

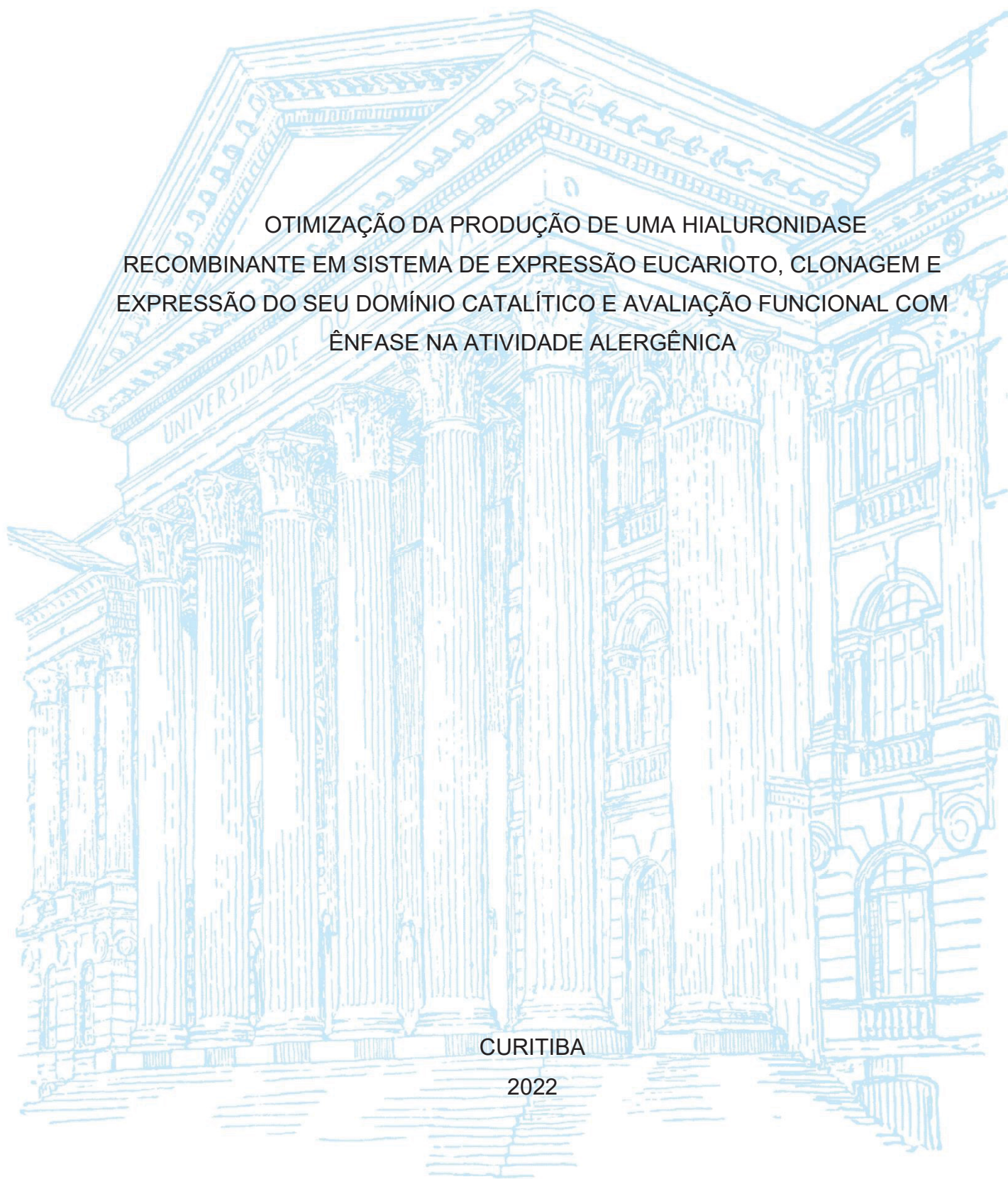
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ISABEL DE OLIVEIRA LEITE

OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE UMA HIALURONIDASE
RECOMBINANTE EM SISTEMA DE EXPRESSÃO EUCARIOTO, CLONAGEM E
EXPRESSÃO DO SEU DOMÍNIO CATALÍTICO E AVALIAÇÃO FUNCIONAL COM
ÊNFASE NA ATIVIDADE ALERGÊNICA

CURITIBA

2022



ISABEL DE OLIVEIRA LEITE

OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE UMA HIALURONIDASE
RECOMBINANTE EM SISTEMA DE EXPRESSÃO EUCARIOTO, CLONAGEM E
EXPRESSÃO DO SEU DOMÍNIO CATALÍTICO E AVALIAÇÃO FUNCIONAL COM
ÊNFASE NA ATIVIDADE ALERGÊNICA

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientadora: Profa. Dra. Luiza Helena Gremski
Coorientador: Prof. Dr. Silvio Sanches Veiga

CURITIBA

2022

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Leite, Isabel de Oliveira

Otimização da produção de uma hialuronidase recombinante em sistema de expressão eucarioto, clonagem e expressão do seu domínio catalítico e avaliação funcional com ênfase na atividade alergênica / Isabel de Oliveira Leite. – Curitiba, 2022.

1 recurso on-line : PDF.

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

Orientadora: Profa. Dra. Luiza Helena Gremski.

Coorientadora: Prof. Dr. Silvio Sanches Veiga.

1. Alergia. 2. Inflamação. 3. Hialuronidase recombinante. 4. Loxosceles. I. Gremski, Luiza Helena, 1982-. II. Veiga, Silvio Sanches, 1962-. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular. IV. Título.

Bibliotecária: Giana Mara Seniski Silva CRB-9/1406



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 BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **ISABEL DE OLIVEIRA LEITE** intitulada: **OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE UMA HIALURONIDASE RECOMBINANTE EM SISTEMA DE EXPRESSÃO EUCARIOTO, CLONAGEM E EXPRESSÃO DO SEU DOMÍNIO CATALÍTICO E AVALIAÇÃO FUNCIONAL COM ÊNFASE NA ATIVIDADE ALERGÊNICA**, sob orientação da Profa. Dra. LUIZA HELENA GREMSKI, 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 mestra 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, 05 de Setembro de 2022.

Assinatura Eletrônica

06/09/2022 14:39:30.0

LUIZA HELENA GREMSKI

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

13/09/2022 14:26:18.0

EDVALDO DA SILVA TRINDADE

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

14/09/2022 20:33:58.0

VALERIA PEREIRA FERRER

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE)

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, pela dádiva da vida, por me permitir chegar até o fim deste processo. Me deu tudo, foi/é meu Amigo nos momentos difíceis, foi/é meu porto seguro. Eu só tenho a agradecer ao meu Pai.

Agradeço ao meu querido Samuel, meu companheiro de vida, sou muito grata pela sua paciência comigo. Sua sabedoria e serenidade em lidar com a vida e com os problemas que há nela já me ensinaram bastante. Obrigada por me auxiliar nesta caminhada, com você ao meu lado foi muito mais fácil.

Sou grata a minha família: meu pai, minha mãe, meu irmão João Paulo, minha irmã Milena (*in memoriam*) e meu irmão Alberto. Meu pai, de quem muito me orgulho, sou grata por me ensinar lições da vida, por ser tão cuidadoso comigo e por ser meu amigo. Minha mãe, sou muito grata por ser minha incentivadora neste processo, me direcionou e acreditou em mim. Meu irmão João Paulo, obrigada por ser a pessoa que me inspira e me incentiva a ser grande. Minha irmã Milena, que me incentivou a fazer o mestrado. Meu irmão Alberto, obrigada por me acolher.

Agradeço à minha orientadora Doutora Luiza Gremski, por aceitar me orientar, por confiar a mim este projeto, me ajudar no entendimento e direcionamento deste trabalho, pelas ideias e discussões. Também agradeço ao meu coorientador Doutor Silvio Sanches por me aceitar no laboratório, por compartilhar ideias e soluções para conclusão deste trabalho. Admiro ambos por serem excelentes cientistas e professores, exemplos de ética e seriedade.

Muito obrigada à Doutora Zelinda Graeff, que esteve presente em todas as etapas deste trabalho, muito obrigada pela disposição em me ajudar. Admiro-a como profissional e como pessoa, excelente cientista e professora, que ama ensinar, pois não há pesar em fazê-lo.

Também sou grata à Mestre Hanna Justa, que me ajudou com os ensaios em animais, me ensinou as técnicas da biologia molecular e compartilhou muitas ideias.

Agradeço ao pessoal do laboratório, doutorando Pedro Schluga, doutorandas Nyanne Polli e Antonielle Baldissera pelas contribuições.

Agradeço aos alunos de iniciação científica Lucas, Thaís, Mariana e Eduarda por me auxiliarem com as tarefas e ensaios, e por seus questionamentos.

Agradeço à Mariana Ferreira por suas contribuições para este trabalho.

Agradeço ao Matheus Zazula e técnico do CTAF, Israel, por suas contribuições.

Também sou grata ao laboratório de Neurobiologia do professor Silvio Zanatta pelo uso dos equipamentos.

Agradeço à Odete Silva, por ser uma incentivadora deste processo, por contribuir mesmo que de forma indireta para eu estar aqui. Exemplo de mulher, mãe e professora.

Agradeço aos meus amigos Ana Paula, Mariana, Sandoval, Andrew e Andrey e aos meus tios Josinete e Joston pelas conversas e pelos bons momentos que compartilhamos.

Agradeço à nação brasileira por compartilhar sua força através da arrecadação de tributos para o financiamento desta pesquisa.

“Acredito que a “sorte” é fruto de quem trabalha duro e o sucesso é consequência de quem persiste”. (Autor desconhecido)

RESUMO

As hialuronidases são enzimas que clivam o ácido hialurônico e através desta atividade atuam como um fator de espalhamento de moléculas nos tecidos. As hialuronidases presentes no veneno de animais são semelhantes a hialuronidases de mamíferos, devido a isso, essa enzima vem sendo estudada e avaliada para aplicações farmacológicas e biotecnológicas. Algumas destas enzimas têm sido aplicadas na otimização da entrega de drogas terapêuticas aos seus alvos e na correção de preenchimentos de ácido hialurônico. As hialuronidases recombinantes do veneno de *Loxosceles* obtidas em modelos de expressão eucarioto (LiHyal2) e procarioto (*Dietrich's hyaluronidase*) se mostram promissoras para tais potenciais de aplicação. No entanto, o rendimento de LiHyal2 era baixo, enquanto *Dietrich's hyaluronidase* era obtida inativa. Portanto, a otimização da expressão dessa toxina em bactérias e em células de inseto é uma etapa essencial a ser cumprida se existe um propósito de aplicação na indústria. Dessa forma, a otimização da produção da LiHyal2 foi um dos objetivos do presente estudo. Sabe-se que as hialuronidases presentes no veneno de outros artrópodes, como as de abelhas, são alérgenos. No entanto, não estava claro se hialuronidases loxoscélicas eram alergênicas. Portanto, também pensando no propósito de aplicação dessa proteína na indústria, este estudo fornece resultados da avaliação da atividade biológica da hialuronidase do veneno de *Loxosceles* com enfoque na atividade alergênica. A clonagem do domínio catalítico da hialuronidase de *L. intermedia* também foi meta desse estudo, pois a sua estrutura conta com um domínio adicional que, segundo estudos com toxinas homólogas, não tem influência direta na sua atividade catalítica, mas poderia estar dificultando a sua expressão como proteína solúvel em sistema de expressão procarioto. Foram estabelecidos 4 protocolos para otimizar a expressão da LiHyal2 em células de inseto, variando a adição da suspensão de vírus durante a expressão e o tempo de expressão. Um deles rendeu 12 mg/L, sendo estabelecido como a melhor estratégia de produção da LiHyal2. A proteína purificada foi analisada quanto às suas principais características individuais (massa molecular, imunodeteção e atividade enzimática) e os resultados confirmaram os aspectos inerentes da LiHyal2. Anticorpos produzidos contra a LiHyal2 foram capazes de reconhecer epítopos de hialuronidase nativa nos venenos de *L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta*, mostrando conservação desta molécula em diferentes venenos de espécies de *Loxosceles*. Resultados dos efeitos biológicos causados por LiHyal2 revelaram que sozinha não é potencialmente alergênica ou inflamatória: não foi capaz de aumentar a permeabilidade vascular, não provocou influxo de cálcio em células RBL-2H3 e degranulação de mastócitos, e nem edema exacerbado. Foi detectado apenas edema residual dose-dependente em pata de camundongos. Além disso, as análises histológicas da pele de coelhos após inoculação da LiHyal2 mostram um leve infiltrado inflamatório e desorganização das fibras de colágeno da derme. Com base nessas observações, é provável que esse edema seja desencadeado pelo dano tecidual resultante da ação enzimática da LiHyal2 sobre o ácido hialurônico do tecido, o que estimularia essa leve resposta inflamatória. O domínio catalítico da hialuronidase de *L. intermedia* foi clonado com sucesso e essa construção será uma ferramenta importante para a expressão dessa nova proteína. A otimização da produção da LiHyal2 e os resultados que demonstram ausência de atividade alergênica por parte dessa proteína recombinante fortalecem a viabilidade de utilização dessa enzima para aplicações terapêuticas.

Palavras-chave: Hialuronidase recombinante; Alergia; Inflamação; Células Sf9; *Loxosceles*.

ABSTRACT

Hyaluronidases are enzymes that cleave the hyaluronic acid and through this activity act as a factor of spreading molecules in tissues. The hyaluronidases present in animal venom are similar to mammalian hyaluronidases, due to this, this enzyme has been studied and evaluated for pharmacological and biotechnological applications. Some of these enzymes have been applied to optimize the delivery of therapeutic drugs to their targets and to correct hyaluronic acid fillers. Recombinant hyaluronidases from *Loxosceles* venom obtained in eukaryotic (LiHyal2) and prokaryotic (Dietrich's hyaluronidase) expression models show promise for such potential applications. However, the yield of LiHyal2 was low, while Dietrich's hyaluronidase was obtained inactive. Therefore, the optimization of the expression of this toxin in bacteria and in insect cells is an essential step to be fulfilled if there is an application purpose in industry. Thus, the optimization of LiHyal2 production was one of the objectives of the present study. Hyaluronidases present in the venom of other arthropods, such as those of bees, are known to be allergens. However, it was not clear whether *Loxosceles* hyaluronidases were allergenic. Therefore, also with the purpose of application of this protein in industry in mind, this study provides results of the evaluation of the biological activity of hyaluronidase from *Loxosceles* venom with a focus on allergenic activity. The cloning of the catalytic domain of the hyaluronidase from *L. intermedia* was also a goal of this study, since its structure has an additional domain which, according to studies with homologous toxins, has no direct influence on its catalytic activity, but could be hindering its expression as a soluble protein in a prokaryotic expression system. Four protocols were established to optimize the expression of LiHyal2 in insect cells, varying the addition of the virus suspension during expression and the expression time. One of them yielded 12 mg/L, being established as the best LiHyal2 production strategy. The purified protein was analyzed for its main individual characteristics (molecular mass, immunodetection and enzymatic activity) and the results confirmed the inherent aspects of LiHyal2. Antibodies produced against LiHyal2 were able to recognize epitopes of native hyaluronidase in the venoms of *L. intermedia*, *L. gaucho* and *L. laeta*, showing conservation of this molecule in different venoms of *Loxosceles* species. Results of the biological effects caused by LiHyal2 revealed that alone it is not potentially allergenic or inflammatory: it was not able to increase vascular permeability, did not cause calcium influx in RBL-2H3 cells and mast cell degranulation, and neither exacerbated oedema. Only dose-dependent residual oedema was detected in mouse paw. Furthermore, histological analyses of rabbit skin after LiHyal2 inoculation show a mild inflammatory infiltrate and disorganization of collagen fibers of the dermis. Based on these observations, it is likely that this oedema is triggered by tissue damage resulting from the enzymatic action of LiHyal2 on hyaluronic acid in the tissue, which would stimulate this mild inflammatory response. The catalytic domain of the hyaluronidase from *L. intermedia* was successfully cloned and this construct will be an important tool for the expression of this new protein. The optimization of LiHyal2 production and the results that demonstrate the absence of allergenic activity by this recombinant protein strengthen the viability of using this enzyme for therapeutic applications.

Keywords: Recombinant hyaluronidase; Allergy; Inflammation; Sf9 cells; *Loxosceles*.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – CARACTERÍSTICAS DO CEFALOTÓRAX DE LOXOSCELES	20
FIGURA 2 – TOXINAS PRESENTES NO VENENO DE <i>L. INTERMEDIA</i>	23
FIGURA 3 – CLIVAGEM DO ÁCIDO HIALURÔNICO POR HIALURONIDASES.....	24
FIGURA 4 – EFEITOS BIOLÓGICOS RELACIONADOS AO ÁCIDO HIALURÔNICO.....	27
FIGURA 5 - A ESTRUTURA DA LIHYAL2 E SUA SEMELHANÇA COM HIALURONIDASE DE <i>APIS MELIFERA</i>	30
FIGURA 6 – SEQUÊNCIAS AMINOACÍDICA E NUCLEOTÍDICA DA LIHYAL2.....	31
FIGURA 7 – DIAGRAMA DO PROCESSO DE EXPRESSÃO DA LIHYAL2.....	38
FIGURA 8 – ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS EM CÉLULAS SF9, PERFIL ELETROFORÉTICO DA LIHYAL2 PURIFICADA E TABELA DE RENDIMENTO PROTEICO.....	51
FIGURA 9 – IMUNODETECÇÃO DA LIHYAL2.....	53
FIGURA 10 - ZIMOGRAMA E TURBIDIMETRIA DA ATIVIDADE HIALURONIDÁSICA.....	54
FIGURA 11 - ENSAIO DE PERMEABILIDADE VASCULAR.....	55
FIGURA 12 – EDEMA EM PATA DE CAMUNDONGO.....	56
FIGURA 13 - ANÁLISE HISTOLÓGICA DA PELE DE COELHO.....	57
FIGURA 14 – ENSAIO DE DEGRANULAÇÃO DE MASTÓCITOS EM MESENTÉRIO DE RATOS.....	58
FIGURA 15 – EFEITOS DA LIHYAL2 SOBRE A VIABILIDADE CELULAR E O INFLUXO DE CÁLCIO.....	60
FIGURA 16 – PERFIL ELETROFORÉTICO DOS PRODUTOS DA AMPLIFICAÇÃO DE PCR.....	61
FIGURA 17 – SEQUÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS E DE AMINOÁCIDOS DO DOMÍNIO CATALÍTICO DA HIALURONIDASE DE <i>L. INTERMEDIA</i>	63
FIGURA 18 – ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS AMINOACÍDICAS.....	64

BSA - Bovine Serum Albumin
B.O.D - Biological Oxygen Demand (Estufa incubadora microprocessada)
DMEM -Dulbecco's Modified Eagle's Medium
EGF-*like* - Epidermal Growth Factor like
ICK -Inhibitor Cystine Knot
kDa - Quilodaltons (unidade de massa molecular equivalente a mil daltons).
LALLT - *Loxosceles Allergen-Like* Toxin
LiHyal2 - *Loxosceles intermedia* Hyaluronidase isoform 2
LiRecDT - *Loxosceles intermedia* Dermonecrotic recombinant Toxin 1
LSPILT - *Loxosceles* Serine Protease Inhibitor-*Like* Toxin)
MTT -(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)
PBS -Phosphate Buffered Saline
PCR -Reação em Cadeia da Polimerase
SDS-PAGE- Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
SFB - Soro Fetal bovino
Sf9 - *Spodoptera frugiperda*

LISTA DE SÍMBOLOS

® Registro, marca registrada

™ trade mark, marca comercial

∞ infinito, ciclo de espera da pcr

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 JUSTIFICATIVA	18
1.2 OBJETIVOS	19
1.2.1 Objetivo geral	19
1.2.2 Objetivos específicos.....	19
2 REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 <i>LOXOSCELES</i>	20
2.1.1 Proteínas do veneno loxoscélico	22
2.2 HIALURONIDASES.....	24
2.2.1 A importância da hialuronidase e do ácido hialurônico da matriz extracelular nas respostas biológicas	26
2.2.2 Hialuronidasas do veneno loxoscélico.....	28
2.2.3 Hialuronidasas e suas aplicações biotecnológicas.....	31
2.3 CARACTERÍSTICAS DO PROCESSO ALERGÊNICO E INFLAMATÓRIO.....	34
2.4 SISTEMA DE EXPRESSÃO BACULOVÍRUS/ CÉLULAS DE INSETO	35
3 MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1 OTIMIZAÇÃO DA EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA LIHYAL2	37
3.1.1 Produção de estoque viral recombinante fresco	37
3.1.2 Expressão da hialuronidase recombinante em células Sf9	38
3.1.3 Purificação da LiHyal2 expressa em células Sf9.....	39
3.2 DOSAGEM E DETECÇÃO DA LIHYAL2.....	40
3.2.1 Dosagem de proteínas pelo método de Bradford	40
3.2.2 Produção de anticorpos em camundongos com a proteína recombinante.....	40
3.2.3 Ensaio de imunodeteção	41
3.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DA LIHYAL2	42
3.3.1 Ensaio de degradação.....	42
3.3.2 Animais.....	42
3.3.3 Ensaio de permeabilidade vascular em camundongo	43
3.3.4 Edema de pata em camundongo	43
3.3.5 Análise histológica da pele de coelho	44
3.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ALERGÊNICA DA LIHYAL2	44
3.4.1 Visualização de mastócitos em mesentério de ratos.....	44

3.4.2 Cultivo celular.....	45
3.4.3 Ensaio de viabilidade celular.....	45
3.4.4 Ensaio de influxo de cálcio.....	45
3.5 CLONAGEM DO DOMÍNIO CATALÍTICO DA HIALURONIDASE DE <i>L. INTERMEDIA</i>	46
3.5.1 Desenho dos primers, amplificação da sequência do domínio catalítico da hialuronidase de <i>L. intermedia</i> e ligação no vetor pGEM-T.....	46
3.5.2 Transformação em bactérias quimiocompetentes.....	47
3.5.3 Plaqueamento das bactérias transformadas.....	47
3.5.4 PCR de colônia.....	48
3.5.5 Minipreparação e processamento para sequenciamento.....	48
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	49
4 RESULTADOS.....	50
4.1 OTIMIZAÇÃO DA EXPRESSÃO E DA PURIFICAÇÃO DE LIHYAL2.....	50
4.2 IMUNODETECCÃO DA LIHYAL2.....	52
4.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DA LIHYAL2.....	53
4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ALERGÊNICA DA LIHYAL2.....	58
4.5 CLONAGEM DO DOMÍNIO CATALÍTICO DA HIALURONIDASE DE <i>L. INTERMEDIA</i>	61
5 DISCUSSÃO.....	65
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	73
7 REFERÊNCIAS.....	75

1 INTRODUÇÃO

As aranhas do gênero *Loxosceles* estão entre os principais gêneros de aranhas envolvidas em acidentes por animais peçonhentos. Uma vez que este aracnídeo pode pôr em risco a saúde humana através de sua picada, elas apresentam importância na saúde pública no Brasil, pois os efeitos do veneno de *Loxosceles* podem levar a necrose e implicações sistêmicas (MINISTÉRIO SAUDE, 2022).

Durante os anos de 2017, 2018 e 2019 a média de acidentes envolvendo aranhas no Brasil foi de 34.995 sendo que o gênero *Loxosceles* é responsável por aproximadamente um quarto (média 8.324) desses casos nestes anos. Também se observa que a maior parte dos acidentes que ocorre envolvendo *Loxosceles* é relatada na região sul do país, consistindo no estado do Paraná o maior número de casos (em média 4.055), e seguido pelo estado de Santa Catarina (em média 1.841) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

Os acidentes loxoscélicos envolvem sintomas bem caracterizados que podem ser classificados em dois principais perfis, o de dermonecrose que é acompanhado de um espalhamento gravitacional e o desenvolvimento de inflamação, e o outro é o sistêmico, que é mais raro de acontecer e leva à insuficiência renal aguda em alguns casos. O conjunto de sintomas e manifestações é chamado de Loxoscelismo (SILVA et al., 2004; SWANSON; VETTER, 2006)

O veneno loxoscélico é composto por uma mistura de proteínas e entre elas as hialuronidases destacam-se como uma das responsáveis pelo espalhamento gravitacional. Esta enzima é uma hidrolase que realiza a degradação de glicosaminoglicanos presentes na matriz extracelular, gerando a desorganização da estrutura do tecido. Sua atividade biológica já foi descrita e mostrou degradar ácido hialurônico e condroitin sulfato (DA SILVEIRA et al., 2007; FERRER et al., 2013)

As hialuronidases do veneno de *Loxosceles* já foram produzidas em sistemas de expressão procarionte e eucarionte. Quando produzida por meio de vetor de expressão bacteriano, foi obtida de forma insolúvel precisando de ser redobrada *in vitro*. Enquanto em sistemas de expressão em células eucariontes, as hialuronidases apresentaram solubilidade pois o processo de síntese possivelmente permitiu a realização de modificações pós-traducionais na proteína recombinante e formação de

pontes dissulfeto (SOLDATOVA et al., 1998). No entanto, o rendimento da LiHyal2 foi baixo (1 mg/L) (DE-BONA et al., 2021) comparado a outras hialuronidases obtidas pelo mesmo modelo de expressão (células de inseto) (SOLDATOVA et al., 1998)

A estrutura tridimensional da LiHyal2 foi predita e para isso moldes de duas hialuronidases foram utilizadas para a modelagem molecular: a hialuronidase de abelha e a de humano, uma vez que essas três enzimas pertencem à mesma classe de hialuronidases. A comparação entre as estruturas proporcionou embasamento para pesquisas futuras, principalmente quanto a uma possível atividade alergênica da hialuronidase do veneno de *Loxosceles*, uma vez que a hialuronidase de abelha é um importante alérgeno do veneno desse inseto (DE-BONA et al., 2021; FERRER et al., 2013)

No modelo predito de LiHyal2 foi possível analisar alguns aminoácidos conservados envolvidos na hidrólise do substrato, além disso, foi observada a semelhança com hialuronidase de abelha e principalmente com a humana (hHyal-1). LiHyal2 e hHyal-1 compartilham uma região em comum na extremidade C-terminal, uma região semelhante ao fator de crescimento epidérmico (*EGF-like*), que inclui 6 resíduos de cisteína que se ligam e formam 3 pontes dissulfeto (DE-BONA et al., 2021). Park e colaboradores (2019) mostraram que mesmo removendo parcialmente regiões da extremidade C-terminal da hialuronidase bovina, foi possível obtê-la ativa (DE-BONA et al., 2021; PARK et al., 2019). A sequência removida por Park coincide com o início do domínio *EGF-like* de LiHyal2 sugerindo que a eliminação deste domínio não implicaria na perda da atividade hialuronidásica, e a produção em bactéria seria uma opção economicamente mais viável, além de contribuir para possíveis estudos de sua estrutura e função.

