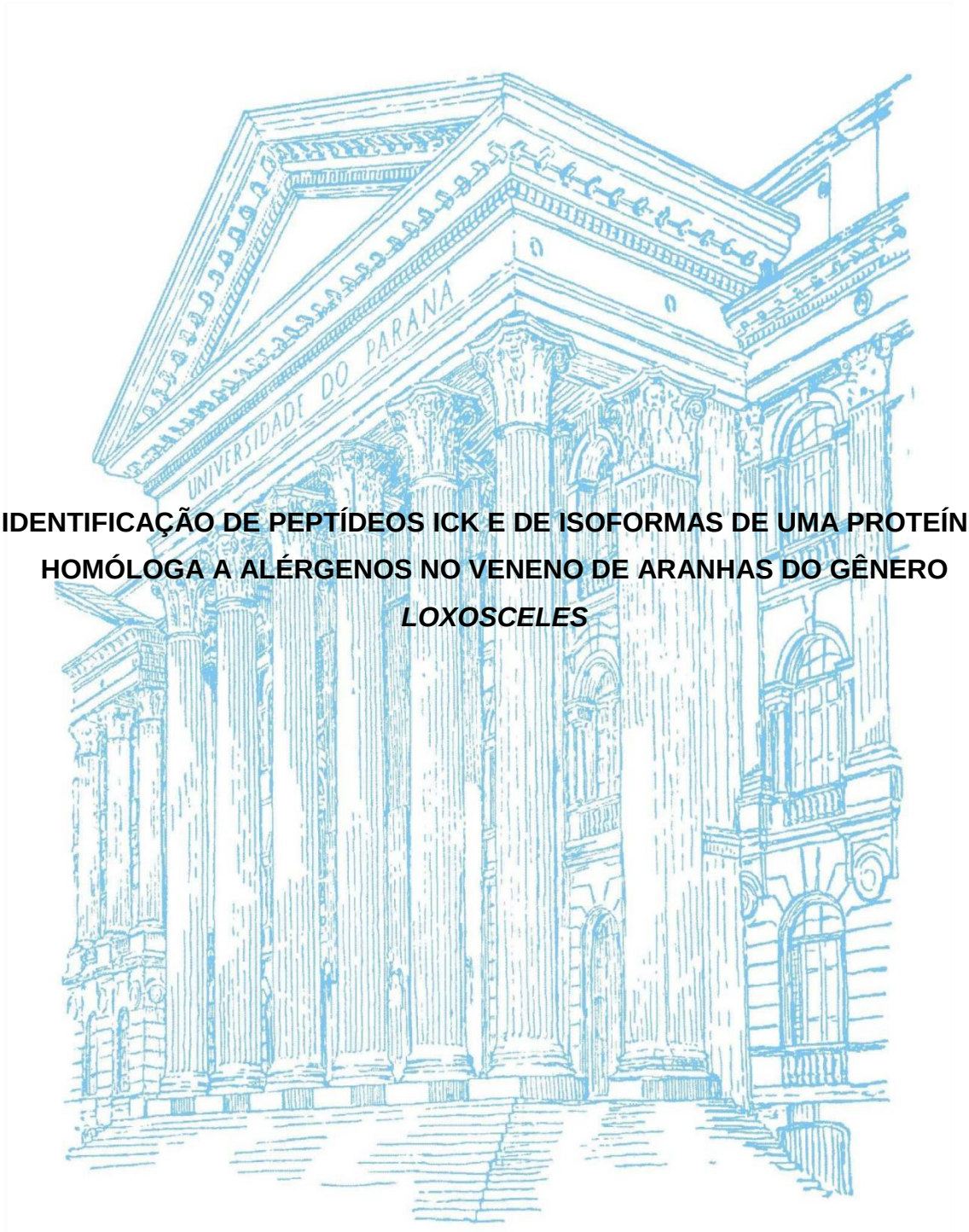
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

HANNA CÂMARA DA JUSTA



IDENTIFICAÇÃO DE PEPTÍDEOS ICK E DE ISOFORMAS DE UMA PROTEÍNA HOMÓLOGA A ALÉRGENOS NO VENENO DE ARANHAS DO GÊNERO *LOXOSCELES*

CURITIBA

2016

HANNA CÂMARA DA JUSTA

IDENTIFICAÇÃO DE PEPTÍDEOS ICK E DE ISOFORMAS DE UMA PROTEÍNA HOMÓLOGA A ALÉRGENOS NO VENENO DE ARANHAS DO GÊNERO *LOXOSCELES*

Monografia apresentada ao curso de Ciências Biológicas da disciplina BG038, Setor de Biologia, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas, disciplina BG038.

Orientador: Prof. Dr. Silvio Sanches Veiga

Co-orientador: Dr. Fernando Hitomi Matsubara

CURITIBA

2016

Dedico esta monografia principalmente a meu pai e meu avô. Também a minha namorada, meus amigos, meu orientador, co-orientador e a todos os integrantes do laboratório de Matriz Extracelular e biotecnologia de Venenos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao meu pai e ao meu avô, pois sem eles jamais conseguiria estudar e me dedicar inteiramente à faculdade. Obrigada pai, por mesmo longe e com muita saudade guardada no peito, me apoiar, torcer por mim e ser meu porto seguro. Também sou grata a minha mãe, minha tia e minha avó, que me deram sempre bons exemplos de mulheres fortes e batalhadoras.

Ao Allyfer, meu melhor amigo e irmão de coração. Aquele que desde o primeiro ano de faculdade esteve do meu lado, nos momentos bons e ruins. Obrigada por nunca me abandonar, por nunca me deixar na mão, mesmo quando eu estava fora de mim. Obrigada por ser sempre meu companheiro, meu confidente, meu conselheiro, meu ombro amigo. Ao Raul, por me ensinar que a amizade quando verdadeira supera qualquer barreira, que mesmo depois de 1 ano de intercambio longe um do outro a amizade só fortaleceu. A Amanda por me dar as melhores risadas e histórias que só a faculdade e uma amizade como a nossa proporciona. Ao Lucas, que sempre esteve disposto a me ajudar com o que fosse preciso, que tem esse coração puro que estava sempre do meu lado quando precisei e que sempre me fez rir com a sua risada única e contagiante. A Louise, que mesmo nossa amizade tendo altos e baixos, mesmo nos momentos tensos da faculdade, eu sempre sei que em momentos difíceis ela é aquela que estende a mão pra ajudar sem pensar duas vezes. O que a biologia une nada separa! E também Raquel, Bruno, Brenda, Paloma, Shaline, Valéria. Obrigada a todos os meus amigos que me ajudaram e estiveram comigo nessa longa jornada.

Aos donos da academia Curitiba Top Team: Leonardo, Michele e Maurício, por me mostrar e me ensinar àquilo que hoje se tornou parte de quem eu sou. Por me acolherem e me permitirem frequentar um lugar que se tornou a minha terapia do dia a dia.

Aos professores da Universidade Federal do Paraná. Todos de alguma forma contribuíram para a minha formação acadêmica e aprendizado.

A Rô e ao Leandro da secretaria, que sempre estavam dispostos a tirar dúvidas, a lembrar de prazos e arrumar as matrículas.

Obrigada principalmente a Larissa, que também ser tornou uma grande amiga. Obrigada por todos os cafés e conversas que tivemos nesses anos, você me ajudou a crescer e a amadurecer. A Antonielle, por me apoiar, se preocupar sempre comigo, me ouvir e ficar do meu lado quando precisei. Ao Adriano por desde o primeiro relatório de IC me incentivar e me dar forças. Ao Gabriel e a Aline pelas brincadeiras que me faziam sorrir mesmo nos dias mais difíceis de laboratório. E a todos os membros do laboratório LME que de alguma forma contribuíram para o que sou hoje, seja me ensinando uma técnica, tirando dúvidas, dando dicas, conselhos ou corrigindo relatórios.

Ao meu co-orientador Fernando Matsubara. Muito do que sou hoje devo a ele. Quando nem eu acreditava na minha capacidade, você não desistiu e me mostrou o contrário. Obrigada por nunca desistir de mim, por sempre lutar por mim e me mostrar que eu sou capaz. Obrigada por despertar em mim a vontade de estudar e a faísca que eu precisava para acordar.

Ao meu orientador Silvio Sanches Veiga, obrigada por me dar a oportunidade e apoio para realizar este trabalho.

A minha namorada Lorena, que sempre fez de tudo para me animar, que durante todo esse tempo me aguentou, me apoiou e me motivou. Obrigada por fazer parte da minha vida e por tornar ela mais alegre. Obrigada por me dar um bom motivo para sorrir todos os dias. Obrigada por me compreender nos momentos mais difíceis. Obrigada por todos os colos, abraços e palavras de incentivo. Obrigada por me amar como eu sou, e por me permitir amar você.

RESUMO

As aranhas-marrons do gênero *Loxosceles* são endêmicas em Curitiba e região metropolitana e foram responsáveis pelos 1797 acidentes registrados em 2015 nesta área. O veneno dessas aranhas é composto por uma mistura de toxinas, com predominância de moléculas de baixa massa molecular. A partir do veneno de *L. intermedia* foram purificados 3 peptídeos (LiTx1, LiTx2 e LiTx3) com massas moleculares de 5,6-7,9 kDa e contendo 10 resíduos de cisteína. O estudo do transcriptoma da glândula produtora de veneno de *L. intermedia* revelou que mais de 50% de todas as sequências relativas a toxinas são relacionadas com os peptídeos LiTx descritos anteriormente. Esses peptídeos contêm um arranjo típico de pontes dissulfeto intracadeia que compõem um motivo estrutural denominado “nó de cistina inibidor” (ICK). Os peptídeos ICK possuem ação sobre canais iônicos dependentes de voltagem, sendo assim muito visados do ponto de vista biotecnológico. Também foi identificada na glândula de veneno de *L. intermedia* uma sequência codificante de uma proteína homóloga a alérgenos. Esta pertence à família CAP/CRiSP, que são proteínas ricas em cisteína e o estudo dessa toxina pode auxiliar a elucidar eventos de hipersensibilidade e o processo inflamatório decorrente dos acidentes com aranhas do gênero *Loxosceles*. O objetivo deste trabalho foi identificar sequências codificantes de peptídeos ICK e de sequências homólogas a alérgenos no veneno das espécies *L. gaucho* e *L. laeta*. Para isso, as glândulas de veneno dessas espécies foram extraídas, o RNA total foi purificado, foram obtidos os cDNA através de uma RT-PCR, seguida de clonagem em vetor pGEM-T. Essas construções foram transformadas em bactérias da cepa *E. coli* DH5α e os clones positivos foram confirmados por PCR de colônia e sequenciamento. Para os grupos dos peptídeos ICK, também foi feito uma análise comparativa dos venenos das três espécies por meio de SDS-PAGE, no qual os perfis proteicos revelaram ser similares, e um imunoensaio de reatividade cruzada, no qual os soros hiperimunes dos venenos de *L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta* reconheceram um peptídeo ICK recombinante de *L. intermedia.* Os resultados de ambos experimentos reforçam a ideia de que a família das toxinas ICK é conservada no gênero. Os sequenciamentos dos grupos de peptídeos ICK revelaram que todas as sequências obtidas continham os 10 residuos de cisteínas em posições conservadas. Em *L. gaucho* foram encontradas sequências codificantes idênticas com as já descritas para *L. intermedia*, o que não foi observado em *L. laeta;* esse achado indica uma semelhança maior dos venenos e uma filogenia mais próxima entre *L. intermedia* e *L. gaucho*. Essa suposição também foi reforçada ao analisar as sequências de proteínas homólogas a alérgenos. Uma das sequências obtidas em *L. gaucho* apresentou 100% de similaridade com a já descrita de *L. intermedia.* As sequências obtidas de *L. gaucho* e *L. laeta* mostraram-se altamente conservadas quando comparadas com as de *L. intermedia*, divergindo em apenas duas substituições aminoacídicas. Essas análises identificaram novas sequências codificantes de peptídeos ICK e de moléculas alergênicas nos venenos de aranhas do gênero *Loxosceles*. Ambas as toxinas podem ser exploradas do ponto de vista biotecnológico e a proteína alergênica pode ajudar a elucidar mecanismos do Loxoscelismo

Palavras-chave: ICK, Alergeno, Sequenciamento

ABSTRACT

The *Loxosceles* genus spiders (brown spiders) are endemic in Curitiba city and metropolitan region and they were responsible for the recorded 1,797 accidents in this area in 2015. *Loxosceles*' venom is composed by a mixture of toxins, especially low molecular mass components. From the venom of *L. intermedia*, 3 peptides were purified (LiTx1, LiTx2 and LiTx3) with molecular masses ranging from 5.6 to 7.9 kDa and containing 10 cysteine residues. The *L. intermedia* venomous gland transcriptome showed that over 50% of all annotated toxins sequences are related to LiTx peptides previously described. These peptides contain typical intra-disulfide bonds, which establish a structural motif called "inhibitor cystine knot" (ICK). The ICK peptides have action upon voltage-dependent ion channels, thus being targeted as potential biotechnological tools. In the *L. intermedia* venom gland, a coding sequence for a protein homologous to an allergen has also been identified. This toxin belongs to the CAP/CriSP family, which contains cysteine-rich proteins, and consequently the study of this toxin can help elucidate hypersensitivity events and the inflammatory process during loxoscelism. The objective of this study was to identify coding sequences for ICK peptides and sequences homologous to allergens in the venom of *L. gaucho* and *L. laeta* spiders. For this, venom glands from these two species were extracted, the total RNA was purified, cDNA was obtained by means of RT-PCR and cloning was perfomed into pGEM-T vector. These constructs were transformed into *E. coli* DH5α bacterial strain and positive clones were confirmed by colony PCR and sequencing. The venoms from *L. intermedia*, *L. laeta* e *L. gaucho* showed similar protein profiles in SDS-PAGE analysis, suggesting a high content of peptides ICK. Besides that the cross-reactivity immunoassay performed with hyperimmune sera raised against *L. intermedia, L. gaucho* and *L. laeta* venoms recognized a recombinant ICK peptide from *L. intermedia*; The results of both experiments reinforce the idea that the ICK family of toxins is conserved in the *Loxosceles* genus. The sequencing of ICK peptides groups showed that all contained the 10 cysteine residues in conserved positions. In *L. gaucho,* coding sequences for such peptides were identical to those already described for *L. intermedia*, however, the same was not observed for *L. laeta*, indicating a possible greater venoms similarity and closer phylogeny between *L. intermedia* and *L. gaucho*. This finding was reinforced by the analyses of sequences related to proteins homologous to allergens. One of the sequences obtained in *L. gaucho* showed 100% similarity to the previously described for *L. intermedia*. Allergens sequences obtained from *L. gaucho* and *L. laeta* were highly conserved when compared to *L. intermedia*, diverging in only 2 conservative amino acid residues substitutions. Such analyses identified new coding sequences for ICK peptides and allergenic molecules in the *Loxosceles* genus. Both toxins can be exploited from a biotechnological perspective and may help elucidate the loxoscelism mechanisms progression.

Key-words: ICK, Allergen, Sequencing

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – CARACTERÍSTICAS MORFOLOGIAS DE ESPÉCIMES *L. intermedia* – PAG. 14

FIGURA 2 – GEL DE POLIACRILAMIDA DO PERFIL PROTEICO DO VENENO DE *L. intermedia* – PAG. 15

FIGURA 3 – TRANSCRIPTOMA DA GLÂNDULA DE VENENO DE *L. intermedia* SEPARADO NAS PORCENTAGENS DOS GRUPOS DE TOXINAS ENCONTRADAS – PAG. 15

FIGURA 4 – LESÕES DO LOXOSCELISMO CUTÂNEO – PAG. 18

FIGURA 5 – ESTRUTURA BÁSICA DOS TRÊS GRUPOS DE PROTEÍNAS QUE CONTEM O NÓ DE CISTINA – PAG. 19

FIGURA 6 – ESQUEMA DO MOTIVO ESTRUTURAL "*INHIBITOR CYSTINE KNOT*" (ICK) – PAG. 20

FIGURA 7 – REAÇÕES DE HIPERSENSIBILIDADE DECORRENTES DE PICADAS DE ARANHAS DO GÊNERO *LOXOSCELES* – PAG. 23

FIGURA 8 – GEL DESNATURANTE DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE) GRADIENTE 10-20% COM AMOSTRAS BRUTAS DOS VENENOS DAS ESPÉCIES DE *LOXOSCELES* - PAG. 31

FIGURA 9 – REATIVIDADE IMUNOLÓGICA CRUZADA DOS SOROS HIPERIMUNES QUE RECONHECEM O VENENO TOTAL DE DIFERENTES ESPÉCIES DE ARANHAS DO GÊNERO *LOXOSCELES* COM O PEPTÍDEO RECOMBINANTE U_2-SCTX-LI1B – PAG. 31

FIGURA 10 – AMPLIFICAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS RELATIVAS AOS DIFERENTES GRUPOS DE LITX (LiTx1-4) ANALISADAS POR ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1,5%. – PAG. 32

FIGURA 11 – GEL AGAROSE 1,5%. PERFIL ELETROFORÉTICO PROVENIENTE DAS AMOSTRAS AMPLIFICADAS POR PCR DE COLÔNIA DE PEPTÍDEOS SEMELHANTES A LiTx1 EM *L. gaucho* E *L. laeta*.– PAG. 33

FIGURA 12 – GEL AGAROSE 1,5%. PERFIL ELETROFORÉTICO PROVENIENTE DAS AMOSTRAS AMPLIFICADAS POR PCR DE COLÔNIA DE PEPTÍDEOS SEMELHANTES A LiTx2 EM *L. gaucho* E *L. laeta* – PAG. 33

FIGURA 13 – GEL AGAROSE 1,5%. PERFIL ELETROFORÉTICO PROVENIENTE DAS AMOSTRAS AMPLIFICADAS POR PCR DE COLÔNIA DE PEPTÍDEOS SEMELHANTES A LiTx4 EM *L. gaucho* E *L. laeta*. – PAG. 34

FIGURA 14 – GEL AGAROSE 1,5%. PERFIL ELETROFORÉTICO PROVENIENTE DAS AMOSTRAS AMPLIFICADAS POR PCR DE COLÔNIA DE PEPTÍDEOS SEMELHANTES A LiTx3 EM *L. gaucho* E *L. laeta* – PAG. 34

