 uL para LiRecDT2 e LiRecDT3 para cepa *E. coli* SHuffle T7 Express lysY. Para a purificação das proteínas produzidas na cepa *E. coli* BL21(DE3)pLysS a suspensão foi lavada em BATCH com o tampão de lavagem (fosfato sódico 50 mM pH 8.0, NaCl 500 mM, imidazol 20 mM) e depois 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 D.O. de 280 nm monitorada durante todo o procedimento de purificação.

Para a purificação das proteínas produzidas na cepa *E. coli* SHuffle T7 Express lysY a suspensão foi lavada em BATCH com o tampão de lavagem (fosfato sódico 50 mM pH 8.0, NaCl 500 mM, imidazol 20 mM) e depois foi empacotada em coluna plástica e lavada exaustivamente com o tampão de lavagem (fosfato sódico 50 mM pH 8.0, NaCl 500 mM, imidazol 30 mM), sendo a D.O. de 280 nm monitorada durante todo o procedimento de purificação. Ambas proteínas foram eluídas utilizando-se tampão de eluição (fosfato sódico 50 mM pH 8.0, NaCl 500 mM, imidazol 250 mM) quando a D.O. de 280 nm atingiu 0,010 de absorbância, ou quando as leituras mostravam-se constantes. As frações obtidas

foram dialisadas contra tampão PBS 1x. As toxinas recombinantes purificadas foram analisadas em gel de poliacrilamida, dosadas pelo método de BRADFORD (1976), alíquotadas e mantidas a -20°C até o momento do uso (CHAIM *et al.*, 2006; da SILVEIRA *et al.*, 2006, 2007; RIBEIRO *et al.*, 2007).

5.12 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 e não-redutoras. 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 5 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 e LANE, 1988).

5.13 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 poços (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 (BSA) 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 quatro 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 em leitor de placas de 96 poços (Meridian ELX 800).

5.14 Ensaio de atividade esfingomielinásica

A atividade fosfolipásica foi mensurada utilizando o kit *Amplex Red* (Molecular Probes, Eugene, EUA). Neste ensaio, a atividade fosfolipásica é monitorada usando 10-acetil-3,7-dihidroxifenoxazine (reagente Amplex Red), um reagente fluorogênico sensível para H₂O₂. Primeiramente, a fosfolipase-D hidrolisa a esfingomielinina à ceramida-1-fosfato e colina. A colina, por sua vez, é oxidada pela enzima colina oxidase à betaina e H₂O₂. Finalmente, a H₂O₂, na presença da peroxidase reage com o *Amplex Red* estequiometricamente (1:1), gerando um produto altamente fluorescente, o Resorufin (APPEL *et al.*, 2008; CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2011). Para mensurar a atividade fosfolipásica das toxinas recombinantes LiRecDT1, LiRecDT2, LiRecDT3 e LiRecDT1 H12A de ambas cepas (*E. coli* BL21(DE3)pLysS e *E. coli* SHuffle T7 Express lysY), estas foram incubadas com o Reagente *Amplex Red*, na concentração de 10 µg em pentaplicata, à 37°C por 60 minutos. Foi utilizado como controle positivo a enzima esfingomielinase do próprio Kit, e controle negativo apenas o Reagente *Amplex Red* sem a toxina, ambos também em pentaplicata à 37°C por 60 minutos. A fluorescência foi mensurada em um fluorímetro (Tecan Infinite M200, Männedorf,

Switzerland) usando comprimento de onda de excitação em 540 nm e emissão em 570 nm.

5.15 Reação de imunoblotting - Western Blot

O ensaio de *Western Blot* foi realizado para identificar a presença de epítomos conformacionais conservados em ambas as proteínas recombinantes produzidas, frente ao anticorpo do veneno total de aranha-marrom.

Primeiramente 1 µg de cada proteína produzida nas duas cepas bacterianas foi submetido à eletroforese do tipo SDS-PAGE 12,5% em condições não redutoras. Após eletroforese, 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 bloqueadas com PBS contendo 5% de caseína por 1 hora à temperatura ambiente. Para detecção das proteínas, as membranas contendo 1 µg de cada proteína purificada LiRecDT1, LiRecDT2, LiRecDT3 e LiRecDT1 H12A de ambas cepas (*E. coli* BL21(DE3)pLysS e *E. coli* SHuffle T7 Express lysY) foram incubadas com soro pré-imune de coelhos e hiperimunes ao veneno total (1:2000) por 2 horas à temperatura ambiente. Em seguida, as membranas foram lavadas e incubadas por 2 horas à temperatura ambiente com anticorpo secundário anti-IgG de coelho na diluição 1:8000, conjugado à fosfatase alcalina. Para revelação foi 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).

5.16 Ensaio de ELISA

O ensaio de ELISA foi realizado sensibilizando-se uma placa de 96 poços do tipo MaxiSorp (Nunc, Roskilde, Dinamarca) e foi adaptado de HARLOW E LANE (1988) .

Primeiramente foram adicionados antígenos à placa de ELISA, os poços foram sensibilizados com 100µL (10µg/poço) da solução de cada proteína recombinante LiRecDT1, LiRecDT2, LiRecDT3 e LiRecDT1 H12A de ambas cepas (*E. coli* BL21(DE3)pLysS e *E. coli* SHuffle T7 Express lysY) à temperatura ambiente por 16 horas. Retirada essa solução por inversão, adicionava-se 100µL de PBS-molico 3% para bloquear sítios inespecíficos o qual permanecia por duas horas à temperatura ambiente. Após, foram realizadas três lavagens com 200µL de solução PBS-Tween 0,01%.

A segunda etapa consistia na incubação dos anticorpos primários a serem avaliados. Depois de bloqueada com PBS-molico 3% a placa era exposta à incubação por duas horas à temperatura ambiente e então lavada três vezes com PBS-Tween 0,01%.

Posteriormente incubava-se a placa com anticorpos secundários antiimunoglobulina de camundongo conjugado com peroxidase durante duas horas à temperatura ambiente e ao abrigo de luz.

Em seguida as placas foram finalmente lavadas e a reação revelada com OPD 0,2mg/ml e peróxido de hidrogênio 0,06%, em tampão citrato de sódio 24mM, pH5,0 em torno de cinco minutos à temperatura ambiente e ao abrigo de luz. As reações foram interrompidas pela adição de H₂SO₄ 3N (100µL/poço). Fazia-se então a leitura no aparelho de ELISA (Automated Microplate Reader ELX800 – Bio-Tek® Instruments, Los Angeles, EUA) a 492nm.

O controle negativo foi utilizado o branco (adição de todos os reagentes com exceção do anticorpo primário), também realizado em quadruplicata, para garantir a ausência de ligação inespecífica tanto do anticorpo primário quanto do secundário, ou seja, para garantir a qualidade do bloqueio.

5.17 Ensaio de hemólise

5.17.1 Obtenção de eritrócitos humanos

A coleta de amostras de sangue periférico foi feita por punção de voluntários adultos e saudáveis, de acordo com os requisitos definidos pelo Comitê de Ética em Experimentação em Humanos (CEP-Biológicas). Todo o material estéril utilizado foi adquirido comercialmente (Aglhas e Seringas BD Plastipak®). O anticoagulante utilizado foi EDTA Na₂ 5% adquirido da Newprov produtos para laboratório (Pinhais, PR, Brasil), na proporção de 1 gota para cada mililitro de sangue.

5.17.2 Atividade hemolítica direta das toxinas recombinantes LiRecDT1, LiRecDT2, LiRecDT3 e LiRecDT1 H12A produzidas na *E. coli* BL21(DE3)pLysS e *E. coli* SHuffle T7 Express lysY

O ensaio hemolítico foi conduzido como descrito por CHAVES-MOREIRA e colaboradores (2009) adaptado de HARRIS e PHOENIX (1997). Essencialmente, 1 mL de sangue foi lavado três vezes em Tampão Tris/Sucrose (Sucrose 250 mM, 10 mM Tris/HCl , pH 7.4, 280 mOsm\kg H₂O) e centrifugado a 2000 xg por 3 minutos. Em seguida, foram ressuspensos no mesmo tampão para se obter uma concentração inicial de eritrócitos de aproximadamente 0.05%, correspondente a 5x10⁸ células/mL. Para se obter essa diluição, 250 µl da suspensão de eritrócitos lavados foram diluídos em 6 ml de água destilada e a absorbância lida a 550nm. O resultado foi obtido utilizando-se a equação abaixo, com a finalidade de se determinar o volume para o qual a suspensão inicial deveria ser diluída para se obter a concentração desejada:

$$\text{Volume final} = \frac{\text{Volume inicial} \times A_{550\text{nm}}}{0,210}$$

$$0,210$$

O controle positivo constituiu-se de 100% de hemólise, a qual foi produzida com uma solução de 0.1% (v/v) Triton X-100 por 60 minutos a 37 °C. As alíquotas de 200 µL da suspensão de eritrócitos normalizada (perfazendo um total de 1×10^8 células) foram utilizadas conjuntamente com 200 µL da solução de tratamento. As soluções de tratamento foram compostas de uma única concentração das toxinas recombinantes LiRecDT1, LiRecDT2, LiRecDT3 e LiRecDT1 H12A separadamente de ambas cepas (*E. coli* BL21(DE3)pLysS e *E. coli* SHuffle T7 Express lysY). As misturas resultantes foram incubadas a 37°C na B.O.D, sob agitação delicada e constante em “roda mecânica”. Após o tempo de tratamento desejado (24 horas), as suspensões foram centrifugadas por 3 minutos, a 2000 xg, a 4°C e a absorbância da hemoglobina livre no sobrenadante obtida em 550nm utilizando-se leitor ELISA. Em todos os casos, os níveis de hemólise foram determinados em porcentagem em relação ao controle positivo (Hemólise 100%). O Controle negativo foi obtido apenas com tampão e eritrócitos, em que não houve hemólise de fundo significativa.

5.18 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando análise de variância (ANOVA) sendo as médias comparadas pelo “método Paramétrico Tukey”, e os gráficos construídos através dos programas GraphPad Instant e Prisma (versão 3.0 / Windows 2000). Os valores \pm erro padrão da média (EPM) foram utilizados (*P \leq 0,05, **P \leq 0,01, ***P \leq 0,001) de acordo com o desenho experimental.

5.19 Análise estrutural das proteínas com ferramentas de Bioinformática

Utilizou-se a versão beta do *SWISS-MODEL* que é a mais recente <<http://beta.swissmodel.expasy.org/>> para construir uma predição da estrutura tridimensional das fosfolipases LiRecDT2 e LiRecDT3.

A proteína utilizada como modelo para análise das predições foi a fosfolipase LiRecDT1 (código PDB:3RLH), pois esta toxina já foi cristalizada e teve sua estrutura tridimensional resolvida no trabalho de De Giuseppe e colaboradores 2011. A proteína LiRecDT1H12A (código PDB:3RLG) também foi cristalizada (ULLAH *et al.*, 2011) e por isso não foi necessário utilizar outra proteína como modelo para fazer a predição de sua estrutura.

A produção das figuras apresentadas nos resultados foi produzida com o software *Open Astex Viewer 3.0* <<http://openastexviewer.net/web/>> que é um programa para visualização molecular.

6. RESULTADOS

6.1 Sequenciamento

Realizamos esta etapa para verificarmos se as seqüências nucleotídicas estavam corretas e se não haviam ocorrido mutações durante a etapa de PCR que se sucedeu após a transformação das cepas de subclonagem DH5 α para produção das minipreparações plasmidiais que seriam utilizadas na transformação das cepas de expressão.

Todas as seqüências ficaram 100% idênticas as registradas no GenBank sob os códigos de acesso DQ218155 para LiRecDT1, DQ266399 para LiRecDT2 e DQ267927 para LiRecDT3. A LiRecDT1H12A por ser uma mutação da isoforma LiRecDT1, não possui número de registro no GenBank, sendo assim, a verificação da sua seqüência foi realizada com base na seqüência do trabalho de KUSMA e colaboradores 2008. Fizemos os alinhamentos usando a ferramenta *ClustalW2* <<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>>. Para confirmarmos a seqüência aminoacídica usamos a ferramenta *ExPASy Translate Tool* <<http://web.expasy.org/translate/>> e comparamos com as seqüências dos trabalhos das quais estas seqüências foram primeiramente originadas (CHAIM *et al.*, 2006; da SILVEIRA *et al.*, 2006; KUSMA *et al.*, 2008). O resultado dos sequenciamentos realizados no sequenciador por eletroforese capilar 3500xL

Genetic Analysers (Applied Biosystems® 3500) foram analisados em software *ChromasPro version 1.5* e os eletroferogramas gerados foram satisfatórios quanto a qualidade dos picos gerados (Fig. 8).

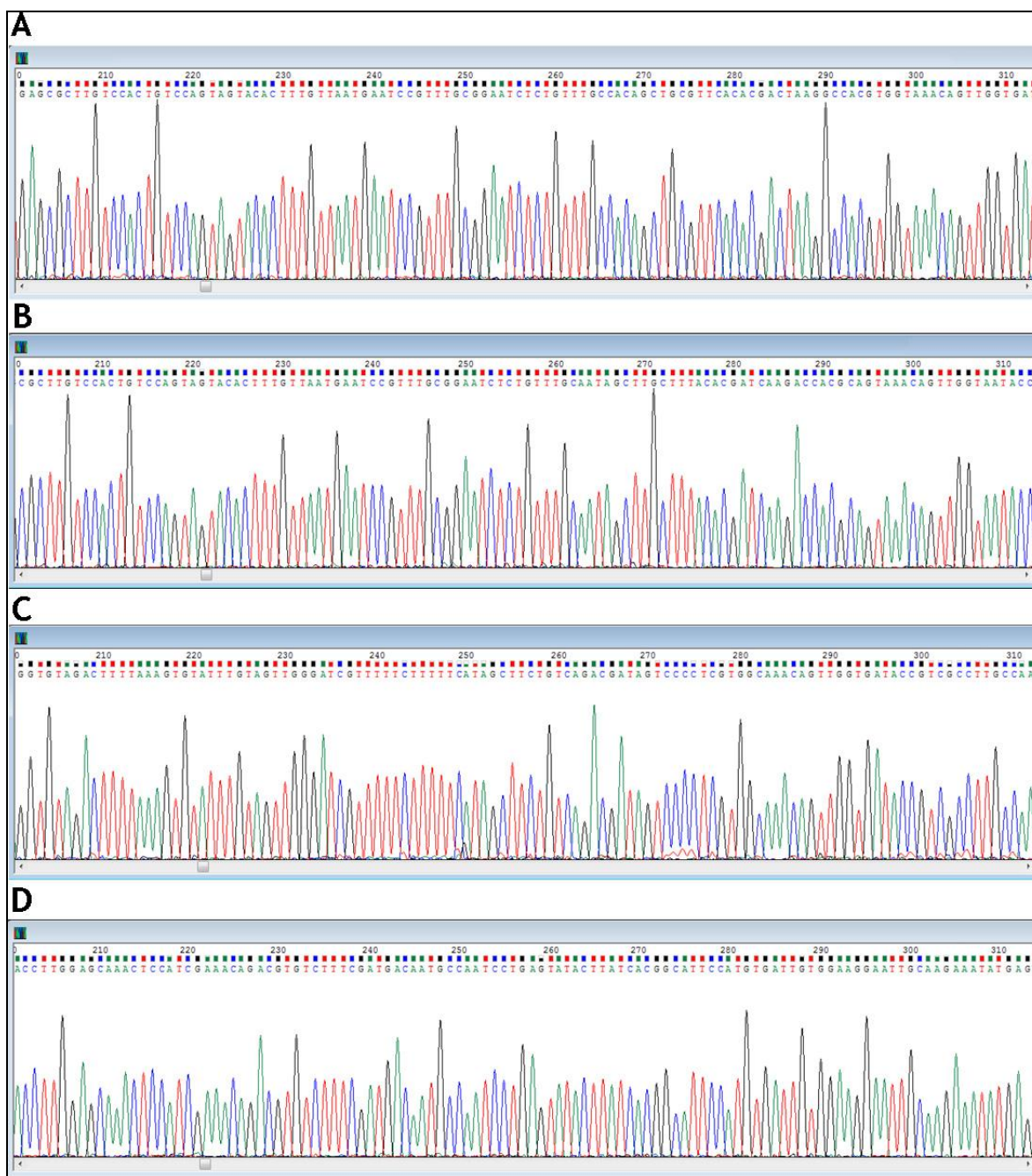


Figura 8 - ELETROFEROGRAMAS DA REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO. Os eletroferogramas foram gerados com o auxílio do software *ChromasPro version 1.5*. (A) Eletroferograma da isoforma LiRecDT1. (B) LiRecDT2. (C) LiRecDT3. (D) LiRecDT1H12A. Cada base nucleotídica está representada por uma coloração, sendo vermelho para Timina, azul para Citosina, verde para Adenina e preto para Guanina. Os quadrados acima das bases nucleotídicas representam o grau de confiabilidade dos picos gerados pelo sequenciamento, onde quanto mais preenchido o quadro esta, mais confiável é o pico gerado.

O resultado do sequenciamento também foi satisfatório quanto ao alinhamento das sequências *sense* e *antisense* para cada construção, pois cada clone foi submetido a duas reações de sequenciamento, uma utilizando o iniciador universal *sense* T7 e outra o iniciador universal *antisense* T7 Terminator, e quando as sequências *sense* e *antisense* de cada construção foram alinhadas uma contra a outra, elas apresentaram 100% de identidade, reforçando a qualidade do sequenciamento realizado.

Confirmadas as sequências partimos para a transformação nas cepas de expressão *E. coli* BL21(DE3)pLysS e *E. coli* SHuffle T7 Express lysY .

6.2 Transformações das cepas de expressão e PCR de colônia

Inicialmente partimos para a transformação das cepas de expressão com os clones de LiRecDT1, LiRecDT2, LiRecDT3 e LiRecDT1H12A para fazermos os testes de miniexpressão com o intuito de avaliar a viabilidade do uso da nova cepa *E. coli* SHuffle T7 Express lysY. Todas as placas das transformações cresceram bem, então partimos para uma PCR de colônia para verificar a positividade dos clones escolhidos.

Preparamos 18 colônias sendo três de cada fosfolipase (LiRecDT1, LiRecDT2 e LiRecDT3). Corremos o gel e analisamos o resultado na luz U.V do aparelho de captura de imagem Chemidoc®. Todos os clones da cepa *E. coli* BL21(DE3)pLysS ficaram positivos e no caso da cepa *E. coli* SHuffle T7 Express lysY tivemos algumas bandas positivas fortes e fracas e apenas uma banda negativa (Fig. 9).

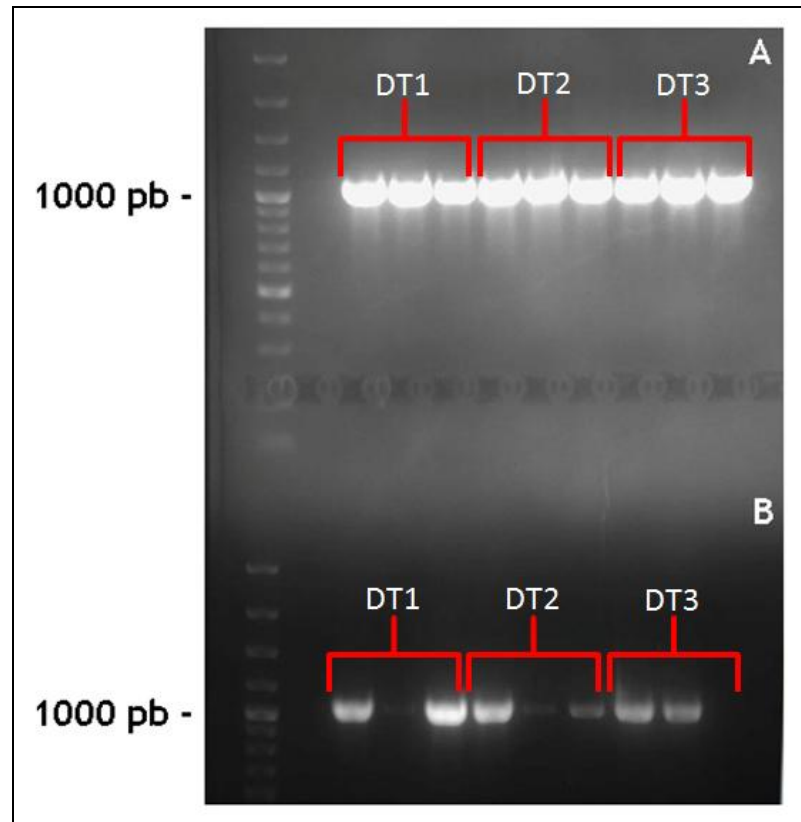


Figura 9 - PCR DE COLÔNIA. (A) Produto da PCR de colônia com os clones da LiRecDT1, LiRecDT2 e LiRecDT3 transformados na cepa *E.coli* BL21(DE3)pLysS na altura de aproximadamente 1000pb. (B) Produto da PCR de colônia com os clones da LiRecDT1 (DT1), LiRecDT2 (DT2) e LiRecDT3 (DT3) transformados na cepa *E.coli* SHuffle T7 Express lysY na altura de aproximadamente 1000pb. O último clone não acendeu como pode ser observado no gel. LiRecDT1H12A dados não mostrados.

A altura das bandas foi condizente com o esperado, pois nos trabalhos realizados pelo grupo para clonagem destas construções a altura das bandas para cada construção é de 1139 pb para o cDNA da LiRecDT1 (CHAIM *et al.*, 2006) e 1062 pb e 1007 pb para os cDNAs da LiRecDT2 e LiRecDT3 respectivamente (da SILVEIRA *et al.*, 2006).

6.3 Testes de Miniexpressão

Iniciamos os testes de miniexpressão primeiramente com a construção da isoforma da fosfolipase-D LiRecDT1 em *E. coli* BL21(DE3)pLysS e *E. coli* SHuffle

T7 Express lysY para verificarmos como a nova cepa iria se comportar na expressão desta toxina.

A quantidade de IPTG utilizado no teste piloto foi exatamente como a já padronizada pelo grupo desde o primeiro trabalho realizado com esta isoforma, que já tinha verificado que a quantidade de IPTG ótima para a indução da expressão era de 0,05 mM na concentração final (CHAIM *et al.*, 2006).

A quantidade de IPTG adicionado no meio de cultura de cada cepa foi igual, pois como queremos realizar ensaios comparativos as condições de expressão precisam estar padronizadas.