Pensando nas possíveis aplicações da hialuronidase de *L. intermedia*, a otimização da produção das hialuronidases recombinantes de *L. intermedia*, que inclui a clonagem do domínio catalítico da enzima e uma melhoria nos protocolos de expressão e purificação da proteína completa são fundamentais para permitir um maior rendimento proteico. A verificação da atividade alergênica dessa enzima é também uma etapa essencial para verificar a viabilidade de utilização dessa enzima para diferentes aplicações.

1.1 JUSTIFICATIVA

A hialuronidase recombinante do veneno de *L. intermedia* é uma possível ferramenta para a aplicação biotecnológica, pois já foi mostrado seu potencial como fator de espalhamento e sua atividade sobre o ácido hialurônico (DE-BONA et al., 2021; FERRER et al., 2013). No entanto, também é necessário comprovar que a proteína sozinha não causa inflamações ou reações alérgicas no sistema biológico. A partir disso, este projeto buscou analisar e mostrar o efeito da LiHyal2 no organismo, principalmente na pele, que pode ser um possível local de aplicação da hialuronidase para fins terapêuticos e é onde a atividade da proteína é mais evidente, funcionando como um fator de espalhamento de outras toxinas (SILVA et al., 2004). Além disso, em alguns casos de acidentes envolvendo a aranha marrom foi detectada a presença de reações alérgicas. Sabe-se que há alérgenos no veneno de *Loxosceles*, no entanto, a hialuronidase também poderia estar contribuindo para o desencadeamento destas respostas (JUSTA et al., 2020; SADE et al., 2012). Essa hipótese surgiu porque as hialuronidases presentes no veneno de abelha e de vespa são alérgenos, e LiHyal2 mostrou 47,4% de similaridade estrutural com a hialuronidase de abelha, isso seria mais uma evidência de que LiHyal2 poderia ser um alérgeno (DE-BONA et al., 2021). Desta forma, averiguar a atividade alergênica da proteína é importante.

Outrossim, a expressão da proteína era desvantajosa tanto em células de inseto quanto em bactéria. A hialuronidase recombinante produzida em células de inseto é produzida de forma solúvel e ativa, no entanto o rendimento era muito baixo, 1 mg/L, tal quantidade se tornava escassa para trabalhar na pesquisa e pouco atrativa para a indústria. Por outro lado, a hialuronidase produzida em bactéria era obtida na forma insolúvel, precisando de uma etapa adicional de dobramento *in vitro*, tornando o processo dispendioso (DE-BONA et al., 2021; FERRER et al., 2013). Devido a isso, buscamos nesse trabalho a otimização da expressão em ambos os sistemas.

Portanto, se torna relevante otimizar a expressão da LiHyal2 e deixá-la apta para a indústria, ou seja, mostrar que a proteína é obtida ativa, solúvel, com alto rendimento e melhor custo-benefício, assim como, mostrar sua aplicabilidade.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Otimizar a expressão e purificação de LiHyal2 em sistema de expressão eucarioto (célula de inseto/baculovírus), caracterizar sua resposta biológica com a ênfase na análise da atividade alergênica, e realizar a clonagem do domínio catalítico da hialuronidase de *Loxosceles intermedia*.

1.2.2 Objetivos específicos

- ✓ Otimizar a expressão e purificação da LiHyal2 em células Sf9 (*Spodoptera frugiperda*) por meio de baculovírus;
- ✓ Confirmar a atividade enzimática da LiHyal2 através de métodos bioquímicos;
- ✓ Avaliar a atividade biológica de LiHyal2 *in vivo*;
- ✓ Avaliar a atividade alergênica de LiHyal2 *in vitro* e *in vivo*;
- ✓ Imunodectecção por anticorpos policlonais produzidos contra LiHyal2;
- ✓ Clonar o domínio catalítico da hialuronidase de *Loxosceles intermedia*;

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 LOXOSCELES

As aranhas pertencentes ao gênero *Loxosceles* são popularmente conhecidas como aranha marrom. Elas apresentam uma coloração entre o castanho claro ao marrom escuro, pernas longas e delgadas permitindo que se movimentem rapidamente. Na região do cefalotórax da aranha marrom há uma marca em forma de violino demarcado em escuro. Além disso, na parte frontal deste cefalotórax existem seis olhos de tamanhos iguais e que são distribuídos em pares formando um semicírculo (FIGURA 1) (SILVA et al., 2004)

FIGURA 1 - CARACTERÍSTICAS DO CEFALOTÓRAX DE LOXOSCELES.



FONTE: Adaptado de National Science Foundation (2014).

LEGENDA: A região do cefalotórax de *Loxosceles* é caracterizada por uma marca que lembra um violino (seta preta) e pelos 3 pares de olhos formando um semicírculo (seta amarela).

Acidentes envolvendo este aracnídeo ocorrem geralmente devido à fricção com o animal, pois elas não são agressivas (GERTSCH, 1967). Além disso, possuem hábitos noturnos e preferem lugares mais escuros, como embaixo de pedras, tijolos, folhagens, guarda-roupas, atrás de quadros e objetos. Então, devido a tais características a picada da aranha ocorre ao dormir, ao vestir roupas com ela dentro, ou ainda, ao pegar objetos ou encostar em lugares, desta forma pressionando-a (FUTRELL, 1992).

A picada da aranha marrom é indolor, logo o paciente toma ciência do loxoscelismo (quadro dos sintomas decorrentes da picada por *Loxosceles*) pela presença de dor somente 8 ou 12 horas após a picada (GOMES AGUIAR et al., 2021). Além disso, lesões cutâneas começam a se manifestar, o que pode levar a um quadro dermonecrotico (FUTRELL, 1992).

O loxoscelismo cutâneo é a reação mais típica da picada de *Loxosceles*, este é caracterizado pela dermonecrose. Ela é acompanhada de um espalhamento gravitacional e o desenvolvimento de inflamação. As lesões são caracterizadas por feridas necrosantes, de cor azul-violeta escura e endurecidas, levando à formação de tecido cicatricial, apresentando também eritema e edema ao redor da lesão ((SILVA et al., 2004; SWANSON; VETTER, 2006; VETTER, 2008).

Análises histológicas do loxoscelismo cutâneo em coelhos mostraram edema, espessamento do endotélio dos vasos sanguíneos, presença de células inflamatórias, vasodilatação, coagulação sanguínea e degradação das paredes dos vasos sanguíneos, hemorragia dérmica e subcutânea. A evolução da lesão é caracterizada primeiramente pelo aparecimento do edema 3 horas após a exposição ao veneno, com acúmulo de leucócitos polimorfonucleares ao redor de vênulas e eritrócitos extravasculares sugerindo perda da integridade vascular. As arteríolas mostraram apenas edema de células endoteliais. Em 6 horas há edema da epiderme e derme, infiltração acentuada de leucócitos polimorfonucleares nas paredes das vênulas, vasodilatação. O edema progride até 24 horas e depois diminui nos dois dias seguintes, enquanto a infiltração de leucócitos polimorfonucleares aumenta mais ainda em 48 horas (FUTRELL, 1992) .

Análises histológicas mais detalhadas da epiderme de coelhos que receberam injeções intradérmicas do veneno de *L. intermedia* mostram a evolução das alterações no tecido entre 4 h a 5 dias. Até 5 dias após o envenenamento, as alterações evoluem para uma infiltração volumosa de neutrófilos na derme que se estende até o tecido muscular subcutâneo, também é detectado destruição dos vasos sanguíneos, trombose, hemorragia, mionecrose e necrose coagulativa no 5º dia (OSPEDAL et al., 2002).

Em alguns casos mais graves, pacientes podem desenvolver o loxoscelismo cutâneo-visceral ou sistêmico, que ocorre com menor frequência e raramente é fatal. Os sintomas incluem febre, cefaleia, hemólise intravascular e como consequência, anemia e insuficiência renal. Sinais clínicos de hemólise intravascular, como anemia,

icterícia e hemoglobinúria, geralmente ocorrem dentro das primeiras 24 h após a picada. A lesão renal aguda e a coagulação intravascular disseminada podem ocorrer como complicações da hemólise intravascular, no entanto, acontecem com menor frequência, desencadeadas apenas quando há progressão de hemólise intensa (MALAQUE et al., 2016).

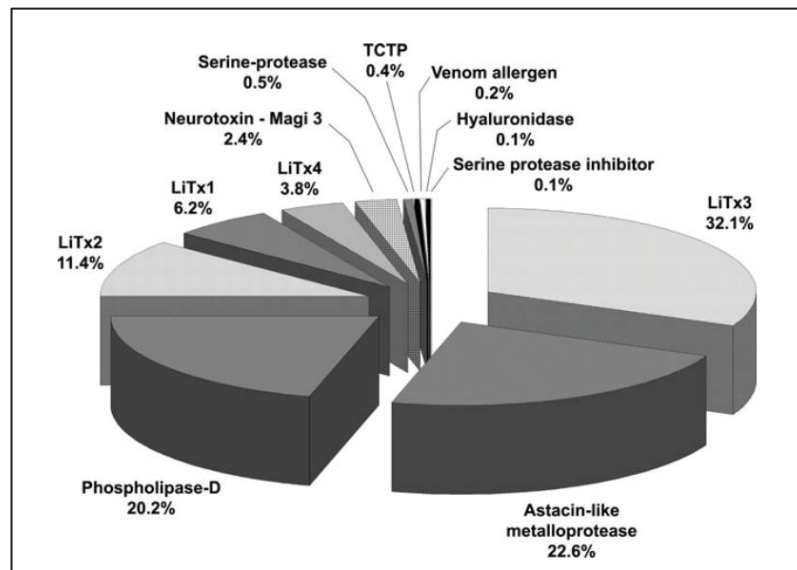
Tais sintomas são decorrentes da ação sinérgica das toxinas presentes no veneno da aranha marrom. Este veneno é caracterizado por uma mistura complexa de moléculas que juntas são citotóxicas e capazes de causar injúria celular, como remodelação e permeabilidade da membrana, podendo levar a morte celular (CHAVES-MOREIRA et al., 2017; NOWATZKI et al., 2010). Esta mistura de moléculas biologicamente ativas é caracterizada principalmente por proteínas, que podem apresentar ação tóxica ou/e enzimática (GREMSKI et al., 2014; VEIGA et al., 2001).

2.1.1 Proteínas do veneno loxoscélico

Diversas proteínas presentes no veneno loxoscélico já foram identificadas e caracterizadas. Através de análises do transcriptoma do veneno de *L. intermedia* foram identificadas sequências codificantes de vários grupos de toxinas, como: peptídeos ICK (*Inhibitor Cystine Knot*) (55,9%), proteases do tipo astacina (22,6%), fosfolipases-D (20,2%), serinoproteases (0,5%), proteína tumoral controlada tradicionalmente (0,4%), alérgenos (0,2%), inibidores de serinoproteases (0,1%) e hialuronidases (0,1%) (FIGURA 2) (GREMSKI et al., 2010).

Dentre as proteínas do veneno de *Loxosceles* mais conhecidas e bem caracterizadas estão as fosfolipases D. Essas proteínas possuem massa molecular aproximada entre 30 e 35 kDa e são responsáveis pela maior parte dos danos causados por picadas do gênero *Loxosceles*, o que pode ser devido à alta expressão dessa proteína no veneno (GREMSKI et al., 2021).

Outro grupo de proteínas que são abundantes no veneno loxoscélico é o de proteases do tipo astacina. Esse grupo é caracterizado por massa molecular entre 22 e 35 kDa e tem atividade proteolítica sobre fibronectina, fibrinogênio e gelatina. Tais atividades são inibidas apenas por quelantes metálicos divalentes, o que classifica este grupo como metaloproteases (FEITOSA et al., 1998; GREMSKI et al., 2021).

FIGURA 2 – TOXINAS PRESENTES NO VENENO DE *L. INTERMEDIA*.

FONTE: Adaptado de Gremski et al. (2010)

LEGENDA: Proporções relativas de cada grupo de toxinas presentes no veneno sobre o total transcritos que codificam toxinas.

Outra família que representa a maioria das sequências expressas em relação às toxinas do veneno de *Loxosceles* são peptídeos ICK. Estes peptídeos possuem massa molecular entre 3 e 10 kDa, contendo um alto número de resíduos de cisteína em sua estrutura. Estes peptídeos do veneno de *L. intermedia* podem afetar o sistema nervoso de insetos através da alteração de canais iônicos específicos (DE CASTRO et al., 2004; GREMSKI et al., 2021).

Há também proteases presentes no veneno de *Loxosceles* chamadas de serinoproteases. São moléculas grandes com massa entre 85 e 95 kDa e podem ser inibidas por inibidores de serinoproteases, outro grupo presente no veneno (FINGERMANN et al., 2020). Também chamadas de serpinas, sugere-se que estes inibidores de serinoproteases têm essa função para proteger as toxinas presentes no veneno loxoscélico (além das serinoproteases) de outras proteases quando expostas ao ambiente proteolítico externo (GREMSKI et al., 2021; SCHEMCZSEN-GRAEFF et al., 2021).

A proteína tumoral controlada traducionalmente, também chamada de TCTP, é conhecida por estimular a liberação de histamina, sendo associada a hipersensibilidade e reações alérgicas causadas pela picada da aranha marrom (BOIA-FERREIRA et al., 2019; GREMSKI et al., 2021). Similar a esta, também são

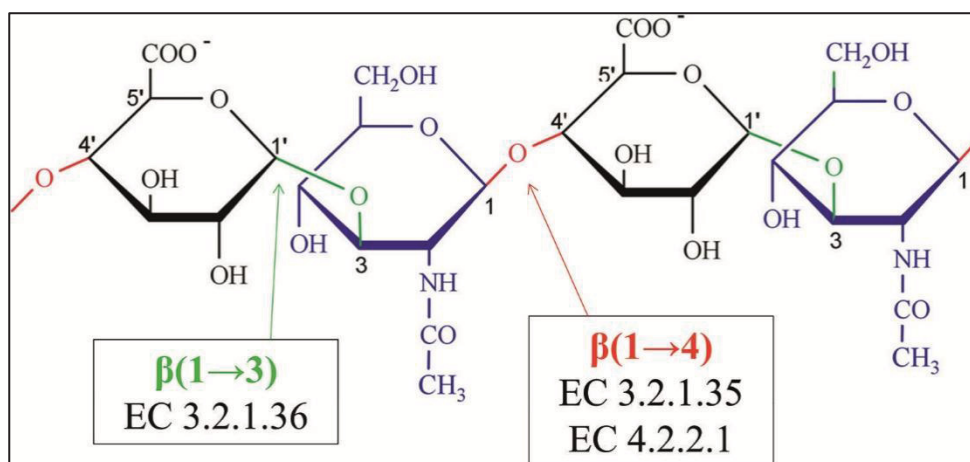
encontrados alérgenos na composição deste veneno. Estes alérgenos têm a capacidade de degranular mastócitos, liberando beta-hexosaminidase e desencadeando uma reação inflamatória (JUSTA et al., 2020).

Entre o grupo de proteínas pouco expressas estão as hialuronidases. São proteínas com massa molecular aproximada de 41 a 45 kDa e têm um papel importante no veneno juntamente com outras toxinas que degradam matriz extracelular. Elas são responsáveis pelo espalhamento gravitacional das lesões causadas pela picada de *Loxosceles* (CHAVES-MOREIRA et al., 2017).

2.2 HIALURONIDASES

As hialuronidases são proteínas que estão presentes em diversos organismos, desde bactérias a humanos. As razões pelas quais estas proteínas são expressas por cada organismo podem ser diferentes, mas é comum que elas atuem clivando polímeros de ácido hialurônico (SINDELAR et al., 2021). O ácido hialurônico é uma estrutura composta por dissacarídeos com unidades repetitivas de N-acetil- β -D-glicosamina e β -D-ácido glicurônico que alternam na cadeia através de ligações glicosídicas β 1-3 e β 1-4. Desta forma, as hialuronidases atuam clivando estas ligações glicosídicas (FIGURA 3) (FRASER; LAURENT; LAURENT, 1997a).

FIGURA 3 – CLIVAGEM DO ÁCIDO HIALURÔNICO POR HIALURONIDASES.



FONTE: Adaptado de Bordon et al. (2015).

LEGENDA: Estrutura do ácido hialurônico formada por unidades repetidas de β -D-ácido glicurônico (em preto) e N-acetil- β -D-glicosamina (em violeta), intercaladas por ligações glicosídicas β 1-3 (em verde) e β 1-4 (em vermelho). Os códigos estão relacionados a classificação das hialuronidases conforme a posição da ligação glicosídica onde clivam, gerando produtos com finais diferentes.

Por muito tempo as hialuronidasas estão sob investigação, sendo primeiramente descrita por Duran-Reynals (1929) que estudou o efeito biológico dela e foi quem analisou a propriedade descrita como fator de espalhamento. Em seguida, Karl Meyer (1937) as classificou em 3 grupos com base nas suas propriedades bioquímicas e produtos gerados (FIGURA 3) (MEYER; RAPPORT; YORK, 1952).

As hialuronidasas de mamíferos são classificadas como endo- β -N- acetil- D-hexosaminidasas (EC 3.2.1.35) que clivam as ligações glicosídicas β 1-4 em substratos de ácido hialurônico, condroitin e condroitin sulfato. Estão presentes em espermatozóides, lisossomos, veneno de serpente, abelha, répteis e aracnídeos. Enzimas deste grupo possuem atividade hidrolítica resultando principalmente em tetrassacarídeos e hexassacarídeos (CRAMER et al., 1994; MEYER, 1971; MEYER; RAPPORT; YORK, 1952).

O segundo grupo, também chamado de glucano hidrolase, são endo- β -D-glucuronidasas (EC 3.2.1.36) que clivam as ligações ácido glicurônico (β 1-3) do substrato ácido hialurônico, não apresenta atividade em relação aos outros glicosaminoglicanos. Podem ser encontradas em sanguessugas, crustáceos e parasitas. Assim como as endo- β -N- acetil- D-hexosaminidasas, também geram tetra e hexassacarídeos (DA SILVEIRA et al., 2007; MEYER; RAPPORT; YORK, 1952).

E por fim, o terceiro grupo de hialuronidasas estão presentes em microrganismos, elas clivam a ligação glicosídica β 1-4 (EC 4.2.2.) do substrato por β -eliminação resultando em oligossacarídeos insaturados. Essa enzima catalisa substratos de ácido hialurônico, condroitin e condroitin sulfato (MEYER, 1971; MEYER; RAPPORT; YORK, 1952).

As hialuronidasas também podem ser classificadas quanto ao pH de atividade ótima. Há hialuronidasas que apresentam melhor atividade em pH ácidos, entre 3 a 4, geralmente são encontradas em células hepáticas humanas. Também podem apresentar atividade ótima em pH mais neutro, entre 5 e 8 (BORDON et al., 2015; GIRISH; KEMPARAJU, 2007), estas são comumente hialuronidasas encontradas em veneno animais como, serpentes, aranhas, escorpiões e abelhas (ABDEL-MONSEF et al., 2020; BHAVYA et al., 2016; DA SILVEIRA et al., 2007; PESSINI et al., 2001; SUTTI et al., 2014).

Conforme foi sendo investigada sua função, a hialuronidase foi atrelada a muitos benefícios biológicos. Entre estes benefícios está a capacidade de aumentar a permeabilidade na camada dérmica, auxiliando na disseminação de soluções de

corantes injetadas por via intradérmica (CHAIN; DUTHIE, 1939; WRIGHT et al., 1973). Essa capacidade de espalhamento da hialuronidase em tecidos está relacionada à presença do ácido hialurônico na estrutura da matriz extracelular. Ao clivar estes polissacarídeos, ocorre uma desorganização da matriz, de forma que expande espaços no tecido permitindo o rápido o espalhamento de moléculas (GIRISH; KEMPARAJU, 2007).

2.2.1 A importância da hialuronidase e do ácido hialurônico da matriz extracelular nas respostas biológicas

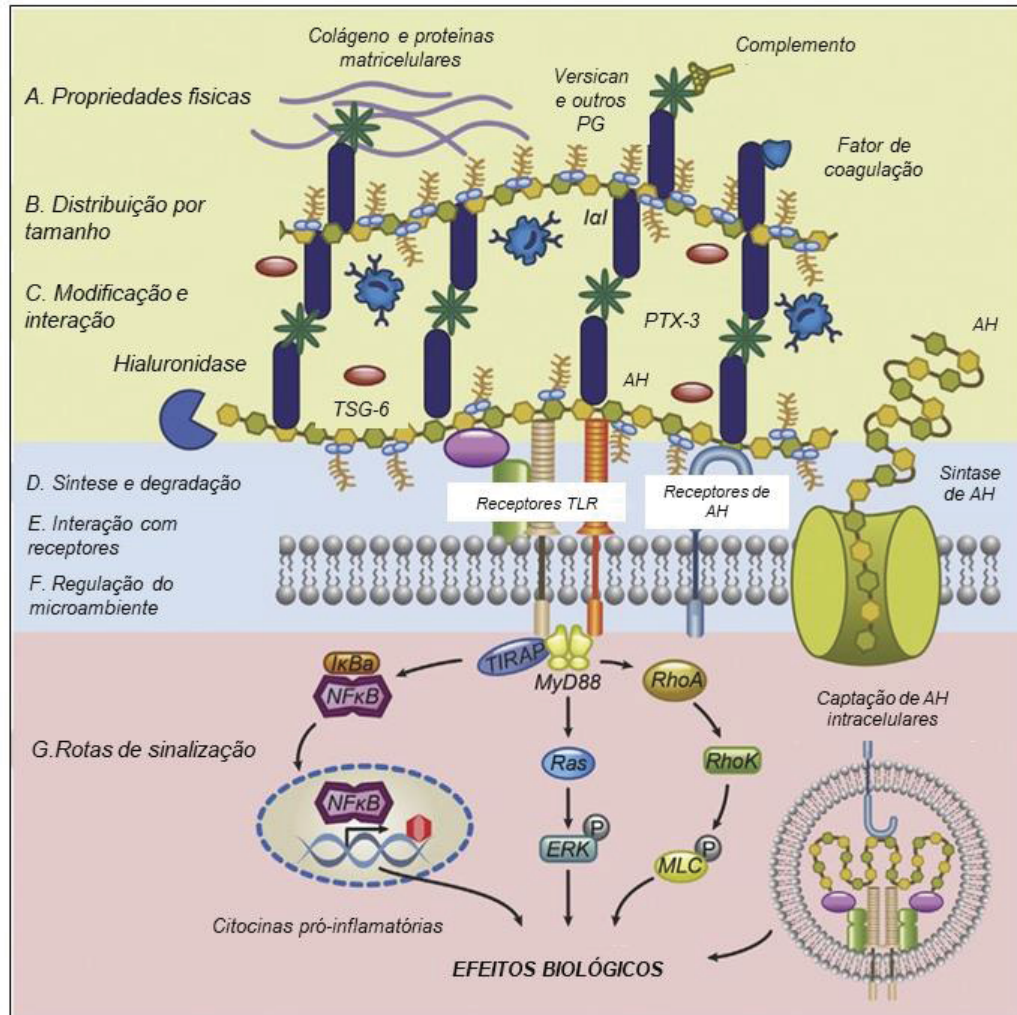
A hialuronidase e o ácido hialurônico desempenham papel importante na matriz extracelular e indiretamente no ambiente intracelular desencadeando efeitos biológicos (FIGURA 4). A matriz extracelular é uma rede composta por macromoléculas que estão organizadas de uma forma específica dependendo do tecido. Essa estrutura possui moléculas que se unem para formar um esqueleto estável, proporcionando habilidade mecânica, bem como dinamicidade sendo de vital importância para o crescimento celular, regulando os comportamentos e características mais fundamentais das células, como proliferação, adesão, migração, diferenciação e apoptose (ALBERTS et al., 2008; HUMPHREY; DUFRESNE; SCHWARTZ, 2014).

A matriz extracelular é composta por diversas proteínas em que, aproximadamente 300 compõem o matrissomo central. Entre os componentes estão: colágeno, proteoglicanos, elastina e glicoproteínas receptoras. Os proteoglicanos são formados por uma proteína central à qual associam-se cadeias laterais chamadas de glicosaminoglicanos (GAG). Os GAGs são polissacarídeos aniônicos lineares compostos por unidades dissacarídicas repetidas. Entre os GAGs estão: o ácido hialurônico, queratan sulfato, condroitin sulfato e heparan sulfato (YUE, 2014).

O ácido hialurônico é um componente abundante na matriz extracelular e que é essencial na remodelação de tecidos, inflamação e tumorigênese (MCATEE; TAKAGAKI, 2014; VEISEH; TURLEY, 2011). Na maioria dos tecidos ele é caracterizado como um polímero de alto peso molecular com comprimento molecular de 2 a 20 μm . Devido a isso ele tem um papel essencial na estrutura do tecido, assim como em processos de proliferação, adesão e motilidade celular. Nesses eventos

ocorre a transdução de sinal através de receptores de membrana para o ácido hialurônico, como o CD44 (MISRA et al., 2015).

FIGURA 4 –EFEITOS BIOLÓGICOS RELACIONADOS AO ÁCIDO HIALURÔNICO



FONTE: Adaptado de Garantziotis et al. (2019)

LEGENDA: A estrutura e função do ácido hialurônico podem gerar respostas na matriz extracelular e no ambiente intracelular através da membrana, dependendo de vários fatores. Estes fatores incluem: propriedades biofísicas, tamanho, modificações funcionais, macroestrutura, metabolismo, interação a receptores de membrana (como os receptores de ácido hialurônico – CD44) e sinalização intracelular. Essa interação complexa gera efeitos biológicos a nível celular, tecidual e de organismo. TSG-6 (gene 6 estimulado por TNF); Ial (inter- α -inibidores); PTX-3 (Pentraxina 3); PG (proteoglicanos); AH (ácido hialurônico); TIRAP (molécula adaptadora associada a receptores *toll-like* (TLR)); NF- κ B (fator nuclear Kappa B); MyD88 (proteína de diferenciação mielóide 88), Ras (derivado do inglês: *Rat Sarcoma virus*, transdutor do sinal extracelular), RhoA (proteína GTPase da família Rho); RhoK (rodopsina quinase); ERK (tipo de proteína serina/treonina quinase).