FIGURA 15 – COMPARAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS CODIFICANTES DO GRUPO DE PEPTÍDEOS LiTx1 DE *L. gaucho* E *L. laeta* COM RELAÇÃO AS SEQUÊNCIAS DE LiTx1 DE *L. intermedia* – PAG. 37

FIGURA 16 – COMPARAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS CODIFICANTES DO GRUPO DE PEPTÍDEOS LiTx2 DE *L. gaucho* E *L. laeta* COM RELAÇÃO AS SEQUÊNCIAS DE LiTx2 DE *L. intermedia* – PAG. 38

FIGURA 17 – COMPARAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS CODIFICANTES DO GRUPO DE PEPTÍDEOS LiTx3 DE *L. gaucho* E *L. laeta* COM RELAÇÃO AS SEQUÊNCIAS DE LiTx3 DE *L. intermedia* – PAG. 39

FIGURA 18 – COMPARAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS CODIFICANTES DO GRUPO DE PEPTÍDEOS LiTx4 DE *L. gaucho* E *L. laeta* COM RELAÇÃO AS SEQUÊNCIAS DE LiTx4 DE *L. intermedia* – PAG. 40

FIGURA 19 – GEL AGAROSE 1,5%. AMPLIFICAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS HOMÓLOGAS À LOX i 1 RASTREADAS DE *L. gaucho* E *L. laeta*.– PAG. 41

FIGURA 20 – PERFIL ELETROFORÉTICO PROVENIENTE DAS AMOSTRAS AMPLIFICADAS POR PCR DE COLÔNIA DAS SEQUÊNCIAS HOMÓLOGAS À LOX i 1 – PAG. 42

FIGURA 21 – COMPARAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS CODIFICANTES DA LOX i 1 DE *L. intermedia* COM AS ENCONTRADAS EM *L. gaucho* (LOXI_G) E *L. laeta* (LOXI_L) – PAG. 43

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 12
2. OBJETIVOS 13
3. REVISÃO DA LITERATURA 13
3.1 ARANHAS DO GÊNERO *LOXOSCELES* 13
3.2 VENENO LOXOSCÉLICO 14
3.3 LOXOSCELISMO 18
3.4 PEPTÍDEOS ICK 19
3.5 ALÉRGENOS 21
3.5.1 ALÉRGENOS EM ARANHAS *LOXOSCELES* 21
4. MATERIAIS E MÉTODOS 23
4.1 OBTENÇÃO DAS ARANHAS DO GÊNERO LOXOSCELES 23
4.2 OBTENÇÃO DOS VENENOS LOXOSCÉLICOS 23
4.3 ELETROFORESE EM GEL DESNATURANTE DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE) 24
4.4 IMUNOENSAIO DE REATIVIDADE CRUZADA COM ANTIVENENOS 24
4.5 EXTRAÇÃO DAS GLÂNDULAS DE PRODUTORAS DE VENENO DE *L. intermedia*, *L. gaucho* E *L. laeta* 25
4.6 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO RNA 25
4.7 DESENHO DOS PRIMERS PARA AMPLIFICAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS DAS LITXS E DO ALÉRGENO 26
4.8 RT-PCR (TRANSCRIÇÃO REVERSA ACOPLADA À REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE) 27
4.9 AMPLIFICAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS DOS PEPTÍDEOS ICK E DAS SEQUÊNCIAS DO ALÉRGENO 27
4.10 CLONAGEM DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS NO VETOR pGEM-T EASY VECTOR E TRANSFORMAÇÃO DAS CONSTRUÇÕES EM BACTÉRIAS DA CEPA DH5α 28
4.11 MINIPREPARAÇÃO PLASMIDIAL E PCR DE COLÔNIA 28
4.12 PCR DE SEQUENCIAMENTO, PRECIPITAÇÃO E ANÁLISE DE SEQUENCIAMENTO 29
5. RESULTADOS 30
5.1 PERFIL PROTEICO ELETROFORÉTICO DOS VENENOS DE *L. intermedia*, *L. gaucho* E *L. laeta* EM SDS-PAGE 30

5.2 REATIVIDADE IMUNOLÓGICA CRUZADA DE UM PEPTÍDEO ICK RECOMBINANTE E ANTIVENENOS DE DIFERENTES ESPÉCIES DE ARANHAS DO GÊNERO *LOXOSCELES* 31

5.3 RASTREAMENTO DE SEQUÊNCIAS CODIFICANTES DOS PEPTÍDEOS ICK EM *L. gaucho* E *L. laeta* 32

5.4 RASTREAMENTO DAS SEQUÊNCIAS SEMELHANTES A Lox i 1 EM *L. laeta* E *L. gaucho* 41

6. DISCUSSÃO 44

7. CONCLUSÃO 50

8. REFERÊNCIAS 50

9. ANEXOS 55

10. ARTIGO PUBLICADO 58

1. INTRODUÇÃO

As aranhas do gênero *Loxosceles* estão distribuídas mundialmente e mais de 100 espécies já foram registradas, dentre as quais 12 são encontradas no Brasil. *L. rufescens, L. reclusa,* e, principalmente, *L. intermedia, L. laeta* e *L. gaucho* são as que possuem maior importância clínica em virtude dos acidentes de envenenamento. O veneno dessas aranhas é composto por uma mistura de toxinas como fosfolipases-D, hialuronidases, metaloproteases, peptídeos inseticidas, proteína tumoral controlada traducionalmente (TCTP) e proteínas alergênicas (GREMSKI *et al.,* 2014).

Peptídeos potencialmente inseticidas também são conhecidos como peptídeos ICK (Inhibitor Cystine Knot) ou notinas (do inglês "*knot"*, nó), pois possuem um motivo estrutural composto por folhas betas antiparalelas, estabilizadas por duas pontes dissulfeto e uma ponte dissulfeto intercruzando-as, formando um "nó" na parte central do peptídeo (DALY E CRAIK, 2011; SU *et al.,* 2016). Os peptídeos ICK são encontrados em altas percentagens nos venenos de aranhas e estão associados a funções importantes como captura de presas e defesa frente a predadores. A atividade desses peptídeos decorre da interação com canais iônicos voltagem-dependentes de sódio, cálcio e potássio, principalmente (HERZIG e KING 2015; LÓPEZ e POSSANI 2015; ARIKI *et al*., 2016). Devido a essas características, os peptídeos ICK são toxinas potencialmente visadas para produção de novas drogas ou produção de bioferramentas como bioinseticidas.

Existem mais de 800 moléculas alérgenas registradas no banco de dados "*Allergen Nomenclature Sub-committee"* (http://www.allergen.org) e destas, 242 estão relacionadas ao filo artrópoda. Em aranhas do gênero *Loxosceles*, uma sequência semelhante a alérgenos foi identificada por Gremski e colaboradores em 2010 pela análise do transcriptoma da glândula de veneno de *L. intermedia*. Adicionalmente também foram depositadas no GenBank 3 sequências incompletas de alérgenos de *L. laeta* (FERNANDES-PEDROSA *et al.,* 2008).

Apesar de muitas toxinas do veneno de aranhas do gênero *Loxosceles* já terem sido bem estudadas e caracterizadas, é necessário ampliar o conhecimento

sobre as toxinas encontradas nos venenos loxoscélicos. Esse trabalho contribui para os estudos das moléculas alergênicas e dos peptídeos ICK, duas famílias de toxinas já relatadas para venenos de aranhas do gênero *Loxosceles.* As sequências dessas toxinas obtidas por meio do presente trabalho podem ser exploradas para o desenvolvimento de insumos biotecnológicos ou farmacológicos.

2. OBJETIVOS

Objetivo Geral

• Identificar a presença de proteínas alergênicas e peptídeos ICK no veneno de aranhas das espécies *Loxosceles gaucho* e *Loxosceles laeta* por meio de análise de transcritos produzidos nas glândulas de veneno dessas aranhas.

Objetivos Específicos

• Avaliar a reatividade imunológica cruzada de um peptídeo ICK recombinante de *L. intermedia* (U2-SCTX-Li1b) e os soros hiperimunes anti-*L. gaucho* e anti-*L. laeta;*

• Obtenção dos cDNAs codificantes de peptídeos ICK e toxinas alergênicas por meio de RT-PCR a partir do RNA total extraído da glândula de veneno de *L. gaucho* e *L. laeta*;

• Clonagem dos cDNAs obtidos em vetor de clonagem e sequenciamento dos clones positivos obtidos;

• Comparação das sequências obtidas para *L. gaucho* e *L. laeta* com as sequências já descritas para a espécie *L. intermedia*.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 ARANHAS DO GÊNERO *LOXOSCELES*

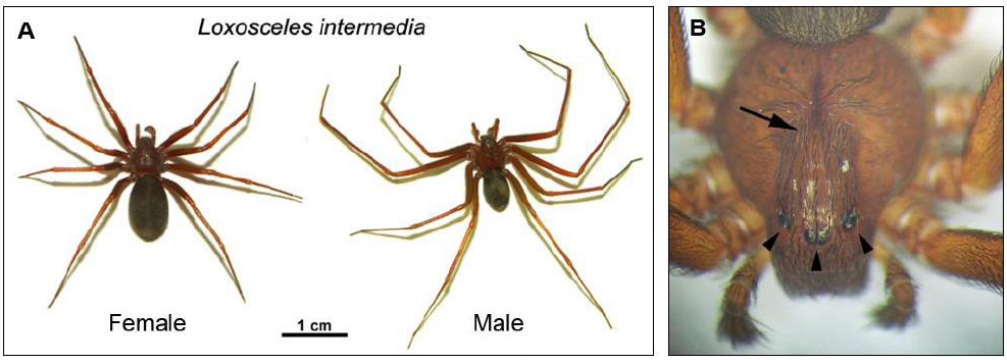
De acordo com Platnick (2014), as aranhas do gênero *Loxosceles* pertencem a família Sicariidae, sub-ordem Labidognatha, ordem Araneae, classe Arachnida, filo Artrópoda e já foram registradas, aproximadamente, 130 espécies. Elas são

popularmente conhecidas como aranhas-marrons, devido a sua coloração, ou aranhas–violino, em razão da presença de um desenho semelhante ao instrumento sobre o cefalotórax (FUTRELL *et al.*, 1992).

No Brasil, 12 espécies de aranhas do gênero *Loxosceles* são encontradas (GREMSKI *et al.,* 2014). O Paraná é o estado brasileiro com o maior número de notificações de acidentes com aranhas desse gênero. Em 2013 foram mais de 3.500 acidentes envolvendo essas aranhas, enquanto que em 2014 foram registrados, aproximadamente, 3.140 casos e em 2015, 2.629 casos (SINAN, 2015).

Morfologicamente essas aranhas são pequenas, variando de 1 a 5 cm, e possuem dimorfismo sexual, sendo a fêmea maior e com pernas mais curtas, enquanto que o macho é menor e com pernas mais alongadas. Além dessas características, as aranhas-marrons possuem três pares de olhos dispostos em semi-círculos e um desenho no cefalotórax parecido com um violino (FUTRELL *et al.*, 1992; CHAIM *et al.,* 2011; GREMSKI *et al.,* 2014)(Fig 01).

Figura 01 – Características morfologias de espécimes de *L. intermedia*



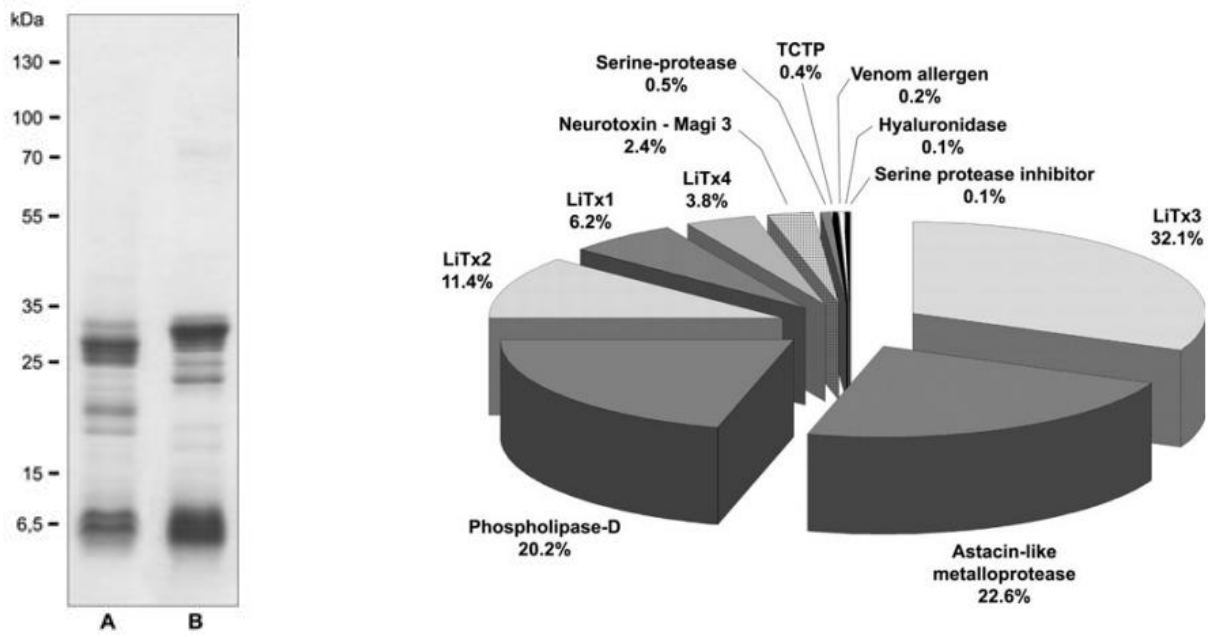
A - Espécimes de *L. intermedia* macho e fêmea, evidenciando dimorfismo sexual. B - Setas indicando os olhos em semicírculo e o desenho do violino no cefalotórax de um espécime de *L. intermedia* (Adaptado de CHAIM *et al.,* 2011)

3.2 VENENO LOXOSCÉLICO

O veneno das aranhas-marrons é um líquido cristalino e incolor, composto por proteínas, glicoproteínas e peptídeos de baixa massa molecular (GREMSKI *et al.,* 2014). O veneno é enriquecido em toxinas que apresentam massa molecular de 5-40 kDa (Fig 02). Por meio da análise de um transcriptoma da glândula de veneno de

L. intermedia foram identificadas sequências codificantes de diversos grupos de toxinas como fosfolipases-D (20,2%), hialuronidases (0,1%), metaloproteases (22,6%), peptídeos da família das notinas ou peptídeos ICK (55,9%), proteína tumoral controlada traducionalmente (TCTP)(0,4%) e serinoproteases (0,5%) (Fig 03) (GREMSKI *et al.,* 2010).

Figuras 02 e 03 – Gel de poliacrilamida do perfil proteico do veneno de *L. intermedia* e transcriptoma da glândula de veneno de *L. intermedia*



02. Gel de poliacrilamida (8-18%) representando o perfil eletroforético do veneno de *L. intermedia*. A maior parte das proteínas apresenta massa molecular que varia de 5 a 40 kDa. A- Amostra reduzida, B- Amostra não- reduzida. 03. Transcriptoma da glândula de veneno de *L. intermedia* separado nas porcentagens dos grupos de toxinas encontradas. (Adaptado de GREMSKI *et al.,* 2010).

Dentre as toxinas mais bem caracterizadas estão as fosfolipases-D. Elas também são conhecidas como toxinas dermonecróticas por desencadearem dermonecrose *in vivo*, além de serem responsáveis por eventos como permeabilidade vascular aumentada, edema, agregação plaquetária e nefrotoxicidade, sendo assim responsáveis pela maior parte dos sintomas desencadeados pelo envenenamento da aranha-marrom (CHAIM *et al.,* 2006; RIBEIRO *et al.*, 2007; APPEL *et al.*, 2008; PALUDO *et al.*, 2009; CHAVES-

MOREIRA *et al.*, 2011; MALAQUE *et al.*, 2011; VUITIKA *et al.,* 2016). Atualmente em *L. intermedia*, 7 isoformas foram clonadas, expressas e testadas biologicamente, e todas elas desencadearam dermonecrose em pele de coelhos (VUITIKA *et al.,* 2013; GREMSKI *et al.,* 2014). As mesmas atividades biológicas reportadas para *L. intermedia* também foram verificadas para as fosfolipases-D recombinantes de outras espécies de *Loxosceles* como as LIPLD1 e LIPLD2 de *L. laeta* (CATALÁN *et al.,* 2011), a LgRec1 de *L. gaucho* (MAGALHÃES *et al.,* 2013) e SMaseD de *L. reclusa* (LEE *et al.,* 2005).

Outra família de proteínas encontradas no veneno de *L. intermedia* são as metaloproteases. Inicialmente em *L. intermedia* foram identificadas duas proteases (Loxolisinas A e B) que hidrolisavam fibrinogênio, fibronectina e gelatina. Devido à dependência de zinco para a atividade dessas moléculas, elas foram caracterizadas como metaloproteases (FEITOSA *et al.,* 1998) pertencentes à família das astacinas (TREVISAN *et al.,* 2010). A primeira astacina tóxica descrita em venenos de animais foi a LALP (***L****oxosceles* **A**stacin-**L**ike **P**rotease), uma enzima identificada a partir da biblioteca de cDNA da glândula de veneno de *L. intermedia* (DA SILVEIRA *et al.,* 2007). Posteriormente, mais duas isoformas (LALP2 e LALP3) foram caracterizadas por Trevisan-Silva e colaboradores (2010). Além das caracterizações das isoformas das LALPS, MORGON e colaboradores em 2016 fizeram uma predição da estrutura em 3D do sítio catalítico da isoforma LALP3, permitindo a visualização dos aminoácidos que interagem e coordenam o íon zinco. As metaloproteases de aranhas do gênero *Loxosceles* são retratadas como um possível fator de espalhamento para outras toxinas do veneno durante, auxiliando no desenvolvimento da lesão dermonecrótica e também estão relacionadas a distúrbios hemorrágicos e aumento da permeabilidade vascular (GREMSKI *et al.,* 2014; MORGON *et al.,* 2016). As metaloproteases são toxinas encontradas também em *L. laeta* e *L. gaucho, L. deserta* e *L. reclusa* (BARBARO *et al.,* 2005; TREVISAN *et al.,* 2013).