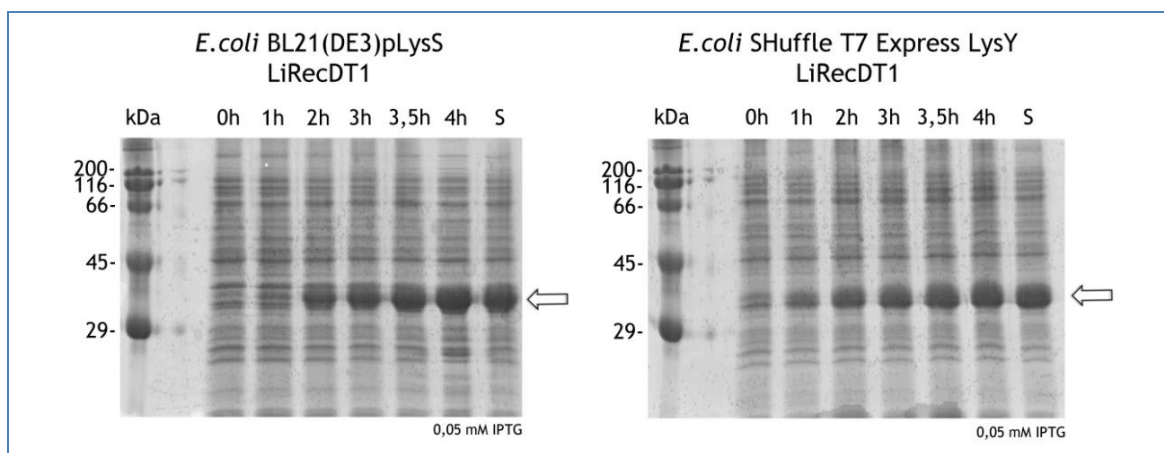


Figura 10 - TESTE DE MINI-EXPRESSION DA TOXINA LiRecDT1 NAS CEPAS *E.coli* BL21(DE3)pLysS e *E.coli* SHuffle T7 Express lysY. A proteína foi expressa à 30°C na concentração de IPTG 0,05mM. Em cada gel está demonstrado o marcador (kDa), os tempos de expressão em horas (0h, 1h, 2h, 3h, 3,5h e 4h), o sobrenadante após o processo de lise das bactérias (S) e a quantidade de IPTG utilizada. As setas vazadas indicam a altura da banda correspondente a LiRecDT1 na altura de 34kDa.

É possível ver nos dois géis uma banda crescente na altura de aproximadamente 34 kDa, que aumenta no decorrer das horas de expressão (Fig. 10). Sabemos que a proteína está presente nesta altura com base no trabalho de CHAIM e colaboradores (2006), que verificou que a isoforma LiRecDT1 purificada tinha mobilidade eletroforética em gel de poliacrilamida em condições redutoras na região de 34 kDa. Essa mesma mobilidade é observada nas isoformas LiRecDT2, LiRecDT3 (da SILVEIRA *et al.*, 2006) e LiRecDT4 (da SILVEIRA *et al.*, 2007). As outras isoformas apresentaram mobilidade diferente, sendo em 37 kDa a

mobilidade observada para a isoforma LiRecDT5 (da SILVEIRA *et al.*, 2007) e 33 kDa a observada para a isoforma LiRecDT6 (APPEL *et al.*, 2008).

Nas duas expressões houve porção solúvel de proteínas após o processo de lise bacteriana conforme pode ser observado na coluna do sobrenadante (S) dos géis. Isso já era esperado, visto que a isoforma LiRecDT1 apresentou ótimo rendimento quando purificada, resultando em 24 mg/L de cultura (CHAIM *et al.*, 2006).

Após verificarmos que a cepa bacteriana *E. coli* SHuffle T7 Express lysY foi viável para a produção da isoforma recombinante da LiRecDT1 então prosseguimos com os testes de miniexpressão.

Os testes posteriores foram realizados com as construções LiRecDT2 e LiRecDT3 e LiRecDT1H12A conduzidos com ambas cepas bacterianas *E. coli* BL21(DE3)pLysS e *E. coli* SHuffle T7 Express lysY, pois já sabíamos como estas outras toxinas se comportam quando expressas na cepa *E. coli* BL21(DE3)pLysS a partir do resultado de outros trabalhos do grupo (da SILVEIRA *et al.*, 2006; RIBEIRO *et al.*, 2007; KUSMA *et al.*, 2008).

A quantidade de IPTG utilizado no teste piloto foi exatamente como a utilizada pelo grupo nos trabalhos de da SILVEIRA e colaboradores 2006, RIBEIRO e colaboradores 2007 e KUSMA e colaboradores 2008.

É possível ver nos géis uma banda crescente na altura de aproximadamente 34 kDa, que aumenta no decorrer das horas de expressão (Fig. 11). Assim como na expressão da LiRecDT1, sabemos que as proteínas estão presentes nesta altura com base no trabalho de da SILVEIRA e colaboradores (2006) e KUSMA e colaboradores (2008), que como já mencionado anteriormente, verificaram que as isoformas LiRecDT2, LiRecDT3 e LiRecDT1H12A purificadas tinham mobilidade eletroforética em gel de poliacrilamida na região de 34 kDa. Em todas as expressões houve porção solúvel de proteínas após o processo de lise bacteriana conforme pode ser observado na coluna do sobrenadante (S).

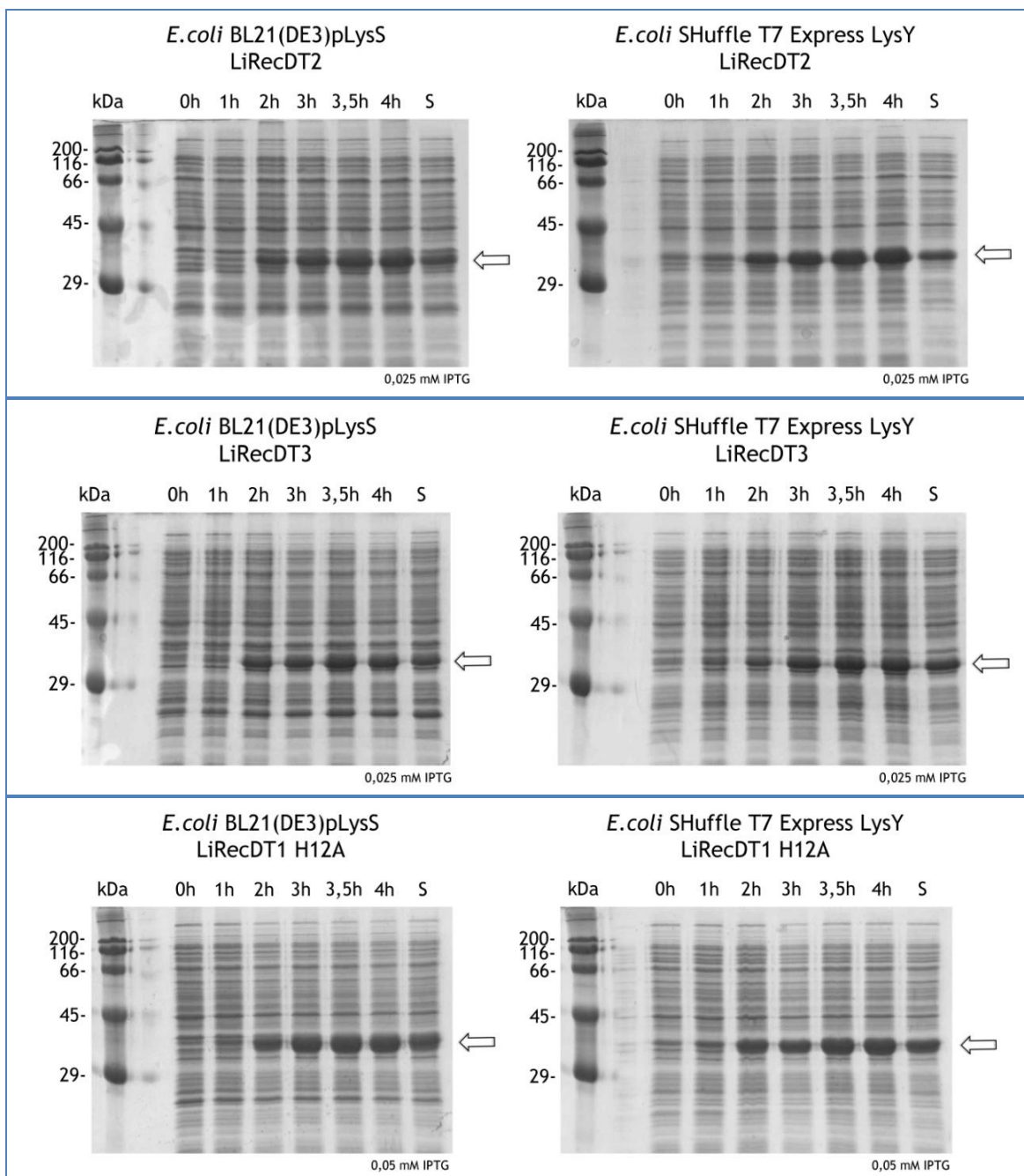


Figura 11 - TESTE DE MINI-EXPRESSÃO DAS TOXINAS LiRecDT2, LiRecDT3 e LiRecDT1H12A NAS CEPAS *E. coli* BL21(DE3)pLysS e *E. coli* SHuffle T7 Express lysY. As proteínas foram expressas à 37°C e 30°C respectivamente, nas concentrações de IPTG 0,025mM e 0,05mM. Em cada gel está demonstrado o marcador (kDa), os tempos de expressão em horas (0h, 1h, 2h, 3h, 3,5h e 4h), o sobrenadante após o processo de lise das bactérias (S) e a quantidade de IPTG utilizada. As setas vazadas indicam a altura da banda correspondente a LiRecDT2, LiRecDT3 e LiRecDT1H12A todas na altura de 34 kDa.

Também podemos observar nestes testes de miniexpressão, que a partir do tempo 1 hora (1h) da expressão com a cepa *E. coli* SHuffle T7 Express lysY já é

possível visualizar a presença de uma banda crescente no decorrer das horas (2h, 3h, 3,5h e 4h) na altura correspondente as toxinas LiRecDT2, LiRecDT3 e LiRecDT1H12A respectivamente, enquanto que a expressão na cepa *E. coli* BL21(DE3)pLysS começa a ser observada somente a partir de 2 horas (2h) de expressão.

6.4 Expressão heteróloga das toxinas recombinantes LiRecDT1, LiRecDT2, LiRecDT3 e LiRecDT1H12A

Todas as proteínas foram expressas em ambas cepas *E. coli* BL21(DE3)pLysS e *E. coli* SHuffle T7 Express lysY durante 3 horas e meia de expressão contendo suas respectivas quantidades de indutor IPTG.

Após a expressão todas as culturas foram centrifugadas, ressuspendidas cada uma em 40 mL de tampão de ligação e mantidas a -20°C até o processo de lise mecânica pela prensa de French.

Géis de poliacrilamida 12,5% foram produzidos para analisar a solubilidade das expressões a fim de se prosseguir com o processo de purificação de todas as toxinas.

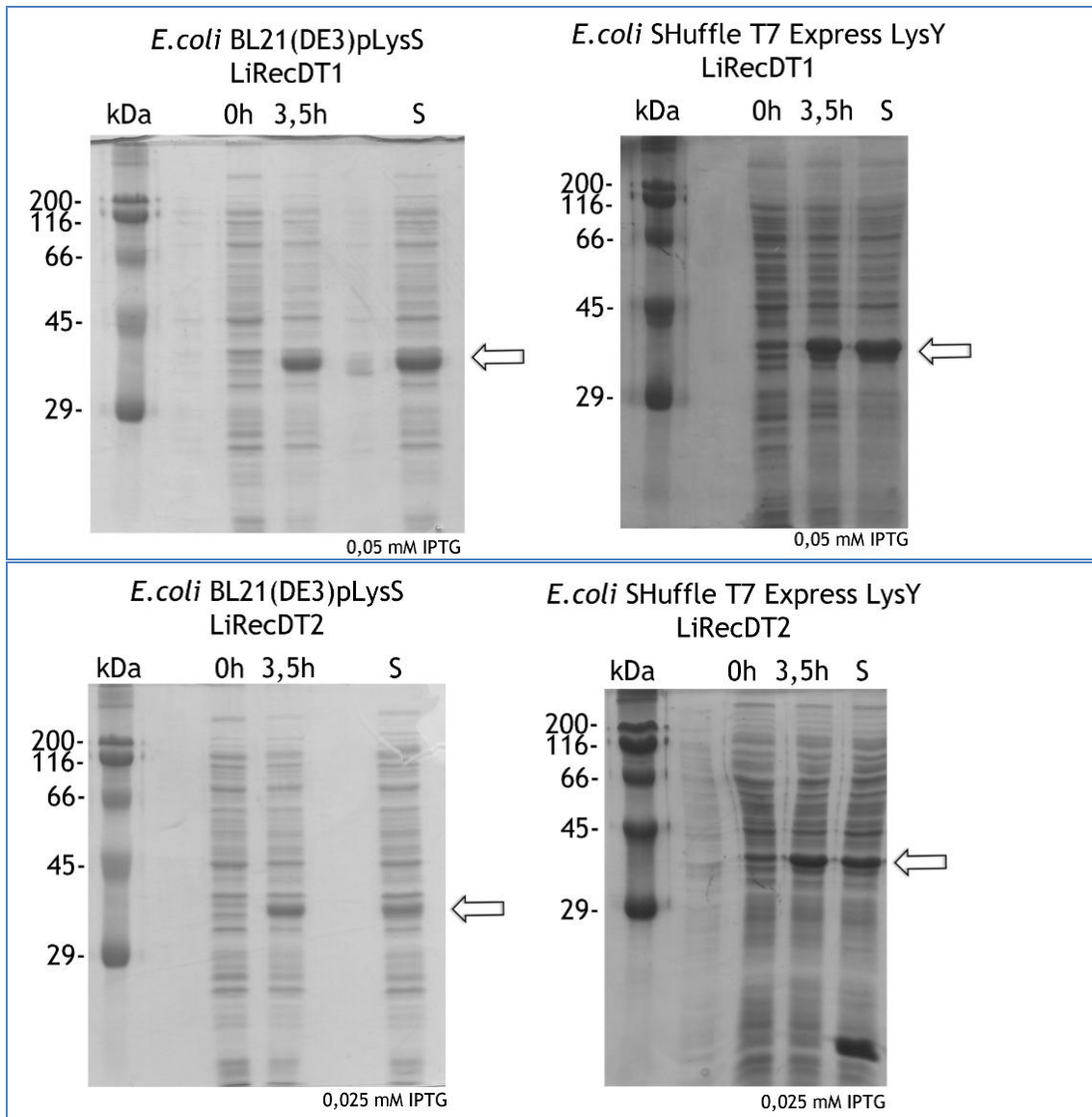
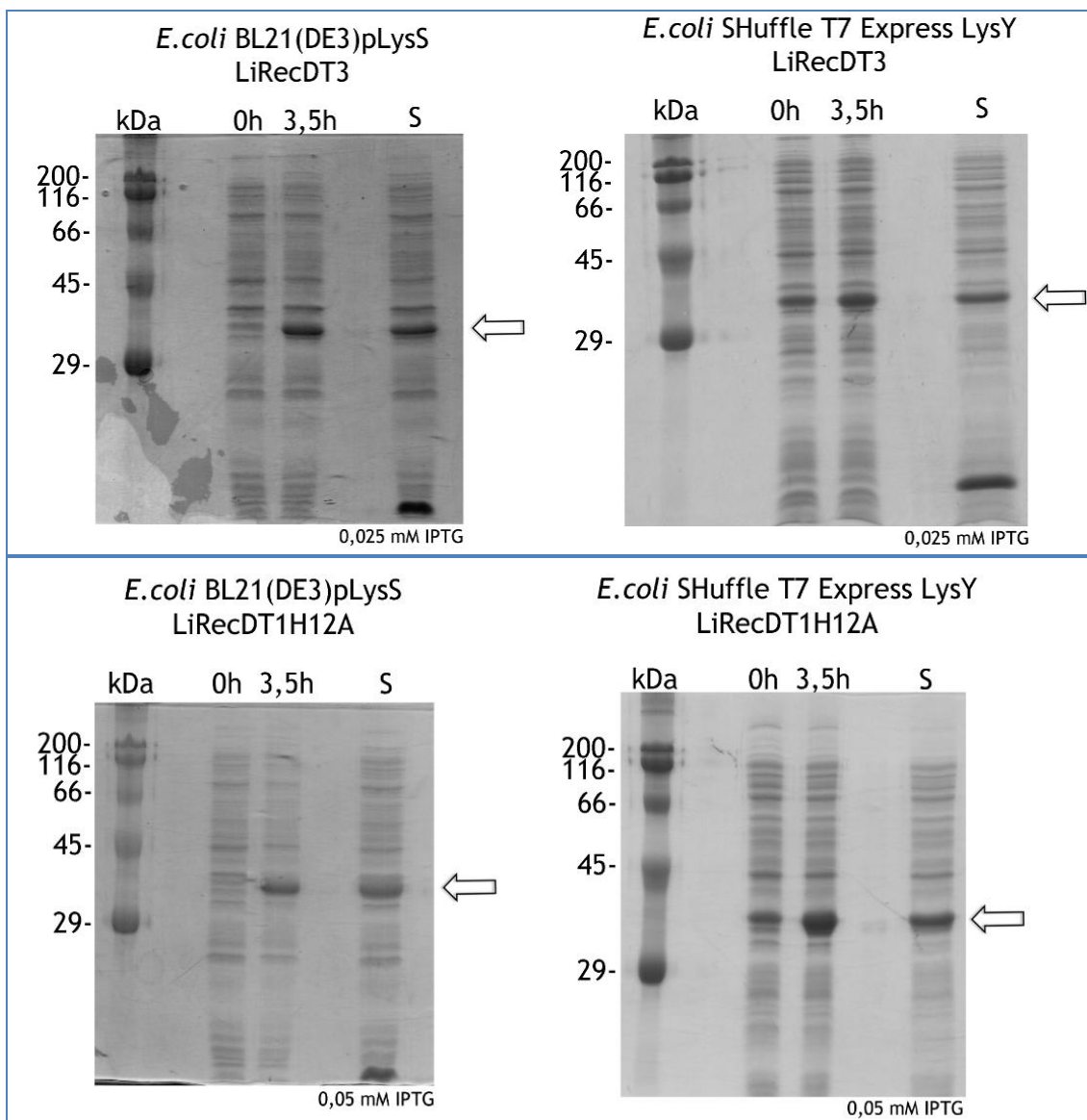


Figura 12 - EXPRESSÃO DAS TOXINAS LiRecDT1, LiRecDT2, LiRecDT3 e LiRecDT1H12A NAS CEPAS *E. coli* BL21(DE3)pLysS e *E. coli* SHuffle T7 Express lysY. As proteínas foram expressas à 37°C e 30°C respectivamente, nas concentrações de IPTG 0,025mM e 0,05mM. Em cada gel está demonstrado o marcador (kDa), os tempos de expressão em horas (0h e 3,5h), o sobrenadante após o processo de lise das bactérias (S) e a quantidade de IPTG utilizada. As setas vazadas indicam a altura da banda correspondente a LiRecDT1, LiRecDT2, LiRecDT3 e LiRecDT1H12A todas na altura de 34 kDa.



Continuação da figura 12 - EXPRESSÃO DAS TOXINAS LiRecDT1, LiRecDT2, LiRecDT3 e LiRecDT1H12A NAS CEPAS *E. coli* BL21(DE3)pLysS e *E. coli* SHuffle T7 Express lysY. As proteínas foram expressas à 37°C e 30°C respectivamente, nas concentrações de IPTG 0,025mM e 0,05mM. Em cada gel está demonstrado o marcador (kDa), os tempos de expressão em horas (0h e 3,5h), o sobrenadante após o processo de lise das bactérias (S) e a quantidade de IPTG utilizada. As setas vazadas indicam a altura da banda correspondente a LiRecDT1, LiRecDT2, LiRecDT3 e LiRecDT1H12A todas na altura de 34 kDa.

As análises dos géis mostram a mesma banda de intensidade crescente na altura de 34 kDa que foram vistas nas análises das miniexpressões. Em todas as expressões após o processo de lise mecânica foi possível observar a presença das toxinas no sobrenadante, ou seja, na porção solúvel (Fig. 12).

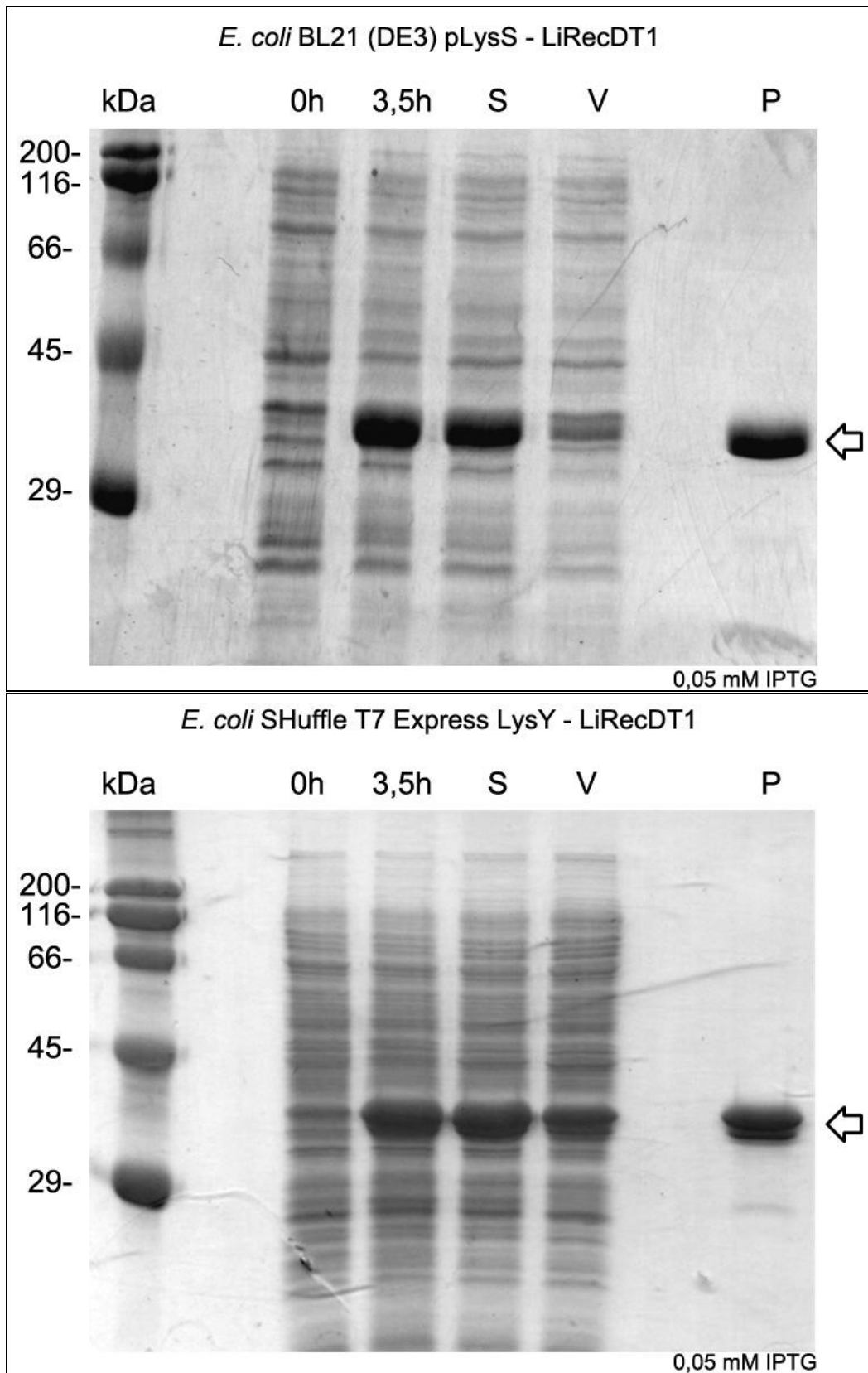
Podemos notar nos géis das expressões na cepa *E. coli* SHuffle T7 Express lysY que no tempo inicial (T0) mesmo antes da indução com o IPTG já havia a presença de uma banda de expressão na altura correspondente as fosfolipases-D que estavam sendo expressadas.