O processo de biossíntese e degradação do ácido hialurônico está relacionado à rápida remodelação da matriz. Quando o ácido hialurônico sofre

degradação pela hialuronidase (FIGURA 4), são gerados fragmentos que podem ser internalizados por via endossômica ou ainda podem se ligar ao receptor CD44 causando modificações que envolvem a reorganização do tecido e reações inflamatórias. Esses polímeros de ácido hialurônico são sintetizados na superfície celular através de sintases de ácido hialurônico (HAS). O processo de degradação e recapturação (FIGURA 4) desse glicosaminoglicano pode exigir hialuronidases secretadas para gerar oligômeros de baixo peso molecular (MCATEE; TAKAGAKI, 2014).

A degradação por hialuronidases e a deposição do ácido hialurônico atuam conjuntamente regulando respostas inflamatórias. Alguns genes de expressão relacionados ao metabolismo do ácido hialurônico são regulados por citocinas inflamatórias (FIGURA 4), aumentando o *turnover* deste carboidrato durante a resposta inflamatória (KOBAYASHI; CHANMEE; ITANO, 2020). Os ácidos hialurônicos de alto peso molecular, geralmente estão associados a sinais de integridade tecidual, por isso são considerados anti-inflamatórios enquanto os de baixo peso molecular estimulam a liberação de mediadores pro-inflamatórios (RUPPERT et al., 2014). Vistejnova et al. (2014) trataram fibroblastos de pele humana com ácido hialurônico de baixo peso molecular (4,3 kDa) para determinar as expressões gênicas de citocinas e quimiocinas e sua produção no meio de cultura. Foi detectada a indução da expressão gênica da citocina IL-6 e das quimiocinas IL-8, CXCL1, CXCL2, CXCL6 e CCL8 nos fibroblastos, que foram confirmadas por níveis aumentados de IL-6 e IL-8 em sobrenadantes da cultura celular (VISTEJNOVA et al., 2014).

Dependendo da concentração do ácido hialurônico e do peso molecular, este polissacarídeo determina também as funções fisiológicas das células, tecidos e órgãos, em funções de ligação à água, troca iônica, difusão dependente do tamanho da molécula e permeabilidade para grandes moléculas (GARANTZIOTIS; SAVANI, 2019).

2.2.2 Hialuronidases do veneno loxoscélico

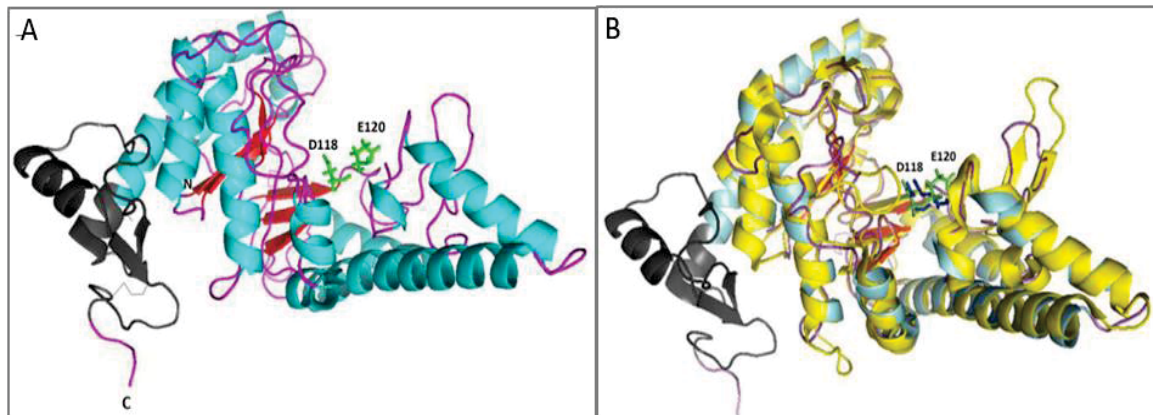
As hialuronidases presentes no veneno do gênero *Loxosceles* são estudadas por mais de uma década e algumas características sobre este grupo de proteínas já foram bem elucidadas. A primeira investigação sobre este grupo foi iniciada por Da

Silveira e colaboradores (2007), que realizaram um estudo sobre as hialuronidasas do veneno de *L. intermedia*. Eles realizaram zimogramas copolimerizados com os substratos ácido hialurônico e condroitin sulfato para analisar a atividade do veneno de *L. intermedia* sobre essas moléculas, sendo observada atividade sobre ambos os substratos por uma enzima com massa molecular aparente entre 41 a 43kDa. Também em reações colorimétricas foi observado que a enzima gerava resíduos de N-acetilglucosamina na extremidade redutora após a clivagem do substrato, sendo assim, os autores a identificaram como endo- β -N-acetil-D-hexosaminidase (DA SILVEIRA et al., 2007).

Mais tarde, Ferrer e colaboradores (2013) utilizando uma biblioteca de cDNA da glândula de veneno de *L. intermedia*, clonaram e expressaram uma isoforma da hialuronidase contendo 1200 pb chamada *Dietrich's Hyaluronidase*. Por meio de testes bioquímicos e biológicos, foi avaliada a degradação dos substratos ácido hialurônico e condroitin sulfato para comprovar a atividade da hialuronidase recombinante, a qual mostrou atividade sobre ambos os substratos. Também realizaram testes *in vivo* de dermonecrose em pele de coelhos. Como resultado a *Dietrich's Hyaluronidase* aumentou o efeito necrótico produzido pela fosfolipase-D recombinante (LiRecDT1), indicando que a hialuronidase de *Loxosceles* atua sinergicamente com outras toxinas como um fator de espalhamento (FERRER et al., 2013)

Outra isoforma de hialuronidase do veneno de *L. intermedia* foi produzida em células de inseto através do sistema de expressão BaculoDirect™. Essa hialuronidase foi denominada LiHyal2 (FIGURA 5-A). A sua capacidade de degradar ácido hialurônico e condroitin sulfato, bem como a atividade de fator de espalhamento foram confirmadas. LiHyal2 agiu sinergicamente com LiRecDT1 sobre a permeabilidade vascular em camundongos, potencializando o efeito da fosfolipase-D recombinante. Além disso, para avaliar o espalhamento gravitacional em pele de coelho, LiHyal2 foi injetada juntamente com LiRecDT1. Foi observado nas análises histopatológicas da pele do coelho acúmulo de células polimorfonucleares, desorganização das fibras de colágeno e presença de fibrina no tecido conjuntivo, eventos já conhecidos pela ação das fosfolipases. Estas características ficaram mais evidentes quando a dose de LiHyal2 foi aumentada de 2,5 μ g para 7,5 μ g (DE-BONA et al., 2021).

FIGURA 5 - A ESTRUTURA DA LIHYAL2 E SUA SEMELHANÇA COM HIALURONIDASE DE *APIS MELIFERA*



FONTE: Adaptado de De Bona et al. (2021).

LEGENDA: Em A, é ilustrado o modelo da estrutura tridimensional da LiHyal2: α -hélices em azul, fitas- β em vermelho, *loops* em rosa; domínio semelhante a EGF em preto. Os resíduos diretamente envolvidos na atividade catalítica são mostrados em verde. Em B, a sobreposição do modelo da LiHyal2 (α -hélices em azul, fitas- β em vermelho, *loops* em rosa; domínio semelhante a EGF em preto) com estrutura Apm2 (α -hélices, fitas- β e *loops* em amarelo). Os resíduos diretamente envolvidos na atividade catalítica da LiHyal2 são mostrados em verde e em azul os da Apm2.

A isoforma LiHyal2 teve seu modelo predito (FIGURA 5-A) e a estrutura apresentou treze α hélices e oito fitas β . A sequência codificante da enzima prevê uma proteína de 400 aminoácidos (FIGURA 6), podendo apresentar até 4 sítios de N-glicosilação e 12 cisteínas capazes de formar 6 pontes dissulfeto. Também possui um sinal de endereçamento para o retículo endoplasmático composto por 19 aminoácidos e uma massa molecular predita de aproximadamente 44007.34 Da com um pI de 8.57. LiHyal2 foi comparada a estruturas de *Apis mellifera* (Apm2) (FIGURA 5-B) e de humano (hHyal-1), através de técnicas de análise *in silico*, e apresentou similaridades com as hialuronidases de abelha e a humana, 47,4% e 47,9% respectivamente. A hialuronidase de abelha se apresentou bem similar a LiHyal2, com exceção do domínio EGF-*like* que a abelha não possui. No entanto, a hialuronidase humana possui o domínio EGF-*like*, que é pouco conservado entre elas, apesar de ambas as estruturas manterem as 6 cisteínas que compõem o domínio (DE-BONA et al., 2021).

FIGURA 6 – SEQUÊNCIAS AMINOACÍDICA E NUCLEOTÍDICA DA LIHYAL2.

1	ATGCAAAOCATCTTAGTITTTAACC	ACATTCTTGTCAGCATGGTCCCTT	GCCTGGGATTGGACGTCTTCTGG
1	M Q T I L V L T	T F L S A W S L	A V G F D V F W
73	AACGTGCOGTCTCAACAGTGCAG	AAGTATGGTATGAAGTTCGTCOOG	CTGCTOGAGCAGTATTCATTITG
25	N V P S Q Q C K	K Y G M K F V P	L L E Q Y S I L
145	GTGAACAAAGAGGATAATTTCAAG	GGAGACAAAATCAOGATATTTTAC	GAATCTCAGCTTGGACTGTATOCG
49	V N K E D N F K	G D K I T I F Y	E S Q L G L Y P
217	CATATTGGCGCCAATGAOGAATCA	TTCAAOGGTGGCATCOCTCAGCTC	GGAGATCTGAAGGCTCAGTTAGAG
73	H I G A N D E S	F N G G I P Q L	G D L K A H L E
289	AAATCAGCGGTGGATATTCGGAGG	GACATTCTGACAAGAGCGOCACG	GGCTTACGCATCATCGACTGGGAA
97	K S A V D I R R	D I P D K S A T	G L R I I D W E
361	GCATGGAGAOCTATTTGGGAATTC	AACTGGAGTTCCTTTGCGCAAATAC	CAGGATAAGATGAAGAAAGTGGTT
121	A W R P I W E F	N W S S L R K Y	Q D K M K K V V
433	CGCCAGTTCAATCOGACAGCACAT	GAAAGCACAGTGGGAAATTTGGCA	CATAATGAATGGGAAAACAGCTCC
145	R Q F N P T A H	E S T V A K L A	H N E W E N S S
505	AAATCGTGGATGTTGTCTAOCCTG	CAACTGGGCAAGCAGCTGCGAOCA	AATAGTGTCTGGTGTATTATCTC
169	K S W M L S T L	Q L G K Q L R P	N S V W C Y Y L
577	TTTCCCGATTGCTACAACATGAT	GGAAATTCGTCAAGAATTTCAA	TGTTCCGAAGCTATCGGGAAGGA
193	F P D C Y N Y D	G N S V Q E F Q	C S E A I G K G
649	AACGACAGGTTGAAGTGGCTTTGG	GAAGAGAGCACAGCTGTCTGCOCA	TCCATTTACATCAAAGAAGGGCAA
217	N D R L K W L W	E E S T A V C P	S I Y I K E G Q
721	TTGACCAACTACAOGTTACAGAAG	AGAATTTGGTTCACCAACGGCOGT	TTGCAAGAAGCTTTGCGGGTGGCT
241	L T N Y T L Q K	R I W F T N G R	L Q E A L R V A
793	CAACCGAAAGCTCGTATATATOCCT	TACATCAACTACAGCATCAAGOCCT	GGCATGATGGTTCCTGAGGTGGAA
265	Q P K A R I Y P	Y I N Y S I K P	G M M V P E V E
865	TTCTGGCGATTAATGGCCCAAAT	GCATCTCTTGGCATGGATGGTGTCT	GTTATATGGGGATOGTCCGCATCA
289	F W R L M A Q I	A S L G M D G A	V I W G S S A S
937	GTTGGGTCCAAAACCAATTGTGCA	CAGCTTATGAAGTACATAGCAGAC	GTCCTGGGOCAGCTACTCTCAGA
313	V G S K N H C A	Q L M K Y I A D	V L G P A T L R
1009	ATAAAGAGAAOGTCCCAAGGTGC	TCAAACAGGCGTGCAGTGGAOGT	GGAAGATGCACTTGGCCAAAAGAT
337	I K E N V A	R C S K Q A C S G R	G R C T W P K D
1081	ACATCOGTTCATAGCTTGGAAATTT	CTGGTGGAGAAGGAGGACTACGAT	TTCTACTTAGGAGATATTGAATGC
361	T S V I A W K F	L V E K E D Y D	F Y L G D I E C
1153	AAGTGTGTAGAAGGATAOGAAGGA	OGATACTGTGAGCAGAAAACAAAG	
385	K C V E G Y E G	R Y C E	Q K T K G K P I P N P L
	L G L D S T H H	H H H H	

FONTE: Adaptado de De Bona et al., (2021).

LEGENDA: Em vermelho os resíduos do peptídeo sinal predito. Em azul os resíduos de cisteínas que podem formar pontes dissulfeto. Em verde os possíveis sítios de N-glicosilação. Em destaque dentro do retângulo os resíduos de aminoácidos do domínio semelhante ao fator de crescimento epidérmico (EGF-like). Em laranja os resíduos da tag epitopo V5. Em rosa os resíduos da cauda de poli histidina (6xHisTag).

Devido ao efeito da hialuronidase sobre tecidos conjuntivos como fator de espalhamento, essa enzima passou a ser estudada e avaliada para diversas aplicações farmacológicas e biotecnológicas. Uma das aplicações que está sendo bem estudada é o uso desta enzima como coadjuvante para entrega de medicamentos de forma rápida e em grandes volumes. Um exemplo seria a aplicação de uma hialuronidase humana recombinante denominada rHuPH20 para entrega de drogas subcutâneas. O emprego desta enzima tem sido analisado para o transporte de medicamentos terapêuticos, através da degradação de componentes presentes na matriz extracelular de células endoteliais, atingindo vasos linfáticos e capilares facilitando a absorção do fármaco (ANGELOTTI et al., 2020; KNOWLES et al., 2021).

Outra aplicação destas enzimas é na área da estética e dermatologia. Elas estão sendo bastante estudadas para correção, tratamento (ORS, 2020) ou total eliminação de preenchimentos com ácido hialurônico (KWAK et al., 2021). As hialuronidases comercialmente disponíveis que são mais comuns incluem: *Vitrase*, hialuronidase testicular ovina; *Amphadase*, hialuronidase testicular bovina e *Hipenox*, hialuronidase recombinante humana. Apesar de serem amplamente utilizadas, reações alérgicas ainda são detectadas por hialuronidases que estão presentes no mercado. Em alguns casos ocorre a incidência de reações alérgicas no local de aplicação e alguns sintomas que incluem edema, eritema, dor e coceira. Sendo assim, hialuronidases recombinantes não alergênicas podem ser potenciais alvos para aplicações biotecnológicas (CAVALLINI et al., 2013)

Soldatova et al. (1998) descreveram as propriedades bioquímicas e imunológicas de uma hialuronidase recombinante de veneno de abelha produzida em sistemas de expressão procarióticos (*E. coli*) e eucarióticos (células de insetos infectadas por baculovírus). A hialuronidase recombinante produzida em células eucarióticas reagiu a 95% dos soros de pacientes alérgicos a veneno de abelha. Essa imunoreatividade da hialuronidase recombinante de abelha detectada, indica base para o desenvolvimento de insumos para testes de alergia (SOLDATOVA et al., 1998)

Alguns casos de acidentes envolvendo o gênero *Loxosceles* foram caracterizados com a presença de alergias após alguns dias. Sabe-se que há alérgenos no veneno de *Loxosceles*, no entanto, não está claro se a alergia também pode ser proveniente de toxinas como a hialuronidase (GREMSKI et al., 2010; JUSTA et al., 2020). Além disso, analisar a resposta biológica a LiHyal2 se torna importante, pois apresenta atividade enzimática relevante e que pode ser empregada em várias

áreas, principalmente, na farmacêutica. Portanto, avaliar a resposta biológica a LiHyal2 contribui para o esclarecimento e disponibilidade dessa proteína para aplicações terapêuticas (CHAVES-MOREIRA et al., 2019).

Mediante a isso se torna importante otimizar a expressão de proteínas recombinantes que podem ser empregadas no mercado farmacêutico, uma vez que indústrias realizam produção em escalas muito maiores e com alto rendimento. Os sistemas mais utilizados para expressão proteica são os bacterianos. Os sistemas bacterianos são simples e envolvem menor custo e tempo de produção para a clonagem e expressão de grandes quantidades de proteínas (BROWN, 2003).

Porém para proteínas como hialuronidases que apresentam padrões de glicosilação e várias pontes dissulfeto, a melhor opção atualmente é o sistema de expressão em eucarioto. Soldatova e colaboradores (1998) conseguiram obter 20 mg/L de hialuronidase recombinante expressando em células de inseto (HighFive™ Cells) infectadas por baculovírus. A expressão de proteínas recombinantes neste sistema proporciona um alto rendimento proteico e secreção de proteínas solúveis e biologicamente ativas (SOLDATOVA et al., 1998).

A rHuPH20 é uma hialuronidase humana recombinante produzida em células de mamífero da linhagem CHO (*chinese hamster ovary*). Através da otimização dos sistemas de clonagem e expressão, foi possível alcançar o alto rendimento da hialuronidase humana recombinante solúvel em células de mamífero (FROST, 2007a). Atualmente a proteína é empregada em co-formulações para terapias anticâncer (GAO et al., 2021; LOCKE; MANEVAL; LABARRE, 2019).

A hialuronidase do veneno de *L. intermedia* já foi obtida em sistema de expressão bacteriano. Os autores produziram uma hialuronidase que precisou ser submetida ao redobramento *in vitro* para se tornar ativa. Desta forma, utilizar sistemas de expressão bacterianos pode envolver mais uma etapa no processo de obtenção da proteína, além da limitação no dobramento correto da proteína (FERRER et al., 2013).

Park e colaboradores (2019) obtiveram uma hialuronidase recombinante (rbSPAM1^{C80-del}) ativa que apresentou atividade catalítica igual à hialuronidase bovina comercial. Neste trabalho, eles removeram cerca de 80 aminoácidos da região C-terminal da proteína e esta foi expressa na conformação correta e biologicamente ativa em células de mamífero (PARK et al., 2019). Tal estratégia pode facilitar a

expressão de proteínas relativamente grandes e com muitas pontes dissulfeto em sistemas de expressão bacterianos.

2.3 CARACTERÍSTICAS DO PROCESSO ALERGÊNICO E INFLAMATÓRIO

Alergia é uma reação causada pela hipersensibilidade do sistema imunológico a substâncias externas. Essas reações de hipersensibilidade são desencadeadas principalmente por células chamadas mastócitos. Estas células são encontradas em maior quantidade em órgãos que fazem o contato entre o meio externo e o interno, como a pele, sistema gastrointestinal e sistema respiratório (KRYSTEL-WHITTEMORE; DILEEPAN; WOOD, 2016).

A ativação de mastócitos mediada pelo receptor de alta afinidade para IgE ($Fc\epsilon RI$) é considerado como um evento chave na resposta a reações alérgicas. O alérgeno se liga a IgEs que já estão ligadas de forma cruzada nos receptores nos mastócitos, desencadeando reações bioquímicas complexas, incluindo o influxo de cálcio (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015). Para a liberação de mediadores, ocorre o aumento da concentração de cálcio no citoplasma. A saída deste íon do retículo endoplasmático estimula mais entrada de cálcio do meio extracelular para o intracelular e a ativação de proteínas que auxiliarão na síntese de componentes que serão liberados (ALBERTS et al., 2017).

Após o processo de sinalização, o mastócito libera alguns produtos biologicamente ativos, alguns já armazenados nos grânulos citoplasmáticos, como a histamina, mediadores derivados de lipídios, citocinas e fatores de crescimento recém-sintetizados. A histamina presente nos grânulos é a principal molécula mediadora presente nas reações alérgicas e na indução da permeabilidade vascular. Mediadores derivados de lipídios, prostaglandinas, e leucotrienos promovem a vasodilatação e o eritema. Os mastócitos quando ativos também liberam citocinas, quimiocinas, e fatores de crescimento que têm o potencial de recrutar outras células do sistema imune. O neutrófilo é um dos primeiros leucócitos a migrar para o local de infecção ou injúria tecidual, e são ativados por quimiocinas. Desta forma, os mastócitos também contribuem para inflamações (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

Além disso, os mediadores químicos atuam sobre a vasculatura do local, na maioria são vasodilatadoras, conseqüentemente aumentando as lacunas existentes nas junções intercelulares endoteliais, levando ao extravasamento de proteínas

plasmáticas. Essa passagem altera a pressão osmótica entre o meio extravascular e intravascular, o que leva a saída de água e eletrólitos do vaso, formando o edema (CLAESSON-WELSH; DEJANA; MCDONALD, 2021). O edema é um acúmulo de fluido sérico no espaço intersticial, e pode ser causado por diversos fatores e um deles também pode incluir o rompimento da matriz extracelular. O rompimento do tecido conjuntivo permite que os fluidos dentro do espaço interstício se espalhem para uma área maior. Isto pode se dar devido ao rompimento da matriz extracelular, pois aumenta-se a capacidade de dispersão e permeabilidade dos fluidos contidos no espaço intersticial, podendo gerar o edema (FROST, 2007; KOÇ; ER, 2018).

2.4 SISTEMA DE EXPRESSÃO BACULOVÍRUS/ CÉLULAS DE INSETO

No ambiente natural o baculovírus infecta insetos geralmente da ordem *Diptera* e *Hymenoptera* (OKANO et al., 2006). A estrutura deste vírus é fator determinante para sua capacidade de infecção. Ele é apresentado fenotipicamente de duas formas durante o ciclo de infecção, vírus extracelular (BV - *Budded virus*) e vírus oclusos (ODV- *Occlusion-devided virus*). O BV participa na infecção célula a célula, mas não é capaz de infectar o hospedeiro, enquanto o ODV é encapsulado por uma bicamada lipídica semelhante a membrana nuclear do hospedeiro. Desta forma, a primeira infecção ocorre através do ODV, que se funde a membrana celular do hospedeiro, liberando a partícula viral, que se direciona para o núcleo, onde insere seu DNA viral. Em seguida ocorre a replicação deste DNA e a formação dos nucleocapsídeos. Os nucleocapsídeos brotam da membrana plasmática sendo envelopados pela camada lipoproteica da célula, em forma de BV. O BV segue para a infecção da próxima célula (FUNK; BRAUNAGEL; ROHRMANN, 1997; SLACK; ARIF, 2006a).

Deste de 1980, já foi detectado o potencial desta interação natural como potencial para expressão de proteínas recombinantes (SMITH; SUMMERS; FRASER, 1983). A espécie de baculovírus mais utilizada para essa aplicação é a *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV), com o uso de células Sf9 (*Spodoptera frugiperda*) como hospedeiro (CONTRERAS-GÓMEZ et al., 2014). Essas células Sf9 precisam de muitos componentes para seu crescimento como, carboidratos, lipídios, aminoácidos, fatores de crescimento, hormônios e vitaminas. São células que crescem em adesão, formando uma monocamada, no entanto

também podem ser adaptadas para o crescimento em suspensão, sendo facilmente escalonável (IRONS et al., 2018)

Este sistema de expressão de baculovirus/células de insetos é bastante eficaz em produzir alto rendimento proteico, possui um ambiente eucariótico necessário para o enovelamento correto de proteínas realizando modificações pós-traducionais e pontes dissulfeto (VAN OERS; PIJLMAN; VLAK, 2015). No entanto, algumas desvantagens também podem ser observadas neste sistema devido a sua natureza, que é lítica. E uma delas é a proteólise que pode afetar tanto a qualidade quanto a quantidade do produto devido a proteases da célula que podem ser expressas e liberadas em cada intervalo de tempo entre 72 e 96 h durante a expressão da proteína recombinante. O problema da proteólise pode ser ainda mais acentuado em cultura celular isenta de soro, onde a proteção conferida por proteínas séricas como albumina e macroglobulina é ausente (IKONOMOU; SCHNEIDER; AGATHOS, 2003).

Durante a expressão proteica, algumas alterações citopatológicas evoluem e poder ser visíveis via microscópio. Nas primeiras 6 horas após início da infecção, as células já apresentam alterações morfológicas, como a expansão do núcleo, arredondamento celular e mudanças no citoesqueleto. Entre 6 a 12 horas, observa-se uma estrutura eletro-densa, granular, de formato irregular no núcleo, chamada de estroma virogênico. Ao mesmo tempo se inicia a produção de proteínas para a montagem viral (p10 e poliedrina), à medida que a infecção progride é possível detectar a presença de poliedros no núcleo celular (WILLIAMS; FAULKNER, 1997). Na infecção tardia, ou seja, após 48 horas à infecção, a proteína p10 interage com o citoesqueleto celular, promovendo a *l*ise celular e extravasamento do conteúdo interno da célula e dos poliedros (SLACK; ARIF, 2006a).