A análise da glândula de veneno de *L. intermedia* também revelou a presença de transcritos relacionados a uma proteína da família TCTP (*Translationally Controlled Tumor Protein)* (GREMSKI *et al.,* 2010). Esta toxina é expressa constitutivamente em diversos tecidos e tipos celulares, e seu nome é devido a primeira proteína identificada dessa família, a qual se originou de um carcinoma

mamário humano (SADE *et al.,* 2012; GREMSKI *et al.,* 2014). A TCTP de *L. intermedia* recombinante foi nomeada de LiRecTCTP e é capaz de induzir permeabilidade microvascular em vasos da pele e edema na pata de camundongos (SADE *et al.,* 2012).

Também foram identificadas no veneno de aranhas *Loxosceles* as hialuronidases, as quais são enzimas associadas como um fator de espalhamento do veneno por aumentarem a permeabilidade vascular ao degradarem componentes da matriz extracelular (FERRER *et al.,* 2013). São encontradas não só no veneno da aranha-marrom, mas também no veneno de outras espécies como lagartos, abelhas e serpentes (GREMSKI *et al.,* 2014). Ferrer e colaboradores (2013) clonaram, expressaram e avaliaram as atividades de uma hialuronidase recombinante do veneno de *L. intermedia,* a qual foi denominada *Dietrich's Hyaluronidase*. Em testes feitos em pele de coelho, essa enzima mostrou-se capaz de aumentar a área de dermonecrose e edema induzidos por uma toxina dermonecrótica (LiRecDT1).

O transcriptoma da glândula de *L. intermedia* também revelou que mais de 50% dos transcritos codificavam toxinas potencialmente inseticidas (GREMSKI *et al.,* 2010). A alta prevalência dessas toxinas corrobora com a hipótese do propósito do veneno em paralisar e matar presas e se defender de predadores, os quais são, em sua maioria, insetos (MATSUBARA *et al.,* 2013). Por meio da análise de sequências de outros peptídeos presentes nos venenos de aranhas, observou-se que essas toxinas possuem uma grande quantidade de resíduos de cisteínas em sua estrutura primária, as quais estabelecem pontes dissulfeto intracadeia. Estas se organizam de forma a compor o motivo estrutural denominado "nó de cistina inibidor", ICK (Inhibitor Cystine Knot) e, por isso, são denominadas notinas (do inglês *"knot"*, nó) ou peptídeos ICK (CRAIK, DALY e WAINE, 2001; MOORE, LEUNG e COCHRAN, 2013). Muitas proteínas apresentam este nó, desde hormônios, inibidores enzimáticos e toxinas do veneno de artrópodes. Muitos peptídeos ICK produzidos por aranhas são capazes de interagir principalmente com canais iônicos de sódio e cálcio voltagem-dependentes (BELEBONI *et al.,* 2004).

Uma sequência encontrada no transcriptoma da glândula de veneno de *L. intermedia* apresentou uma alta semelhança com alérgenos de outros animais. Essa sequência corresponde a 0,2% dos transcritos e foi posteriormente nomeada de Lox i 1 (FERRER *et al.,* 2010). Essa molécula alergênica foi enquadrada como membro

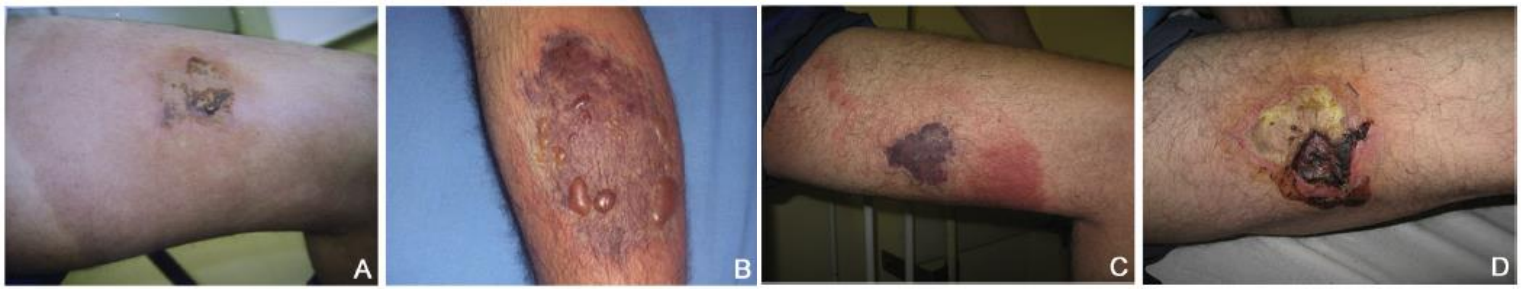
da família CAP/CRiSP e são associadas com a modulação dos canais iônicos (GIBBS *et al.,* 2008; SCHNEITER e PIETRO., 2013).

3.3 LOXOSCELISMO

O quadro de sinais e sintomas clínicos decorrentes da picada de aranhas do gênero *Loxosceles* é denominado Loxoscelismo e pode ser classificado em duas variantes: cutâneo e sistêmico. Essas duas formas podem ocorrer separadamente ou simultaneamente (FUTRELL *et al.,* 1992). A manifestação clínica mais comum do loxoscelismo cutâneo é a lesão dermonecrótica. Inicialmente, no local da picada, há uma sensação de ardência, dor e eritema, e, após algumas horas, há a formação de uma região pálida chamada de placa marmórea (Fig 04 A-C). Após aproximadamente 72 horas da picada surge a necrose (Fig 04 D) e, posteriormente, uma escara de difícil cicatrização é formada (ISBISTER e FAN, 2011; GREMSKI *et al.,* 2014).

O loxoscelismo sistêmico é a manifestação clínica mais grave e mais rara decorrente do envenenamento pela picada de aranhas do gênero *Loxosceles*. É caracterizada por febre, cefaleia, náusea, hematúria e coagulação intravascular disseminada. Em casos extremos, pacientes apresentando hemólise extensa podem apresentar danos nos rins, os quais podem ocasionar insuficiência renal aguda e, nos casos mais severos, levar a óbito (ISBISTER e FAN, 2011; GREMSKI *et al.,* 2014).

Figura 04 – Lesões do loxoscelismo cutâneo



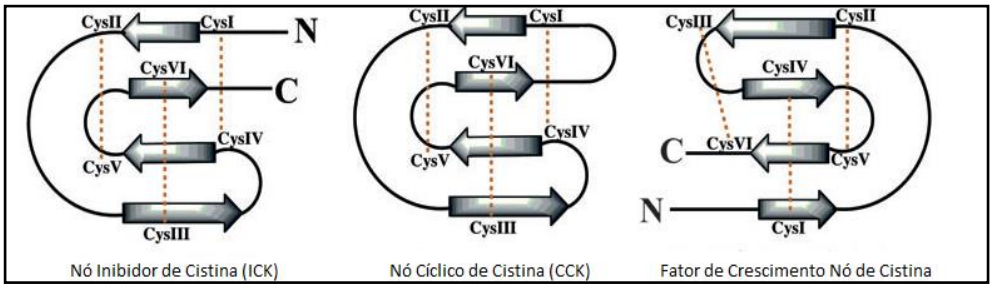
A- Dois dias após a picada de aranha-marrom na coxa de uma paciente, há formação de edema, eritema e áreas hemorrágicas. B- Paciente picado na região do antebraço, também dois dias após a picada. Houve formação de bolhas serosas, e posteriormente erupção cutânea, com a sensação de

dor ardente. C e D – 4 dias após a mordida, a ferida apresentava edema, eritema, placa marmórea (região pálida) e a necrose surgiu nos 20 dias posteriores (Adaptado de GREMSKI *et al.,* 2014).

3.4 PEPTÍDEOS ICK

O “nó de cistina” é um motivo estrutural que é composto por três pontes dissulfeto, sendo que duas delas, juntamente com os segmentos do esqueleto proteico, formam um anel, o qual é cruzado pela terceira ponte dissulfeto, estabelecendo um pseudonó estrutural. Esse motivo estrutural é classificado em três grupos: o nó de cistina inibidor (ICK), o nó cíclico de cistina (CCK) e o nó de cistina de fator de crescimento (GFCK) (Fig 05). Muitas proteínas apresentam este nó, como hormônios, inibidores enzimáticos e toxinas do veneno de artrópodes (DALY E CRAIK, 2011).

Figura 05 – Estrutura básica dos três grupos de proteínas que contem o nó de cistina



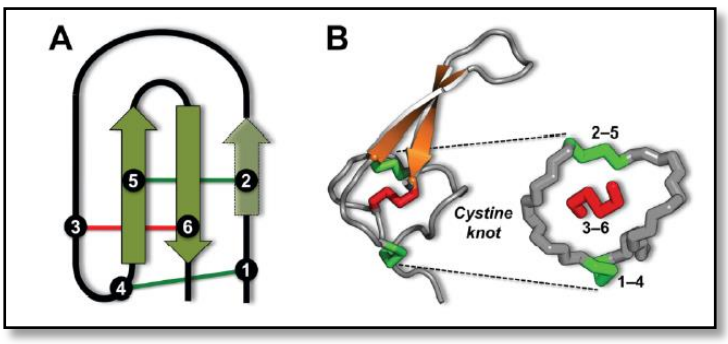
As setas representam as folhas betas e as linhas pontilhadas as pontes dissulfeto. As cisteínas são numeradas de I a VI (Adaptado de LYER e ACHARYA, 2011).

Toxinas com atividades inseticidas de *L. intermedia* foram primeiramente descritas e caracterizadas por de Castro e colaboradores em 2004. Elas foram designadas LiTx1, LiTx2 e LiTx3, e possuíam massas moleculares entre 5,6k Da e 7,9k Da. Análises de sequências aminoacídicas semelhantes a essas toxinas as relacionaram com peptídeos que possuem ação sobre canais iônicos voltagem-dependentes de sódio e cálcio. Em 2006, foi depositado no GenBank uma sequência referente a uma possível nova isoforma dos peptídeos ICK, a LiTx4. Posteriormente, um estudo revelou que mais de 50% dos transcritos de toxinas da glândula de veneno de *L. intermedia* codificavam peptídeos potencialmente inseticidas da família

das notinas (GREMSKI *et al.,* 2010). Esses peptídeos podem ter de 3 a 10 resíduos de cisteínas e foram enquadrados na família das notinas devido a seu motivo estrutural (Fig 06). Esses peptídeos são conhecidos como notinas ou peptídeos ICK (DALY E CRAIK., 2011; SU *et al.,* 2016).

Essas toxinas são encontradas em altas percentagens nos venenos de aranhas e escorpiões e possuem ação sobre canais de sódio e cálcio voltagem-dependentes. Por exemplo, um peptídeo isolado do veneno da tarântula *Hysterocrates gigas* (SNX-482) apresentou atividade de inibição de canais de cálcio (Cav2.3) (NEWCOMB *et al.,* 1998) e, mais recentemente, Luo e colaboradores (2014) testaram um peptídeo ICK da aranha *Chilobrachys jingzhao* (JZTX-V) e este mostrou-se capaz de inibir canais de sódio de ratos (HERZIG e KING 2015; LÓPEZ e POSSANI 2015; ARIKI *et al*., 2016). Além dessa interação, estudos mostram que alguns peptídeos ICK têm ação antifúngica, antimicrobiana e inseticida, como por exemplo, o peptídeo ICK da abelha *Apis cerana* (AcICK). Park e colaboradores em 2014 demonstraram que o AcICK possui atividade antifúngica e inseticida. O peptídeo ICK Li1b de *L. intermedia*, obtido de forma recombinante em bactérias, demonstrou atividade inseticida sobre moscas da espécie *Lucilia cuprina*, visualizada por meio de paralisia por mais de 24 horas (MATSUBARA *et al.,* 2016). Devido ao seu motivo estrutural, esses peptídeos são notavelmente resistentes a variações ambientais, o que foi demonstrado em ensaios realizados por Herzig e King (2015) com o peptídeo ICK Hv1a da aranha *Hadronyche versuta*. O peptídeo em questão demonstrou alta resistência a degradação proteolítica e se manteve estável em pH variando de 1-8 e em temperaturas maiores que 75ºC.

Figura 06 – Esquema do motivo estrutural "*Inhibitor Cystine Knot*" (ICK)



A – Esquema do motivo estrutural ICK, composto pelas folhas beta antiparalelas (em verde) estabilizadas pelo nó de cistina. As cisteínas que formam o nó estão numeradas de 1-6. B – Esquema

genérico da estrutura tridimensional dos peptídeos ICK, com ênfase no motivo estrutural (Adaptado de SAEZ *et al*., 2010).

3.5 ALÉRGENOS

Alérgenos, por definição, são moléculas que desencadeiam a produção de anticorpos IgE e reações alérgicas. Além de relacionada com alergias, a IgE também tem sua função na resposta imune relacionada a vermes parasitas. A produção de IgE é regulada por células T_H2 CD4 produtoras de interleucina 4 (IL-4) e interleucina 13 (IL-13) (MURPHY, 2010).

Anticorpos IgE que se ligam em moléculas alérgenas são encontradas em mamíferos e medeiam respostas de hipersensibilidade do tipo I. No primeiro contato com um alérgeno, estes são apresentados como antígenos para os linfócitos T, desencadeando em seguida a produção de anticorpos IgE específicos por linfócitos T que apresentam receptor CD4. Também há liberação de citocinas como a interleucina 4. Após o segundo contato com o mesmo alérgeno, há liberação de outras moléculas como a histamina, que desencadeiam os sintomas das reações alérgicas (CUI, 2013).

Mais de 800 moléculas alérgenas foram registradas no banco de dados Allergen Nomenclature Sub-committee (http://www.allergen.org) e destas, 242 são do filo artrópoda. Há um amplo número de estudos que pesquisam moléculas alérgenas em animais do filo artrópoda como, por exemplo, baratas, vespas, formigas, carrapatos, mariposas e aranhas (HOFFMAN, 2010; LOCKWOOD *et al.,* 2012; BERARDI *et al.,* 2015; ARRUDA *et al.,* 2014; PENG *et al.,* 2016; FANG *et al.,* 2015).

3.5.1 ALÉRGENOS EM ARANHAS *LOXOSCELES*

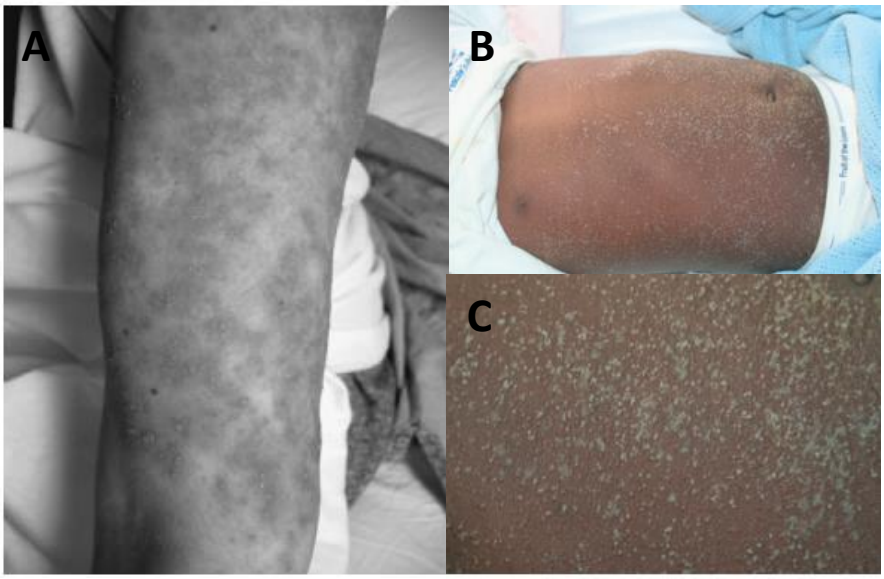
A análise do transcriptoma da glândula de veneno de *L. intermedia* produzido por GREMSKI e colaboradores (2010) identificou uma sequência semelhante a alérgenos presentes em venenos e secreções de outros animais. Essa sequência encontrada apresentou maior identidade aminoacídica (positividade) com os alérgenos de formigas das espécies *Pachycondyla chinensis* e *Solenopsis invicta*

(36 e 37), além de similaridade significativa com alérgenos do piolho *Pediculus humanus* (35), da vespa *Rhynchium brunneum* (33), da aranha *Lycosa singoriensis (29*) e do crustáceo *Caligus rogercresseyi* (22). Essa proteína possui um peptídeo-sinal, é composta por 415 aminoácidos, tem ponto isoelétrico de 8.4 e um tamanho de aproximadamente 46 kDa (FERRER *et al*, 2010). Posteriormente essa molécula foi nomeada de Lox i 1 de acordo com a nomenclatura proposta por King (2005) e Larsen (2006), na qual o alérgeno é descrito pelas primeiras 3 letras do gênero, a primeira letra da espécie e um número arábico. Ela foi inserida na família CAP/CRiSP, as quais são caracterizadas por serem ricas em resíduos de cisteínas (FERRER *et al.*, 2010).

Proteínas da família CAP são encontradas em diversos organismos como mamíferos, cobras, lagartos, aranhas e insetos, e estão relacionadas com processos biológicos como defesa imune em mamíferos, maturação de esperma, toxicidade de venenos e virulência de patógenos. Existem três grupos de proteínas dessa família, uma delas são as proteínas Antígeno 5 (Ag5), as quais são encontradas abundantemente nos ductos secretores de veneno de insetos, desencadeando respostas alérgicas. Outro membro fundador da família CAP são as proteínas ricas em resíduos de cisteína (CRISPs). Essas proteínas são encontradas no trato reprodutor de mamíferos e no ducto secretor de veneno de lagartos, cobras e outros vertebrados. A estrutura dessas moléculas revela a presença de um domínio C-terminal rico em cisteínas e foram associadas com a modulação dos canais iônicos (GIBBS *et al.,* 2008; SCHNEITER e PIETRO., 2013).

Reações de hipersensibilidades relatadas com aranhas do gênero *Loxosceles* são raras, entretanto existem registros de reações alérgicas envolvendo espécies como *L. reclusa* e *L. rufescens* (GREMSKI *et al.,* 2014). Em ambos os casos relatados houve o desenvolvimento de exantema pustuloso generalizado e uma reação cutânea severa caracterizada pelo aparecimento de pequenas pústulas sobre uma pele eritematosa, seguida de febre (Fig 07) (MAKRIS *et al.,* 2009, LANE *et al.,* 2011).