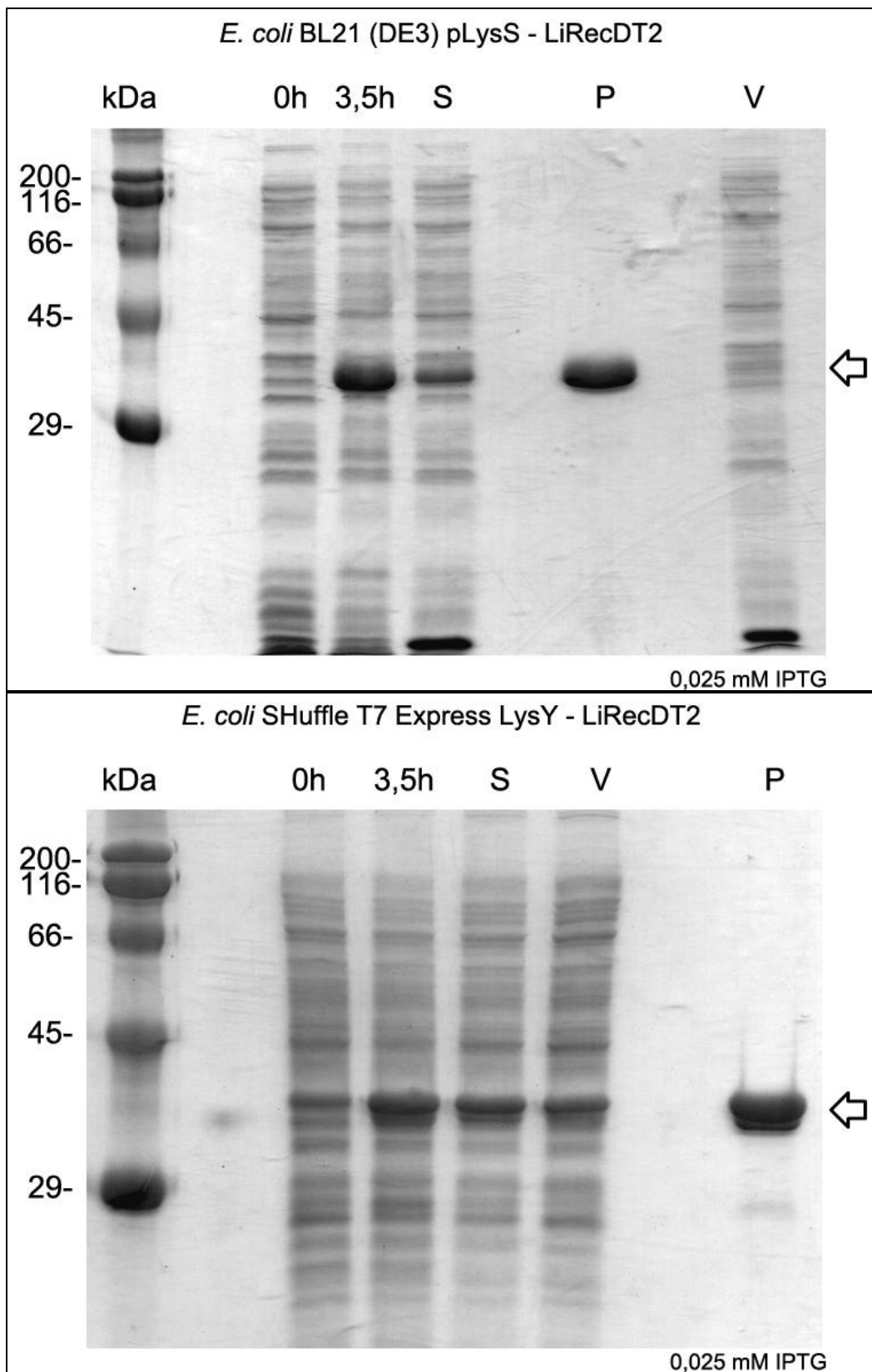
Com base nos resultados obtidos prosseguimos para o processo de purificação das toxinas recombinantes.

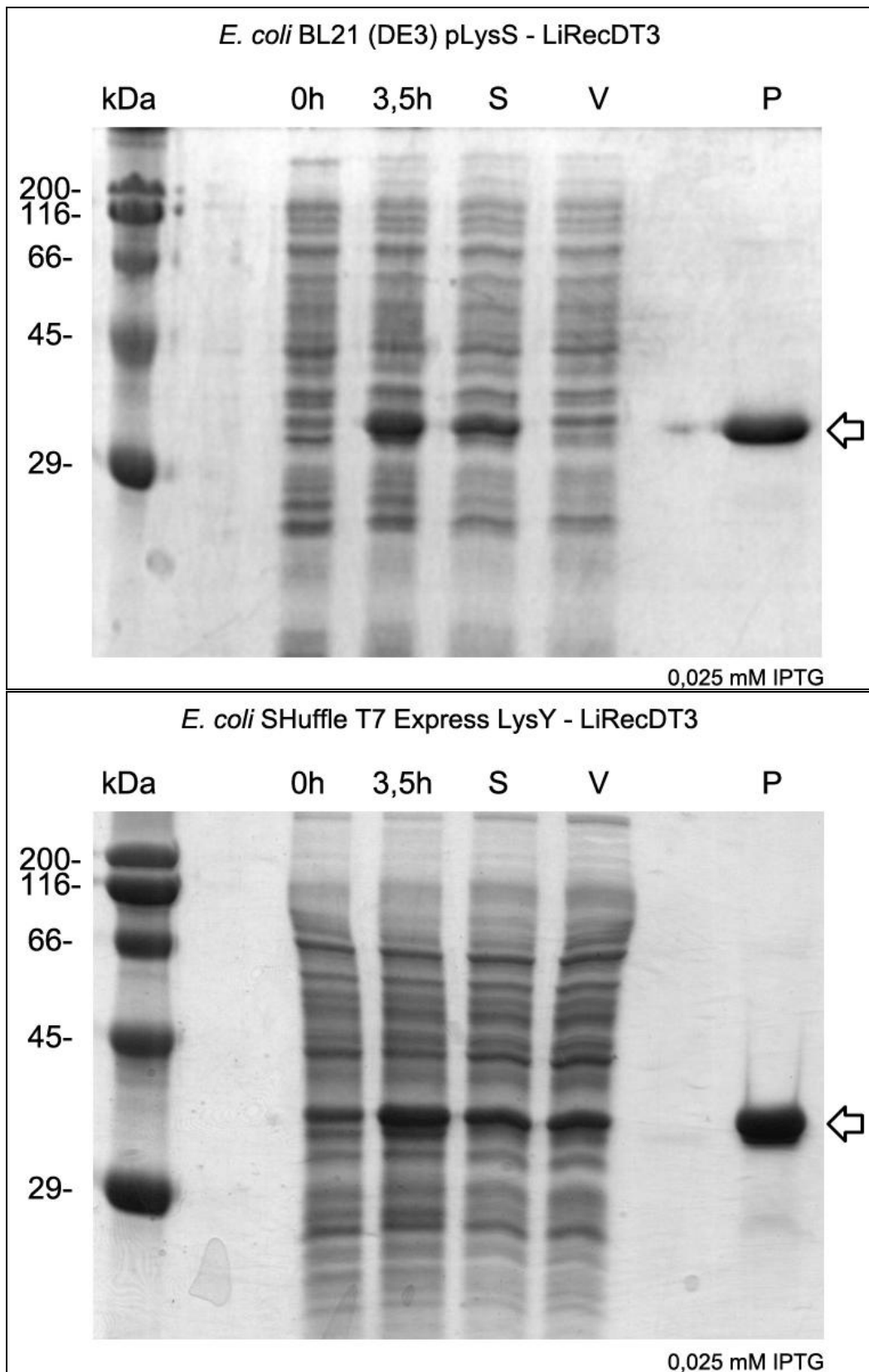
6.5 Purificação das toxinas recombinantes LiRecDT1, LiRecDT2, LiRecDT3 e LiRecDT1H12A

Todas as toxinas utilizadas neste trabalho estão subclonadas em vetor de expressão pET-14b e ao serem produzidas é inserido na porção N-terminal das recombinantes uma cauda contendo 6 histidinas que tem como objetivo final facilitar a etapa de purificação por cromatografia de afinidade com resina Ni⁺² - NTA agarose, visto que essa cauda tem afinidade por metais divalentes.

A partir da análise dos géis de poliacrilamida de todas as purificações (Figura 13) podemos verificar a presença das proteínas purificadas após a eluição das mesmas.







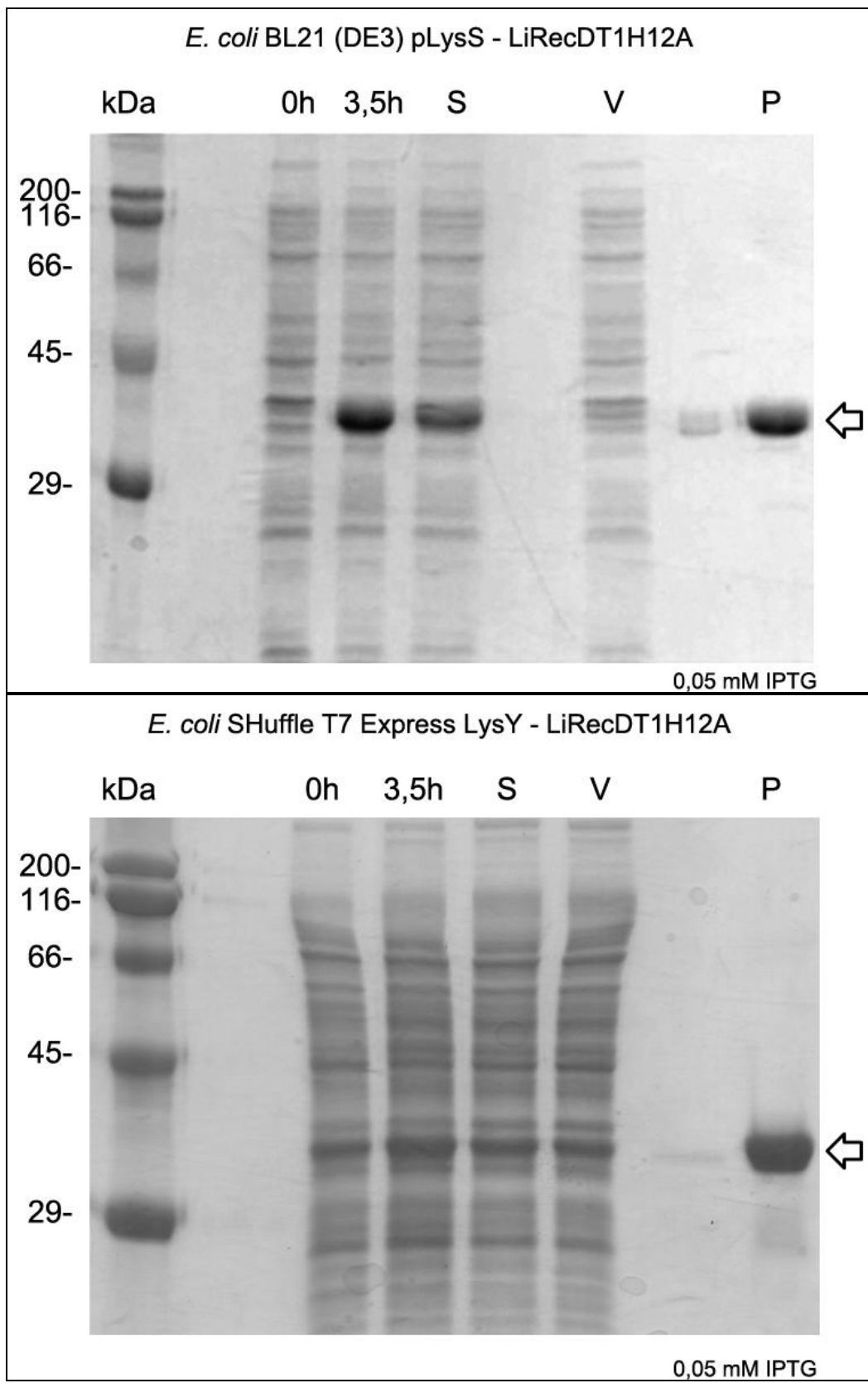


Figura 13 - PURIFICAÇÃO DAS TOXINAS LiRecDT1, LiRecDT2, LiRecDT3 e LiRecDT1H12A DAS CEPAS *E. coli* BL21(DE3)pLysS e *E. coli* SHuffle T7 Express lysY. As proteínas foram expressas à 37°C e 30°C respectivamente, nas concentrações de IPTG 0,025mM e 0,05mM. Em cada gel está demonstrado o marcador (kDa), os tempos de expressão em horas (0h e 3,5h), o sobrenadante após o processo de lise das bactérias (S) e após incubação com a resina de Ni-NTA agarose (V), a proteína recombinante eluída (P) e a quantidade de IPTG utilizada. As setas vazadas indicam a altura da banda correspondente a LiRecDT1, LiRecDT2, LiRecDT3 e LiRecDT1H12A purificadas, todas na altura de aproximadamente 34 kDa. As massas moleculares estão demonstradas ao lado esquerdo de cada gel.

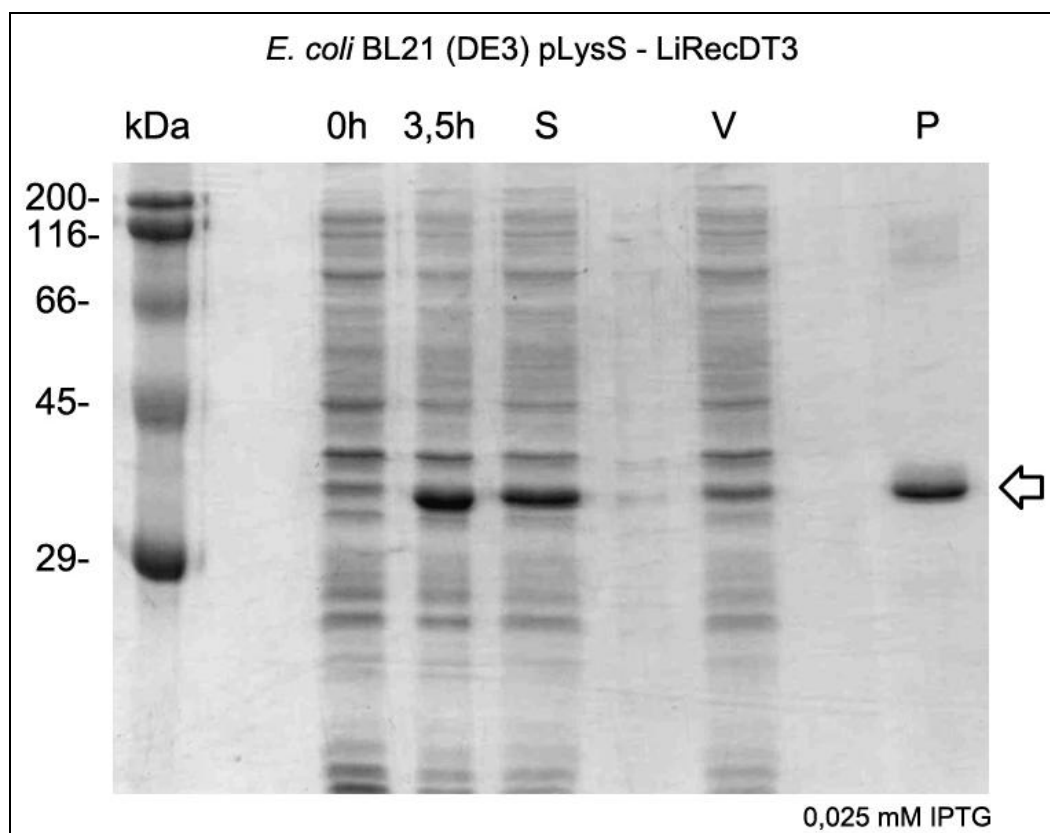


Figura 14 - SEGUNDA PURIFICAÇÃO DA TOXINA LiRecDT3 DA CEPA *E. coli* BL21(DE3)pLysS. A proteína foi expressa à 30°C, na concentração de IPTG 0,025mM. No gel está demonstrado o marcador (kDa), os tempos de expressão em horas (0h e 3,5h), o sobrenadante após o processo de lise das bactérias (S) e após incubação com a resina de Ni-NTA agarose (V), a proteína recombinante eluída (P) e a quantidade de IPTG utilizada. As setas vazadas indicam a altura da banda correspondente LiRecDT3 na altura de aproximadamente 34 kDa. As massas moleculares estão demonstradas ao lado esquerdo do gel.

Todas as proteínas produzidas nas cepas *E. coli* BL21(DE3)pLysS e *E. coli* SHuffle T7 Express lysY foram purificadas com sucesso, com destaque para a LiRecDT3 que foi produzida duas vezes na cepa *E. coli* BL21(DE3)pLysS pois o produto da segunda purificação que rendeu 8 mg/L de proteína recombinante (Fig.

14) foi enviado para a UNESP de São José do Rio Preto para cristalização, a fim de resolvermos sua estrutura terciária e verificarmos se as predições apresentadas neste trabalho condizem com a real estrutura desta toxina, o que responderia o motivo dela ter uma atividade tão baixa em relação as outras.

As outras purificações tiveram os seguintes rendimentos apresentados na tabela 3.

Como o objetivo de expressar todas as proteínas é para utilizá-las em ensaios *in vitro* e *in vivo*, sua pureza deve estar em um nível aceitável (> 98%), uma vez que mesmo pequenas quantidades de contaminantes bacterianos podem interferir nos resultados de atividade biológica.

<i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS	Rendimento mg/L	<i>E. coli</i> SHuffle T7 Express lysY	Rendimento mg/L
LiRecDT1	21 mg/L	LiRecDT1	10 mg/L
LiRecDT2	4,8 mg/L	LiRecDT2	2,5 mg/L
LiRecDT3	4,7 mg/L	LiRecDT3	2,8 mg/L
LiRecDTH12A	10 mg/L	LiRecDTH12A	5 mg/L

Tabela 3 - RENDIMENTO DA PURIFICAÇÃO DAS TOXINAS LiRecDT1, LiRecDT2, LiRecDT3 e LiRecDT1H12A DAS CEPAS *E. coli* BL21(DE3)pLysS e *E. coli* SHuffle T7 Express lysY. Os rendimentos referentes à purificação das toxinas recombinantes produzidas em cada cepa estão dispostos respectivamente ao lado direito de cada.

6.6 Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida

Após a purificação das oito proteínas recombinantes, foi realizada a eletroforese em gel de poliacrilamida em condições redutoras e não redutoras para avaliarmos se a mobilidade eletroforética de cada uma das proteínas recombinantes LiRecDT1, LiRecDT2, LiRecDT3 e LiRecDT1 H12A permanecia as mesmas ainda que produzidas em cepas bacterianas diferentes ou se a cepa *E. coli* SHuffle T7 Express lysY teria modificado a estrutura terciária a ponto de apresentar uma modificação globular capaz de apresentar diferença em relação as proteínas produzidas na *E. coli* BL21(DE3)pLysS (Fig. 15 e 16).

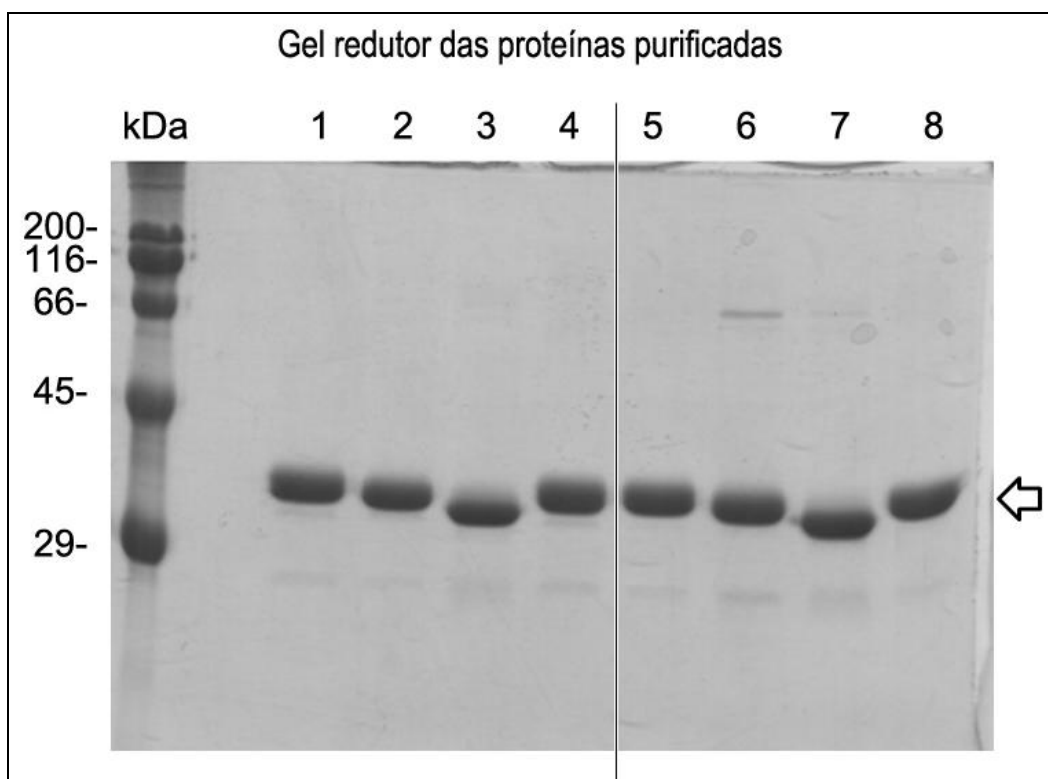


Figura 15 - GEL REDUTOR DAS TOXINAS LiRecDT1, LiRecDT2, LiRecDT3 E LiRecDT1 H12A DAS CEPAS *E. coli* BL21(DE3)pLysS E *E. coli* SHuffle T7 Express lysY. Todas as proteínas puras foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5% em condições redutoras. No gel estão representados na sequência as massas moleculares ao lado esquerdo do gel (kDa), as toxinas recombinantes puras LiRecDT1 (1), LiRecDT2 (2), LiRecDT3 (3) e LiRecDT1 H12A (4) da cepa *E. coli* BL21(DE3)pLysS e logo em seguida as toxinas recombinantes puras LiRecDT1 (5), LiRecDT2 (6), LiRecDT3 (7) e LiRecDT1 H12A (8) da cepa *E. coli* SHuffle T7 Express lysY.