3 MATERIAL E MÉTODOS

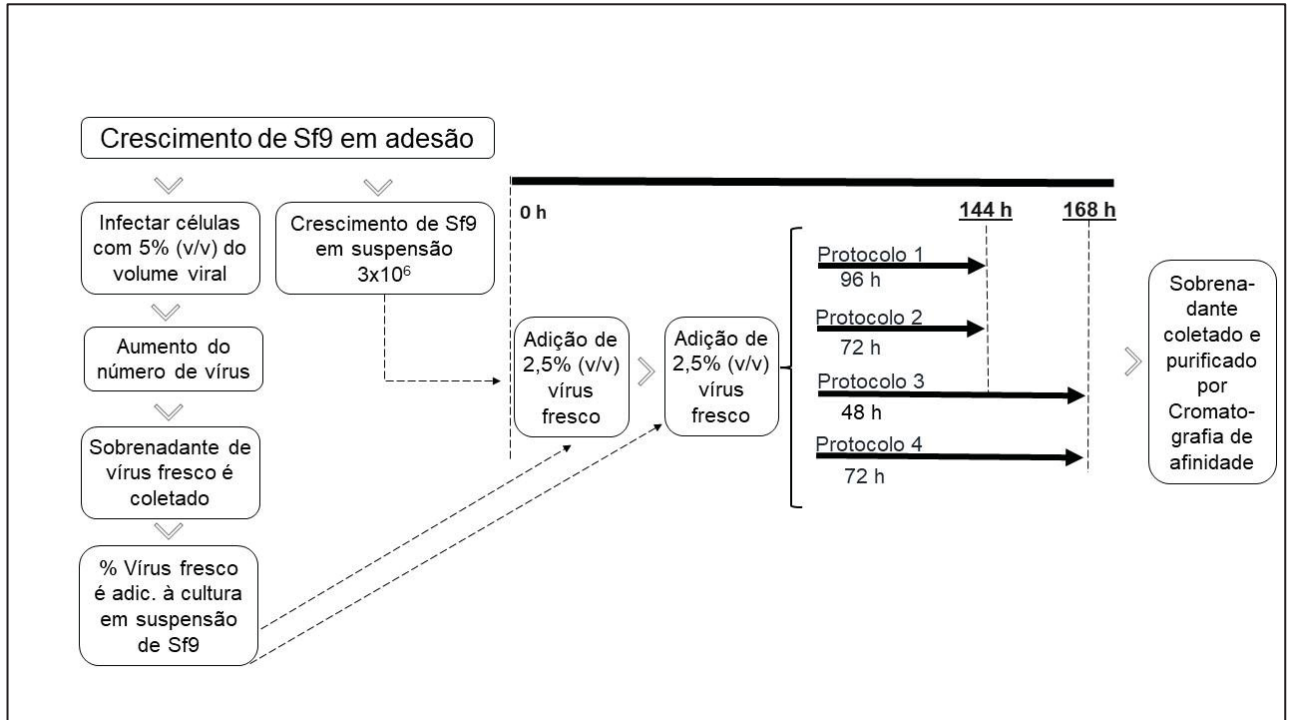
3.1 OTIMIZAÇÃO DA EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA LIHYAL2

3.1.1 Produção de estoque viral recombinante fresco

Neste trabalho, foi utilizada uma solução de estoque de Baculovírus recombinante da espécie *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV). Este baculovírus recombinante contendo a sequência para expressão da hialuronidase completa de *Loxosceles intermedia* já foi obtido em trabalhos anteriores (DE-BONA et al., 2021). Células Sf9 (*Spodoptera frugiperda*) (Invitrogen, Waltham, EUA) foram utilizadas como hospedeiro do vírus e para expressar a proteína recombinante. A construção foi planejada para permitir a expressão da sequência completa da hialuronidase recombinante de *L. intermedia* contendo os tags “epítipo V5” e “cauda 6xHis” na porção C-terminal da proteína, estes para fins de identificação e purificação. Esta proteína recombinante é denominada LiHyal2.

O P3 é a titulação viral com cerca de 2×10^{10} cópias virais/ml, quantificados por qPCR. Esse P3 foi utilizado para a produção do estoque viral fresco. Para a produção do estoque, foram utilizadas células de inseto Sf9 cultivadas em adesão em garrafas de 75 cm², com 10 mL de meio Sf-900™II SFM (Gibco®), sem SFB, em uma confluência celular de 80% e viabilidade mínima de 95%. Estas culturas celulares em adesão receberam 5% (v/v) do sobrenadante do P3. As células foram mantidas em incubadora a 27 °C por 144 h, o sobrenadante com vírus fresco foi coletado, centrifugado a 5.000/rpm por 5 min e armazenado a 4 °C protegido da luz (FIGURA 7).

FIGURA 7 – DIAGRAMA DO PROCESSO DE EXPRESSÃO DA LIHYAL2



FONTE: A autora.

LEGENDA: O diagrama mostra o processo de expressão da LiHyal2. O crescimento das células Sf9 em adesão é feito para duas utilidades: para a amplificação das partículas virais por meio da Sf9; e para a amplificação de células Sf9 ($3-5 \times 10^5$ cel./ mL) para transferência para o cultivo em suspensão posteriormente. Após a amplificação, o sobrenadante com vírus fresco é coletado e adicionado (2,5% v/v) à cultura em suspensão com células Sf9 (densidade 3×10^6 cel./mL). Então inicia-se a expressão da LiHyal2 (0h). Durante a expressão é adicionado mais 2,5% (v/v) do sobrenadante com vírus fresco. A partir dessa segunda adição de vírus, foram estabelecidos 4 protocolos que variam no tempo da adição do vírus (48, 72 e 96h) durante a expressão e o tempo total da expressão (144h e 168h). Os sobrenadantes de todas as expressões foram submetidos a purificação por cromatografia de afinidade.

3.1.2 Expressão da hialuronidase recombinante em células Sf9

As células de inseto Sf9 foram mantidas em garrafas de 75 cm² (KASVI) com 10 mL de meio Sf-900™II SFM, sem SFB e viabilidade mínima de 95%. Ao atingir a confluência aproximada de 100% foi feito o subcultivo para outras garrafas com objetivo de amplificar o crescimento celular. A densidade e a viabilidade celular foram realizadas através do teste de exclusão com azul de tripan, com auxílio de uma câmara de Neubauer. Foi iniciado o cultivo celular em suspensão em Erlenmeyer, com uma densidade celular entre 3×10^5 - 5×10^5 cél/ml e com 95% de viabilidade celular. Foram adicionados antibióticos na cultura em suspensão, anfotericina-B 0.25 µg/mL e estreptomicina 100 µg/mL (Gibco®), a qual foi mantida sob agitação (105 - 110 rpm)

em incubadora do tipo *shaker*, a 27°C. Ao atingir 3×10^6 cél/mL foi adicionado à cultura celular o sobrenadante com vírus fresco (FIGURA 7).

Para esta etapa, foi utilizado o método descrito por Schemczssen-Graeff et al. (2021), de forma adaptada. Foram testados alguns protocolos (FIGURA 7). Ao atingir 3×10^6 cél/ml (0 h) foi adicionado à cultura celular 2,5% (v/v) do estoque viral fresco. 96 h após a infecção, foi adicionado mais 2,5 % (v/v) do estoque viral à cultura celular em expressão da proteína alvo. Cento e quarenta e quatro horas após a primeira infecção com o vírus, a expressão em células Sf9 foi concluída. No segundo protocolo, em 0 h foi adicionado 2,5% da titulação viral, 72 h após a infecção foi adicionado mais 2,5% da titulação viral e mais 1% de meio para a manutenção celular. Cento e quarenta e quatro horas após a primeira infecção, a expressão foi finalizada. No terceiro e quarto protocolo o tempo de expressão foi aumentado para 168 h, e adição do vírus foi feita com 2,5% da titulação viral em 0 h, e mais 2,5 % em 48h ou 72h após a primeira adição. Em todos os protocolos, a viabilidade celular foi conferida no fim das expressões, e a suspensão celular (contendo a expressão proteica) foi levada à centrifuga refrigerada a 4°C por 10 minutos a 8000xg. Os sobrenadantes foram coletados e o pellet descartado.

3.1.3 Purificação da LiHyal2 expressa em células Sf9

Para a purificação da LiHyal2, os sobrenadantes das expressões foram filtrados em filtros à vácuo 500 ml (membrana 0,22 μ m – KASVI). Em seguida submetidos à cromatografia de afinidade em Níquel-agarose uma coluna Histrap™ Excel de 1mL, com auxílio do sistema automatizado de purificação AKTA PURE (GE Healthcare Life Sciences Marlborough, EUA).

Para purificação foram utilizados dois tampões: tampão A (20 mM de NaH_2PO_4 e 500 mM de NaCl – pH 7.4) para equilibrar a coluna e tampão B (20 mM de NaH_2PO_4 , 500 mM de NaCl e 500 mM de imidazol – pH 7.4) para eluir a amostra.

A aplicação da amostra no sistema de purificação AKTA ocorreu a um fluxo contínuo de 0,5 mL/min. Após esta etapa, a coluna foi lavada com tampão A para eliminar possíveis contaminantes. A eluição foi feita utilizando gradiente linear de 0 a 100% de tampão B em frações de 1 ml a um fluxo de 0,5 mL/min. Após a purificação, as frações eluídas foram coletadas e dialisadas em Amicon® (tamanho do poro 10 kDa MWCO) com PBS 1X em centrifuga refrigerada a 7000xg.

O perfil eletroforético e análise sobre o grau de pureza das amostras purificadas pela cromatografia de afinidade foram avaliadas a partir da corrida em gel de poliacrilamida 12,5% (SDS-PAGE) sob condições redutoras.

3.2 DOSAGEM E DETECÇÃO DA LIHYAL2

3.2.1 Dosagem de proteínas pelo método de Bradford

A dosagem de proteínas foi realizada pelo método de Azul de Coomassie, descrito por Bradford (1976), adaptado para leitura em leitor de placas de 96 wells (Meridian ELX 800). A curva padrão foi feita com diferentes quantidades (0,25 µg – 2,00 µg) de Albumina Sérica Bovina. O reativo para dosagem de proteínas *Dye Reagent Concentrate* (BioRad Laboratories) foi adicionado em cada poço. Após 5 minutos de incubação das amostras com o corante, a absorbância foi determinada em 595 nm. Os pontos da curva e as amostras foram lidos em duplicatas.

3.2.2 Produção de anticorpos em camundongos com a proteína recombinante

A produção de soros hiper imunes de camundongos injetados com a hialuronidase recombinante foi de acordo com o método de Harlow e Lane (1988). Dois camundongos da linhagem *Swiss* foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal do Paraná. Primeiro foi feita a coleta do soro pré-imune, para isso foi retirado sangue dos dois camundongos, pela veia auricular. Em seguida, o sangue foi centrifugado com objetivo de separar o soro, o qual foi coletado e armazenado a -20°C. Em seguida, foram administrados nos camundongos via intraperitoneal 10 µg da proteína recombinante com adjuvante hidróxido de alumínio (Sigma Aldrich). Após 20 dias foram aplicados mais 20 µg com o adjuvante, e depois de mais 20 dias, 30 µg juntamente com o adjuvante. Após 15 dias da terceira imunização, os camundongos foram eutanasiados e o sangue dos animais foi coletado e mantido por 2h na B.O.D a 37° C. Em seguida, a amostra foi centrifugada por 20 minutos e o soro hiper imune foi coletado e guardado a - 20°C.

Os soros hiper imunes que reconhecem as toxinas presentes no veneno de *L. intermedia* foram fornecidos pela doutoranda Nyanne Polli. A produção destes soros ocorre em coelhos neozelandeses adultos adquiridos Fazenda Experimental Canguiri

da Universidade Federal do Paraná e mantidos no Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos (CPPI). Após coletado o soro pré-imune, cada coelho é imunizado por via intramuscular com 15 µg do veneno total de *L. intermedia* emulsificado com adjuvante completo de Freund (Sigma-Aldrich). Outras imunizações são administradas com 30, 40 e 100 µg de veneno total emulsificado em adjuvante incompleto de Freund (Sigma-Aldrich) a cada 20 dias. Após 21 dias da última imunização, os soros são coletados e armazenados conforme descrito anteriormente.

3.2.3 Ensaio de imunodeteção

As análises de imunodeteção foram realizadas utilizando o método *Western Blotting*. Para tal, a proteína purificada foi submetida à separação por eletroforeses em gel de poliacrilamida 12,5% com SDS (dodecil sulfato de sódio) em condições redutoras, diluídas em tampão *Laemmli* (4% SDS, 20% glicerol, 10% 2-mercaptoetanol, 0.004% azul de bromofenol e 0.125 M Tris HCl), e foram transferidas para membranas de nitrocelulose por 15 minutos à voltagem constante de 15 V. Em seguida as membranas foram bloqueadas por 1 h com leite desnatado em pó (Molico) (3% p/v) diluído em PBS e incubadas por 2 h à temperatura ambiente sob agitação constante com anticorpos primários.

Os anticorpos primários utilizados incluem: o anticorpo comercial anti-6xHisTag (1:2000) (Invitrogen, California, USA), anticorpos policlonais que reconhecem toxinas do veneno loxoscélico (1:1000) e anticorpos policlonais que reconhecem LiHyal2 (1:3000). Além da LiHyal2, os venenos brutos (10 µg) de *L. intermedia*, *L. gaucho*, *L. laeta* foram submetidos à imunodeteção por anticorpos policlonais que reconhecem LiHyal2 (1:3000). Como controle positivo, a proteína LiRecDT1 foi utilizada para o reconhecimento por anticorpos anti-6xHisTag e anti-veneno.

As membranas foram lavadas com o tampão (PBS 1x + 3% leite) e incubadas com anticorpos secundários anti-IgG de camundongo ou coelho conjugados com fosfatase alcalina (Sigma, Missouri) por 1 h à temperatura ambiente. Após lavagens, a reação foi revelada com o substrato BCIP e o cromógeno NBT (Promega, Wisconsin, USA) em tampão ótimo para atividade de fosfatase alcalina.

3.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DA LIHYAL2

3.3.1 Ensaio de degradação

A proteína purificada foi submetida ao zimograma em SDS-PAGE 12,5% copolimerizado com 0,17 mg/mL de ácido hialurônico (AH). As amostras em estudo, diluídas em tampão *Laemmli* (4% SDS, 20% glicerol, 0.004% azul de bromofenol e 0.125 M Tris HCl), em condições não redutoras, foram submetidas à eletroforese (25 mA) a 4°C. Após a migração eletroforética, os géis foram lavados 3 vezes em Triton X-100 (Reagen) 2,5% por 30 minutos cada e em seguida incubados a 37°C em tampão ótimo (150 mM NaCl, 50 mM Tris, 0,5 mM CaCl₂ - pH 7,4) para a atividade enzimática durante 16 h. O gel, por fim, foi corado com Azul de Alcian 0,5% em solução de ácido acético 3% e descorado em solução de ácido acético 10%.

A hialuronidase recombinante também foi submetida a turbidimetria, um ensaio quantitativo para a degradação do AH. Em uma placa de 96 poços o ácido hialurônico (10µg, 7,5µg, 5µg e 2,5µg) foi incubado em tampão acetato (0,2M de acetato de sódio – ácido acético e 0,15M NaCl – pH 6) para estabelecer uma curva que indicava a porcentagem do AH degradado (100% a 0%, sendo 0% apenas o tampão acetato). Massas de LiHyal2 (10µg – 0,625µg,) foram incubadas em tampão acetato com 10µg de AH por 1h a 37°C. Após isso, 200µL de CTAB (2,5% p/v de brometo de cetiltrimetilamônio dissolvido em 2% p/v de NaOH) foi adicionado em cada poço para produção da turbidez causada pelo AH não clivado. Em seguida, foi realizada a leitura em 450nm em leitor de placas de 96 wells (Meridian ELX 800). Os ensaios foram feitos em duplicata. Os resultados plotados foram calculados sobre as porcentagens de AH degradados utilizando o programa GraphPad Prism 8.

3.3.2 Animais

Fêmeas de camundongos suíços adultos (25-30 g) e coelhos adultos neozelandeses (~ 3 kg) foram utilizados para os experimentos *in vivo*. Os camundongos foram retirados do Biotério da Universidade Federal do Paraná e os coelhos foram adquiridos na Fazenda Experimental de Canguiri da Universidade Federal do Paraná e mantidos no Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos

(CPPI). Todos os procedimentos envolvendo animais foram realizados em conformidade com as Diretrizes do Comitê de Ética no uso de animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, que aprovou a metodologia do projeto em relação aos ensaios envolvendo animais (Números dos certificados: 1395 e 1442).

3.3.3 Ensaio de permeabilidade vascular em camundongo

Para avaliação da atividade biológica da LiHyal2 com relação ao extravasamento de líquido intersticial, foi feito o ensaio de permeabilidade vascular em camundongo. Alguns animais foram previamente tratados com o inibidor de degranulação de mastócito (cromoglicato dissódico) por 3 dias antes da aplicação da LiHyal2. O cromoglicato dissódico (30 mg/kg em 100 µL) foi injetado via intraperitoneal em um grupo de animais todos os dias durante três dias. Em outro grupo foi injetado apenas PBS (100 µL) por três dias também antes da aplicação da proteína recombinante. Para a verificação do extravasamento de líquido plasmático, os animais receberam o corante azul de Evans (30 mg/kg em 200µl) na veia caudal diluído em PBS. Em seguida foram aplicadas pela via intradérmica na região dorso-lateral dos animais (n=5 para cada grupo): a proteína recombinante LiHyal2 (20 µg), a Serpina (20 µg) (proteína recombinante do veneno de *L. intermedia* LSPILT) como controle de expressão, fosfolipase-D (2,5 µg) (proteína recombinante do veneno de *L. intermedia* que causa aumento da permeabilidade vascular -LiRecDT1) e PBS. LiHyal2 (20 µg) foi aplicada em animais (n=5) previamente tratados com o cromoglicato dissódico e com PBS. Depois de 1 hora esses animais foram eutanasiados, e o folheto interno da pele exposto, observado e fotografado.

3.3.4 Edema de pata em camundongo

A fim de verificar se a LiHyal2 tem a capacidade de causar edema, foi realizado o ensaio de edema em pata de camundongo. Foram utilizados 5 camundongos para cada grupo: LiHyal2 (10 µg e 20 µg), LiRecDT1 (fosfolipase-D recombinante do veneno de *L. intermedia* que causa edema) (20 µg) e PBS. Foram aplicados na região da pata (intraplantar) um volume de 30 µl de cada grupo. A

espessura das patas foi medida com um paquímetro digital (Digimess, São Paulo) em tempos de 0, 10, 20, 30, 60, 120, 240, 360, 720 e 1440 minutos.

3.3.5 Análise histológica da pele de coelho

Um coelho neozelandês foi anestesiado e eutanasiado após 4 horas da aplicação subcutânea de LiHyal2 (10µg e 20µg), alérgeno (20µg) (proteína recombinante alergênica – LALLT) e PBS. As peles foram fixadas com ALFAC (etanol 85%, formaldeído 10% e ácido acético glacial 5%) por 16 h a temperatura ambiente. Posteriormente foram submetidas a uma série de desidratações com álcool etílico e emblocadas em parafina. As secções foram feitas em micrótomo, colocadas em lâminas de microscopia e coradas com Hematoxilina e Eosina (CHAIM et al., 2006). As imagens foram analisadas e obtidas em Microscópio binocular Olympus BX41 (Olympus, Tóquio, Japão).

3.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ALERGÊNICA DA LIHYAL2

3.4.1 Visualização de mastócitos em mesentério de ratos

Para avaliar se a LiHyal2 tem capacidade de degranular mastócitos, foram usados porções de mesentério 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 parafina.

Os grupos para este ensaio incluem: a LiHyal2 (10 e 20 µg), a Serpina (proteína recombinante do veneno de *L. intermedia* LSPILT), PBS como controle negativo, e o alérgeno (proteína recombinante alergênica – LALLT) como controle positivo. Cada solução teste foi aplicada na superfície do mesentério em uma região diferente do mesentério. Após 30 minutos, o mesentério foi lavado com soro fisiológico e em seguida fixado com ALFAC (etanol 85%, formaldeído 10% e ácido acético glacial 5%) *overnight*. Parte dos tecidos foi excisada, estendida em lâminas e colocada para secar. Vinte e quatro horas depois, essas lâminas foram coradas com azul de toluidina (0,1% de azul de toluidina em uma solução tampão – ácido acético glacial 0,6% v/v e acetato de sódio 0,82% p/v) por 5 minutos, lavadas rapidamente em etanol 95% e deixadas para secar por 30 minutos. Após montagem das lâminas, as amostras foram observadas em Microscópio binocular Olympus BX41 (Olympus, Tóquio, Japão).

3.4.2 Cultivo celular

As células da linhagem RBL-2H3 (células basófilas de ratos leucêmicos) (linhagem cedida pela professora Maria Célia Jamur - USP) foram cultivadas em meio Dulbecco's Minimum Essential Medium (DMEM, Gibco) contendo antibiótico penicilina e estreptomicina (10000U/mL e 10000 µg/mL) e suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (GIBCO, Invitrogen). A cultura foi mantida em uma incubadora com atmosfera de 5% de CO₂ e temperatura de 37°C.

3.4.3 Ensaio de viabilidade celular

Para o ensaio de viabilidade por MTT foram plaqueadas 5×10^4 células da linhagem RBL-2H3 em placas de 96 poços em meio DMEM sem SFB. Após 16 horas, as células foram lavadas com tampão Tyrode's (TGB) (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1mM MgCl₂, 1.8 mM CaCl₂, 0.2 mM Na₂HPO₄, 5.5 mM Glucose, 10 mM HEPES, e 0.1% BSA) e, então, tratadas com LiHyal2 (50 e 100 µg/mL), o composto 48/80 (controle positivo) (100 µg/ml) e PBS por 2 horas. Após o tratamento o meio foi aspirado e foram adicionados às células 100 µL de uma solução 0,5 mg/mL (50 µg) de MTT (Sigma, St. Louis, USA) em meio DMEM. As células foram incubadas em estufa com 5% de CO₂ a 37°C durante 3 horas. O meio contendo MTT foi cuidadosamente retirado e 100 µl de DMSO (Sigma Aldrich) foram adicionados em cada poço. A reação foi medida em espectrofotômetro em 550 nm (Meridian ELX 800).

3.4.4 Ensaio de influxo de cálcio

Células RBL-2H3 foram soltas com tripsina (1x) /EDTA/PBS e lavadas com PBS. Em seguida foram lavadas duas vezes com TGB. Para internalização da sonda fluorescente as células foram incubadas por 30 min com fluo-4AM (5 mM) em tampão contendo ácido plurônico (0,01%) a 37°C. As células foram então lavadas 2 vezes com TGB e incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente para desesterificação. Após isso, foram lavadas novamente e ressuspendidas em TGB. 5×10^5 células/ poço foram incubadas em placas pretas de 96 poços com PBS (controle negativo), LiHyal2 (50 e 100 µg/mL), LiHyal2 (100 µg/mL) combinada ao Cromoglicato de Sódio (20 µM) por 5, 15, 30 e 60 min. Como controle, estas células também foram incubadas

somente com TGB. A fluorescência resultante foi quantificada em espectrofluorímetro Tecan Infinite M200 (Tecan, Männedorf, Suíça) usando um comprimento de onda de 485 nm para a excitação e 535 nm para a emissão.

3.5 CLONAGEM DO DOMÍNIO CATALÍTICO DA HIALURONIDASE DE *L. INTERMEDIA*

3.5.1 Desenho dos primers, amplificação da sequência do domínio catalítico da hialuronidase de *L. intermedia* e ligação no vetor pGEM-T

O *primer forward* (5' TAGCATATGTTTCGACGTGTTCTGG 3') foi desenhado para obtenção do fragmento codificante do domínio catalítico da hialuronidase de *L. intermedia* sem a sequência codificante para o peptídeo sinal de endereçamento para o retículo endoplasmático, que corresponde a 19 aminoácidos. O *primer reverse* (5' TATAGCTCGAGTGCGACGTTCTC 3') foi desenhado para a obtenção do fragmento codificante do domínio catalítico sem o domínio EGF-like, que corresponde aos 54 resíduos de aminoácidos finais da sequência codificante. Aos *primers* foram adicionados sítios de restrição para as enzimas *NdeI* e *XhoI*.

A sequência codificante completa da hialuronidase do veneno de *L. intermedia* clonada em pGEM-T (construção da isoforma *Dietrich's hyaluronidase*) 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 para a PCR incluem: Taq polimerase (1,25 U/ μ L), mistura de PCR (10X), *primers forward* e *reverse* (0,4 μ M) e a construção da hialuronidase em pGEM-T. A mistura foi levada para o termociclador (My Cycler – Thermal Cycler BioRad) que foi programado para realizar ciclos: 95°C/2 minutos (1x); 95°C/30 segundos, 62°C/30 segundos, 72°C/2 minutos (35x); 72°C/10 minutos (1x); 4°C/ ∞ .

Em seguida, os produtos de PCR amplificados foram submetidos a uma corrida eletroforética em de gel de agarose 1,5% com brometo de etídio (0,5 μ g/ml). O gel foi inserido em tampão TAE (Tris base 40 mM/ acetato 20 mM/ EDTA 1 mM) em uma cuba horizontal a 5 V/cm. O gel foi analisado com o auxílio do aparelho de análise de imagens *Chemidoc – XRS* e software *Quantity One – SW* (BioRad).

Por seguinte, foi feita uma reação utilizando uma polimerase com menor taxa de erro ao adicionar nucleotídeos na amplificação, a enzima *Pfu* DNA polimerase.

Para esta reação foram utilizados os seguintes reagentes: *Pfu* DNA polimerase (2,5 U/ μ L), tampão para *Pfu* DNA polimerase com MgCl₂ (1x), *primers forward* e *reverse* (0,4 μ M), dNTPmix (0,2 mM) e a construção hialuronidase no pGEM-T como molde. A reação também foi analisada por meio de uma corrida eletroforética de um gel de agarose 1,5% seguindo os mesmos processos descritos acima.

Foi feita a extração da banda com o DNA amplificado do gel com o auxílio de kit de extração de DNA (*Gel Band Purification kit*, GE®), o DNA extraído foi diluído em água estéril e dosado. Em seguida, o DNA gel-extraído foi submetido a uma reação de adenilação nas seguintes condições: Tampão Taq polimerase (10 X), MgCl₂ (25 mM), dATP (0,2 mM), Taq DNA polimerase (5U/ μ L) e H₂O deionizada, em um volume final de reação de 10 μ L. Esta mistura foi incubada em termociclador à 70°C por 30 minutos.

Após o processo de adenilação, o volume correspondente a 0,075 pmol do inserto foi colocado em microtubo de PCR juntamente com 0,025 pmol do vetor pGEM-T (vetor A-T) em uma proporção de 3:1 (inserto:vetor). Para a reação de ligação foram utilizados os seguintes reagentes: inserto adenilado (0,075 pmol), 50ng do vetor pGEM-T (0,025 pmol), Tampão para a enzima ligase (1x), T4 DNA ligase (5U/ μ L) e H₂O estéril. Esta reação foi incubada a 4 -16°C por 16 horas.

3.5.2 Transformação em bactérias quimiocompetentes

Uma alíquota de 110 μ L da solução de bactéria DH5 α quimiocompetente foi descongelada e mantida em gelo. Quando descongelada foi adicionada a um tubo de polipropileno com 3 μ L da reação de ligação. Essa mistura permaneceu por 30 minutos em gelo, em seguida foi transferida para um banho a 42°C por 90 segundos, e por mais 90 segundos no gelo novamente. Foi adicionado 1 mL de meio SOC (triptona 20 g/L; extrato de levedura 5 g/L; NaCl 0,5 g/L; KCl 2,5 mM; MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM, glicose 0,2 M) à solução que ficou por 1 hora sobre agitação (225 rpm) a 37°C.

