

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DILZA TREVISAN SILVA

METALOPROTEASES DO TIPO ASTACINAS SÃO UMA FAMÍLIA DE TOXINAS
CONSERVADAS EM VENENOS DE DIFERENTES ESPÉCIES DE ARANHAS
MARRONS (GÊNERO *Loxosceles*)

CURITIBA

2009

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

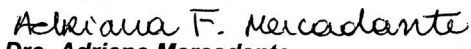
Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fisiologia
Setor de Ciências Biológicas
Universidade Federal do Paraná
Instituto de Biologia Molecular do Paraná

PARECER

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


Dra. Andrea Senff Ribeiro

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


Dra. Adriana Mercadante
(Universidade Federal do Paraná - UFPR)


Dr. Christian Macagnan Probst
(Instituto Carlos Chagas - Fiocruz)

Como Suplente:

Dr. Rubens Brtszolli Filho
(Universidade Federal do Paraná - UFPR)

Após argüir o(a) mestrando(a) **Dilza Trevisan Silva** em relação ao seu trabalho de dissertação intitulada: "**Metaloproteases do tipo astacinas são uma família de toxinas conservadas em venenos de diferentes espécies de aranhas marrons (Gênero *Loxosceles*)**", é de parecer favorável à **Aprovação** do(a) acadêmico(a), habilitando-o(a) ao título de **Mestre** em Biologia Celular e Molecular, área de concentração em **Biologia Celular e Molecular**.

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


Silvio Sanches Veiga
Coordenador do Curso

Curitiba, 19 de outubro de 2009



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DILZA TREVISAN SILVA

METALOPROTEASES DO TIPO ASTACINAS SÃO UMA FAMÍLIA DE TOXINAS
CONSERVADAS EM VENENOS DE DIFERENTES ESPÉCIES DE ARANHAS
MARRONS (GÊNERO *Loxosceles*)

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

Orientadora: Prof^a. Dra. Andrea Senff Ribeiro.

Co-Orientador: Prof. Dr. Silvio Sanches Veiga.

CURITIBA

2009

Trevisan-Silva, Dilza

METALOPROTEASES DO TIPO ASTACINAS SÃO UMA FAMÍLIA DE TOXINAS CONSERVADAS EM VENENOS DE DIFERENTES ESPÉCIES DE ARANHAS MARRONS (GÊNERO *Loxosceles*) – Curitiba, 2009.

82 p.

Orientadora: Prof^a. Dra. Andrea Senff Ribeiro.

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

1. *Loxosceles*. 2. Veneno. 3. Metaloprotease. 4. Astacina.

Aos meus pais, irmãos
e à tia Di, por todos os ensinamentos,
pela dedicação e imensa confiança
depositadas em mim, por sempre me
apoiarem, por me incentivarem a lutar
pelos meus sonhos, pelo amor
incondicional! Vocês são meus grandes
exemplos, com vocês aprendi o que é
viver e não apenas existir!

Em especial à minha
mãe por ser a melhor mãe do mundo em
absolutamente todos os momentos!

AGRADECIMENTOS

A Deus por todas as oportunidades e por colocar todas estas pessoas na minha vida!

À minha orientadora, Prof^ª Dra Andrea Senff Ribeiro, pelo exemplo de dedicação, ética e seriedade com que conduz todas suas atividades profissionais, pelo envolvimento com a realização dessa dissertação, pelas sugestões e pelos ensinamentos experimentais, científicos e de escrita ao longo do desenvolvimento do projeto, pela disciplina de docência, pelo total apoio às minhas idéias quase geniais e às nada geniais também, por ter sido sua primeira orientada e desejo que tenha sido o início de uma carreira profissional com futuro brilhante para ela. Se fosse “somente” isso, já teria sido ótimo, mas agradeço mais ainda à amiga Andrea! Pelo convívio ao longo desses anos, por dividirmos todas as angústias e alegrias, por aprendermos muitas coisas juntas, por todos os momentos de descontração (sextas à tarde, jantares, chácara, etc...) e por todos os seus conselhos!

Ao meu (co-) orientador, Prof. Dr. Silvio Sanches Veiga, pela oportunidade de crescimento profissional, pelo acompanhamento direto do desenvolvimento desse projeto, por ter sido solícito em todos os momentos, por ser exemplo de dedicação e competência, pela incansável pergunta: e esse artigo sai ou não sai? Agradeço também pela amizade, pela tentativa de aprimorarmos o velho conhecido “lambari frito”, pelas músicas de raiz e pelas histórias de infância.

Ao Prof. Dr. Waldemiro Gremski por ter tornado possível a existência desse grupo de pesquisa, pelos incentivos durante minha iniciação científica, pelas ótimas aulas ministradas e pela dedicação à ciência brasileira.

À Prof^ª. Dra Katia Cristina Barbaro do Instituto Butantan, pela colaboração com projetos do laboratório, pelos conselhos e auxílios técnicos e científicos, pela doação dos soros anti-venenos, pela revisão do manuscrito, enfim, pela amizade científica.

Ao Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos do Paraná, em especial à Isolete Pauli e ao Prof. Minoso por contribuir com o desenvolvimento desse trabalho e nos conceder espécimes de aranhas. Espero que esse seja o começo de uma parceria sólida e duradoura.

À amiga e doutoranda Luiza Helena Gremski (Lu!), pela amizade, pela dedicação ao projeto, pelo empenho com os vários sequenciamentos e análises, pela paciência em me ensinar, pelos conselhos profissionais e pessoais.

Ao Rafael, que com seu trabalho de doutorado e dedicação à ciência, possibilitou a existência desse e demais trabalhos do LME. Agradeço também pelos esclarecimentos de dúvidas e por todas as sugestões.

ESPECIALMENTE aos queridos amigos do LME:

Olga (Cha), Luiza (Lu), Youssef (You), Valéria (Val), Danielle (Dani), Katia (canaaaaalha!), Fernando (juniorzinho!), Jenifer (juniorzinha!), Isabela (Isa), Thiago (zica!), Fernanda (Fer a), Gabriel (Gaybriel!!!), Bruna, Mariana. Todos vocês foram ESSENCIAIS para a realização e conclusão dessa etapa importantíssima na minha vida. Vocês participaram das minhas aflições e felicidades, desde a expectativa de aprovação na prova do mestrado até a comemoração daqueles resultados de experimentos TÃO esperados. Cada um de vocês é responsável pela agradável convivência que existe no LME, pela cumplicidade em todos os momentos, por jamais precisar pedir ajuda porque sempre existia pelo menos um de vocês ao lado disposto a ficar até altas horas no lab. Muito obrigada pelas ótimas discussões (científicas, filosóficas, humanísticas), pelo ócio criativo, pelas festas, pela espera na fila do RU, pelos cafés, enfim; pela amizade, respeito e carinho de todos. Jamais esqueçam que podem contar comigo para qualquer situação!