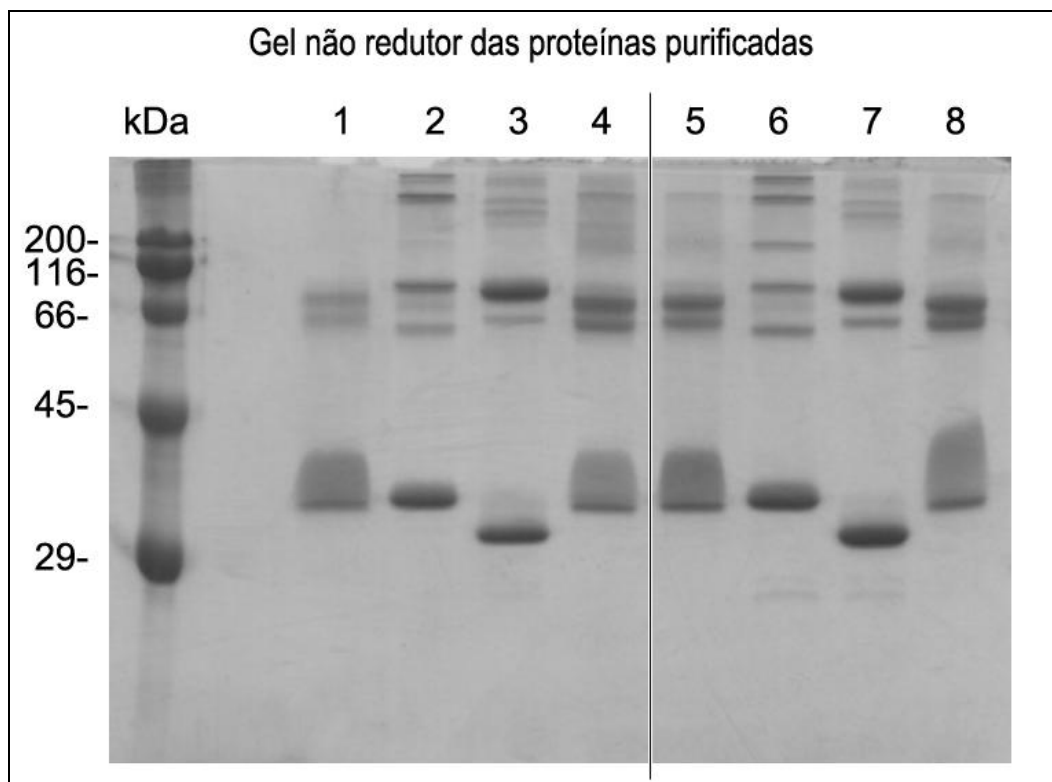


Figura 16 - GEL NÃO REDUTOR DAS TOXINAS LiRecDT1, LiRecDT2, LiRecDT3 E LiRecDT1 H12A DAS CEPAS *E. coli* BL21(DE3)pLysS E *E. coli* SHuffle T7 Express lysY. Todas as proteínas puras foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5% em condições não redutoras. No gel estão representados na sequência as massas moleculares ao lado esquerdo do gel (kDa), as toxinas recombinantes puras LiRecDT1 (1), LiRecDT2 (2), LiRecDT3 (3) e LiRecDT1 H12A (4) da cepa *E. coli* BL21(DE3)pLysS e logo em seguida as toxinas recombinantes puras LiRecDT1 (5), LiRecDT2 (6), LiRecDT3 (7) e LiRecDT1 H12A (8) da cepa *E. coli* SHuffle T7 Express lysY.

Podemos observar tanto no gel redutor quanto no gel não redutor que a proteína recombinante LiRecDT3 produzida em ambas as cepas apresenta uma mobilidade eletroforética diferente das outras proteínas recombinantes (Fig. 15 e 16).

Outro fator que chamou a atenção foi à presença de diversos dímeros, trímeros e oligômeros quando as proteínas recombinantes foram submetidas à eletroforese em condições não redutoras.

6.7 Reação de imunoblotting - *Western Blot*

O Western Blot foi realizado para confirmarmos a presença de dímeros trimeros e oligomeros nas toxinas mesmo quando produzidas em cepas diferentes. Foi utilizado o anticorpo anti-veneno bruto produzido em coelhos e o controle negativo foi o soro pré-imune também de coelhos (Fig. 17 e 18).

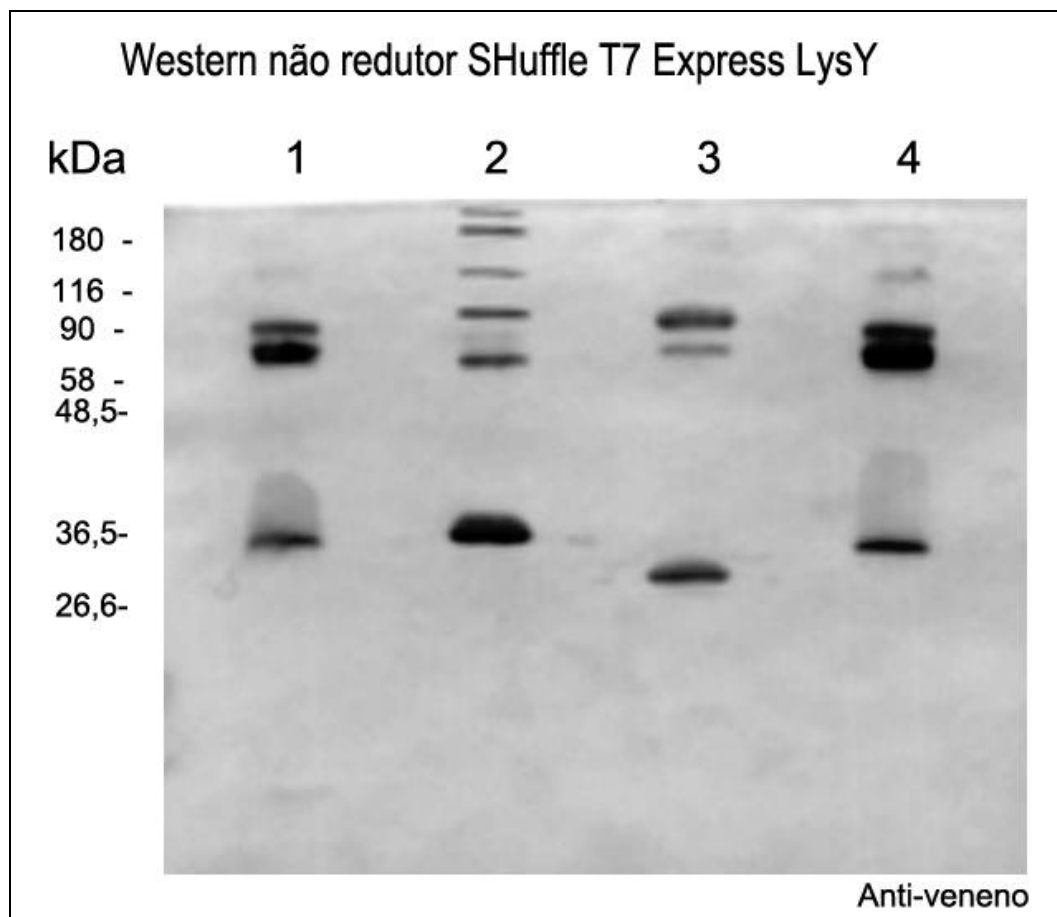


Figura 17 - WESTERN BLOT PARA COMPARAÇÃO DA REATIVIDADE IMONOLÓGICA DAS TOXINAS RECOMBINANTES LiRecDT1, LiRecDT2, LiRecDT3 e LiRecDT1 H12A DA CEPA *E. coli* SHuffle T7 Express lysY. 1 ug de todas as proteínas puras foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5% em condições não redutoras, transferidas para membranas de nitrocelulose e foram expostas a anticorpos purificados contra as toxinas do veneno bruto (Anti-veneno). No gel estão representados na sequência as massas moleculares ao lado esquerdo do gel (kDa), as toxinas recombinantes puras LiRecDT1 (1), LiRecDT2 (2), LiRecDT3 (3) e LiRecDT1 H12A (4).

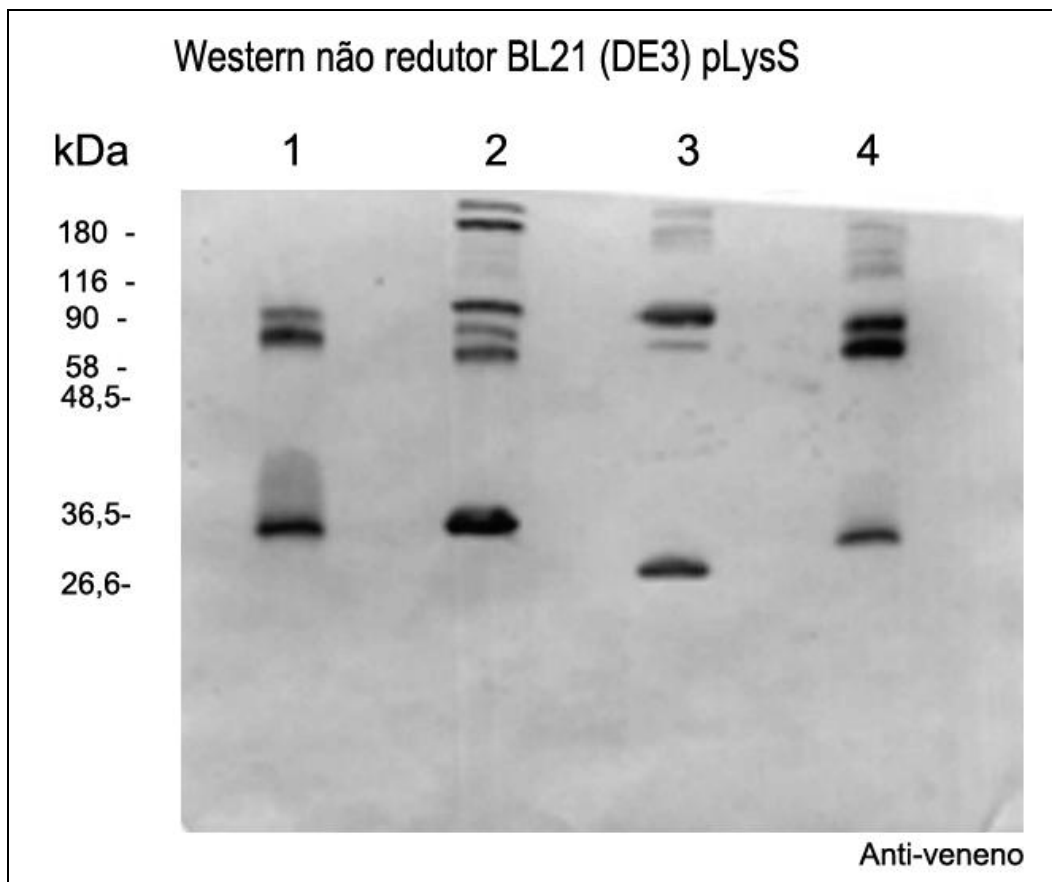


Figura 18 - WESTERN BLOT PARA COMPARAÇÃO DA REATIVIDADE IMONOLÓGICA DAS TOXINAS RECOMBINANTES LiRecDT1, LiRecDT2, LiRecDT3 e LiRecDT1 H12A DA CEPA *E. coli* BL21(DE3)pLysS. 1 ug de todas as proteínas puras foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5% em condições não redutoras, transferidas para membranas de nitrocelulose e foram expostas a anticorpos purificados contra as toxinas do veneno bruto (Anti-veneno). No gel estão representados na sequência as massas moleculares ao lado esquerdo do gel (kDa), as toxinas recombinantes puras LiRecDT1 (1), LiRecDT2 (2), LiRecDT3 (3) e LiRecDT1 H12A (4).

O resultado mostrou mais uma vez a presença de dímeros, trimeros e oligômeros em todas as proteínas recombinantes purificadas de ambas as cepas bacterianas (Fig. 17 e 18).

6.8 Ensaio de ELISA

Para o ensaio de ELISA uma única diluição de 1:1000 foi utilizada para o soro hiperimune anti-veneno total *L. intermedia* e anti-LiRecDT1.

Para a confecção dos gráficos dos resultados dos ensaios de ELISA utilizou-se a média das absorbâncias obtidas nas quadruplicatas realizadas para cada toxina recombinante e o mesmo foi feito para o controle (branco) de cada proteína. Para as análises estatísticas dos ensaios de ELISA apresentados, os resultados de absorbância de cada soro hiperimune sobre as proteínas produzidas na bactéria *E. coli* BL21(DE3)pLysS foram sempre confrontados com os dados de absorbância do mesmo soro hiperimune sobre as proteínas produzidas na bactéria *E. coli* SHuffle T7 Express lysY para verificação de significância.

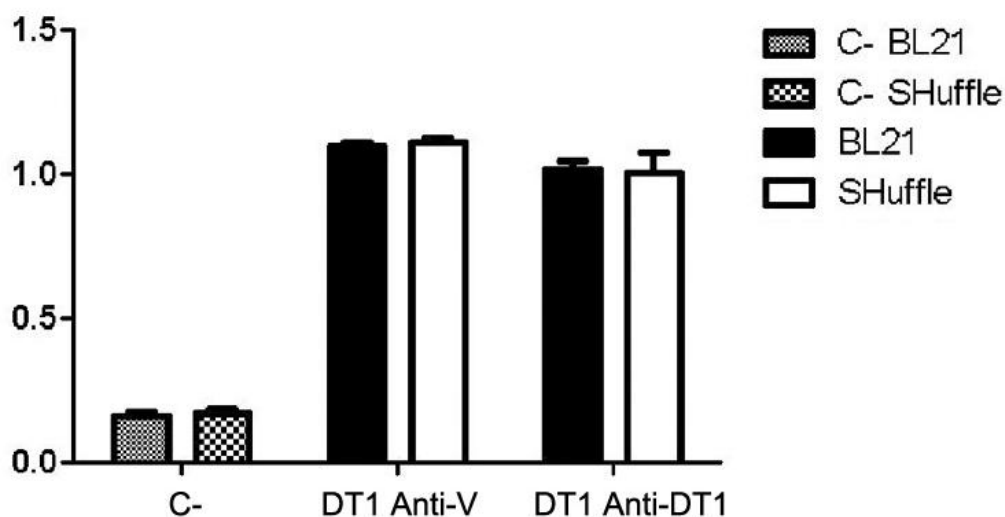


Gráfico 1 - REAÇÃO IMUNOLÓGICA ENTRE LiRecDT1 E ANTI-VENENO DE *Loxosceles intermedia* - ELISA. Ensaio realizado utilizando como antígeno 20 µg de toxina recombinante LiRecDT1/mL de cada cepa *E. coli* BL21(DE3)pLysS e *E. coli* SHuffle T7 Express lysY como anticorpos primários soros hiperimunes anti-veneno (DT1 Anti-V) total de *Loxosceles intermedia* e anti-LiRecDT1 (DT1 Anti-DT1) em diluição única (1:1000). O eixo y indica as médias das absorbâncias obtidas. As diferenças entre os resultados obtidos dos soros hiperimunes não foram estatisticamente significativas entre as duas bactérias testadas.

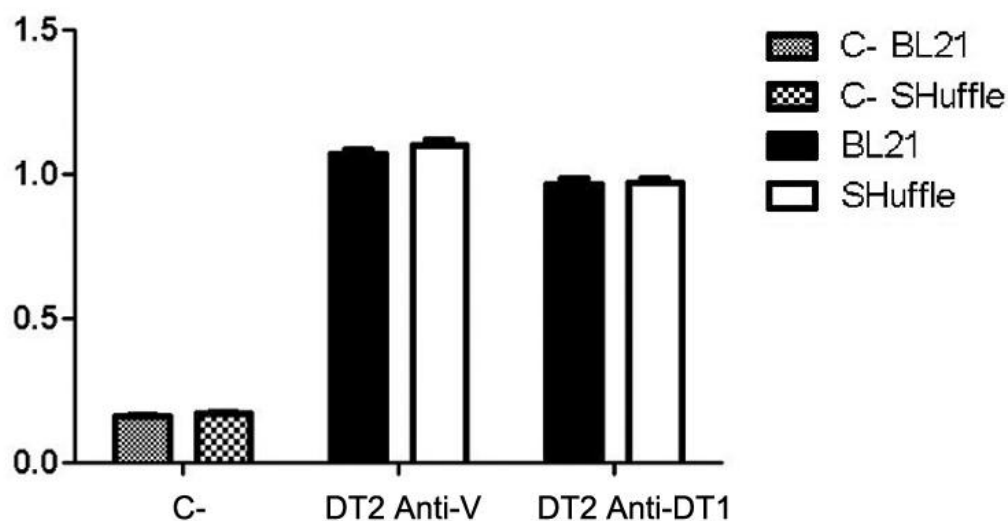


Gráfico 2 - REAÇÃO IMUNOLÓGICA ENTRE LiRecDT2 E ANTI-VENENO DE *Loxosceles intermedia* - ELISA. Ensaio realizado utilizando como antígeno 20 µg de toxina recombinante LiRecDT2/mL de cada cepa *E. coli* BL21(DE3)pLysS e *E. coli* SHuffle T7 Express lysY como anticorpos primários soros hiperimunes anti-veneno (DT2 Anti-V) total de *Loxosceles intermedia* e anti-LiRecDT1 (DT2 Anti-DT1) em diluição única (1:1000). O eixo y indica as médias das absorbâncias obtidas. As diferenças entre os resultados obtidos dos soros hiperimunes não foram estatisticamente significativas entre as duas bactérias testadas.

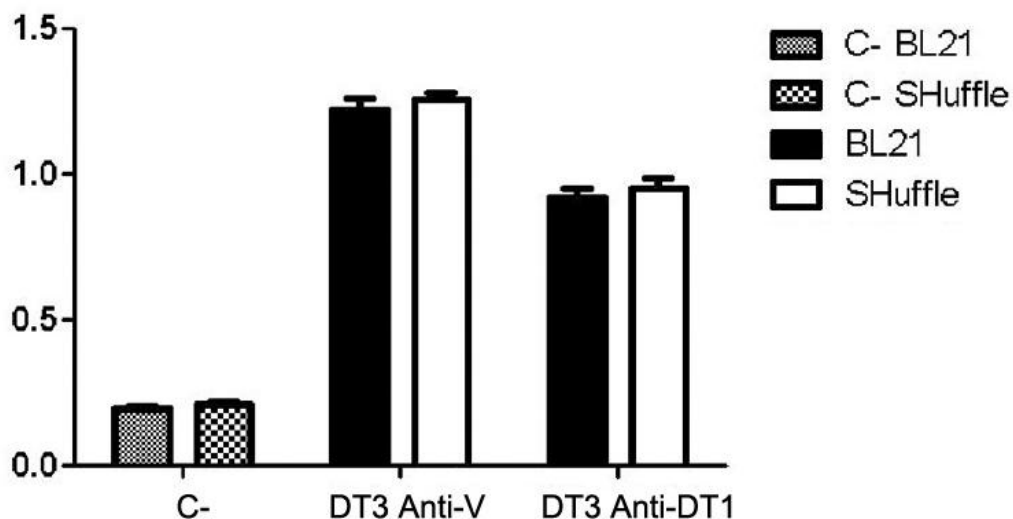


Gráfico 3 - REAÇÃO IMUNOLÓGICA ENTRE LiRecDT3 E ANTI-VENENO DE *Loxosceles intermedia* - ELISA. Ensaio realizado utilizando como antígeno 20 µg de toxina recombinante LiRecDT3/mL de cada cepa *E. coli* BL21(DE3)pLysS e *E. coli* SHuffle T7 Express lysY como anticorpos primários soros hiperimunes anti-veneno (DT3 Anti-V) total de *Loxosceles intermedia* e anti-LiRecDT1 (DT3 Anti-DT1) em diluição única (1:1000). O eixo y indica as médias das absorbâncias obtidas. As diferenças entre os resultados obtidos dos soros hiperimunes não foram estatisticamente significativas entre as duas bactérias testadas.

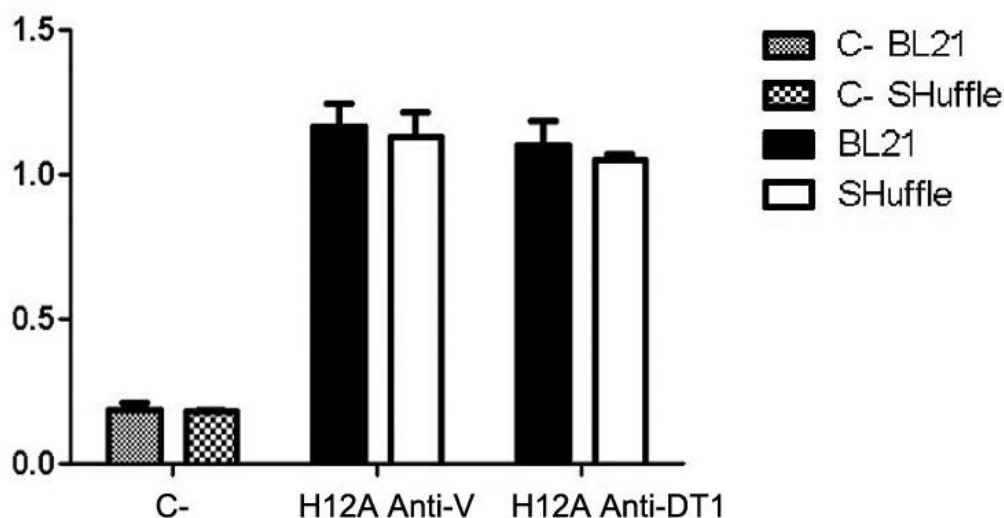


Gráfico 4 - REAÇÃO IMUNOLÓGICA ENTRE LiRecDT1H12A E ANTI-VENENO DE *Loxosceles intermedia* - ELISA. Ensaio realizado utilizando como antígeno 20 µg de toxina recombinante LiRecDT1H12A/mL de cada cepa *E. coli* BL21(DE3)pLysS e *E. coli* SHuffle T7 Express lysY como anticorpos primários soros hiperimunes anti-veneno (H12A Anti-V) total de *Loxosceles intermedia* e anti-LiRecDT1 (H12A Anti-DT1) em diluição única (1:1000). O eixo y indica as médias das absorvâncias obtidas. As diferenças entre os resultados obtidos dos soros hiperimunes não foram estatisticamente significativas entre as duas bactérias testadas.

Em todos os ensaios de ELISA realizados podemos verificar que não houve modificação significativa na identificação de epítomos conformacionais entre todas as proteínas recombinantes analisadas reforçando o resultado obtido com o ensaio de *western blot* (Gráficos 1, 2, 3 e 4).

6.9 Ensaio de atividade esfingomielinásica

O ensaio de atividade esfingomielinásica foi realizado para verificarmos se as mesmas toxinas recombinantes quando produzidas em outra cepa bacteriana apresentariam atividades diferenciadas.

Este método foi escolhido por ser eficiente para avaliar a atividade das fosfolipases-D do veneno de aranha-marrom, visto que, este método já foi empregado diversas vezes pelo nosso grupo e está presente em artigos já publicados (da SILVEIRA *et al.*, 2006; 2007; APPEL *et al.*, 2008; CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2011; CHAIM *et al.*, 2011b).

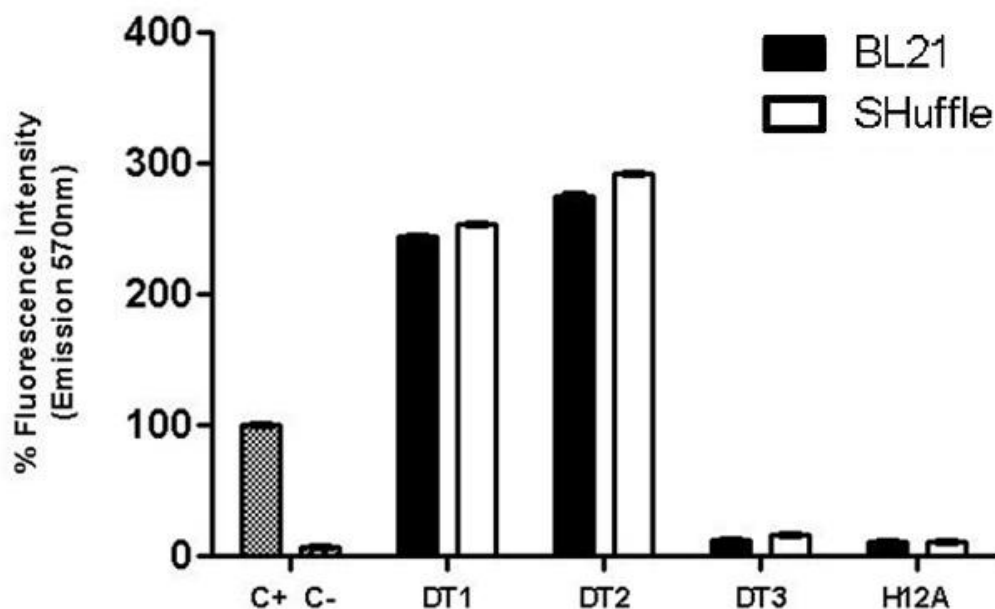


Gráfico 5 - ENSAIO PARA COMPARAÇÃO DA ATIVIDADE ESFINGOMIELINÁSICA DAS ISOFORMAS LiRecDT1, LiRecDT2, LiRecDT3 E LiRecDT1 H12A PRODUZIDAS NAS CEPAS *E. coli* BL21(DE3)pLysS e *E. coli* SHuffle T7 Express lysY. A atividade esfingomielinásica foi avaliada através do kit Amplex Red Assay à 37°C por 60 minutos, sendo o produto da reação determinada em 540nm, com detecção de emissão à 590nm. A enzima esfingomielinase do próprio kit foi utilizada como controle positivo, e o controle negativo foi apenas o reagente Amplex Red mais o tampão sem a proteína recombinante. A concentração utilizada para todas as toxinas foi de 10µg. O experimento foi realizado em triplicata e os valores dados pela média ± SEM expressos em porcentagem. A significância é definida como ***p ≤ 0,001. As diferenças entre os níveis de fluorescência gerados por cada proteína produzida em ambas cepas não foram estatisticamente significantes.