3.5.3 Plaqueamento das bactérias transformadas

As bactérias recuperadas transformadas com construções do vetor pGEM-T foram divididas em duas porções: uma de 100 μ L plaqueadas em meio LB ágar (triptona 10 g/L, extrato de levedura 5 g/L, cloreto de sódio 10 g/L, ágar-ágar 15 g/L)

suplementado com ampicilina (100 µg/ml), previamente tratada com IPTG (100 mM) e X-GAL (50mg/mL); e outra de 900 µl que foi submetida a centrifugação e ressuspensa em 100 µl de meio SOC para plaqueamento nas mesmas condições descritas acima. As suspensões bacterianas foram espalhadas com alça de Drigalski de vidro estéril até completa secagem do líquido no meio solidificado na placa. As placas foram levadas para incubação a 37°C (em incubadora tipo BOD 411 D, Nova Ética) por 16h.

3.5.4 PCR de colônia

Após observação das placas contendo colônias com bactérias possivelmente transformadas, foram escolhidas colônias brancas e outras parcialmente azuis para replaqueamento (*Master plate*) e para confecção de PCR de colônia. Cada uma das colônias escolhida foi tocada com auxílio de palito de madeira estéril, parte do material esfregado no fundo de um tubo de 0,2 mL e outra parte para furar uma “*master plate*”. Nos tubos foram acrescentados os reagentes para a PCR que incluem: Mix *taq* (1x), oligonucleotídeo sense universal T7 (0,3 µM), oligonucleotídeo universal antisense SP6 (0,3 µM) e H₂O estéril para uma reação com volume final de 10µL. A mistura foi levada para o termociclador que foi programado para realizar ciclos: 95°C/ 5 minutos (1x); 95°C/30 segundos, temperatura média das TMs dos *primers* diminuídos de 5°C /30 segundos, 72°C/2 minutos (35x); 72°C/10 minutos (1x); 4°C/∞. O produto da PCR de colônia foi analisado em gel de agarose 1,5%. O resultado foi visualizado e registrado no aparelho de captura *Chemidoc*.

3.5.5 Minipreparação e processamento para sequenciamento

A partir da “*master plate*” os clones escolhidos foram picados com auxílio de pinça e palitos de madeira estéreis para um pré-inóculo em LB líquido com ampicilina (100 µg/mL) e incubado por 16 horas a 37°C (em incubadora 430 RDB tipo *shaker* Nova Ética) em um tubo. Cada cultura foi centrifugada a temperatura ambiente (4000x g por 10 minutos). A partir do *pellet* dessas culturas, foi feita a extração do plasmídeo com auxílio dos reagentes do kit de Miniprep da Promega (WizardPlus SV Minipreps DNA Purification Systems ®).

Para a PCR de sequenciamento foi utilizado o protocolo de sequenciamento *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems), com um volume total de reação de 10 µL. Destes, 4 µL são do reagente *Big Dye*, 2 µL do tampão de sequenciamento (5x), 0,8 µL de um dos primers universais *sense* T7 ou *antisense* SP6 (5 µM), 300ng de molde e água estéril. Essas reações foram levadas ao termociclador de placa à 95°C/ 2 minutos (1x); 96°C / 15 segundos, 50°C / 15 segundos, 60°C / 4 minutos (35 x); 4°C / infinito.

Para a precipitação das amostras para o sequenciamento, adicionou-se acetato de sódio/ EDTA (1,5 M / 0,25 M) (1/10 do volume inicial da reação) em seguida etanol absoluto gelado (3 vezes o volume da reação), homogeneizou-se bem com auxílio de um vórtex e centrifugou-se rapidamente, em seguida, deixando em gelo por 30 minutos. Foi feita uma centrifugação a 4 °C por 20 minutos, 20.000x g. O sobrenadante foi retirado e o sedimento lavado com etanol 70% gelado (750 µL), passando o líquido pelo sedimento sem homogeneizar, centrifugou-se por 5 minutos 20.000x g a 4 °C. Em seguida, foi retirado novamente o sobrenadante e centrifugado por 2 minutos. O excesso de álcool foi retirado delicadamente e deixado para secar por 30 minutos em B.O.D, protegidos da luz. A amostra foi ressuspensa com 12 µL de formamida, homogeneizada e centrifugada rapidamente. Foi incubada por 5 minutos a 90°C, e em seguida foi incubada em gelo por 10 minutos. Após esta etapa, as amostras foram homogeneizadas em vórtex e centrifugadas rapidamente. Finalmente, foram inseridas em uma placa para o sequenciamento no sequenciador por eletroforese capilar 3500 xL *Genetic Analysers* (Applied Biosystems® 3500).

Os resultados foram analisados nos softwares *FinchTV version 1.4* e *BioEdit version 7.2.5. Sequencing alignment editor*. A sequência mais representativa foi traduzida utilizando a plataforma *Expasy: Swiss Bioinformatics Resource Portal* <<https://www.expasy.org/>>. A análise e os alinhamentos das sequências nucleotídicas e aminoácidas do domínio catalítico, LiHyal2 e Dietrich's hyaluronidase foram feitos na plataforma *ClustalW* <<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/>>.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística do ensaio de edema em pata de camundongo foi utilizada ANOVA de duas vias com pós teste de Tukey para comparação das médias usando o software GraphPad Prism 8. Para os ensaios de MTT e influxo de cálcio foi

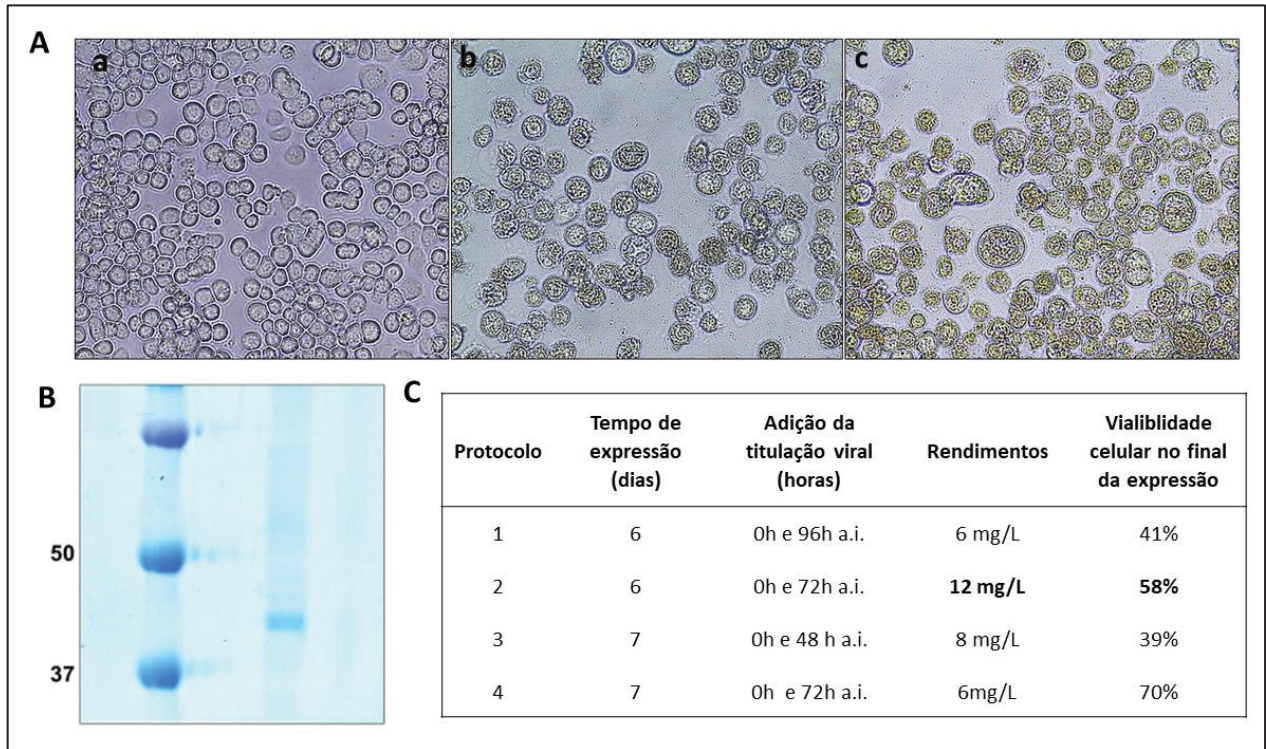
utilizado o teste ANOVA de uma via com pós teste de Tukey para comparações das médias usando o programa GraphPad Prism 8. A significância foi definida * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ ou **** $p < 0,0001$.

4 RESULTADOS

4.1 OTIMIZAÇÃO DA EXPRESSÃO E DA PURIFICAÇÃO DE LIHYAL2

Com objetivo de aumentar o rendimento da proteína recombinante LiHyal2, algumas etapas da expressão em suspensão em células Sf9, com auxílio de sistema de expressão baculovírus/células de inseto foram alteradas em relação a padronização estabelecida por De Bona (2021). Nesse trabalho anterior, a infecção era feita uma única vez em 0 h com 5% (v/v) da suspensão de vírus. No presente trabalho, o fracionamento dos 5% da titulação viral em dois dias diferentes da expressão foi a estratégia adotada para a otimização. Foram testados 4 protocolos diferentes que variam o tempo de expressão e os momentos de adição do baculovírus. Na tabela da FIGURA 8-C é possível observar a descrição dos protocolos executados e os rendimentos de proteína purificada obtidos em cada um deles. O protocolo de maior rendimento proteico foi o segundo.

FIGURA 8 – ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS EM CÉLULAS SF9, PERFIL ELETROFORÉTICO DA LIHYAL2 PURIFICADA E TABELA DE RENDIMENTO PROTEICO.



FONTE: A autora

LEGENDA: Em A, as características morfológicas das células Sf9 não infectadas (a) incluem: células bem redondas, aderidas, pouco granuladas e quase translúcidas. Células Sf9 no 4º dia após infectadas com baculovírus (b), apresentando rugosidade, grânulos e coloração acentuada. No 7º dia (c), o aumento do tamanho celular e expansão do núcleo são bem visíveis. As imagens a, b e c estão no aumento de 20x. Em B, SDS-PAGE 12,5% com 5 µg da LiHyal2 obtida. A banda correspondente à proteína recombinante aparece na altura de cerca de 44 kDa. Em C mostra-se a tabela com a descrição resumida dos protocolos de expressão testados e seus respectivos rendimentos em mg por litro de cultura. A sigla “a.i.” significa “após infecção”.

O segundo protocolo é caracterizado pela adição da titulação viral em 0 h e em 72h. A cultura celular de Sf9 com densidade de 3×10^6 células/mL (viabilidade celular de 95%) foi infectada com 2,5% (v/v). Após 72 h (viabilidade celular de 88%), ou seja, no terceiro dia após o início da primeira infecção foi adicionado mais 2,5% da titulação viral e mais 1% do volume total em expressão de meio S900II e antibióticos (a partir disso foi adicionado meio de cultura fresco durante as expressões dos protocolos 3 e 4 também). Após 144 h a expressão foi finalizada com 58% de viabilidade celular. Na tabela mostrada na FIGURA 8-C é possível observar que a viabilidade celular verificada no final da expressão foi menor nos protocolos 1 e 3, após 144h/168h a viabilidade era entre 30 e 41%. Por meio do protocolo 4 foi

alcançada a maior viabilidade celular, com cerca de 70% de células viáveis no meio de expressão.

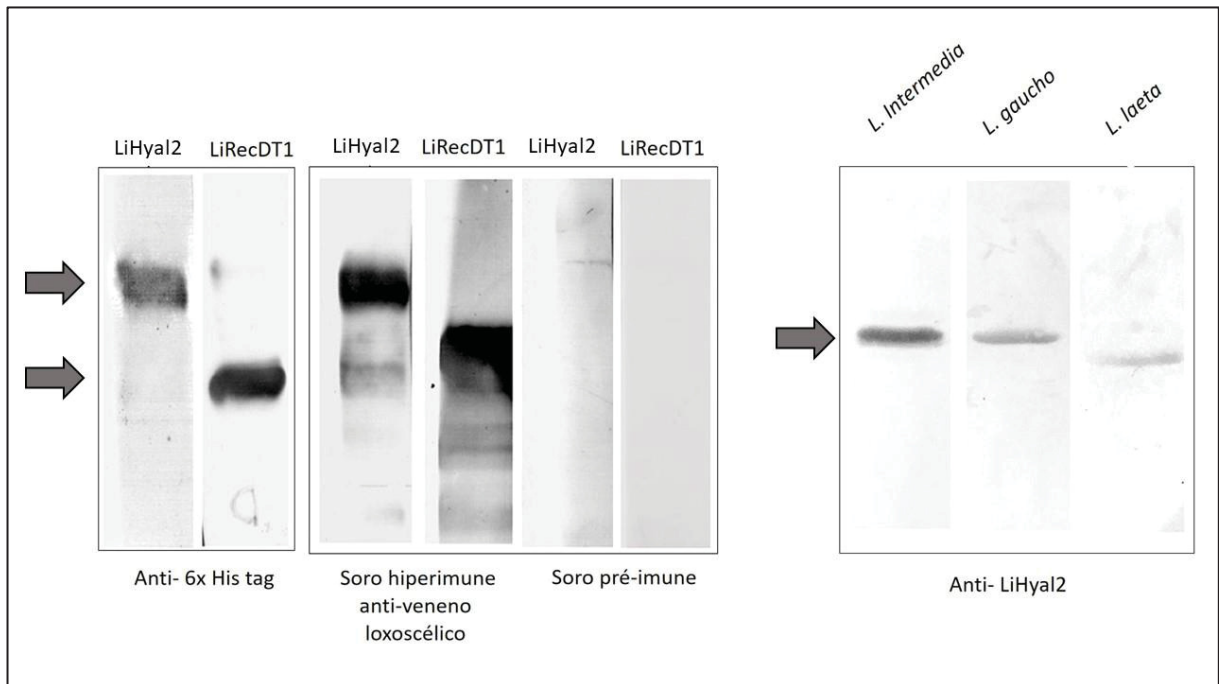
Após os procedimentos de purificação, foi realizada a dosagem das proteínas que revelou o rendimento de 6 mg de LiHyal2/L de cultura no protocolo 1 e 4, 8 mg/L de cultura no protocolo 3 e 12 mg/L no protocolo 2.

As proteínas foram analisadas quanto ao grau de pureza e perfil eletroforético por meio da corrida em gel de poliacrilamida 12,5% (SDS-PAGE) de forma redutora. Foi detectada uma banda entre 50 kDa e 37 kDa, com mobilidade eletroforética aparente de cerca de 44 kDa (FIGURA 8 - B).

4.2 IMUNODETECÇÃO DA LIHYAL2

Para detecção da proteína nas amostras purificadas, elas foram submetidas a imunodeteccção por meio da técnica *western blotting*. A proteína foi detectada por anticorpos que reconhecem uma sequência de 6 resíduos de histidina e por anticorpos policlonais produzidos contra proteínas presentes no veneno loxoscélico. Os anticorpos policlonais produzidos contra LiHyal2 reconheceram epítomos da hialuronidase nativa nos venenos *L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta* (FIGURA 9). Observa-se também, que as hialuronidases de diferentes venenos loxoscélicos apresentam uma sutil variação na mobilidade eletroforética.

FIGURA 9 – IMUNODETEECÇÃO DA LIHYAL2



FONTE: A autora

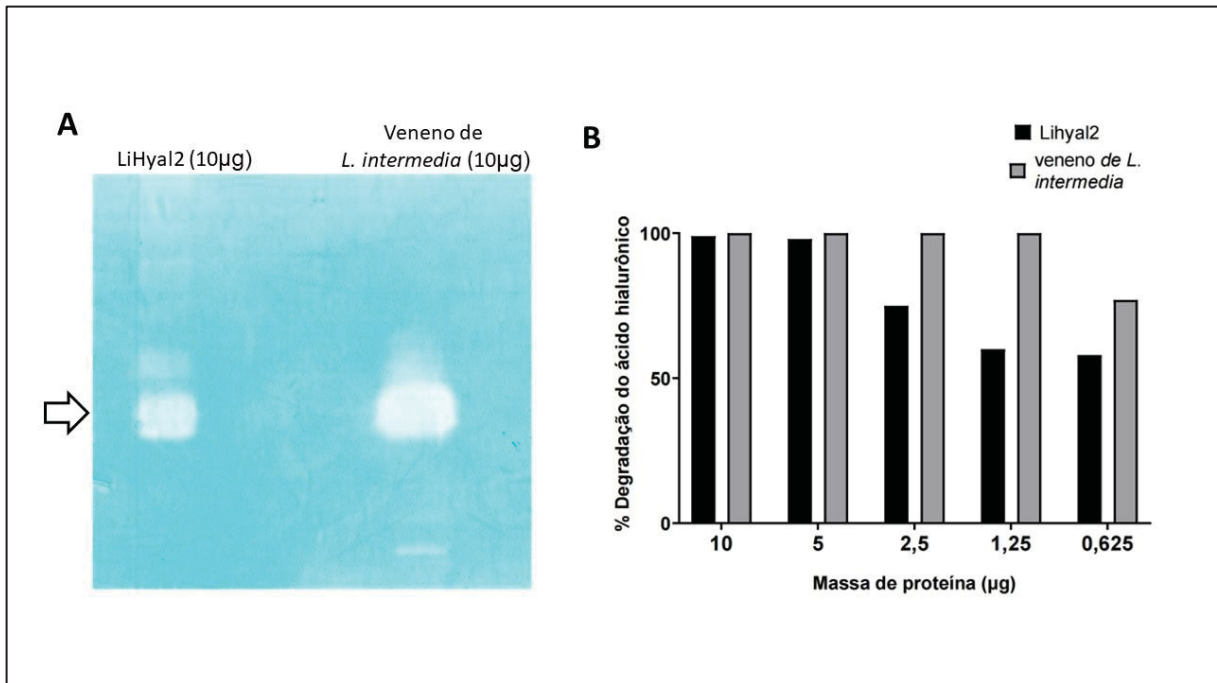
LEGENDA: O *Western blotting* foi feito através da corrida eletroforética SDS-PAGE 12,5 % em condições redutoras, com a posterior transferência para membrana de nitrocelulose. Após isto, cada lane foi tratado com anticorpos para o reconhecimento da LiHyal2 ou das hialuronidasas nativas de venenos loxoscélicos. No ensaio mostrado na imagem da esquerda, LiHyal2 e o controle LiRecDT1 (10 µg) foram reconhecidas por anticorpos anti- 6x-his-tag (1:2000), e por anticorpos policlonais produzidos em coelhos que reconhecem toxinas do veneno de *L. intermedia* (1:1000). Seus respectivos tratamentos com soros pré-ímenes de coelhos (1:1000) mostrou ausência de reação. Epítomos das hialuronidasas nativas foram detectados nos venenos de *L. intermedia* (10 µg), *L. gaucho* (10 µg) e *L. laeta* (10 µg) pelo soro anti-LiHyal2 produzido em camundongos (1:3000). As setas indicam as alturas esperadas para LiHyal2 (44 kDa), LiRecDT1 (34 kDa) e hialuronidase nativa dos venenos (41-44 kDa)

4.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DA LIHYAL2

Para avaliar o perfil de degradação de ácido hialurônico pela LiHyal2, a proteína recombinante foi submetida ao ensaio de degradação em gel de poliacrilamida copolimerizado com ácido hialurônico. A atividade da proteína foi confirmada pela revelação de uma banda clara no gel, contrastado em azul, na altura esperada (~44 kDa) (FIGURA 10 – A). LiHyal2 também foi submetida a turbidimetria, um ensaio quantitativo para degradação com ácido hialurônico. Massas de 10 a 0,625 µg de LiHyal2 foram incubadas com 10µg de ácido hialurônico. Com apenas 0,625 µg

LiHyal2 degradou mais do que 50% do AH (FIGURA 10 – B). Como controle positivo foi utilizado o veneno total de *L. intermedia*.

FIGURA 10 - ZIMOGRAMA E TURBIDIMETRIA DA ATIVIDADE HIALURONIDÁSICA DA LiHyal2.



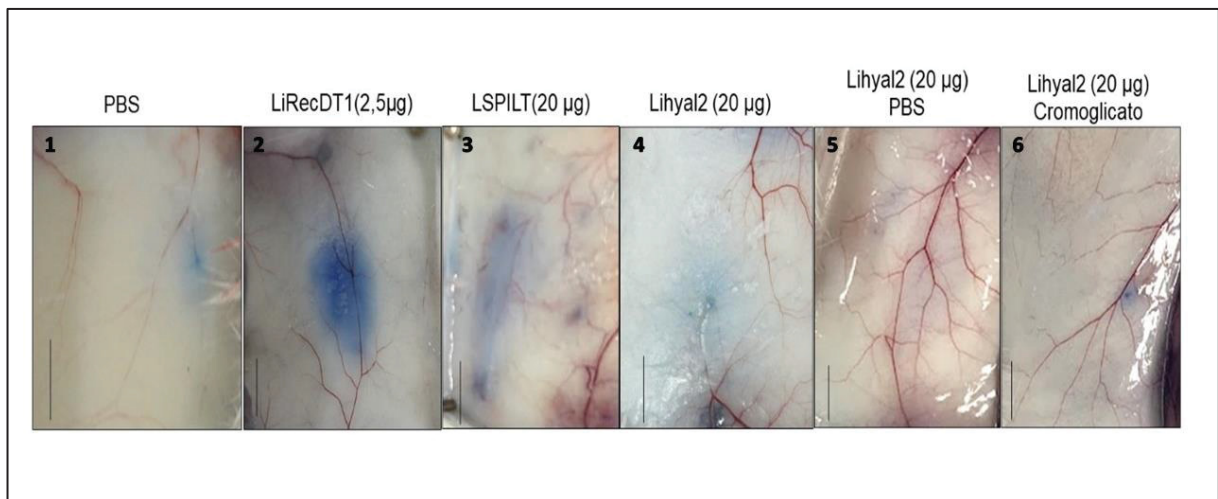
FONTE: A autora

LEGENDA: A- Perfil da atividade da LiHyal2 (10 µg) e do veneno do *L. intermedia* (10 µg) por meio de gel de poliacrilamida 12,5% copolimerizado com AH. As bandas brancas indicam a região onde não há AH, pois foi clivado na altura da LiHyal2 ou da hialuronidase do veneno de *L. intermedia*. B- Gráfico apresenta o ensaio de turbidimetria em placa de 96 poços. No eixo Y mostra-se a porcentagem de degradação do AH (10 µg) e no eixo X a quantidade em massa da LiHyal2 e o do veneno total de *L. intermedia* (10 – 0,625µg) utilizada para degradar o AH. A seta indica altura aproximada para LiHyal2 e para o veneno (~44 kDa).

Ensaio *in vivo* também foram realizados para avaliar determinados efeitos biológicos da LiHyal2. O ensaio de permeabilidade vascular em camundongos foi realizado com a LiHyal2 de duas formas diferentes: aplicada diretamente no camundongo (20 µg) e comparada a LiRecDT1 (2,5 µg), LSPILT (20 µg) e PBS; e aplicada em animais previamente tratados com cromoglicato dissódico (inibidor de degranulação de mastócitos) e com PBS. Os animais previamente tratados com cromoglicato foram utilizados para avaliar uma possível inibição do aumento da permeabilidade vascular pela LiHyal2, caso ela fosse desencadeada por mastócitos. Se ela causasse aumento da permeabilidade vascular por mastócitos isso seria detectado em animais previamente tratados com PBS (utilizado como controle para o cromoglicato). No entanto, LiHyal2 não foi capaz de aumentar a permeabilidade

vascular nos animais tratados previamente com PBS (quinta imagem da FIGURA 11). O outro grupo de animais que recebeu os tratamentos das proteínas recombinantes LiHyal2, LiRecDT1, LSPILT e o controle negativo PBS são visualizados nas quatro primeiras imagens da FIGURA 11. Na quarta imagem (LiHyal2 20 μ g) é possível observar que LiHyal2 não causou o extravasamento de proteínas plasmáticas em camundongos quando comparada a LiRecDT1, observada na segunda imagem (FIGURA 11). A serpina LSPILT (observada na terceira imagem) utilizada como controle de expressão, uma vez que tinha sido expressa por células Sf9 assim como a LiHyal2, mostrou aumento residual de permeabilidade das proteínas do plasma.

FIGURA 11 - ENSAIO DE PERMEABILIDADE VASCULAR.



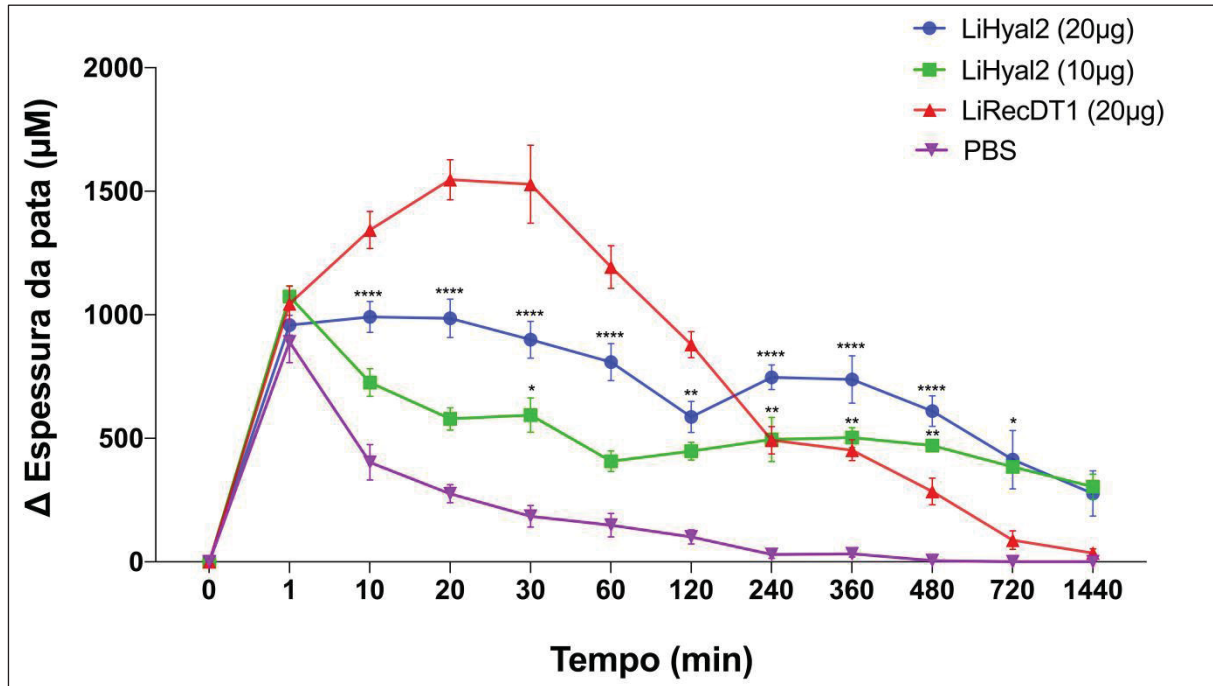
FONTE: A autora

LEGENDA: LiHyal2 sozinha não causou aumento da permeabilidade vascular em camundongos quando comparada a LiRecDT1, LSPILT e PBS. Em animais tratados com cromoglicato e com PBS não foi detectado aumento da permeabilidade vascular. As imagens são representativas de um ensaio feito com 5 animais por grupo de tratamento. A barra lateral indica 0,5 cm na imagem.