Às minhas queridas amigas: Luciane, Fer Tanaka, Mariah, Nathalia, Mariana, Maria Luiza e ao ótimo amigo Fábio por absolutamente todos os momentos, pela amizade de todos esses anos, por me incentivarem e por serem sempre ótimas companhias!!

A todos do Laboratório de Neurobiologia pelos empréstimos de reagentes, equipamentos e tempo! Pelas prazerosas conversas de corredor – fossem elas científicas ou não – pelas festas, pela cumplicidade. Especialmente, à Chelin que é uma amiga ótima, sincera, companheira! E à Marcia que foi uma das “culpadas” por eu estar nessa carreira (junto com incentivo da Olga), por ter aberto meus olhos em muitos momentos com conselhos extremamente sábios.

A todos os professores do programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular pelos ensinamentos. Especialmente, ao Prof. Edvaldo e Prof^a. Sônia pela avaliação criteriosa e sugestões feitas na defesa do projeto dessa dissertação.

Aos professores do Departamento de Bioquímica, em especial, à Prof^a. Leda, à Prof^a. Elaine e à Prof^a. Maria Benigna (*in memoriam*). Acredito que elas até mesmo sem saber contribuíram muito para minha formação profissional e pessoal.

Aos professores e alunos do ICC (Instituto Carlos Chagas), pela dedicação às disciplinas ofertadas, pelo comprometimento com o preparo e qualidade das aulas, pelas ótimas discussões científicas.

À Prof^a. Dra. Adriana Mercadante por acompanhar meu desenvolvimento desde a iniciação científica, por estar sempre disposta a ajudar e por ter aceitado prontamente em fazer parte da banca examinadora dessa dissertação.

Ao Prof. Dr. Christian Probst pelos conselhos científicos, pelo incentivo com bioinformática e também por ter aceitado prontamente em fazer parte da banca examinadora dessa dissertação.

À Marlene, secretária do programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular.

Ao Biotério do Setor de Ciências Biológicas, em especial ao Luiz, ao Candido e à Iselen.

Ao Sr. Luiz e ao Sr. Tião, porteiros do Setor de Ciências Biológicas, por sempre me acolher com um alegre bom dia e pelo carinho de cuidar de todos do LME nas horas extras, sempre preocupados com nossa segurança.

À CAPES, Fundação Araucária, FAPESP, SETI e ao CNPq pelo apoio financeiro.

Ao povo brasileiro que financia a UFPR e torna possível a formação de tantos profissionais!!

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

Muito Obrigada!!

Só sei que nada sei.

Sócrates

RESUMO

No estado do Paraná, os acidentes com aranhas marrons (gênero *Loxosceles*) são problema de saúde pública, em especial na cidade de Curitiba e Região Metropolitana que são consideradas áreas endêmicas para o loxoscelismo. O veneno de *Loxosceles* é composto por uma mistura de toxinas, na sua maioria protéica, capazes de causar lesões dermonecroticas com espalhamento gravitacional e manifestações sistêmicas como agregação plaquetária, anemia hemolítica e falência renal aguda. Nos venenos de aranhas do gênero *Loxosceles* foram descritas toxinas como fosfolipases-D, hialuronidases e metaloproteases, entre outras. As metaloproteases já foram descritas em venenos de diferentes espécies, como exemplo: *L. intermedia*, *L. reclusa*, *L. deserta*, *L. rufescens*, *L. gaucho* e *L. laeta* e acredita-se que tenham participações nos distúrbios hemostáticos descritos após o envenenamento, além de poderem ser um fator de espalhamento das demais toxinas do veneno devido sua ação proteolítica frente aos componentes da matriz extracelular. As espécies de maior importância clínica são: *L. intermedia*, *L. laeta* e *L. gaucho*, sendo a espécie *L. intermedia* de maior distribuição no estado do Paraná e a principal espécie relacionada com acidentes no município de Curitiba. Através de técnicas de biologia molecular, foi mostrado que uma metaloprotease presente no veneno de *L. intermedia* (a LALP1 - *Loxosceles* Astacin-like Protease) pertence à família das astacinas, diferente das metaloproteases de venenos de outros animais, como as de serpentes que pertencem à família das adamalisinases. A LALP1 foi a primeira enzima da família das astacinas descrita como constituinte de venenos animais. O presente estudo identificou, através de análise de diferentes clones de uma biblioteca de cDNA de glândulas de veneno de *L. intermedia*, duas novas isoformas de astacinas presentes no veneno de *L. intermedia*, denominadas LALP2 e LALP3. Os imunoensaaios realizados com venenos das outras duas principais espécies do Paraná, *L. laeta* e *L. gaucho*, mostraram a existência de proteínas nativas relacionadas à LALP1 e que tais proteínas apresentavam atividade gelatinolítica que foi inibida por 1,10-fenantroline (quelante de metal divalente), confirmando atividade metaloproteásica. Extrações de RNA total de glândulas de veneno de *L. laeta* e *L. gaucho* foram realizadas, os cDNAs obtidos utilizando oligonucleotídeos iniciadores para sequência da LALP1 foram sequenciados e identificou-se que esses cDNAs codificavam metaloproteases da família das astacinas, tais proteínas foram denominadas LALP4 (astacina de *L. laeta*) e LALP5 (astacina de *L. gaucho*). O alinhamento das sequências aminoacídicas de todas as LALPs e membros da família das astacinas de diferentes organismos mostraram que as astacinas de *Loxosceles* têm maiores identidades com as astacinas de nematódeos. Portanto, os resultados sugerem a existência de uma família gênica para astacinas no veneno de *L. intermedia* com expressão de diferentes isoformas (LALP1, LALP2 e LALP3), essa família gênica está presente nos venenos das três espécies estudadas (*L. intermedia*, *L. laeta* e *L. gaucho*) e possivelmente serão encontradas distribuídas em todo o gênero *Loxosceles*. Esses achados reforçam a relevância biológica das astacinas como toxinas importantes nos efeitos tóxicos dos venenos loxoscélicos.

Palavras chaves: *Loxosceles*, veneno, metaloprotease, astacina.