Os resultados indicam que a produção das isoformas LiRecDT1, LiRecDT2, LiRecDT3 E LiRecDT1 H12A na cepa *E. coli* SHuffle T7 Express lysY não foi capaz de gerar proteínas recombinantes significativamente mais ativas em relação as mesmas proteínas produzidas na cepa *E. coli* BL21(DE3)pLysS (Gráfico 5).

6.10 Atividade hemolítica direta das toxinas recombinantes LiRecDT1, LiRecDT2, LiRecDT3 e LiRecDT1 H12A produzidas na *E. coli* BL21(DE3)pLysS e *E. coli* SHuffle T7 Express lysY.

Para avaliar se a capacidade hemolítica das toxinas recombinantes LiRecDT1, LiRecDT2, LiRecDT3 e LiRecDT1 H12A de *L. intermedia* sobre

eritrócitos humanos sofreria alguma alteração se as mesmas toxinas fossem produzidas na cepa *E. coli* SHuffle T7 Express lysY além da cepa *E. coli* BL21(DE3)pLysS, foram realizados experimentos que avaliaram sua capacidade em promover diretamente hemólise de eritrócitos humanos “*in vitro*”. Este ensaio foi baseado no artigo de CHAVES-MOREIRA e colaboradores 2009 (Fig. 19).

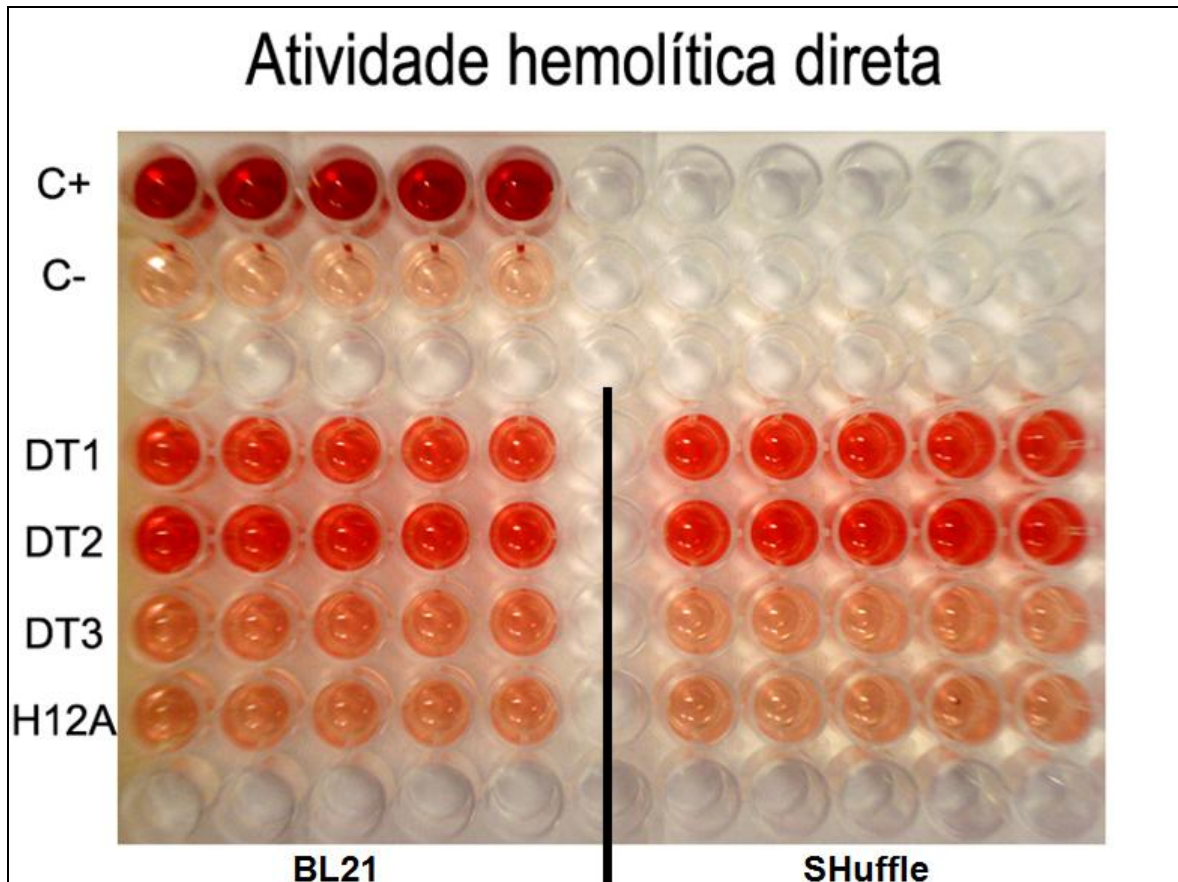


Figura 19 - COMPARAÇÃO DA HEMÓLISE DIRETA DAS TOXINAS RECOMBINANTES LiRecDT1 (DT1), LiRecDT2 (DT2), LiRecDT3 (DT3) E LiRecDT1H12A (H12A) DE AMBAS CEPAS BACTERIANAS *E. coli* BL21(DE3)pLysS E *E. coli* SHuffle T7 Express lysY. O efeito hemolítico das toxinas foi determinado após 24 h na concentração única de 25 µg/mL.

O resultado deste experimento (Gráfico 6) mostra intensidades de hemólise muito semelhantes para as comparações de cada toxina recombinante entre si, não apresentando portanto diferenças de atividade hemolítica direta estatisticamente significativas nos ensaios realizados em pentaplicata.

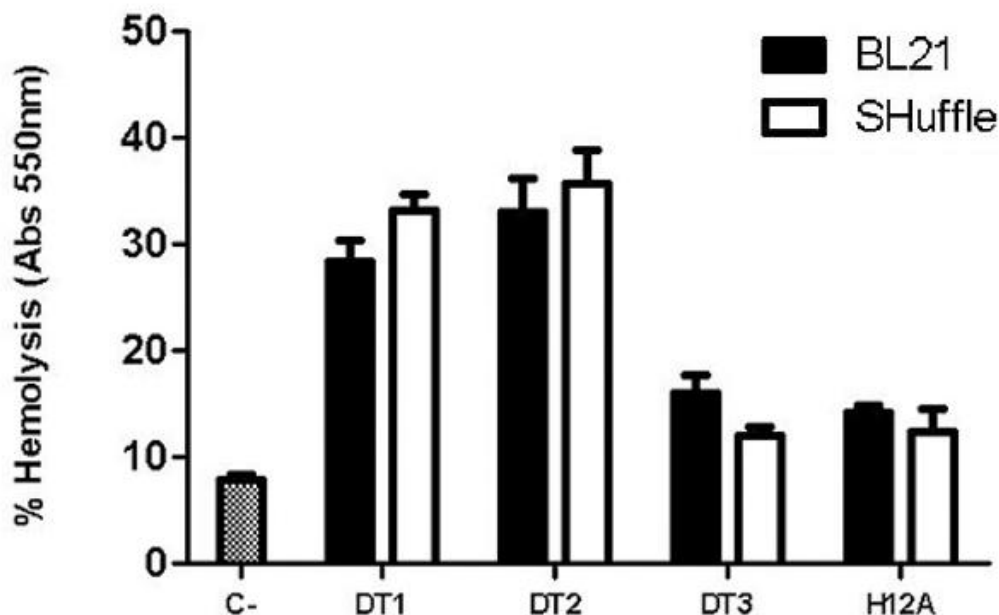


Gráfico 6 - COMPARAÇÃO DA HEMÓLISE DIRETA DAS TOXINAS RECOMBINANTES LiRecDT1 (DT1), LiRecDT2 (DT2), LiRecDT3 (DT3) E LiRecDT1H12A (H12A) DE AMBAS CEPAS BACTERIANAS *E. coli* BL21(DE3)pLysS E *E. coli* SHuffle T7 Express lysY. O efeito hemolítico das toxinas foi determinado após 24 h na concentração única de 25 µg/mL. O experimento foi realizado em pentaplicata. A significância é definida $***P \leq 0,001$. As diferenças entre os níveis de hemólise gerados por cada proteína produzida em ambas cepas não foram estatisticamente significantes.

Este resultado mostra mais uma vez que a produção das toxinas recombinantes LiRecDT1, LiRecDT2, LiRecDT3 e LiRecDT1 H12A na cepa *E. coli* SHuffle T7 Express lysY não alterou o nível de atividade destas toxinas quando comparadas com as mesmas produzidas na cepa *E. coli* BL21(DE3)pLysS.

6.11 Análise estrutural das proteínas com ferramentas de Bioinformática

Aprendemos a trabalhar com os programas de bioinformática utilizados para as análises estruturais durante a “EMBO Conference Series: Visualizing Biological Data (VIZBI 2012)” que ocorreu em Heidelberg – Alemanha, devido a uma bolsa concedida após seleção pela organização do Laboratório de Biologia Molecular Europeu (EMBL).

Nas quatro estruturas é possível visualizar a presença das duas pontes dissulfeto que caracterizam as fosfolipases da *Loxosceles intermedia* como sendo pertencentes à classe II (de GIUSEPPE *et al.*, 2011).

Na estrutura A que pertence a proteína mutada LiRecDT1H12A, está destacado em azul claro o aminoácido Alanina, que substituiu a Histina da posição 12 para deletar a atividade catalítica presente na isoforma LiRecDT1 (KUSMA *et al.*, 2008; CHAIM *et al.*, 2011b). As estruturas B e C são muito parecidas, pois as duas toxinas (LiRecDT1 e LiRecDT2) possuem 90,58% de identidade de acordo com o software SWISS-MODEL. Um dado bem interessante foi a predição estrutural da LiRecDT3, por que de acordo com o resultado não foi possível demonstrar a presença do íon Mg^{2+} no sítio catalítico da toxina (Fig. 20).

A abordagem conservadora usada pelo método do SWISS-MODEL define que um ligante é incluído na modelagem quando critérios rigorosos são atingidos, entre eles: (1) os resíduos de ligação do modelo tem de ser perfeitamente conservados, (2) o RMSD entre o molde e os resíduos de ligação do modelo é menor que 2 Angstroms (ZHANG e SKOLNICK, 2005).

No caso da predição da LiRecDT3 o critério número 1 foi positivo porém o critério número 2 não.

O desvio da raiz quadrada média (RMSD - Root-mean-square deviation) é a medida da distância média entre os átomos (geralmente os átomos da estrutura principal) das proteínas sobrepostas. Um valor em RMSD é expresso em unidades de comprimento, onde a unidade mais comumente usada na biologia estrutural é o Angstrom (Å) que é igual a 10^{-10} m. Podemos verificar que realmente existe uma diferença estrutural entre LiRecDT3 e LiRecDT1 quando analisamos o sítio de ligação do magnésio mais aproximadamente (Fig. 21).

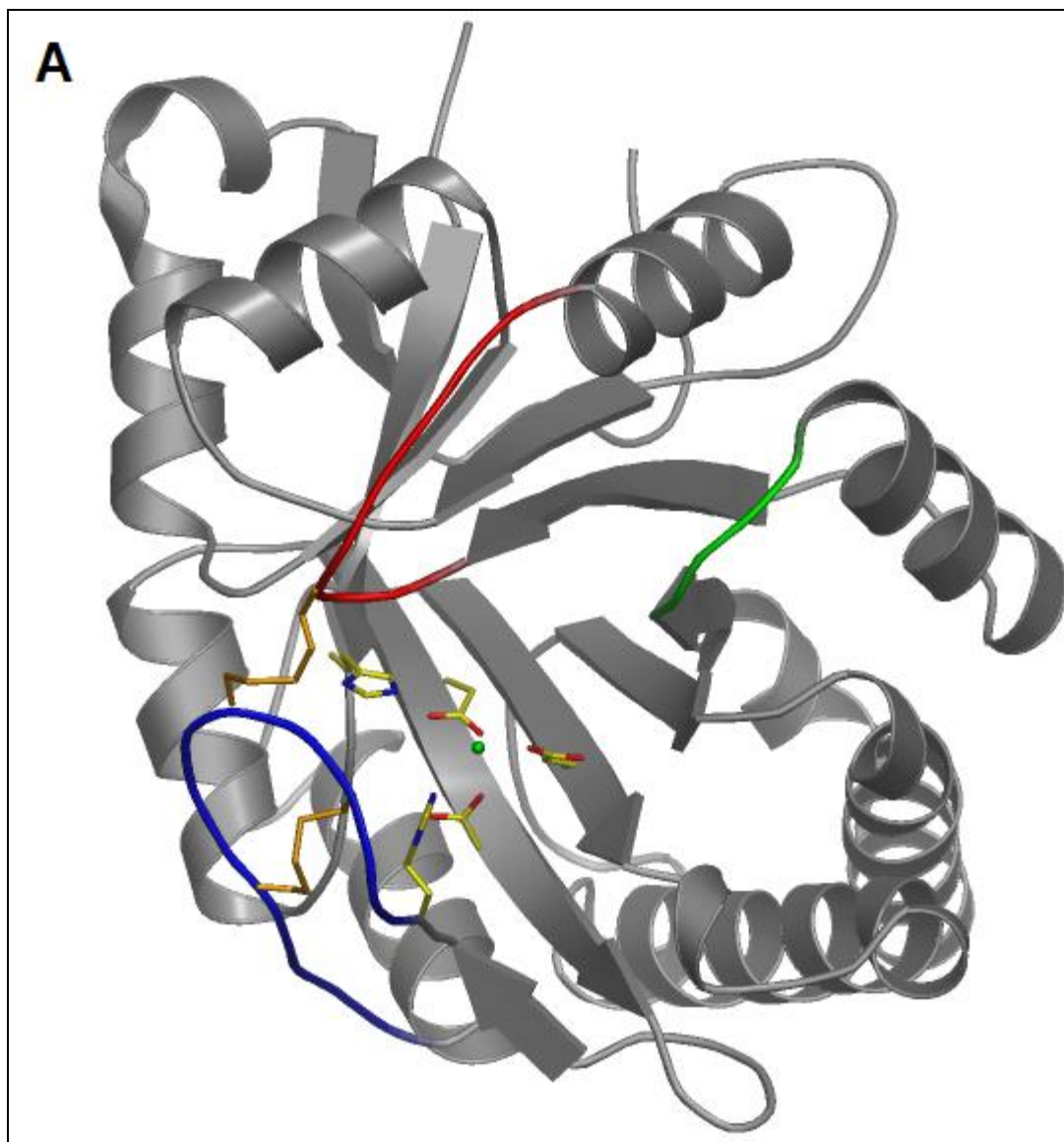
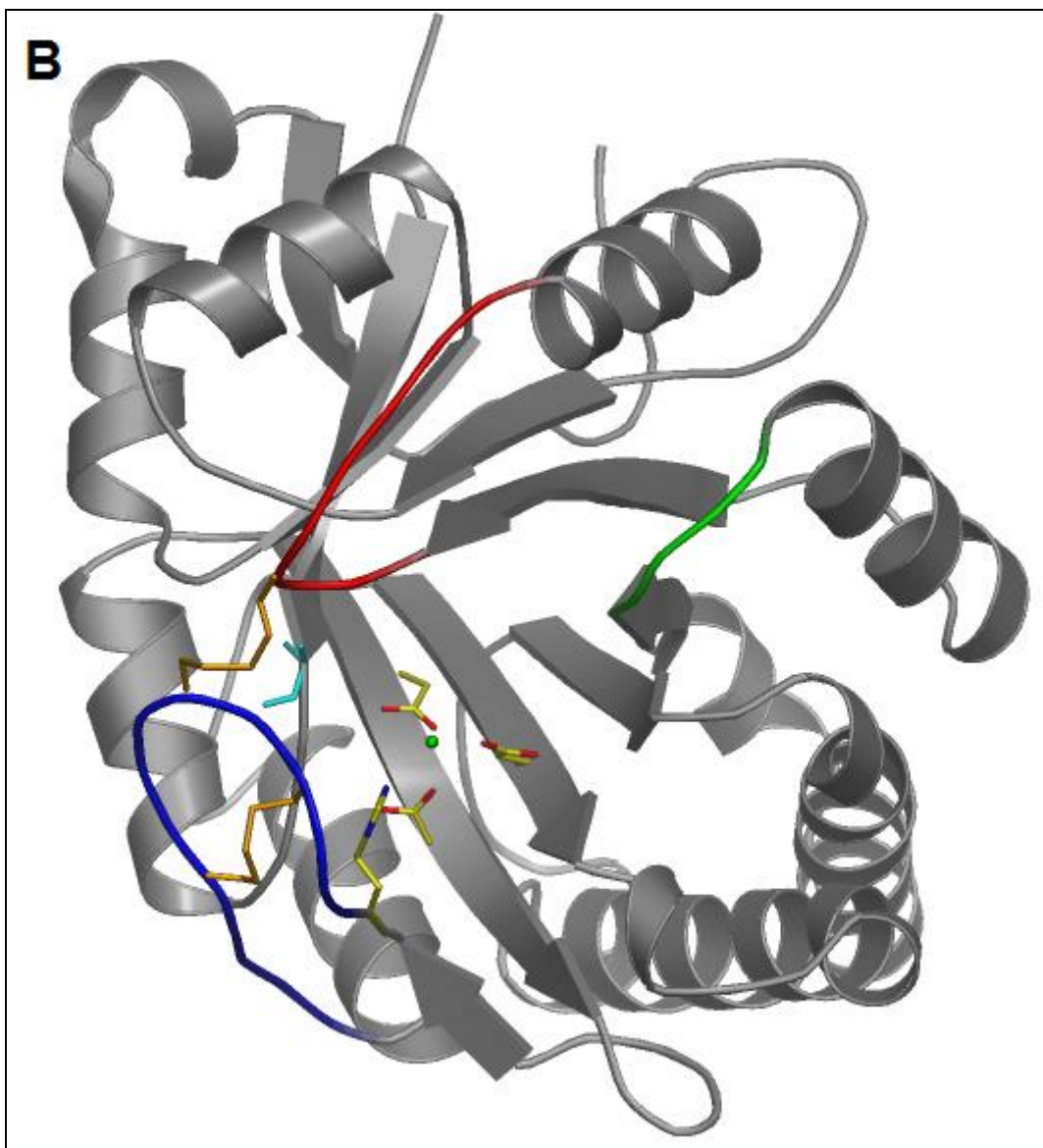
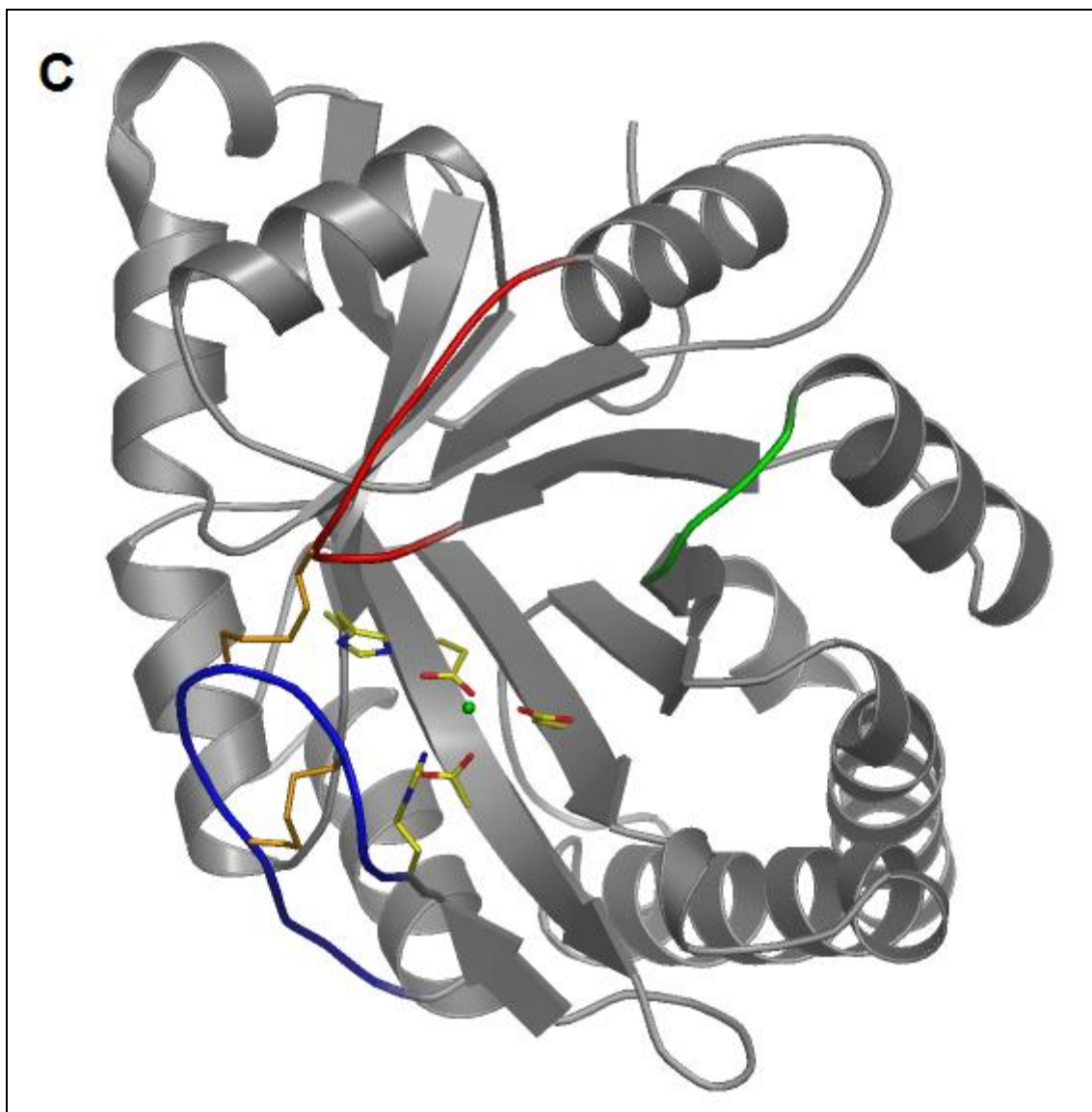