Figura 07 – Reações de hipersensibilidade decorrentes de picadas de aranhas do gênero *Loxosceles*



A - Exantema pustuloso generalizado causado pela picada de *L. rufescens* (Adaptado de MAKRIS *et al*., 2009). B - Erupção de pústulas decorrentes da picada de *L. reclusa*. C - Zoom da erupção de pústulas (Adaptado de LANE *et al.,* 2011).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DAS ARANHAS DO GÊNERO LOXOSCELES

As aranhas adultas de *L. intermedia* foram capturadas na cidade da Lapa-PR (Sob autorização do SISBIO Número 29801-5, em anexo) e mantidas no laboratório com trocas de água semanais e alimentação a base de tenébrios uma vez por mês. As aranhas das espécies *L. laeta* e *L. gaucho* foram cedidos gentilmente pelo Dr. João Carlos Minozzo, do CPPI (Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos).

4.2 OBTENÇÃO DOS VENENOS LOXOSCÉLICOS

Para a extração do veneno, as aranhas foram privadas de alimentação por 2 semanas, a fim de evitar a contaminação com egesta. As aranhas foram submetidas a eletrochoque de 15V no cefalotórax (FEITOSA *et al.*, 1998), e a gotícula cristalina de veneno foi coletada das quelíceras com micropipeta, solubilizada em PBS (NaCl

100 mM; Tampão Fosfato de Sódio 10 mM; pH 7,3) e mantida em gelo até o final da coleta. Os venenos de *L. laeta* e *L. gaucho* foram gentilmente cedidas pelo CPPI, Prof. Dr. João Carlos Minoso e MSc. Isolete de Pauli. As proteínas dos venenos das três espécies foram dosados por meio da técnica de Bradford (BRADFORD, 1976).

4.3 ELETROFORESE EM GEL DESNATURANTE DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)

O gel gradiente (10-20%) foi preparado com a mistura de solução de acrilamida (acrilamida e bis-acrilamida), Lower Gel Buffer (1,5 M Tris-Cl, pH 8,8 e 0,4% dodecil sulfato de sódio (SDS)), água destilada e os catalisadores APS (Persulfato de amônio 10%) e TEMED (N,N,N',N'-Tetrametiletilenodiamina). A solução de poliacrilamida foi polimerizada entre duas placas de vidro e adicionada uma fina camada de butanol na parte superior. Em seguida, ao retirar a água e o butanol, o "*stacking"* (com 5% de poliacrilamida e catalisadores) foi colocado em cima do gel e adicionado um pente para a formação dos poços. Após a retirada dos pentes, os poços foram secados e as amostras foram aplicadas. As amostras de veneno das espécies *L. gaucho* e *L. laeta* (5 ug) foram corridas no gel com SDS, sob condições redutoras (5% β-mercaptoetanol) (LAEMMLI, U. K 1970). A amperagem utilizada na corrida foi de 25 mA e após o término, o gel foi corado usando o método de prata monocromática conforme WRAY *et al.,* 1981.

4.4 IMUNOENSAIO DE REATIVIDADE CRUZADA COM ANTIVENENOS

Após uma corrida eletroforética em gel de poliacrilamida 18%, as amostras do peptídeo ICK recombinante de *L. intermedia* U2-SCTX-Li1b (MATSUBARA *et al*., 2013), contendo 5% de β-mercaptoetanol, foram fervidas por 5 minutos a 100°C. Logo após, os perfis proteicos foram transferidos para uma membrana de nitrocelulose com uma voltagem constante de 100 V. Essas membranas foram coradas com Ponceau-S. Fitas de nitrocelulose foram inicialmente incubadas por uma hora em solução de bloqueio contendo PBS-caseína 3% (p/v) e, em seguida, essas fitas foram incubadas individualmente com 2 ml dos soros pré-imunes e hiperimunes antiveneno total (diluídos 1:1000 na mesma solução de bloqueio): anti-

L. intermedia, anti-*L. laeta* e anti-*L. gaucho*. A lavagem das fitas foi realizada com PBS-caseína (5 vezes, por 3 minutos cada), e, em sequência, foram incubadas com anticorpos secundários anti-IgG de coelho conjugado à fosfatase alcalina (diluição de 1:8000) por uma hora, à temperatura ambiente. Após 5 lavagens, foram utilizados para revelação da reação os reagentes BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indoil fosfato) e o cromógeno NBT ("*nitro blue tetrazolium*") (Promega) em tampão ótimo para atividade de fosfatase alcalina (Tris-HCl 100 mM, pH 9,5; NaCl 100 mM e $MgCl_2$ 5 mM) (HARLOW e LANE, 1988).

4.5 EXTRAÇÃO DAS GLÂNDULAS DE PRODUTORAS DE VENENO DE *L. intermedia*, *L. gaucho* E *L. laeta*

Foram utilizadas 30 espécies de *L. laeta* e *L. gaucho* para a extração das glândulas de veneno. Os materiais utilizados para a extração das glândulas, como placas de vidro, alfinetes, bastão de vidro e lâminas de bisturi foram esterilizados por 8 horas, a 200ºC, em uma estufa. Outros materiais como microtubos de 2 ml e ponteiras foram autoclavados e as bancadas foram limpas com etanol 70% para evitar contaminações por RNAses. Além disso, todo o procedimento foi realizado com luvas e o uso de máscaras.

4.6 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO RNA

As glândulas de veneno foram extraídas e então congeladas em microtubos mantidos em gelo seco. O RNA foi extraído pelo método de TRizol® (CHOMCZYNSKI, 1993), o qual consiste na adição de 750 µL do reagente TRIzol®, seguido da homogeneização das amostras com um homogeneizador de tecidos (Tecnal, São Paulo, Brasil). Depois da incubação das amostras por 5 minutos, à temperatura ambiente, foram adicionados aos microtubos 150 µL de clorofórmio. Na sequência, os microtubos foram vortexados rapidamente e, em seguida, centrifugados a 20.000 g, por 20 min, a 4°C. Após isso, houve a formação de 3 fases: a aquosa (a que contém o RNA), a proteica e a orgânica. Foi retirado a fase que contém o RNA e foi adicionado isopropanol para a precipitação, seguido de

centrifugações, isolamento de *pellet*, lavagem com etanol 75% e ressuspenssão do *pellet* com água ultrapura tratada com dietilpirocarbonato - DEPC (água ultrapura homogeneizada com 0,1% de DEPC por duas horas e autoclavada por 45 minutos) (CHOMECZINSKI, 1993).

O RNA total foi quantificado por espectrofotometria em espectrofotômetro Nanovue (GE Healthcare) l, o qual tem a capacidade de medir a quantidade de RNA contido na amostra e o seu grau de pureza. Além da quantidade e da pureza obtida de RNA, sua integridade também foi avaliada por meio de um gel de agarose na concentração de 1% com brometo de etídio (1:20.000) em tampão TAE (Tris base 40 mM, acetato 20 mM, EDTA 1 mM), a uma voltagem de 5 V/cm. O aparelho utilizado para a visualização e análise foi o Chemidoc – XRS e software Quantity One – SW (BioRad).

4.7 DESENHO DOS PRIMERS PARA AMPLIFICAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS DAS LITXS E DO ALÉRGENO

Os *primers* específicos foram desenhados manualmente com base nas sequências obtidas no estudo do transcriptoma da glândula de veneno de *L. intermedia* (GREMSKI *et al.,* 2010). O algoritimo OligoAnalyzer versão 3.1 foi utilizado como ferramenta para a análise dos *primers* desenhados, no intuito de confirmar os parâmetros desejados. Os *primers* utilizados e as temperaturas de anelamento para cada toxina estão listados na tabela 1.

Tabela 1: Sequências e temperatura de anelamento dos *primers* sintetizados para a amplificação dos peptídeos ICK e da molécula alergênica de *L. laeta* e *L. gaucho*.

Primer	Sequência	Temperatura de Anelamento
LiTx1	ATGAGGTTTCTCGTTGGAGCA	56,7º C
LiTx2	ATGAAGCTGCTGTTTGAAGGA	56,0º C
LiTx3	CTAGCCATATATGTGGCGAC	54,6º C
LiTx4	ATGAAGCTGTTGTTTGGAG	53,9º C
Lox i 1 *Foward*	ATGTCTGCGATGTATCAAATC	53,1ºC
Lox i 1 *Reverse*	CTAACAGCTTCCGGATTTTAC	53,4ºC

4.8 RT-PCR (TRANSCRIÇÃO REVERSA ACOPLADA À REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE)

Essa técnica foi utilizada para obter os cDNAs correspondentes aos mRNAs dos peptídeos ICK e do alérgeno de *L. gaucho* e *L. laeta.* Primeiramente, o *primer* oligo(dT)$_{17}$ adaptor (0,5 µg/µL), 1 µg de RNA total 1 µg de *L. laeta* ou *L. gaucho* e água suficiente para 5 µL foram adicionados a um microtubo e este foi incubado em termociclador programado para a temperatura de 72ºC, por 5 minutos. Em seguida, o microtubo foi mantido em gelo por 3 a 5 minutos. Logo após, foi adicionado à reação o tampão para a enzima transcriptase reversa (1x), 2,5 mM de $MgCl_2$, 0,4 mM de dNTPs, 20 U de inibidor de RNAse e água DEPC-tratada suficiente para 10µL. As amostras foram mantidas no termociclador a uma temperatura de 42ºC e depois de 1 minuto foi adicionada a enzima Transcriptase Reversa (200 U). O protocolo utilizado no termociclador foi: um ciclo de 25°C/5min, 42°C/60min, 70°C/10min e temperatura final de 4°C. A precipitação dos cDNAs foi realizada com acetato de amônio (2,5 M) e etanol absoluto gelado (0,1v:3v de amostra) e as amostras foram incubadas por 30 minutos, a -20ºC. Após a centrifugação por 30 minutos, a 4°C, 20.000 g, o sobrenadante foi retirado e o *pellet* lavado com 750 µL de etanol 70% e uma nova centrifugação foi realizada por 5 minutos. Após a retirada do sobrenadante o *pellet* foi ressuspendido em 12 µl de água ultrapura (Adaptado de SAMBROOK, 2011).

4.9 AMPLIFICAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS DOS PEPTÍDEOS ICK E DAS SEQUÊNCIAS DO ALÉRGENO

Após obter o cDNA pela técnica de RT-PCR mencionada anteriormente, foi feita uma reação de PCR convencional utilizando: o tampão da T*aq* DNA polimerase (1x), $MgCl_2$ (1,5 mM), dNTPs (0,2 mM), o *primer reverse* Oligo(dT)17-adaptor (0,4 µM), o cDNA de *L. gaucho* ou *L. laeta* (3µ, equivalente a 10% do volume da reação), a enzima T*aq* DNA polimerase (1,25U/50µL) e os *primers fowards* específicos para cada sequência (LiTx 1-4 e alérgeno). A programação no termociclador foi a seguinte: 95°C/2 min (1 ciclo); 95°C/30 s, temperatura de anelamento média entre os *primers* específicos e o Oligo(dT)17-adaptor/30 s, 72°C/2 min (35 ciclos); 72°C/10

min (1ciclo); 4°C. A análise dos produtos obtidos foi realizada por um gel de agarose 1,5% e, após a confirmação da amplificação, as bandas foram cortadas e gel-extraídas, seguindo o protocolo do Kit Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ, USA). As amostras eluídas foram dosadas no aparelho NanoVue Plus® (GE Healthcare Life Sciences).

4.10 CLONAGEM DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS NO VETOR pGEM-T EASY VECTOR E TRANSFORMAÇÃO DAS CONSTRUÇÕES EM BACTÉRIAS DA CEPA DH5α

A ligação dos produtos da PCR no vetor pGEM-T Easy Vector foi realizada utilizando: o tampão para a enzima T4 DNA Ligase (2X), a enzima T4 DNA Ligase (3 U/µl) e o vetor pGEM-T Easy Vector (50 ng), em uma proporção de 3:1 (inserto/vetor). As reações foram mantidas a 22ºC por no mínimo 16 horas no termociclador ou Banho-Maria.

Para transformar as construções (inserto + vetor) nas cepas eletrocompetentes de *E. coli* DH5α foram utilizadas 1 µl da ligação. A amostra da reação de ligação mais 50 µl da cultura de bactéria foram homogeneizadas em uma cubeta de vidro e colocadas no aparelho Gene Pulser X-Cell (BioRad). As bactérias foram recuperadas em meio SOC (triptona 20 g/L, extrato de levedura 5 g/L, NaCl 0,5 g/L, KCl 2,5 mM, $MgCl_2$ 10 mM, $MgSO_4$ 10 mM e glicose 0,2 M) e incubadas por, aproximadamente, uma hora, sob moderada agitação (aproximadamente 100 rpm), a 37°C. Após esse período, as bactérias foram plaqueadas em duas placas (uma com 100 µl da suspensão bacteriana e outra com os 900 µl restante) com o meio LB ágar (triptona 10 g/L, extrato de levedura 5 g/L, NaCl 10 g/L, agar-ágar 15 g/L) suplementado com ampicilina (100 µg/ml) e tratado com IPTG (100 mM) e X-GAL (20 mg/ml). Ambas foram incubadas a 37ºC por 16 horas.

4.11 MINIPREPARAÇÃO PLASMIDIAL E PCR DE COLÔNIA

Aproximadamente 50 colônias foram selecionadas dos materiais oriundos de *L. gaucho* e *L. laeta* para a PCR de colônia tanto dos grupos de peptídeos ICK quanto das moléculas alergênicas. As colônias foram coletadas com um palito de madeira autoclavado e transferidas para microtubos de 0,2 mL. Com o mesmo

palito, as colônias foram subcultivadas em uma placa-mãe denominada *master plater*, a qual possuia quadrados numerados para posterior identificação. Foram adicionados aos tubos tampão para *Taq* DNA polimerase (1X), dNTPs (0,2 mM), $MgCl_2$ (1,5 mM), *primer* T7 sense *forward* (0,2 µM), *primer* SP6 *reverse* (0,2 µM) e enzima *Taq* DNA polimerase (1,25U/50µl). A programação no termociclador foi: 95°C/5 min (1 ciclo); 95°C/30 s, média das Tm (temperatura de "*melting"*) dos *primers* diminuída de 5°C/30 s e 72°C/2 min (35 ciclos); 72°C/10 min (1 ciclo); 4°C (ciclo de espera).

A análise dos produtos de PCR de colônia amplificados foi realizada por meio de gel de agarose 1,5% e o resultado foi avaliado e fotodocumentado com auxílio do equipamento de captura de imagem Chemidoc (Bio-Rad) por meio do software Quantity One.

Os clones confirmados como positivos foram selecionados para um pré-inóculo. Utilizando o meio LB líquido com ampicilina (100 µg/mL), foram usados palitos estéreis para coletar um clone positivo e o pré-inóculo foi deixado sobre agitação constante na temperatura de 37ºC. Após 16 horas, foi seguido o protocolo recomendado no Kit Miniprep Pure Link Quick Plamid (Invitrogen) para a extração da construção. A dosagem foi pelo aparelho NanoVue Plus® (GE Healthcare Life Sciences).

4.12 PCR DE SEQUENCIAMENTO, PRECIPITAÇÃO E ANÁLISE DE SEQUENCIAMENTO

Os reagentes utilizados para a PCR de sequenciamento foram: o reagente BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing, o tampão de sequenciamento (1X) e os *primers forward* T7 ou o *primer reverse* SP6 (0,8 pmol) e 400 ng do DNA molde (construções pGEM-T Easy Vector + sequências dos peptídeos ICK/alérgeno). Cada clone foi feito em duplicata, um com o *primer* T7 e o outro com o *primer* SP6. Os ciclos programados no termociclador foram 95°C/20 min, 50°C/15 s e 60°C/4 min (35 ciclos); 4°C (ciclo de espera). Em seguida, os produtos obtidos da PCR foram submetidos ao protocolo de precipitação por etanol absoluto e acetato de sódio-EDTA (1,5 M) (proporção 3:0,1 V:V) e enfim, sequenciados no sequenciador ABI PRISM 3500 Genetic Analyser (Applied Biosystems, Foster City, EUA).

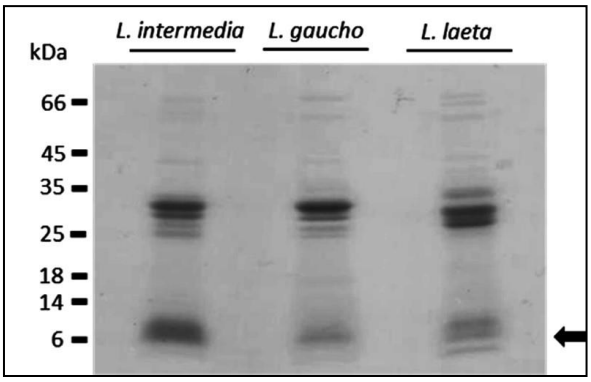
Na análise de bioinformática foram utilizados softwares como FinchTV Version 1.4.0 (eletroferogramas), Open Reading Frame Finder e o Expasy Translate para analisar as possíveis sequências de aminoácidos. A ferramenta online Clustal Omega (http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/) foi utilizada para produção dos alinhamentos das sequências obtidas com aquelas referentes aos peptídeos LiTx de *L. intermedia* descritos por De Castro e colaboradores (2004) e depositadas no banco de dados *online* GenBank, como também as sequências obtidas por GREMSKI e colaboradores (2010) no estudo do transcriptoma da glândula de veneno de *L. intermedia*. Para o alérgeno, foram alinhadas as sequências obtidas com a sequência de *L. intermedia* obtida por FERRER em 2010. Na ferramenta online BOXSHADE Server versão 3.21 (disponível em http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html) foram realizados os alinhamentos gráficos e no BLASTp (disponível em http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins) foi possível determinar as porcentagens de identidade das sequências obtidas de *L. gaucho* e *L. laeta* em relação às sequências mencionadas anteriormente de De Castro e colaboradores (2004) e Ferrer (2010).

5. RESULTADOS

5.1 PERFIL PROTEICO ELETROFORÉTICO DOS VENENOS DE *L. intermedia*, *L. gaucho* E *L. laeta* EM SDS-PAGE

Os venenos brutos de *L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta* foram analisados e comparados por meio de uma corrida eletroforética em gel desnaturante de poliacrilamida gradiente 10-20%. Os perfis protéicos, caracterizados por regiões enriquecidas em proteínas ou peptídeos, mostraram-se similares. As bandas de 30 a 35 kDa no gel estão associadas às enzimas fosfolipases-D, enquanto que as bandas relativas às massas de 5 a 10 kDa correspondem às massas esperadas para os peptídeos ICK, sugerindo a presença desses peptídeos nos venenos das 3 espécies de *Loxosceles* (Fig 08).