Para verificar se LiHyal2 era capaz de induzir edema foi realizado o ensaio de edema em pata de camundongo. Após a injeção intraplantar de LiHyal2 (10 μ g e 20 μ g), LiRecDT1 (20 μ g) – proteína reconhecidamente edematogênica, e PBS, as espessuras das patas foram medidas entre 1 minuto a 1440 minutos (24 h). Por meio deste ensaio foi possível observar uma resposta ampla dos efeitos biológicos de LiHyal2. A hialuronidase recombinante desencadeou uma resposta residual, causando edema dose-dependente nas patas dos camundongos (FIGURA 12). Em animais tratados com 20 μ g de LiHyal2, foi observado edema nos primeiros 20 minutos, após 30 minutos foi verificada redução do inchaço. No entanto, ocorreu uma outra resposta tardia dos camundongos a LiHyal2 após 240 minutos, e o edema não

reduziu totalmente em até 24 h, diferentemente do perfil de redução observado no tratamento com LiRecDT1. As patas dos animais tratados com 10 µg de LiHyal2 não apresentaram edema. Após 2 horas, nas patas dos animais tratados com 10 µg de LiHyal2 um edema significativo foi observado, e esse edema não diminuiu totalmente em até 24 horas.

FIGURA 12 – EDEMA EM PATA DE CAMUNDONGO



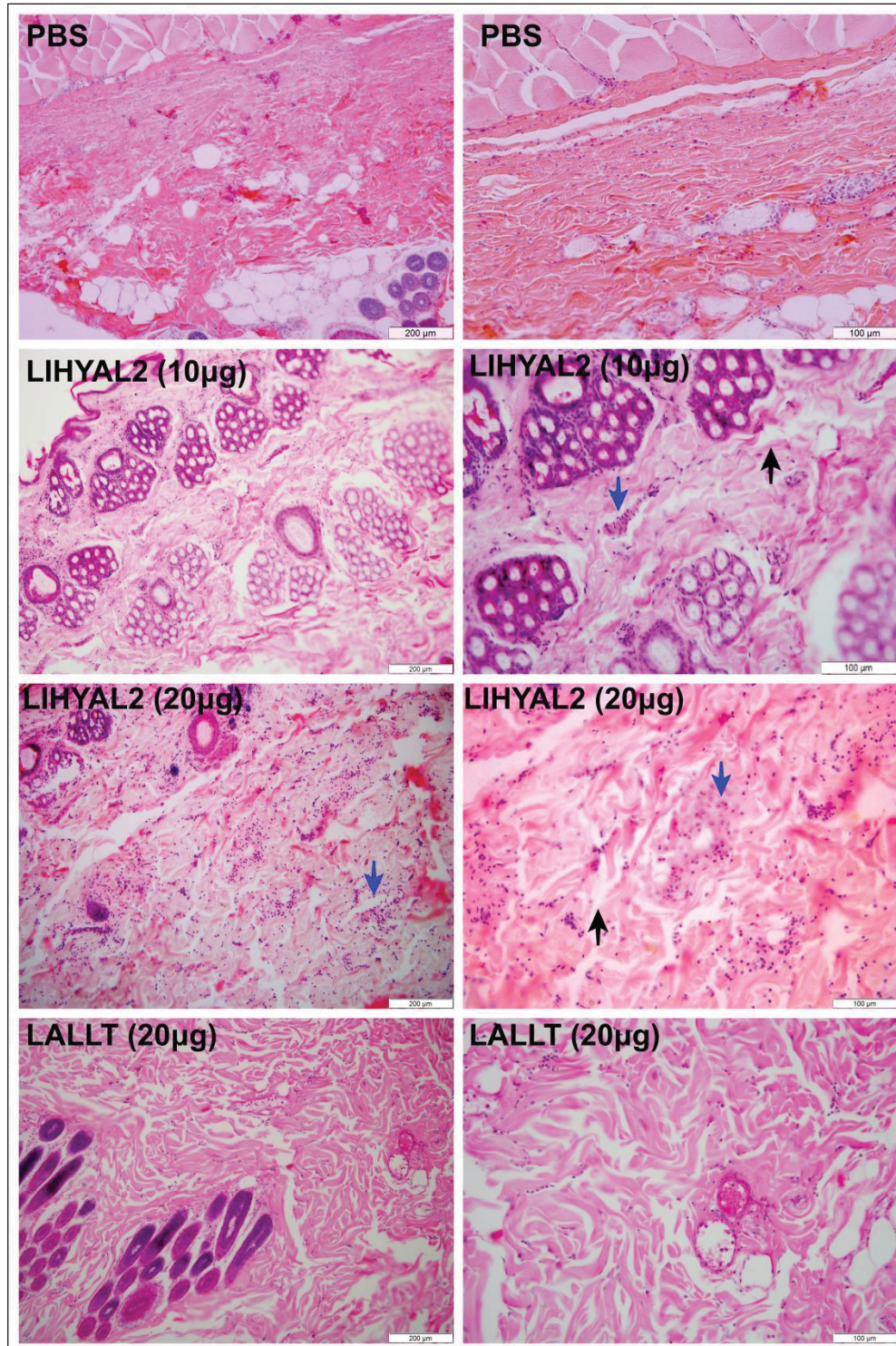
FONTE: A autora

LEGENDA: O gráfico do ensaio edema de pata de camundongo mostra no eixo Y a variação da espessura da pata dos animais medida em µM e no eixo X os tempos em que foram feitas as medidas. LiHyal2 20µg mostrou um pico nos primeiros 20 minutos e depois reduziu até 2 h. Após 2h ocorreu outro pico, que não reduziu totalmente até 24 horas. Enquanto LiHyal2 10 µg causou edema residual em 1 minuto e diminui até 1 hora. Depois ocorreu um aumento do edema que não diminuiu totalmente até 24 horas. Cada ponto representa a média ± S.E.M de cinco animais de um experimento representativo (*p = 0.01 a 0.05; **p = 0.001 a 0.01; ***p = 0,0001 a 0.001; ****p < 0,0001, comparados ao PBS).

LiHyal2 também foi aplicada subcutaneamente na pele de coelho para analisar alterações que a proteína recombinante poderia causar no tecido. Após 4 horas de tratamento, os animais foram eutanasiados, as peles foram retiradas e fixadas em ALFAC e, após o processamento e coloração, os cortes histológicos foram fotografados em microscópio Olympus BX41. Nas análises foi observada uma inflamação leve detectada pela presença de alguns neutrófilos na área da pele onde a LiHyal2 foi aplicada. Além disso, foi possível verificar a desorganização das fibras de colágeno do tecido, diferentemente do tecido tratado com PBS, onde a derme está

compacta. A proteína alergênica LALLT causou edema caracterizado pelo espaçamento e desorganização das fibras de colágeno no tecido (FIGURA 13).

FIGURA 13 - ANÁLISE HISTOLÓGICA DA PELE DE COELHO.



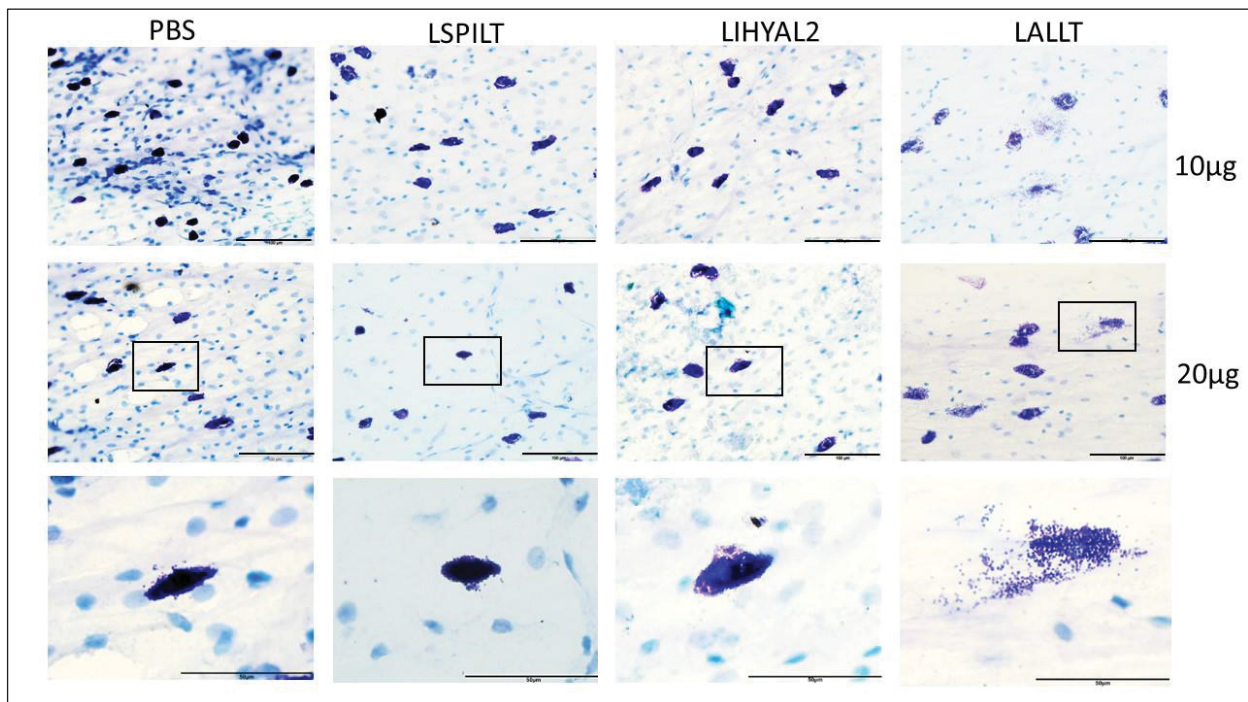
FONTE: A autora

LEGENDA: Alterações morfológicas na pele de coelho expostas a LiHyal2 (10µg e 20µg) após 4 h de tratamento. LiHyal2 causou desorganização das fibras de colágeno (seta preta), e uma inflamação leve marcada pela presença de neutrófilos (seta azul). LALLT (20µg) foi utilizada como controle positivo e PBS como controle negativo. Escala de cada imagem está representada no canto inferior direito.

4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ALERGÊNICA DA LIHYAL2

Com o objetivo de avaliar a capacidade da LiHyal2 em degranular mastócitos, regiões do mesentério de ratos foram tratadas com diferentes quantidades de LiHyal2, 10 e 20 μg . LiHyal2 não foi capaz de induzir a degranulação de mastócitos, que apresentaram uma coloração mais escura e morfologia consistente. Por outro lado, foi possível observar que a LALLT (proteína alergênica recombinantes de *L. intermedia*) causou a degranulação mastócitos, apresentando coloração mais clara. Os mastócitos de mesentério tratados com PBS e LSPILT (serpina recombinante utilizada como controle de expressão) não degranularam e permaneceram consistentes e mais escuros. Desta forma, o perfil do tecido tratado com LiHyal2 apresentou mais similaridade com os tratados com PBS e LSPILT (FIGURA 14).

FIGURA 14 – ENSAIO DE DEGRANULAÇÃO DE MASTÓCITOS EM MESENTÉRIO DE RATOS.



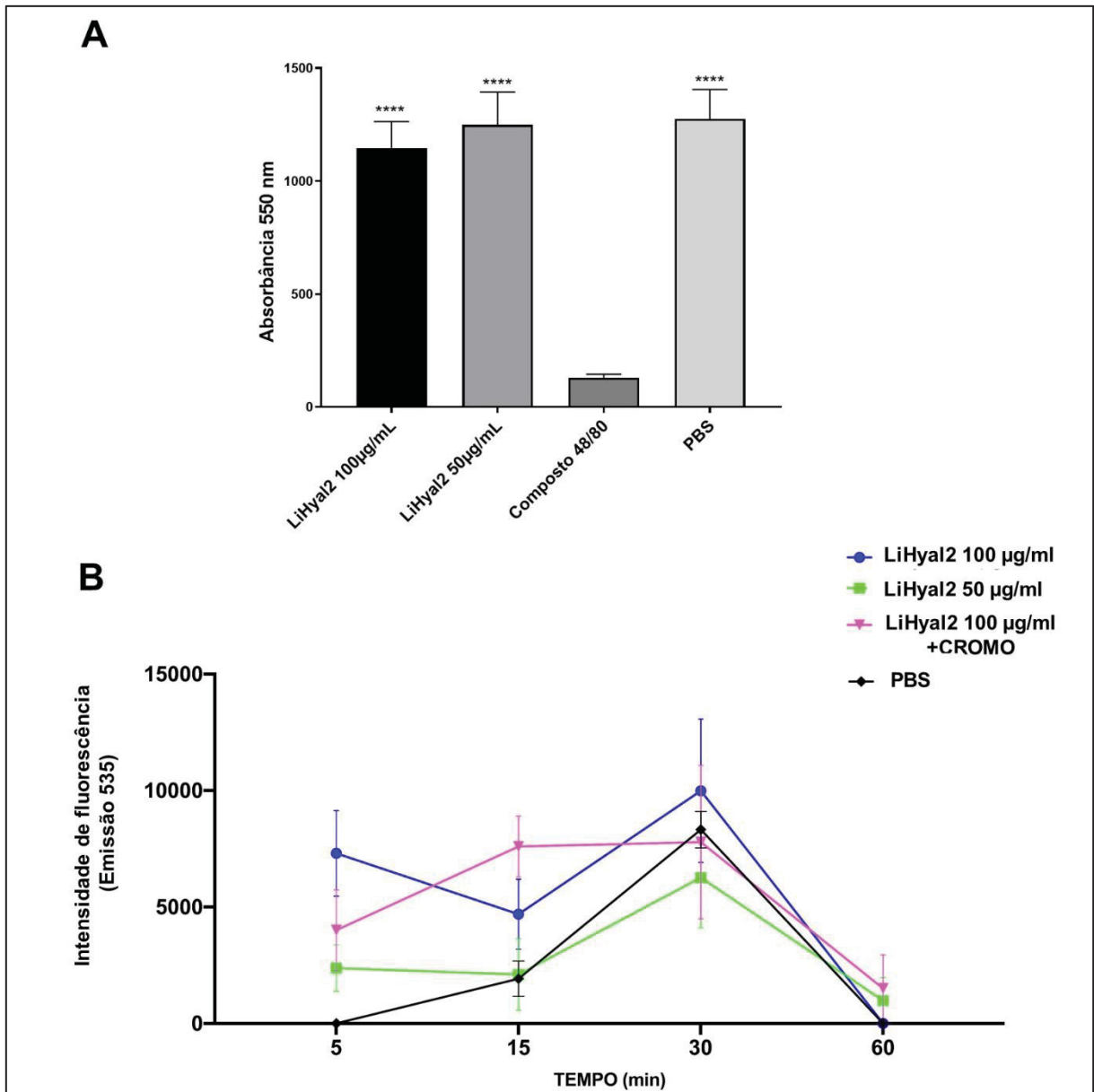
FONTE: A autora

LEGENDA: Ensaio de degranulação de mastócitos em mesentério de rato com LiHyal2 (10 μg e 20 μg), PBS (50 μL), LSPILT (10 μg e 20 μg), e LALLT (10 μg e 20 μg) que foram aplicados sobre o mesentério. As imagens mostram que a LiHyal2 não apresentou efeito sobre os mastócitos, tanto com 10 μg quanto com 20 μg de massa proteica. É possível observar os mastócitos bem arredondados ou fusiformes tratados com PBS, LSPILT e LiHyal2 enquanto mastócitos tratados com LALLT estão degranulados. Todas as imagens foram obtidas no microscópio Olympus BX41. Imagens na linha 1 (10 μg) e 2 (20 μg) estão no aumento de 40X, com a escala de 100 μm . Na linha 3 são as respectivas ampliações dos quadrados indicados nas imagens da linha 2 e estão com a escala de 50 μm .

Outro ensaio que complementa a degranulação de mastócitos é o influxo de cálcio. Para isso, primeiramente LiHyal2 foi incubada por 2 horas com as células RBL-2H3 para verificar se LiHyal2 alterava a viabilidade celular da linhagem. A proteína não alterou a viabilidade da RBL-2H3 e sua adesão (FIGURA 15 - A).

Para o ensaio de influxo de cálcio, LiHyal2 foi incubada com RBL-2H3 por 60 minutos, monitorando o aumento da concentração de cálcio através de uma sonda fluorescente sensível ao cálcio (Fluo-4). LiHyal2 mostrou influência basal sobre as células, semelhante ao controle PBS (FIGURA 15-B). O inibidor de degranulação cromoglicato dissódico foi incubado juntamente com as células e a proteína recombinante, no entanto, não ocorreu redução na leitura da fluorescência para esse tratamento. Não teve diferença significativa entre LiHyal2 e os controles, PBS e LiHyal2 combinada ao cromoglicato.

FIGURA 15 – EFEITOS DA LIHYAL2 SOBRE A VIABILIDADE CELULAR E O INFLUXO DE CÁLCIO.



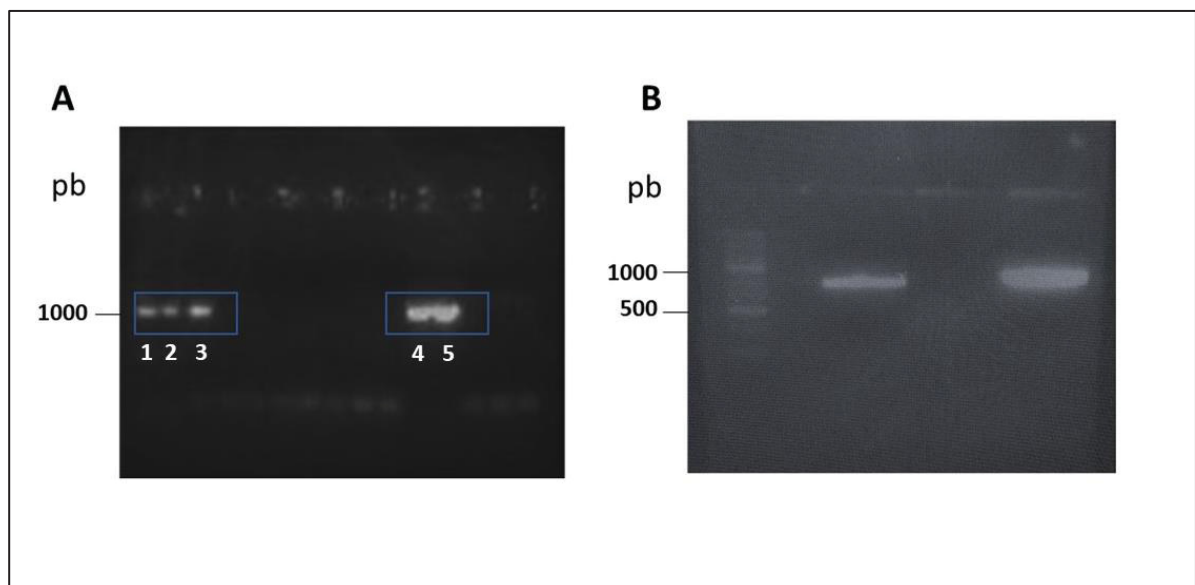
FONTE: O autor.

LEGENDA: A- A viabilidade celular foi verificada através do ensaio de MTT. No gráfico A é mostrado no eixo Y a quantificação das células viáveis e o eixo X mostra os tratamentos utilizados sobre estas células. A LiHyal2 (50 e 100µg/ml), composto 48/80 (controle positivo) (100 µg/mL) e PBS (controle negativo) foram incubados com RBL-2H3. Depois de 2 h foi verificado que a proteína não altera a viabilidade celular. Os valores representam a média \pm S.D. de dois experimentos independentes feito em quintuplicata (*p = 0.01 a 0.05; **p = 0.001 a 0.01; ***p = 0,0001 a 0.001; ****p < 0,0001 comparados com controle positivo). B - LiHyal2 (50 e 100µg/ml), PBS e LiHyal2 (100µg/ml) + o cromoglicato dissódico (CROMO) (20 µM) foram incubados por 60 minutos com RBL-2H3 internalizadas com fluo-4. A leitura da fluorescência foi feita em: 5, 15, 30 e 60 minutos. Os valores representam a média \pm S.D de um experimento representativo. A diferença entre os tratamentos foi não significativa.

4.5 CLONAGEM DO DOMÍNIO CATALÍTICO DA HIALURONIDASE DE *L. INTERMEDIA*

Os *primers* desenhados para realizar a clonagem da sequência da hialuronidase foram eficazes em obter a sequência do domínio catalítico. Após a obtenção do inserto, foi realizada a ligação do mesmo com o vetor pGEM-T e a transferência desta construção para DH5- α . Colônias potencialmente positivas foram confirmadas através do PCR de colônia realizado com *primers* do vetor pGEM-T. Os produtos da PCR de colônias foram aplicados em gel de agarose, onde foi possível detectar cinco bandas na altura aproximada de 1000 pb (FIGURA 15 - A). Foi realizada uma PCR com uma das minipreps de um dos clones para confirmar altura dos produtos de amplificação utilizando *primers* específicos e primers do vetor (T7 e SP6) (FIGURA 16 - B).

FIGURA 16 – PERFIL ELETROFORÉTICO DOS PRODUTOS DA AMPLIFICAÇÃO DE PCR.



FONTE: A autora.

LEGENDA: Perfil eletroforético dos produtos da amplificação da PCR. A - Gel de agarose 1,5% com os clones considerados positivos marcados com uma forma azul, que foram amplificados na PCR das colônias que receberam a construção pGEM-T + inserto, com uma altura ~1000 pb. B- no primeiro *lane* mostra-se o marcador molecular, em seguida a sequência amplificada com os *primers* específicos e no terceiro *lane* encontra-se a sequência amplificada com os *primers* do vetor.

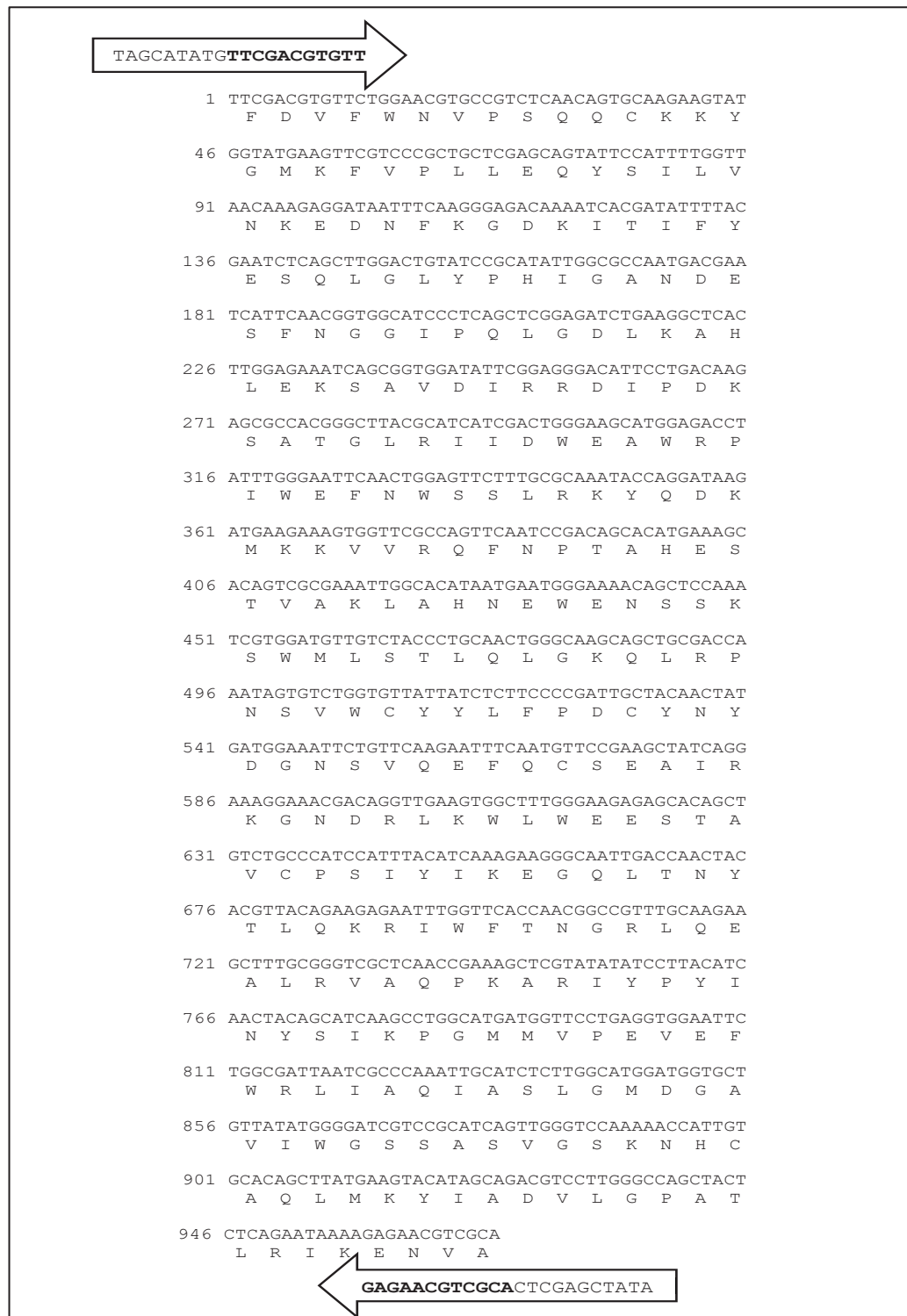
Após a confirmação, foram escolhidos 2 clones (bandas 3 e 5 do gel de agarose mostrado na FIGURA 16 - A) para o sequenciamento utilizando os primers do vetor. O inserto no pGEM-T do clone 3 correspondeu a sequência codificante para

o domínio catalítico da hialuronidase do veneno de *L. intermedia*. A sequência de nucleotídeos que codifica para o domínio catalítico da hialuronidase apresentou 969 nucleotídeos, mais 20 nucleotídeos que correspondem aos sítios de restrição para as enzimas NdeI (5' CATATG 3') e XhoI (3' GAGCTC 5'), e nucleotídeos adicionais para a estabilização do primer (FIGURA 17).

