

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

HANNA CÂMARA DA JUSTA

CLONAGEM, EXPRESSÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DE UMA  
PROTEÍNA ALERGÊNICA DO VENENO DE *Loxosceles intermedia*



CURITIBA

2020

HANNA CÂMARA DA JUSTA

CLONAGEM, EXPRESSÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DE UMA  
PROTEÍNA ALERGÊNICA DO VENENO DE *Loxosceles intermedia*

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular como parte das exigências para obtenção do título de Mestre. Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Silvio Sanches Veiga

Co-orientadora: Profa. Dra. Luiza Helena Gremski

CURITIBA

2020

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.  
Biblioteca de Ciências Biológicas.  
(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1406)

Justa, Hanna Câmara da

Clonagem, expressão e caracterização biológica de uma proteína  
alergênica do veneno de *Loxosceles intermedia*. / Hanna Câmara da Justa.  
– Curitiba, 2020.

75 p.: il.

Orientador: Silvio Sanches Veiga

Co-orientadora: Luiza Helena Gremski

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de  
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e  
Molecular.

1. Aranha - veneno 2. Toxinas 3. Baculoviridae 4. Hipersensibilidade I.  
Título II. Veiga, Silvio Sanches, 1962, - III. Gremski, Luiza Helena IV.  
Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa  
de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

CDD (22. ed.) 595.44



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO BIOLOGIA CELULAR E  
MOLECULAR - 40001016007P8

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **HANNA CÂMARA DA JUSTA** intitulada: **CLONAGEM, EXPRESSÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DE UMA PROTEÍNA ALERGÊNICA DO VENENO DE *Loxosceles intermedia***, sob orientação do Prof. Dr. SILVIO SANCHES VEIGA, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua **Aprovação** no rito de defesa. A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 20 de Fevereiro de 2020.

SILVIO SANCHES VEIGA

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

VALERIA PEREIRA FERRER

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE)

LARISSA MAGALHÃES ALVARENGA

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)



## AGRADECIMENTOS

A primeira pessoa que devo meu afeto e gratidão é meu pai e a meu falecido avô. Sei que fui privilegiada em ter parentes que valorizaram e me ajudaram a estudar e a batalhar pelo que eu quero. Mesmo que isso signifique estar sempre tão longe dos seus abraços. Amo vocês.

Senti o quão difícil a pós-graduação pode ser. Mas percebi que ao passar por ela com pessoas maravilhosas tudo se torna mais leve. E vocês meus capiroinhos, tornaram tudo muito mais leve ao rirmos juntos das desgraças. E cada um de vocês me ensinaram lições preciosas que nunca esquecerei. Nyanne, essa princesa dos Elisas me ensinou a levar as coisas de uma forma mais simples, a ser uma pessoa mais flexível. Além de ter se tornado uma das primeiras pessoas que eu penso “que bom que ela vai estar junto comigo nos próximos 4 anos”. Pedro apesar de me irritar algumas (muitas) vezes e de termos pontos de vista diferentes, é exatamente esse tipo de convivência que eu entendi que te faz crescer como pessoa. Aprender a lidar com pontos de vista diferentes, com opiniões diferentes e discutir sobre isso sem brigar (tanto), nós força a amadurecer como pessoas. Kamis foi uma dos meus portos seguros desses últimos 2 anos. O meu chaveirinho da sorte que nunca para de falar, viciada em café e que mesmo tão pequenininha conquistou um pedaço gigante no meu coração. Rodrigo, aquele que consegue falar tão alto que o campus inteiro escuta, é a pessoa mais desligada que conheci na minha vida inteira. Mas o tamanho do seu coração é proporcional a altura da sua voz quando você fala. Anto, todas as coisas difíceis no caminho se tornaram fáceis quando eu ouvia você perguntar “mas calma, eu te ajudo o que você precisa?”. Muitas vezes você nem sabia o que fazer, mas sei que você oferecia de coração. Você se tornou minha irmã, minha melhor amiga, meu porto seguro. Você esteve do meu lado não só em momentos difíceis no laboratório, mas também segurou minha mão em um dos momentos mais difíceis da minha vida, mesmo sabendo que isso também iria te afetar. E eu nunca vou esquecer isso. Também nunca vou esquecer de você me oferecendo dinheiro quando eu não tinha nem 1,30 pra comer no ru, me levando comida pra almoçar, nossas idas a bakpa, nossos cafés no Mc e os doces (saudades cookies). A gratidão que sinto por ter você na minha vida é enorme, e eu espero poder retribuir um dia com todas as minhas forças. Eu amo você, e amo o

Guilherme porque sei o quanto ele te faz feliz. Então indiretamente agradeço ao Guilherme também (e porque eu sei que ele vai ficar de cara por não estar nos agradecimentos). E não poderia deixar de agradecer a sua família, seu pai e sua mãe, que sempre me trataram tão carinhosamente.

Também preciso agradecer a duas pessoas que lutaram a mesma batalha que eu. E que me ajudaram em momentos em que achei que iria desistir do projeto. Zelinda e Lidi, obrigada pelas células divididas, pelas palavras de apoio e pela luta compartilhada. Obrigada a Mariana, pelas ideias de experimentos, pelas ajudas nos experimentos e por tentar me ensinar a ser menos dramática (eu disser tentar). Aos ICs do laboratório, queria deixar aqui enfatizado o quanto vocês são importantes para nós. O quanto vocês nos ajudam, nos auxiliam e o quanto eu valorizo e agradeço de coração o auxílio em todos os experimentos. Minha gratidão ao Sorocaba, ao meu mini eu Gustavo e João.

Fernando Matsubara, não vou falar muito de você pra não inflar tanto o seu ego. E porque todo mundo já sabe o quanto você significa pra mim. Sem você eu teria desistido desde a IC. Quem sabe teria desistido até da graduação. Obrigada por não desistir de mim, e por mesmo estando longe nunca esquecer da sua pupila. Juro que um dia vou aprender a usar pontuação decentemente e a colocar títulos mais bonitos nas figuras (não desiste de mim).

Natália, Dri, Marcos e Thiago. Vocês não sabem o quanto significava sair com vocês. O quanto significava pra mim passar a noite ou uma tarde com vocês tomando café, jogando videogame, comendo pizza e conversando sobre a vida. Vocês foram as pessoas que salvaram a minha sanidade mental. Foram as pessoas que me fizeram crescer, amadurecer, me desconstruir, tudo isso com muitas risadas, algumas poucas brigas, mas tudo com muito amor. Obrigada por me ensinarem o que significa uma amizade verdadeiramente saudável e por me deixarem fazer parte da vida de vocês.

Agradeço também ao meu orientador Silvio Sanches Veiga e a minha co orientadora Luiza Helena Gremski. Sei o quão difícil é lidar comigo às vezes e sei também que consigo ser bastante pessimista e teimosa. Obrigada pela paciência, pelos relatórios e resumos corrigidos e pelos auxílios nos experimentos.

Não poderia deixar de agradecer aquelas pessoas que fazem toda diferença no meu dia a dia ao desejar um bom dia sorrindo ou ao me cumprimentar no corredor. Obrigada Elis pelos doces e pelos papos, ao Zé por estar sempre pronto a resolver qualquer problema técnico, ao seu Nino, ao seu Luiz que sempre me recebeu tão feliz na portaria mesmo tão cedo pela manhã e as pessoas maravilhosas do laboratório do Zanata, Edvaldo e da Caro que sempre estavam dispostas a nos ajudar.

Eu jamais poderia deixar de agradecer ao meu principal porto seguro, Lorena. Estamos juntas desde a graduação, sempre uma dando forças pra outras desde a monografia. Crescemos e amadurecemos juntas, sempre apoiando o sonho uma da outra. Compartilhamos planos e nos incentivamos a seguir esses planos. São tantas coisas que eu tenho que agradecer, mas a principal delas é ter você do meu lado. O simples fato de você me levar um café no laboratório me animava, saber que eu ia chegar em casa e você ia estar ali me dava forças pra continuar. Obrigada por cuidar tão bem de mim, por segurar minha mão quando eu achei que fosse cair, por me amar, me respeitar e por nunca me deixar desistir. Obrigada por me amar, mas sem me aprisionar, por me cuidar, mas sem me sufocar, por me ajudar, mas sem me impedir de aprender. Falar que te amo já se tornou até clichê.

Meu muito obrigada aos professores, técnicos e servidores da UFPR. Minha admiração por vocês é enorme, a união e o amor à UFPR falaram mais alto, ainda mais nesse período político em que nos encontramos. A ciência, a educação, a pesquisa e a revolução não se fazem sozinhos. Fazer a diferença para uma sociedade que em sua maioria não nos reconhece é difícil, mas não desistiremos, pois sabemos o quão importante é fazer essa diferença.

“Eu não tenho nenhum vestido além do que uso todo dia. Se você for gentil o suficiente para me presentear um, só peço que seja prático e escuro para que eu possa vesti-lo logo em seguida para ir para o laboratório.”

Marie Curie



## RESUMO

Picadas de aranhas do gênero *Loxosceles* são acidentes comuns no Brasil. No Paraná, por exemplo, em 2018 foram registrados 4098 casos de Loxoscelismo, termo usado para o conjunto de sintomas decorrentes do envenenamento. A picada por aranhas *Loxosceles* pode desencadear reações cutâneas e sistêmicas. Isso ocorre devido ao efeito sinérgico das toxinas encontradas no veneno desses animais. Muitas toxinas do veneno de *L. intermedia* já foram isoladas e caracterizadas, como as fosfolipases-D. Entretanto, toxinas alergênicas não foram ainda estudadas. Há um especial interesse em avaliar suas atividades, pois essa molécula pode estar envolvida em eventos de hipersensibilidade desencadeados pelo loxoscelismo, os quais ainda não foram totalmente elucidados. Uma dessas toxinas de *L. intermedia*, denominada LALLT (*Loxosceles allergen-like toxin*), nunca havia sido expressa e sua atividade biológica não havia sido explorada. Com isso, o objetivo deste trabalho foi obter essa molécula recombinante e caracterizar suas atividades biológicas. A expressão da LALLT foi por meio do sistema eucarioto de baculovírus/células de inseto (Sf9). Este modelo de expressão foi escolhido porque as células Sf9 possuem sistema de endomembranas que favorece as modificações pós-traducionais. A sequência codificante da LALLT foi amplificada, clonada no vetor para expressão em baculovírus, o pENTR™/D-TOPO®, e sequenciada. A sequência aminoacídica predita da LALLT revelou similaridade significativa com alérgenos de outras aranhas da família de proteínas CAP/CRISP (*cysteine-rich secretory proteins, antigen5, and pathogenesis-related1proteins*). Em seguida foi realizada a recombinação, inserção da sequência da LALLT no DNA viral do baculovírus, e esse DNA recombinante foi utilizado para a transfecção nas células Sf9. Os parâmetros para a expressão foram otimizados e a purificação da proteína foi realizada em cromatografia de afinidade por níquel. Foi produzido um soro policlonal anti-LALLT, e os imunoenaios identificaram epitopos lineares (*western blotting*) e estruturais (ELISA) conservados entre as espécies de *L. intermedia*, *L. laeta* e *L. gaucho*. Nos ensaios biológicos, a LALLT induziu aumento do extravasamento de plasma no ensaio de permeabilidade vascular em camundongos. Além disso, quando aplicada via intradérmica em pele de coelhos causa um edema observado macroscopicamente. Nos cortes histopatológicos da pele desses coelhos foi possível constatar uma desorganização das fibras colágenas e um infiltrado de células do sistema imune. Para confirmar essa atividade edematogênica, foi realizado o ensaio de edema de pata em camundongos, o qual confirmou a capacidade de LALLT de induzir essa alteração, com pico em 20 minutos pós-aplicação e manutenção do edema por até uma hora. A relação da LALLT com o mastócito, célula do sistema imune, foi investigada mais a fundo. A observação de mastócitos em mesentérios de ratos incubados com a LALLT revelou a capacidade da proteína em degranular mastócitos. Diante desses resultados, é possível associar a LALLT a sintomas cutâneos do Loxoscelismo como edema, eritema, exantema. Sendo assim, sugere-se que essa proteína possui um papel importante no envenenamento por aranhas do gênero *Loxosceles*. Entretanto, para investigar mais a fundo as atividades da LALLT, são necessários novos ensaios para entender seus mecanismos frente aos processos associados ao envenenamento.

Palavras-chaves: Veneno. toxina alergênica. *L. intermedia*. Baculovírus. Loxoscelismo. Hipersensibilidade.

## ABSTRACT

Bites from *Loxosceles* spider are common accidents in Brazil. In Parana, for example, in 2018 authorities recorded 4098 cases of Loxoscelism, which is the term that denotes the set of clinical symptoms triggered after the bite of those spiders. The bite from the *Loxosceles* spiders can cause cutaneous and systemic reactions. This occurs due to the synergic effect of the toxins found in the venom of those animals. Many toxins were already isolated and characterized, like phospholipases-D. However, allergenic toxins were still not studied. There is a special interest in evaluate its activities, since this molecule may be involved in hypersensitivity events caused by *Loxosceles* venom, which have not yet been fully elucidated. One of those toxins from *Loxosceles intermedia*, called LALLT (*Loxosceles allergen-like toxin*), was never evaluated. Therein, the aim of this study was to produce this recombinant molecule and characterize its biological activity. The expression of LALLT was made in the eukaryotic baculovirus-insect cell expression system (Sf9 cells). This model was chosen because it has an endomembrane system. The coding sequence of LALLT was amplified, cloned into the expression vector of baculovirus, pENTR™/D-TOPO®, and sequenced. The predicted aminoacidic sequence of LALLT revealed significant similarities with allergen molecules from other spiders that belong to the CAP (*cysteine-rich secretory proteins, antigen5, and pathogenesis-related1proteins*) protein family. Then, the recombination and insertion of the sequence of LALLT into the baculovirus DNA was performed, and this recombinant DNA was used to the transfection of Sf9 cells. The expression parameters were optimized and the protein was purified by nickel affinity chromatography. It was produced a polyclonal serum anti-LALLT, and the imunoassays identified linear (western blotting) and structural (ELISA) conserved epitopes among the species of *L. intermedia*, *L. laeta* and *L. gaucho*. In the biological assays, LALLT induced an increase in the extravasation of plasma in the assay of vascular permeability in mouse. Besides that, when injected intradermally in rabbit's skin, it caused a macroscopic edema. In the histopathological sections of this skin, it was observed a disorganization of collagen fibers and the infiltration of cells from immune system. To confirm the edematogenic activity, a paw edema assay in mouse was performed, which confirmed the capacity of LALLT to induce such alteration, showing a peak of edema after 20 minutes of injection and maintenance of this edema for an hour. The relationship of LALLT with an immune cell, the mast cell, was investigated. The visualization of mast cells in the mesentery of rats incubated with LALLT showed that this protein can degranulate mast cells. With these results, it is possible to associate LALLT with cutaneous symptoms of Loxoscelism such as edema, erythema and cutaneous rash. Thus, it is suggested that this protein have an important role in the envenoming by *Loxosceles* spiders. However, to further understand the activities of LALLT, new assays are needed to understand the mechanisms of this toxin in the process of Loxoscelism.

Key Words: Venom. Allergenic toxin. *L. intermedia*. Baculovirus. Loxoscelism. Hypersensitivity.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Morfologia de aranhas da espécie <i>Loxosceles intermedia</i> .....	20
Figura 2 – Análise do perfil proteico do veneno de <i>L. intermedia</i> e visão geral das porcentagens dos transcritos codificantes de toxinas expressos na glândula de veneno de <i>L. intermedia</i> obtidos no estudo do transcriptoma.....	21
Figura 3 - Sinais associados à variante cutânea do loxoscelismo decorrente da picada de aranhas do gênero <i>Loxosceles</i> .....	25
Figura 4 - Reações alérgicas decorrentes de picadas de aranhas do gênero <i>Loxosceles</i> ...	26
Figura 5 - Análise da amplificação da sequência codificante de LALLT e verificação dos clones positivos obtidos contendo a sequência de interesse .....	42
Figura 6 - Sequências nucleotídica e aminoacídica da LALLT, com predição do peptídeo sinal e de modificações pós-traducionais.....	43
Figura 7 - Alinhamento de sequências aminoacídicas de alérgenos semelhantes à LALLT e sua relação filogenética com as espécies de animais correspondentes à seus alérgenos ...	45
Figura 8 – Alterações morfológicas e diminuição da confluência em células Sf9 transfectadas com o baculovírus recombinante por 72 horas, após nove amplificações .....	47
Figura 9 - Amplificação das partículas virais obtidas do meio de cultivo de células Sf9 transfectadas com baculovírus recombinante .....	48
Figura 10 – Identificação da LALLT em diferentes tempos e porcentagens virais .....	49
Figura 11 – Pico de eluição obtido após a purificação da expressão em larga escala da LALLT e análise do perfil proteico com posterior reconhecimento da LALLT no veneno de <i>L. intermedia</i> .....	50
Figura 12 - Análise do perfil proteico e o reconhecimento da LALLT no veneno de <i>L. intermedia</i> da segunda expressão em larga escala .....	51
Figura 13 – Reconhecimento da LALLT pelo soro produzido anti-LALLT e conservação de epítomos lineares da LALLT no gênero <i>Loxosceles</i> .....	53
Figura 14 - Conservação de epítomos estruturais da LALLT nos venenos de aranhas <i>Loxosceles</i> .....	54
Figura 15 – Atividade da LALLT no aumento do extravasamento de plasma em camundongos .....	55
Figura 16 - Edema macroscópico causado pela aplicação da LALLT em pele de coelho ....	56

Figura 17 - Presença de fibras colágenas desorganizadas e recrutamento de células na pele de coelhos tratados com a LALLT..... 57

Figura 18 – Edema de pata causado pela aplicação da LALLT em camundongos ..... 58

Figura 19 - Degranulação de mastócitos na presença de LALLT em mesentérios de ratos . 59

## LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

AcMNPV– *Autographa californica Multiple Nucleocapsids*

AGEP - *acute generalized exanthematous pustulosis*

Bla g 2 - Alérgeno de *Blattella germanica*

BV - *Budded Virus*

BvTri 37 - Alérgeno do trigo

CAP - *cysteine-rich secretory proteins, antigen5, and pathogenesis-related1proteins*

ICK - *Inhibitor Cystine Knot*

LALLT - *Loxosceles allergen-like toxin*

LiRecDT1 - Fosfolipase-D recombinante de *L. intermedia*

ODV - *Oclusion derived virus*

PBS- *Phosphate buffered saline*

SDS- PAGE- *Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*

Sf9 - *Spodoptera frugiperda*

SFB- Soro fetal bovino

Sol i 1/2/3/4 - Alérgeno de *Solenopssis invicta* 1,2,3,4

TCTP - *Translationally Controlled Tumor Protein*

TE - Tampão Tris-EDTA

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
1.2. OBJETIVOS .....	19
1.2.1 Objetivo geral .....	19
1.2.2 Objetivos específicos.....	19
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>20</b>
2.1 ARANHAS DO GÊNERO <i>LOXOSCELES</i> .....	20
2.2 O VENENO LOXOSCÉLICO E SUAS MOLÉCULAS.....	21
2.3 LOXOSCELISMO E OS EVENTOS DE HIPERSENSIBILIDADE .....	24
2.4 REAÇÕES DE HIPERSENSIBILIDADE E ALERGIA .....	27
2.5 ALÉRGENOS EM ARTRÓPODES.....	28
2.6 O SISTEMA BACULOVÍRUS .....	30
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>31</b>
3.1 DESENHO DOS PRIMERS, AMPLIFICAÇÃO DA SEQUÊNCIA LALLT E LIGAÇÃO NO VETOR pENTR™/D-TOPO®.....	31
3.2 TRANSFORMAÇÃO DA CONSTRUÇÃO (LALLT + pENTR™/D-TOPO®) EM CEPAS COMPETENTES DE BACTÉRIAS.....	32
3.3 PCR DE COLÔNIA E PARA O SEQUENCIAMENTO.....	32
3.4 RECOMBINAÇÃO COM DNA DO BACULOVÍRUS .....	33
3.5 TRANSFECCÃO NAS CÉLULAS DE INSETO SF9 E AMPLIFICAÇÕES.....	33
3.6 EXTRAÇÃO VIRAL E DETECÇÃO VIRAL POR MEIO DA PCR EM TEMPO REAL (qPCR).....	35
3.7 TESTES DE EXPRESSÃO TEMPO/PORCENTAGEM VIRAL (V/V) .....	36
3.8 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE).....	36
3.9 <i>WESTERN BLOTTING</i> .....	37
3.10 EXPRESSÃO EM LARGA ESCALA E PURIFICAÇÃO NO SISTEMA AKTA....	37

3.11	IMUNIZAÇÃO EM CAMUNDONGOS E REATIVIDADE CRUZADA DOS VENENOS DE <i>L. intermedia</i> , <i>L. laeta</i> E <i>L. gaucho</i> .....	38
3.12	ELISA .....	38
3.13	ENSAIO DE PERMEABILIDADE VASCULAR EM CAMUNDONGO .....	39
3.14	EDEMA EM PELE DE COELHO .....	39
3.15	ANÁLISE HISTOLÓGICA DA PELE DE COELHO .....	40
3.16	EDEMA DE PATA EM CAMUNDONGO .....	40
3.17	VISUALIZAÇÃO DE MASTÓCITOS EM MESENTÉRIO DE RATOS .....	40
3.18	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	41
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>41</b>
4.1	ANÁLISE DA AMPLIFICAÇÃO DA SEQUÊNCIA DE LALLT E DOS CLONES POSITIVOS OBTIDOS APÓS TRANSFORMAÇÃO COM A CONSTRUÇÃO LALLT + pENTR™/D-TOPO® .....	41
4.2	SEQUÊNCIA NUCLEOTÍDICA, AMINOACÍDICA E CARACTERÍSTICAS PREDITAS DA LALLT .....	42
4.3	COMPARAÇÃO DA SEQUÊNCIA AMINOACÍDICA DA LALLT COM OUTROS ALÉRGENOS .....	43
4.4	CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS OBSERVADAS DAS CÉLULAS SF9 TRANSFECTADAS .....	46
4.5	DETECÇÃO DE PARTÍCULAS VIRAIS NO MEIO DE CULTIVO CELULAR DE CÉLULAS SF9 TRANSFECTADAS .....	47
4.6	PADRONIZAÇÃO DO TEMPO DE EXPRESSÃO E PORCENTAGEM VIRAL ÓTIMOS PARA A OTIMIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DA LALLT .....	48
4.7	EXPRESSÕES EM LARGA ESCALA DA LALLT, PURIFICAÇÃO POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE E DETECÇÃO DA PROTEÍNA EM <i>W.B</i> .....	50
4.8	PRODUÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-LALLT E REAÇÃO CRUZADA COM OS VENENOS TOTAIS DE <i>L. intermedia</i> , <i>L. laeta</i> E <i>L. gaucho</i> .....	52
4.9	ELISA .....	53
4.10	ENSAIO DE PERMEABILIDADE VASCULAR .....	54

4.11 EDEMA EM PELE DE COELHO .....	55
4.12 HISTOLOGIA DAS PELES DE COELHO.....	56
4.13 ENSAIO DE EDEMA DE PATA EM CAMUNDONGO .....	57
4.14 ATIVIDADE DA LALLT EM MESENTÉRIO DE RATOS.....	58
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>59</b>
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>67</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>68</b>
<b>ANEXO 1.....</b>	<b>75</b>



## 1. INTRODUÇÃO

Existem mais de 100 espécies de aranhas do gênero *Loxosceles* no mundo (GREMSKI *et al.*, 2014). Esses animais possuem um potente arsenal de toxinas em seu veneno e, devido a isso, os acidentes envolvendo esses artrópodes tem uma grande importância clínica. Além disso, o envenenamento decorrente da picada dessas aranhas ocorre com frequência, especialmente no sul do Brasil. Por exemplo, no ano de 2018, o estado do Paraná registrou 4098 casos de acidentes envolvendo aranhas do gênero *Loxosceles* (SINAM, 2018).