Figura 08 – Gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) gradiente 10-20% com amostras brutas dos venenos das espécies de *Loxosceles.*

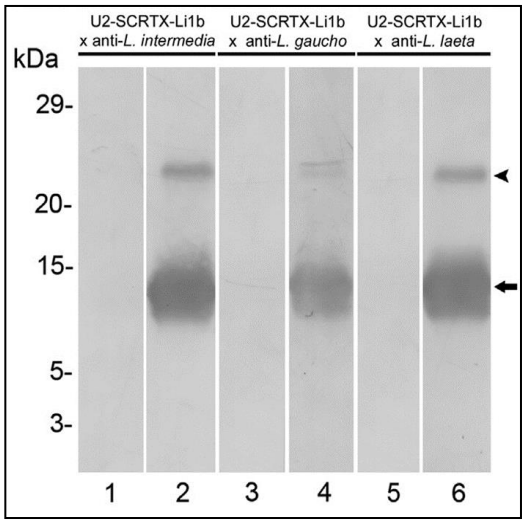


Região correspondente aos peptídeos de baixa massa presentes nos venenos (seta).

5.2 REATIVIDADE IMUNOLÓGICA CRUZADA DE UM PEPTÍDEO ICK RECOMBINANTE E ANTIVENENOS DE DIFERENTES ESPÉCIES DE ARANHAS DO GÊNERO *LOXOSCELES*

Em um imunoensaio de *western blotting*, o peptídeo recombinante U_2-SCTX-Li1b (MATSUBARA, 2013) foi reconhecido pelos soros hiperimunes que reconhecem o veneno das espécies de *Loxosceles* estudadas. Esse resultado indica a presença de toxinas nativas com epítopos lineares relacionados com peptídeos da família ICK nos venenos das 3 espécies (Fig 09).

Figura 09 – Reatividade imunológica cruzada dos soros hiperimunes que reconhecem o veneno total de diferentes espécies de aranhas do gênero *Loxosceles* com o peptídeo recombinante U_2-SCTX-Li1b.

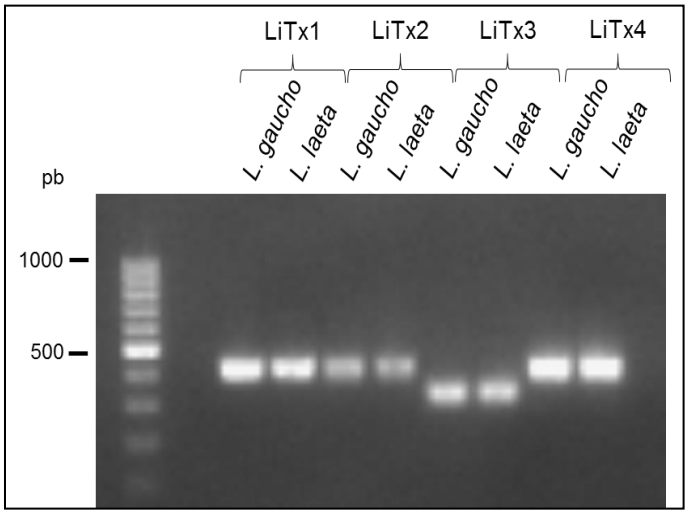


1, 3 e 5 - Amostras do peptídeo recombinante U_2-SCTX-Li1b foram submetidas a SDS-PAGE 18% sob condições redutoras e transferidas para membranas de nitrocelulose. Em seguida, foram expostas aos soros pré-imunes. 2, 4 e 6 – Exposta ao soro hiperimune que reconhece: 2- o veneno total de *L. intermedia*, 4 – o veneno total de *L. gaucho* e 6 – o veneno total de *L. laeta*. Reações positivas podem ser verificadas tanto para as formas monoméricas (~12 kDa; seta) quanto para as formas diméricas (~24 kDa; cabeça de seta) do peptídeo recombinante.

5.3 RASTREAMENTO DE SEQUÊNCIAS CODIFICANTES DOS PEPTÍDEOS ICK EM *L. gaucho* E *L. laeta*

A técnica RT-PCR foi utilizada para a obtenção dos cDNAs relativos às toxinas produzidas nas glândulas de *L. gaucho* e *L laeta* a partir do RNA total extraído. Para a amplificação dos cDNAs obtidos, em cada reação de PCR, foram utilizados *primers* específicos do grupo de toxina a ser rastreado. As reações de amplificação obtiveram sucesso e indicaram um tamanho de 400 pb para os peptídeos semelhantes a LiTx 1, LiTx2 e LiTx4 para *L. gaucho* e *L. laeta* e de 300 pb para os peptídeos semelhantes a LiTx3 também nas duas espécies de *Loxosceles* (Fig 10).

Figura 10 – Amplificação das sequências relativas aos diferentes grupos de LiTx (Litx1-4) analisadas por eletroforese em gel de agarose 1,5%

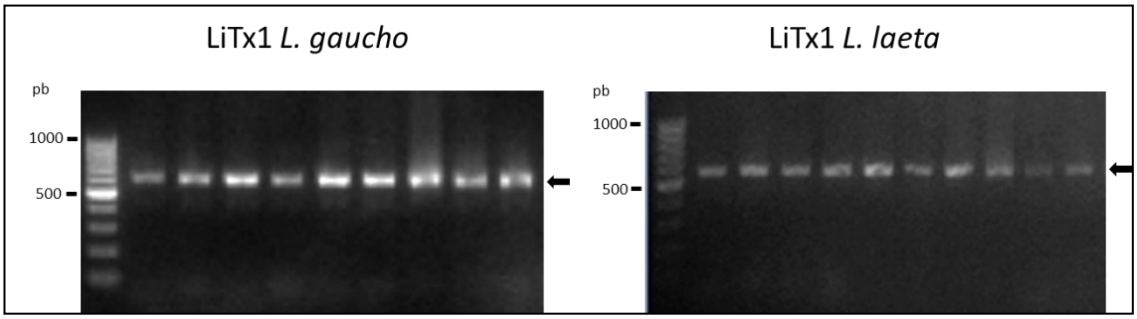


A amplificação foi realizada por meio de PCR convencional com a utilização de um par de *primers* composto pelo *primer forward* gene-específico do grupo de LiTx a ser rastreado e o *primer reverse* oligo $(dT)_{17}$-adaptor.

Após a corrida em gel de agarose, as bandas visualizadas correspondentes às sequências dos peptídeos foram extraídas, purificadas, eluídas em água ultrapura

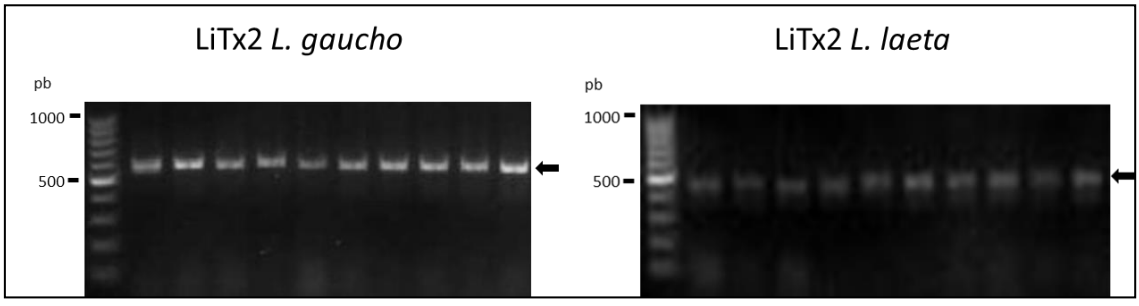
e dosadas. Nesse material foi realizada a reação de ligação no vetor de clonagem pGEM-T. Em seguida, o produto dessa ligação foi transformado por eletroporação na cepa de bactéria *E. coli* DH5α. Para confirmação de clones positivos, foram testados 50 clones para cada grupo de peptídeos das duas espécies em PCRs de colônia. Mais de 90% de todos os clones de bactérias contendo o inserto dos grupos de peptídeos das LiTx1-4 de *L. gaucho* e *L. laeta* foram positivos, ou seja, continham a sequência de interesse. Para a LiTx1, LiTx2 e LiTx4 os fragmentos amplificados apresentaram tamanho aproximado de 600 pb, como esperado, nos quais 400 pb referem-se às sequências codificantes dos peptídeos e 200 pb são referentes às porções do vetor amplificadas devido ao anelamento dos primers *forward* T7 sense e o *primer* reverse SP6 utilizados na reação de PRC de colônia (Fig 11, 12 e 13).

Figura 11 – Gel agarose 1,5%. Perfil eletroforético proveniente das amostras amplificadas por PCR de colônia de peptídeos semelhantes a LiTx1 em *L. gaucho* (à esquerda) e *L. laeta* (à direita).



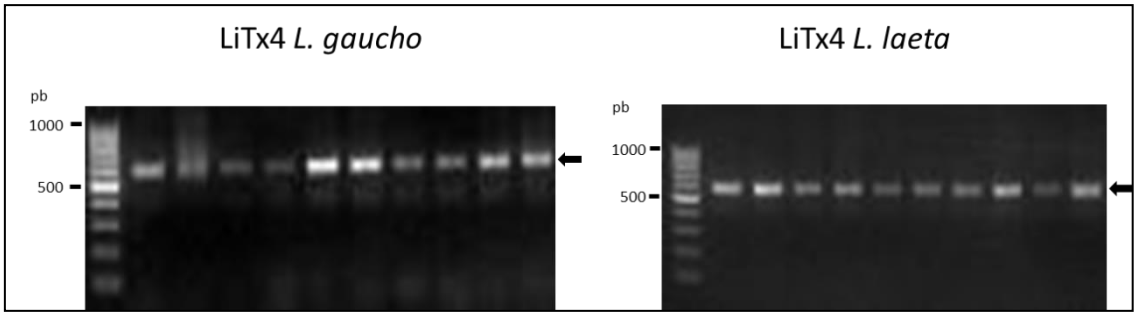
Gel mostrando 10 clones positivos, dos 50 testados. Todos os clones foram positivos e demonstram banda na altura aproximada de 600 pb. *Primers* utilizados: *forward* T7 *sense* e o *primer reverse* SP6.

Figura 12 – Gel agarose 1,5%. Perfil eletroforético proveniente das amostras amplificadas por PCR de colônia de peptídeos semelhantes a LiTx2 em *L. gaucho* (à esquerda) e *L. laeta* (à direita).



Gel mostrando 10 clones positivos, dos 50 testados. Todos os clones foram positivos e demonstram banda na altura aproximada de 600 pb. Primers utilizados: *forward* T7 *sense* e o *primer reverse* SP6.

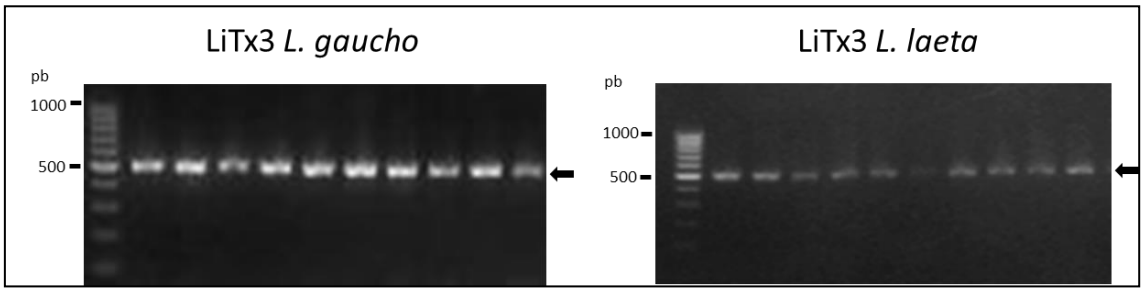
Figura 13 – Gel agarose 1,5%. Perfil eletroforético proveniente das amostras amplificadas por PCR de colônia de peptídeos semelhantes a LiTx4 em *L. gaucho* (à esquerda) e *L. laeta* (à direita).



Gel mostrando 10 clones positivos, dos 50 testados. Todos os clones foram positivos e demonstram banda na altura aproximada de 600 pb. Primers utilizados: *forward* T7 *sense* e o *primer reverse* SP6.

Diferindo dos outros grupos, os peptídeos semelhantes a LiTx 3 tiveram o tamanho aproximado de 500 pb, os quais 300 pb são relativos às sequências codificantes dos peptídeos e 200 pb relativos ao vetor amplificado devido ao anelamento de *primers* (forward T7 sente e reverse SP6) utilizados no PCR de colônia (Fig 14)

Figura 14 – Gel agarose 1,5%. Perfil eletroforético proveniente das amostras amplificadas por PCR de colônia de peptídeos semelhantes a LiTx3 em *L. gaucho* (à esquerda) e *L. laeta* (à direita).



Gel mostrando 10 clones positivos, dos 50 testados. Todos os clones foram positivos e demonstram banda na altura aproximada de 600 pb. Primers utilizados: *forward* T7 *sense* e o *primer reverse* SP6.

Dos 50 clones testados, 10 positivos foram selecionados para a análise das sequências codificantes dos peptídeos, nas duas espécies em estudo. Foram

realizadas minipreparações para obtenção das construções dos clones, PCR de sequenciamento e sequenciamento pelo método dos dideoxinucleotídeos. As sequências obtidas foram trimadas e submetidas a análises bioinformáticas como descrito anteriormente.

Todas as sequências encontradas dos peptídeos LiTx1-4 possuíam os resíduos de cisteína conservados em relação aos peptídeos de *L. intermedia* (Fig 16-19). Além disso, os prováveis resíduos de cisteína que estabelecem as pontes dissulfeto que compõem o motivo estrutural “nó de cistina inibidor”, o qual confere nome a essa família de peptídeos (ICK), também estão conservados.

Das duas sequências obtidas em *L. gaucho* relativas aos peptídeos de LiTx1 (Tx1_gauchoI-II) uma delas, a Tx1_gauchoI, é a própria LiTx1 encontrada no estudo do transcriptoma de Gremski (2010) e àquela obtida por De Castro (2004) do veneno de *L. intermedia* (Fig 15). A outra sequência revelou identidade de 96% com a LiTx1, apresentando a substituição não conservativa de um resíduo de lisina (K) por um de glutamina (Q) na posição 13 e também a substituição de um resíduo de lisina (K) por um de arginina na posição 46.

Em *L. laeta* foi possível obter 6 isoformas do peptídeo LiTx1 (Tx1_laetaI-VI), com identidades variando de 87% a 93% com a LiTx1(Fig 16). Os resíduos encontrados que diferem da LiTx1 são: resíduos de alanina(A) (posição 1), de lisina (K) (posição 21), de ácido aspártico (D) (posição 31) e de glutamina (Q) (posição 39); nas mesmas posições, no peptídeo LiTx1, são encontrados resíduos de lisina (K) (posição 1), de arginina (N) (posição 21), de serina (S) (posição 31) e de metionina (M) (posição 39) (Fig 15).

Duas sequências foram obtidas tanto em *L. laeta* (Tx2_laetaI-II) quanto em *L. gaucho* (Tx2_gauchoI-II) para o grupo de peptídeos LiTx2. Em *L. gaucho,* ambas as sequências apresentaram identidade de 85% com a LiTx2 de *L. intermedia* (Fig 16) e os resíduos de aminoácidos diferindo da LiTx2 são os das posições 11 a 14 e os das posições 31 a 33. Em *L. laeta,* as identidades apresentadas foram de 87% com a LiTx2. (Fig 16) e as diferenças de resíduos de aminoácidos também se localizaram nas mesmas posições observadas para os peptídeos de *L. gaucho*.

Com relação ao grupo dos peptídeos LiTx3, duas isoformas foram encontradas em *L. gaucho* (Tx3_gauchoI-II). Uma delas possui 100% de identidade com a LiTx3 de *L intermedia* e a outra apresentou identidade de 87%. As duas isoformas encontradas para *L. laeta* (Tx3_laetaI-II) demonstraram identidades de

90% e 92% com relação ao peptídeo LiTx3 de *L. intermedia.* Os resíduos de aminoácidos na sequência em *L. laeta* foram de 52 e em *L. gaucho* e *L. intermedia* 53 (Fig 17).

Tanto em *L. gaucho* quanto em *L. laeta*, duas isoformas relacionadas ao grupo das LiTx4 foram identificadas (Tx4_gauchoI-II e Tx4_laetaI-II). Em *L. gaucho,* uma das sequências apresentou 100% de identidade com a LiTx4 de *L. intermedia* e a outra possui 83% de identidade com a LiTx4. Em *L. laeta,* as isoformas apresentaram identidade de 83% e 85% com relação à LiTx 4 (Fig 18).

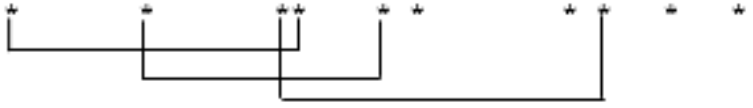
Figura 15 – Comparação das sequências codificantes do grupo de peptídeos LiTx1 de *L. gaucho* e *L. laeta* com relação as sequências de LiTx1 de *L. intermedia*.

IDENTIFICAÇÃO DA SEQUÊNCIA	ESPÉCIE	SEQUÊNCIA AMINOACÍDICA	IDENTIDADE (%)	REFERÊNCIA
LiTx1	*L. intermedia*	KCHGDGSKGCATKPDDWCCKNTPCKCPAWSSTSECRCAMDCSRRCK	-	De Castro *et al.*, 2004
LIC425	*L. intermedia*	KCHGDGSKGCATKPDDWCCKNTPCKCPAWSSTSECRCAMDCSRRCK	100	Gremski *et al.*, 2010
LIC385	*L. intermedia*	KCHGDGSKGCATKPDDWCCKNTPCKCPAWSSTSECRCAMDCSRRCR	98	Gremski *et al.*, 2010
Tx1_gauchoI	*L. gaucho*	KCHGDGSKGCATKPDDWCCKNTPCKCPAWSSTSECRCAMDCSRRCK	100	Este trabalho
Tx1_gauchoII	*L. gaucho*	KCHGDGSKGCATQPDDWCCKNTPCKCPAWSSTSECRCAMDCSRRCR	96	Este trabalho
Tx1_laetaI	*L. laeta*	ACHGDGSKGCATKPDDWCCKKTPCKCPAWSDTSECRCAQDCSRSCR	89	Este trabalho
Tx1_laetaII	*L. laeta*	ACHGEGSKGCATKPDDWCCKKTPCKCPAWSDTSECRCAQDCSRSCR	87	Este trabalho
Tx1_laetaIII	*L. laeta*	ACHGDGSKGCATKPDDWCCKKTPCKCPAWSSTSECRCAQDCSRRCR	93	Este trabalho
Tx1_laetaIV	*L. laeta*	ACHGEGSKGCATKPDDWCCKKTPCKCPAWSDTSECRCAQDCSRRCK	91	Este trabalho
Tx1_laetaV	*L. laeta*	ACHGDGSKGCATKPDDWCCKKTPCKCPAWSDTSECRCAQDCSRRCK	93	Este trabalho
Tx1_laetaVI	*L. laeta*	ACHGDGSKGCATKPDDWCCKKTPCKCPWWSDTSECRCAQDCSRRCK	91	Este trabalho

Em *L. gaucho* foram encontradas duas isoformas de LiTx1 e em *L. laeta* cinco isoformas. A sequência da LiTx1 de *L. intermedia* também é representada no alinhamento. Em asteriscos os resíduos de cisteína conservados e aqueles que estabelecem pontes dissulfeto são indicados por colchetes.