A sequência de aminoácidos do domínio catalítico da hialuronidase apresentou 323 resíduos, sem a região do peptídeo sinal de endereçamento para o retículo endoplasmático e sem o domínio EGF-*like*. As regiões da proteína que codificam para o peptídeo sinal mais a região do domínio EGF-*like* correspondem a 73 aminoácidos. A sequência manteve todos os resíduos catalíticos e os sítios de N-glicosilação preditos (FIGURA 18).

A sequência aminoacídica do domínio catalítico apresentou uma única mutação referente a sequência da *Dietrich's hyaluronidase*. Ocorreu a troca de um aminoácido de Leucina (107 Leu) por um de Prolina (88 Pro), ambos são aminoácidos apolares, porém esta mesma mutação também ocorreu na LiHyal2, a troca de 107 Leu por 107 Pro.

FIGURA 17 – SEQUÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS E DE AMINOÁCIDOS DO DOMÍNIO CATALÍTICO DA HIALURONIDASE DE *L. INTERMEDIA*.



FONTE: A autora.

LEGENDA: Sequência de nucleotídeos do domínio catalítico da hialuronidase de *L. intermedia* e sua respectiva sequência de aminoácidos. A sequência codificante possui 969 nucleotídeos e 20 adicionais referentes aos sítios de reconhecimento das enzimas de restrição NdeI e XhoI e estabilização do *primer*. As setas representam os primers desenhados para obter a sequência codificante. Os nucleotídeos em negrito dentro das setas indicam o final da sequência ainda correspondente a hialuronidase de origem. A sequência aminoacídica predita foi obtida com o auxílio da ferramenta *ORF Finder*.

FIGURA 18 – ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS AMINOACÍDICAS.

		↓	
LiHyal2	<u>MQTILVLTTFFLSAWSLAVGFDVFWNVPSQQCKKYGMKFVPLLEQYSILVNKEDNFKGDKI</u>		60
Dietrich	<u>MQTILVLTTFFLSAWFLAVGFDVFWNVPSQQCKKYGMKFVPLLEQYSILVNKEDNFKGDKI</u>		60
domínio	-----FDVFWNVPSQQCKKYGMKFVPLLEQYSILVNKEDNFKGDKI		41
LiHyal2	TIFYESQLGLYPHIGANDESFNNGGIPQLGDLKAHLEKSAVDIRRDIPDKSATGLRIIDWE		120
Dietrich	TIFYESQLGLYPHIGANDESFNNGGIPQLGDLKAHLEKSAVDIRRDIPDKSATGLRIIDWE		120
domínio	TIFYESQLGLYPHIGANDESFNNGGIPQLGDLKAHLEKSAVDIRRDIPDKSATGLRIIDWE		101
	★		
LiHyal2	AWRPIWEF NWS SLRKYQDKMKVVRQFNPTAHES TVAKLAHNEWE NSS KS WMLSTLQLGK		180
Dietrich	AWRPIWEF NWS SLRKYQDKMKVVRQFNPTAHES TVAKLAHNEWE NSS KS WMLSTLQLGK		180
domínio	AWRPIWEF NWS SLRKYQDKMKVVRQFNPTAHES TVAKLAHNEWE NSS KS WMLSTLQLGK		161
	★		
	↓ ↓ ↓ ↓		
LiHyal2	QLRPNSVWCYLLFPDCYNYDGNVSVQEFQCSEAI G KGNDR LKWLWEESTAVCP SIYIKEGQ		240
Dietrich	QLRPNSVWCYLLFPDCYNYDGNVSVQEFQCSEAI R KGNDR LKWLWEESTAVCP SIYIKEGQ		240
domínio	QLRPNSVWCYLLFPDCYNYDGNVSVQEFQCSEAI R KGNDR LKWLWEESTAVCP SIYIKEGQ		221
	★ ★ ★ ★		
LiHyal2	LT NYT LQKRIWFTNGRLQEALRVAQPKARIYPYI NYS IKPGMMVPEVEFWRL MA QIASLG		300
Dietrich	LT NYT LQKRIWFTNGRLQEALRVAQPKARIYPYI NYS IKPGMMVPEVEFWRL IA QIASLG		300
domínio	LT NYT LQKRIWFTNGRLQEALRVAQPKARIYPYI NYS IKPGMMVPEVEFWRL IA QIASLG		281
	★		
	↓ ↓ ↓ ↓		
LiHyal2	MDGAVIWGSSASVGSKNHCAQLMKYIADVLGPATLRIKENVA RC SKQACSGRGRCTWPKD		360
Dietrich	MDGAVIWGSSASVGSKNHCAQLMKYIADVLGPATLRIKENVA RC SKQACSGRGRCTWPKD		360
domínio	MDGAVIWGSSASVGSKNHCAQLMKYIADVLGPATLRIKENVA-----		323
	★		
	↓ ↓ ↓		
LiHyal2	TSVIAWKFLVEKEDYDFYLGDI ECKC VEGYEGRYCE DKTK		400
Dietrich	TSVIAWKFLVEKEDYDFYLGDI ECKC VEGYEGRYCE DKTK		400
domínio	-----		323

FONTE: A autora.

LEGENDA: Alinhamento das sequências de aminoácidos da LiHyal2, *Dietrich's hyaluronidase* e do domínio catalítico da hialuronidase de *L. intermedia*. Os resíduos sublinhados indicam o peptídeo sinal de endereçamento para o retículo endoplasmático. Os resíduos ácido aspártico (D) e ácido glutâmico (E) são resíduos catalíticos preditos e estão marcados em cinza, enquanto as substituições não conservativas de resíduos entre as sequências estão marcadas em preto. As cisteínas que formam as 6 pontes dissulfeto da proteína madura estão indicadas pelas setas cinzas. Os sítios de N-glicosilação estão destacados em negrito. Resíduos com estrelas abaixo são resíduos aromáticos típicos de proteínas que se ligam a carboidratos. Região do domínio EGF-like está demarcada pelo quadro pontilhado. Alinhamento feito com a ferramenta ClustalW.

5 DISCUSSÃO

O intuito de otimizar a expressão da hialuronidase loxoscélica neste trabalho está atrelado à aplicação dela à produtos biotecnológicos. É muito importante para a indústria, principalmente a farmacêutica, a produção de proteínas recombinantes em larga escala com alto rendimento e é claro, solúveis (BROWN, 2003). As hialuronidases recombinantes possuem diversas aplicações na área farmacêutica. Estas enzimas são utilizadas para clivagem de preenchimentos com ácido hialurônico (BUHREN et al., 2018; JUHÁSZ; LEVIN; MARMUR, 2017; ORS, 2020), como coadjuvante para formulações de medicamentos para entrega rápida e absorção eficiente por meio de aplicações subcutâneas (KNOWLES et al., 2021; LOCKE; MANEVAL; LABARRE, 2019), e tratamento de injúria tecidual, como edema e hematomas (HAN et al., 2018; KOÇ; ER, 2018; WASHINGTON et al., 2020). As hialuronidases loxoscélicas tem grande potencial para tais aplicações uma vez que mostrou atividade sobre o ácido hialurônico e aumentou o efeito de outra toxina no tecido (DE-BONA et al., 2021; FERRER et al., 2013). Além disso, hialuronidases loxoscélicas são da mesma classe de enzimas que as hialuronidases de mamíferos, abrindo uma variedade aplicações para estas enzimas (DA SILVEIRA et al., 2007).

Ao longo dos anos, fontes para obtenção de hialuronidases foram sendo investigadas para aplicações na pesquisa e indústria, sendo produzidas a partir de tecidos e secreções viscosas bovinas e ovinas (BORDERS; RAFTERY, 1968; HARRISON, 1988; HOUCK; CHANG, 1979), de cultura de bactérias patogênicas (*Streptococcus* e *Staphylococcus*) (AHMED, 2014; OETTL et al., 2003), assim como, de forma recombinante (FROST et al., 1997). Porém, proteínas obtidas de purificados de tecido geralmente são impuras e imunogênicas, contendo várias substâncias contaminantes como proteases, imunoglobulinas e fatores vasoativos (BORDERS; RAFTERY, 1968; HOUCK; CHANG, 1979). Atualmente, proteínas recombinantes comerciais, como a Amphadase e a Hylenex (rHuPH20) ou são produzidas através da purificação do extrato de tecidos (AMPHASTAR PHARMACEUTICALS INC., 2005) podendo ter contaminantes, ou são obtidas através de sistemas de expressão de células de mamíferos (FROST, 2007a; LOCKE; MANEVAL; LABARRE, 2019) sendo mais caras do que sistemas de expressão de células Sf9. Neste sentido, as hialuronidases de *Loxosceles* são proteínas que apresentam vantagens no custo e

forma de produção em relação as atuais hialuronidases disponíveis tanto na pesquisa quanto na indústria (CHAVES-MOREIRA et al., 2019; GREMSKI et al., 2021).

As hialuronidases recombinantes do veneno de *Loxosceles* já foram obtidas em modelos de expressão procarioto e eucarioto. Uma delas chamada *Dietrich's Hyaluronidase* foi obtida em *E. coli*, a outra hialuronidase, a LiHyal2, foi obtida em células Sf9 infectadas por baculovírus. No entanto, ambas mostraram desvantagens quanto a expressão. A *Dietrich's hyaluronidase* foi obtida de forma insolúvel, um problema recorrente em proteínas heterólogas produzidas em bactérias, enquanto a LiHyal2 apesar de ativa e glicosilada, teve um baixo rendimento, pouco menos do que 1 mg/L. Desta forma, ambas ainda precisam de otimização na expressão em bactéria e em células de inseto (DE-BONA et al., 2021; FERRER et al., 2013).

À vista disso, a otimização da LiHyal2 iniciou-se a partir de algumas tentativas de expressar a proteína pelo método padronizado por De Bona et al. (2021). Neste processo foi observado que ao infectar uma única vez com 5% (v/v) da titulação viral, as células mostravam muitas alterações citopatológicas no final da expressão, como: células granulosas e rugosas, com membranas rompidas e muitos *debris* (SLACK; ARIF, 2006). Isto pode ser uma desvantagem, porque em estágios avançados da infecção por baculovírus ocorre a *lise* celular (VAN OERS; PIJLMAN; VLAK, 2015). Desta forma, são liberadas diversas proteases promovendo a clivagem de proteínas que estão no meio, incluindo a proteína recombinante alvo, como consequência diminuindo o seu rendimento (IRONS et al., 2018). Se torna importante regular a adição dos vírus na cultura celular, pois a infecção em grandes quantidades e por muitos dias pode levar a perda da eficiência de tais sistemas de expressão (HO et al., 2004).

Por este motivo, foi testado um outro método de infecção com baculovírus em células Sf9, descrito por Schemczssen-Graeff et al, (2021). Este método se baseia em adicionar frações da suspensão de vírus durante o período de expressão. Então a partir disso, foi executado o fracionamento da adição de suspensão de vírus já estabelecida (5%) no primeiro e no quarto dia de expressão. Com essa estratégia foi possível alcançar maior viabilidade celular e permitir que a infecção ocorresse de forma lenta e contínua. Com isso, obteve-se um rendimento 6 vezes maior do que o obtido por De Bona et al., 2021.

Para fins de melhorar ainda mais o rendimento, foi testado um segundo método. Neste, foram feitas mínimas mudanças, mas que foram essenciais para

duplicar a quantidade em massa proteica (12 mg/L): a suspensão de vírus foi adicionada no primeiro e no terceiro dia de expressão. Além disso, nesse protocolo, foi adicionado 1% de meio fresco em 72 h de expressão, pois foi observado que no terceiro dia ainda havia células sem características citopatológicas. Isto sugere que algumas células ainda estavam se dividindo, ou que não estavam infectadas, ou ainda, estavam no início da infecção. Desta forma, com adição de mais meio, a hipótese é de que isso manteria estas células viáveis e produzindo a LiHyal2. Sob estas condições foi possível detectar maior viabilidade celular (58%) no fim da expressão.

No entanto, a porcentagem alta de células viáveis nem sempre indica mais rendimento proteico. No protocolo 4, a viabilidade celular da expressão era 70%, no entanto, o rendimento foi 6 mg/L. Sugere-se que a infecção viral não ocorreu de forma efetiva em toda a cultura, somente em algumas células. Isto pode estar relacionando a produção da suspensão de vírus. Antes de infectar a cultura celular desenvolvida em suspensão com a titulação viral, o número de baculovírus é amplificado em garrafas. Quanto mais fresca e recente ela estiver mais potente será a infecção, pois supõe-se que o vírus está na sua forma ativa (GOTOH et al., 2002).

Após a purificação da proteína, LiHyal2 foi detectada por anticorpos que reconhecem proteínas do veneno, isto confirma o quanto esta proteína é semelhante a hialuronidase nativa, e a importância da sua conservação nos venenos loxoscélicos (BUCH et al., 2015). Além disso, a proteína foi reconhecida por anticorpos monoclonais anti-6xHis-tag, o que determina que a proteína purificada é uma proteína recombinante. Anticorpos policlonais produzidos em camundongos contra LiHyal2 também reconheceram epítomos da proteína nativa nos venenos de *L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta*. Isso reforça a semelhança entre a proteína recombinante e a nativa, pois foram utilizados somente 10 microgramas dos venenos, e dentro do veneno a hialuronidase representa apenas 0,1% das sequências que codificam para toxinas (GREMSKI et al., 2010).

As hialuronidases recombinantes de *Loxosceles*, LiHyal2 e *Dietrich's hyaluronidase*, já mostraram atividade sobre ácido hialurônico, detectando seu grande potencial de degradação (DE-BONA et al., 2021; FERRER et al., 2013). Ensaios como o zimograma e a turbidimetria mostram de forma qualitativa e quantitativa esse potencial. Apesar da atividade, foi observado que o veneno de *L. intermedia* apresenta atividade igual ou maior do que a proteína recombinante. Isso pode parecer

contraditório uma vez que há mais massa da proteína recombinante purificada em 10 microgramas do que hialuronidase nativa em 10 microgramas do veneno. Uma das hipóteses é a de que a proteína recombinante pode ter a sua atividade enzimática diminuída após etapas de congelamento ou após um período decorrido a partir da sua purificação. Além disso, essa observação pode estar relacionada com a sinergia entre as moléculas dentro do veneno, que pode ser importante para a atividade enzimática da hialuronidase. Essa hipótese se baseia no relato de diferentes trabalhos que mostram que a formação de complexos entre as proteínas de venenos contribui significativamente para potencializar a atividade dos componentes individuais do complexo (GROTEN; FERON; SÜHNEL, 2001; XIONG; HUANG, 2018). Shen e Cho, por exemplo, demonstraram a existência de um potente sinergismo entre duas fosfolipases A₂ presentes no veneno de *Agkistrodon piscivorus piscivorus*. Neste caso, uma fosfolipase ativa (Asp-49 PLA₂) agiu sinergicamente com outra fosfolipase A (Lys-49 PLA₂) inativa permeabilizando membranas de lipídios aniônicos (SHEN; CHO, 1995).

Outra possível hipótese é de que há outras isoformas de hialuronidases presentes no veneno de *L. intermedia*, o que deixaria a atividade sobre o substrato mais perceptível. Quando o veneno de *Loxocles* é submetido a ensaios de zimograma, frequentemente são detectadas duas regiões de degradação entre 41 a 43 kDa (DA SILVEIRA et al., 2007; HOGAN; BARBARO; WINKEL, 2004)

Os efeitos biológicos da LiHyal2 relacionados com atividade alergênica também foram avaliados para verificar a viabilidade de aplicar essa enzima recombinante como produto biotecnológico com baixo potencial alergênico. Através do ensaio de permeabilidade microvascular em camundongos foi possível mostrar que LiHyal2 não causa extravasamento de proteínas plasmáticas em até uma hora. Em um ensaio semelhante, foi avaliada a capacidade da rHuPH20 (hialuronidase humana recombinante) aumentar a permeabilidade vascular através do uso do corante azul de Evans. Após 15 minutos de tratamento com a proteína foi observado que a hialuronidase não promoveu o extravasamento de proteínas do plasma, ou seja, não aumentando a permeabilidade vascular (BOOKBINDER et al., 2006). Além disso, observa-se que nos ensaios de permeabilidade vascular realizado por De-Bona et al. (2021) que LiHyal2 sozinha não foi capaz de causar o extravasamento de proteínas plasmáticas, mas quando aplicada juntamente com uma fosfolipase-D recombinante conhecidamente capaz de aumentar a permeabilidade vascular, a área do

extravasamento aumentou consideravelmente, indicando o potencial desta proteína como fator de espalhamento de outras moléculas (DE-BONA et al., 2021). Tais evidências indicam que hialuronidasas como LiHyal2 e rHuPH20 facilitam a dispersão de drogas aplicadas localmente dentro do interstício, sem alterar a integridade vascular (BOOKBINDER et al., 2006; CHAVES-MOREIRA et al., 2019; DE-BONA et al., 2021).

As alterações vasculares geralmente estão associadas a inflamação e alergia e entre as principais características destas patologias é destacado o extravasamento de fluidos e proteínas do plasma (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015; PALUDO et al., 2009). As alterações na parede vascular que levam ao aumento da permeabilidade vascular podem ser induzidas por mediadores, como a histamina e a serotonina. A histamina e a serotonina são produzidas e liberadas por mastócitos (BROWN; WILSON; METCALFE, 2008). Logo, isto corrobora com os resultados do ensaio de degranulação de mastócitos do mesentério de rato, que mostrou que a LiHyal2 não causou influência sobre mastócitos, indicando que esta proteína não tem atividade alergênica.

Este resultado, por sua vez, corrobora com os dados obtidos no ensaio de influxo de cálcio com a linhagem RBL-2H3, que foi realizado por já se saber que o aumento do cálcio intracelular é essencial para a ativação de células basófilas e mastócitos no processo alergênico (BEAVENS et al., 1984; HONG-TAO; BEAVEN, 2010). É também conhecido que a ativação de mastócitos desencadeia a liberação de mediadores inflamatórios e esses mediadores aumentam a permeabilidade vascular, causando edema, e a contração da musculatura lisa (BROWN; WILSON; METCALFE, 2008; KRISTEL-WHITTEMORE; DILEEPAN; WOOD, 2016).

Outro teste realizado para verificar o envolvimento da degranulação de mastócitos caso a LiHyal2 mostrasse atividade nos ensaios *in vivo* e *in vitro*, foi o uso do fármaco cromoglicato dissódico nesses ensaios de permeabilidade e de influxo de cálcio. O cromoglicato dissódico é um fármaco que estabiliza e inibe a degranulação de mastócitos, portanto ele evita a liberação de mediadores inflamatórios de células de basófilos e mastócitos (PUZZOVIO et al., 2022). Em ambos os ensaios foi possível verificar que qualquer atividade inflamatória ou alergênica que LiHyal2 poderia desencadear, seria inibida pelo medicamento. No entanto, não houve diferença entre os tratamentos LiHyal2 e LiHyal2 + cromoglicato tanto a nível de organismo quanto a nível celular, reforçando as evidências de que a LiHyal2 não atua em vias alergênicas.

Outro ensaio que possibilita avaliar uma resposta biológica do organismo à proteína recombinante é o edema. Foram aplicados 10 e 20 microgramas de LiHyal2 na pata de camundongos e a espessura da pata, indicando edema, foi medida entre 1 minuto e 24 horas após a aplicação.

O edema desencadeado pela liberação de mediadores inflamatórios e compostos alergênicos tem um pico muito pronunciado e de desenvolvimento muito rápido, às vezes até imediato (BOIA-FERREIRA et al., 2019; JUSTA et al., 2020). No entanto, o edema desencadeado pela LiHyal2 nos primeiros 60 minutos foi inferior ao estimulado pela fosfolipase-D, que se caracteriza pela liberação massiva de mediadores inflamatórios no tecido (APPEL et al., 2008; PALUDO et al., 2009; RIBEIRO et al., 2007). Além disso, esse edema mais baixo se manteve praticamente constante até 8 horas após a inoculação, com apenas um pico, também não pronunciado, em 2 horas. Ademais, embora após 8 horas tenha-se observado uma redução no edema, o inchaço não foi completamente liquidado como nos tratamentos com a fosfolipase-D ou PBS. Essas observações em conjunto com os dois picos de edema mais tardios que foram observados em resposta à LiHyal2 sugerem fortemente que o edema está relacionado ao metabolismo do ácido hialurônico presente no tecido (KOBAYASHI; CHANMEE; ITANO, 2020; STERN, 2004). Sugere-se que o edema causado pela hialuronidase possa estar relacionado a sua atividade hialuronidásica de clivar polímeros de ácido hialurônico da matriz extracelular, e não a reações alergênicas ou inflamatórias.

O edema pode indicar uma resposta a diversos fatores e um deles pode ser relacionado a injúria tecidual, incluindo rompimento da matriz extracelular. O ácido hialurônico presente na matriz extracelular auxilia na estabilidade e lubrificação do espaço intercelular, bem como tem influência sobre o metabolismo extracelular. Devido ao rompimento da matriz, aumenta-se a capacidade de dispersão e permeabilidade dos fluidos contidos no espaço intersticial, podendo gerar o edema (FROST, 2007; KOÇ; ER, 2018).

A literatura relata que durante a resposta à lesão, os polímeros de ácido hialurônico de alto peso molecular são rapidamente metabolizados no tecido lesionado (FRASER; LAURENT, 1989). Durante o reparo do tecido, os ácidos hialurônicos de baixo peso molecular desempenham funções como, o controle da função das células imunes inatas, promoção de angiogênese, e regulação da proliferação, diferenciação e migração celular. Estes ácidos hialurônicos de baixo

peso molecular são internalizados e degradados por hialuronidases intracelulares (VEISEH; TURLEY, 2011). Desta forma, isto indica que o primeiro pico está relacionado a atividade inicial da hialuronidase sobre a matriz extracelular degradando o ácido hialurônico e gerando ácido hialurônico de baixo peso molecular, o que sinaliza para um dano no tecido, dando início ao processo de reparo tecidual (CHAO; MUTHUKUMAR; HERZBERG, 2007; HARADA; TAKAHASHI, 2007; VEISEH; TURLEY, 2011).

O segundo pico de edema em resposta a LiHyal2 pode estar relacionado à reconstituição do ácido hialurônico da matriz extracelular. Em resposta à lesão no tecido, também ocorre a produção e o acúmulo local de ácido hialurônico devido a elevada síntese pela sintase HAS que é ativada neste processo (VEISEH; TURLEY, 2011). Estudos indicam que o ácido hialurônico é regenerado em poucas horas (FRASER; LAURENT, 1989; KOBAYASHI; CHANMEE; ITANO, 2020). Bookbinder et al. (2006) observou que após injetar a hialuronidase rHuPH20 na pele de camundongos seguida da injeção do corante azul de Tripán, em 24 horas a área do corante já tinha se difundido e estava tão claro quanto o controle, mostrando que reconstituição da barreira dérmica é feita em até 24 horas (BOOKBINDER et al., 2006). Desta forma, infere-se que LiHyal2 degrada o ácido hialurônico, gerando uma resposta para remodelação da matriz extracelular, conseqüentemente, para síntese do ácido hialurônico. Portanto, o edema do segundo pico pode estar relacionado a uma resposta ao metabolismo do ácido hialurônico da pele, desencadeando a síntese de mais ácido hialurônico (VEISEH; TURLEY, 2011). Uma vez que este polissacarídeo é hidrofílico, pode ser capaz de atrair e reter água, conseqüentemente aumentando o volume tecidual (DOVEDYTIS; LIU; BARTLETT, 2020).

Em condições fisiológicas normais, sem a injeção de hialuronidases, o ácido hialurônico é rapidamente transformado no corpo, com uma meia-vida de 15 a 20 horas na pele (FRASER; LAURENT, 1989; LAURENT; DAHL; REED, 1991). É possível que ocorra a degradação e posterior síntese do ácido hialurônico no local de aplicação da LiHyal2, e o processo edematogênico detectado durante as 24 horas do ensaio corresponde ao tempo de metabolização do ácido hialurônico e ao dano no tecido como já foi descrito na literatura (FRASER; LAURENT; LAURENT, 1997b; FRASER; LAURENT, 1989; VEISEH; TURLEY, 2011). No entanto, será necessária uma avaliação mais aprofundada desta hipótese. Para estudos futuros, seria interessante estender o tempo do ensaio de edema em pata de camundongo para

48h, isso poderá revelar uma resposta mais assertiva, a fim de se observar a reconstituição do tecido, ou seja, a redução total do edema.

A análise histológica da pele de coelho tratada com LiHyal2 corrobora com a hipótese em que a proteína recombinante causa uma resposta biológica devido a sua atividade sobre o ácido hialurônico da matriz extracelular da pele. O ácido hialurônico de baixo peso molecular tem afinidade pelo receptor de ácido hialurônico CD44(DUTERME et al., 2009; HARADA; TAKAHASHI, 2007; UNDERHILL, 1992). A ligação a este receptor promove a internalização dos fragmentos de ácido hialurônico além de um papel importante no processo do reparo tecidual, na estimulação da migração de leucócitos para o sítio lesionado e na liberação de citocinas e quimiocinas pro-inflamatórias (DOVEDYTIS; LIU; BARTLETT, 2020; KROLIKOSKI; MONSLOW; PURÉ, 2019). A promoção dessa migração leucocitária é observada pela presença de neutrófilos na pele de coelho tratada com LiHyal2. Além disso, a desorganização das fibras de colágeno da pele de coelho indica a presença de rupturas na estrutura do tecido que podem estar associadas a clivagem do ácido hialurônico. Diferentemente, LALLT, a toxina alergênica do veneno de *Loxosceles* utilizada como controle, não desencadeou uma alta migração destes leucócitos em até quatro horas de tratamento, sugerindo que o ácido hialurônico, clivado pela LiHyal2, pode estar envolvido na sinalização de injúria tecidual, promovendo a migração leucocitária (KROLIKOSKI; MONSLOW; PURÉ, 2019).

Sendo assim, através dos resultados discutidos, a proteína recombinante LiHyal2 pode ser uma forte candidata para clivagem do ácido hialurônico no reparo de tecidos injuriados, assim como coadjuvante para o espalhamento e rápida absorção de moléculas terapêuticas sem afetar a integridade vascular, e sem desencadear reações alérgicas e inflamatórias. No entanto, análises mais específicas são necessárias para verificar a resposta à proteína LiHyal2 por períodos mais longos, bem como, quanto sua capacidade de clivar ácido hialurônico da matriz extracelular. Também seria importante verificar se LiHyal2 promove estímulo a remodelação e a reconstituição do tecido, além disso, continuar avaliando respostas inflamatórias e alergênicas através de moléculas pro-inflamatórias envolvidas na alergia e inflamação tardias.