ABSTRACT

In the Parana State, accidents involving brown spiders (*Loxosceles* genus) are a public health problem, especially in the city of Curitiba and metropolitan region that are considered endemic areas for loxoscelism. *Loxosceles* venom is a mixture of toxins, mostly protein, capable of causing dermonecrotic lesions with gravitational spreading and systemic manifestations such as platelet aggregation, hemolytic anemia and acute renal failure. In *Loxosceles* spider venoms were described toxins as phospholipase D, hyaluronic acid, and metalloproteases, among others. Metalloproteases have been described in venoms of different species, for example: *L. intermedia*, *L. reclusa*, *L. deserta*, *L. rufescens*, *L. gaucho* and *L. laeta* and is believed to be involved in hemostatic disorders described after poisoning, and can act as spreading factor for other venom toxins, due to its proteolytic action against extracellular matrix components. Species of greatest clinical importance are: *L. intermedia*, *L. laeta* and *L. gaucho*. In the Parana State, *L. intermedia* species show larger distribution and are the main species related with accidents in the city of Curitiba. By molecular biology techniques, it was demonstrated that metalloprotease from *L. intermedia* (LALP1 – *Loxosceles* *Astacin*-like *Protease*) venom belongs to the astacin family, that is different from others animal venoms metalloproteases, such as snake metalloproteases that belong to the adamalysin family. LALP1 was the first astacin described as an animal venom constituent. The present study identified, by analyzing distinct clones from *L. intermedia* venom glands cDNA library, two new astacin isoforms present in *L. intermedia* venom, which were named LALP2 and LALP3. Immunoassays with *L. laeta* and *L. gaucho* venoms (two others important species in Parana) showed the existence of native proteins related to LALP1 and these proteins have gelatinolytic activity which could be inhibited by 1,10-phenanthroline (divalent metal chelator), confirming metalloprotease activity. Moreover, total RNA from *L. laeta* and *L. gaucho* venom glands were extracted, the cDNAs obtained using LALP1 primers were sequenced and the results identified that they encode metalloproteases from astacin family, named LALP4 (*L. laeta* astacin) and LALP5 (*L. gaucho* astacin). Amino acid sequences alignment with LALPs and other astacin members from different organisms showed that *Loxosceles* astacins have the greatest identities with nematode astacins. Therefore, the results suggest the existence of an astacin gene family in *L. intermedia* venom expressing different isoforms (LALP1, LALP2 and LALP3), that this gene family is present in venoms of the three species studied (*L. intermedia*, *L. gaucho* and *L. laeta*) and possibly will be found distributed throughout the *Loxosceles* genus. These findings reinforce the biological relevance of astacin toxins as important for toxic effects of loxoscelic venoms.

Keywords: *Loxosceles*, venom, metalloprotease, astacin.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

FIGURA 1: ESPÉCIMES DO GÊNERO <i>Loxosceles</i>	17
FIGURA 2: DIMORFISMO SEXUAL DE <i>L.intermedia</i>	18
FIGURA 3: ESPÉCIES DE MAIOR IMPORTÂNCIA MÉDICA NO PARANÁ	19
FIGURA 4: EVOLUÇÃO DE LESÃO CUTÂNEA DIAGNOSTICADA COMO LOXOSCELISMO	21
FIGURA 5: DESENHO ESQUEMÁTICO DO SÍTIO CATALÍCO E DA VOLTA DE METIONINA DAS METZINCINAS.....	27
FIGURA 6: SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS E AMINOACÍDICAS DAS DUAS NOVAS ISOFORMAS DE ASTACINAS DO VENENO DE <i>L. intermedia</i>	43
FIGURA 7: ANÁLISE EM GEL DE AGAROSE DE PCR DE COLÔNIA DAS DUAS ISOFORMAS MADURAS DE ASTACINAS EM pET-14B	45
FIGURA 8: REAÇÃO IMUNOLÓGICA CRUZADA ENTRE METALOPROTEASES DOS VENENOS DE <i>Loxosceles spp.</i>	47
FIGURA 9: ZIMOGRAMA DE GELATINA DOS VENENOS DE <i>L. intermedia</i> , <i>L. laeta</i> e <i>L. gaucho</i>	48
FIGURA 10: GEL DE AGAROSE DOS PRODUTOS DE PCR DE <i>L. laeta</i> E <i>L. gaucho</i> CORADO COM BROMETO DE ETÍDEO.	49
FIGURA 11: SEQUÊNCIA NUCLEOTÍDICA E AMINOACÍDICA DAS ASTACINAS IDENTIFICADAS EM VENENOS DE <i>L. laeta</i> E <i>L. gaucho</i>	50
FIGURA 12: ALINHAMENTO DE SEQUÊNCIAS DE ASTACINAS DE DIFERENTES ORGANISMOS.....	52
TABELA 1: PORCENTUAL DE POSITIVIDADE OBTIDO A PARTIR DO ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DOS DIFERENTES MEMBROS DA FAMÍLIA DAS ASTACINAS EM RELAÇÃO ÀS LALPS	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

APS: Persulfato de amônio

BCIP: 5-bromo-4cloro-3-indoil fosfato

BLAST : do inglês, “Basic Local Alignment Search Tool”

BMP-1: proteína morfogenética de osso -1

BOD: Demanda biológica de oxigênio

BSA : Albumina de soro bovina (“Bovine Serum Albumin”)

cDNA: DNA complementar

CEEA: Comitê de ética em experimentação animal

CPPI: Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos do Estado do Paraná.

DEPC: dietilpirocarbonato

dNTPs: mistura de nucleotídeo trifosfato (A, T, G, C)

D.O.: densidade óptica

ELISA: do inglês, “Enzime Linked Imuno Sorbent Assay”

EST: do inglês, “Expressed Sequence Tag”

Expasy: o inglês, “Expert Protein Analysis System”

Fab: fragmento de imunoglobulina – sítio de ligação ao antígeno

F(ab)₂: fragmento de imunoglobulina – contendo dois sítios de ligação ao antígeno

IgG: Imunoglobulina G

IPTG: isopropil-β-D-tiogalatopiranosídeo

IRA: Insuficiência renal aguda.