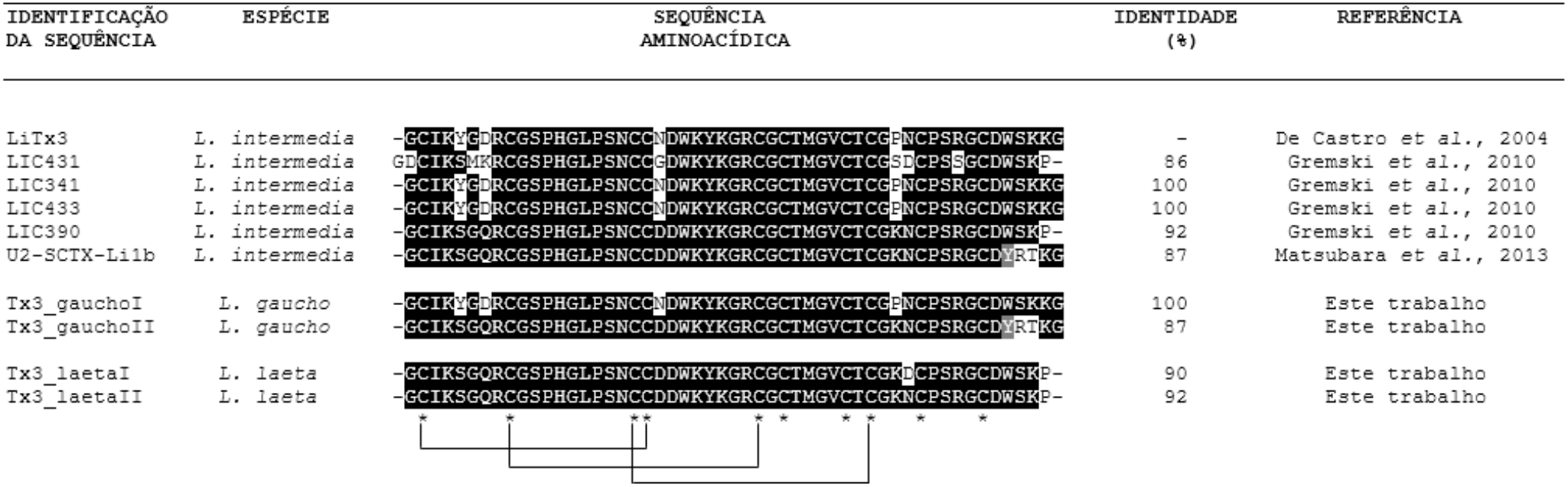
Figura 16 – Comparação das sequências codificantes do grupo de peptídeos LiTx2 de *L. gaucho* e *L. laeta* com relação as sequências de LiTx2 de *L. intermedia*.

IDENTIFICAÇÃO DA SEQUÊNCIA	ESPÉCIE	SEQUÊNCIA AMINOACÍDICA	IDENTIDADE (%)	REFERÊNCIA
LiTx2	L. *intermedia*	ACKGEGVKGCYYDADDWCCKKTPCKCPAWSHERECRCTQPCNPSCR	-	De Castro *et al.*, 2004
LIC436	L. *intermedia*	ACKGEGVKGCYYDADDWCCKKTPCKCPAWSHERECRCTQPCNPSCR	100	Gremski *et al.*, 2010
Tx2_gauchoI	L. *gaucho*	ACKGEGVKGCADQPDDWCCKKTPCKCPAWSSTSECRCTQPCNPSCR	85	Este trabalho
Tx2_gauchoII	L. *gaucho*	ACKGEGVKGCAVQPDDWCCKKTPCKCPAWSSTSECRCTQPCNPSCR	85	Este trabalho
Tx2_laetaI	L. *laeta*	ACKGEGVKGCAAEPDDWCCKKTPCKCPAWSQTAECRCTQPCNPSCR	87	Este trabalho
Tx2_laetaII	L. *laeta*	ACKGEGVKGCADEPDDWCCKKTPCKCPAWSQTSECRCTQPCNPSCR	87	Este trabalho



Em *L. gaucho* foram encontradas duas isoformas de LiTx2 e em *L. laeta* duas outras isoformas. A sequência da LiTx2 de *L. intermedia* também é representada no alinhamento. Em asteriscos os resíduos de cisteína conservados e aqueles que estabelecem pontes dissulfeto são indicados por colchetes.

Figura 17 – Comparação das sequências codificantes do grupo de peptídeos LiTx3 de *L. gaucho* e *L. laeta* com relação as sequências de LiTx3 de *L. intermedia*.



Em *L. gaucho* foram encontradas duas isoformas de LiTx3 e em *L. laeta* também duas isoformas. Cinco isoformas de peptídeos LiTx3 descritas na literatura estão representadas no alinhamento. Em asteriscos os resíduos de cisteína conservados e aqueles que estabelecem pontes dissulfeto são indicados por colchetes.

Figura 18 – Comparação das sequências codificantes do grupo de peptídeos LiTx4 de *L. gaucho* e *L. laeta* com relação as sequências de LiTx4 de *L. intermedia*.

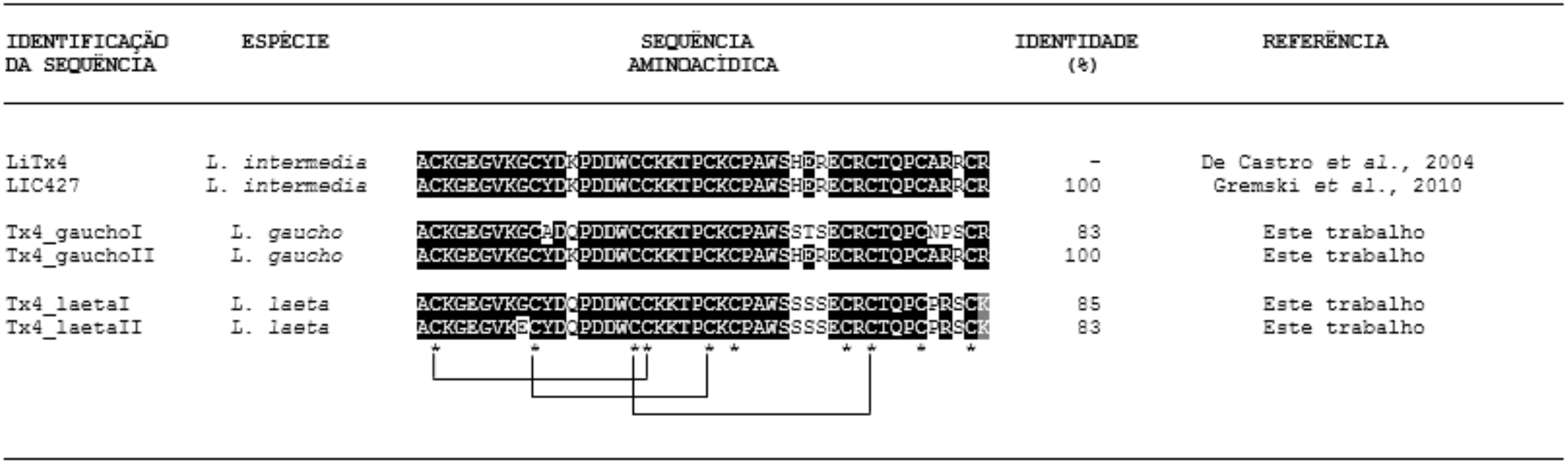
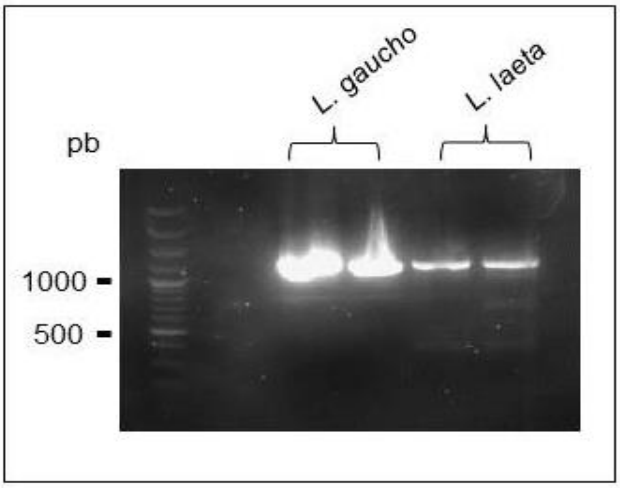


Fig 18. Comparação das sequências codificantes do grupo de peptídeos LiTx4 de *L. gaucho* e *L. laeta* com relação as sequências de LiTx4 de *L. intermedia*. Em *L. gaucho* foram encontradas duas isoformas de LiTx4 e em *L. laeta* duas isoformas. A sequência da LiTx4 de *L. intermedia* também é representada no alinhamento. Em asteriscos os resíduos de cisteína conservados e aqueles que estabelecem pontes dissulfeto são indicados por colchetes.

5.4 RASTREAMENTO DAS SEQUÊNCIAS SEMELHANTES A Lox i 1 EM *L. laeta* E *L. gaucho*

Após a obtenção dos cDNAs das sequências homólogas a Loxi 1 de *L. intermedia*, provenientes do RT-PCR, foi realizada uma PCR utilizando os *primers* específicos. As reações foram amplificadas indicando amostras com tamanho aproximado de 1.200 pb para ambas as espécies, *L. gaucho* e *L. laeta* (Fig 19).

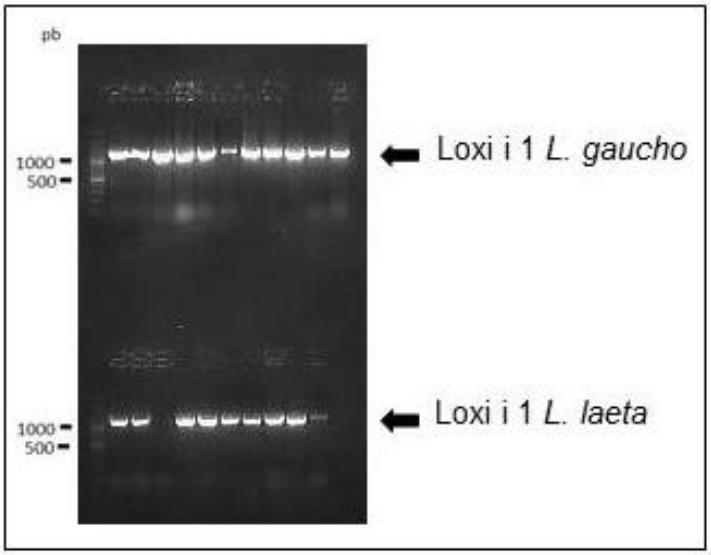
Figura 19 – Gel agarose 1,5%. Amplificação das sequências homólogas à Lox i 1 rastreadas de *L. gaucho* e *L. laeta*.



A amplificação foi realizada por meio de PCR convencional com a utilização de um par de *primers* composto pelo *primer forward* gene-específico da sequências alergênicas a serem rastreadas e o *primer reverse* oligo $(dT)_{17}$-adaptor.

Após a confirmação das sequências amplificadas, essas bandas foram extraídas do gel de agarose, purificadas e eluídas em água ultrapura. Essas amostras foram utilizadas para realizar a ligação no vetor de clonagem pGEM-T, utilizando a T4 ligase. O tubo foi mantido a temperatura ambiente por aproximadamente 24 horas, e em seguida foi realizada a transformação dessa amostra na cepa de bactéria *E. coli* DH5α. Para confirmação de clones positivos, aproximadamente 50 clones foram testados para cada construção referente às sequências de cada espécie. Na reação de PCR de colônia os *primers* utilizados foram T7 sense e o SP6. Foram obtidos 10 clones positivos tanto em *L. gaucho* quanto em *L. laeta*, todos com aproximadamente 1350 pb (Fig 20).

Figura 20 – Perfil eletroforético proveniente das amostras amplificadas por PCR de colônia das sequências homólogas à Lox i 1



Gel de agarose 1,5% mostrando aproximadamente 10 clones positivos com a construção das sequências alergênicas e pGEM-T. Foi observada uma banda na altura aproximada de 1350 pb tanto em *L. gaucho* quanto para *L. laeta*. *Primers* utilizados: T7 *sense* e o SP6

Os clones positivos foram então submetidos a procedimentos de minipreparação, os quais consistem no isolamento das construções. Após a dosagem das amostras obtidas, estas foram submetidas a uma PCR para sequenciamento pelo método dos dideoxinucleotídeos. Em seguida, as Sequências obtidas foram analisadas por bioinformática como descrito anteriormente.

As sequências obtidas em *L. laeta* (loxi_l_1, loxi_l_2, loxi_l_3) possuem aproximadamente 99% de similaridade com a sequência da Lox i 1 de *L. intermedia*. Em *L. gaucho*, duas sequências encontradas possuem 99,52% de similaridade (loxi_g_1, loxi_g_3) e uma delas, a loxi_g_2, apresenta 100% de identidade com a Lox i 1 de *L. intermedia*. (Fig 21)

Figura 21 – Comparação das sequências codificantes da Lox i 1 de *L. intermedia* com as encontradas em *L. gaucho* (Loxi_g) e *L. laeta* (Loxi_l).

6. DISCUSSÃO

Os venenos dos artrópodas desempenham papeis importantes para o animal como captura de presas e defesa de predadores. Apesar dessas funções, pouco se sabe sobre as glândulas produtoras de veneno. Sabe-se que, devido a processos ecológicos e evolutivos, a expressão gênica das toxinas presentes na glândula de veneno varia dentre os espécimes desses animais (HANEY *et al.,* 2016). O desenvolvimento de tecnologias como o sequenciamento revelou essa variação gênica por meio da demonstração da expressão de transcritos homólogos em glândulas de veneno dentro de uma mesma espécie. Além disso, análises desses transcritos podem ajudar a elucidar os mecanismos de evolução dos genes que codificam tais toxinas de venenos (FERNANDES-PEDROSA *et al.,* 2008; GREMSKI *et al.,* 2010; HE *et al.,* 2013; HANEY *et al.,* 2016).

Existem na literatura análises de transcriptomas de glândulas de veneno de aranhas do gênero *Loxosceles*. Nos transcriptomas de *L. intermedia* e *L. laeta* foram encontradas transcritos das mesmas famílias de toxinas como metaloproteases, serinoproteases, hialuronidases e fosfolipases-D, em porcentagens equivalentes, demonstrando assim um perfil de toxinas expressas semelhantes (PEDROSA *et al.,* 2008; GREMSKI *et al.,* 2010). Apesar de não haver um transcriptoma da glândula de veneno de *L. gaucho*, existe uma análise proteômica da composição de seu veneno. O perfil proteico do veneno de *L. gaucho* em gel bidimensional revela similaridades com os perfis protéicos dos venenos de *L. intermedia* e o *L. laeta*, com predominância de bandas de massas moleculares variando de 30 a 35 kDa. Nessa análise, os venenos dessas três espécies também apresentaram bandas de alta massa molecular de 45-94 kDa e de 14-25 kDa, sendo assim, venenos com composições proteicas muito semelhantes (MACHADO *et al.,* 2005). No presente estudo, os perfils proteicos dos venenos de *L. intermedia, L. laeta* e *L. gaucho* analisados em gel desnaturante de poliacrilamida revelou a presença de bandas similares na altura de 5-10 kDa (correspondente aos peptídeos ICK), corroborando com a semelhança proteica do veneno dessas três espécies.

No transcriptoma da glândula de veneno de *L. intermedia* e de *L. laeta* foram encontrados transcritos de toxinas (0,2% e 0,6%, respectivamente) que codificavam

proteínas semelhantes a alérgenos de outros organismos (GREMSKI *et al.,* 2010). A sequência da proteína alergênica de *L. intermedia* foi obtida por meio de uma biblioteca de cDNA da glândula de veneno dessa espécie. Posteriormente essa molécula foi nomeada de Lox i 1 e foi enquadrada na família CAP/CRiSP, as quais são caracterizadas por serem ricas em resíduos de cisteínas (FERRER *et al.,* 2010).

As sequências de alérgenos de *L. gaucho* e *L. laeta* obtidas nesse trabalho revelaram uma alta identidade com a Lox i 1 descrita por Ferrer em 2010 para *L. intermedia.* Estudos demostram que certas famílias de toxinas são bem conservadas entre espécies de aranhas do gênero *Loxosceles*. Trevisan e colaboradores em 2010 analisaram metaloproteases da família das astacinas de *L. intermedia (*LALP1, LALP2 e LALP3), de *L. laeta* (LALP4) e *L. gaucho* (LALP5). A LALP 2 e a LALP 3 de *L. intermedia* apresentaram similaridades consideráveis de 48% e 44%, respectivamente, com a LALP 4 de *L. laeta* e 39% e 40% com a LALP 5 de *L. gaucho.* A maior similaridade foi encontrada entre a LALP1 de *L. intermedia* com a LALP4 de *L. laeta* e a LALP5 de *L. gaucho*, de 75%. Sendo assim, essas toxinas são conservadas entre essas espécies, podendo ter um valor biológico significativo no veneno de aranhas do gênero *Loxosceles,* como por exemplo, um mecanismo biológico de defesa contra variações do ambiente, defesa de predadores e presas diferentes encontradas no ambiente onde elas se encontram (TREVISAN-SILVA *et al.,* 2010).