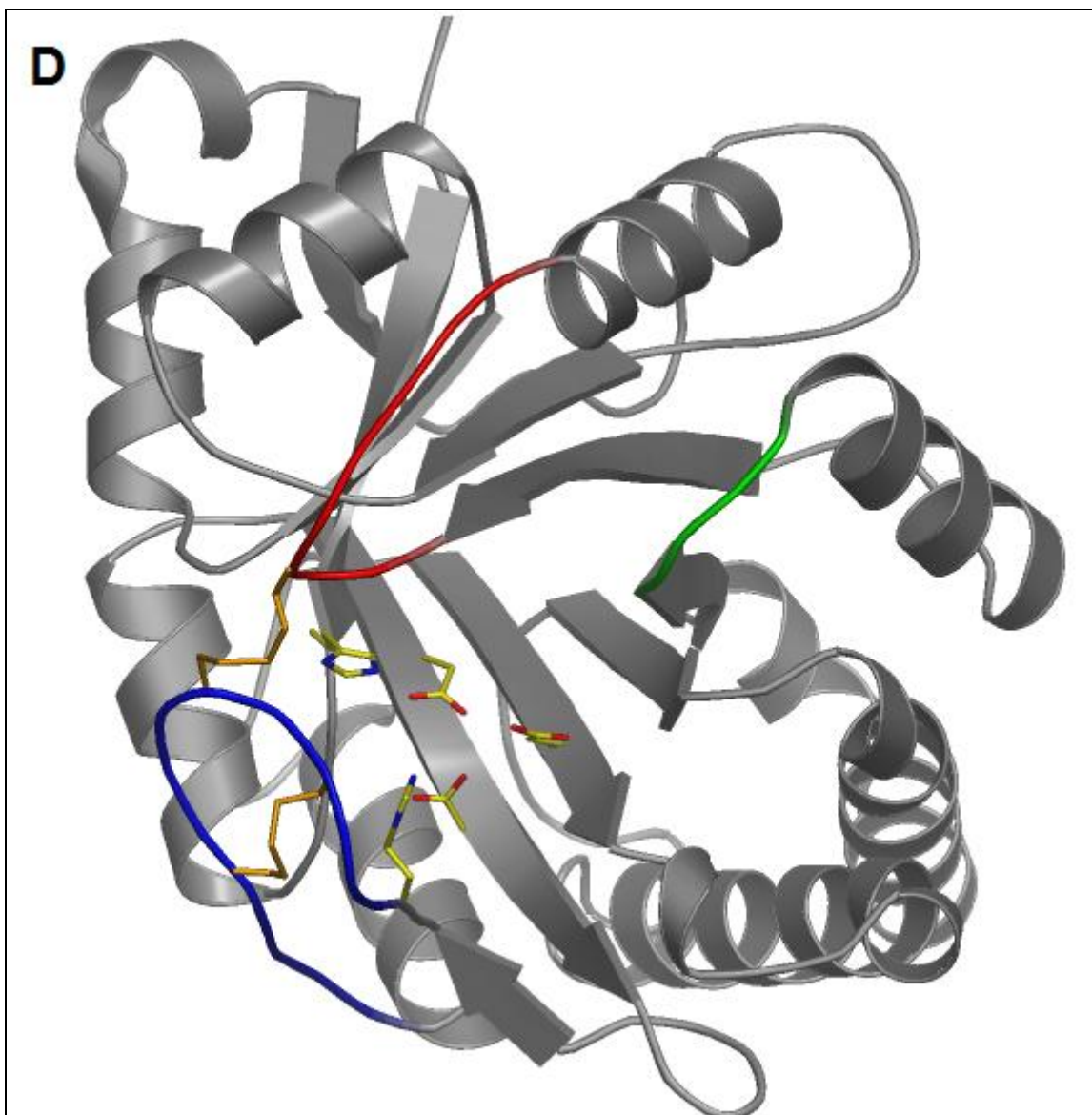
Figura 20 - ANÁLISES ESTRUTURAIS DAS TOXINAS LiRecDT1H12A, LiRecDT1, LiRecDT2 E LiRecDT3. Em azul claro está o aminoácido que foi mutado para uma Alanina para que a proteína perdesse a sua atividade. (B) LiRecDT1H12A. Em todas as figuras os loops catalítico, flexível e variável estão representados pelas cores azul, vermelho e verde respectivamente. Em vermelho e amarelo estão os aminoácidos que participam na coordenação do íon Mg^{2+} . Em azul e amarelo estão as duas Histidinas envolvidas na atividade catalítica da toxina. Em laranja estão as duas pontes dissulfeto (A) LiRecDT1. (C) LiRecDT2. (D) LiRecDT3. O íon Mg^{2+} está destacado por uma esfera verde, não presente na LiRecDT3 pela predição.



Continuação da Figura 20 - ANÁLISES ESTRUTURAIS DAS TOXINAS LiRecDT1H12A, LiRecDT1, LiRecDT2 E LiRecDT3. Em azul claro está o aminoácido que foi mutado para uma Alanina para que a proteína perdesse a sua atividade. (B) LiRecDT1H12A. Em todas as figuras os loops catalítico, flexível e variável estão representados pelas cores azul, vermelho e verde respectivamente. Em vermelho e amarelo estão os aminoácidos que participam na coordenação do íon Mg^{2+} . Em azul e amarelo estão as duas Histidinas envolvidas na atividade catalítica da toxina. Em laranja estão as duas pontes dissulfeto (A) LiRecDT1. (C) LiRecDT2. (D) LiRecDT3. O íon Mg^{2+} está destacado por uma esfera verde, não presente na LiRecDT3 pela predição.



Continuação da Figura 20 - ANÁLISES ESTRUTURAIS DAS TOXINAS LiRecDT1H12A, LiRecDT1, LiRecDT2 E LiRecDT3. Em azul claro está o aminoácido que foi mutado para uma Alanina para que a proteína perdesse a sua atividade. (B) LiRecDT1H12A. Em todas as figuras os loops catalítico, flexível e variável estão representados pelas cores azul, vermelho e verde respectivamente. Em vermelho e amarelo estão os aminoácidos que participam na coordenação do íon Mg^{2+} . Em azul e amarelo estão as duas Histidinas envolvidas na atividade catalítica da toxina. Em laranja estão as duas pontes dissulfeto (A) LiRecDT1. (C) LiRecDT2. (D) LiRecDT3. O íon Mg^{2+} está destacado por uma esfera verde, não presente na LiRecDT3 pela predição.



Continuação da Figura 20 - ANÁLISES ESTRUTURAIS DAS TOXINAS LiRecDT1H12A, LiRecDT1, LiRecDT2 E LiRecDT3. Em azul claro está o aminoácido que foi mutado para uma Alanina para que a proteína perdesse a sua atividade. (B) LiRecDT1H12A. Em todas as figuras os loops catalítico, flexível e variável estão representados pelas cores azul, vermelho e verde respectivamente. Em vermelho e amarelo estão os aminoácidos que participam na coordenação do íon Mg^{2+} . Em azul e amarelo estão as duas Histidinas envolvidas na atividade catalítica da toxina. Em laranja estão as duas pontes dissulfeto (A) LiRecDT1. (C) LiRecDT2. (D) LiRecDT3. O íon Mg^{2+} está destacado por uma esfera verde, não presente na LiRecDT3 pela predição.

Fizemos uma análise comparativa entre os sítios catalíticos das isoforma LiRecDT1 e LiRecDT3 para tentar observar se existia alguma mudança significativa na estrutura que forma o sítio catalítico da toxina LiRecDT3 e assim inferir o possível motivo para a falta do íon Mg^{2+} quando feita a predição pelos softwares utilizados (Fig. 21).

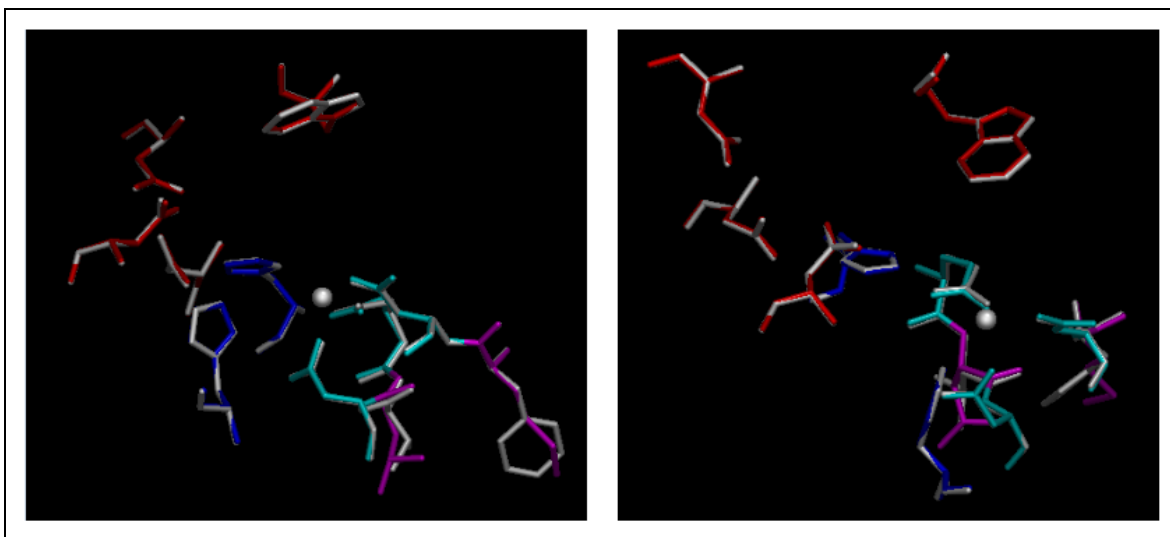


Figura 21 - COMPARAÇÃO E ANÁLISE ESTRUTURAL ENTRE OS AMINOÁCIDOS DO SÍTIO CATALÍTICO DAS TOXINAS LiRecDT1 E LiRecDT3. Representados em prata estão os aminoácidos pertencentes à toxina LiRecDT1, incluindo a esfera correspondente ao íon Mg^{2+} . Em colorido estão sobrepostos os aminoácidos pertencentes a isoforma LiRecDT3. Em azul claro estão os aminoácidos E32, D34 e D91 que coordenam o íon Mg^{2+} . Em azul são representadas as Histidinas 12 e 47. Em vermelho são representados os aminoácidos D52, W230, D233 e N252. Em rosa estão representados os aminoácidos que fazem fronteira com os aminoácidos responsáveis pela coordenação do íon Mg^{2+} , estes aminoácidos tiveram substituições não conservativas. Os dois lados da figura representam as mesmas estruturas em diferentes ângulos de visão.

Com base na análise mais aprofundada apresentada na figura 21, foi possível investigar e observar que os aminoácidos que fazem fronteira com os que coordenam o íon Mg^{2+} possuem substituições não conservativas em relação aos aminoácidos da proteína LiRecDT1, o que poderia responder o resultado da predição estrutural indicar uma diferença maior que 2 Angstroms na disposição dos aminoácidos que coordenam o íon Mg^{2+} na LiRecDT3.

Outra análise realizada com as ferramentas de modelagem estrutural foi em relação às pontes dissulfeto que as fosfolipases-D de *Loxosceles intermedia* possuem. Como as duas pontes dissulfeto estão presentes em todas as isoformas de fosfolipases-D analisadas até o momento, então partimos para uma predição do que ocorreria se duas das quatro cisteínas fossem mutadas, de forma que não houvesse mais conexão entre os loops catalítico e flexível (Fig. 22).

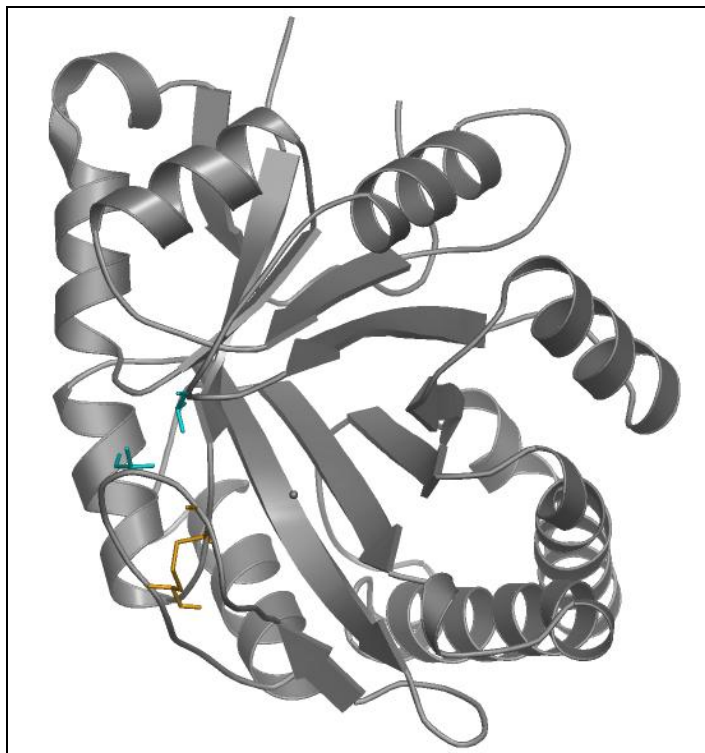


Figura 22 - PREDIÇÃO DA MUTAÇÃO NAS CISTEÍNAS C53 E C201 DA TOXINA LiRecDT1. Em azul claro estão as cisteínas mutadas na sequência da LiRecDT1 para Alaninas. Em laranja esta a ponte dissulfeto das cisteínas não alteradas. O íon Mg^{2+} está destacado por uma esfera prata somente para representação.

Com a substituição das cisteínas nas posições C53 e C201 por alaninas esperamos que ocorra conforme o que está predito na estrutura da figura 22, ou seja, esperamos que não haja mais a ligação entre o loop catalítico e flexível. O intuito dessas mutações seria tornar a fosfolipase-D até então pertencente à classe II, uma fosfolipases-D da classe I, que são as que possuem somente uma ponte dissulfeto presente no loop catalítico, assim como é a fosfolipase-D (SMase I) de *Loxosceles laeta* mencionada durante a introdução na figura 5, e depois submeter essa toxina mutada a ensaios bioquímicos e biológicos para avaliar as modificações na atividade enzimática que serão produzidas.

7. DISCUSSÃO

Baseado nas características da cepa *E. coli* SHuffle T7 Express lysY, optamos por escolhê-la para analisarmos a influência que ela traria na expressão das fosfolipases-D clonadas e já expressadas pelo grupo, quanto à atividade biológica e bioquímica, pois até a presente data todas as fosfolipases-D do nosso grupo haviam sido expressas em cepa *E. coli* BL21(DE3)pLysS (CHAIM *et al.*, 2006; da SILVEIRA *et al.*, 2006; as SILVEIRA *et al.*, 2007; KUSMA *et al.*, 2008; CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2009; PALUDO *et al.*, 2009; CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2011; CHAIM *et al.*, 2011), com exceção do trabalho mais recente onde a sétima isoforma denominada LiRecDT7 foi clonada e expressa na cepa *E. coli* SHuffle T7 Express lysY, porém essa isoforma não passou por testes comparativos com sua produção na cepa *E. coli* BL21(DE3)pLysS, pois, sua produção e purificação nesta cepa não foi bem sucedida devido a problemas de baixíssimo rendimento e alta instabilidade apresentada quando purificada (VUITIKA *et al.*, 2012).

A cepa *E. coli* BL21(DE3)pLysS possui como características a deficiência em duas proteases (*lon* e *ompT*) e a presença de um plasmídeo que codifica para a lisozima T7, que é um inibidor natural da polimerase T7 RNA, que serve para repressão basal da expressão de genes alvo, sobre o controle do promotor T7. Porém nenhuma das características da *E. coli* BL21(DE3)pLysS favorece a formação de pontes dissulfeto e o dobramento correto, portanto ocorrendo assim o dobramento espontâneo das proteínas heterólogas expressas nesta cepa, o que não garante que a formação correta da estrutura está sendo fiel para cada proteína produzida pela bactéria, o que pode levar à formação de corpos de inclusão ou até à perda ou redução na atividade conforme já mencionado anteriormente.

No trabalho de da SILVEIRA e colaboradores (2006) após a análise de identidade entre as três isoformas clonadas até a presente data, foi observado que enquanto a isoforma LiRecDT2 apresentava uma alta identidade com a isoforma LiRecDT1 que ficava em torno dos 90%, a LiRecDT3 por outro lado mostrou apenas 45% de identidade em relação as duas toxinas recombinantes anteriores. Interessantemente, da SILVEIRA e colaboradores (2006) ao confrontar a isoforma

LiRecDT3 com as fosfolipases-D de outras espécies do gênero *Loxosceles* que também haviam sido clonadas, encontraram mais similaridade desta isoforma entre as toxinas dermonecroticas das *Loxosceles laeta* (AAM21156) (FERNANDES-PEDROSA *et al.*, 2002) e *Loxosceles boneti* (AAT66074) (RAMOS-CERRILLO *et al.*, 2004) do que com as isoformas da sua própria espécie.

Dentre todas as isoformas produzidas pelo grupo a LiRecDT1 é a que apresentou maior rendimento final após a etapa de purificação, sendo obtido 3 mg/L para LiRecDT2 e 2,7 mg/L para LiRecDT3 (da SILVEIRA *et al.*, 2006), 2,8 mg/L para LiRecDT4 e 2,6 mg/L para LiReCDT5 (da SILVEIRA *et al.*, 2007) e 2,9 mg/L para LiRecDT6 (APPEL *et al.*, 2008).

Comparando o resultado das expressões dos testes de miniexpressão realizados com as proteínas LiRecDT1, LiRecDT2, LiRecDT3 e LiRecDT1H12A podemos relatar as seguintes informações: a partir do tempo de 1 hora (1h) a banda correspondente as toxinas recombinantes já apresentava maior visibilidade no gel da *E. coli* SHuffle T7 Express lysY quando comparada ao da *E. coli* BL21(DE3)pLysS (Figuras 10 e 11), revelando que a repressão basal estava sendo menos efetiva na nova cepa. No entanto, na coluna do sobrenadante (S) de ambas cepas já não se observou um aparente aumento na quantidade de proteína solúvel presente, visto que o esperado se comparado com o tempo de expressão de 4 horas (4h) era de uma quantidade acima da resultante no sobrenadante. Isso nos leva a crer que parte da expressão ficou em corpos de inclusão, portanto não estando solúvel após o processo de lise bacteriana.

Corpos de inclusão são o conjunto de agregados de proteínas que podem ser formados durante a expressão decorrente de situações como: altíssima taxa de expressão da proteína recombinante dentro do citoplasma da célula, desfavorecendo o ambiente intracelular e prejudicando dobramento correto das proteínas (SORENSEN e MORTENSEN, 2005), composição do meio de cultura, temperatura de crescimento e a disponibilidade de chaperonas (VENTURA e VILLAVARDE, 2006). Entretanto, a quantidade de proteína solúvel para a purificação não foi prejudicada a ponto de ser necessário fazer modificações nos padrões de expressão.

Quando fazemos uma comparação entre os géis da *E. coli* SHuffle T7 Express lysY das isoformas LiRecDT2 e LiRecDT3, com os produzidos pela *E. coli* BL21(DE3)pLysS no trabalho de da SILVEIRA e colaboradores (2006), podemos notar que existe uma diferença na banda da coluna dos sobrenadantes.

Podemos observar na figura da purificação que a banda correspondente ao sobrenadante da isoforma LiRecDT2 é mais expressiva que a da isoforma LiRecDT3, o que no caso da expressão com a cepa *E. coli* SHuffle T7 Express lysY mostrou um resultado aparentemente diferente (Figura 10), onde a banda do sobrenadante da isoforma LiRecDT3 mostra-se mais aparente se igualando em intensidade com o da LiRecDT2. Devido a este resultado era esperado que a purificação da toxina LiRecDT3 tivesse algum ganho de rendimento em relação a isoforma LiRecDT2, diferente dos rendimentos já registrados para as duas isoformas produzidas anteriormente na cepa *E. coli* BL21(DE3)pLysS.

Como já era esperado, os resultados obtidos para os testes de miniexpressão foram reproduzidos nas expressões em larga escala, resultando em quantidades de proteínas recombinantes solúveis após o processo de lise mecânica pela Prensa de French, que foram passíveis de purificação por cromatografia de afinidade nas suas condições nativas.

Um fator que deve ser registrado foi à diferença de tempo de crescimento para atingir a D.O de indução de ambas as cepas durante as expressões em larga escala. Enquanto a *E. coli* BL21(DE3)pLysS levou em média 3 horas e meia para atingir uma D.O entre 0.4 e 0.5, a cepa *E. coli* SHuffle T7 Express lysY levou em média mais de 6 horas para atingir a mesma D.O. O mesmo também havia sido percebido durante os testes de miniexpressão, porém com menores diferenças de tempo.

De acordo com uma informação da empresa New England Biolabs (http://66.155.211.155/nebecomm/products_intl/faqproductC3029.asp) foi observado que a cepa *E. coli* SHuffle T7 Express lysY possui uma fase lag mais longa do que sua variante selvagem.

Na fase lag inicialmente o número de células não aumenta, pois, ao encontrar-se em um novo ambiente as células precisam de um tempo para se

ajustar. Elas ainda podem precisar sintetizar novas enzimas, reparar qualquer dano celular e iniciar a replicação plasmidial ou cromossomal.

A produção de grandes quantidades de proteína, na base de miligramas para estudos estruturais e funcionais, requer uma eficiente purificação (DONNELLY *et al.*, 2006). Normalmente, a purificação de proteínas é facilitada por adição de caudas de fusão, o que permite a purificação por cromatografia de afinidade a íons metálicos, e como já dito anteriormente as toxinas recombinantes produzidas neste trabalho (LiRecDT1, LiRecDT2, LiRecDT3 e LiRecDT1H12A) foram clonadas em pET-14b (Novagen), que é um vetor que insere uma cauda de 6 histidinas na porção N-terminal das proteínas que permite a purificação destas em uma única etapa de cromatografia de afinidade ao metal níquel (Ni^{+2}).

Após várias tentativas mal sucedidas de purificação das proteínas produzidas na cepa *E. coli* SHuffle T7 Express lysY, optamos por alterar um dos passos de purificação, aumentando a estringência da etapa de lavagem na coluna para conseguirmos obter proteínas o mais puras possível e ao mesmo tempo diminuimos a quantidade de resina utilizada para auxiliar ainda mais na prevenção da ligação de contaminantes.

Podemos notar na tabela de rendimentos (Tabela 3) que as proteínas recombinantes quando purificadas a partir da produção na cepa *E. coli* SHuffle T7 Express lysY apresentaram rendimento praticamente 50% mais baixo quando comparadas com o rendimento das produzidas pela cepa *E. coli* BL21(DE3)pLysS.

Isso pode ser atribuído a fatores como o crescimento mais lento da cepa *E. coli* SHuffle T7 Express lysY que foi observado, onde no tempo final da expressão apresentou uma D.O de crescimento mais baixa, sendo em média entre 0.9 e 1.0, enquanto que a D.O final após expressão na cepa *E. coli* BL21(DE3)pLysS ficou em média 1.2, e também devido a diminuição da quantidade de resina na etapa de purificação que pode ter contribuído para ligação da menor quantidade de proteína recombinante produzida a partir da *E. coli* SHuffle T7 Express lysY.

Após a purificação das 8 proteínas recombinantes o primeiro ensaio realizado acabou gerando uma nova indagação, pois no gel não redutor foi possível constatar a presença de agregados proteicos para todas as isoformas de

ambas as cepas, agregados estes que foram confirmados pelo ensaio de *western blot* realizado na sequência que teve o intuito de verificar se os agregados vistos no gel não redutor do ensaio anterior realmente pertenciam as toxinas recombinantes produzidas, e não a contaminantes presentes nos purificados obtidos, embora o gel redutor já nos tivesse indicado que os agregados de cada isoforma pertenciam a uma única proteína.