Loxoscelismo é o termo utilizado para designar o conjunto de sinais e sintomas clínicos desencadeados pela picada de aranhas do gênero *Loxosceles*. O grave envenenamento tem efeitos cutâneos e sistêmicos como inflamação local, lesão dolorosa, eritema, edema, dermonecrose e, em casos mais graves hemólise intravascular e insuficiência renal aguda. Esses sintomas são decorrentes do efeito sinérgico de toxinas com diversas atividades biológicas (ISBISTER e FAN, 2011; GREMSKI *et al.*, 2014; CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2017). Em 2010, Gremski e colaboradores revelaram a diversidade dessas toxinas por meio da análise do transcriptoma da glândula de veneno de *L. intermedia*.

As famílias de toxinas identificadas no transcriptoma da glândula de veneno de *L. intermedia* podem ser divididas entre aquelas que são altamente expressas, como as fosfolipases-D, peptídeos inseticidas e metaloproteases, e aquelas que são pouco expressas como a TCTP (*Translationally Controlled Tumor Protein*), hialuronidases e alérgenos (GREMSKI *et al.* 2014).

Muitas dessas toxinas tiveram seus papéis definidos no loxoscelismo. A fosfolipase-D, por exemplo, está relacionada com o desenvolvimento de dermonecrose, hemólise e distúrbios renais (BARBARO *et al.*, 1996, DA SILVA *et al.*, 2004, CHAIM *et al.*, 2006, GREMSKI *et al.*, 2014). A hialuronidase hidrolisa ácido hialurônico causando um espalhamento do veneno nos tecidos (FERRER *et al.*, 2013). Outra família de toxinas com atividade bem caracterizada é das metaloproteases, que são capazes de degradar fibronectina e fibrinogênio (FEITOSA *et al.*, 1998, GREMSKI *et al.*, 2014). Entretanto, uma molécula alergênica havia sido identificada no transcriptoma, mas não havia sido obtida e testada de forma isolada em ensaios biológicos a fim de caracterizá-la. Assim, seu papel no loxoscelismo era ainda incerto. Apesar dessa falta de informação a respeito de

moléculas com atividade alergênica reações de hipersensibilidade foram registradas em alguns casos de picadas com aranhas do gênero *Loxosceles* (MAKRIS *et al.*, 2009, LANE *et al.*, 2011), bem como manifestações características de alérgenos, a exemplo de edema e eritema, também haviam sido relatadas (MALAQUE *et al.*, 2015).

Avanços na biologia molecular têm auxiliado na elucidação do papel dessas moléculas. Moléculas alergênicas podem ter diversas vias de entrada. Podem ser inaladas, ingeridas ou injetadas. Estudos envolvendo essas moléculas presentes em venenos de artrópodes têm aumentado cada vez mais, visto que eventos alérgicos podem causar graves reações como anafilaxia (OLLERT e BLANK., 2015). Devido à sua glicosilação, alérgenos são mais bem expressos em sistemas de expressão com sistema de endomembranas, como aqueles presentes em seres eucariotos. Sendo assim, neste trabalho optou-se pela expressão em sistema de baculovírus, o qual utiliza células de inseto da linhagem Sf9 (*Spodoptera frugiperda*).

Este trabalho resultou na clonagem molecular e expressão heteróloga da primeira molécula alergênica presente no veneno de aranhas *L. intermedia*, a qual havia sido identificada no estudo preliminar do transcriptoma da glândula de veneno de *L. intermedia*. O alérgeno aqui estudado foi denominado de LALLT (*Loxosceles allergen-like toxin*). Essa molécula demonstrou atividade edematogênica, promoveu um aumento no extravasamento de líquido plasmático e desencadeou a degranulação de mastócitos. Todas essas atividades corroboram com os sintomas iniciais do loxoscelismo, que envolvem edema e eritema (CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2019). Sendo assim, o alérgeno estudado pode auxiliar a compreender melhor o processo inflamatório e as reações de hipersensibilidade que já foram descritas.

## 1.2. OBJETIVOS

### 1.2.1 Objetivo geral

- Obter e caracterizar funcionalmente uma toxina recombinante de *Loxosceles intermedia* homóloga a alérgenos (LALLT – *Loxosceles allergen-like toxin*)

### 1.2.2 Objetivos específicos

- Clonar a sequência codificante da LALLT no vetor pENTR™/D-TOPO® para expressão no sistema baculovírus;
- Obter a proteína de forma recombinante e pura, utilizando o sistema de expressão eucarioto (baculovírus em células de inseto Sf9);
- Avaliar atividades biológicas da LALLT *in vivo* (resposta inflamatória, aumento da permeabilidade vascular e edema);
- Produzir um soro policlonal em camundongos específico para a LALLT;
- Verificar a conservação de epítomos da LALLT em venenos de outras espécies do gênero *Loxosceles* (*L. laeta* e *L. gaucho*).

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 ARANHAS DO GÊNERO *LOXOSCELES*

As aranhas mais frequentemente envolvidas em acidentes graves no Brasil pertencem aos gêneros *Phoneutria*, *Latrodectus* e *Loxosceles* (SAMPAIO *et al.*, 2016). De acordo com o SINAN, apenas no ano de 2017, as aranhas do gênero *Loxosceles* foram responsáveis pela maior parte dos acidentes com aranhas no Brasil (8079), e no Paraná, em 2018, 4098 casos envolvendo essas aranhas foram notificados. Essas aranhas pertencem à família Sicariidae, sub-ordem Labidognatha, ordem Araneae, classe Arachnida, filo Artrópode. Possuem tamanho que varia 1 a 5 cm e dimorfismo sexual acentuado (FUTRELL *et al.*, 1992, CHAIM *et al.*, 2011, GREMSKI *et al.*, 2014) (Figura 1).

Devido à preferência de *habitat* desses animais, os acidentes são comuns e recorrentes. Esses artrópodes se adaptaram para viver em ambientes intradomiciliares, entre seres humanos, e são encontrados em locais propícios para acidentes como em vestimentas e calçados, além de mobílias em geral (atrás de quadros e móveis) (Secretaria Estadual de Saúde do Paraná, 2019).

Figura 1 - Morfologia de aranhas da espécie *Loxosceles intermedia*

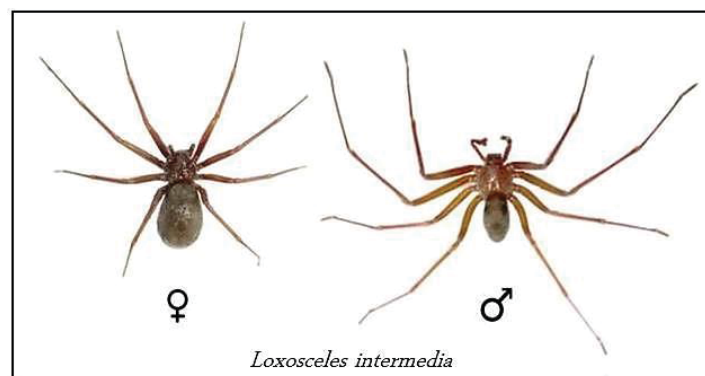
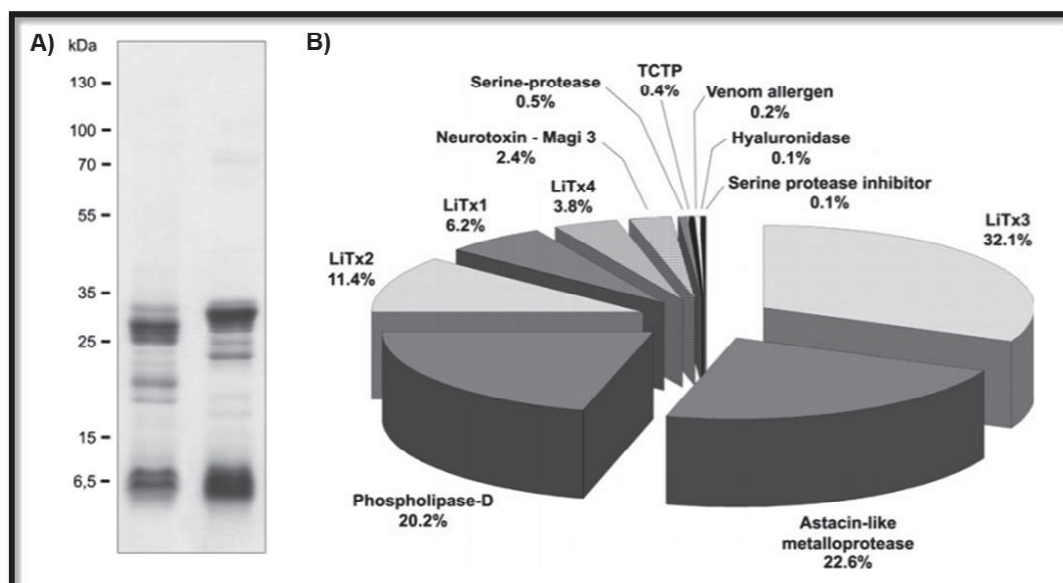


Imagem demonstrando o dimorfismo sexual entre os espécimes de *L. intermedia*. A fêmea com abdômen maior e pernas mais curtas enquanto o macho possui o abdômen mais fino e as pernas mais longas (A autora, 2018).

## 2.2 O VENENO LOXOSCÉLICO E SUAS MOLÉCULAS

O veneno da aranha-marrom é um líquido cristalino e incolor, composto principalmente por glicoproteínas e peptídeos de baixa massa molecular. As massas moleculares das toxinas variam entre 5-40 kDa. Por meio da análise do transcriptoma da glândula de veneno de *L. intermedia* foram identificadas sequências codificantes de diversos grupos de toxinas (GREMSKI *et al.*, 2010) (Figura 2 A e B). Existem 3 classes de moléculas altamente expressas que, no total, correspondem a quase 95% de todos os transcritos: as fosfolipases-D, metaloproteases e os peptídeos inseticidas (CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2019).

Figura 2 – Análise do perfil proteico do veneno de *L. intermedia* e visão geral das porcentagens dos transcritos codificantes de toxinas expressos na glândula de veneno de *L. intermedia* obtidos no estudo do transcriptoma



Em A o SDS-PAGE mostra de uma forma reduzida e não reduzida o perfil proteico do veneno de *L. intermedia*, revelando a presença de bandas predominantemente entre 5 e 40 kDa. Em B, uma visão geral das porcentagens de transcritos codificantes de toxinas. Os transcritos de peptídeos inseticidas, as fosfolipases e as metaloproteases representam mais de 95% dos transcritos obtidos no estudo do transcriptoma da glândula de veneno de *L. intermedia* (adaptado de Gremski *et al.*, 2010).

As fosfolipases-D estão entre as toxinas mais bem caracterizadas. São conhecidas como toxinas dermonecróticas devido à sua capacidade de desencadear dermonecrose *in vivo*. Essa toxina tem o potencial de hidrolisar determinados fosfolipídeos. Além dos efeitos dermonecróticos, as fosfolipases também são

responsáveis por eventos como: aumento na permeabilidade vascular, edema, hemólise, agregação plaquetária e nefrotoxicidade, sendo assim responsáveis pela maior parte dos sintomas desencadeados pelo envenenamento pela aranha-marrom (DA SILVA *et al.*, 2004, CHAIM *et al.*, 2006, CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2011; MALAQUE *et al.*, 2011; VUITIKA *et al.*, 2016; CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2019). Atualmente, para *L. intermedia*, 7 isoformas de fosfolipases 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 essas toxinas de *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 a SMaseD de *L. reclusa* (LEE *et al.*, 2005). A fim de minimizar os efeitos dermonecróticos dessa enzima, diversos estudos foram realizados. Foi relatada em 2007 a diminuição da lesão dermonecrótica em coelhos por meio do tratamento tópico com o antibiótico tetraciclina (PAIXÃO-CAVALVANTE *et al.*, 2007). Recentemente, também foram expressas fosfolipases mutadas de *L. intermedia* a fim de investigar e elucidar o reconhecimento do substrato no sítio catalítico da enzima e a dependência de  $Mg^{2+}$  para sua atividade; quando testadas, essas toxinas mutadas revelaram atividades biológicas reduzidas ou ausência dessas atividades (VUITIKA *et al.*, 2016).

As metaloproteases presentes no veneno dessas aranhas possuem um papel importante no espalhamento das outras toxinas. Possuem esse nome por ter uma dependência de metal do metal zinco para suas atividades, como a hidrólise de moléculas de matriz tais como o fibrinogênio e a fibronectina. Essas enzimas estão relacionadas com distúrbios hemorrágicos e aumento na permeabilidade vascular (FEITOSA *et al.*, 1998, GREMSKI *et al.*, 2014; MORGON *et al.*, 2016). Em *L. intermedia* foram identificadas 3 isoformas (LALP, LALP2 e LALP3) (DA SILVEIRA *et al.*, 2007; TREVISAN *et al.*, 2010) e essas moléculas também foram encontradas em *L. laeta*, *L. gaucho*, *L. deserta* e *L. reclusa* (BARBARO *et al.*, 2005; TREVISAN *et al.*, 2013). As metaloproteases podem ser uma importante bioferramenta no futuro. Por exemplo, elas podem ser usadas em processos de cicatrização de matriz extracelular, eliminando tecidos danificados. Também poderiam auxiliar no tratamento com antibióticos, visto que algumas bactérias patogênicas produzem um biofilme para auxiliar na adesão do tecido infectado; assim, as metaloproteases

poderiam ajudar na degradação desse biofilme, facilitando a atuação dos antibióticos (CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2019).

A classe de moléculas que corresponde a mais de 50% dos transcritos de toxinas expressos na glândula de veneno de *L. intermedia* codificam peptídeos inseticidas (LiTx1-4 e Neurotoxin) (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. Esses peptídeos apresentam baixa massa molecular e são bem caracterizados por possuírem muitos resíduos de cisteínas (no mínimo 6), os quais formam pontes dissulfeto que se organizam de uma forma a compor um motivo estrutural chamado “nó de cistina inibidor” (MATSUBARA *et al.*, 2013). As pontes dissulfeto proporcionam uma alta resistência e estabilidade a esses peptídeos e permitem o estabelecimento de uma conformação tridimensional que deu origem ao nome dessas moléculas: Notinas (do inglês “*knot*”, nó) ou peptídeos ICK (*Inhibitor Cystine Knot*, nó de cistina inibidor) (CRAIK, DALY e WAINE, 2001; MOORE, LEUNG e COCHRAN, 2013). Os peptídeos ICK apresentam a capacidade de causar paralisia em larvas de *Spodoptera frugiperda* e em moscas da espécie *Lucilia cuprina*, o que os tornam potenciais bioinseticidas para o combate de larvas de interesse econômico (DE CASTRO *et al.*, 2004; MATSUBARA *et al.*, 2016). Em outras duas espécies de aranhas *Loxosceles* (*L. laeta* e *L. gaucho*) foram encontradas sequências de notinas muito semelhantes com aquelas encontradas em *L. intermedia*. Muitos peptídeos ICK produzidos por aranhas são capazes de interagir principalmente com canais iônicos de sódio e cálcio voltagem-dependentes, o que os torna um potencial alvo para produção de analgésicos (BELEBONI *et al.*, 2004; MEISSNER *et al.*, 2016; CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2019).

Dentre as famílias de toxinas menos expressas pela glândula de veneno de *L. intermedia* estão: hialuronidases (0,1%), TCTP (0,4%), serino-proteases (0,5%), inibidor de serino protease (0,1%) e alérgenos (0,2%) (GREMSKI *et al.*, 2010) (Figura 2). Apesar de seus baixos percentuais, sua importância e seus efeitos biológicos parecem ser bastante relevantes. A hialuronidase, por exemplo, é uma molécula responsável pelo espalhamento gravitacional do veneno. Ela é capaz de hidrolisar o ácido hialurônico e condroitin sulfato presentes na matriz extracelular permitindo que os outros componentes do veneno se difundam pelos tecidos (FERRER *et al.*, 2013). A TCTP (*Translationally Controlled Tumor Protein*) também,

apesar do seu baixo percentual, é uma molécula capaz de aumentar a permeabilidade vascular e causar edema na pata de camundongos (SADE *et al.*, 2012). Tanto a hialuronidase quanto a TCTP são proteínas que possuem grandes potenciais biotecnológicos. Enzimas como as hialuronidasas podem ser usadas para reduzir a extensão de danos causados em um tecido e como um adjuvante para absorção de drogas como os antibióticos. Já a TCTP tem um potencial para produção de próteses dentárias e é considerada como um potencial alvo na terapia de asma e alergias (CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2019).

### 2.3 LOXOSCELISMO E OS EVENTOS DE HIPERSENSIBILIDADE

A atividade sinérgica das toxinas encontradas no veneno das aranhas do gênero *Loxosceles* desencadeia nas vítimas da picada um quadro clínico de sinais e sintomas característicos que denominamos de loxoscelismo. Na maior parte dos casos há o desenvolvimento de uma reação inflamatória no local da picada, a formação de uma lesão dolorida, e após alguns dias a lesão pode se espalhar de forma gravitacional e evoluir para uma séria lesão dermonecrotica. Sendo esse o sintoma principal observado do loxoscelismo cutâneo. (ISBISTER e FAN, 2011; GREMSKI *et al.*, 2014; CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2017).

Além da dermonecrose, a picada desses animais também desencadeia reações inflamatórias. Por exemplo, são registrados casos de picadas de aranhas do gênero *Loxosceles* que desencadearam respostas inflamatórias que podem estar relacionadas com reações histaminérgicas como: edema, eritema (vermelhidão) e exantema (erupções avermelhadas generalizadas) (Figura 3) (GREMSKI *et al.*, 2014; CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2017).



Figura 3 - Sinais associados à variante cutânea do loxoscelismo decorrente da picada de aranhas do gênero *Loxosceles*

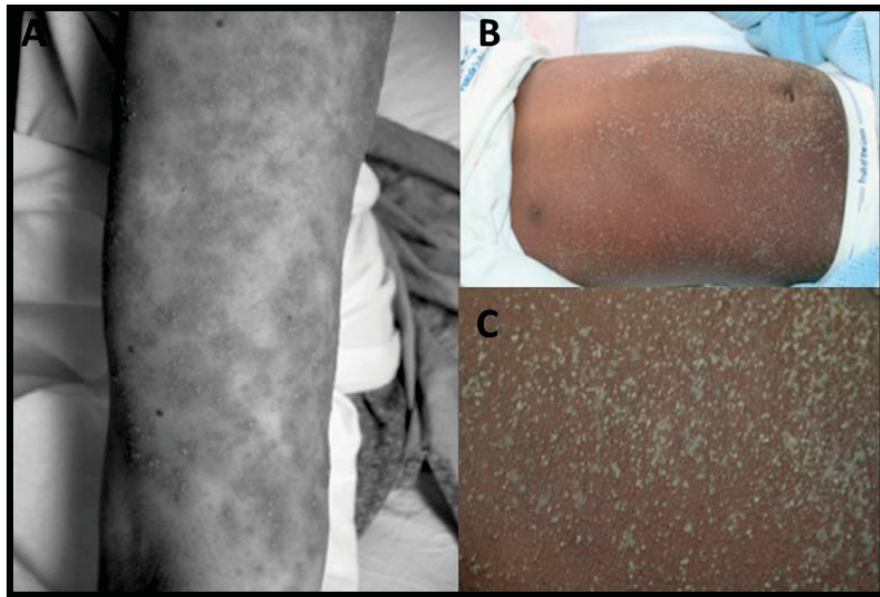


Em A é mostrada uma lesão eritematosa e em B é mostrado um exantema e edema, ambos sintomas iniciais do loxoscelismo cutâneo, desenvolvidos em pacientes picados por aranhas do gênero *Loxosceles* (Adaptado de MALAQUE *et al.*, 2015).

Além das manifestações cutâneas mencionadas, o loxoscelismo também pode se desenvolver de forma sistêmica. Apesar de ocorrer em poucos casos, os sintomas são bem mais graves como febre, hemólise intravascular, insuficiência renal aguda e, em alguns casos raros, pode levar o paciente a óbito (ISBISTER e FAN, 2011; GREMSKI *et al.*, 2014; CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2017).

Makris (2009) e Lane (2011) relataram o desenvolvimento de um exantema pustuloso generalizado (AGEP - *acute generalized exanthematous pustulosis*) derivado de acidentes com aranhas do gênero *Loxosceles* (Figura 4). Esse sintoma é mais comumente encontrado em reações a drogas como os antibióticos, mas nos últimos anos a picada dessas aranhas tem sido relacionada com o AGEP. Esse sintoma é uma reação séria que causa a formação de pústulas generalizadas em uma pele eritematosa (MAKRIS *et al.*, 2009, LANE *et al.*, 2011, GUERROUJ *et al.*, 2014, MILMAN *et al.*, 2016). Essas manifestações podem estar relacionadas com a presença de uma toxina alergênica no veneno das aranhas do gênero *Loxosceles*, como aquela sequência identificada no transcriptoma da glândula de veneno de *L. intermedia*.

Figura 4 - Reações alérgicas decorrentes de picadas de aranhas do gênero *Loxosceles*



Pacientes que desenvolveram reações alérgicas como erupções em uma pele eritematosas (A) e pústulas generalizadas (B e C) após 72 horas da picada de aranhas *Loxosceles* (Adaptado de MAKRIS *et al.*, 2009, LANE *et al.*, 2011).