Nesse trabalho, foram encontradas várias isoformas de grupos dos peptídeos ICK (LiTx1-4) dentro da mesma espécie de *Loxosceles*. Na literatura, é comum encontrar várias isoformas de uma mesma toxina em diferentes espécies do gênero *Loxosceles,* a exemplo das toxinas dermonecróticas fosfolipases-D. Kalapothakis e colaboradores em 2007 denominaram as toxinas dermonecróticas ou esfingomielinases de *Loxosceles* de Loxtox. No trabalho, os autores identificaram 8 sequências de toxinas dermonecróticas apenas em *L. intermedia*. Destas, duas sequências: a Loxtox i 6 e a Loxtox i 4, revelaram similaridade de 100% quando comparadas com as fosfolipases LiRecDT3 e a P1 de *L. intermedia*. As 8 novas sequências encontradas apresentaram identidades aminoacídicas variando entre 63% e 99% quando comparadas com sequências anteriores descritas para as fosfolipases-D de *L. intermedia*. A presença de muitas isoformas de toxinas de uma mesma família encontradas em uma mesma espécie pode estar relacionada a uma

coevolução com a para presa, defesa e adaptação ao meio ambiente. Por exemplo, caso ocorra alguma mudança de temperatura drástica ou variação de valor pH que degrade uma isoforma de uma toxina, a aranha possui outras isoformas funcionais mais resistentes em seu arsenal bioquímico (MATSUBARA, 2015).

Apesar dessa grande variedade de isoformas dentro da mesma espécie, entre espécies, existem em *L. intermedia* e *L. gaucho* sequências de toxinas mais semelhantes do que em *L. laeta*. Um claro exemplo dessa observação é a comparação entre fosfolipases-D: a sequência da LiRecDT1 de *L. intermedia* possui uma similaridade maior com a LgRec1 de *L. gaucho (*78%) e menor com a SMase I de *L. laeta* (58%). Essa semelhança entre as sequências aminoacídicas de *L. intermedia* e *L. gaucho* também foi observada com as sequências codificantes dos peptídeos ICK desse trabalho. Em todos os grupos dos peptídeos ICK (LiTx1-4), uma sequência de *L. gaucho* possuia 100% de identidade com a de *L. intermedia*. Assim, esses dados sugerem que *L. gaucho* e *L. intermedia* podem ter uma proximidade filogenética maior. Entretanto, A LALP 2 de *L. intermedia* revelou similaridade maior com a LALP 4 de *L laeta* (44%) do que com a LALP 5 de *L. gaucho* (39%), diferindo assim da hipótese proposta (TREVISAN-SILVA *et al.,* 2010). Sendo assim, novos estudos são necessários para avaliar a proximidade entre essas três espécies do gênero *Loxosceles*.

Apenas 3 sequências codificantes de alérgenos em *L. laeta* estão depositadas no GenBank, sendo que todas elas são parcialmente incompletas (EY189185, EY188440, EY189716). Para *L. gaucho* nenhuma sequência até agora foi descrita. Este trabalho revelou pela primeira vez sequências aminoacídicas completas de alérgenos dessas duas espécies de aranhas do gênero *Loxosceles.* As sequências de ambas as espécies possuem similaridade de 99,52% quando comparadas com a sequência do alérgeno de *L. intermedia*, possuindo apenas duas substituições aminoacídicas. Em *L. intermedia* o aminoácido 249 é uma serina e o 251 uma asparagina. Nas espécies *L. gaucho* e *L. laeta,* na posição 249, o aminoácido correspondente é uma treonina e o 251 é uma serina, sendo assim substituições conservativas.

Outra família de toxinas do gênero *Loxosceles* que demonstram altos índices de similaridades entre suas sequências aminoacídicas são as notinas/peptídeos ICK. No transcriptoma da glândula de veneno de *L. intermedia,*

produzido por Gremski e colaboradores (2010), mais de 50% das EST correspondem a esses peptídeos ICK (LiTx1, LiTx2, LiTx3 e LiTx4). Os peptídeos ICK em geral possuem um tamanho que varia de 3 a 15 kDa e foram relacionados a peptídeos que possuem ação sobre canais de sódio e cálcio voltagem-dependente.

Do ponto de vista biotecnológico, as isoformas de toxinas encontradas em um gênero podem ser exploradas como ferramentas imunológicas se seus epítopos forem conservados para a produção de anticorpos que neutralizem a atividade dermonecrótica da toxina, por exemplo (GREMSKI *et al.,* 2014; BUCH *et al.,* 2015). Existem estudos que demonstram essa conservação de epítopos em famílias de toxinas de aranhas do gênero *Loxosceles.* Buch e colaboradores em 2015 demonstraram que 6 isoformas da toxina dermonecrótica de *L. intermedia* foram reconhecidas pelos soros hiperimunes dos venenos totais de *L. gaucho* e *L. laeta*, reforçando a ideia da presença de epitopos conservados nos venenos dessas três espécies. Além da toxina dermonecrótica, a hialuronidase recombinante de *L. intermedia* também foi reconhecida pelos anticorpos antiveneno de *L. laeta* e *L. gaucho,* também indicando uma conservação imunológica. Seguindo essa lógica de toxinas com conservação de epítopos, foi feito neste trabalho o experimento de imunoensaio de reatividade cruzada entre peptídeo ICK e soros hiperimunes. O peptídeo ICK recombinante de *L. intermedia* (U2-SCTX-Li1b) foi reconhecido pelos soros hiperimunes que reconhecem os venenos de *L. laeta* e *L. gaucho,* indicando assim a presença de toxinas com epítopos lineares da família ICK. Isso reforça a importância biológica dessas toxinas presentes no gênero *Loxosceles* (GREMSKI *et al.,* 2014)

Como demonstrado nesse trabalho, todas as sequências novas rastreadas dos peptídeos ICK, tanto em *L gaucho* quanto em *L laeta,* possuíam os 10 resíduos de cisteína em posições conservadas encontrados nos peptídeos ICK de *L. intermedia*. Esse resultado é um indicativo da relação tanto estrutural como funcional existente entre esses peptídeos. Além disso, através da ferramenta *online* KNOTTER 1D, foi possível confirmar que o arranjo do motivo estrutural ICK foi conservado em todas as sequências encontradas.

No grupo da LiTx1, foram identificadas no estudo do transcriptoma de Gremski e colaboradores (2010) duas isoformas, sendo uma delas a própria LiTx1 descrita por De Castro e colaboradores em 2004 e a outra possui duas substituições

aminoacídicas. Na espécie *L. gaucho* foram encontradas também duas isoformas, uma delas também é a própria LiTx1 e a outra com duas substituições aminoacídicas. É comum na literatura encontrar no mesmo veneno de aranhas isoformas semelhantes com poucas diferenças na sequência aminoacídicas. A similaridade na sequência codificante de peptídeos ICK é tanto associada a atividades biológicas muito distintas quanto associadas ao mesmo alvo. Peptídeos homólogos isolados da aranha *Machrotheles gigas* (Magi5 e Magi11) com similaridade de 70% entre si causaram o mesmo sintoma de lacrimejamento quando injetados em camundongos. Além desses, os peptídeos Magi 14 e Magi 4, também da mesma aranha, apresentaram uma similaridade de 68% e induziram o mesmo sintoma de convulsão em camundongos (CORZO *et al*., 2003; SATAKE *et al*., 2004). Entretanto, as toxinas HwTx4 da aranha *Selenocosmia huwena* e PaurTx3 da aranha *Phrixotrichus auratus* compartilham apenas 40% de similaridade na sequência aminoacídica e modulam canais de sódio com afinidades similares (REDAELLI *et al.,* 2010). E além das divergências de atividade relacionadas a similaridade das sequências aminoacídicas, existem toxinas, como por exemplo, da aranha *Selenocosmia huwena,* que diferem entre si apenas nos últimos 2 resíduos de aminoácido em suas sequências, que não causaram o mesmo efeito quando injetados em grilos e gafanhotos (ZHANG *et al.,* 2003). Na espécie *L. laeta*, foram encontradas 6 possíveis isoformas e em *L. gaucho* apenas duas isoformas com relação ao grupo das LiTx1. Este resultado pode sugerir que em *L. gaucho* as poucas isoformas podem interagir de forma menos específica com vários alvos, enquanto que em *L. laeta* cada isoforma pode interagir com um alvo diferente. Entretanto, são necessários mais estudos para corroborar essa hipótese.

No grupo da LiTx2, tanto em *L. laeta* quanto em *L. gaucho* foram encontradas duas sequências com pequenas diferenças entre elas. Quando comparadas as encontradas em *L. intermedia*, as diferenças concentram-se nas regiões das posições aminoacídicas 11 a 14 e 31 a 33. Essas diferenças podem estar associadas a alvos e/ou intensidades diferentes relacionadas a alguma atividade biológica. Estudos com peptídeos similares, diferindo em posições específicas, mostraram que a região contendo a heterogeneidade na estrutura dos peptídeos pode estar relacionada com perfis diferentes de toxicidade (SATAKE *et al.,* 2004).

No grupo da LiTx3, 7 isoformas foram identificadas em *L. intermedia* no estudo do transcriptoma de Gremski e colaboradores (2010). Em *L. gaucho* e *L.*

laeta duas isoformas foram encontradas relacionadas a LiTx3. As sequências de *L. gaucho* e algumas sequências de *L. intermedia* não possuem a terminação composta pelo dipeptídeo lisina-glicina na região C-terminal. Esse dipeptídeo é associado com a amidação C-terminal dessas toxinas, cuja função seria proteger o peptídeo contra a degradação proteolítica (SAEZ *et al.,* 2010; WINDLEY *et al.,* 2012). A literatura também indica que essa amidação C-terminal pode ser importante para a atividade biológica dos peptídeos. Deng e colaboradores (2013) mostraram que o peptídeo ICK HWTX-IV, da aranha *Ornithoctonus huwena* inibe canais de sódio dos neurônios de ratos. Entretanto, ao mutar 3 resíduos de aminoácidos presentes na região C-terminal, essa ligação da toxina no canal de sódio torna-se severamente mais fraca, prejudicando a atividade biológica desse peptídeo. O fato dos peptídeos de *L. gaucho* não possuírem a sequência de amidação pode indicar uma atividade mais fraca quando interagem com canais voltagem-dependente ou pode indicar que estes possuam atividade biológica independente dessa modificação em questão.

Tanto em *L. gaucho* quanto em *L. laeta* duas sequências foram encontradas para o grupo da LiTx4. O peptídeo LiTx4 não foi biologicamente caracterizado e apenas a sua sequência foi depositada no *GenBank* por De Castro e colaboradores. Gremski em 2010 revelou que o peptídeo LiTx4 possui identidade de 77% com o peptídeo LiTx2. Essa semelhança de LiTx2 e LiTx4 pode indicar que esses peptídeos podem pertencer a um mesmo grupo (GREMSKI *et al.,* 2010). Entretanto, novos estudos são necessários para corroborar essa ideia.

Nas sequências aminoacídicas obtidas em cada um dos grupos de peptídeos (LiTx1-4) de *L gaucho*, foram encontradas pelo menos uma sequência que possui 100% de similaridade com as sequências dos grupos de *L. intermedia.* E entre *L. intermedia* e *L. laeta* nenhuma sequência codificante com 100% de similaridade dos peptídeos foi encontrada. Esse resultado corrobora com os resultados das sequências das moléculas alergênicas, podendo indicar uma maior similaridade dos venenos de *L. intermedia* e *L. gaucho*, além de sugerir uma maior proximidade filogenética entre essas espécies.

Diversas isoformas de toxinas encontradas em um gênero podem refletir um processo evolutivo comumente encontrado em glândulas de veneno de aranhas. Aquelas relacionadas diretamente com uma atividade, como a atividade inseticida dos peptídeos ICK, pode ser utilizada para caçar diferentes presas. Assim, isoformas

menos potentes não são um problema para a aranha, pois ela possui um arsenal diversificado e potente de toxinas (CARDOSO *et al.,* 2003; KALAPOTHAKIS *et al.,* 2007)

7. CONCLUSÃO

Há uma grande variedade de moléculas em venenos de aranhas. O presente estudo mostrou sequências diferentes de peptídeos ICK dos grupos LiTx1-4 de *L. laeta* e *L gaucho*, que até o presente momento eram desconhecidos. Além destes, também foram identificadas pela primeira vez sequências aminoacídicas completas de alérgenos de ambas as espécies. Essas moléculas servem de exemplo para explicar a complexidade do que é codificado pelo RNAs mensageiros das glândulas de veneno dessas aranhas. Uma análise de uma quantidade maior de clones ampliaria ainda mais a diversidade dessas sequências. Essas sequências de toxinas podem ser exploradas futuramente através de abordagens de biologia molecular e bioquímica, com a finalidade de caracterização de suas atividades biológicas e suas potencialidades do ponto de vista biotecnológico e terapêutico.

8. REFERÊNCIAS

APPEL, M. H. *et al*. Identification, cloning and functional characterization of a novel dermonecrotic toxin (phospholipase D) from brown spider (Loxosceles intermedia) venom. **Biochim Biophys Acta**, v. 1780, n. 2, p. 167-78, Feb 2008.

ARIKI, N. K. *et al*. Characterization of Three Venom Peptides from the Spitting Spider Scytodes thoracica. **PLoS One**, v. 11, n. 5, p. e0156291, 2016.

ARRUDA, L. K. *et al*. Recombinant allergens for diagnosis of cockroach allergy. **Curr Allergy Asthma** Rep, v. 14, n. 4, p. 428, Apr 2014.

BARBARO, K. C. *et al*. Enzymatic characterization, antigenic cross-reactivity and neutralization of dermonecrotic activity of five Loxosceles spider venoms of medical importance in the Americas. **Toxicon**, v. 45, n. 4, p. 489-99, Mar 15 2005.

BELEBONI, R. O. *et al*. Pharmacological and biochemical aspects of GABAergic neurotransmission: pathological and neuropsychobiological relationships. **Cell Mol Neurobiol**, v. 24, n. 6, p. 707-28, Dec 2004.

BERARDI, L.; BATTISTI, A.; NEGRISOLO, E. The allergenic protein Tha p 2 of processionary moths of the genus Thaumetopoea (Thaumetopoeinae, Notodontidae, Lepidoptera): Characterization and evolution. **Gene**, v. 574, n. 2, p. 317-24, Dec 15 2015

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-54, May 7 1976.

BUCH, D. R. *et al*. Brown spider (Loxosceles genus) venom toxins: Evaluation of biological conservation by immune cross-reactivity. **Toxicon**, v. 108, p. 154-66, Dec 15 2015.

CARDOSO, F. C. *et al*. Molecular cloning and characterization of Phoneutria nigriventer toxins active on calcium channels. **Toxicon**, v. 41, n. 7, p. 755-63, Jun 2003.

CATALAN, A. *et al*. Two new phospholipase D isoforms of Loxosceles laeta: cloning, heterologous expression, functional characterization, and potential biotechnological application. **J Biochem Mol Toxicol**, v. 25, n. 6, p. 393-403, Nov-Dec 2011.

CHAIM, O. M. *et al*. Brown spider dermonecrotic toxin directly induces nephrotoxicity. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 211, n. 1, p. 64-77, Feb 15 2006.

CHAIM, O. M. *et al*. Brown spider (Loxosceles genus) venom toxins: tools for biological purposes. **Toxins** (Basel), v. 3, n. 3, p. 309-44, Mar 2011.

CHAVES-MOREIRA, D. *et al*. 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, n. 9, p. 2529-40, Sep 2011.

CHOMCZYNSKI, P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. **Biotechniques**, v. 15, n. 3, p. 532-4, 536-7, Sep 1993.

CORZO, G. *et al*. Distinct primary structures of the major peptide toxins from the venom of the spider Macrothele gigas that bind to sites 3 and 4 in the sodium channel. **FEBS Lett**, v. 547, n. 1-3, p. 43-50, Jul 17 2003.

CRAIK, D. J.; DALY, N. L.; WAINE, C. The cystine knot motif in toxins and implications for drug design. **Toxicon**, v. 39, n. 1, p. 43-60, Jan 2001.

CUI, Y. *et al*. The group 10 allergen of Dermatophagoides farinae (Acari: Pyroglyphidae): cDNA cloning, sequence analysis, and expression in Escherichia coli BL21. **J Med Entomol**, v. 50, n. 1, p. 205-8, Jan 2013.

DA SILVEIRA, R. B. *et al*. Identification, cloning, expression and functional characterization of an astacin-like metalloprotease toxin from Loxosceles intermedia (brown spider) venom. **Biochem J**, v. 406, n. 2, p. 355-63, Sep 1 2007.

DALY, N. L.; CRAIK, D. J. Bioactive cystine knot proteins. **Curr Opin Chem Biol**, v. 15, n. 3, p. 362-8, Jun 2011.

DE CASTRO, C. S. *et al*. Identification and molecular cloning of insecticidal toxins from the venom of the brown spider Loxosceles intermedia. **Toxicon**, v. 44, n. 3, p. 273-80, Sep 1 2004.

DENG, M. *et al*. Synthesis and biological characterization of synthetic analogs of Huwentoxin-IV (Mu-theraphotoxin-Hh2a), a neuronal tetrodotoxin-sensitive sodium channel inhibitor. **Toxicon**, v. 71, p. 57-65, Sep 2013.

FANG, Y. *et al*. Two new types of allergens from the cockroach, Periplaneta americana. **Allergy**, v. 70, n. 12, p. 1674-8, Dec 2015.

FEITOSA, L. *et al*. Detection and characterization of metalloproteinases with gelatinolytic, fibronectinolytic and fibrinogenolytic activities in brown spider (Loxosceles intermedia) venom. **Toxicon**, v. 36, n. 7, p. 1039-51, Jul 1998.

FERNANDES-PEDROSA MDE, F. *et al*. Transcriptome analysis of Loxosceles laeta (Araneae, Sicariidae) spider venomous gland using expressed sequence tags. **BMC Genomics**, v. 9, p. 279, Jun 12 2008.

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

FERRER, V. P. *et al*. A novel hyaluronidase from brown spider (Loxosceles intermedia) venom (Dietrich's Hyaluronidase): from cloning to functional characterization. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, n. 5, p. e2206, 2013.

FUTRELL, J. M. Loxoscelism. **Am J Med Sci**, v. 304, n. 4, p. 261-7, Oct 1992.

GIBBS, G. M.; ROELANTS, K.; O'BRYAN, M. K. The CAP superfamily: cysteine-rich secretory proteins, antigen 5, and pathogenesis-related 1 proteins--roles in reproduction, cancer, and immune defense. **Endocr Rev**, v. 29, n. 7, p. 865-97, Dec 2008.