KCl: Cloreto de potássio

LALP: do inglês, “Loxosceles astacin-like protease”

LAST: do inglês, “Limulus astacin”

LB: Luria-Bertani

LoxTox: do inglês, “Loxosceles toxin”

mRNA: RNA mensageiro

MgCl₂: Cloreto de magnésio

MgSO₄: Sulfato de Magnésio

NaCl: Cloreto de sódio

NaH₂PO₄: Fosfato de sódio monobásico

NAS: do inglês, “Nematode astacins”

NBT: do inglês, “nitro blue tetrazolium”

NCBI: do inglês, “National Center for Biotechnology Information”

Ni-NTA: Níquel-ácido nitrilotriacético

NPI: Núcleo de Propriedade Intelectual

OPD: orto-fenileno diamina

PBS: Solução salina tamponada com fosfato (“phosphate buffer saline”)

PCR: reação em cadeia da polimerase

pI: ponto isoelétrico

pH: potencial hidrogeniônico

RT-PCR: Reação em cadeia da polimerase com transcriptase reversa

SDS: dodecil sulfato de sódio (“sodium dodecyl sulfate”)

SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (“sodium dodecyl sulfate-poliacrilamide gel electrophoresis”)

T.A.: Temperatura ambiente

TEMED: N,N,N',N'- tetrametil-etilenodiamina

UFPR: Universidade Federal do Paraná

W.B.: do inglês, “western blott”

ZnCl₂: Cloreto de zinco

kDa: quilodaltons (unidade de massa molecular equivalente a mil daltons)

L: litro

M: molar

mA: miliamperere

mg: miligrama

min: minutos

mL: mililitro

mM: milimolar

Nm: nanômetro

p/v: proporção peso/volume

V: volts

v/v: proporção volume/volume

μg: micrograma

μL: microlitro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 Aranhas	16
1.2 Aranhas do Gênero <i>Loxosceles</i>	16
1.3 Distribuição Geográfica do Gênero <i>Loxosceles</i>	18
1.4 Loxoscelismo ou Acidente Loxoscélico	19
1.4.1 Caracterização	19
1.4.2 Epidemiologia.....	22
1.4.3 Tratamento	23
1.5 Veneno Loxoscélico	24
1.6 Astacinas.....	27
2. OBJETIVOS.....	30
2.1 Objetivo Geral	30
2.2 Objetivos Específicos	30
3. MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1 Reagentes	31
3.2 Animais.....	31
3.3 Obtenção do veneno total	32
3.4 Quantificação de proteínas.....	32
3.5 Eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	32
3.6 Identificação dos cDNAs codificantes da LALP2 e LALP3	33
3.7 Subclonagem dos cDNAs codificantes da LALP2 e LALP3 maduras	34
3.8 Expressão heteróloga e purificação da LALP1.....	35
3.9 Produção de anticorpos policlonais anti-LALP1 em coelhos	36
3.10 ELISA (“ <u>E</u> nzime <u>L</u> inked <u>I</u> mmuno <u>S</u> orbent <u>A</u> ssay”)	37
3.11 Ensaaios de “Western Blotting”	38
3.12 Ensaaios de Zimograma.....	38
3.13 RT-PCR para obtenção de cDNAs das glândulas de veneno de <i>L. laeta</i> e <i>L. gaucho</i>	39
3.14 Rastreamento de astacinas e PCR de sequenciamento	40
3.15 Alinhamento de múltiplas sequências	41
4. RESULTADOS.....	42
4.1 Identificação de duas novas isoformas de astacinas presentes no veneno de <i>L. intermedia</i>	42

4.2 Subclonagem molecular dos cDNAs referentes às astacinas maduras de <i>L. intermedia</i> (LALP2 e LALP3).....	44
4.3 Reatividade imunológica cruzada de metaloproteases presentes nos venenos de <i>Loxosceles spp</i>	45
4.4 Efeito gelatinolítico de toxinas nativas dos venenos de três espécies de <i>Loxosceles</i> e inibição por 1,10-fenantrolina	47
4.5 Identificação de mRNA de astacinas nas glândulas de venenos de <i>L. laeta</i> e <i>L. gaucho</i>	48
4.6 Análise comparativa das sequências aminoacídicas das LALPs com astacinas de diferentes organismos	50
5. DISCUSSÃO	55
6. CONCLUSÃO	63
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
8. ANEXOS	76
8.1 Certificado comitê de ética em experimentação animal	77
8.2 Parecer técnico CTNBio	78
8.3 Artigo científico publicado.....	79
8.4 Artigo científico submetido	80
8.5 Participação em congresso	81

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aranhas

As aranhas são animais da classe dos aracnídeos que pertencem ao grupo dos artrópodes terrestres (RUPPERT; FOX; BARNES, 2005). Os aracnídeos são a segunda classe mais bem sucedida dos invertebrados terrestres com mais de 40.000 espécies descritas atualmente e acredita-se que existam mais de 100.000 espécies a serem descobertas (RUPPERT; FOX; BARNES, 2005; ESCOUBAS; DIOCHORT; CORZO, 2000).

As aranhas são divididas em dois grupos principais quanto à posição da quelícera (primeiro par de apêndices do prossoma dos artrópodes): o grupo Ortognata ou Megalomorfa e o grupo Labidognata ou Araneomorfa (ESCOUBAS; DIOCHORT; CORZO, 2000; RASH; HODGSON, 2002). Apesar da imensa diversidade biológica e ecológica das aranhas, somente poucas espécies estão relacionadas com acidentes envolvendo humanos (ISBISTER; WHITE, 2004). O grupo Ortognata possui grande número de espécies, porém somente espécies do gênero *Hadronyche*, endêmicas da Austrália, possuem venenos altamente tóxicos para humanos (ESCOUBAS; DIOCHORT; CORZO, 2000). Já, as aranhas mais perigosas e com maior importância médica são do grupo Labidognata distribuídas nos gêneros: *Latrodectus* (viúva negra), *Loxosceles* (aranhas marrom) e *Phoneutria* (aranha da bananeira ou armadeiras) (ESCOUBAS; DIOCHORT; CORZO, 2000).

1.2 Aranhas do Gênero *Loxosceles*

As aranhas do gênero *Loxosceles* taxonomicamente estão alocadas na família Sicariidae, sub-ordem Araneomorphae, ordem Araneae, classe Arachnida, subfilo Chelicerata e filo Arthropoda (PLATNICK, 2008). A família Sicariidae é composta por somente 2 gêneros (*Loxosceles* e *Sicarius*) e 122 espécies (PLATNICK, 2007). Uma característica bastante importante utilizada para identificação de aranhas do gênero *Loxosceles* é a presença de seis olhos agrupados em pares e organizados em semi-círculo ("U") na região anterior do cefalotórax (FIGURA 1A) (VETTER; VISSCHER, 1998).