Transcritos de proteínas alergênicas foram identificadas em outros transcriptomas de aranhas *Loxosceles*, além daquele de *L. intermedia*. Em *L. laeta* 0,6% de seus transcritos correspondem a proteínas alergênicas. Apesar de 3 sequências estarem depositadas no GenBank elas estão incompletas (EY189185, EY188440, EY189716). Para *L. gaucho* os transcritos correspondem a 2,12% (FERNANDES-PEDROSA *et al.*, 2008; CALABRIA *et al.*, 2019). A sequência do transcrito do alérgeno de *L. intermedia* (denominada LALLT) revelou uma alta similaridade aminoacídica com moléculas alergênicas presentes em venenos de outros animais como escorpiões e outras espécies de aranhas (FERRER, 2010). Essa sequência pode estar relacionada a eventos de hipersensibilidade e processos inflamatórios decorrentes da picada de aranhas do gênero *Loxosceles*. Essa classe de moléculas nunca foi antes expressa e sua função biológica efetiva não foi testada. Dessa forma, investigar o papel de uma toxina semelhante à alérgenos no contexto do loxoscelismo é importante para entender essas manifestações de hipersensibilidade.

A purificação da LALLT na sua forma nativa diretamente do veneno é inviável, visto que seria necessária uma enorme quantidade de veneno, sendo que,

normalmente, poucos microgramas são obtidos de uma aranha. Além disso, devido às características intrínsecas dessa toxina (tamanho, prováveis modificações pós-traducionais) existem alguns obstáculos que dificultam a sua expressão com a conformação correta. A LALLT possui diversas cisteínas, e justamente devido a essa característica ela se enquadra na família CAP (*cysteine-rich secretory proteins, antigen5, and pathogenesis-related1proteins*). As pontes dissulfeto provavelmente formadas por essas cisteínas não favoreceram a expressão em sistema procarioto, resultando em uma proteína insolúvel (FERRER, 2010).

## 2.4 REAÇÕES DE HIPERSENSIBILIDADE E ALERGIA

As partículas desencadeadoras de reações de hipersensibilidade podem ter diversas vias de entrada no organismo. Podem ser inaladas, ingeridas ou injetadas (PLATTS-MILLS e WOODFOLK, 2011; WOODFOLK *et al.*, 2015). Essas reações de hipersensibilidade são definidas como respostas exacerbadas e inesperadas do sistema imune frente a alguma molécula. São classificadas em 4 tipos de acordo com o tipo celular pela qual elas são mediadas. A reação do tipo I é mediada por IgE, a do tipo II por IgM/IgG, a do tipo III por IgG/IgM mediada por imunocomplexo e a do tipo IV mediada por célula-T. As reações alérgicas são relacionadas com as reações de hipersensibilidade do tipo I, pelo processo de produção e liberação de IgE pelas células B, estimuladas pelos linfócitos Th2. Em um primeiro contato com um alérgeno, há a produção de IgE, as quais se ligam ao receptor FcεRI presente na superfície de mastócitos e basófilos (sensibilização). Em um segundo contato com essa molécula, há o reconhecimento do alérgeno pelos anticorpos IgE presente na membrana de mastócitos e basófilos, desencadeando a liberação de mediadores inflamatórios por essas células, a exemplo da histamina, serotonina e citocinas, que causam sintomas como aumento da permeabilidade vascular e edema (UZZAMAN e SEONG, 2012; VELEZ, BRYCE e HULSE, 2018).

Apesar do mecanismo da hipersensibilidade do tipo I estar bem estabelecido e relacionado à IgE e à alergia, existem alergias que também desencadeiam a liberação de mediadores inflamatórios de mastócitos e basófilos de forma independente de IgE. Além do receptor FcεRI, mastócitos também possuem uma grande variedade de receptores para respostas contra bactérias, fungos, vírus e outras moléculas que também estão relacionadas com sintomas de alergia (BRYCE

e HULSE, 2018). Ou seja, não são todas as reações de hipersensibilidade que dependem da IgE, existem outras formas de degranular mastócitos e desencadear seus mediadores inflamatórios, independentemente de IgE e da sensibilização desses mastócitos.

## 2.5 ALÉRGENOS EM ARTRÓPODES

Os casos de reações alérgicas mais discutidos na literatura são decorrentes de picadas de insetos (abelhas, vespas e formigas). A alergia ao veneno de vespas e abelhas é um dos casos mais severos de reações de hipersensibilidade. Entre 9,2% e 28,7% dos adultos são sensibilizados ao veneno de himenópteras (OLLERT e BLANK., 2015). O veneno desses animais pode causar reações alérgicas sistêmicas e locais, incluindo, em casos mais graves, a anafilaxia. As reações variam de acordo com o tipo do inseto, a saúde e a idade do indivíduo, entre outras variáveis (RIVEROL *et al.*, 2015). As manifestações clínicas mais comuns são: urticária generalizada, queda da pressão arterial, broncoespasmos, parada cardíaca e respiratória e choque anafilático (MINGOMATAJ *et al.*, 2014). Um dos alérgenos mais estudados é o da abelha *Apis mellifera* (Api m 1). Expresso de forma recombinante em baculovírus, essa molécula desencadeia formação de IgE específica contra Api m 1 em 97% dos pacientes alérgicos à picada dessa espécie de abelha (BLANK *et al.*, 2011). Já em formigas, o gênero mais importante clinicamente é o *Solenopsis*. Mais especificamente as espécies *S. invicta*, *S. richteri*, *S. germinata* e *S. saevissima* (HOFFMAN 2010). Ao serem picadas pela *S. invicta*, conhecida como formiga de fogo, 5% das pessoas necessitam de atendimento médico e 2% desencadeiam fortes reações alérgicas sistêmicas. Os sintomas são bem variados como, por exemplo, tosse, febre, vertigem, náuseas, dores de cabeça e em casos extremos choque anafilático (BIRCHER, 2005, LOCKWOOD *et al.*, 2012). Atualmente existem descritos na literatura 4 alérgenos para *S. invicta*: Sol i 1, Sol i 2, Sol i 3 e Sol i 4. Os alérgenos Sol i 2 e Sol i 3 são os mais abundantes no veneno e tiveram suas estruturas cristalizadas. Esses alérgenos foram expressos em sistema de baculovírus e foram capazes de reagir com o soro de pacientes sensíveis à formiga do fogo (*S. invicta*) e, sendo assim, são potenciais insumos terapêuticos para o diagnóstico de alergias (SCHMIDT *et al.*, 1996, HOFFMAN, MCCONNELL e SCHMIDT, 2003).

Ácaros e baratas também são animais que podem desencadear reações alérgicas severas. A primeira resposta alérgica relacionada com baratas foi reportada em 1964. Esses artrópodes podem induzir reações de hipersensibilidade tipo I mediada por IgE (BERNTON 1964). Estudos relatam que, principalmente em crianças, a alergia a baratas está relacionada com rinites alérgicas e asma (ROSENSTREICH *et al.*, 1997, POMÉS *et al.*, 2016). Há uma grande diversidade de alérgenos que variam entre as espécies de baratas. Em *Periplaneta americana*, por exemplo, foram identificados aproximadamente 22 componentes que se ligam à imunoglobulina IgE (THANGAM *et al.*, 2007). Atualmente existem 12 grupos de alérgeno de baratas (POMÉS *et al.*, 2016). A clonagem molecular foi uma ferramenta de grande auxílio para melhor entender os eventos de hipersensibilidade envolvidos com baratas. O primeiro alérgeno a ser clonado foi o Bla g 2 de *Blattella germanica* em 1995 (ARRUDA *et al.*, 1995, ARRUDA *et al.*, 2014). A partir disso, os estudos avançaram e atualmente na base de dados Allergen Nomenclature Subcommittee (WHO/IUIS) existem 10 alérgenos recombinantes de *Blattella germanicae* 11 de *Periplaneta americana*. Nesses animais, o alérgeno de *Periplaneta americana* (Per a 9) foi clonado e expresso pelo sistema de baculovírus (YANG *et al.*, 2019). Os ácaros são animais que desencadeiam reações alérgicas associadas com rinite e asma (PLATTS-MILLS *et al.*, 1997). As espécies de ácaros mais comuns encontrados em casas domésticas são *Dermatophagoides pteronyssinus* e *Dermatophagoides farinae* (POMÉS *et al.*, 2016). Os alérgenos desses animais são mais comumente inalados e desencadeiam produção de anticorpos IgE, causando reações de hipersensibilidade. Os alérgenos Der f 1, Der f 2 e Der f 4 também foram expressos no sistema de baculovírus (CUI *et al.*, 2018). Eles são divididos em 33 grupos, os quais estão registrados no banco de dados Allergen Nomenclature Subcommittee. Os grupos 1 e 2 causam sensibilização em mais de 80% de pacientes alérgicos a ácaros.

As aranhas também podem desencadear respostas alérgicas. Inclusive, esses animais foram associados positivamente, juntamente com formigas e cães de estimação, com a prevalência de asma em uma população de crianças no México (SVENDSEN, GONZALES e COMMODORE, 2018). Foram relatados casos de pacientes que desenvolveram sintomas como reações urticantes, devido ao contato com os pelos presentes em uma família de aracnídeos chamada Theraphosidae (ISBISTER, 2002).

## 2.6 O SISTEMA BACULOVÍRUS

Um dos maiores desafios para a expressão de proteínas da família CAP é justamente a sua alta quantidade de resíduos de cisteínas, as quais formam pontes dissulfeto. Essa característica dificulta a expressão em sistemas de expressão procarioto, os quais não possuem um sistema de endomembranas e, assim, não fornecem um ambiente redutor adequado para a formação dessas pontes dissulfeto (GAIKWAD, *et al.*, 2020). Dessa forma, o sistema de expressão em células de inseto infectadas pelo baculovirus, que possui o sistema de endomembranas desejado, pode melhorar a expressão dessa classe de proteínas.

De acordo com o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (2017), os vírus da família Baculoviridae são divididos em 4 gêneros; Alphabaculovirus, Betabaculovirus, Deltabaculovirus e Gammabaculovirus. Esses vírus são patógenos específicos de artrópodes, capazes de regular populações de insetos. Seu genoma fornece informação para a produção de nucleocapsídeos envelopados, de forma individual ou em grupos. Os vírions desses organismos estão presentes em dois fenótipos. O Vírus derivado de oclusão (ODV) e os “*Budded*” Vírus (BV). Cada um é responsável por um período e local diferente de infecção nas células das larvas (LÓPEZ *et al.*, 2018). Protegendo os vírions desses organismos está uma proteína de matriz, que forma os corpos de oclusão (OB) ou poliedra (HU *et al.*, 2010, WILLIAMS *et al.*, 2017, LÓPEZ *et al.*, 2018). É devido à morfologia desses OB que os vírus da família Baculoviridae foram divididos em dois grandes grupos; os núcleopoliedrovírus (OBs em formato poliédrico de 0.5-10  $\mu\text{m}$ ) e os granulovírus (OBs em formato simples de 0.4  $\mu\text{m}$ ) (AU, WU e PANTÉ, 2013).

A chave para usar esses vírus para a produção de proteínas recombinantes está nos genes da poliedrina e o gene p10. Esses genes são necessários para a produção dos corpos de oclusão e na fase tardia da infecção tem sua expressão aumentada, mas não são necessários para a produção dos BV. Ou seja, os genes podem ser substituídos pelo gene de outra proteína que será regulada pelos promotores da poliedrina e do p10 (GÓMEZ *et al.*, 2014, LOPEZ *et al.*, 2018).

A espécie de baculovirus mais usada para a expressão de proteínas recombinantes é a *Autographa californica*. Essa espécie possui seus OBs em formato poliédrico, ou seja, pertencem ao grupo dos núcleopoliedrovírus (AcMNPV–

*Autographa californica multiple nucleocapsids*). A AcMNPV é um vírus que infecta diversas linhagens celulares de insetos, como por exemplo, as células da lagarta *Spodoptera frugiperda*. Derivadas do tecido do ovário da pupa da lagarta, essas células possuem duas linhagens, Sf9 e Sf21 (VAUGHN *et al.*, 1977, OERS, PIJLMAN e VLAK., 2015, WILLIAMS, 2017).

Esse sistema eucarioto possui vantagens acima do procarioto, especialmente quando a proteína a ser expressa necessita de modificações pós-traducionais como a formação de pontes dissulfeto e glicosilação. Essas modificações são fornecidas nesse modelo eucarioto, visto que possui um sistema de endomembranas para tal (OLLERT e BLANK., 2015). Dessa forma, a chance de expressar uma proteína com todas as modificações pós-traducionais corretas aumenta, favorecendo o dobramento correto e a glicosilação da proteína.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 DESENHO DOS PRIMERS, AMPLIFICAÇÃO DA SEQUÊNCIA LALLT E LIGAÇÃO NO VETOR pENTR™/D-TOPO®

Os *primers forward* e *reverse* foram desenhados de acordo com as adaptações requeridas do manual do pENTR *Directional TOPO Cloning Kits* (Invitrogen). Essas adaptações estão sublinhadas. Para o *primer forward* C ACC ATG TCT GCG ATG TAT (introdução de quatro pares de bases para criar uma ponta coesiva) e para o *reverse* AAA ACA GCT TCC GGA TTT TAC G (retirada do códon *stop* para produção da proteína com a cauda de histidina para posterior purificação). Foi usada a média das temperaturas (55° C) dos *primers* específicos para o ciclo de PCR para a amplificação da LALLT.

A construção anterior da LALLT clonada em pGEM-T foi usada como molde para a PCR de amplificação (50 ng). Foi utilizada a enzima *Taq* polimerase para testar a eficácia dos *primers*. Os reagentes utilizados nessa PCR foram: *Taq* DNA polimerase (1,25 U/μL), Mistura para PCR (1x), *primers* (0,4 μM), a construção LALLT no pGEM-T (50 ng) e o ciclo utilizado foi: 95°C/2 minutos (1x); 95°C/30 segundos, 55,2°C/30 segundos, 72°C/2 minutos (35x); 72°C/10 minutos (1x); 4°C/∞. Após a confirmação da banda correspondente esperada visualizada por meio de uma corrida eletroforética de gel de agarose 1% com brometo de etídio (0,5 μg/ml),

foi feita uma reação utilizando uma polimerase com menor taxa de erro ao adicionar nucleotídeos na amplificação, a enzima *Pfu*. Os reagentes utilizados foram *Pfu* DNA Polimerase (1,25 U/ $\mu$ L), tampão para *Pfu* DNA polimerase (1x), a construção LALLT no pGEM-T (50 ng), dNTPmix (0,2 mM). A reação também foi analisada por meio de uma corrida eletroforética de um gel de agarose 1%, visualizado pelo aparelho Chemidoc – XRS e software QuantityOne – SW (BioRad, Hércules), e a banda obtida foi extraída por meio do Kit Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ, USA).

Para a ligação no vetor pENTR™/D-TOPO® foram utilizados 1  $\mu$ L da LALLT amplificada anteriormente, 1  $\mu$ L de uma solução salina (300 mM NaCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>), 3  $\mu$ L de água estéril e 1  $\mu$ L do vetor. Essa mistura foi incubada por 30 minutos em temperatura ambiente e foi usado 2  $\mu$ L dessa reação para transformação em cepas de bactérias eletrocompetentes DH5 $\alpha$ .

### 3.2 TRANSFORMAÇÃO DA CONSTRUÇÃO (LALLT + pENTR™/D-TOPO®) EM CEPAS COMPETENTES DE BACTÉRIAS

Foram utilizados 2  $\mu$ L da reação de ligação anteriormente descrita para a transformação em cepas de bactéria DH5 $\alpha$ . Foi usado uma alíquota de bactéria de 40  $\mu$ L e essa mistura foi colocada em cubetas para posterior eletroporação. As bactérias foram recuperadas com 1 mL do meio SOC (triptona 20 g/L, extrato de levedura 5 g/L, NaCl 0,5 g/L, KCl 2,5 mM, MgCl<sub>2</sub> 10mM, MgSO<sub>4</sub> 10 mM e glicose 0,2 M) por 1 hora a 37°C sob agitação constante em agitador. Em seguida, essa reação foi centrifugada por 3 minutos e 110  $\mu$ L foram plaqueados em uma placa contendo LB ágar (triptona 10 g/L, extrato de levedura 5 g/L, cloreto de sódio 10 g/L, agar-ágar 15 g/L) com canamicina (34 mg/mL) e os outros 990  $\mu$ L plaqueados em outra placa também com o mesmo meio e antibiótico. Após 24 horas, as colônias que cresceram nas placas foram submetidas a uma PCR de colônia.

### 3.3 PCR DE COLÔNIA E PARA O SEQUENCIAMENTO

O PCR de colônia consiste em picar as colônias com um palito estéril, esfregar em um microtúbulo e posteriormente em uma placa numerada denominada de *master plate*. Dentro do tubo serão adicionados o Mix *taq* (1x), os *primers forward*



e *reverse* do vetor pENTR™/D-TOPO®, o M13 (0,2 µM) e esses tubos foram submetidos aos ciclos 95°C/5 minutos (1x); 95°C/30 segundos; 60°C/30 segundos; 72°C/2 minutos (35x); 72°C/10 minutos (1x); 4°C/∞. Após a reação, essas amostras foram analisadas em um gel de agarose 1% e as bandas foram observadas. Foram obtidos 10 clones positivos e destes, três foram submetidos a uma minipreparação (isolamento do plasmídeo com a construção da LALLT) para isolar a construção LALLT + pENTR™/D-TOPO® e posterior sequenciamento.

Para a reação de sequenciamento foram feitas minipreparações (*Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification Systems*) (Promega), de três clones positivos e foram usados aproximadamente 400 ng da construção de cada clone, tampão de sequenciamento, *primer* M13 *forward* ou *primer* M13 *reverse*. As amostras foram submetidas ao ciclo: 96°C/1 minuto (1x); 96°C/15 segundos; 50°C/15 segundos; 60°C/4 minutos (35x); 4°C/∞. Em seguida essas amostras foram precipitadas com acetato de sódio-EDTA (1,5 M) e etanol absoluto (0,1v:3v). O aparelho utilizado para a leitura foi ABI PRISM 3500 Genetic Analyser (Applied Biosystems, Foster City, EUA) e o *software* Finch TV Version 1.4.0 foi usado para analisar os eletroferogramas.

### 3.4 RECOMBINAÇÃO COM DNA DO BACULOVÍRUS

Após análise do sequenciamento dos clones, um clone positivo foi submetido novamente a uma minipreparação plasmidial, sendo desta vez a eluição com o tampão TE. Foram utilizados 2 µL dessa amostra, 10 µL do DNA linear do baculovírus, 4 µL do tampão TE e 4 µL da enzima LR clonase. Por esta reação ser realizada com base na tecnologia *Gateway* (Invitrogen), não são necessárias enzimas de restrição nem de ligação. Apenas a LR clonase, a qual retira a sequência de interesse (LALLT) clonada no vetor pENTR™/D-TOPO® e a insere no DNA linear do baculovírus. Essa reação foi deixada a 25°C por 18 horas e foi utilizada logo após na transfecção das células Sf9.

### 3.5 TRANSFECCÃO NAS CÉLULAS DE INSETO SF9 E AMPLIFICAÇÕES

Foram testados dois protocolos diferentes de transfecção. No primeiro protocolo as células foram cultivadas no meio Sf-900™ II SFM com 10% de SFB.

Essas células foram desaderidas da garrafa, centrifugadas 3.000 xg por 3 minutos, seu meio foi aspirado e as células foram ressuspensas com 5 mL do meio Sf-900™ II SFM com 10% de SFB. Em seguida, foram pipetados 10 µL dessa suspensão de células e 10 µL do reagente azul de Tripán e foram aplicados 10 µL dessa mistura na câmara de Neubauer. A viabilidade dessas células se encontrava em 94% e foram plaqueadas destas  $8 \times 10^5$  em duas placas de 6 poços cada, uma placa para o controle (células não infectadas) e uma para as células que seriam infectadas. Para o plaqueamento, foi usado 1 mL de meio Sf-900™ II SFM com 10% SFB e o volume correspondente da suspensão para  $8 \times 10^5$  células (146 µL). Foi dado o tempo de 1 hora para completa aderência dessas células na placa. Após esse tempo, o meio de ambas as placas foi inteiramente removido e adicionado 1 mL do meio *Grace's insect medium unsupplemented*. Em paralelo, foi adicionado ao tubo da recombinação 200 µL do meio *Grace's insect medium unsupplemented* e 8 µL de Celfectina (reagente com lipídeos que faz a mediação da transfecção em células Sf9). Após 45 minutos de incubação, foi adicionado a esse mesmo tubo 800 µL do *Grace's insect medium unsupplemented* e essa mistura foi gotejada lentamente em cima das células que seriam transfectadas. Para as células do grupo controle, foram adicionados 1 mL apenas do meio *Grace's insect medium unsupplemented*. Ambas as placas foram deixadas a 27°C por 5 horas, o meio foi totalmente removido e foram adicionados 2 mL do meio *Grace's insect medium supplemented* com 10% de SFB, Penicilina (50 U/mL) e Estreptomicina (50 U/mL), antibióticos recomendados para manutenção e esterilidade das células, e 100 µM de Ganciclovir (antiviral usado para selecionar apenas os baculovírus recombinantes). As placas foram mantidas a 27°C por 72 horas. O meio foi coletado, centrifugado e armazenado a 4°C protegido da luz. Denominado de primeiro estoque viral (P1), foram utilizados 5 µL e 10 µL para amplificação do estoque viral denominado P2, com intuito de aumentar o título viral. Foram novamente plaqueadas  $8 \times 10^5$  células em duas placas de 6 poços, uma placa com 1 poço infectado com 5 µL, o outro poço com 10 µL e a outra placa apenas para plaqueamento de células controle. Essas células também foram mantidas as 27°C por 72 horas. Também foi feita a amplificação viral P3, utilizando 500 µL do meio do P2.

Como não foram observadas mudanças morfológicas características de células infectadas (aumento do núcleo, desadesão das células da placa, lise celular) em nenhuma amplificação viral oriundas do primeiro protocolo, foi tentado um

segundo protocolo focando em utilizar o meio condicionado das células. Diferentemente do primeiro protocolo, não foi retirado o meio das células cultivadas no meio Sf-900™ II SFM. Foi utilizado o mesmo meio (condicionado) com o intuito de facilitar a recombinação nas células. Para plaquear  $8 \times 10^5$  células, as células foram contadas, e foram utilizados 300  $\mu\text{L}$  desse meio condicionado + 700  $\mu\text{L}$  do meio *Grace's insect medium unsupplemented*. Essas células foram deixadas em aderência por 1 hora (tanto para o grupo controle quanto para o infectado) e os tubos da recombinação foram misturados da mesma forma que o primeiro protocolo. Essas células também foram mantidas as 27°C por 72 horas. Outra modificação feita foi de ao invés de 5  $\mu\text{L}$  e 10  $\mu\text{L}$  do P1, foram utilizados 500  $\mu\text{L}$  para infecção do P2 e 1 mL do P2 para infecção do P3. Como foram observadas mudanças morfológicas, foram feitas sucessivas ampliações a partir do P3, sempre aumentando o volume. O P4 foi feito em uma garrafa pequena com 5 mL (4 mL do meio Sf-900™ II SFM + 1 mL P3), P5 foi feita em garrafa média (10 mL do meio Sf-900™ II SFM + 2 mL P4) e as ampliações P6, P7, P8 e P9 foram feitas em garrafas grandes (15 mL do Sf-900™ II SFM + 5 mL P5).