A otimização da produção da hialuronidase recombinante de *L. intermedia* deve permitir o estabelecimento de parâmetros de produção adequados para o melhor rendimento proteico em larga escala, bem como, viabilizar a obtenção da sua estrutura

cristalográfica para aplicar em simulações de dinâmica molecular no intuito de aprofundar as informações sobre a sua atividade e interação com outras moléculas.

Ainda, a clonagem domínio catalítico da hialuronidase é um avanço para a otimização da produção da proteína, uma vez que sistemas de expressão bacterianos ainda continuam sendo uma opção de menor custo e que fornece altos rendimentos proteicos, e a eliminação de 3 possíveis pontes dissulfeto na proteína pode viabilizar a expressão dessa molécula em sistemas bacterianos. Além disso, é possível que o domínio catalítico da hialuronidase possa gerar respostas biológicas diferentes da LiHyal2, pois não está clara a função do domínio EGF-*like* na hialuronidase. Um estudo sobre uma toxina (Mg1a) do veneno da formiga *Myrmecia gulosa* mostrou que Mg1a pode ser um ligante do receptor ErbB1 de mamífero, pois este peptídeo mimetiza fatores de crescimento epidérmico EGF-*like* de hormônios de vertebrados. A toxina também foi capaz de causar hipersensibilidade em camundongos após injeção intraplantar até 4 dias depois da aplicação (EAGLES et al., 2022). Isto indica que domínios como EGF-*like* presentes em toxinas do veneno de invertebrados podem ser possíveis mimetizadores de moléculas humanas, podendo ser utilizados para fins terapêuticos. Neste raciocínio, LiHyal2 tem este domínio EGF-*like* semelhante ao da hialuronidase humana hHyal-1, e é possível que possua homologia significativa a ponto de estimular respostas semelhantes ao da hHyal-1 (DE-BONA et al., 2021). Sendo assim, estudos comparando a LiHyal2 com domínio catalítico permitirão avaliar as diferenças e similaridades entre as repostas biológicas, elucidando a função deste domínio EGF-*like*, bem como possíveis descobertas sobre interações com receptores e vias celulares em mamíferos.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A adição fracionada da titulação viral em dois tempos diferentes da expressão, bem como a adição de meio de cultura fresco durante este período foram essenciais para o aumento do rendimento da produção da LiHyal2. O segundo protocolo estabelecido, adicionando titulação viral em 0h e 72h, com 144h de expressão e adição de meio fresco no período gerou o melhor rendimento, sendo obtidos 12mg/L de LiHyal2. Isto permitirá que a LiHyal2 seja submetida a mais análises, como a produção da estrutura cristalográfica, para sejam feitos estudos *in silico* com a proteína.

A proteína LiHyal2 foi detectada através de anticorpos que reconhecem proteínas com cauda histidina e toxinas presentes no veneno loxoscélico, confirmando a produção da proteína. Anticorpos produzidos contra LiHyal2 também reconheceram epítomos da hialuronidase nativa nos venenos de *L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta*, indicando que hialuronidase é uma proteína bem conservada entre os venenos loxoscélicos.

Foi detectada a atividade da LiHyal2 através de ensaios de turbidimetria e zimograma. LiHyal2 apresentou atividade enzimática menos pronunciada em relação ao veneno *L. intermedia*. Desta forma, é necessário verificar a estabilidade dessa proteína recombinante em solução como, por exemplo, em testes utilizando outros protocolos de conservação desta enzima.

Através de ensaios para avaliar respostas biológicas frente a LiHyal2 foi concluído que LiHyal2 por si só não causa inflamações ou alergia. Não age sobre mastócitos, basófilos, não altera a estabilidade dos vasos, não desencadeia influxo de cálcio e nem causa edema exacerbado. O edema dose-dependente verificado em resposta a LiHyal2 está provavelmente relacionado a clivagem e degradação do ácido hialurônico da matriz extracelular presente no tecido. Ou seja, a inflamação que foi detectada através da análise histológica, pode ser causada pelo ácido hialurônico clivado que sinaliza para um dano tecidual. No entanto, estudos mais aprofundados devem ser realizados para confirmar esta hipótese.

A sequência que codifica para o domínio catalítico da hialuronidase de *L. intermedia* foi obtida com sucesso. Os próximos passos ainda são pertinentes para obtenção do domínio catalítico e estudo da sua atividade. A conclusão desta etapa poderá levar a novas descobertas sobre a estrutura e função das hialuronidases do veneno de *Loxosceles*.

Portanto, sugere-se também estudos que incluam a aplicabilidade da LiHyal2 em contextos terapêuticos, como degradação de preenchimentos de ácido hialurônico, coadjuvante para difusão e absorção de moléculas bioativas, tratamento de injúrias teciduais, incluindo edema e cicatrização de tecidos.

7 REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. *Imunologia Celular e Molecular - Abbas 8ed-2. Elsevier Editora Ltda*, n. 8, 2015.

ABDEL-MONSEF, M. M. et al. Biochemical isolation and characterization of hyaluronidase enzyme from venom of egyptian honey bee *apis mellifera lamarckii*. **Journal of Apicultural Science**, v. 64, n. 1, p. 153–164, 1 jun. 2020.

AHMED, E. M. Enhancement of the hyaluronidase production from isolated *Staphylococcus aureus* using factorial design technique and partial purification. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 102, p. 180–187, 1 abr. 2014.

ALBERTS, B. et al. **Biologia molecular da célula**. [s.l: s.n.].

AMPHASTAR PHARMACEUTICALS INC. **Amphadase [package insert]**. Disponível em: <https://www.amphastar.com/assets/amphadase_01-800-03.pdf>. Acesso em: 20 ago. 2022.

ANGELOTTI, F. et al. Long-term efficacy, safety, and tolerability of recombinant human hyaluronidase-facilitated subcutaneous infusion of immunoglobulin (Ig) (fSCIG; HyQvia®) in immunodeficiency diseases: real-life data from a monocentric experience. **Clinical and Experimental Medicine**, v. 20, n. 3, p. 387–392, 1 ago. 2020.

APPEL, M. H. et al. Identification, cloning and functional characterization of a novel dermonecrotic toxin (phospholipase D) from brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1780, n. 2, p. 167–178, 1 fev. 2008.

BEAVENS, M. A. et al. The Mechanism of the Calcium Signal and Correlation with Histamine Release in 2H3 Cells. v. 259, n. 11, p. 7129–7136, 1984.

BHAVYA, J. et al. Low-molecular weight hyaluronidase from the venom of *Bungarus caeruleus* (Indian common krait) snake: Isolation and partial characterization. <http://dx.doi.org/10.1080/10826076.2016.1144203>, v. 39, n. 4, p. 203–208, 25 fev. 2016.

BOIA-FERREIRA, M. et al. TCTP from *Loxosceles Intermedia* (Brown Spider) Venom Contributes to the Allergic and Inflammatory Response of Cutaneous Loxoscelism. **Cells**, v. 8, n. 12, 22 nov. 2019.

BOOKBINDER, L. H. et al. A recombinant human enzyme for enhanced interstitial transport of therapeutics. **Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society**, v. 114, n. 2, p. 230–241, 28 ago. 2006.

BORDERS, C. L.; RAFTERY, M. A. Purification and Partial Characterization of Testicular Hyaluronidase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 243, n. 13, p. 3756–3762, 10 jul. 1968.

- BORDON, K. C. F. et al. Arthropod venom Hyaluronidases: Biochemical properties and potential applications in medicine and biotechnology. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, 2015.
- BROWN, J. M.; WILSON, T. M.; METCALFE, D. D. The mast cell and allergic diseases: role in pathogenesis and implications for therapy. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 38, n. 1, p. 4–18, 1 jan. 2008.
- BROWN, T. A. Aplicações da Clonagem Gênica e da Análise de DNA na Biotecnologia. In: **Clonagem gênica e análise de DNA: uma introdução**. 4. ed. [s.l.: s.n.]. p. 275–346.
- BUCH, D. R. et al. Brown spider (*Loxosceles* genus) venom toxins: Evaluation of biological conservation by immune cross-reactivity. **Toxicon**, v. 108, p. 154–166, 15 dez. 2015.
- BUHREN, B. A. et al. Standardized in vitro analysis of the degradability of hyaluronic acid fillers by hyaluronidase. **European Journal of Medical Research**, v. 23, n. 1, jan. 2018.
- CAVALLINI, M. et al. The Role of Hyaluronidase in the Treatment of Complications From Hyaluronic Acid Dermal Fillers. **Aesthetic Surgery Journal**, v. 33, n. 8, p. 1167–1174, 1 nov. 2013.
- CHAIN, E.; DUTHIE, E. S. **A mucolytic enzyme in testis extracts [2]**. **Nature**, jan. 1939. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/144977b0>>
- CHAO, K. L.; MUTHUKUMAR, L.; HERZBERG, O. Structure of human hyaluronidase-1, a hyaluronan hydrolyzing enzyme involved in tumor growth and angiogenesis. **Biochemistry**, v. 46, n. 23, p. 6911–6920, 2007.
- CHAVES-MOREIRA, D. et al. **Highlights in the knowledge of brown spider toxins**. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases** BioMed Central Ltd., , jan. 2017.
- CHAVES-MOREIRA, D. et al. **Brown spider (*Loxosceles*) venom toxins as potential biotools for the development of novel therapeutics**. **Toxins** MDPI AG, , jan. 2019.
- CLAESSON-WELSH, L.; DEJANA, E.; MCDONALD, D. M. Permeability of the Endothelial Barrier: Identifying and Reconciling Controversies. **Trends in Molecular Medicine**, v. 27, n. 4, p. 314–331, 1 abr. 2021.
- CONTRERAS-GÓMEZ, A. et al. Protein production using the baculovirus-insect cell expression system. **Biotechnology Progress**, v. 30, n. 1, p. 1–18, 1 jan. 2014.
- CRAMER, J. A. et al. Kinetic and mechanistic studies with bovine testicular hyaluronidase. **BBA - General Subjects**, 1994.
- DA SILVEIRA, R. B. et al. Hyaluronidases in *Loxosceles intermedia* (Brown spider) venom are endo- β -N-acetyl-d-hexosaminidases hydrolases. **Toxicon**, v. 49, n. 6, p. 758–768, jan. 2007.

DE CASTRO, C. S. et al. Identification and molecular cloning of insecticidal toxins from the venom of the brown spider *Loxosceles intermedia*. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 44, n. 3, p. 273–280, 1 set. 2004.

DE-BONA, E. et al. Production of a novel recombinant brown spider hyaluronidase in baculovirus-infected insect cells. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 146, p. 109759, 1 maio 2021.

DOVEDYTIS, M.; LIU, Z. J.; BARTLETT, S. Hyaluronic acid and its biomedical applications: A review. **Engineered Regeneration**, v. 1, p. 102–113, 1 jan. 2020.

DUTERME, C. et al. Two novel functions of hyaluronidase-2 (Hyal2) are formation of the glycocalyx and control of CD44-ERM interactions. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 48, p. 33495–33508, 2009.

EAGLES, D. A. et al. A peptide toxin in ant venom mimics vertebrate EGF-like hormones to cause long-lasting hypersensitivity in mammals. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 119, n. 7, p. e2112630119, 15 fev. 2022.

FEITOSA, L. et al. **DETECTION AND CHARACTERIZATION OF METALLOPROTEINASES WITH GELATINOLYTIC, FIBRONECTINOLYTIC AND FIBRINOGENOLYTIC ACTIVITIES IN BROWN SPIDER (LOXOSCELES INTERMEDIA) VENOM***Toxicon*. [s.l.: 1998.

FERRER, V. P. et al. A Novel Hyaluronidase from Brown Spider (*Loxosceles intermedia*) Venom (Dietrich's Hyaluronidase): From Cloning to Functional Characterization. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 5, p. 1–12, 2013.

FRASER, J. R. E.; LAURENT, T. C.; LAURENT, U. B. G. **Hyaluronan: Its nature, distribution, functions and turnover**. *Journal of Internal Medicine*. **Anais...**1997a.

FRASER, J. R. E.; LAURENT, T. C.; LAURENT, U. B. G. **Hyaluronan: Its nature, distribution, functions and turnover**. *Journal of Internal Medicine*. **Anais...**1997b.

FRASER, J. R.; LAURENT, T. C. Turnover and metabolism of hyaluronan. **Ciba Foundation Symposium**, v. 143, p. 41–53; discussion 53, 1 jan. 1989.

FROST, G. I. et al. Purification, Cloning, and Expression of Human Plasma Hyaluronidase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 236, n. 1, p. 10–15, 9 jul. 1997.

FROST, G. I. Recombinant human hyaluronidase (rHuPH20): an enabling platform for subcutaneous drug and fluid administration. <http://dx.doi.org/10.1517/17425247.4.4.427>, v. 4, n. 4, p. 427–440, jul. 2007a.

FROST, G. I. Recombinant human hyaluronidase (rHuPH20): an enabling platform for subcutaneous drug and fluid administration. <http://dx.doi.org/10.1517/17425247.4.4.427>, v. 4, n. 4, p. 427–440, jul. 2007b.

FUNK, C. J.; BRAUNAGEL, S. C.; ROHRMANN, G. F. Baculovirus Structure. **The Baculoviruses**, p. 7–32, 1997.

FUTRELL, J. M. Loxoscelism. **The American Journal of the Medical Sciences**, v. 304, p. 261–267, 1992.

GAO, J. J. et al. FDA approval summary: Pertuzumab, trastuzumab, and hyaluronidase-zzxf injection for subcutaneous use in patients with HER2-positive breast cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 27, n. 8, p. 2126–2129, 1 abr. 2021.

GARANTZIOTIS, S.; SAVANI, R. C. Hyaluronan biology: A complex balancing act of structure, function, location and context. **Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology**, v. 78–79, p. 1, 1 maio 2019.

GERTSCH, W. J. THE SPIDER GENUS LOXOSCELES IN SOUTH AMERICA (ARANEAE, SCYTODIDAE). **Nature**, v. 136, n. 2830, p. 121–170, 1967.

GIRISH, K. S.; KEMPARAJU, K. **The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: A biological overview**. **Life Sciences**Life Sci jan. 2007.

GOMES AGUIAR, V. et al. Caracterização de acidentes provocados por Aranha Marrom (*Loxosceles* sp). **Revista de Casos e Consultoria**, v. 12, n. 1, p. e22513–e22513, 22 fev. 2021.

GOTOH, T. et al. Significant increase in recombinant protein production of a virus-infected Sf-9 insect cell culture of low MOI under low dissolved oxygen conditions. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 94, n. 5, p. 426–433, 1 jan. 2002.

GREMSKI, L. H. et al. A novel expression profile of the *Loxosceles intermedia* spider venomous gland revealed by transcriptome analysis. **Molecular BioSystems**, v. 6, n. 12, p. 2403–2416, jan. 2010.

GREMSKI, L. H. et al. Recent advances in the understanding of brown spider venoms: From the biology of spiders to the molecular mechanisms of toxins. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 83, p. 91–120, 1 jun. 2014.

GREMSKI, L. H. et al. Brown spider venom toxins: what are the functions of astacins, serine proteases, hyaluronidases, allergens, TCTP, serpins and knottins? **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 27, p. 20201088, 12 jul. 2021.

GROTEN, J. P.; FERON, V. J.; SÜHNEL, J. Toxicology of simple and complex mixtures. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 22, n. 6, p. 316–322, 1 jun. 2001.

HAN, J. H. et al. Treatment of post-traumatic hematoma and fibrosis using hyaluronidase injection. **Archives of Craniofacial Surgery**, v. 19, n. 3, p. 218, 20 set. 2018.

HARADA, H.; TAKAHASHI, M. CD44-dependent intracellular and extracellular catabolism of hyaluronic acid by hyaluronidase-1 and -2. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 8, p. 5597–5607, 23 fev. 2007.

HARRISON, R. A. P. Hyaluronidase in ram semen. Quantitative determination, and isolation of multiple forms. **Biochemical Journal**, v. 252, n. 3, p. 865, 6 jun. 1988.

HO, Y. et al. Enhancement of correct protein folding in vivo by a non-lytic baculovirus. **Biochemical Journal**, v. 382, n. 2, p. 695–702, 1 set. 2004.

HOGAN, C. J.; BARBARO, K. C.; WINKEL, K. **Loxoscelism: Old obstacles, new directions. Annals of Emergency Medicine** Mosby Inc., , 2004.

HONG-TAO, M.; BEAVEN, M. A. REGULATORS OF CA²⁺ SIGNALING IN MAST CELLS Potential Targets for Treatment of Mast-Cell Related Diseases? In: GILFILLAN, A. M.; METCALFE, D. D. . (Eds.). **Ma Hong-Tao and Michael A Beaven**. [s.l: s.n.].

HOUCK, J. C.; CHANG, C. M. Permeability factor contaminating hyaluronidase preparations. **Inflammation**, v. 3, n. 4, p. 447–451, set. 1979.

HUMPHREY, J. D.; DUFRESNE, E. R.; SCHWARTZ, M. A. **Mechanotransduction and extracellular matrix homeostasis. Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 2014.

IKONOMOU, L.; SCHNEIDER, Y. J.; AGATHOS, S. N. Insect cell culture for industrial production of recombinant proteins. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 62, n. 1, p. 1–20, jul. 2003.

IRONS, S. L. et al. Protein Production using the Baculovirus Expression System. **Current Protocols in Protein Science**, v. 91, n. 1, p. 5.5.1-5.5.22, 1 jan. 2018.

JUHÁSZ, M. L. W.; LEVIN, M. K.; MARMUR, E. S. The Kinetics of Reversible Hyaluronic Acid Filler Injection Treated with Hyaluronidase. **Dermatologic Surgery**, v. 43, n. 6, p. 841–847, jan. 2017.

JUSTA, H. C. DA et al. LALLT (Loxosceles Allergen-Like Toxin) from the venom of *Loxosceles intermedia*: Recombinant expression in insect cells and characterization as a molecule with allergenic properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 164, p. 3984–3999, 1 dez. 2020.

KNOWLES, S. P. et al. Safety of recombinant human hyaluronidase PH20 for subcutaneous drug delivery. <https://doi.org/10.1080/17425247.2021.1981286>, v. 18, n. 11, p. 1673–1685, 2021.

KOBAYASHI, T.; CHANMEE, T.; ITANO, N. Hyaluronan: Metabolism and Function. **Biomolecules 2020, Vol. 10, Page 1525**, v. 10, n. 11, p. 1525, 7 nov. 2020.

KOÇ, O.; ER, N. Can Hyaluronidase Be an Alternative Postoperative Anti-edema Agent to Dexamethasone? Preliminary Results of an Animal Study. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 76, n. 8, p. 1653–1659, 1 ago. 2018.

KROLIKOSKI, M.; MONSLOW, J.; PURÉ, E. The CD44-HA axis and inflammation in atherosclerosis: A temporal perspective. **Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology**, v. 78–79, p. 201–218, 1 maio 2019.

KRYSTEL-WHITTEMORE, M.; DILEEPAN, K. N.; WOOD, J. G. Mast cell: A multi-functional master cell. **Frontiers in Immunology**, v. 6, n. JAN, p. 620, 2016.

KWAK, S. S. et al. Comparative Analysis of Hyaluronidase-Mediated Degradation Among Seven Hyaluronic Acid Fillers in Hairless Mice. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology**, v. 14, p. 241, 2021.

LAURENT, U.; DAHL, L.; REED, R. Catabolism of hyaluronan in rabbit skin takes place locally, in lymph nodes and liver. **Experimental physiology**, v. 76, n. 5, p. 695–703, 1 set. 1991.

LOCKE, K. W.; MANEVAL, D. C.; LABARRE, M. J. **ENHANZE® drug delivery technology: a novel approach to subcutaneous administration using recombinant human hyaluronidase PH20**. **Drug Delivery**, 2019.

MALAUQUE, C. M. S. et al. Loxosceles and Loxoscelism: Biology, Venom, Envenomation, and Treatment. In: **Spider Venoms**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2016. p. 419–444.

MCATEE, C. O.; TAKAGAKI, K. **Hyaluronan Signaling and Turnover Biochemistry of Glycoconjugate Gly-cans; Carbohydrate-Mediated Interactions Hyaluronidase from stonefish**. [s.l: s.n.].

MEYER, K. Hyaluronidases. **Enzymes**, 1971.

MEYER, K.; RAPPORT, M. M.; YORK, N. **H Y ALURONIDASES***. [s.l: s.n.].

MISRA, S. et al. Interactions between hyaluronan and its receptors (CD44, RHAMM) regulate the activities of inflammation and cancer. **Frontiers in Immunology**, v. 6, n. MAY, 2015.

NOWATZKI, J. et al. Brown spider venom toxins interact with cell surface and are endocytosed by rabbit endothelial cells. **Toxicon**, v. 56, n. 4, p. 535–543, 15 set. 2010.

OETTL, M. et al. Comparative characterization of bovine testicular hyaluronidase and a hyaluronate lyase from *Streptococcus agalactiae* in pharmaceutical preparations. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 18, n. 3–4, p. 267–277, 2003.

OKANO, K. et al. Conserved molecular systems of the Baculoviridae. **Virology**, v. 344, n. 1, p. 77–87, 5 jan. 2006.

ORS, S. The Effect of Hyaluronidase on Depth of Necrosis in Hyaluronic Acid Filling-Related Skin Complications. **Aesthetic plastic surgery**, v. 44, n. 5, p. 1778–1785, 1 out. 2020.

OSPEDAL, K. Z. et al. Histopathological findings in rabbits after experimental acute exposure to the *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 83, n. 6, p. 287–294, 1 dez. 2002.

PALUDO, K. S. et al. Inflammatory events induced by brown spider venom and its recombinant dermonecrotic toxin: A pharmacological investigation. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 149, n. 3, p. 323–333, 1 abr. 2009.

PARK, C. et al. Development of a New Type of Recombinant Hyaluronidase Using a Hexahistidine; Possibilities and Challenges in Commercialization. **Journal of microbiology and biotechnology**, 2019.

PESSINI, A. C. et al. A hyaluronidase from *Tityus serrulatus* scorpion venom: isolation, characterization and inhibition by flavonoids. **Toxicon**, v. 39, n. 10, p. 1495–1504, 1 out. 2001.

PUZZOVIO, P. G. et al. Cromolyn Sodium differentially regulates human mast cell and mouse leukocyte responses to control allergic inflammation. **Pharmacological Research**, v. 178, p. 106172, 1 abr. 2022.

RIBEIRO, R. O. S. et al. Biological and structural comparison of recombinant phospholipase D toxins from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 50, n. 8, p. 1162–1174, 15 dez. 2007.

RUPPERT, S. M. et al. Tissue integrity signals communicated by high-molecular weight hyaluronan and the resolution of inflammation. **Immunologic research**, v. 58, n. 0, p. 186, 2014.

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. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 44, n. 1, p. 170–177, 1 jan. 2012.

SCHEMCZSSEN-GRAEFF, Z. et al. Description of a serpin toxin in *Loxosceles* (Brown spider) venoms: Cloning, expression in baculovirus-infected insect cells and functional characterization. **International journal of biological macromolecules**, v. 183, p. 1607–1620, 31 jul. 2021.

SHEN, Z.; CHO, W. Membrane leakage induced by synergetic action of Lys-49 and Asp-49 Agkistrodon piscivorus piscivorus phospholipases A2: Implications in their pharmacological activities. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 27, n. 10, p. 1009–1013, 1 out. 1995.

SILVA, P. H. DA et al. **Brown spiders and loxoscelism**. **Toxicon**, jan. 2004.

SINDELAR, M. et al. Hyaluronidases and hyaluronate lyases: From humans to bacteriophages. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 208, p. 112095, 1 dez. 2021.

SLACK, J.; ARIF, B. M. The Baculovirus Occlusion-Derived Virus: Virion Structure and Function. **Advances in Virus Research**, v. 69, p. 99–165, 1 jan. 2006.

SMITH, G. E.; SUMMERS, M. D.; FRASER, M. Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. **Molecular and Cellular Biology**, v. 3, n. 12, p. 2156–2165, 1983.

SOLDATOVA, L. N. et al. Superior biologic activity of the recombinant bee venom allergen hyaluronidase expressed in baculovirus-infected insect cells as compared

with *Escherichia coli*. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 101, n. 5, p. 691–698, jan. 1998.

STERN, R. Hyaluronan catabolism: A new metabolic pathway. **European Journal of Cell Biology**, 2004.

SUTTI, R. et al. Purification and characterization of a hyaluronidase from venom of the spider *Vitalius dubius* (Araneae, Theraphosidae). **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 20, n. 1, p. 1–7, 4 fev. 2014.

SWANSON, D. L.; VETTER, R. S. Loxoscelism. **Clinics in Dermatology**, v. 24, n. 3, p. 213–221, jan. 2006.

UNDERHILL, C. **CD44: The hyaluronan receptor**. **Journal of Cell Science**, 1992.

VAN OERS, M. M.; PIJLMAN, G. P.; VLAK, J. M. Thirty years of baculovirus-insect cell protein expression: from dark horse to mainstream technology. **The Journal of general virology**, v. 96, n. Pt 1, p. 6–23, 1 jan. 2015.

VEIGA, S. S. et al. Extracellular matrix molecules as targets for brown spider venom toxins. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 34, n. 7, p. 843–850, 2001.

VEISEH, M.; TURLEY, E. A. Hyaluronan metabolism in remodeling extracellular matrix: probes for imaging and therapy of breast cancer. **Integrative biology: quantitative biosciences from nano to macro**, v. 3, n. 4, p. 304–315, abr. 2011.

VETTER, R. S. **Spiders of the genus *Loxosceles* (Araneae, Sicariidae): a review of biological, medical and psychological aspects regarding envenomations**. , 2008.

VISTEJNOVA, L. et al. Low molecular weight hyaluronan mediated CD44 dependent induction of IL-6 and chemokines in human dermal fibroblasts potentiates innate immune response. **Cytokine**, v. 70, n. 2, p. 97–103, 1 dez. 2014.

WASHINGTON, P. M. et al. Hyaluronidase reduced edema after experimental traumatic brain injury. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 40, n. 10, p. 2026–2037, 1 out. 2020.

WILLIAMS, G. V.; FAULKNER, P. Cytological Changes and Viral Morphogenesis during Baculovirus Infection. **The Baculoviruses**, p. 61–107, 1997.

WRIGHT, R. P. et al. Hyaluronidase and esterase activities of the venom of the poisonous brown recluse spider. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 1973.

XIONG, S.; HUANG, C. Synergistic strategies of predominant toxins in snake venoms. **Toxicology Letters**, v. 287, p. 142–154, 1 maio 2018.

YUE, B. **Biology of the extracellular matrix: An overview**. **Journal of Glaucoma**, 2014.