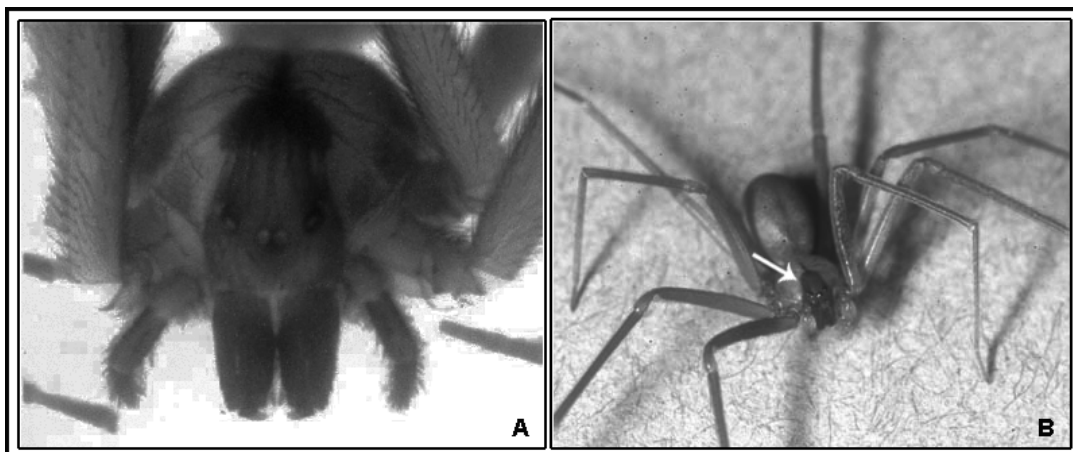


FIGURA 1 – ESPÉCIMES DO GÊNERO *Loxosceles*. **(A)** Região anterior do cefalotórax de *Loxosceles* focado na disposição dos 3 pares de olhos típica da família Sicariidae. **(B)** Exemplar de *L. laeta*, seta indica o formato de violino na parte dorsal do cefalotórax. ADAPTADO DE: (A) SWANSON; VETTER, 2006. (B) CABRERIZO *et al.*, 2009.

As aranhas do gênero *Loxosceles* são popularmente conhecidas como aranhas marrons por apresentarem coloração corporal que varia de marrom claro até marrom escuro ou como aranhas violino devido à forma da região dorsal do cefalotórax ser semelhante a tal instrumento musical (FIGURA 1B) (FUTRELL, 1992; VETTER; VISSCHER, 1998). As aranhas marrons são geralmente pequenas, com tamanho corporal que varia de 8 a 15mm e o comprimento das patas de 8 a 30mm (FUTRELL, 1992). Possuem dimorfismo sexual, os machos têm corpo menor e pernas relativamente mais longas do que as das fêmeas (FIGURA 2), o último segmento dos pedipalpos dos machos é modificado (aumentados e em forma de maçaneta) para exercerem a função de órgãos copulatórios e nas fêmeas os pedipalpos são curtos e possuem o mesmo formato das pernas (FUTRELL, 1992; RUPPERT; FOX; BARNES, 2005). Ambos os sexos são venenosos, mas as fêmeas produzem uma quantidade maior de peçonha, com concentração protéica maior e acredita-se que em acidentes com humanos o efeito tóxico do veneno das fêmeas seja mais intenso, apesar da composição dos venenos dos dois sexos ser bastante semelhante (OLIVEIRA *et al.*, 1999).



FIGURA 2: DIMORFISMO SEXUAL DE *L. intermedia*. Fêmea com corpo maior e pernas menores que as do macho. ADAPTADO DE: da SILVA *et al.*, 2004.

As aranhas marrons possuem hábitos noturnos e são lucífugas, portanto são geralmente encontradas em habitat natural sob pedras, troncos de árvores e restos vegetais; em regiões peridomiciliares encontram-se sob telhas, tijolos e madeiras empilhadas e em ambientes intradomiciliares são encontradas atrás de quadros, no meio de roupas, livros e outros objetos (FUTREL, 1992; SWANSON; VETTER, 2006). São animais carnívoros que se alimentam de pequenos insetos, principalmente: traças, baratas, moscas, mosquitos e cupins (FUTRELL, 1992). São capazes de se reproduzirem com facilidade mesmo em ambientes desfavoráveis, suportam temperaturas entre 8°C a 43°C e podem passar dias a meses sem água e comida (FUTREL, 1992).

1.3 Distribuição geográfica do Gênero *Loxosceles*

O gênero *Loxosceles* é cosmopolita e possui mais de 100 espécies que têm como centro de origem a África e as Américas. O continente americano tem grande diversidade de espécies, sendo que dentre as descritas, 20 são endêmicas da África, 50 da América do Norte e Central e 30 da América do Sul (MARQUES-DASILVA; FISCHER, 2005).

As espécies de importância médica variam nas diferentes Américas. Na América do Sul, *Loxosceles gaucho*, *Loxosceles intermedia* e *Loxosceles laeta* são as principais responsáveis pelos casos de loxoscelismo e na América do Norte as de maior importância são *Loxosceles deserta* e *Loxosceles reclusa* (BARBARO *et al.*, 2005).

No Brasil são encontradas atualmente 10 espécies de aranhas marrons (PLATNICK, 2007) sendo que quatro destas espécies estão presentes no estado Paraná: *L. intermedia*, *L. laeta*, *L. gaucho* e *L. hirsuta*. As espécies de maior importância clínica são: *L. intermedia*, *L. laeta*, *L. gaucho* (FIGURA 3) (MÁLAQUE *et al.*, 2002), sendo a espécie *L. intermedia* de maior distribuição no estado do Paraná e a principal espécie relacionada com acidentes no município de Curitiba (MARQUES-DA-SILVA; FISCHER, 2005).



FIGURA 3: ESPÉCIES DE MAIOR IMPORTÂNCIA MÉDICA NO PARANÁ.

1.4 Loxoscelismo ou Acidente Loxoscélico

1.4.1 Caracterização

Os acidentes loxoscélicos ocorrem principalmente durante a primavera e verão que são as estações mais quentes do ano nas quais as aranhas estão mais ativas (SCHENONE; LETONJA, 1975). As aranhas marrons não possuem hábitos agressivos, ao contrário da maioria dos animais peçonhentos, como escorpiões, ofídios e outros quelicerados; portanto, os acidentes em geral ocorrem devido à inadvertida compressão do animal contra o corpo do indivíduo durante o sono ou nos atos de vestir-se, calçar-se, enxugar-se (SUAREZ; BIGGERMANN; SCHENONE, 1971; LUCAS, 1988; FUTRELL, 1992; RIBEIRO *et al.*, 1993).