### 3.6 EXTRAÇÃO VIRAL E DETECÇÃO VIRAL POR MEIO DA PCR EM TEMPO REAL (qPCR)

Para detectar se realmente as células estavam transfectadas com o baculovírus, foi feita uma PCR em tempo real, na qual o gene alvo é o GP64, que codifica uma proteína do capsídeo viral do baculovírus. Para isso, foi feito primeiramente a extração viral. Foram coletados 750  $\mu\text{L}$  do sobrenadante de uma cultura transfectada, nesse caso as mais recentes, a 8º e a 9º amplificação (P8 e P9). Foi adicionado 750  $\mu\text{L}$  de PEG 8000 20% diluído em 1 M de NaCl. Após a incubação por 30 minutos em temperatura ambiente, essa amostra foi centrifugada e o sobrenadante descartado. Nesse mesmo tubo, foi pipetado 100  $\mu\text{L}$  de triton x-100 (0,1% em PBS) e 10  $\mu\text{L}$  de proteinase K (7 mg/mL). Após uma delicada homogeneização, essa amostra foi incubada por 1 hora a 50°C em um banho maria. Em seguida foi adicionado ao tubo 110  $\mu\text{L}$  de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:2) e após uma centrifugação de 5 minutos a temperatura ambiente a fase aquosa foi transferida para outro tubo, no qual foi adicionado 3M de acetato de sódio, 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de glicogênio e 250  $\mu\text{L}$  de etanol 100%. Essa amostra foi incubada

por mais 20 minutos a 20°C, centrifugada 15 minutos a 4°C, retirado o sobrenadante o *pellet* foi lavado com 1 mL de etanol 70%. Após uma última centrifugação, o etanol foi removido e o *pellet* foi ressuspendido em 10 µL de água.

Para a qPCR, foi utilizada o gene GP64 para construção da curva padrão de 6 pontos (1x, 0,1x, 0,01x, 0,001x, 0,0001x, 0,00001x) em duplicata (reagente do kit . Para cada ponto pipetado, foi utilizado 1 µL das amostras (extração viral, controle negativo, controle positivo, curva padrão) e 9 µL do *mastermix*, o qual é composto de: *primer forward* e *primer reverse* para GP64, água estéril e o reagente *Sybr Green*. Para o controle negativo foi utilizada uma amostra de água ultra pura estéril e para o controle positivo o DNA de uma proteína expressa no mesmo modelo de baculovírus. As amostras foram aplicadas em duplicata e foi utilizado o ciclo: 95°C/30 segundos (1x); 95°C/3 segundos, 60°C/25 segundos (40x); 95°C/15 segundos, 60°C/1 minuto, 95°C/15 segundos (1x); 4°C/∞.

### 3.7 TESTES DE EXPRESSÃO TEMPO/PORCENTAGEM VIRAL (V/V)

A fim de otimizar a expressão da proteína LALLT, foram realizados testes de expressão em tempos variados (24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 216 horas) e com três porcentagens de vírus (1%, 5% e 20%). Foram utilizadas quatro garrafas médias com volume de 15 mL e uma confluência de aproximadamente 70% de células Sf9 cultivadas no meio Sf-900™ II SFM com os antibióticos Penicilina (50 U/mL) e Estreptomicina (50 U/mL). A cada 24 horas foram retirados 1 mL de meio das garrafas infectadas com o vírus e armazenadas em 20°C para posterior análise. Essas amostras foram dialisadas, com seu volume sendo aumentado para 5 mL (4 mL de PBS) e concentradas para 100 µL em um filtro de centrifuga tipo Amicon de 30 kDa. Posteriormente essas amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida e reação de *western blotting*.

### 3.8 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)

Todas as amostras que foram submetidas à corrida eletroforética em SDS-PAGE (gel 12,5%) foram fervidas por 10 minutos ou mais, e foi utilizado o tampão de amostra redutor 4x com 10% de β-mercaptoetanol. Os géis foram submetidos à corrente de 25 mA e posteriormente corados com Azul de Coomassie Brilhante R-

250 por 10 minutos e descorados com metanol 30% ou transferidos para membranas de nitrocelulose para realização do *western blotting*.

### 3.9 WESTERN BLOTTING

Após a transferência das amostras para membranas de nitrocelulose, as membranas foram bloqueadas com PBS caseína 3% por 2 horas, incubadas com os anticorpos primários (anti-veneno total de *L. intermedia* 1:1000, anti-LALLT 1:3000 ou soro pré-imune) por 2 horas e 1 hora com o anticorpo secundário correspondente (anti-IgG de coelho ou anti-IgG de camundongo 1:5000, ambos conjugados à fosfatase alcalina). Após sucessivas lavagens com PBS, essas membranas foram incubadas com o tampão ótimo para a fosfatase alcalina (Tris-HCl 100 mM, pH 9,5; NaCl 100 mM e MgCl<sub>2</sub> 5 mM) e posterior adição dos reagentes BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indoil fosfato) e NBT ("*nitro blue tetrazolium*") (Promega).

### 3.10 EXPRESSÃO EM LARGA ESCALA E PURIFICAÇÃO NO SISTEMA AKTA

As células Sf9 podem ser cultivadas tanto em aderência em garrafas de cultivo celular quanto em suspensão em erlenmeyer. Para conseguir uma maior quantidade da proteína LALLT, células foram cultivadas em suspensão em erlenmeyer de 2 litros. Os cultivos variavam de volume entre 180-450 mL com as células mantidas a uma densidade de  $1,5 \times 10^6$ /mL. A infecção viral era feita quando as células atingiam uma densidade entre  $2,5 \times 10^6$ /mL -  $3,5 \times 10^6$ /mL e eram utilizados 5% de vírus v/v de amplificações virais anteriores. O erlenmeyer foi mantido a uma rotação de 100 rpm em incubadora do tipo *shaker* a 28°C de 144-216 horas. No total foram feitas 4 expressões e purificações.

Após o término do tempo de expressão, as expressões foram centrifugadas a 7000 xg, filtradas em um filtro de 0,22 e submetidas à cromatografia de afinidade níquel-agarose. A amostra era aplicada no equipamento AKTA (*GE Healthcare*), associado em uma coluna HisTrap Excel Affinity (*GE Healthcare*) a uma velocidade de 1 mL/min. Em seguida essa amostra era submetida a uma fase de lavagem com o tampão A (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20mM, NaCl 500mM) e posterior eluição gradual com tampão B contendo imidazol (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20mM, NaCl 500mM, Imidazol 500mM). As frações resultantes da eluição foram submetidas a uma corrida eletroforética em gel de

poliacrilamida 12,5% para determinação do grau de pureza e posteriormente o *W.B.* com o anticorpo primário anti-veneno total de *L. intermedia* foi realizado para confirmação da presença da LALLT.

### 3.11 IMUNIZAÇÃO EM CAMUNDONGOS E REATIVIDADE CRUZADA DOS VENENOS DE *L. intermedia*, *L. laeta* E *L. gaucho*

Foram utilizados dois camundongos para um protocolo de imunização com intuito de produção de um soro policlonal anti-LALLT. Um dos animais recebeu doses menores intervaladas de 14 em 14 dias com 5 µg, 15 µg e 20 µg e o outro recebeu 10 µg, 20 µg e 25 µg. Os protocolos de imunização foram adaptados de Harlow e Lane, 1988. Todas as doses e animais tiveram como adjuvantes na mesma proporção v/v o hidróxido de alumínio. Previamente foi coletado o sangue antes da imunização desses animais (soro pré-imune) por uma pequena perfuração na bochecha, a qual permite acesso à veia inferior da pálpebra. Após a última dose de imunização os animais foram anestesiados com Cetamina (30 mg/kg) e Xilazina (5 mg/kg) e foi realizada a punção cardíaca para maior extração de volume possível. Esse sangue foi centrifugado a 5.000 rpm e o sobrenadante aliquoteado e congelado. Esse e os protocolos seguintes com animais foram autorizados pelo comitê de ética animal da UFPR, parecer de número 1297 (em anexo).

Venenos brutos (100µg) de *L. intermedia*, *L. laeta* e *L. gaucho* foram separados em gel de poliacrilamida 12,5%, transferidos para membranas de nitrocelulose. As membranas foram bloqueadas por 1 hora com PBS caseína 3% e incubadas com anti-LALLT (1:1000) e posteriormente com secundário anti-IgG de camundongo. O método para revelação utilizado foi o da fosfatase alcalina.

### 3.12 ELISA

Para verificar se a LALLT era capaz de ser reconhecida em sua conformação nativa pelos anticorpos dos venenos totais de outras espécies de *Loxosceles*, foi feito o ensaio de ELISA. Poços de placas de 96 poços foram sensibilizados com a LALLT overnight a 4°C em uma concentração de 10 µg/mL. A placa em seguida foi lavada com PBS e bloqueada 1 hora com PBS-BSA 1%. Após esse tempo, a placa

foi lavada novamente e as diluições dos anticorpos primários anti-veneno total de *L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta* (1:500, 1:1000, 1:2000) foram deixadas por 1 hora na placa. O secundário anti-IgG de coelho (1:5000) também foi incubado por 1 hora e para a revelação o substrato ( $H_2O_2$ + OPD 0,2 mg) foi diluído em tampão citrato para peroxidase (50mM  $Na_2HPO_4$ , 24mM de ácido cítrico, pH: 5). A placa foi deixada no escuro por 5 minutos, a reação foi parada com  $H_2SO_4$  2N e lida em 490 nm. As amostras foram avaliadas em triplicatas.

### 3.13 ENSAIO DE PERMEABILIDADE VASCULAR EM CAMUNDONGO

Para avaliação da atividade biológica da LALLT com relação ao extravasamento de líquido intersticial, foi feito o ensaio de permeabilidade vascular em camundongo. Os animais do grupo com tratamento com o inibidor de degranulação de mastócito (cromoglicato dissódico) foram tratados por 3 dias consecutivos via intraperitoneal na dose de 30 mg/kg, antes do dia do experimento. Para a verificação do extravasamento de líquido plasmático, os animais receberam o corante azul de evans (30 mg/kg em 200  $\mu$ L) na veia caudal diluído em PBS (Cloreto de Sódio 100 mM; Tampão Fosfato de Sódio 10 mM; pH 7,3). Em seguida foram aplicadas pela via intradérmica na região dorso-lateral dos animais (n=5 para cada grupo): a LALLT (10  $\mu$ g), PBS, Serpina (10  $\mu$ g), a fosfolipase-D recombinante de *L. intermedia* (LiRecDT1) (2,5  $\mu$ g) e a LALLT (10  $\mu$ g) no grupo de animais previamente tratado com o cromoglicato. Depois de 1 hora esses animais foram eutanasiados, e o folheto interno da pele exposto, observado e fotografados.

### 3.14 EDEMA EM PELE DE COELHO

O edema em pele de coelho foi realizado em coelho da linhagem Nova Zelândia providenciados pela Fazenda Experimental Canguiri da Universidade Federal do Paraná e mantidos no CPPI (Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos). Os pelos dos animais na região lateral foram raspados e três pontos de inoculação foram marcados. Em um desses pontos foi aplicado o controle negativo PBS e em outro a LALLT (20  $\mu$ g). A região foi fotografada 0, 3, 6 e 24 horas após a aplicação.

### 3.15 ANÁLISE HISTOLÓGICA DA PELE DE COELHO

Dois coelhos foram usados para produção das lâminas. Um dos coelhos foi anestesiado e eutanasiado após 3 horas da inoculação da LALLT e PBS e outro coelho após 24 horas. As peles foram fixadas com ALFAC e submetidas a uma série de desidratações e finalmente emblocadas em parafina. Os cortes foram feitos em micrótomo, colocados em lâminas e corados com Hematoxilina e Eosina (CHAIM *et al.*, 2006) e as imagens foram obtidas em Microscópio binocular Olympus BX41 (Olympus, Tóquio, Japão).

### 3.16 EDEMA DE PATA EM CAMUNDONGO

A fim de verificar se a LALLT tem a capacidade de causar edema, foi realizado o ensaio de edema de pata. Foram utilizados 5 camundongos para cada grupo. Foi aplicado na região da pata (intraplantar) um volume total de 33  $\mu$ l de cada grupo (PBS, LALLT 10  $\mu$ g, Serpina 10  $\mu$ g e PBS). A espessura das patas foi medida com um paquímetro digital (Digimess, São Paulo) em tempos de 0, 5, 10, 20, 30, 60, 120, 240, 360 e 720 minutos.

### 3.17 VISUALIZAÇÃO DE MASTÓCITOS EM MESENTÉRIO DE RATOS

Para avaliar se a LALLT tem capacidade de degranular mastócito, foram usados mesentérios de ratos para visualização dessas células. O animal foi anestesiado com Cetamina (30 mg/Kg) e Xilazina (5 mg/Kg), e parte do seu mesentério foi removida e estendida em uma placa de petri com cera. Logo em seguida a LALLT (10 e 20  $\mu$ g) e o PBS foram aplicados diretamente na superfície do mesentério, sendo cada amostra aplicada em uma região diferente. Após 10 minutos, essas regiões foram fixadas com formol 10%. Parte dos tecidos foi excisada, estendida em lâminas e colocados para secar. Vinte e quatro horas depois essas lâminas foram coradas com azul de toluidina por 12 minutos, lavadas e observadas em Microscópio binocular Olympus BX41 (Olympus, Tóquio, Japão).



### 3.18 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram submetidos a análise estatística. Para o edema de pata foi utilizado ANOVA de duas vias com pós teste de Tukey. e para o ELISA ANOVA de uma via com pós teste de Tukey. A significância foi definida como \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  ou \*\*\*\*  $p < 0,0001$ , utilizando o programa GraphPadPrism 6.

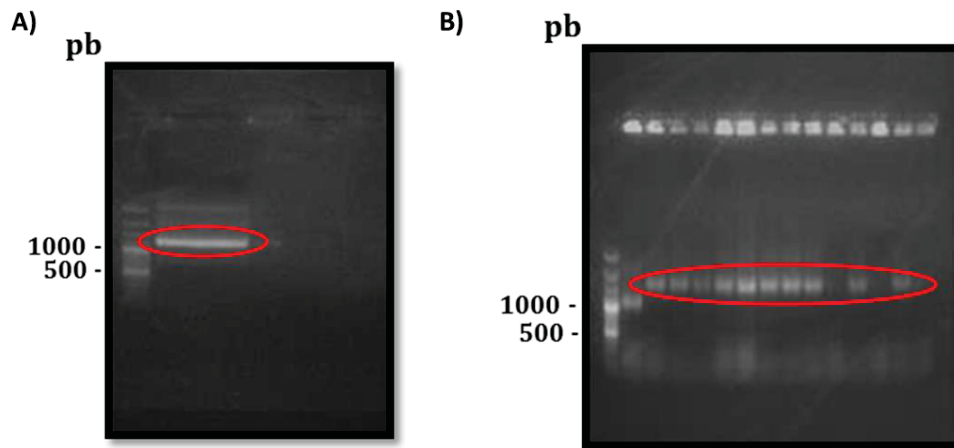
## 4. RESULTADOS

### 4.1 ANÁLISE DA AMPLIFICAÇÃO DA SEQUÊNCIA DE LALLT E DOS CLONES POSITIVOS OBTIDOS APÓS TRANSFORMAÇÃO COM A CONSTRUÇÃO LALLT + pENTR™/D-TOPO®

A amplificação da sequência codificante de LALLT a partir de uma construção prévia (LALLT clonada em vetor pGEM-T) resultou na visualização de uma banda única, específica, com aproximadamente 1200 pb, como pode ser visualizada na figura 5 A do gel de agarose realizado após a PCR. O tamanho do fragmento amplificado condiz com o tamanho da sequência predita da LALLT. Os *primers* utilizados para a amplificação foram desenhados com as requeridas adaptações para clonagem no vetor pENTR™/D-TOPO®.

A banda amplificada foi gel-extraída e clonada no vetor pENTR™/D-TOPO®. Na figura 5 B é possível observar os clones positivos, correspondentes a um tamanho de aproximadamente 1400 pb, condizentes com a amplificação da sequência codificante da LALLT e de fragmentos do vetor (visto que foram utilizados os *primers* M13). Posteriormente esses clones foram encaminhados para o sequenciamento, com intuito de confirmar a sequência da proteína LALLT.

Figura 5 - Análise da amplificação da sequência codificante de LALLT e verificação dos clones positivos obtidos contendo a sequência de interesse

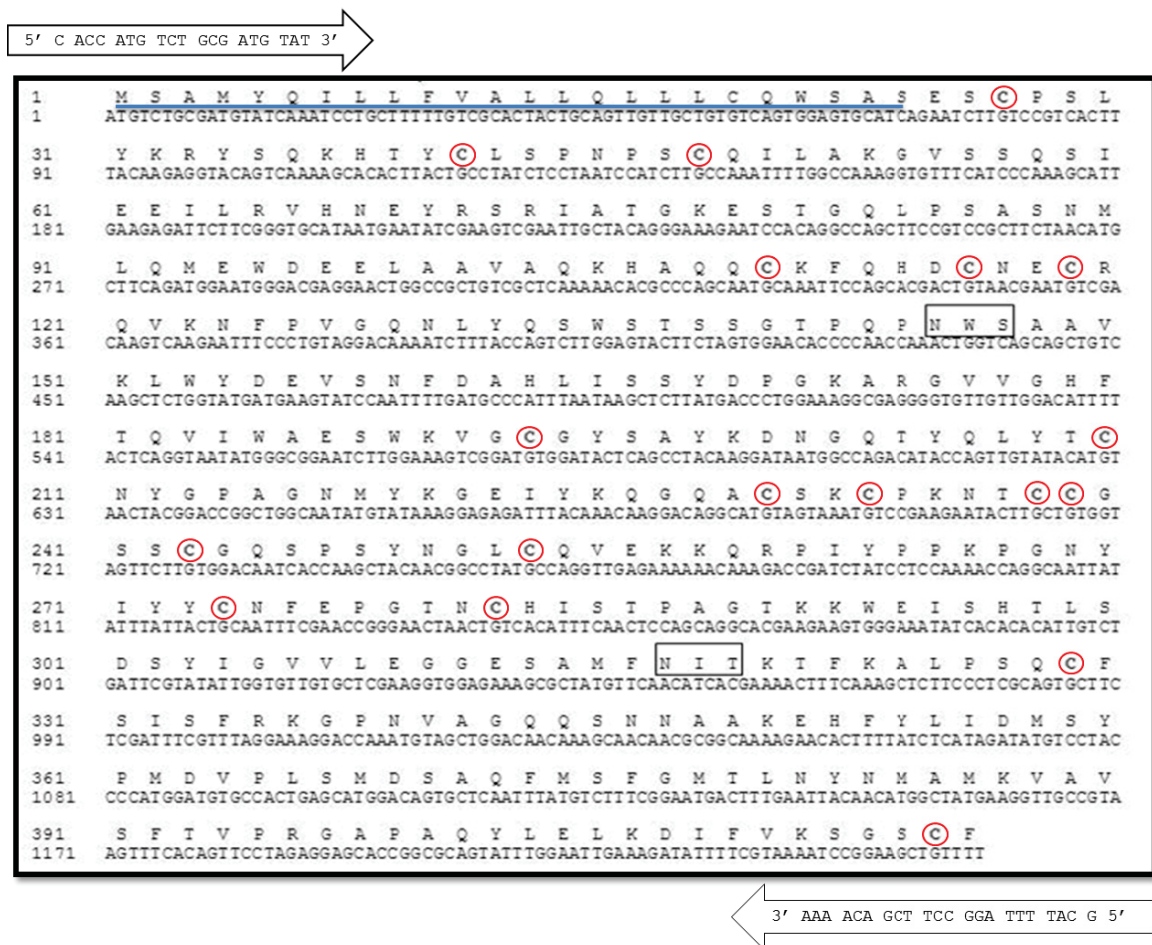


Em A é observado o fragmento na altura de 1200 pb obtido após a amplificação da sequência codificante da LALLT (gel de agarose 1%). Foram obtidos 14 clones totais da PCR de colônia, evidenciados no gel de agarose em B. Do total, 10 clones foram positivos, representados pelas bandas no gel na altura de aproximadamente 1.400 pb. (amplificação da LALLT +pENTR™/D-TOPO®).

#### 4.2 SEQUÊNCIA NUCLEOTÍDICA, AMINOACÍDICA E CARACTERÍSTICAS PREDITAS DA LALLT

Os clones positivos foram submetidos a um sequenciamento e assim, a sequência codificante da LALLT foi confirmada. Por meio de ferramentas *online* foram identificados 415 resíduos de aminoácidos, 18 resíduos de cisteínas (DiaNNA 1.1) e dois possíveis sítios de N-glicosilação preditos (NetNGlyc 1.0 - disponível em <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) (Figura 6). O peptídeo sinal previsto pelo SignalP-5.0 (disponível em <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) possui 24 aminoácidos, sendo a clivagem predita entre os aminoácidos 24 e 25 (S-E). O *pi* calculado da proteína é 8,4 (ExPASy, disponível em [https://web.expasy.org/compute\\_pi/](https://web.expasy.org/compute_pi/)).

Figura 6 - Sequências nucleotídica e aminoacídica da LALLT, com predição do peptídeo sinal e de modificações pós-traducionais



Na figura, a sequência aminoacídica predita e a nucleotídica da LALLT, com os *primers forward* e *reverse* para clonagem em pENTR™/D-TOPO® indicados pelas setas e os possíveis sítios de N-glicosilação em retângulos (NWS e NIT). Os resíduos de cisteína estão destacados em vermelho e o peptídeo-sinal predito está sublinhado em azul.