A nova dúvida gerada foi em relação a qual das formas apresentadas no gel não redutor possui mais atividade.

O papel da dimerização ainda não é bem elucidado devido à escassez de dados biofísicos sobre esse assunto, sendo as enzimas a classe de proteínas mais bem caracterizadas nesse sentido (MARIANAYAGAM *et al.*, 2004).

A hemoglobina com certeza é o caso mais conhecido de auto-associação de proteínas.

A dimerização ou oligomerização de proteínas é um fenômeno comum e muitas vezes promove maior estabilidade e aumento de atividade enzimática pela concentração do sítio ativo das proteínas, porém, este mesmo processo pode levar a sua inativação (MARIANAYAGAM *et al.*, 2004).

Segundo a base de dados sobre enzimas BRENDA, a maioria das enzimas se apresenta na forma de homo-oligômeros e o mesmo é observado levando em consideração somente às enzimas humanas. Já foi reportado que esses processos de dimerização e oligomerização são o fator chave para mediação e regulação da expressão de genes, atividade de enzimas, canais de íons, receptores e processos de adesão celular (MARIANAYAGAM *et al.*, 2004; HASHIMOTO *et al.*, 2011). E no nosso caso trouxemos a tona à possibilidade de que esses agregados possam ser o fator chave para mediação e regulação da atividade das fosfolipases-D recombinantes.

Dizemos isso para os casos das fosfolipases-D recombinantes, pois, ainda não verificamos a presença destes dímeros de fosfolipases-D no veneno bruto das aranhas do gênero *Loxosceles*, portanto não podemos afirmar que o mesmo ocorre para as proteínas nativas do veneno.

O próximo passo foi à realização do imunoenensaio de ELISA onde não verificamos diferenças significativas nos picos de absorbância.

A investigação de epítomos presentes na estrutura de uma proteína é uma excelente estratégia para a produção de soros e vacinas. Possibilitando desta maneira o desenvolvimento de imunobiológicos contendo somente o determinante antigênico com o potencial de gerar resposta imune, excluindo-se a porção da proteína responsável por efeitos tóxicos (SENFF-RIBEIRO *et al.*, 2008).

Contudo, o uso de anticorpos produzidos para reconhecer toxinas específicas e ou venenos brutos totais não se limita a identificar e desenvolver antissoros ideais visando uma eficiente neutralização dos efeitos do envenenamento. Muitos estudos buscam detectar os epítomos responsáveis pela ligação de anticorpos, ou ainda, aprofundar o conhecimento sobre as bases moleculares que permitem a ligação antígeno-anticorpo. Outros, ainda buscam o desenvolvimento de imunodiagnósticos fáceis, rápidos e específicos, com possibilidade comercial. Portanto, anticorpos policlonais e/ou monoclonais são bioferramentas científicas que permitem diferentes aplicações nas áreas científica e biomédica. Atualmente, os anticorpos são amplamente utilizados em diferentes áreas da ciência com os mais diversos objetivos de investigação (BUCH *et al.*, 2012).

Os determinantes antigênicos ou epítomos podem ser: conformacionais (descontínuos) e ou lineares (contínuos). Os epítomos conformacionais são estruturas reconhecidas compostas por segmentos proteicos descontínuos na sequência de aminoácidos do antígeno, mas contínuos na estrutura tridimensional. O epítomos lineares são compostos por fragmentos únicos da cadeia polipeptídica, podem ser acessíveis aos anticorpos em uma proteína nativa dobrada, mas frequentemente, os determinantes lineares podem ser inacessíveis na conformação nativa e surgir apenas quando a proteína é desnaturada (ABBAS, LICHTMAN e PILLAI, 2012).

Anticorpos ou imunoglobulinas são glicoproteínas produzidas por um organismo em resposta à presença de moléculas estranhas no corpo. São responsáveis pelo reconhecimento de antígenos, papel fundamental para o

adequado desenvolvimento da resposta imune de organismos vertebrados. Os anticorpos são sintetizados principalmente por células do plasma e diferenciados por células da linhagem de linfócitos B (ABBAS, LICHTMAN e PILLAI, 2012; JANEWAY *et al.*, 2007). A imunoglobulina G é a principal classe de molécula de anticorpo e é uma das mais abundantes no soro. As imunoglobulinas G são formadas por duas cadeias leves e duas cadeias pesadas, ligadas entre si por pontes dissulfeto. Cada cadeia pode ser dividida em regiões constantes e variáveis (LEHNINGER, NELSON e COX, 2011; ABBAS, LICHTMAN e PILLAI, 2012). São moléculas grandes, com peso molecular de aproximadamente 150 kDa (cadeia pesada aproximadamente 50kDa e cadeia leve 25 kDa) (JANEWAY *et al.*, 2007) A ligação antígeno anticorpo apesar de não covalente é forte e, em geral, bastante específica. Esta forte interação é gerada por pontes de hidrogênio, ligações eletrostáticas, hidrofóbicas e forças de Van der Waals (ROITT *et al.*, 2006).

Na literatura podemos encontrar diversos estudos visando à produção de anticorpos para a neutralização do efeito tóxico dos venenos das aranhas do gênero *Loxosceles*, entre estes estudos podemos citar o mais antigo que é o de REES e colaboradores (1984) onde já se falava sobre um anticorpo que inibia as atividades dermonecrótica e esfingomielinásica do veneno da *Loxosceles reclusa*, GUILHERME e colaboradores (2001) e ALVARENGA colaboradores (2003) produziram anticorpos monoclonais e avaliaram a capacidade de neutralização de cada um frente ao veneno da própria espécie e de diferentes espécies do gênero *loxosceles*. Em 2008 de ALMEIDA e colaboradores usaram uma fosfolipase-D recombinante para produzir um soro antiloxoscélico com o intuito de avaliar sua eficiência em comparação com o soro antiaracnídico já produzido e utilizado no Brasil.

FELICORI e colaboradores (2006 e 2009) verificaram a capacidade de peptídeos sintéticos produzirem imunogenicidade quando aplicados isoladamente ou em combinação. OLVERA e colaboradores (2006) apontaram para a possibilidade da produção de soro antiloxoscélico polivalente a partir da combinação de diversas fosfolipases-D recombinantes de diferentes espécies de

Loxosceles. O estudo mais recente de MOURA e colaboradores (2011) mostrou que a produção de mimotopos também é alternativa que pode ser usada na imunização para a neutralização do veneno de aranhas do gênero *Loxosceles*.

Além do uso na produção de anticorpos também é de conhecimento que as fosfolipases-D possuem atividade sobre diferentes tipos de fosfolipídios. LEE e LYNCH (2005) já haviam demonstrado bioquimicamente que as toxinas dermonecróticas são capazes de hidrolisar lisoglicerofosfolipídios e esfingofosfolipídios gerando ácido lisofosfatídico (LPA) e ceramida-1-fosfato (C1P). Recentemente, CHAIM e colaboradores (2011b) demonstraram que a isoforma de fosfolipase-D recombinante de *L. intermedia* LiRecDT1 além de hidrolisar o fosfolipídio esfingomiélna com eficiência, também é capaz de hidrolisar os fosfolipídios fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, fosfatidilcolina assimétrico, fosfatidilserina, lisofosfatidilcolina. CHAVES-MOREIRA e colaboradores (2011) demonstraram que isoforma LiRecDT1 de *L. intermedia* além de hidrolisar os lipídeos sintéticos ela também foi capaz de hidrolisar os lipídeos obtidos diretamente da membrana plasmática de eritrócitos humanos, além disso foi novamente demonstrado os diferentes níveis de atividade esfingomiélnásica que cada uma das seis isoformas utilizadas possui, mais a proteína mutada LiRecDT1H12A.

CHAVES-MOREIRA e colaboradores 2009 comprovaram que a ação enzimática das fosfolipases-D de *Loxosceles intermedia* possui ação hemolítica direta sobre eritrócitos humanos e não humanos, sem a participação do sistema complemento. Também foi verificado que essa ação é tempo e concentração dependente e que ela corresponde aos níveis de atividade enzimática verificados no ensaio de atividade esfingomiélnásica, sendo a LiRecDT3 a menos hemolítica das proteínas avaliadas, depois da isoforma mutada LiRecDT1H12A.

Por este motivo esse ensaio celular foi o escolhido para avaliarmos as atividades de todas as toxinas recombinantes produzidas neste trabalho e confrontar os resultados obtidos, visto que os resultados assim como demonstrado por CHAVES-MOREIRA e colaboradores 2009 seriam correspondentes aos níveis de atividade de cada fosfolipase-D recombinante utilizada. Entretanto, nem o

ensaio de atividade esfingomielinásica ou de atividade hemolítica apresentaram mudanças estatisticamente significantes no nível de atividade catalítica das enzimas aqui comparadas.

Assim, todos os resultados anteriores indicam que apesar de a cepa *E. coli* SHuffle T7 Express lysY possuir um ambiente citosólico menos redutor e a presença de uma chaperona para auxiliar no dobramento correto das proteínas e a formação correta das pontes dissulfeto, as toxinas LiRecDT1, LiRecDT2, LiRecDT3 E LiRecDT1 H12A no processo final estão permanecendo com a mesma atividade.

Este resultado é importante porque podemos reforçar que as fosfolipases-D testadas neste trabalho que até então sempre haviam sido produzidas na cepa *E. coli* BL21(DE3)pLysS são capazes de adquirir espontaneamente uma conformação estrutural que lhes permite serem ativas, mesmo sem ter os mesmos refinamentos presentes na cepa *E. coli* SHuffle T7 Express lysY.

É importante ressaltarmos, no entanto, que este resultado não valida a cepa *E. coli* SHuffle T7 Express lysY como ineficiente para o uso de um modo geral, pois já foi mostrado que para outras proteínas com a presença de múltiplas pontes de sulfeto não consecutivas essa cepa foi capaz de auxiliar na formação das pontes, aumentar o rendimento da purificação e a atividade de proteínas que quando produzidas em outras cepas sem o mesmo refinamento apresentavam características rendimento inferiores, redução e até mesmo falta de atividade (LOBSTEIN *et al.*, 2012). Portanto, o resultado mostra que para as proteínas utilizadas, esta cepa embora com seus refinamentos, não modificou a atividade ou solubilidade das proteínas, pois estas aparentemente já o são capazes de adquiri-las de forma espontânea.

Somente estudos biofísicos como, por exemplo, a cristalografia ou dicroísmo circular poderiam nos dar respostas mais conclusivas sobre a estrutura dessas proteínas para efeito de comparação.

Como não foi possível verificar nenhuma modificação de atividade ou nos epítomos em todos os ensaios realizados, partimos para a predição das estruturas das toxinas recombinantes utilizadas neste trabalho com o intuito de tentar

entender principalmente o porquê da isoforma LiRecDT3 possuir uma atividade catalítica tão residual, mudando o foco de comparações entre mesmas proteínas produzidas em cepas diferentes para comparações estruturais entre as diferentes isoformas.

Essas predições foram interessantes por que a LiRecDT3 é uma toxina que apresentou atividade catalítica residual em todos os trabalhos realizados com esta toxina, bem abaixo da atividade das demais, chegando próximo da atividade quase nula da toxina mutada inativa LiRecDT1H21A conforme já relatado no início e novamente demonstrado nos ensaios comparativos realizados neste trabalho.

A predição apontou para a possibilidade do íon Mg^{2+} não estar presente no sítio catalítico da LiRecDT3 devido a uma diferença em distância de mais de 2 angstroms entre os aminoácidos que estabilizam esse metal nas outras isoformas. Se a predição estiver correta e o íon Mg^{2+} realmente não tiver estabilidade no sítio catalítico, isso ajudaria a explicar o motivo da sua baixa atividade catalítica.

Para confirmarmos esta hipótese dada pela predição a solução final para este questionamento seria a cristalização e solução da estrutura da toxina LiRecDT3 para que assim possamos ter certeza de quais modificações ocorreram na estrutura desta isoforma, e se realmente o íon Mg^{2+} não está presente estavelmente devido a mudanças estruturais dos aminoácidos que o coordenam nas outras fosfolipases-D de *Loxosceles intermedia*.

Para fazermos tais análises essa toxina já está sendo cristalizada em colaboração com o Centro Multiusuário de Inovação Biomolecular, do Departamento de Física da Universidade Estadual Paulista (UNESP) de São José do Rio Preto, onde muito provavelmente futuramente outras isoformas também serão cristalizadas e terão suas estruturas resolvidas. A cristalização é importante, pois ferramentas de predição como as utilizadas neste trabalho são úteis para a análise molecular das proteínas, porém toda ferramenta de predição não garante 100% de confiabilidade no resultado apontado.

Outros estudos que poderiam ser conduzidos para elucidação do papel de cada aminoácido na estrutura da proteína, seria a condução de mutações sítio dirigidas assim como a realizada no trabalho de KUSMA e colaboradores (2008),

fazendo mutações aleatórias nos aminoácidos envolvidos na coordenação do íon Mg^{2+} e nos demais aminoácidos que pertencem ao sítio catalítico das fosfolipases-D.

Por fim, consideramos que este trabalho teve grande relevância no sentido de mostrar que as fosfolipases-D recombinantes são capazes de adquirirem sua conformação correta espontaneamente. Alguns resultados também foram relevantes no sentido de que geraram novas hipóteses que virão a serem estudadas e que muito provavelmente nos levarão a melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na atividade das fosfolipases-D, bem como a atuação de cada aminoácido na estrutura e atividade destas enzimas.

8. CONCLUSÃO

As fosfolipases-D da espécie *Loxosceles intermedia* possuem a sua estrutura catalítica e pontes dissulfeto conservadas em todas as isoformas estudadas até a presente data. Mesmo possuindo estas características de conservação, estas toxinas possuem diferentes níveis de atividade catalítica e biológica, levando ao questionamento sobre quais fatores contribuem como isso.

O uso da cepa de expressão *E. coli* SHuffle T7 Express lysY, produziu resultados satisfatórios quanto a viabilidade do uso desta nova cepa como ferramenta para a expressão em larga escala, e para purificação das toxinas LiRecDT1, LiRecDT2, LiRecDT3 e LiRecDT1 H12A, porém, em comparação com a cepa *E. coli* BL21(DE3)pLysS ela possui a desvantagem de apresentar crescimento mais lento, levando ao rendimento final após a purificação aproximadamente 50% mais baixo, fator este somado as modificações nos protocolos que foram necessárias para se obter as toxinas puras a partir desta nova cepa.

Todos os ensaios de cunho bioquímico e biológico realizados demonstraram que a produção das fosfolipases-D recombinantes na cepa *E. coli* SHuffle T7 Express lysY não apresentou modificação significativa nos níveis de atividade enzimática e tampouco apresentou modificação aparente na estrutura das

enzimas, sendo então a cepa *E. coli* BL21(DE3)pLysS ainda a melhor escolha para a produção das fosfolipases-D de *Loxosceles intermedia*, por este e pelos motivos anteriormente expostos.

A confirmação da presença de auto-associação das fosfolipases-D acarretando na formação de dímeros, trimeros e oligômeros, levou a indagação sobre qual das formas apresentadas possui maior atividade ou se a mesma permanece inalterada independentemente do nível de associação entre elas.

Além disso, o uso de ferramentas de bioinformática para análise molecular das toxinas foi produtivo, pois gerou novas discussões sobre as possíveis modificações nas estruturas das fosfolipases-D que precisam ser analisadas para um melhor entendimento das suas atividades serem diferenciadas dentro de um mesmo grupo de isoformas, principalmente no caso da toxina LiRecDT3 onde esperamos ter respostas mais concretas após a cristalização e solução estrutural desta toxina que já está em andamento.

Contudo, apesar de as fosfolipases-D serem as toxinas mais bem estudadas e caracterizadas dentro da complexa mistura de moléculas do veneno das aranhas do gênero *Loxosceles*, muito ainda precisa ser estudado sobre suas estruturas e a participação que cada aminoácido tem, seja na sua atividade biológica ou catalítica.

Esperamos que com os resultados deste e dos próximos trabalhos, possamos produzir isoformas cada vez mais ativas e assim empregá-las na indústria e em diversos usos como ferramentas biotecnológicas que venham a favorecer futuras pesquisas e a sociedade de modo geral.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. Sétima Edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula**. Quinta Edição. Porto Alegre: Artmed, 2008.

ALVARENGA, L. M.; MARTINS, M. S.; MOURA, J. F.; KALAPOTHAKIS, E.; OLIVEIRA, J. C.; MANGILI, O. C.; GRANIER, C.; CHAVEZ-OLORTEGUI, C. Production of monoclonal antibodies capable of neutralizing dermonecrotic activity of *Loxocles intermedia* spider venom and their use in a specific immunometric assay. **Toxicon**, v. 42, p. 725–731, 2003.

APPEL, M.H.; DA SILVEIRA, R.B.; GREMSKI, G.; VEIGA, S.S. Insights into brown spider and loxoscelism. **Invertebrate Survival Journal**, v. 2, p. 52-158, 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.

ARAUJO, S. C.; CASTANHEIRA, P.; ALVARENGA, L. M.; MANGILI, O. C.; KALAPOTHAKIS, E.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. Protection against dermonecrotic and lethal activities of *Loxosceles intermedia* spider venom by immunization with a fused recombinant protein. **Toxicon**, v. 41(3) p. 261-7, 2003.

ATKINS, J. A.; WINGO, C. W.; SODEMAN, W. A.; FLYNN, J. E. Necrotic arachnidism. **Am J Trop Med Hyg**, v. 7, p. 165–184, 1958.

BARBARO, K. C.; CARDOSO, J. L.; et al. Dermonecrotic and lethal components of *Loxosceles gaucho* spider venom. **Toxicon**, v. 30(3), p. 331-8, 1992.

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

BASCUR, L.; YEVENES, I.; BARJA, P. Effects of *Loxosceles laeta* spider venom on blood coagulation. **Toxicon**, v. 20(4), p. 795-6, 1982.

BERTANI, R.; FUKUSHIMA, C. S.; NAGAHAMA, R. H. *Loxosceles chapadensis* (Araneae: Sicariidae): a new recluse spider species of the *gaucho* group from Brazil. **The Journal of the Arachnology**, v.38, p. 364-367, 2010.

BINFORD, G. J.; CALLAHAN, M. S.; BODNER, M. R.; RYNERSON, M. R.; NÚÑES, P. B.; ELLISON, C. E.; DUNCAN, R. P. Phylogenetic relationships of *Loxosceles* and *Sicarius* spiders are consistent with Western Gondwanan vicariance. **Mol Phylogenet and Evol.**, v. 48, p. 538-553, 2008.

BRADFORD, M.M.; A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Anal. Bioch.**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRAVO, M.; PURATIC, O.; BEHN, C.; FARDELLA, C.; CONTRERAS, A. Hemolysis induced by *Loxosceles laeta* venom. In vitro experience. **Rev Med Chil**, v. 121(1), p. 16-20, 1993.

BRONDYK, W.H. Selecting an Appropriate Method for Expressing a Recombinant Protein. **Methods in Enzymology**. v. 463, p. 131-147, 2009.

BUCH, D. R. **Toxinas loxoscélicas: estudo da conservação biológica por meio de imunoenaios**. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular). Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

CATALÁN, A.; CORTES, W.; SAGUA, H.; GONZÁLEZ, J.; ARAYA, J. E. Two new phospholipase D isoforms of *Loxosceles laeta*: cloning, heterologous expression, functional characterization, and potential biotechnological application. **J Biochem Mol Toxicol**, v. 25(6), p. 393-403, 2011.

CHAIM, O. M.; SADE, Y. B.; da SILVEIRA, R. B.; TOMA, L.; KALAPOTHAKIS, E.; CHAVEZ-OLORTEGUI, C.; MANGILI, O. C.; GREMSKI, W.; DIETRICH, C. P.; NADER, H. B.; VEIGA, S. S.; Brown spider dermonecrotic toxin directly induces nephrotoxicity. **Toxicol App Pharmacol.**, v. 221, p. 64- 77, 2006.

CHAIM, O. M.; da SILVEIRA, R. B.; TREVISAN-SILVA, D.; FERRER, V. P.; SADE, Y. B.; BÓIA-FERREIRA, M.; GREMSKI, L. H.; GREMSKI, W.; SENFFRIBEIRO, A.; TAKAHASHI, H. K.; TOLEDO, M. S.; NADER, H. B.; VEIGA, S. S. Phospholipase-D activity and inflammatory response induced by brown spider dermonecrotic toxin: Endothelial cell membrane phospholipids as targets for toxicity. **BBA Mol. Cell Biol. Lipids** 2010, v. 1811, p. 84–96, 2011a.

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

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. **J. Cell. Biochem.**, v. 107, p. 655–666, 2009.

CHAVES-MOREIRA, D.; SOUZA, F. N.; FOGAÇA, R. T. H.; MANGILI, O. C.; GREMSKI, W.; SENFF-RIBEIRO, A.; CHAIM, O. M.; VEIGA, S.S. The Relationship Between Calcium and the Metabolism of Plasma Membrane Phospholipids in Hemolysis Induced by Brown Spider Venom Phospholipase-D Toxin. **J. Cell. Biochem.**, v. 112, p. 2529-2540, 2011.

CICARELLI, R. M. B.; SILES VILLARROEL, M. et al. "Estudo imunoquímico dos venenos araneicos das espécies *Loxosceles gaucho*, *Phoneutria nigriventer* e *Lycosa erythrognatha*." **Mem Inst Butantan**, v. 47-48, p. 33-43, 1983.

CORREA, A.; OPPEZZO, P. Tuning different expression parameters to achieve soluble recombinant proteins in *E. coli*: Advantages of high-throughput screening. **Biotechnol. J.**, v. 6, p. 715–730, 2011.

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

CUPO, P.; AZEVEDO-MARQUES, M.M.; HERING, S.E. Escorpionismo. In: CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, F.O.S.; FAN, F.W.; MÁLAQUE, C.M.; HADDAD, Jr. V, eds. **Animais peçonhentos no Brasil. Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. Sarvier, São Paulo, p.182-197, 2003.

da SILVA, P.H.; 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.; 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.; PIGOZZO, R.B.; CHAIM, O.M.; APPEL, M.H.; SILVA, D.T.; DREYFUSS, J.L.; TOMA, L.; DIETRICH, C.P.; NADER, H.B.; VEIGA, S.S.; GREMSKI, W. Two novel dermonecrotic toxins from brown spider (*Loxosceles*

intermedia) venom: from cloning to functional characterization. **Biochimie**, v. 89, p. 289 – 300, 2007.

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

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. **Biochem J**, v. 406, p. 355-363, 2007b.

de ANDRADE, S. A.; FERNANDES-PEDROSA, M.; ANDRADE, R. M. G.; OLIVA, M. L.V.; VAN DER BERG, C. W.; TAMBOURGI, D. V. Conformational changes of *Loxosceles* venom sphingomyelinases monitored by circular dichroism., **Bioch and Biophysical Research Communications**, v. 327, p. 117-123, 2005.

de ANDRADE, S. A.; MURAKAMI, M. T.; CAVALCANTE, D. P.; ARNI, R. K.; TAMBOURGI, D. V. Kinetic and mechanistic characterization of the Sphingomyelinases D from *Loxosceles intermedia* spider venom. **Toxicon**. V. 47(4), p. 380-6, 2006.