Loxoscelismo é a denominação utilizada para designar as manifestações clínicas decorrentes de envenenamentos com aranhas do gênero *Loxosceles* (FUTRELL, 1992; da SILVA *et al.*, 2004). Tal envenenamento pode ser caracterizado por duas variantes clínicas: loxoscelismo cutâneo e loxoscelismo sistêmico (FUTRELL, 1992). O loxoscelismo cutâneo é predominante nos acidentes (ocorre em 84 a 97% dos casos) e caracteriza-se por hemorragia local e lesão dermonecrotica com espalhamento gravitacional algumas horas após o acidente. A picada normalmente não é percebida por ser indolor e somente após 2 a 8 horas iniciam alguns sintomas como: dor, que pode variar de intensidade e é caracterizada por ser do tipo “queimação” ou “ardência”, febre, prurido e mal estar geral. Após 12 a 24 horas do acidente, ocorre formação de bolha circundada por um halo de tecido isquêmico que fica avermelhado, uma zona pálida denominada placa marmórea e a região ao redor adquire uma coloração violácea. Depois de poucos dias, a região entra em processo de necrose e adquire cor azul-violácea com espalhamento gravitacional (FUTRELL, 1992; SEZERINO *et al.*, 1998, MÀLAQUE *et al.*, 2002; HOGAN; BARBARO; WINKEL, 2004). Lesões com placa marmórea, coloração violácea, necrose e com espalhamento gravitacional são características de acidentes com aranhas marrons (FIGURAS 4A e 4B) (da SILVA *et al.*, 2004; APPEL *et al.*, 2005). Esta lesão pode ter como agente sinérgico, acentuando sua gravidade, a presença de microorganismos anaeróbios provenientes das quelíceras das aranhas, as quais no momento da picada injetam-nos concomitantemente com o veneno. Um agente importante de infecção secundária à picada é o bacilo gram positivo *Clostridium perfringens* (MONTEIRO *et al.*, 2002). Em alguns casos a lesão cutânea evolui e após 3 a 7 dias forma-se uma escara de difícil cicatrização, podendo originar seqüelas deformantes nas quais procedimentos cirúrgicos para enxerto são necessários (FIGURAS 4C e 4D) (PIZZI; ZACARIAS; SCHENONE, 1957; FUTRELL, 1992).



FIGURA 4: EVOLUÇÃO DE LESÃO CUTÂNEA DIAGNOSTICADA COMO LOXOSCELISMO. **(A)** Paciente de 6 anos com lesão cutânea típica de acidente loxoscélico. **(B)** Detalhe da placa marmórea após 36 horas do acidente. **(C)** Escara necrótica após 8 dias de evolução. **(D)** Cicatriz com quelóide após 3 meses do acidente. ADAPTADO DE: CABRERIZO *et al.*, 2009.

O loxoscelismo sistêmico é observado somente em 3 a 16% dos casos, e, embora seja menos comum, é a principal causa de morte relacionada ao envenenamento (FUTRELL, 1992; LUNG; MALLORY, 2000; da SILVA *et al.*, 2004; APPEL *et al.*, 2005; CHAIM *et al.*, 2006). Os sintomas desse quadro clínico geralmente iniciam 24 horas após a picada e são caracterizados por distúrbios da hemostase e da função renal (da SILVA *et al.*, 2004; APPEL *et al.*, 2005). Nos casos mais graves ocorrem alterações no quadro hematológico incluindo anemia hemolítica, trombocitopenia causada devido à agregação plaquetária e coagulação intravascular disseminada, além de ocorrer aumento da bilirrubina indireta, icterícia e falência renal aguda (FUTRELL, 1992; da SILVA *et al.*, 2003; da SILVA *et al.*, 2004; CHAIM *et al.*, 2006). Outras consequências decorrentes do envenenamento incluem alterações vasculares nos pulmões, fígado e rins (LUNG; MALLORY, 2000). Uma das alterações funcionais mais graves é a insuficiência renal aguda (IRA), a qual se caracteriza por hemoglobinúria e hematúria, e em casos extremos pode levar à obstrução da luz tubular

(WASSERMAN; ANDERSON, 1984; SCHENONE *et al.*, 1989; FUTRELL, 1992; SEZERINO *et al.*, 1998; LUNG; MALLORY, 2000).

Muitos fatores estão relacionados com a severidade dos quadros clínicos desencadeados pelos indivíduos acidentados, tanto fatores relacionados ao acidentado (estado nutricional, idade, local da picada, tempo de demora para procurar tratamento adequado) quanto a características da aranha que o picou (estágio de desenvolvimento, sexo, quantidade de veneno inoculada) (OLIVEIRA *et al.*, 1999; ANDRADE *et al.*, 1999; SEZERINO *et al.*, 1998; GAJARDO-TOBAR, 1966; SCHENONE *et al.*, 1989; BARBARO *et al.*, 1994).

1.4.2 Epidemiologia

Os acidentes com *Loxosceles* no Brasil começaram a ser reconhecidos em 1954, por BÜCHERL e ROSENFELD. Entre 1990 e 1993, no Brasil foram registrados 17.785 acidentes araneídicos onde 36,6% (6.512 casos) atribuídos à aranha marrom, sendo 6.224 ocorrências na região sul, tornando o loxoscelismo o mais importante dos casos de envenenamento envolvendo aranhas.

Segundo Ministério da Saúde, no Brasil ocorreram 7.281 casos de loxoscelismo em 2008, sendo que somente no estado do Paraná ocorreram 5.314 casos o que perfaz 67% de todos os casos ocorridos no país. Dentre os dez primeiros municípios em frequência de acidentes no estado do Paraná, nove estão localizados na 2ª Regional de Saúde – Curitiba e Região Metropolitana (MARQUES-DA-SILVA, 2002). Somente no Município de Curitiba e região metropolitana, segundo dados da Secretaria Municipal de Saúde (SMS/CE/CVE - SINAM, 2009), 3.890 acidentes loxoscélicos foram notificados em 2008 e dados preliminares de 2009 mostram ocorrência de 1.733 casos (até abril de 2009). Portanto, a segunda regional de saúde é considerada área endêmica para o loxoscelismo e, apesar de existirem muitos fatores relacionados com o aumento de acidentes com aranhas marrons em Curitiba e região metropolitana nos últimos anos, é provável que seja consequência de mudanças ambientais e desequilíbrios ecológicos que impedem a manutenção da densidade populacional das espécies em níveis estáveis (BARBARO; JARED; MOTA, 1995).

1.4.3 Tratamento

O tratamento do loxoscelismo ainda é bastante controverso na literatura científica. O primeiro problema para o tratamento do loxoscelismo são as dificuldades encontradas para realização de um diagnóstico correto. Diagnósticos realizados através de testes laboratoriais ainda são pouco realizados devido ao tempo gasto para a realização e principalmente ao alto custo (HOGAN; BARBARO; WINKEL, 2004). Poucas vezes o diagnóstico é realizado baseado na identificação da aranha uma vez que a picada é indolor e raramente os acidentados percebem que foram picados, e também, existe muita falta de informação de médicos e pacientes quanto ao loxoscelismo (da SILVA *et al.*, 2004, PAULI *et al.*, 2006).