#### 4.3 COMPARAÇÃO DA SEQUÊNCIA AMINOACÍDICA DA LALLT COM OUTROS ALÉRGENOS

Com a sequência aminoacídica da LALLT, foi realizado um alinhamento no BLAST (*GenBank database*) usando as sequências de maior *score* semelhantes à LALLT. Foi possível observar que a LALLT tem semelhanças significativas com cinco sequências semelhantes à alérgenos de outras espécies de aranhas (Figura 7 A). Todas as sequências encontradas possuíam grandes quantidades de resíduos de cisteína conservados, assim como a LALLT. A maior identidade obtida foi de 53,73% com o alérgeno da aranha *Periegops suteri* (QHA25178.1), em seguida

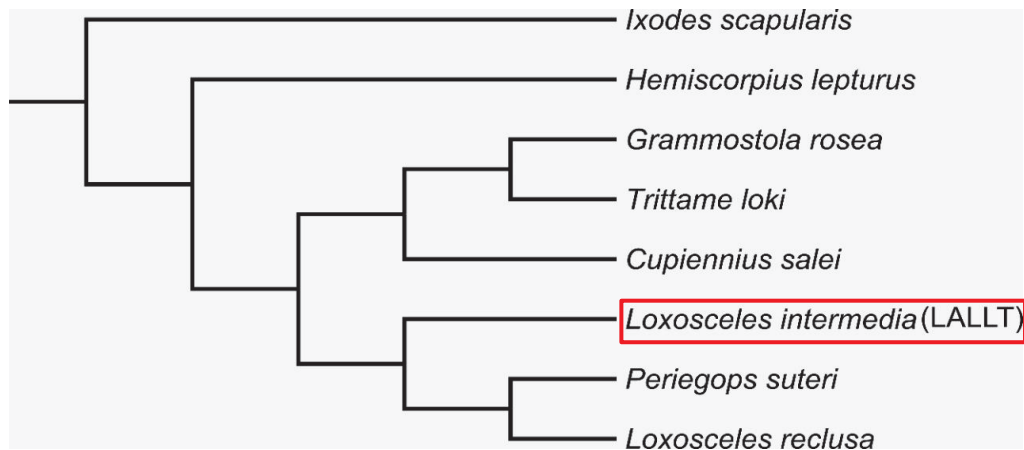
53,1% com o alérgeno da aranha *Loxosceles reclusa* (QHA25179.1), 48,17% de *Grammostola rosea* (BAN13538.1), 48,4% de *Trittame loki* (W4VS53.1) e 42,23% de *Cupiennius salei* (QDC23063.1). Além dessas espécies de aranhas, foram adicionadas uma espécie de ácaro (*Ixodes scapularis* – XP\_002403125.2) e uma de escorpião (*Hemiscorpius lepturus* – API81358.1) para construir um cladograma, a fim de demonstrar a presença dessas moléculas alergênicas em outros aracnídeos. (Figura 7 B).

Figura 7 - Alinhamento de seqüências aminoacídicas de alérgenos semelhantes à LALLT e sua relação filogenética com as espécies de animais correspondentes à seus alérgenos

A)

<i>Loxosceles intermedia</i> (LALLT)	1	-----MSAMYQILLEVALLCILLCCQ--SASPS	CPSLYKRYSK
<i>Cupiennius salei</i>	1	-----MGIP--SLEFL-VTLLVSYTTAQTTPG	CPALSLRYSKT
<i>Grammostola rosea</i>	1	-----MQIRVILMLISWFWLGVSAET	CPATLYRYSRE
<i>Trittame loki</i>	1	-----MHFQVILMMWLWLEAEGG	CPTLYKRYSKH
<i>Periegops suteri</i>	1	MRASKQEKHRI FFSQTKNDMVVSGILSQCLYCAISLLMTHVM--FVQSQCPDLYRYSAR	
<i>Loxosceles reclusa</i>	1	MRASKQEKHRI FFSQTKNDMVVSGILSQCLYCAISLLMTHVM--FVQSQCPDLYRYSAR	
<i>Loxosceles intermedia</i> (LALLT)	38	HTYCLSPNPSCOLLAKGVSSQSTLELLEFVHNEYRSRIATGKESTGQLPSASNMLQMEWDE	
<i>Cupiennius salei</i>	36	HSYCKPANPACNGVRSVSAQDNAILKEHNTHRSKLATGGEQ--NLPTAANMTEMVWDD	
<i>Grammostola rosea</i>	32	HTYCLERKSSCTILQSGVTKSDTEIIVREHNLLRSKVATGKETQYSMEKASNMLQMVWDD	
<i>Trittame loki</i>	32	HTYCLSPNPSTCKIILTRGVSGDREIILREHNKIRSRVATGKETKYSLEKASDMLQIVWDD	
<i>Periegops suteri</i>	59	HTFCQPPNQCNILARIVSKEDAKTIVQAHNEYRSKIAMGKETTGNLPSADMLQMEWDD	
<i>Loxosceles reclusa</i>	59	HTFCQPPNQCNILARIVSKEDAKTIVQAHNEYRSKIAMGKETTGNLPSADMLQMEWDD	
<i>Loxosceles intermedia</i> (LALLT)	98	ELAAVAQKHAQCKFCHDCNECROVKNFVVGONLYQS--WSTSSGTPQENWSAAVKLWYDE	
<i>Cupiennius salei</i>	94	ELAAVAQKHADQCI FEHDCSTCRVQNYGVGONLAEQVSNSSPSPSENMWPSAIRKSWYDE	
<i>Grammostola rosea</i>	92	ELAAVAQKHADQCFDHDGDCRVRKNFVVGONLQR--TSPSQGPPSEWAEAVKDWYKE	
<i>Trittame loki</i>	92	ELASVAQKHADQCFEHDNCDCRNVQNFVVGONLHLR--TSS--AKFSDITWAGAVNGWYDE	
<i>Periegops suteri</i>	119	ELAAVAEKHAENCKFEHDCNECROISKFNVGONLYTS--WRCSNDIPQEDWKAAYKSWYDE	
<i>Loxosceles reclusa</i>	119	ELAAVAEKHAENCKFEHDCNECROISKFNVGONLYTS--WRCSNDIPQEDWKAAYKSWYDE	
<i>Loxosceles intermedia</i> (LALLT)	157	WSNFDALHILSSILDPGKARGVGHFTQVIWA	PSWKVGCYSAYKDNQYTYCLYTCNYGPG
<i>Cupiennius salei</i>	154	IAYESSNAILDPIAPPPEPTYGHFQLLWATS	SWRIGCGYVILQDRNMQKRLVVCNYGPG
<i>Grammostola rosea</i>	151	IKDFQRKQIDGFTIDGKGPQGTGHFTQEIWAD	TWRVGCYSAYKKGSGSEELYTCNYGPGG
<i>Trittame loki</i>	150	VKDFNRQIISGFTIDGKGPQGTGHFTQAVWATS	SWRVGCGRSMFKDGNTEKLDLYTCNYGPGG
<i>Periegops suteri</i>	178	VADFNKNIIVGSENPAGGTGVIGHFTQVIWA	QTKRWVGCYVAYKEGEKMNQMYTCNYGPGG
<i>Loxosceles reclusa</i>	178	VADFNKNIIVGSENPAGGTGVIGHFTQVIWA	QTKRWVGCYVAYKEGEKMNQMYTCNYGPGG
<i>Loxosceles intermedia</i> (LALLT)	217	NMYKEPIYKQQAQCSKCEKNTCCGSSCGQSE	SYNGLCQVEKQRFPIEYKPKGNLILYCNF
<i>Cupiennius salei</i>	214	NTVSHSMYKVGPPCSACPINSCCDRITCGAQ	KEYSGLCKRITDMNAPNYK--PVGSYMICYDF
<i>Grammostola rosea</i>	211	NIKTRPIYEKGNPCTRCPINSCCENS	CSEGTSYPLCRISGENAPOYK--RPEGLTFYCSF
<i>Trittame loki</i>	210	NMKNAIITYTKGKPCSGCPINSCCGKAC--	EGISYDGLCKRMSGNTAPOYS--PKGAAFRCTE
<i>Periegops suteri</i>	238	NMYEAPVYTS	GKPCSLCPVNSCCGKNCNTQBEYDGLCKMNGNBAPKYE--RTGSYEVYCDF
<i>Loxosceles reclusa</i>	238	NMYEAPVYTS	GKPCSLCPVNSCCGKNCNTQBEYDGLCKMNGNBAPKYE--RTGSYEVYCDF
<i>Loxosceles intermedia</i> (LALLT)	277	EPGINDCHISTPACTKKKEISHTLSDSYIGVILEGGESAMFNILKTFKAL--PSCFSSISFR	
<i>Cupiennius salei</i>	273	NNQSDCNG-YIIEFNKLLIYNTLGSF	LGIVLNGGEESTMVFNKIKPSTSAFCFVVMYR
<i>Grammostola rosea</i>	270	NNEPDCAA-TTTCADKKEVSKTLGSSYIGIVL	NGGESSTLSFTKSFKVPTAELCFYSYR
<i>Trittame loki</i>	268	NGESDCAT-TTSCAKKWKTIKTLGSSF	IGIVLNPGESSTLSFTVFPFVSDGSMCVESYR
<i>Periegops suteri</i>	297	TNPAICLYETPAGMKQWIVYNTLGSYIGIILEGGET	STLNFRTPFKCK--DESCFVSYSR
<i>Loxosceles reclusa</i>	297	TNPAICLYETPAGMKQWIVYNTLGSYIGIILEGGET	STLNFRTPFKCK--DESCFVSYSR
<i>Loxosceles intermedia</i> (LALLT)	336	RGPNVAGQQSNNAKEHFYLI--DMSYPMDVPLSMDSAQFMS	FGMTLNVMAMKVAVVFET
<i>Cupiennius salei</i>	332	RGPNVDGQEESSNSATETETEGS	NFEFQQLNLPTEIGDTRHOFSSMSLAWNMEETIKITFA
<i>Grammostola rosea</i>	329	TGPOVKGEKSAGIFTEIFKLPA-RPDKS	FPTVLTSSMSFETKFKLGNMTEFTSVSFS
<i>Trittame loki</i>	327	RGPOVAGQVAAGNAVEKFGDPA--PSEIDYSTPIKE--	SIDFMOFGVTLGNWPKTTLVSVFS
<i>Periegops suteri</i>	356	RGPNVAGEVGSSEIKHEFENI--QDSYGYDVPLSQDITQFMS	FGMNLNWNADFTVSNFNS
<i>Loxosceles reclusa</i>	356	RGPNVAGEVGSSEIKHEFENI--QDSYGYDVPLSQDIT	-----
<i>Loxosceles intermedia</i> (LALLT)	394	VERCAPAQYLELKDIFVRS	SGSC--
<i>Cupiennius salei</i>	392	VEVCKPEQFLEIQSIYATE	SGCKQ
<i>Grammostola rosea</i>	388	VEKGRPAQYLELIDISAR	AGPC--
<i>Trittame loki</i>	385	VEFGTAPQYLEMKDISVR	RGEC--
<i>Periegops suteri</i>	414	VEFGATAQYVELRN	VFLRGP
<i>Loxosceles reclusa</i>		-----	-----

B)



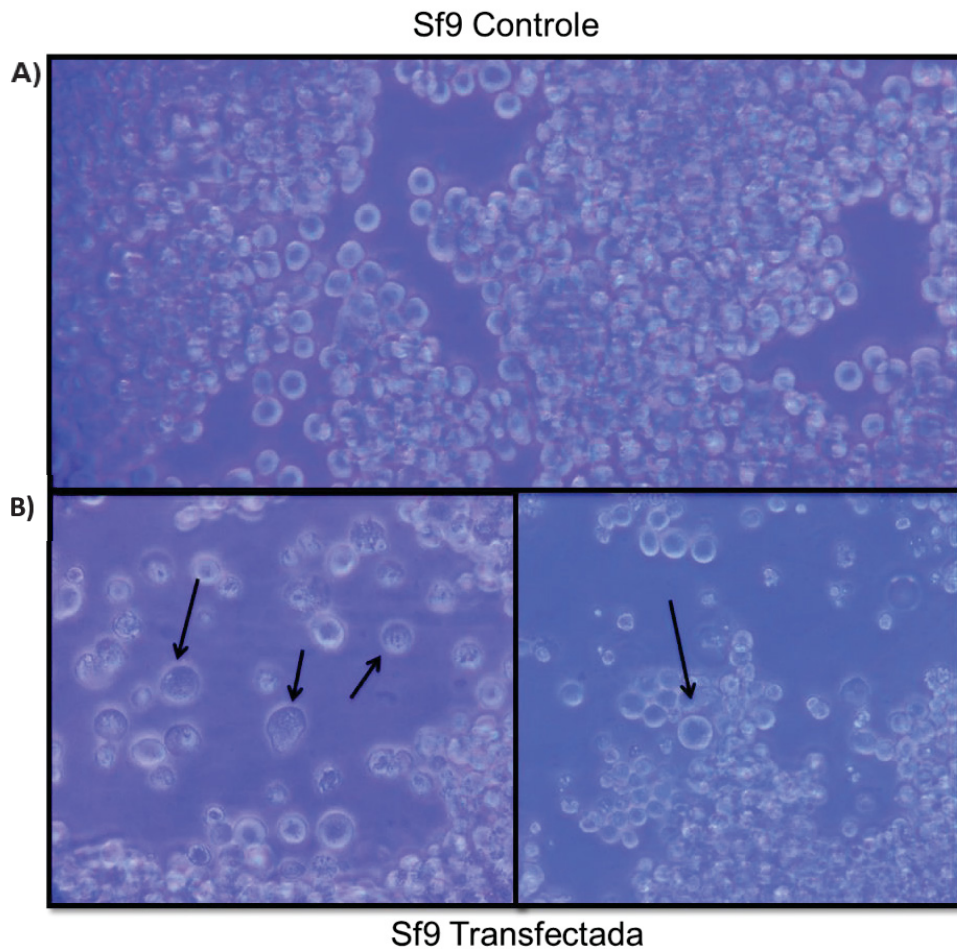
Em A, é mostrada a análise do alinhamento da LALLT, a qual revela semelhanças da LALLT com alérgenos de outras cinco espécies de aranhas. Sequências alinhadas com a ferramenta *online Clustal* (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Em preto os aminoácidos conservados e em cinza aminoácidos com substituições conservativas. As assinaturas características de proteínas CAP encontram-se em dois retângulos vermelhos e os resíduos de cisteínas conservados estão indicados pelas setas vermelhas. Em B o cladograma revela a proximidade filogenética das sequências das espécies de aranhas, uma de ácaro (*Ixodes scapularis*) e uma de escorpião (*Hemiscorpius lepturus*), baseada na sequência aminoacídica da LALLT.

#### 4.4 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS OBSERVADAS DAS CÉLULAS SF9 TRANSFECTADAS

Foram observadas características morfológicas diferentes entre as células Sf9 transfectadas com o baculovírus e aquelas controle. As alterações como o aumento do volume do núcleo celular, irregularidades na membrana celular, pontos de granulação e diminuição da confluência foram vistas em células transfectadas por meio do microscópio invertido. Essas características foram observadas após 72 horas de infecção viral e sugerem fortemente uma transfecção bem-sucedida (*BaculoDirect<sup>TM</sup> C-Term expression kit*).

Com intuito de aumentar a carga viral, foram feitas sucessivas ampliações, e essas alterações morfológicas descritas acima foram ficando cada vez mais perceptíveis, o que sugere um aumento na carga viral nas ampliações seguintes (Figura 8).

Figura 8 – Alterações morfológicas e diminuição da confluência em células Sf9 transfectadas com o baculovírus recombinante por 72 horas, após nove ampliações

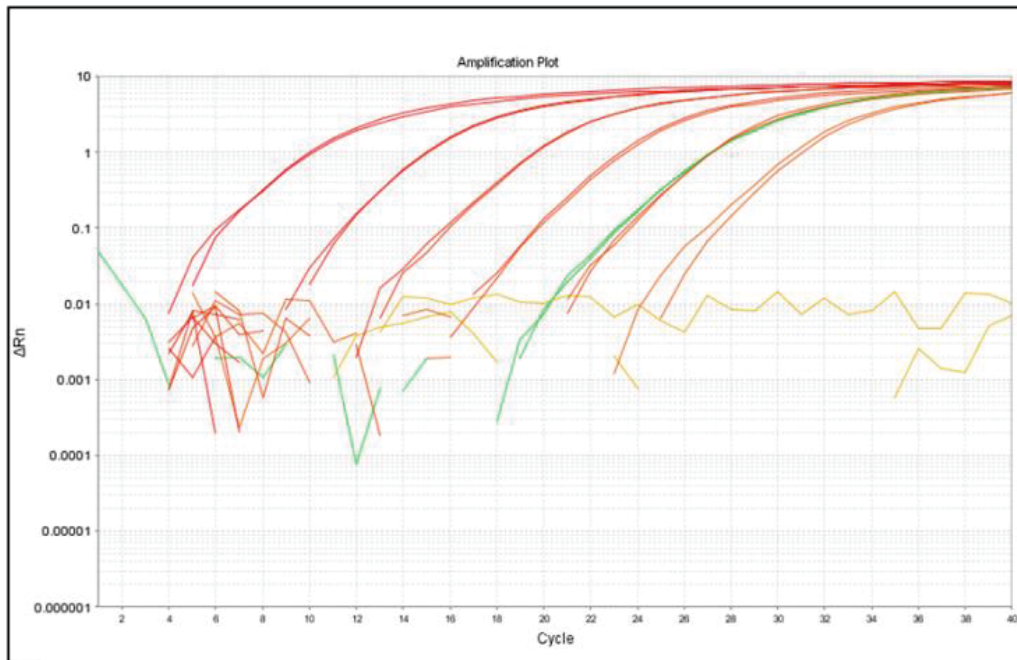


Na imagem em A, é possível observar uma morfologia padrão das células Sf9 controle (núcleo arredondado, membrana celular regular e nenhum tipo de granulação no interior das células). Já nas figuras em B, na morfologia das células transfectadas com o baculovírus, existe um efeito citopático evidente, como a presença de grânulos no interior celular, núcleo aumentado e irregularidades na membrana (mostrados nas setas), efeitos associados à transfecção com a construção de interesse.

#### 4.5 DETECÇÃO DE PARTÍCULAS VIRAIS NO MEIO DE CULTIVO CELULAR DE CÉLULAS SF9 TRANSFECTADAS

Após a observação da morfologia alterada das células transfectadas foram realizadas sucessivas ampliações virais. Após a nona amplificação (P9) foi realizado uma PCR em tempo real para identificação da sequência codificante da proteína GP64, a qual está presente no capsídeo viral. Foi possível observar a amplificação dos fragmentos na amostra, confirmando assim a presença de partículas virais de baculovírus no meio condicionado (Figura 9).

Figura 9 - Amplificação das partículas virais obtidas do meio de cultivo de células Sf9 transfectadas com baculovírus recombinante



O gráfico acima da qPCR revela a amplificação das amostras analisadas. A linha vermelha representa a curva padrão, para a qual é utilizado como molde o gene alvo GP64, a linha amarela representa a amplificação do controle negativo (água), a linha verde mostra a amplificação da amostra de DNA extraída da nona amplificação viral (P9).

#### 4.6 PADRONIZAÇÃO DO TEMPO DE EXPRESSÃO E PORCENTAGEM VIRAL ÓTIMOS PARA A OTIMIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DA LALLT

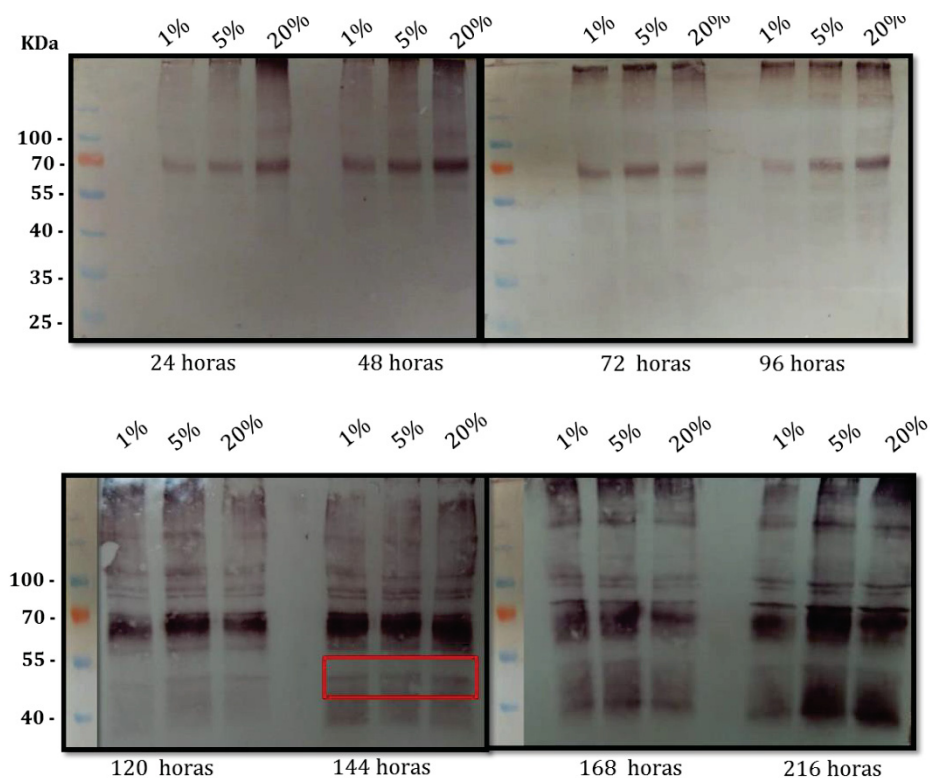
Visto que a presença de partículas virais no meio foi confirmada, foram feitos testes para avaliar qual seria o melhor tempo de expressão e qual a porcentagem de vírus para infectar as células, com o intuito de otimizar a expressão da LALLT. As amostras dos testes de expressão foram coletadas em tempos de 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 e 216 horas. Foram utilizadas três porcentagens de vírus; 1%, 5% e 20% (V/V). Esses tempos e % virais foram testados com base em experimentos prévios de integrantes do laboratório que trabalham com o mesmo sistema de expressão. Para esse experimento as amostras coletadas tiveram seus volumes aumentados com PBS em 4x (para facilitar o procedimento de concentração) e, a seguir, foram concentradas 10x. Para detecção das bandas foi utilizado como anticorpo primário em todas as amostras o soro hiperimune contra o veneno total de *L. intermedia*. Foi utilizada uma amostra contendo a construção pENTR/CAT, a qual



constitui-se em um controle do fabricante para a expressão no sistema de baculovírus. Observou-se um aumento na quantidade e na intensidade de bandas obtidas no decorrer dos tempos testados e nas porcentagens virais (Figura 10). Apenas em 120 horas foi possível identificar uma banda antes não visualizada de aproximadamente 45 kDa, cuja a massa molecular corresponde à calculada para a LALLT.

Posteriormente foram testadas expressões em largas escalas tanto com 120 horas quanto com o maior tempo de expressão, com 216 horas. Com relação à porcentagem viral, 20% de vírus em cada expressão de larga escala demandavam uma alta quantidade de volume de vírus, e na porcentagem de 1% não foram observadas tantas mudanças morfológicas de células transfectadas (dado não mostrado). Devido a isso, foi escolhida a porcentagem viral de 5% nas expressões seguintes.