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(6), p. 695-704, 2008.

de ALMEIDA, D. M.; FERNANDES-PEDROSA, M. DE F.; DE ANDRADE, R. M.; MARCELINO, J. R.; GONDO-HIGASHI, H.; DE AZEVEDO, I. DE L.; HO, P. L.; VAN DEN BERG, C.; TAMBOURGI, D. V. A new anti-loxoscelic serum produced against recombinant sphingomyelinase D: results of preclinical trials. **Am J Trop Med Hyg**. v. 79(3), p. 463-70, 2008.

de GIUSEPPE, P. O.; ULLAH, A.; SILVA, D. T.; GREMSKI, L. H.; WILLE, A. C.; CHAVES- MOREIRA, D.; RIBEIRO, A. S.; CHAIM, O. M.; MURAKAMI, M. T.; VEIGA, S. S.; ARNI, R. K. Structure of a novel class II phospholipase D: catalytic cleft is modified by a disulphide bridge. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 409(4), p. 622-7, 2011.

de OLIVEIRA, K. C.; GONÇALVES de ANDRADE, R. M.; PIAZZA, R. M.; FERREIRA, J. M. Jr.; VAN DEN BERG, C. W.; TAMBOURGI, D. V. Variations in *Loxosceles* spider venom composition and toxicity contribute to the severity of envenomation. **Toxicon**, v. 45(4), p. 421-9, 2005.

de SANTI FERRARA, G. I.; FERNANDES-PEDROSA, M. DE F.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. DE L.; GONÇALVES-DE-ANDRADE, R. M.; PORTARO, F. C.; MANZONI-DE-ALMEIDA, D.; MURAKAMI, M. T.; ARNI, R. K.; VAN DEN BERG, C. W.; HO, P. L.; TAMBOURGI, D. V. SMase II, a new sphingomyelinase D from *Loxosceles laeta* venom gland: molecular cloning, expression, function and structural analysis. **Toxicon**. v. 53(7-8), p. 743-53, 2009.

de SOUZA, A. L.; MALAQUE, C., M.; SZTAJNBOK, J.; ROMANO, C. C.; DUARTE, A. J.; SEGURO, A. C.; *Loxosceles* venom-induced cytokine activation, hemolysis, and acute kidney injury. **Toxicon**, v. 51, p. 151-156, 2008.

de MOURA, J.; FELICORI, L.; MOREAU, V.; GUIMARÃES, G.; DIAS-LOPES, C.; MOLINA, L.; ALVARENGA, L. M.; FERNANDES, P.; FRÉZARD, F.; RIBEIRO, R. R.; FLEURY, C.; NGUYEN, C.; MOLINA, F.; GRANIER, C.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. Protection against the toxic effects of *Loxosceles intermedia* spider venom elicited by mimotope peptides. **Vaccine**, v. 29(45), p. 7992-8001, 2011.

DEMAIN, A. L.; VAISHNAV, P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. **Biotechnology Advances**. v. 27, p. 297–306, 2009.

DENNY, W. F.; DILLAHA, C. J. et al. Hemotoxic Effect of *Loxosceles Reclusus* Venom: *In Vivo* and *in Vitro* Studies. **J Lab Clin Med**, v. 64, p. 291-8, 1964.

DIAS-LOPES, C.; FELICORI, L.; GUIMARÃES, G.; GOMES, E. R.; ROMAN-CAMPOS, D.; DUARTE, H.; DAMASCENO, D.; MARTINS, M.; KALAPOTHAKIS, E.; ALMEIDA, A. P.; GRANIER, C.; CRUZ, J. S.; GUATIMOSIM, S.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. Cardiotoxic effects of *Loxosceles intermedia* spider venom and the recombinant venom toxin rLiD1. **Toxicon**. v. 56(8), p. 1426-35, 2010.

DONNELLY, M. I.; ZHOU, M.; MILLARD, C. S.; CLANCY, S.; STOLS, L.; ESCHENFELD, W. H.; COLLART, F. R.; JOACHIMIAK, A. An expression vector tailored for large-scale, high-throughput purification of recombinant protein. **Protein Expression and Purification**, v. 47, p. 446-454, 2006.

dos SANTOS, V. L.; FRANCO, C. R.; VIGGIANO, R. L.; da SILVEIRA, R. B.; CANTÃO, M. P.; MANGILI, O. C.; VEIGA, S. S.; GREMSKI, W. (2000). "Structural and ultrastructural description of the venom gland of *Loxosceles intermedia* (brown spider)." **Toxicon** **38**(2): 265-285.

ESCOUBAS, P.; DIOCHOT, S.; CORZO, G. Structure and pharmacology of spider venom neurotoxins. **Biochimie**, v. 82(9-10), p. 893-907, 2000.

FEITOSA, L.; GREMSKI, W.; VEIGA, S. S.; ELIAS, M. C.; GRANER, E., MANGILI, O. C.; BRENTANI, R. R. Detection and characterization of metalloproteinases with gelatinolytic, fibronectinolytic and fibrinogenolytic activities in brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. **Toxicon**, v. 36, p. 1039-1051, 1998.

FELICORI, L.; ARAUJO, S. C.; DE AVILA, R. A.; SANCHEZ, E. F.; GRANIER, C.; KALAPOTHAKIS, E.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. Functional characterization and epitope analysis of a recombinant dermonecrotic protein from *Loxosceles intermedia* spider. **Toxicon**, v. 48(5), p. 509-19, 2006.

FELICORI, L.; FERNANDES, P. B.; GIUSTA, M. S.; DUARTE, C. G.; KALAPOTHAKIS, E.; NGUYEN, C.; MOLINA, F.; GRANIER, C.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. An in vivo protective response against toxic effects of the dermonecrotic protein from *Loxosceles intermedia* spider venom elicited by synthetic epitopes. **Vaccine**, v. 27(31), p. 4201-8, 2009.

FERNANDES-PEDROSA, M. F., JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO I. L. M.; GONCALVES-DE-ANDRADE, R. M., VAN DEN BERG, C. W., RAMOS, C. R., HO, P. L.; TAMBOURGI, D. V. Molecular cloning and expression of a functional dermonecrotic and haemolytic factor from *Loxosceles laeta* venom. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 298, p. 638-645, 2002.

FISCHER, M. L.; VASCONCELLOS-NETO, J. Microhabitats occupied by *Loxosceles intermedia* and *Loxosceles laeta* (Araneae: Sicariidae) in Curitiba, Paraná, Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v.42, p. 756-765, 2005.

FUTRELL, J. M. Loxoscelism. **The American journal of the medical sciences**, v. 304, p.261-267, 1992.

GEREN, C.R.; CHAN, T.K.; HOWELL, D.E.; ODELL, G.V. Isolation and characterization of toxins from brown recluse spider venom (*Loxosceles reclusa*). **Archives of biochemistry and Biophysics**, v.174, p.90-99, 1976.

GILBERT, S.F. **Embriology**. Constructing the organism. Ed. S. F. Gilbert and A. M. Raunio, Sinauer, Sunderland, 1997.

GREMSKI, L. H.; DA SILVEIRA, R. B.; CHAIM, O.M.; PROBST, C. M.; FERRER, V. P.; NOWATZKI, J.; WEINSCHUTZ, H.C.; MADEIRA, H.M.F.; GREMSKI, W.; NADER, H.B.; SENFF-RIBEIRO, A.; VEIGA, S.S. A novel expression profile of the *Loxosceles intermedia* venomous gland revealed by transcriptome analysis. **Molecular Biosystems**, v. 12, p. 2403-2416, 2010.

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, n. 9, p. 1333-1342, 2001.

GOMES, M. T.; GUIMARÃES, G.; FRÉZARD, F.; KALAPOTHAKIS, E.; MINOZZO, J. C.; CHAIM, O. M.; VEIGA, S. S.; OLIVEIRA, S. C.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. Determination of sphingomyelinase-D activity of *Loxosceles* venoms in sphingomyelin/cholesterol liposomes containing horseradish peroxidase. **Toxicon**. 57(4):574-9, 2011.

HEREDIA, V.; ARBAIZA, E.; VENEGAS, J.; YARLEQUÉ, A.; ZAVALETA, A. Proteolytic, procoagulant activity and electrophoretic characterization of the proteins of 2 toxic extracts of *Loxosceles laeta* venom. **Bol Chil Parasitol**, v. 44(1-2), p. 8-16, 1989.

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

HARRIS, F.; PHOENIX, D. A. An investigation into the ability of C-terminal homologues of *Escherichia coli* low molecular mass penicillin-binding proteins 4, 5 and 6 to undergo membrane interaction. **Biochimie**. v. 79: 17, p. 1-174, 1997.

HASHIMOTO, K.; NISHI, H.; BRYANT, S.; PANCHENKO, A. R. Caught in self-interaction: evolutionary and functional mechanisms of protein homooligomerization. **Phys Biol**. v. 8(3), 035007, 2011.

JANEWAY, C. **Imunobiologia: o sistema imune na saúde e na doença**. Porto Alegre: Artmed, 2007.

KALAPOTHAKIS, E., ARAUJO, S. C., DE CASTRO, C. S., MENDES, T. M., GOMEZ, M. V., MANGILI, O. C., GUBERT, I. C. & CHAVEZ-OLORTEGUI, C. Molecular cloning, expression and immunological properties of LiD1, a protein from the dermonecrotic family of *Loxosceles intermedia* spider venom. **Toxicon**, v. 40, p. 1691-1699, 2002.

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. and BARBARO, K. C. The Loxtox protein family in *Loxosceles intermedia* (Mello-Leitao) venom. **Toxicon**, v. 50, p. 938-946, 2007.

KUSMA, J.; CHAIM, O.M.; WILLE, A.C.M.; FERRER, V.; 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.

LEE, S.; LYNCH, K.R. Brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*) venom phospholipase D (PLD) generates lysophosphatidic acid (LPA). **Biochem. J**, v. 391, p. 317–323, 2005.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, Michael M. Princípios de bioquímica de Lehninger. Porto Alegre: Artmed, 2011.

LUCIANO, M.N.; da SILVA, P.H.; CHAIM, O.M.; SANTOS, V.P.; FRANCO, C.R.C.; SOARES, M.F.S.; ZANATA, S.M.; MANGILI, O.; GREMSKI, O.C. VEIGA, S.S. Experimental evidence for a direct cytotoxicity of *Loxosceles intermedia* (Brown spider) venom on renal tissue. **The Journal of histochemistry and cytochemistry**, United States, v.52, p.455-467, 2004.

LUNG, J. M. AND MALLORY S. B. A child with spider bite and glomerulonephritis: a diagnostic challenge. **Int J Dermatol** v. 39(4), p. 287-9, 2000.

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.; CASTRO-VALENCIA, J. E.; CARDOSO, J. L.; FRANÇA, F. O.; BARBARO, K. C.; FAN, H. W. (2002). 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.

MARCHESINI, N.; HANNUN, Y. A. Acid and neural sphingomyelinases: roles and mechanisms of regulation. **Biochem. Cell Biol.**, v. 82, p. 27-44, 2004.

MARIANAYAGAM, N. J.; SUNDE, M.; MATTHEWS, J. M. The power of two: protein dimerization in biology. **Trends Biochem Sci**, v. 29(11), p. 618-25, 2004.

MARQUES-DA-SILVA, E.; FISCHER, M. L. *Loxosceles Heinecken & Lowe, 1835 (Araneae; Sicariidae) species distribution in the State of Parana.* **Rev Soc Bras Med Trop** v. 38(4), p. 331-5, 2005.

MARTINEZ-VARGAS, A. Z. Loxoscelism, a health problem in Peru. **Bol Oficina Sanit Panam**, v. 103(4), p. 378-86, 1987.

MEISSNER, G.O.; **Produção e avaliação de anticorpos policlonais contra venenos totais de *Loxosceles laeta* e de *Loxosceles gaucho*.** Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, CURITIBA, 2009.

MORÁN, O.; ZAVALA, A.; CASTRO DE LA MATA, R. (1981). Hematological effects of *Loxosceles laeta* venom in albino mice (author's transl). **Bol Chil Parasitol**, v. 36(1-2), p. 20-3, 1981.

MURAKAMI, M.T.; FERNANDES-PEDROSA, M.F.; TAMBOURGI, D.V.; ARNI, R.K. Structural Basis for Metal-Ion Coordination and the Catalytic Mechanism of Sphingomyelinases D. **J Biol Chem**, v. 280, p. 13658-13658, 2005.

MURAKAMI, M.T.; FERNANDES-PEDROSA, M.F.; ANDRADE, S.A.; GABDOULKHAKOV, A.; BETZEL, C.; TAMBOURGI, D.V.; ARNI, R.K. Structural insights into the catalytic mechanism of sphingomyelinases D and evolutionary relationship to glycerophosphodiester phosphodiesterases. **Biochem Biophys Res Comm**, v. 342, p. 323–329, 2006.

MS (2010). Ministério da Saúde, Aspectos epidemiológicos. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtx=31482>. Acesso em: 28/3/2011.

MS (2010). Ministério da Saúde, Clipping. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/clipping020210.pdf>>. Acesso em: 28/3/2011.

MS (2010). Ministério da Saúde, Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Acidentes por Animais Peçonhentos no período de 2009. Disponível em: <<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/dh?sinannet/animaisp/bases/animaisbrnet.def>>. Acesso em: 27/3/2011.

MS (2013). Ministério da Saúde Acidentes por aranhas. <<http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/index.cfm?portal=pagina.visualizarTexto&codConteudo=5819&codModuloArea=783&chamada=acidentes-por-aranhas>>. Acesso em 15/01/2013.

OLVERA, A.; RAMOS-CERRILLO, B.; ESTÉVEZ, J.; CLEMENT, H.; DE ROODT, A.; PANIAGUA-SOLÍS, J.; VÁZQUEZ, H.; ZAVALA, A.; ARRUZ, M. S.; STOCK, R. P.; ALAGÓN, A. North and South American *Loxosceles* spiders: development of a polyvalent antivenom with recombinant sphingomyelinases D as antigens. **Toxicon**, v. 48(1), p. 64-74, 2006.

PAIXÃO-CAVALCANTE, D.; VAN DEN BERG, C. W.; GONÇALVES-DE-ANDRADE, R. M.; FERNANDES-PEDROSA, M. DE F.; OKAMOTO, C. K.; TAMBOURGI, D. V. Tetracycline protects against dermonecrosis induced by *Loxosceles* spider venom. **J Invest Dermatol**, v. 127(6), p. 1410-8, 2007.

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. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**, v. 149, p. 323-333, 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.

PAULI, I.; MINOZZO, J.C.; DA SILVA, P. H.; 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.

PACHECO, B.; CROMBET, L.; LOPPNAU, P.; COSSAR, D. A screening strategy for heterologous protein expression in *Escherichia coli* with the highest return of investment. **Protein Expression and Purification**, v. 81(1), p. 33-41. 2011.

PIZZI, T.; J. ZACARIAS, J.; SCHENONE, H. Estudio histopatológico experimental en el envenenamiento por *Loxosceles laeta*. **Biologica (Santiago)**, v. 23, p. 33-51., 1957.

PLATNICK, N.I. The world spider catalog, version 12.5. American Museum of Natural History, 2012. Disponível em: <<http://research.amnh.org/iz/spiders/catalog/INTRO1.html>> acesso em: 26/01/2012.

RAMOS-CERRILLO, B., OLVERA, A., ODELL, G. V., ZAMUDIO, F., PANIAGUA-SOLIS, J., ALAGON, A. & STOCK, R. P. Genetic and enzymatic characterization of sphingomyelinase D isoforms from the North American fiddleback spiders *Loxosceles boneti* and *Loxosceles reclusa*. **Toxicon**, v. 44, p. 507-514, 2004.

RATTMANN, Y. D.; PEREIRA, C. R. et al. 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(3), p. 363-372, 2008.

REES, R. S.; NANNEY, L. B. et al. Interaction of brown recluse spider venom on cell membranes: the inciting mechanism?. **J Invest Dermatol**, v. 83(4), p. 270-5, 1984.

RIBEIRO, R. O. S.; CHAIM, O. M.; daSILVEIRA, R. B.; GREMSKI, L. H.; SADE, Y. S.; PALUDO, K. S.; SENFF-RIBEIRO, A.; MOURA, J.; CHÁVEZLORTEGUI, 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.

RIBEIRO, L. A., EICKSTEDT, V. R. et al. Epidemiologia do acidente por aranhas do gênero *Loxosceles* no Estado do Paraná (Brasil). **Mem Inst Butantan**, v. 55, p. 8, 1993.

ROSENFELD, G.; NAHAS, L.; CILLO, D. M.; FLEURY, C. T. **Envenenamentos por serpentes, aranhas e escorpiões**. In: F.C. Prado, Editor, Atualização Terapêutica, Livraria Luso Espanhola e Brasileira, Rio de Janeiro, p.931–944, 1957.

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Immunologia**. 6 ed. São Paulo: Manole, 2006.

SINAN - SISTEMA NACIONAL DE NOTIFICAÇÕES DE AGRAVOS, Ministério da Saúde, BRASIL, 2013. Disponível em: <<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/>> acesso em: 18/01/2013.

SADE, Y. B.; BÓIA-FERREIRA, M.; GREMSKI, L. H.; da SILVEIRA, R. B.; GREMSKI, W.; SENFF-RIBEIRO, A.; CHAIM, O. M.; VEIGA, S. S. Molecular cloning, heterologous expression and functional characterization of a novel translationally-controlled tumor protein (TCTP) family member from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. **The International Journal of Biochemistry e Cell Biology**, v. 44, p.170-177, 2012.

SAHDEV, S.; KAHTTAR, S. K.; SAINI, K. S. Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies. **Mol Cell Biochem**, v. 307, p. 249-264, 2008.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. (2001). Molecular cloning: a laboratory manual. 3th. Ed. New York; Cold Spring Harbour, 2001.

SAMS, H.H.; DUNNICK, C.A.; SMITH, M.L.; KING, L.E. Necrotic arachdism. **J Am Acad Dermatol**, v. 44, p. 61-573, 2001.

SCHENONE, H.; SAAVEDRA, T.; ROJAS, A.; VILLARROEL, F. Loxoscelism in Chile. Epidemiologic, clinical and experimental studies. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 31(6), p. 403-15, 1989.

SECRETARIA DA SAÚDE DE CURITIBA. <http://www.saude.curitiba.pr.gov.br/images/institucional/arquivos/protocolos/protocolo_001.pdf> acesso em: 20/01/2013.

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

SORENSEN, P. H.; MORTENSEN, K. K.; Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **Journal of Biotechnology**, v. 115, p. 113-128, 2005.

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

TAMBOURGI, D. V.; MAGNOLI, F. C.; VAN DEN BERG.; C. W.; MORGAN, B. P.; DE ARAUJO, P. S.; ALVES, E. W.; DA SILVA, W. D. Sphingomyelinases in the venom of the spider *Loxosceles intermedia* are responsible for both dermonecrosis and complement-dependent hemolysis. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 251(1), p. 366-73, 1998.

TAMBOURGI, D. V., DE, F. F. P. M., VAN DEN BERG, C. W., GONCALVES-DE-ANDRADE, R. M., FERRACINI, M., PAIXAO-CAVALCANTE, D., MORGAN, B. P. & RUSHMERE, N. K. Molecular cloning, expression, function and immunoreactivities of members of a gene family of sphingomyelinases from *Loxosceles* venom glands. **Mol Immunol**, v. 41, p. 831-840, 2004.

TANI, M.; ITO, M.; IGARASHI, Y. Ceramide/sphingosine/sphingosine-1-phosphat metabolism on the cell surface and in the extracellular space. **Cell Signal**, v. 19, p. 229-237, 2007.

TREVISAN-SILVA, D.; GREMSKI, L. H.; CHAIM, O. M.; da SILVEIRA, R. B. MEISSNER, G. O.; MANGILI, O. C.; BARBARO, K. C.; GREMSKI, W.; VEIGA, S. S.; SENFF-RIBEIRO, A. Astacin-like metalloproteases are a gene family of toxins present in the venom of different species of the brown spider (genus *Loxosceles*). **Biochimie**, v. 92, p.21-32, 2010.

ULLAH, A.; DE GIUSEPPE, P. O.; MURAKAMI, M. T.; TREVISAN-SILVA, D.; WILLE, A. C.; CHAVES-MOREIRA, D.; GREMSKI, L. H.; DA SILVEIRA, R. B.; SENFF-RIBEIRO, A.; CHAIM, O. M.; VEIGA, S. S.; ARNI, R. K. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of a class II phospholipase D from *Loxosceles intermedia* venom. **Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun**, v. 67(Pt 2), p. 234-6, 2011.

VAN MEETEREN, L. A.; FREDERIKS, F.; GIEPMANS, B. N.; PEDROSA, M. F.; BILLINGTON, S. J.; JOST, B. H.; TAMBOURGI, D. V.; MOOLENAAR, W. H. Spider and bacterial sphingomyelinases D target cellular lysophosphatidic acid receptors by hydrolyzing lysophosphatidylcholine. **J Biol Chem**, v. 279(12), p.10833-6, 2004.

VEIGA, S.S.; GREMSKI, W.; SANTOS, V.L.P.; FEITOSA, L.; MANGILI, O.C.; NADER, H.B.; DIETRICH, C.P.; BRENTANI, R.R. Oligosaccharide residues of *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom proteins: dependence on glycosylation for dermonecrotic activity. **Toxicon**, England, v. 37, p.587-607, 1999.

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

VENTURA, S.; VILLAVARDE, A. Protein quality in bacterial inclusion bodies **Trends in Biotechnology**, v.24, p. 179-185, 2006.

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

VETTER, R. S.; VISSCHER, P.K. Bites and stings of medically important venomous arthropods. **International journal of dermatology**, United States, v.37, p.481-496, 1998.

VETTER, R. S.; SWANSON, D. L. Of spiders and zebras: publication of inadequately documented loxoscelism case reports. **J Am Acad Dermatol**, v. 56(6), p. 1063-4, 2007.

VINCENTELLI, R.; CIMINO, A.; GEERLOF, A.; KUBO, A.; SATOU, Y.; CAMBILLAU, C. High-throughput protein expression screening and purification in *Escherichia coli*. **Methods. In Press**, 2011.

VUITIKA, L. **Clonagem, expressão e purificação de uma nova isoforma de fosfolipase-D presente no veneno de aranha-marrom (*Loxosceles intermedia*)**. 94 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular). Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

WILLIAMS, S. T.; KHARE, V. K.; JOHNSTON, G. A.; BLACKALL, D. P. Severe intravascular hemolysis associated with brown recluse spider envenomation. A report of two cases and review of the literature. **Am J Clin Pathol** v. 104(4), p. 463-7, 1995.

YOUNG, A. R.; PINCUS S. J. Comparison of enzymatic activity from three species of necrotising arachnids in Australia: *Loxosceles rufescens*, *Badumna insignis* and *Lampona cylindrata*. **Toxicon**, v. 39(2-3), p. 391-400, 2001.

ZELA, S. P.; FERNANDES PEDROSA, M. F.; MURAKAMI, M. T.; DE ANDRADE, S. A.; ARNI, R. K.; TAMBOURGI, D. V. Crystallization and preliminary crystallographic analysis of SMase I, a sphingomyelinase from *Loxosceles laeta* spider venom. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 60(Pt 6), p. 1112-4, 2004.

ZHANG, L.; CHOU, C. P.; MOO-YOUNG, M. Disulfide bond formation and its impact on the biological activity and stability of recombinant therapeutic proteins

produced by *Escherichia coli* expression system. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 923–929, 2011.

ZHANG, Y.; SKOLNICK, J. TM-align: A protein structure alignment algorithm based on TM-score. **Nucleic Acids Research**, v. 33, p. 2302-2309, 2005.