Diferentes terapias tem sido propostas, como utilização de dapsona, esteróides, tratamento com câmara hiberbárica de oxigênio e terapia com soro antiveneno (HOGAN; BARBARO; WINKEL, 2004). Muitos estudos tem sido realizados para avaliar a utilização dos antivenenos no tratamento do loxoscelismo cutâneo como: soro anti-loxoscélico, IgG completa, fragmentos Fab ou F(ab)'₂ (GOMEZ *et al.*, 1999; ISBISTER *et al.*, 2003; OLVERA *et al.*, 2006; PAULI *et al.*, 2006). PAULI e colaboradores (2009) mostraram que a utilização do soro anti-loxoscélico quando administrado nas primeiras 48 horas após o envenenamento tem grande poder terapêutico no quadro cutâneo. Apesar dos estudos serem somente em modelo animal e mais estudos serem necessários para avaliar as reais eficiências dos anti-venenos tanto nos casos de loxoscelismo cutâneo quanto sistêmico, em países que já incluíram a soroterapia no protocolo de tratamento a mortalidade de crianças e jovens diminuiu (PAULI *et al.*, 2009; ISBISTER *et al.*, 2003).

O Ministério da Saúde brasileiro disponibiliza dois tipos de antivenenos produzidos em cavalos: soro anti-loxoscélico e o soro anti-aracnídico. O soro anti-loxoscélico é um soro poli-específico que contém anticorpos contra venenos de *L. laeta*, *L. intermedia* e *L. gaucha* produzido no Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos do Estado do Paraná (CPPI). O soro anti-aracnídico é um soro produzido com venenos de *Loxosceles gaucha*, *Phoneutria nigriventer*, *Tityus serrulatus* e *Tityus bahiensis* (PAULI *et al.*, 2006).

Apesar das recomendações do Ministério da Saúde para o uso da soroterapia no Brasil, como existe muita controvérsia na literatura científica em relação à eficácia dos soros em neutralizar os efeitos locais, a via de administração e o tempo para o início da administração, a porcentagem de uso é 11,9% no Paraná; 46,8% em Santa Catarina; 54,9% no Rio Grande do Sul e 70% em São Paulo (PAULI *et al.*, 2006; VETTER; ISBISTER, 2008).

A melhora na eficiência dos tratamentos do loxoscelismo está diretamente relacionada com a necessidade de melhor compreender a composição e principalmente os mecanismos de ação dos componentes do veneno loxoscélico (PAIXAO-CAVALCANTE *et al.*, 2007).

1.5 Veneno Loxoscélico

O veneno loxoscélico é um líquido cristalino, composto basicamente por proteínas enzimáticas e não enzimáticas, peptídeos, nucleotídeos e é produzido por um par de glândulas situadas no cefalotórax das aranhas marrons (da SILVA *et al.*, 2004). As glândulas se comunicam com o exterior através de um duto que passa no interior do aparelho inoculador constituído por um par de quelíceras. As células epiteliais dessas glândulas de veneno são responsáveis pela produção e secreção do veneno e são ricas em organelas como retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi (dos SANTOS *et al.*, 2000).

As moléculas que compõem os venenos de *Loxosceles* são predominantemente proteínas de baixa massa molecular (5-40kDa) com ação tóxica e/ou enzimática (MOTA; BARBARO, 1995; da SILVEIRA *et al.*, 2002; da SILVA *et al.*, 2004; APPEL *et al.*, 2005). Acredita-se que a toxicidade do veneno de aranhas é decorrente de efeitos deletérios sinérgicos e/ou somatórios de todos os seus componentes (GEREN *et al.*, 1976; da SILVA *et al.*, 2004; APPEL *et al.*, 2005). Os venenos de aranhas marrons podem ser comparados a alguns venenos de serpentes, na composição dos quais diferentes estudos mostraram a presença abundante de enzimas (MARTINEZ-VARGAS, 1987; da SILVEIRA *et al.*, 2002).

A identificação dos constituintes dos venenos loxoscélicos é foco de vários estudos e algumas das toxinas presentes no veneno já estão bem caracterizadas do ponto de vista bioquímico e biológico (da SILVA *et al.*, 2004, APPEL *et al.*, 2005). Já foram descritas enzimas como fosfatase alcalina, 5' ribonucleotídeo fosfohidrolase,

peptídeos com atividade inseticida, hialuronidases, fosfolipases-D, serino-proteases e metaloproteases em venenos de diferentes espécies de *Loxosceles* (FUTRELL, 1992; FEITOSA *et al.*, 1998; VEIGA *et al.*, 2000a, 2000b; YOUNG; PINCUS, 2001; VEIGA *et al.*, 2001a; da SILVA *et al.*, 2004; BARBARO *et al.*, 2005; da SILVEIRA *et al.*, 2007a).

As fosfolipases-D são as toxinas melhor caracterizadas dos venenos loxoscélicos. Foram primeiramente descritas como esfingomielinases-D e amplamente denominadas de toxinas dermonecróticas devido ao seu principal efeito biológico. Atualmente, como toxinas, são encontradas somente em aranhas *Loxosceles*, *Sicarius* e em poucas bactérias patogênicas. Análises comparativas sugerem uma origem evolutiva comum da atividade esfingomielinásica-D no ancestral dos gêneros irmãos da família Sicariidae (*Sicarius* e *Loxosceles*) (BINFORD; CORDES; WELLS, 2005).

Em aranhas marrons, fosfolipases-D estão presentes nos venenos de diferentes espécies e em diferentes isoformas (da SILVA *et al.*, 2004; RAMOS-CERRILLO *et al.*, 2004; BARBARO *et al.*, 2005). Recentemente, KALAPOTHAKIS e colaboradores (2007) sugeriram a utilização do termo LoxTox (*Loxosceles* “toxin”) com intuito de padronizar uma nomenclatura para tal grupo de toxinas, as quais têm recebido diferentes nomes: toxinas dermonecróticas, esfingomielinases-D, fosfolipases-D, fatores de dermonecrose. Tanto as fosfolipases-D nativas quanto as isoformas recombinantes dos venenos loxoscélicos, obtidas através de técnicas de biologia molecular, são capazes de induzir experimentalmente dermonecrose, resposta inflamatória, agregação plaquetária, hemólise, aumento da permeabilidade vascular, nefrotoxicidade, letalidade em camundongos e efeitos citotóxicos em linhagens celulares estabelecidas (FUTREL, 1992; da SILVA *et al.*, 2004; APPEL *et al.*, 2005; CHAIM *et al.*, 2006; da SILVEIRA *et al.*, 2006; da SILVEIRA *et al.*, 2007b; RIBEIRO *et al.*, 2007; APPEL *et al.*, 2008).