Figura 10 – Identificação da LALLT em diferentes tempos e porcentagens virais



As imagens acima representam os resultados de *western blotting* realizados para a detecção de LALLT e para a determinação dos parâmetros ótimos para a sua expressão em larga escala. Foram realizadas expressões de 24-216 horas com 1%, 5% e 20% de partículas virais. Os marcadores de massa encontram-se à esquerda de cada membrana. Nos tempos de 24-96 horas não foi possível detectar a banda corresponde à LALLT. Apenas a partir de 120 horas, em todas as porcentagens

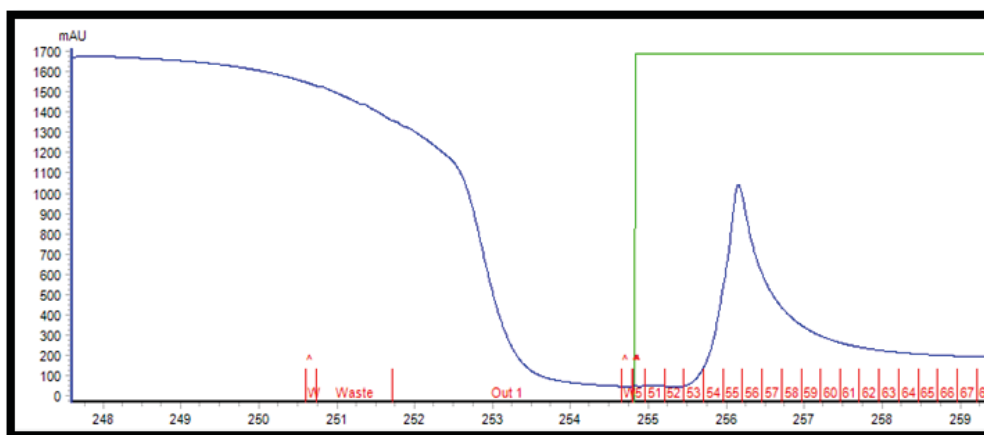
virais testadas, foi possível detectar a banda de 45 kDa, que condiz com a massa molecular predita para LALLT. O tempo padronizado para a expressão em larga escala foi de 144 horas (destacado pelo retângulo vermelho na figura) e porcentagem viral escolhida foi a de 5%.

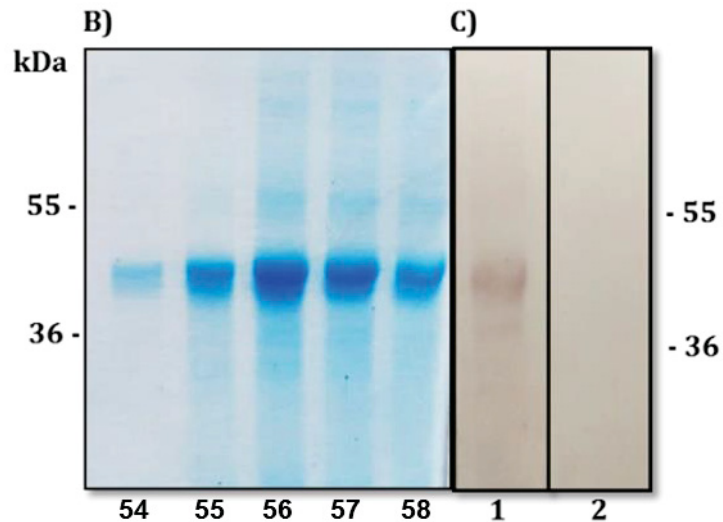
#### 4.7 EXPRESSÕES EM LARGA ESCALA DA LALLT, PURIFICAÇÃO POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE E DETECÇÃO DA PROTEÍNA EM *W.B*

Após os testes de expressão, foram feitas expressões em larga escala com o intuito de obter uma quantidade maior da proteína em questão para os subsequentes ensaios biológicos. Células foram cultivadas inicialmente em garrafas médias, e posteriormente em erlenmeyers estéreis. A primeira expressão foi realizada com um volume total de 450 mL e foi o tempo de expressão foi de 144 horas. Posteriormente, essa amostra foi submetida à cromatografia de afinidade por níquel no equipamento AKTA. As frações correspondentes ao pico formado na etapa de eluição (Figura 11 A) foram analisadas em SDS-PAGE (Figura 11 B), dialisadas em PBS e a imunodeteção por *western blotting* foi realizada com soro anti-veneno total de *L. intermedia* como anticorpo primário (1:000) e o anti-IgG de coelho como secundário (1:5000) (Figura 11 C).

Figura 11 – Pico de eluição obtido após a purificação da expressão em larga escala da LALLT e análise do perfil proteico com posterior reconhecimento da LALLT no veneno de *L. intermedia*

A)

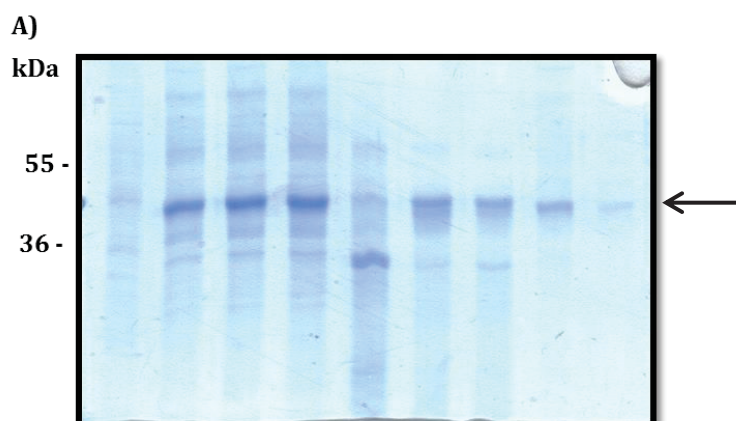


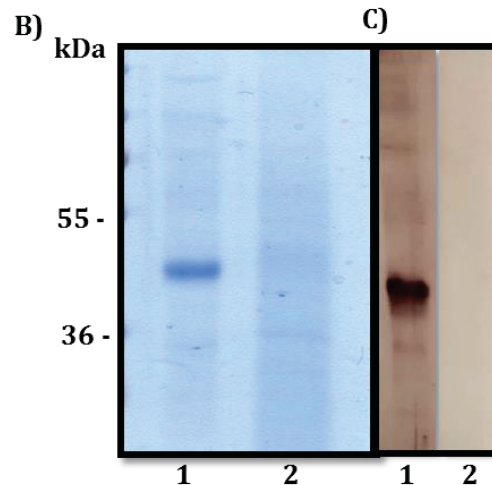


Em A, é mostrado o gráfico da purificação de LALLT obtida por cromatografia de afinidade no AKTA, após a expressão em larga escala. O eixo X corresponde ao volume em mL e o eixo Y a leitura em mAU (*Milli absorbance unit*). Em B é mostrado o perfil proteico das cinco frações do pico correspondente a fase da eluição (54-58, mAU = 1200), as quais foram submetidas a SDS-PAGE 12,5%. Em C é mostrado o *western blotting* realizado para a detecção e confirmação da proteína expressa; em (1) é possível observar a detecção específica de LALLT (banda na altura esperada de ~45 kDa) com a utilização de soro hiperimune contra o veneno total de *L. intermedia* (1:1000); em (2), com a utilização de soro pré-imune (1:1000), é possível verificar que não houve reconhecimento.

A segunda expressão foi feita com um volume menor (180 mL) e o tempo de expressão foi de 216 horas, com intuito de obter um maior rendimento da proteína. Provavelmente devido ao maior tempo de expressão, a amostra no SDS-PAGE continha mais bandas e, portanto, um padrão menor de pureza (Figura 11 A). Além disso, também não foi possível obter um maior rendimento da proteína. As frações (54-58) com as bandas mais nítidas foram unidas e dialisadas contra PBS. Um novo SDS-PAGE foi feito para análise do perfil proteico dessa amostra e um *western blotting* foi realizado com os mesmos anticorpos e diluições utilizados nas amostras da primeira expressão (Figura 12 B e 12 C).

Figura 12 - Análise do perfil proteico e o reconhecimento da LALLT no veneno de *L. intermedia* da segunda expressão em larga escala





Em A, as frações do pico de eluição revelaram bandas de alturas variadas no SDS-PAGE 12,5%, mas uma banda na altura de 45 kDa apresentava-se mais proeminente (seta). Após a junção de frações e posterior diálise, o perfil proteico aparentou um maior grau de pureza, como pode ser verificado em B (1). Essa mesma amostra antes de ser purificada no equipamento AKTA (diretamente do meio de expressão ao fim das 216 horas) apresenta um perfil “arrastado”, verificado pela presença de múltiplas bandas difusas, como pode ser visto em B (2). Em C, é mostrado o resultado do *western blotting* utilizando soro hiperimune contra o veneno total de *L. intermedia*, o qual identificou uma proteína como a mesma massa molecular identificada pelo SDS-PAGE (~45 kDa), como pode ser verificado em C (1); o soro pré-imune não foi capaz de reconhecer nenhuma banda, como pode ser visto em C (2).

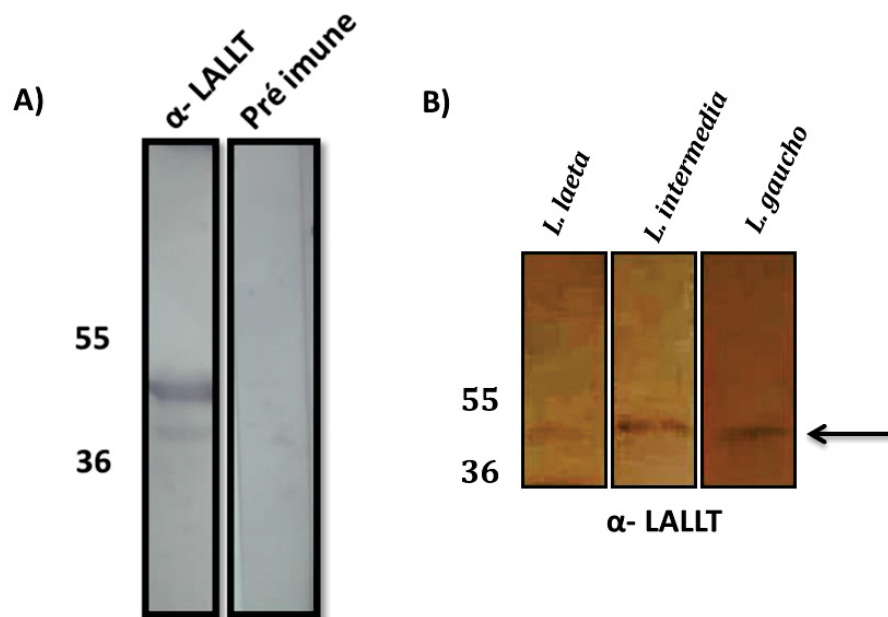
As expressões subsequentes tiveram perfis proteicos similares e também foram identificadas pelo soro anti-veneno total de *L. intermedia*. O rendimento aproximado dessas expressões foi em torno de 0,5 mg de proteína purificada/L. Devido ao baixo rendimento mencionado foram necessárias várias expressões para a obtenção da proteína a ser testada nos ensaios biológicos.

#### 4.8 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-LALLT E REAÇÃO CRUZADA COM OS VENENOS TOTAIS DE *L. intermedia*, *L. laeta* E *L. gaucho*

A produção do soro policlonal anti-LALLT em camundongo foi realizada com imunizações intervaladas de 14 dias. O ensaio de W.B. mostrou que o soro anti-LALLT reconheceu a proteína purificada utilizada como antígeno (45 kDa) (Figura 13 A). Para saber se epítomos da LALLT encontram-se conservados em outros venenos de aranhas do gênero *Loxosceles*, amostras de 100 µg do veneno total de *L. laeta*, *L. intermedia* e *L. gaucho* foram submetidas a SDS-PAGE. Após a transferência das proteínas do gel para a membrana de nitrocelulose, o soro anti-LALLT reconheceu

uma proteína na altura de 45 kDa dos três venenos testados, a qual corresponde à massa molecular predita da LALLT (Figura 13 B).

Figura 13 – Reconhecimento da LALLT pelo soro produzido anti-LALLT e conservação de epítomos lineares da LALLT no gênero *Loxosceles*

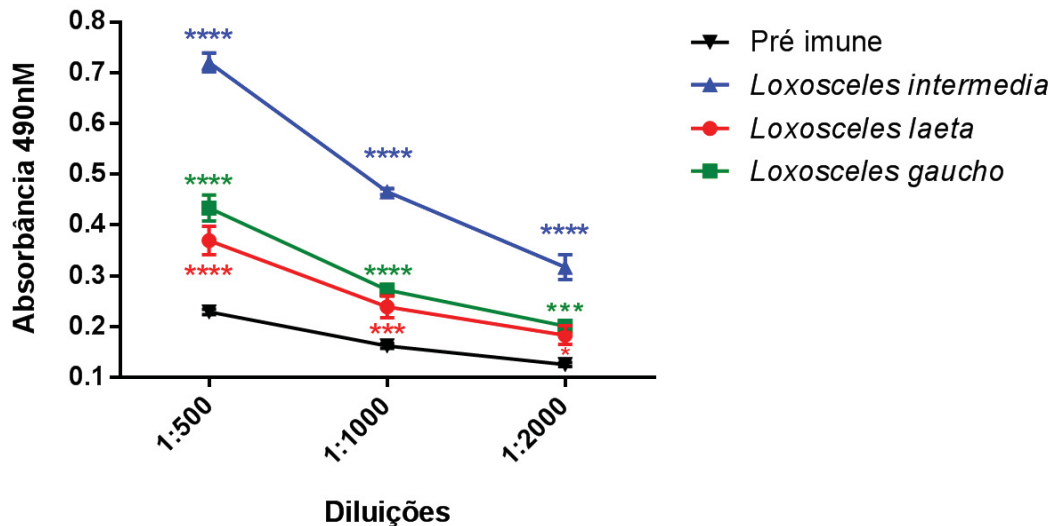


Na figura A é possível visualizar o reconhecimento da LALLT na altura de 45 kDa utilizando o soro hiperimune anti-LALLT produzido (1:3000), o que não foi observado quando o soro pré-imune foi utilizado. Em B, é possível observar que o soro anti-LALLT (1:1000) reconheceu uma proteína de cerca de 45 kDa, presente nos venenos totais das três espécies de aranhas *Loxosceles* (indicada pela seta preta).

#### 4.9 ELISA

O ELISA foi feito para avaliar a capacidade de reconhecimento de epítomos que possam estar conformacionais da LALLT pelos anticorpos contra o veneno total de três espécies de *Loxosceles* (*L. intermedia*, *L. laeta* e *L. gaucho*). O ensaio foi realizado com a sensibilização da placa com LALLT em uma concentração de 10 µg/mL. As diluições utilizadas dos anticorpos primários foram de 1:500, 1:1000 e 1:2000. O gráfico abaixo (Figura 14) mostra as absorvâncias obtidas em função das diluições dos soros testados. O reconhecimento de LALLT pelos soros observados sugere que os epítomos conformacionais da LALLT podem ter sido mantidos na proteína obtida de forma recombinante. Adicionalmente, é possível inferir que a proteína de *L. intermedia* em questão conserva epítomos entre os venenos de *L. laeta* e *L. gaucho* (Figura 14).

Figura 14 - Conservação de epítomos estruturais da LALLT nos venenos de aranhas *Loxosceles*



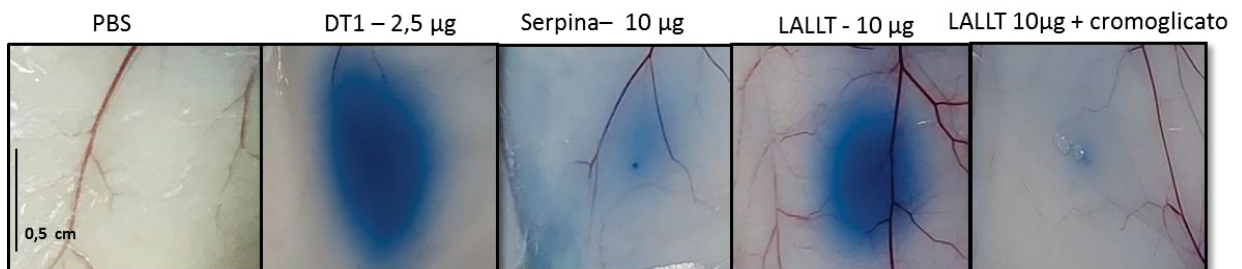
No gráfico é possível observar que a LALLT foi capaz de ser reconhecida pelos soros policlonais produzidos contra os venenos das 3 espécies de *Loxosceles*. No eixo X estão representadas as diluições dos soros e no eixo Y a leitura da absorbância em 490 nM. Nas três diluições dos anticorpos hiperimunes dos venenos testados (1:500, 1:1000 e 1:2000) houve diferenças significativas quando comparadas com os soros pré-imune. Sendo a de maior diferença estatística o veneno de *L. intermedia*, seguido de *L. gaucho* e *L. laeta* (\* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ ).

#### 4.10 ENSAIO DE PERMEABILIDADE VASCULAR

Após a purificação da proteína foram iniciados os testes de atividade biológica. Em camundongos, a LALLT foi capaz de aumentar o extravasamento de plasma para o espaço intersticial quando comparada ao tratamento com PBS (controle negativo) e com um inibidor de serinoprotease (Serpina) recombinante obtido por meio do mesmo sistema de expressão (controle negativo do sistema de purificação) (Figura 15). Uma fosfolipase-D recombinante de *L. intermedia* expressa em bactéria (LiRecDT1), que conhecidamente é capaz de induzir aumento da permeabilidade vascular no modelo em questão, foi utilizada como controle positivo do experimento. Em um dos grupos, os animais foram previamente tratados com o composto cromoglicato de sódio, inibidor de degranulação de mastócitos, o qual é capaz de diminuir a resposta de aumento de extravasamento de plasma pela LALLT, como foi observado no experimento (Figura 15). Uma das principais características de moléculas alergênicas é a liberação de histamina, que tem como uma de suas ações o aumento da permeabilidade vascular, causando edema. Sendo assim, esse

experimento sugere que a LALLT possui um papel na liberação de histamina por mastócitos.

Figura 15 – Atividade da LALLT no aumento do extravasamento de plasma em camundongos

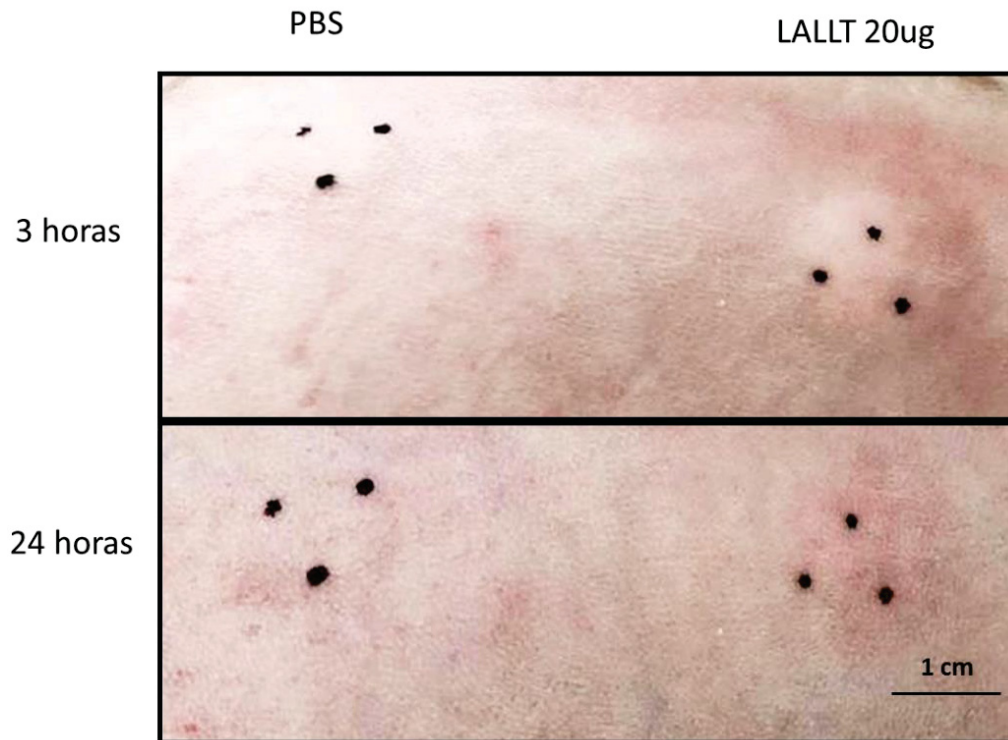


Na figura acima verifica-se que os animais tratados com 2,5 µg de LiRecDT1 e com 10 µg de LALLT mostraram um evidente aumento da permeabilidade vascular. O grupo que foi injetado com PBS e os animais tratados com cromoglicato de sódio, mesmo aqueles que foram injetados com 10 µg de LALLT, não apresentaram um aumento da permeabilidade vascular. O grupo de animais que recebeu 10 µg de Serpina como tratamento apresentou permeabilidade vascular residual.

#### 4.11 EDEMA EM PELE DE COELHO

Para verificar se a LALLT é capaz de causar edema, foi realizado ensaios em pele de coelho. Visto que a dose aplicada de 10 µg da LALLT não causou um edema visível nas fotografias tiradas, nesse ensaio foi utilizada a dose de 20 µg. Tanto a LALLT quanto o como controle (PBS) foram aplicados pela via subcutânea. Após 3 horas da aplicação foi possível observar um edema no ponto de aplicação da LALLT (Figura 16). Esse edema persistiu por 6 horas e em 24 horas não era mais notado, mantendo-se apenas uma leve vermelhidão.