GREMSKI, L. H. *et al*. A novel expression profile of the Loxosceles intermedia spider venomous gland revealed by transcriptome analysis. **Mol. Biosyst.,** v. 6, p. 2403-2416, 2010.

GREMSKI, L. H. *et al*. Recent advances in the understanding of brown spider venoms: From the biology of spiders to the molecular mechanisms of toxins. **Toxicon**, v. 83, p. 91-120, Jun 2014.

HANEY, R. A. *et al*. Effects of Gene Duplication, Positive Selection, and Shifts in Gene Expression on the Evolution of the Venom Gland Transcriptome in Widow Spiders. **Genome Biol Evol**, v. 8, n. 1, p. 228-42, Jan 05 2016.

HARLOW, E.D.; LANE, D. **Antibody a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. 726 p.

HE, Q. *et al*. The venom gland transcriptome of Latrodectus tredecimguttatus revealed by deep sequencing and cDNA library analysis. **PLoS One**, v. 8, n. 11, p. e81357, 2013.

HERZIG, V.; KING, G. F. The Cystine Knot Is Responsible for the Exceptional Stability of the Insecticidal Spider Toxin omega-Hexatoxin-Hv1a. **Toxins (Basel)**, v. 7, n. 10, p. 4366-80, Oct 2015.

HOFFMAN, D. R. Ant venoms. **Curr Opin Allergy Clin Immunol**, v. 10, n. 4, p. 342-6, Aug 2010.

ISBISTER, G. K.; FAN, H. W. **Spider bite. Lancet**, v. 378, n. 9808, p. 2039-47, Dec 10 2011.

IYER, S.; ACHARYA, K. R. Tying the knot: the cystine signature and molecular-recognition processes of the vascular endothelial growth factor family of angiogenic cytokines. **FEBS J**, v. 278, n. 22, p. 4304-22, Nov 2011.

KALAPOTHAKIS, E. *et al*. The Loxtox protein family in Loxosceles intermedia (Mello-Leitao) venom. **Toxicon**, v. 50, n. 7, p. 938-46, Dec 1 2007.

KING, N. *et al*. Allergenic characteristics of a modified peanut allergen. **Mol Nutr Food Res**, v. 49, n. 10, p. 963-71, Oct 2005.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-5, Aug 15 1970.

LANE, L.; MCCOPPIN, H. H.; DYER, J. Acute generalized exanthematous pustulosis and Coombs-positive hemolytic anemia in a child following Loxosceles reclusa envenomation. **Pediatr Dermatol**, v. 28, n. 6, p. 685-8, Nov-Dec 2011.

LARSEN, J. N. Allergen nomenclature: a need for the scientific community. **Arb Paul Ehrlich Inst Bundesamt Sera Impfstoffe Frankf A M**, n. 95, p. 5-9; discussion 9-10, 2006.

LEE, S.; LYNCH, K. R. Brown recluse spider (Loxosceles reclusa) venom phospholipase D (PLD) generates lysophosphatidic acid (LPA). **Biochem J**, v. 391, n. Pt 2, p. 317-23, Oct 15 2005.

LOCKWOOD, S. A. *et al*. Identification, expression, and immuno-reactivity of Sol i 2 & Sol i 4 venom proteins of queen red imported fire ants, Solenopsis invicta Buren (Hymenoptera: Formicidae). **Toxicon**, v. 60, n. 5, p. 752-9, Oct 2012.

LUO, J. *et al*. Molecular surface of JZTX-V (beta-Theraphotoxin-Cj2a) interacting with voltage-gated sodium channel subtype NaV1.4. **Toxins (Basel)**, v. 6, n. 7, p. 2177-93, Jul 23 2014.

MACHADO, L. F. *et al*. Proteome analysis of brown spider venom: identification of loxnecrogin isoforms in Loxosceles gaucho venom. **Proteomics**, v. 5, n. 8, p. 2167-76, May 2005.

MAGALHAES, G. S. *et al*. Cloning, expression and characterization of a phospholipase D from Loxosceles gaucho venom gland. **Biochimie**, v. 95, n. 9, p. 1773-83, Sep 2013.

MAKRIS, M. *et al*. Acute generalized exanthematous pustulosis (AGEP) triggered by a spider bite. **Allergol Int**, v. 58, n. 2, p. 301-3, Jun 2009.

MALAQUE, C. M. *et al*. Clinical picture and laboratorial evaluation in human loxoscelism. **Toxicon**, v. 58, n. 8, p. 664-71, Dec 1 2011.

MATSUBARA, F. H. *et al*. A novel ICK peptide from the Loxosceles intermedia (brown spider) venom gland: cloning, heterologous expression and immunological cross-reactivity approaches. **Toxicon**, v. 71, p. 147-58, Sep 2013.

MATSUBARA, F. H. *et al*. Insecticidal activity of a recombinant knottin peptide from Loxosceles intermedia venom and recognition of these peptides as a conserved family in the genus. **Insect Mol Biol**, Oct 15 2016.

MATSUBARA, F. H. Estudo dos peptídeos pertencentes à família ICK presentes no veneno das aranhas do gênero Loxosceles 178 f. Dissertação (Doutorado em Biologia Celular e Biologia Molecular) - Setor Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2015

MOORE, S. J. *et al*. Engineering agatoxin, a cystine-knot peptide from spider venom, as a molecular probe for in vivo tumor imaging. **PLoS One**, v. 8, n. 4, p. e60498, 2013.

MORGON, A. M. *et al*. Expression and immunological cross-reactivity of LALP3, a novel astacin-like metalloprotease from brown spider (Loxosceles intermedia) venom. **Biochimie**, Jun 23 2016.

MURPHY, PAUL TRAVERS, MARK WALPORT; **Imunobiologia de Janeway**, tradução Ana Paula Franco Lambert [*et al*.]. – 7.ed. – Porto Alegre : Artmed, 2010.

NEWCOMB, R. *et al*. Selective peptide antagonist of the class E calcium channel from the venom of the tarantula Hysterocrates gigas. **Biochemistry**, v. 37, n. 44, p. 15353-62, Nov 3 1998.

PALUDO, K. S. *et al*. Inflammatory events induced by brown spider venom and its recombinant dermonecrotic toxin: a pharmacological investigation. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**, v. 149, n. 3, p. 323-33, Apr 2009.

PARK, H. G. *et al*. Dual function of a bee (Apis cerana) inhibitor cysteine knot peptide that acts as an antifungal peptide and insecticidal venom toxin. **Dev Comp Immunol**, v. 47, n. 2, p. 247-53, Dec 2014.

PLATNICK, N. I. **The World Spider Catalog**, Version 10.5. American Museum of Natural History, 2011.

PENG, Z. *et al*. Mosquito salivary allergen Aed a 3: cloning, comprehensive molecular analysis, and clinical evaluation. **Allergy**, v. 71, n. 5, p. 621-8, May 2016.

REDAELLI, E. *et al*. Target promiscuity and heterogeneous effects of tarantula venom peptides affecting Na+ and K+ ion channels. **J Biol Chem**, v. 285, n. 6, p. 4130-42, Feb 5 2010.

RIBEIRO, R. O. *et al*. Biological and structural comparison of recombinant phospholipase D toxins from Loxosceles intermedia (brown spider) venom. **Toxicon**, v. 50, n. 8, p. 1162-74, Dec 15 2007.

SADE, Y. B. *et al*. Molecular cloning, heterologous expression and functional characterization of a novel translationally-controlled tumor protein (TCTP) family member from Loxosceles intermedia (brown spider) venom. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 44, n. 1, p. 170-7, Jan 2012.

SAEZ, N. J. *et al*. Spider-venom peptides as therapeutics. **Toxins (Basel)**, v. 2, n. 12, p. 2851-71, Dec 2010.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W.; Molecular cloning: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Lab. Press. **Cold Spring Harbor**, 3ed, NY, 2011.

SANTIBANEZ-LOPEZ, C. E.; POSSANI, L. D. Overview of the Knottin scorpion toxin-like peptides in scorpion venoms: Insights on their classification and evolution. **Toxicon**, v. 107, n. Pt B, p. 317-26, Dec 1 2015.

SATAKE, H. *et al*. Rapid and efficient identification of cysteine-rich peptides by random screening of a venom gland cDNA library from the hexathelid spider Macrothele gigas. **Toxicon**, v. 44, n. 2, p. 149-56, Aug 2004.

SCHNEITER, R.; DI PIETRO, A. The CAP protein superfamily: function in sterol export and fungal virulence. **Biomol Concepts**, v. 4, n. 5, p. 519-25, Oct 2013.

SMS/CE/CVE – SINAM. Secretaria Municipal de Saúde. Centro de Vigilância Epidemiológica. Boletim Epidemiológico de Curitiba. 2015

SU, M. *et al*. Stable and biocompatible cystine knot peptides from the marine sponge Asteropus sp. **Bioorg Med Chem**, v. 24, n. 13, p. 2979-87, Jul 1 2016.

TREVISAN-SILVA, D. *et al*. 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, n. 1, p. 21-32, Jan 2010.

TREVISAN-SILVA, D. *et al*. Differential metalloprotease content and activity of three Loxosceles spider venoms revealed using two-dimensional electrophoresis approaches. **Toxicon**, v. 76, p. 11-22, Dec 15 2013.

VUITIKA, L. *et al*. Active site mapping of Loxosceles phospholipases D: Biochemical and biological features. **Biochim Biophys Acta**, v. 1861, n. 9 Pt A, p. 970-9, Sep 2016.

VUITIKA, L. *et al*. Brown spider phospholipase-D containing a conservative mutation (D233E) in the catalytic site: identification and functional characterization. **J Cell Biochem**, v. 114, n. 11, p. 2479-92, Nov 2013.

WINDLEY, M. J. *et al*. Spider-venom peptides as bioinsecticides. **Toxins (Basel)**, v. 4, n. 3, p. 191-227, Mar 2012.

WRAY, W. et al (1981) Silver staining of proteins in polyacrylamide gels**. Anal Biochem** 118: 197–203

ZHANG, P. F. *et al*. Huwentoxin-V, a novel insecticidal peptide toxin from the spider Selenocosmia huwena, and a natural mutant of the toxin: indicates the key amino acid residues related to the biological activity. **Toxicon**, v. 42, n. 1, p. 15-20, Jul 2003.

9. ANEXOS

Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 29801-5	Data da Emissão: 25/02/2016 10:58	Data para Revalidação*: 26/03/2017

* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.

Dados do titular

Nome: Silvio Sanches Veiga	CPF: 078.970.128-67
Título do Projeto: Avaliação bioquímica e biológica de toxinas loxoscélicas recombinantes	
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ	CNPJ: 75.095.679/0001-49

SISBIO

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Análises em Microscopia Confocal, Citômetria de Fluxo e Espectropolarímetro	02/2015	02/2020
2	Análises de atividade biológica das proteínas recombinantes	02/2015	02/2020
3	Realização de imunoensaios para pesquisa de terapias racionais	04/2015	04/2020
4	Imunização de animais para verificação da imunogenicidade de toxinas recombinantes	04/2015	04/2020
5	experimentos de Cristalografia das toxinas recombinantes de interesse	05/2015	05/2020
6	Análise dos dados cristalográficos	07/2015	07/2020
7	Coleta dos espécimes de aranha-marrom	08/2015	08/2020
8	Coleta de veneno, hemolinfa e glândulas produtoras de veneno	08/2015	08/2020
9	Processamento das amostras coletadas (extração de RNA total das glândulas, análises qualitativas)	09/2015	09/2020
10	Processamento das amostras coletadas (análises qualitativas e quantitativas do veneno e hemolinfa)	09/2015	09/2020
11	Desenho de oligonucleotídeos específicos para as toxinas de interesse	10/2015	10/2020
12	Obtenção das sequências completas das toxinas de interesse	10/2015	10/2020
13	Clonagem das sequências das proteínas maduras em vetor	11/2015	11/2020
14	Transfecção e Expressão das proteínas Recombinantes	12/2015	12/2020
15	Purificação das Proteínas Recombinantes	12/2015	12/2020
16	Confecção de artigos científicos e apresentação de trabalhos em congressos da área	12/2015	12/2020
17	Transformação e Expressão das proteínas Recombinantes	12/2015	12/2020

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que específica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen.
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

Equipe

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

SISBIO

Código de autenticação: 66641555

Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 29801-5	Data da Emissão: 25/02/2016 10:58	Data para Revalidação*: 26/03/2017

* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.

Dados do titular

Nome: Silvio Sanches Veiga	CPF: 078.970.128-67
Título do Projeto: Avaliação bioquímica e biológica de toxinas loxoscélicas recombinantes	
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ	CNPJ: 75.095.679/0001-49

SISBIO

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Andrea Senff Ribeiro	Pesquisador	024.183.219-59	36797924 SSP-PR-PR	Brasileira
2	Olga Meiri Chaim	Pesquisador	034.415.729-63	72178823 SSP-PR-PR	Brasileira

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	CURITIBA	PR	Curitiba e Região Metropolitana, Lapa	Fora de UC Federal
2	CURITIBA	PR	Curitiba, Lapa e Quitandinha	Fora de UC Federal
3	QUITANDINHA	PR	Mato Branco	Fora de UC Federal

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Captura de animais silvestres in situ	Arachnida, Loxosceles
2	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Loxosceles, Arachnida
3	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Loxosceles, Arachnida
4	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Loxosceles (*Qtde: 1500), Arachnida (*Qtde: 1500)
5	Manutenção temporária (até 24 meses) de invertebrados silvestres em cativeiro	Arachnida, Loxosceles

* Quantidade de indivíduos por espécie, por localidade ou unidade de conservação, a serem coletados durante um ano.

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Invertebrados Terrestres)	Secreção
2	Método de captura/coleta (Invertebrados Terrestres)	Captura manual

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ	
2	UNIFESP	
3	Butantan	
4	UEPG	
5	UNESP	

SISBIO

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 66641555

Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 29801-5	Data da Emissão: 25/02/2016 10:58	Data para Revalidação*: 26/03/2017

* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.

Dados do titular

Nome: Silvio Sanches Veiga	CPF: 078.970.128-67
Título do Projeto: Avaliação bioquímica e biológica de toxinas loxoscélicas recombinantes	
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ	CNPJ: 75.095.679/0001-49

SISBIO

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº 03/2014, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Táxon*	Qtde.	Tipo de amostra	Qtde.	Data

* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

SISBIO

Código de autenticação: 66641555

10. ARTIGO PUBLICADO

Insect Molecular Biology (2016) 00(00), 00–00 doi: 10.1111/imb.12268

Insecticidal activity of a recombinant knottin peptide from *Loxosceles intermedia* venom and recognition of these peptides as a conserved family in the genus

F. H. Matsubara*[1], G. O. Meissner*†[1], V. Herzig†, H. C. Justa*, B. C. L. Dias*, D. Trevisan-Silva*, L. H. Gremski*, W. Gremski‡, A. Senff-Ribeiro*, O. M. Chaim*, G. F. King† and S. S. Veiga*

**Department of Cell Biology, Federal University of Parana, Jardim das Américas, Curitiba, Paraná, Brazil; †Institute for Molecular Bioscience, The University of Queensland, St. Lucia, QLD, Australia; and ‡Health and Biological Science Institute, Catholic University of Parana, Prado Velho, Curitiba, Paraná, Brazil*

Abstract

***Loxosceles intermedia* venom comprises a complex mixture of proteins, glycoproteins and low molecular mass peptides that act synergistically to immobilize envenomed prey. Analysis of a venom-gland transcriptome from *L. intermedia* revealed that knottins, also known as inhibitor cystine knot peptides, are the most abundant class of toxins expressed in this species. Knottin peptides contain a particular arrangement of intramolecular disulphide bonds, and these peptides typically act upon ion channels or receptors in the insect nervous system, triggering paralysis or other lethal effects. Herein, we focused on a knottin peptide with 53 amino acid residues from *L. intermedia* venom. The recombinant peptide, named U_2-sicaritoxin-Li1b (Li1b), was obtained by expression in the periplasm of *Escherichia coli*. The recombinant peptide induced irreversible flaccid paralysis in sheep blowflies. We screened for knottin-encoding sequences in total RNA extracts from two other *Loxosceles* species, *Loxosceles gaucho* and *Loxosceles laeta*, which revealed that knottin peptides constitute a conserved family of toxins in the *Loxosceles* genus. The insecticidal activity of U_2-SCTX-Li1b, together with the large number of knottin peptides encoded in *Loxosceles* venom glands, suggests that studies of these venoms might facilitate future biotechnological applications of these toxins.**

Keywords: brown spider, *Loxosceles*, venom, knottin, inhibitor cystine knot, bioinsecticide.

Correspondence: Silvio Sanches Veiga, Department of Cell Biology, Federal University of Paraná, Jardim das Américas, 81530-000, Curitiba, Paraná, Brazil. Tel.: +5541 3361 1681; e-mail: veigass@ufpr.br

[1]These Authors contributed equally to this work.

Introduction

Loxosceles spider venoms are well known because of the adverse clinical outcomes that often result from bites by these spiders (da Silva *et al.*, 2004; Vetter & Isbister, 2008). Several studies have revealed that these venoms contain a wide range of molecules with mostly enzymatic properties and/or toxic effects (Gremski *et al.*, 2010). Some identified toxins are well characterized from a biochemical and biological perspective, such as phospholipase D, astacin-like metalloproteases, hyaluronidase and translationally-controlled tumor protein (Chaim *et al.*, 2006; Trevisan-Silva *et al.*, 2010; Sade *et al.*, 2011; Ferrer *et al.*, 2013; Vuitika *et al.*, 2013). Other *Loxosceles* venom toxins have been identified from transcriptomic analyses, such as knottin peptides, allergens, serine proteases, serine protease inhibitors and C-lectins, but there is little information about their activities both *in vitro* and *in vivo* (Fernandes-Pedrosa *et al.*, 2008; Gremski *et al.*, 2010; Matsubara *et al.*, 2013).

Knottin peptides are low molecular mass toxins (4–10 kDa) containing a minimum of six conserved cysteine residues that form intramolecular disulphide bonds (Grishin, 1999). The knottin structural motif is characterized by an antiparallel β-sheet (formed by two or three β strands) stabilized by three disulphide bonds that establish a pseudoknot structure (Pallaghy *et al.*, 1994; Norton & Pallaghy, 1998; King & Hardy, 2013). The cystine knot typically provides these peptides with high levels of chemical, thermal and biological stability, making knottin

© 2016 The Royal Entomological Society