Figura 16 - Edema macroscópico causado pela aplicação da LALLT em pele de coelho



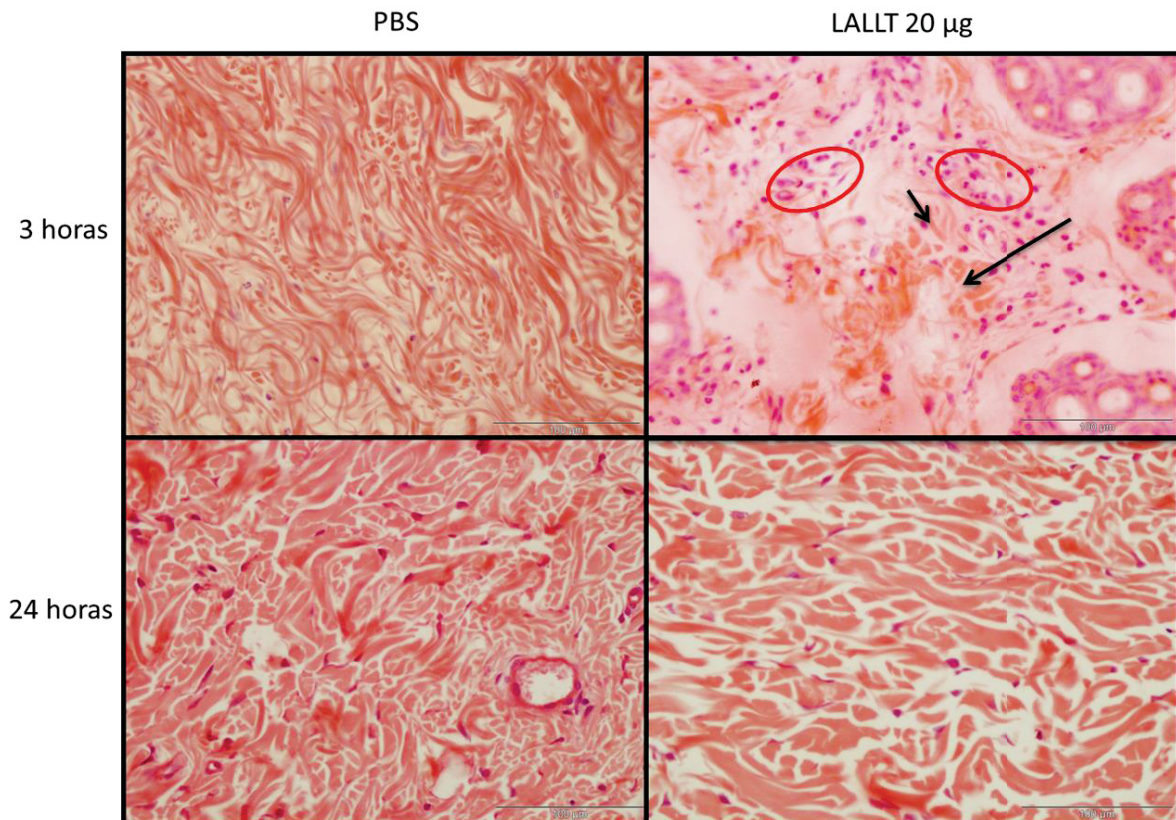
Regiões do coelho onde foram feitos os pontos de aplicação do PBS e da LALLT, após 3 horas e 24 horas. Pode-se observar a presença de um edema ao redor do ponto de aplicação da LALLT 20  $\mu$ g em 3 horas. Este edema diminui em 24 horas, e há presença de uma leve coloração avermelhada. Nos pontos de aplicação do PBS (controle) não foi possível observar nenhum edema ou alteração visível.

#### 4.12 HISTOLOGIA DAS PELES DE COELHO

Após a eutanásia dos coelhos, as peles foram retiradas e fixadas em ALFAC e, após o processamento e coloração, os cortes histológicos foram fotografados em microscópio Olympus BX41 (Figura 17). Foi possível observar em 3 horas a presença de edema nas amostras de animais inoculados com LALLT, caracterizado pela visível desorganização das fibras de colágeno da derme quando comparado com amostras de animais injetados com PBS. Além disso, é possível observar um aumento no número de leucócitos na região edemaciada, indicando uma reação inflamatória em resposta à presença da LALLT. Após 24 horas da inoculação, há uma diminuição do edema no animal tratado com LALLT, porém ainda é possível observar desorganização das fibras de colágeno quando comparadas com o tecido do animal tratado com PBS.



Figura 17 - Presença de fibras colágenas desorganizadas e recrutamento de células na pele de coelhos tratados com a LALLT

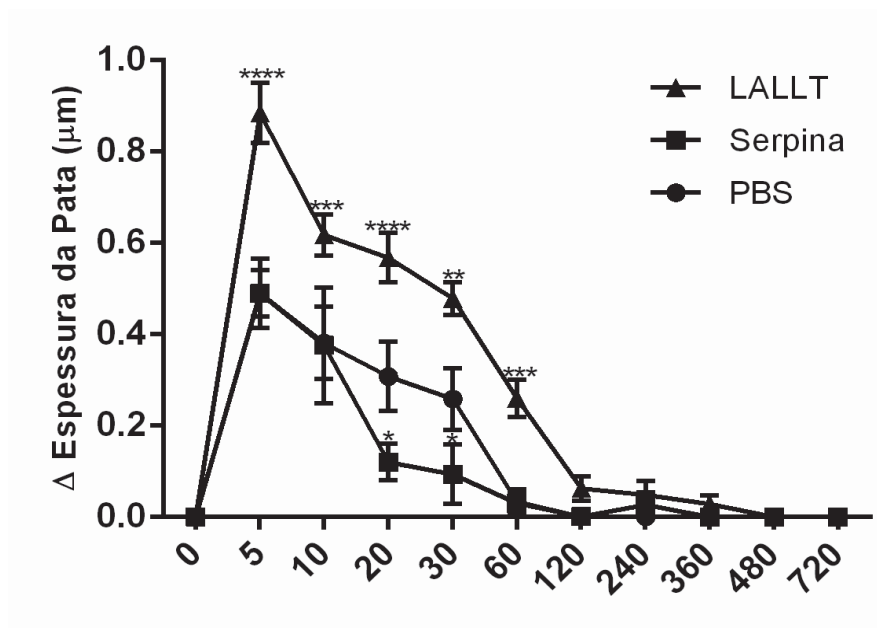


As imagens mostram que a LALLT tem a capacidade de desorganizar as fibras de colágeno (nas setas), aumentando a distância entre elas quando se compara com o tecido tratado com PBS. Também é possível observar um infiltrado de células (nos círculos vermelhos) no tecido do animal tratado com LALLT, caracterizando um processo inflamatório local. Em 24 horas, o edema causado pela LALLT não está presente de uma forma tão acentuada como em 3 horas (escala 100 µm).

#### 4.13 ENSAIO DE EDEMA DE PATA EM CAMUNDONGO

Para reforçar a capacidade de LALLT em desencadear edema, o ensaio de edema em pata de camundongo foi realizado. No experimento foi utilizado como controles negativos o PBS e a Serpina, esta última como controle do sistema de purificação. A LALLT foi capaz de produzir edema a partir dos 5 primeiros minutos, mantendo esse edema por até 60 minutos. Em 20 minutos foi observado o maior pico de edema na pata desses animais (Figura 18).

Figura 18 – Edema de pata causado pela aplicação da LALLT em camundongos

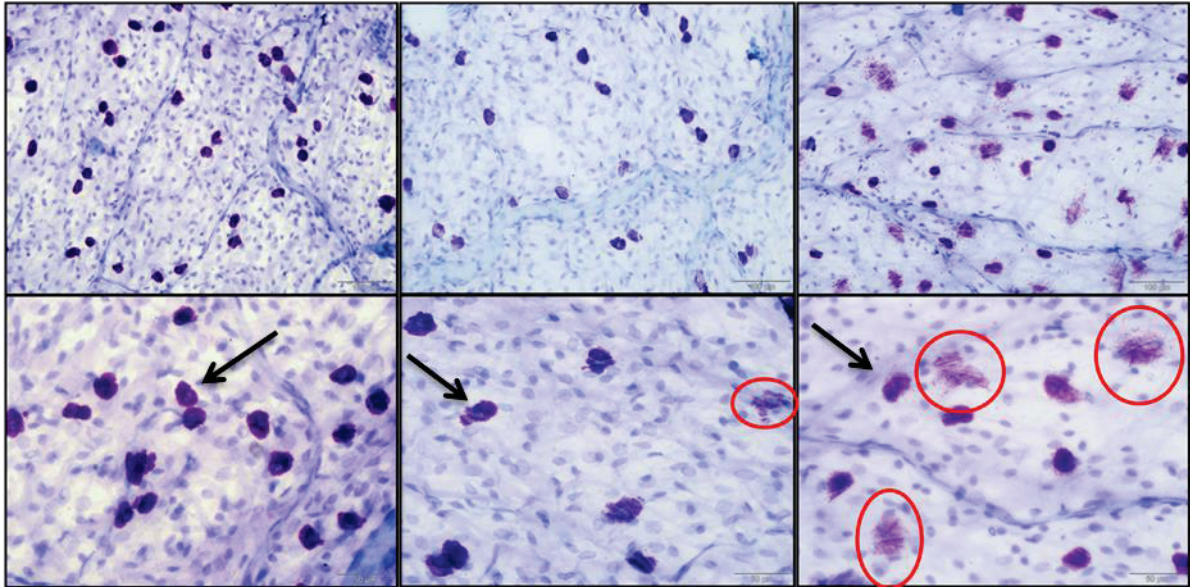


O gráfico do ensaio de edema de pata mostra no eixo X os tempos em que foram realizadas as medidas e no eixo Y a variação na espessura da pata dos animais testados em  $\mu\text{m}$ . A LALLT teve seu pico de edema em 20 minutos após a inoculação e foi capaz de manter esse edema por até 60 minutos. Os grupos injetados com PBS e Serpina praticamente zeraram o edema da pata em 20 minutos, dessa forma não desenvolveram um edema (controles negativos). Cada ponto representa a média  $\pm$  S.E.M. de 5 animais (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ ).

#### 4.14 ATIVIDADE DA LALLT EM MESENTÉRIO DE RATOS

Com intuito de avaliar a capacidade da LALLT de induzir a degranulação de mastócitos, secções do mesentério de ratos foram tratadas com PBS e com 10  $\mu\text{g}$  e 20  $\mu\text{g}$  de LALLT. As duas concentrações de LALLT foram capazes de induzir a degranulação dos mastócitos, mas houve uma maior degranulação de mastócitos na dose de 20  $\mu\text{g}$  da LALLT, indicando que, supostamente essa atividade é dose-dependente. Foi possível observar que os mastócitos do mesentério de ratos tratados com PBS permanecem intactos com uma coloração mais escura, enquanto que aqueles tratados com a LALLT apresentam uma membrana rompida com liberação de grânulos e uma coloração mais clara, indicando a degranulação desses mastócitos (Figura 19).

Figura 19 - Degranulação de mastócitos na presença de LALLT em mesentérios de ratos



Na primeira linha as lâminas foram fotografadas no microscópio Olympus BX41 em um aumento de 20x e na segunda linha o aumento é de 40x. Na primeira linha a escala encontra-se em 100  $\mu$ m e na segunda 50  $\mu$ m. É possível observar que os mastócitos tratados com PBS encontram-se íntegros, o que é indicado pela coloração escura característica (indicados pelas setas pretas). A morfologia dos mastócitos tratados com a LALLT nas duas doses testadas indica que eles estavam degranulados (mostrados nos círculos vermelhos).

## 5. DISCUSSÃO

A prevalência das alergias tem aumentado mundialmente no decorrer dos anos (DIWAKAR *et al.*, 2017). No Brasil, no ano de 2015, as doenças alérgicas alcançaram o 4º lugar no *ranking* de doenças crônicas mais comuns. Além disso, a Organização Mundial de Saúde (OMS) também apurou que 35% das pessoas sofrem com algum tipo de alergia, seja a alimentos, poeira ou a picadas de artrópodes.

Os sintomas decorrentes de alergias são bem variados, e essas moléculas podem ser inaladas, ingeridas ou inoculadas. As alergias decorrentes de artrópodes podem desencadear sintomas severos como urticária, queda pressão arterial, febre, vertigem e edema, já observados em envenenamento com animais como abelhas e formigas (RIVEROL 2015, HOFFMAN, 2010). Sendo assim, eventos alergênicos são esperados também em picadas decorrentes de aranhas. Após serem picados por aranhas *Loxosceles*, os indivíduos relatam coceira no local da picada, vermelhidão,

edema, inchaço e em alguns casos há desenvolvimento de uma reação alérgica generalizada (AGEP – *Acute generalized exanthematous pustulosis*) (MAKRIS *et al.*, 2009, LANE *et al.*, 2011, PALUDO *et al.*, 2009, GREMSKI *et al.*, 2014, MILMAN *et al.*, 2016).

Para melhor entender os mecanismos de ação de uma molécula alergênica e suas atividades inflamatórias e ainda ser possível utilizá-las em diagnósticos, é necessário ter a proteína em grande quantidade e de forma pura. Uma das estratégias é a expressão heteróloga utilizando hospedeiros como, por exemplo, as bactérias (OLLERT e BLANK, 2015). A expressão de proteínas recombinantes tem sido possível principalmente devido a organismos como bactérias, leveduras e mais recentemente ao sistema baculovírus, o qual utiliza células de *Spodoptera frugiperda* (Sf9) como hospedeiras. Apesar de a maior parte das proteínas depositadas na base de dados *Protein Data Bank* (PDB) terem sido expressas em um sistema procarioto como *E. coli*, esse sistema possui suas desvantagens como: proteínas com dobramentos incorretos, acúmulo dessas proteínas mal dobradas em corpos de inclusão e contaminantes bacterianos. (TANYARATSRISAKUL *et al.*, 2010, BRACKE, HOOGEWIJS e DEWILDE, 2018).

O sistema eucarioto que utiliza as células Sf9 como hospedeiras é o mais semelhante à expressão em células de mamíferos quando comparado com outros sistemas de expressão. Esse sistema envolve o baculovírus, um vírus que infecta especificamente célula de inseto. É um sistema usado para produzir proteínas de interesses do ponto de vista biotecnológico e terapêutico, e para produção de vacinas tanto para uso humano quanto veterinário (OERS, PIJLMAN e VLAK, 2015). Para produção de alérgenos, a presença de um sistema de endomembranas em um modelo de expressão é um fator de extrema importância. Esse sistema permite o estabelecimento de modificações pós-traducionais como a glicosilação e a formação de pontes dissulfeto, as quais permitem o enovelamento correto da proteína, originando assim epítopos conformacionais, os quais são cruciais para o reconhecimento pelas células B (OLLERT e BLANK, 2015).

Muitas proteínas alergênicas já foram produzidas utilizando o sistema de expressão em baculovírus. Peng e colaboradores (2016) clonaram e expressaram 4 alérgenos presentes na saliva do mosquito *Aedes aegypti* utilizando esse sistema de expressão. Desses, o Aed a 4 produzido de forma recombinante pode ser usado para diagnóstico na confirmação de alergia à picada desses mosquitos. Além

desses, alérgenos de barata (b Per 5) e do trigo (BvTri 37) também foram expressos por esse mesmo sistema (WEI *et al.*, 2014; PAHR *et al.*, 2014). Em formigas, os alérgenos Sol i 2 e Sol i 3 também foram expressos no sistema de baculovírus. Os autores escolheram esse sistema devido a importância da glicosilação e do enovelamento da proteína, que pode afetar sua ligação à IgE, além de aproximar o dobramento da proteína nativa com a recombinante (SCHMIDT, MCCONNELL e HOFFMAN, 1996 e 2003).

Utilizando o sistema de baculovírus, neste trabalho foi clonada e expressa pela primeira vez uma toxina alergênica recombinante presente no veneno de aranhas do gênero *Loxosceles*. Houve diversas tentativas de expressar essa molécula em modelos procariotos como bactérias e em modelos eucariotos como leveduras, mas sem sucesso (comunicação pessoal). Provavelmente pela ausência do sistema de endomembranas em bactérias e a hiperglicosilação da proteína recombinante em leveduras.

Análises de bioinformática revelaram que na sequência aminoacídica da LALLT existem 2 possíveis sítios de glicosilação e 18 resíduos de cisteínas que provavelmente formam 9 pontes dissulfeto (NetNGlyc 1.0 e DiaNNA 1.1). Devido a essa alta quantidade de resíduos cisteínas, segundo a base de dados Pfam, a sequência aminoacídica se enquadra na superfamília CAP (*cysteine-rich secretor proteins, antigen5, e pathogenesis-related1proteins*). A sequência aminoacídica da LALLT foi submetida a um alinhamento múltiplo com as sequências mais semelhantes à ela; as 5 sequências que apresentam maior identidade com LALLT depositadas no *GenBank* e que foram utilizadas para o alinhamento são alérgenos de aranhas, também pertencentes à família CAP. Além destas, sequências de moléculas alergênicas de animais como escorpiões e ácaros também foram encontradas na análise de alinhamento. Todas as sequências possuíam em comum a presença de uma quantidade considerável de resíduos de cisteínas. Recentemente o sistema de baculovírus tem sido usado para expressão de moléculas pertencentes à superfamília CAP, justamente devido à capacidade desse sistema em produzir proteínas enoveladas corretamente e, conseqüentemente, solúveis (GAIKWAD *et al.*, 2020).

Nas horas iniciais do processo de transfecção das células Sf9 com o baculovírus recombinante (com a sequência da LALLT) a eficiência da infecção foi mensurada pela morfologia de célula. Algumas características morfológicas das Sf9

são bem padronizadas quando infectadas com baculovírus. Algumas características incluem o aumento do diâmetro celular, desadesão da célula e diminuição da confluência (USTÜN-AYTEKIN *et al.*, 2014). Todas essas características foram observadas com maior evidência a partir de 72 horas após a transfecção/infecção.

O primeiro indício de que a LALLT estava sendo expressa foi a imunodeteção de proteínas com epítomos semelhantes a toxinas de *L. intermedia* presentes no meio de cultura das células Sf9 transfectadas com o baculovírus recombinante. Por meio do imunoensaio de *western blotting*, o soro de coelhos imunizados com o veneno total dessa espécie reconheceu uma proteína com massa molecular predita da LALLT. Entretanto, foi necessário otimizar a expressão dessa proteína para larga escala, para obter grandes quantidades da proteína e possibilitar testes de atividade biológica. O tempo e a porcentagem ideais otimizados foram de 120-144 horas e 5% de porcentagem viral v/v. Não foi possível prolongar por muito tempo uma expressão, pois ao manter a expressão por tempos muito prolongados o pH do meio de cultivo celular foi sendo alterado (tornou-se mais ácido), visto que era observada uma mudança de cor do meio de cultivo celular. Isso pode ter consequências como a desnaturação da proteína ou ocorrência de morte de células Sf9 que podem liberar proteases, as quais podem degradar a proteína de interesse expressa. Isso se confirmou quando uma das expressões foi mantida por 216 horas e o rendimento da proteína não aumentou. O SDS-PAGE resultante dessa expressão revelou diversas bandas além da correspondente a LALLT, as quais podem ser referentes aos dímeros da LALLT que sofreram desnaturação e a proteína degradada pelas atividades proteolíticas liberadas pelas células.

A presença de epítomos conservados de toxinas de venenos em diferentes espécies do mesmo gênero é muito comum. Os epítomos podem ser explorados para produção de anticorpos para neutralização de atividades de venenos de diferentes espécies, cujas toxinas possuam seus epítomos conservados (GREMSKI *et al.*, 2014; BUCH *et al.*, 2015). A LALLT recombinante produzida possui seus epítomos reconhecidos pelos soros hiperimunes das espécies de *L. intermedia*, *L. laeta* e *L. gaucho* por meio dos imunoenaios de ELISA e *western blotting*. Dessa forma, esse resultado sugere fortemente que a LALLT possui seus epítomos conservados tanto conformacionais quanto lineares. A conservação dessa proteína nos venenos de *L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta* pode indicar que ela possui uma grande importância evolutiva nos venenos de aranhas *Loxosceles*. Ou seja, essa proteína pode ter um

alto valor biológico para as aranhas como defesa de predadores (TREVISAN *et al.*, 2010). O imunoenensaio de *western blotting* revelou a presença de bandas mais intensas nos venenos de *L. intermedia* e *L. gaucho*, enquanto que no veneno de *L. laeta* a banda obtida apresentou intensidade mais fraca. Esse resultado corroborou com o resultado de ELISA, na qual a absorbância mais baixa obtida foi para a espécie *L. laeta*. Isso sugere uma maior proximidade, ou maior presença desses componentes, entre os alérgenos das espécies de *L. intermedia* e *L. gaucho*, o que também foi verificado para outros grupos de toxinas, a exemplo das fosfolipases-D e dos peptídeos com atividade inseticida. Isoformas desses peptídeos identificadas nos venenos de *L. intermedia* e *L. gaucho* possuíam uma maior semelhança aminoacídica entre si do que aqueles encontrados no veneno de *L. laeta* (MATSUBARA *et al.*, 2017).

Além dessa conservação da LALLT, foi demonstrado que outras toxinas de *L. intermedia* também tiveram seus epítomos reconhecidos entre os venenos de *L. laeta* e *L. gaucho*. É descrito na literatura a conservação de toxinas dermonecróticas, da hialuronidase e de metaloproteases entre os 3 venenos de *Loxosceles* (MATSUBARA *et al.*, 2013, BUCH *et al.*, 2015).

Sabe-se que o veneno total de *L. intermedia* é capaz de induzir reações inflamatórias relacionadas com a liberação de histamina. Essa molécula armazenada em mastócitos está relacionada com processos alérgicos (RATTMANN *et al.*, 2008). Essas reações também são observadas em venenos de outros artrópodes como, por exemplo, na atividade do veneno total da formiga *Dinoponera quadriceps* (SOUSA *et al.*, 2016). A inoculação do veneno total dessa formiga em patas de camundongos desencadeou edema e atividade inflamatória, evidenciada pelo infiltrado de leucócitos visível na análise histológica da pata desses camundongos. Buscando entender se a LALLT possui um papel nesses eventos inflamatórios, visto que sua sequência aminoacídica é semelhante à alérgenos de outras espécies, foram realizados ensaios para a verificação da resposta de células como os mastócitos. Essas células do sistema imune são degranuladas em resposta ao reconhecimento de alguma molécula considerada nociva ao sistema imune, como os alérgenos. Essas células possuem grânulos contendo mediadores inflamatórios (histamina e interleucinas), que quando são liberados aumentam rapidamente a permeabilidade vascular, causando edema (DUDECK *et al.*, 2019).

Para avaliar a participação da LALLT no evento de permeabilidade vascular, foi realizado o ensaio de permeabilidade vascular com o azul de Evans, o qual teve como controle de degranulação de mastócitos o composto cromoglicato de sódio (KIMURA *et al.*, 2015). A LALLT aplicada sem o pré-tratamento com o inibidor de degranulação de mastócitos causou um aumento de extravasamento de plasma acumulado, visualizado pelo extravasamento do corante azul de Evans. No entanto, o cromoglicato de sódio evitou o aumento na permeabilidade vascular nos camundongos causado pela LALLT. Dessa forma, esses resultados sugerem que a LALLT é capaz de induzir a degranulação de mastócitos, que conhecidamente são as células liberadoras de sinais que estimulam o aumento da permeabilidade vascular. Estas células são as primeiras a iniciar uma resposta imune contra patógenos, toxinas e alérgenos, e por isso, geralmente estão localizados nas bordas epiteliais, nas paredes endoteliais e em mucosas. (DUDECK *et al.*, 2019).

O aumento de permeabilidade vascular pode modular a inflamação, fazendo com que enzimas e substâncias no plasma se espalhem no tecido (KOMI, WOHL e BIELORY, 2019). Ou seja, isso pode causar um espalhamento nas outras toxinas presentes no veneno, potencializando sua ação. Sendo assim, a LALLT pode ter um papel de facilitação da difusão das toxinas nos tecidos dos acidentados, potencializando a atividade de outras moléculas presentes no veneno, que vão atuar em sinergia com outras toxinas como as hialuronidases, as metaloproteases e as fosfolipases. Esse tipo de atividade já foi observada em outros alérgenos de artrópodes como o de barata. Kale e colaboradores em 2017 mostraram que a molécula alergênica Per a 10, da barata *Periplaneta americana* tem a capacidade de aumentar a permeabilidade de células Calu-3 (*Human Lung Cancer Cell Line*), rompendo as junções de oclusão entre essas células. Além dessa molécula, o alérgeno Der p 1 de ácaro (*Dermatophagoides pteronyssinus*) também tem é capaz de romper as junções de células MDCK (*Madin-Darby Canine Kidney*) (WANG *et al.*, 1999).

Visto que a LALLT foi capaz de causar um aumento de permeabilidade vascular, foi investigada a sua atividade edematogênica. Utilizando dois modelos animais, a LALLT foi capaz de causar edema tanto em pata de camundongo quanto em pele de coelho. O efeito edematogênico da LALLT teve início 5 minutos após a aplicação na pata dos camundongos e se manteve até 60 minutos após a inoculação de LALLT. Em coelhos, o edema foi visualizado macroscopicamente a partir de 3



horas da aplicação da LALLT. Esse efeito rápido de moléculas que degranulam mastócitos condiz com outras moléculas que também são edematogênicas. O efeito edematogênico foi observado, por exemplo, em veneno da vespa *Parachartergus fraternus*. O veneno total desse artrópode foi capaz de induzir um edema de pata com um pico de atividade semelhante à LALLT, entre 10 e 30 minutos (MULLER *et al.*, 2019).

Além desses ensaios *in vivo* que correlacionam degranulação de mastócitos, o ensaio em mesentério de rato reforça a hipótese dessa atividade da LALLT. Nos cortes histológicos do mesentério de rato, na região onde a LALLT foi aplicada, foi possível observar a presença de vários mastócitos degranulados e seus grânulos espalhados. Em casos de Loxoscelismo, há registro de pacientes que desenvolveram prurido, edema e eritema. Esses sintomas provavelmente estão relacionados com a degranulação de mastócitos e a liberação de mediadores como a histamina (MORALES-MORENO, CARRANZA-RODRIGUEZ e BORREGO, 2015). Ainda correlacionando a atividade edematogênica da LALLT com os sintomas do loxoscelismo, o alérgeno recombinante foi capaz de recrutar células inflamatórias para o tecido, como observado nas análises histológicas. Em análises histológicas da pele de coelhos após 4 horas da inoculação do veneno total de *L. intermedia*, existe além de um grande infiltrado de células inflamatórias uma desorganização das fibras colágenas. Isso caracteriza uma reação inflamatória exacerbada com a presença de edema (OSPEDAL *et al.*, 2002). Em 3 horas após a inoculação da LALLT em pele de coelhos, o resultado da histologia reproduziu tanto essa reação inflamatória quanto a desorganização das fibras que caracterizam o edema. Além disso, apesar de não haver o desenvolvimento de pústulas generalizadas nos coelhos, a presença de um infiltrado de células do sistema imune e a presença de edema na histologia também é observada na histologia de pacientes com AGEP (RAZERA, OLM e BONAMIGO, 2011). Essa reação tem sido um sintoma que recentemente tem aparecido em indivíduos picados por aranhas *Loxosceles* (MAKRIS *et al.*, 2009, LANE *et al.*, 2011, GUERROUJ *et al.*, 2014, MILMAN *et al.*, 2016).

Esses resultados sugerem que a atividade da LALLT é independente de IgE e seu receptor FcεRI, visto que não é necessário um contato prévio com o antígeno para que a degranulação dos mastócitos ocorra. A liberação dos mediadores inflamatórios de mastócitos pode estar relacionada com outro receptor presente

nessas células, assim como o reconhecimento de patógenos como *Staphylococcus aureus* e *Aspergillus fumigatus*, os quais são reconhecidos pelos receptores do tipo *toll-like* e receptores de reconhecimento de padrões (VELEZ, BRYCE e HULSE, 2018). Além desses receptores, mastócitos também podem ser ativados pelo 3º componente do sistema complemento, quimiocinas, citocinas e esfingosina-1-fosfato (GILFILLAN e TKACZYK, 2006). Outra hipótese seria a de reação cruzada com outro alérgeno semelhante à LALLT (como o alérgeno do ácaro encontrado no alinhamento de sequências alergênicas), que poderia fornecer o contato prévio com o antígeno e sensibilizar os mastócitos.

Outro componente do veneno de *L. intermedia* também possui uma ação semelhante à verificada para LALLT no presente trabalho: a TCTP. Essa molécula exibiu atividade edematogênica; em cultivo celular a TCTP foi capaz de induzir degranulação de células basofílicas de rato (RBL-2H3) e causou um aumento na permeabilidade vascular em camundongos (BOIA-FERREIRA *et al.*, 2019). Dessa forma, ambas as toxinas (LALLT e TCTP) podem atuar em sinergia causando os sintomas relacionados à liberação de histamina características do loxoscelismo como edema, vasodilatação e aumento de permeabilidade vascular.

Os resultados desse trabalho mostraram que mesmo sendo pouco expressa na glândula de veneno de *L. intermedia*, a LALLT possui um papel importante no loxoscelismo, assim como a hialuronidase, que também é pouco expressa, mas é responsável por uma potente atividade: o espalhamento gravitacional do veneno que resulta em dermonecrose (FERRER *et al.*, 2013). Outras atividades podem ainda ser investigadas futuramente, como por exemplo, verificar se a LALLT atua em sinergismo com outra toxina do veneno para potencializar desenvolvimento de edema. Dessa forma, a LALLT pode continuar a ser utilizada como uma bioferramenta para melhor entender o loxoscelismo e seus eventos inflamatórios e histaminérgicos. Esses resultados também sugerem que um inibidor de degranulação de mastócitos (cromoglicato) pode ser utilizado para diminuir o edema e extravasamento e acúmulo de plasma, efeitos causados tanto pela atividade da LALLT quanto da TCTP. Ambas as proteínas presentes no veneno de *L. intermedia* tem seus efeitos edematogênicos diminuídos quando utilizado o anti-histamínico cromoglicato. Ou seja, ele poderia ser usado para inibir essas toxinas com atividades em comum (BOIA-FERREIRA *et al.*, 2019). Sendo assim, um anti-histamínico poderia ser utilizado em conjunto com outros medicamentos para o

tratamento de acidentes ocasionados pela inoculação do veneno de aranhas *Loxosceles*.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O sistema de expressão em baculovírus foi de extrema importância para a expressão da LALLT. Apesar do baixo rendimento da proteína obtida e do alto custo monetário deste modelo de expressão, foi esse sistema eucarioto que permitiu a clonagem e a expressão da LALLT com sucesso. Essa molécula demonstrou ser uma potencial bioferramenta para esclarecimento de sintomas do Loxoscelismo, pois apresentou atividades relacionadas com os sintomas cutâneos do Loxoscelismo, como o aumento na permeabilidade vascular, formação de edema e indução de degranulação de mastócitos. É a primeira vez que as atividades biológicas dessa toxina do veneno de *L. intermedia* são registradas. Os resultados obtidos nesse trabalho sugerem que a LALLT pode estar relacionada com os eventos de hipersensibilidade observados em alguns casos clínicos de loxoscelismo. Ou seja, essa molécula pode ajudar a melhor entender os eventos alérgicos e histaminérgicos do veneno. Entretanto, novos ensaios são necessários para melhor entender esses mecanismos, especialmente aqueles relacionados com a degranulação de mastócitos.

## REFERÊNCIAS

- ARRUDA, L. K *et al.* Molecular Cloning of a Major Cockroach (*Blattella germanica*) Allergen, Bla g 2. **Journal Of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 270, n. 33, p.19563-19568, 18 ago. 1995.
- ARRUDA, L. K. *et al.* Recombinant allergens for diagnosis of cockroach allergy. **Curr Allergy Asthma Rep**, v. 14, n. 4, p. 428, Apr 2014.
- AU, S; WU, W; PANTÉ, N. Baculovirus Nuclear Import: Open, Nuclear Pore Complex (NPC) Sesame. **Viruses**, [s.l.], v. 5, n. 7, p.1885-1900, 23 jul. 2013.
- 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.
- BERNTON, H. S.; BROWN, Halla. Insect allergy—Preliminary studies of the cockroach. **Journal Of Allergy**, [s.l.], v. 35, n. 6, p.506-513, nov. 1964
- BIRCHER, A. J.. Systemic Immediate Allergic Reactions to Arthropod Stings and Bites. **Dermatology**, [s.l.], v. 210, n. 2, p.119-127, 2005. S. Karger AG.
- BOIA-FERREIRA, M. *et al.* TCTP from *Loxosceles Intermedia* (Brown Spider) Venom Contributes to the Allergic and Inflammatory Response of Cutaneous Loxoscelism. **Cells**, [s.l.], v. 8, n. 12, p.1489-1509, 22 nov. 2019.
- BORER, A. S. *et al.* Crystal Structure of Sol i 2: A Major Allergen from Fire Ant Venom. **Journal Of Molecular Biology**, [s.l.], v. 415, n. 4, p.635-648, jan. 2012.
- BRACKE, A; HOOGEWIJS, D; DEWILDE, S. Exploring three different expression systems for recombinant expression of globins: *Escherichia coli*, *Pichia pastoris* and *Spodoptera frugiperda*. **Analytical Biochemistry**, [s.l.], v. 543, p.62-70, fev. 2018.
- 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.
- CALABRIA, P. *et al.* Design and Production of a Recombinant Hybrid Toxin to Raise Protective Antibodies against *Loxosceles* Spider Venom. **Toxins**, [s.l.], v. 11, n. 2, p.108-129, 12 fev. 2019.
- CASAI-SILVA, L. L; TEIXEIRA, C. Neurogenic mediators contribute to local edema induced by *Micrurus lemniscatus* venom. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [s.l.], v. 11, n. 11, p.1-12, 21 nov. 2017.

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 (*Loxosceles* genus) venom toxins: tools for biological purposes. **Toxins** (Basel), v. 3, n. 3, p. 309-44, Mar 2011.

CHAIM, O. M. *et al.* Brown spider dermonecrotic toxin directly induces nephrotoxicity. **Toxicology And Applied Pharmacology**, [s.l.], v. 211, n. 1, p.64-77, fev. 2006.

CHAVES-MOREIRA D, Senff-Ribeiro A, Wille ACM, Gremski LH, Chaim OM, Veiga SS. Highlights in the knowledge of brown spider toxins. **J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis**. 2017;23:6. Published 2017 Feb 8

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.

CHAVES-MOREIRA, D. *et al.* Brown Spider (*Loxosceles*) Venom Toxins as Potential Biotools for the Development of Novel Therapeutics. **Toxins**, [s.l.], v. 11, n. 6, p.355-377, 19 jun. 2019.

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.

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.

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.

DIWAKAR, L *et al.* Systematic review of pathways for the delivery of allergy services. **Bmj Open**, [s.l.], v. 7, n. 2, p.1-19, fev. 2017.

DUDECK, A. *et al.* Mast cells as protectors of health. **Journal Of Allergy And Clinical Immunology**, [s.l.], v. 144, n. 4, p.4-18, out. 2019.

FEITOSA, L. *et al.* Detection and characterization of metalloproteinases with gelatinolytic, fibronectinolytic and fibrinogenolytic activities in Brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. **Toxicon**, [s.l.], v. 36, n. 7, p.1039-1051, 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. *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.

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

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

GAIKWAD, A. S. *et al.* Expression and purification of recombinant mouse CRISP4 using a baculovirus system. **Protein Expression And Purification**, [s.l.], v. 167, mar. 2020.

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.

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.

GUERROUJ, B *et al.* Pustulose exanthématique aiguë généralisée après morsure d'araignée au Maghreb. **La Presse Médicale**, [s.l.], v. 43, n. 1, p.87-89, jan. 2014.

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

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

HU, Z. *et al.* Autographa californica Multiple Nucleopolyhedrovirus ac76 Is Involved in Intranuclear Microvesicle Formation. **Journal Of Virology**, [s.l.], v. 84, n. 15, p.7437-7447, 19 maio 2010.

International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Disponível em: <https://talk.ictvonline.org/Acesso em: 19/12/2019>

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

KALE, Sagar L. *et al.* Cockroach protease allergen induces allergic airway inflammation via epithelial cell activation. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 7, n. 1, p.1-12, 15 fev. 2017.

KIMURA, L. F. *et al.* Mast cells and histamine play an important role in edema and leukocyte recruitment induced by *Potamotrygon motoro* stingray venom in mice. **Toxicon**, v. 103, p. 65-73, Sep 2015.

KOMI, D. E. A; WÖHRL, S; BIELORY, L. Mast Cell Biology at Molecular Level: a Comprehensive Review. **Clinical Reviews In Allergy & Immunology**, [s.l.], p.1-24, 12 dez. 2019.

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.

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.

LÓPEZ, M. G. *et al.* Biotechnological applications of occlusion bodies of Baculoviruses. **Applied Microbiology And Biotechnology**, [s.l.], v. 102, n. 16, p.6765-6774, 5 jun. 2018.

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.

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

MALAUQUE, C. M. S *et al.* *Loxosceles* and Loxoscelism: Biology, Venom, Envenomation, and Treatment. **Spider Venoms**, [s.l.], p.419-444, 2016.

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.

MEISSNER, G. O. *et al.* Molecular cloning and in silico characterization of knottin peptide, U2-SCRTX-Lit2, from brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom glands. **Journal Of Molecular Modeling**, [s.l.], v. 22, n. 9, p.1-13, 3 ago. 2016. Springer Science and Business Media LLC.

MILMAN, L. *et al.* Acute generalized exanthematous pustulosis associated with spider bite. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, [s.l.], v. 91, n. 4, p.524-527, ago. 2016.

MINGOMATAJ, E. Ç. *et al.* Unusual Reactions to Hymenoptera Stings: What Should we Keep in Mind?. **Clinical Reviews In Allergy & Immunology**, [s.l.], v. 47, n. 1, p.91-99, 25 jun. 2014.

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.

MORALES-MORENO, H.j.; CARRANZA-RODRIGUEZ, C.; BORREGO, L.. Cutaneous loxoscelism due to *Loxosceles rufescens*. *Journal Of The European Academy Of Dermatology And Venereology*, [s.l.], v. 30, n. 8, p.1431-1432, 2 set. 2015.

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.

OLLERT, Markus; BLANK, Simon. Anaphylaxis to Insect Venom Allergens: Role of Molecular Diagnostics. **Current Allergy And Asthma Reports**, [s.l.], v. 15, n. 5, p.2-11, maio 2015.

OSPEDAL, Katia Zoghbi *et al.* Histopathological findings in rabbits after experimental acute exposure to the *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. *International Journal Of Experimental Pathology*, [s.l.], v. 83, n. 6, p.287-294, 25 mar. 2003.

PAHR S, *et al.* Biochemical, biophysical and IgE-epitope characterization of the wheat food allergen, Tri a 37. *PLoS One* 2014

PAIXÃO-CAVALCANTE, D. *et al.* Tetracycline Protects against Dermonecrosis Induced by *Loxosceles* Spider Venom. **Journal Of Investigative Dermatology**, [s.l.], v. 127, n. 6, p.1410-1418, jun. 2007.

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.

PEREZ-RIVEROL, Amilcar *et al.* Facing Hymenoptera Venom Allergy: From Natural to Recombinant Allergens. **Toxins**, [s.l.], v. 7, n. 7, p.2551-2570, 9 jul. 2015.

PLATTS-MILLS, T A. E. *et al.* The Role of Domestic Allergens. **Ciba Foundation Symposium 206 - The Rising Trends In Asthma**, [s.l.], p.173-189, 28 set. 2007.

PLATTS-MILLS, T. A. E.; WOODFOLK, J. A.. Allergens and their role in the allergic immune response. **Immunological Reviews**, [s.l.], v. 242, n. 1, p.51-68, 20 jun. 2011.

POMÉS, A; CHAPMAN, M. D.; WÜNSCHMANN, S. Indoor Allergens and Allergic Respiratory Disease. **Current Allergy And Asthma Reports**, [s.l.], v. 16, n. 6, p.1-17, 16 maio 2016.

RAZERA, Fernanda; OLM, Gislaine Silveira; BONAMIGO, Renan Rangel. Dermatoses neutrofilicas: parte II. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, [s.l.], v. 86, n. 2, p.195-211, abr. 2011.



ROSENSTREICH, D L. *et al.* The Role of Cockroach Allergy and Exposure to Cockroach Allergen in Causing Morbidity among Inner-City Children with Asthma. **New England Journal Of Medicine**, [s.l.], v. 336, n. 19, p.1356-1363, 8 maio 1997.

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.

SAMPAIO, Vanderson Souza *et al.* Low Health System Performance, Indigenous Status and Antivenom Underdosage Correlate with Spider Envenoming Severity in the Remote Brazilian Amazon. **Plos One**, [s.l.], v. 11, n. 5, 26 may 2016.

SILVA, P. H. da *et al.* Brown spiders and loxoscelism. **Toxicon**, [s.l.], v. 44, n. 7, p.693-709, dez. 2004.

SMS/CE/CVE – SINAM. Secretaria Municipal de Saúde. Centro de Vigilância Epidemiológica. Boletim Epidemiológico de Curitiba. 2019.

SOUSA, Paloma L. *et al.* The acute inflammatory response induced in mice by the venom of the giant ant *Dinoponera quadriceps* involves macrophage and interleukin-1 $\beta$ . **Toxicon**, [s.l.], v. 117, p.22-29, jul. 2016

SUDHA, V. T *et al.* Biopotency and identification of allergenic proteins in *Periplaneta americana* extract for clinical applications. **Biologicals**, [s.l.], v. 35, n. 2, p.131-137, abr. 2007.

SVENDSEN, E. R.; GONZALES, M; COMMODORE, A. The role of the indoor environment: Residential determinants of allergy, asthma and pulmonary function in children from a US-Mexico border community. **Science Of The Total Environment**, [s.l.], v. 616-617, p.1513-1523, mar. 2018.

TANYARATSRISAKUL, S. *et al.* Structural and IgE Binding Analyses of Recombinant Der p 2 Expressed from the Hosts *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*. **International Archives Of Allergy And Immunology**, [s.l.], v. 151, n. 3, p.190-198, 2010.

TOUCHARD, A. *et al.* The Biochemical Toxin Arsenal from Ant Venoms. **Toxins**, [s.l.], v. 8, n. 1, p.30-58, 20 jan. 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.

ÜSTÜN-AYTEKIN, Ö. *et al.* Monitoring of the effects of transfection with baculovirus on Sf9 cell line and expression of human dipeptidyl peptidase IV. **Cytotechnology**, [s.l.], v. 66, n. 1, p.159-168, 29 maio 2013.

UZZAMAN, A; CHO, S. H.. Chapter 28: Classification of hypersensitivity reactions. **Allergy And Asthma Proceedings**, [s.l.], v. 33, n. 3, p.96-99, 1 maio 2012

VAN OERS, M. M.; PIJLMAN, G. P.; VLAK, J. M.. Thirty years of baculovirus-insect cell protein expression: from dark horse to mainstream technology. **Journal Of General Virology**, [s.l.], v. 96, n. 1, p.6-23, 22 set. 2015. Microbiology Society.

VAUGHN, J. L. *et al.* The establishment of two cell lines from the insectspodoptera frugiperda (lepidoptera; noctuidae). **In Vitro**, [s.l.], v. 13, n. 4, p.213-217, abr. 1977.

VELEZ, T. E.; BRYCE, P. J.; HULSE, K. E.. Mast Cell Interactions and Crosstalk in Regulating Allergic Inflammation. **Current Allergy And Asthma Reports**, [s.l.], v. 18, n. 5, p.1-7, 17 abr. 2018.

VELEZ, T. E.; BRYCE, P. J.; HULSE, K. E.. Mast Cell Interactions and Crosstalk in Regulating Allergic Inflammation. **Current Allergy And Asthma Reports**, [s.l.], v. 18, n. 5, p.1-10, 17 abr. 2018.

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.

WAN, Hong *et al.* Der p 1 facilitates transepithelial allergen delivery by disruption of tight junctions. **Journal Of Clinical Investigation**, [s.l.], v. 104, n. 1, p.123-133, 1 jul. 1999.

WEI, J *et al.* Preparation and Identification of Per a 5 as a Novel American Cockroach Allergen. **Mediators Of Inflammation**, [s.l.], v. 2014, p.1-10, 2014.

WILLIAMS, T. *et al.* Covert Infection of Insects by Baculoviruses. **Frontiers In Microbiology**, [s.l.], v. 8, p.1-13, 17 jul. 2017.

WOODFOLK, J. A. *et al.* Antigenic Determinants of the Bilobal Cockroach Allergen Bla g 2. **Journal Of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 291, n. 5, p.2288-2301, 7 dez. 2015.

## ANEXO

18/09/2019

SEI/UFPR - 2136375 - CEUA/BIO: Certificado



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Nº 1297

### CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO – UFPR), instituída pela Resolução Nº 86/11 do Conselho de Ensino Pesquisa e Extensão (CEPE), de 22 de dezembro de 2011, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos (DBCA) estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e com as normas internacionais para a experimentação animal.

### STATEMENT

The Ethics Committee for Animal Use from the Biological Sciences Section of the Federal University of Paraná (CEUA/BIO – UFPR), established by the Resolution Nº 86/11 of the Teaching Research and Extension Council (CEPE) on December 22<sup>nd</sup> 2011, **CERTIFIES** that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the Brazilian Guidelines for Care and Use of Animals for Scientific and Teaching purposes established by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and with the international guidelines for animal experimentation.

**PROCESSO/PROCESS:** 23075.054376/2019-84

**APROVADO/APPROVAL:** 20/08/2019 – R.O. 07/2019

**TÍTULO:** Clonagem e expressão de uma proteína homóloga à alérgenos de *Loxosceles intermedia* em sistema eucarioto: Baculovirus.

**TITLE:** Cloning and expression of a protein homologous to allergens of *Loxosceles intermedia* in a eukaryotic system: Baculovirus.

**AUTORES/AUTHORS:** Silvío Sanches Veiga, Hanna Câmara da Justa, Nayanne Louise Costacurta Polli, Bruno César Antunes, Kamila Moreno, Elidiana de Bona, Antonielle Beatriz Baldissera.

**DEPARTAMENTO/DEPARTMENT:** Biologia Celular

Profa. Dra. Katya Naliwaiko  
Coordenadora da CEUA



Documento assinado eletronicamente por **ISELEN ABREU FLORENTINO IVANOSKI, MEDICO VETERINARIO**, em 17/09/2019, às 17:51, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



A autenticidade do documento pode ser conferida [aqui](#) informando o código verificador **2136375** e o código CRC **80B81229**.