As proteases existentes nos venenos loxoscélicos também têm sido foco de muitos estudos. Especificamente, as metaloproteases foram inicialmente descritas em venenos de *L. intermedia* por FEITOSA e colaboradores (1998) que identificaram duas metaloproteases: a Loxolisina A (20-28kDa) com atividade fibronectinolítica e atividade fibrinogenolítica parcial, e a Loxolisina B (32-35kDa) com atividade gelatinolítica. Inúmeras críticas surgiram nesta época, pois se cogitava a

possibilidade de que essas metaloproteases identificadas por FEITOSA e colaboradores (1998) fossem proteases oriundas do conteúdo gástrico das aranhas, contaminantes do veneno devido ao modo de obtenção do mesmo. Porém, DA SILVEIRA e colaboradores (2002) comprovaram que metaloproteases são realmente constituintes do veneno de *L. intermedia* através de estudo comparativo do perfil protéico e da atividade metaloproteásica realizado entre veneno obtido por eletrochoque (mesma técnica de obtenção utilizada por FEITOSA e colaboradores (1998) e extrato de glândulas de veneno de espécimes de *L. intermedia*. Com esse estudo, mostrou-se que a atividade metaloproteásica está presente no extrato de glândulas de veneno que é totalmente livre de contaminantes gástricos. Outros trabalhos também descreveram metaloproteases nos venenos de *L. reclusa*, *L. deserta*, *L. rufescens* e *L. laeta*. (YOUNG; PINCUS, 2001; BARBARO *et al.*, 2005; FERNANDES-PEDROSA *et al.*, 2008).

DA SILVEIRA e colaboradores (2007c), através de uma biblioteca de cDNA da glândula de veneno de *L. intermedia*, clonaram, identificaram e caracterizaram uma metaloprotease da família das astacinas, a LALP (*L*oxosceles *A*stacin-*l*ike *P*rotease). A descoberta da LALP foi muito significativa, pois caracterizou uma toxina representativa do veneno de *L. intermedia* e foi a primeira descrição de um membro da família das astacinas presente em um veneno animal (da SILVEIRA *et al.*, 2007c).

Apesar das inúmeras identificações de metaloproteases em venenos loxoscélicos, ainda não foram elucidadas suas participações nos eventos tóxicos do veneno. Acredita-se que a atividade destas metaloproteases esteja relacionada com os distúrbios hemostáticos descritos após o envenenamento como danos nos vasos sanguíneos, hemorragias na derme, além de poder ser um fator de espalhamento das demais toxinas do veneno devido a sua ação frente aos componentes da matriz extracelular (FEITOSA *et al.*, 1998; da SILVEIRA *et al.*, 2002; ZANETTI *et al.*, 2002). Podem atuar também sobre outros componentes do veneno ou mesmo de moléculas biológicas do organismo do indivíduo acidentado gerando moléculas/peptídeos ativos (da SILVEIRA *et al.*, 2007c).

1.6 Astacinas

As metaloproteases dependentes de zinco para sua atividade catalítica pertencem à superfamília das Metzincinas que compreende as famílias das Adamalisinas ou Reprolisinas, Serralisinas, Astacinas, Metaloproteinases de Matriz ou Colagenases (STÖCKER *et al.*, 1995). Segundo STÖCKER e colaboradores (1995), os membros das famílias das metzincinas possuem domínio característico conservado HEXXHXXGXXHE, no qual os três resíduos de histidinas estão envolvidos na ligação do íon de zinco, necessário para atividade catalítica, e uma volta de metionina (MXY) (FIGURA 5).

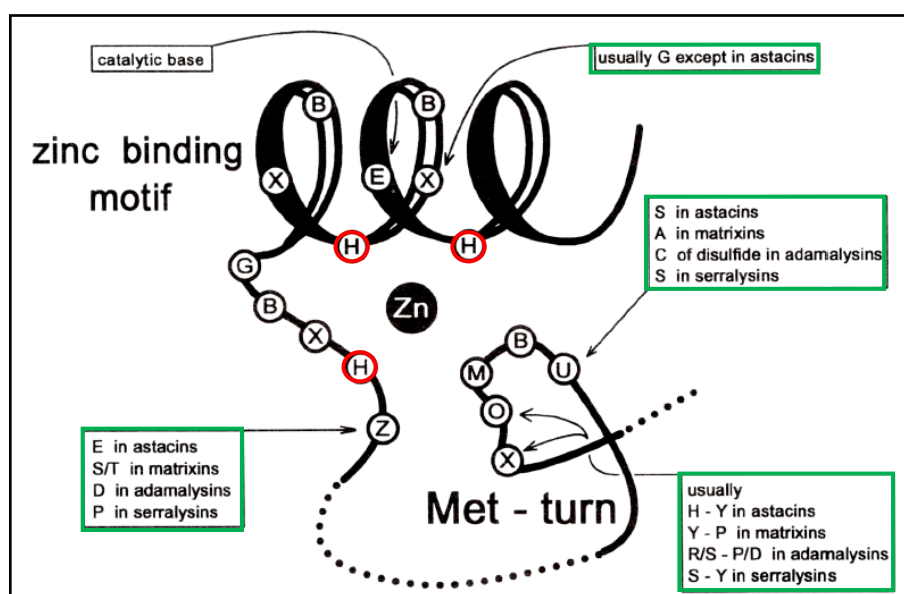


FIGURA 5: DESENHO ESQUEMÁTICO DO SÍTIO CATALÍTICO E DA VOLTA DE METIONINA DAS METZINCINAS. Nos retângulos verdes estão indicados os resíduos de aminoácidos que diferem em cada uma das famílias de metzincinas. Os três resíduos de histidinas do sítio catalítico que fazem a ligação do íon de zinco estão destacados em vermelho. ADAPTADO DE: STÖCKER *et al.*, 1995.

As proteínas do tipo astacinas (família M12A) são caracterizadas por possuírem uma sequência aminoacídica consenso para ligação de zinco composta por 18 resíduos de aminoácidos – HEXXHXXGXXHEXXRXDR – que inicia com a sequência mínima de ligação ao zinco (HEXXH) presente na maioria das metaloendopeptidases. Outra região bastante conservada (SXMHY) inclui um resíduo de tirosina envolvido na ligação ao zinco e um resíduo de metionina envolvido em uma volta de metionina presente na cadeia polipeptídica (BOND; BEYNON, 1995). Os membros da família das astacinas podem possuir na sua porção C-terminal outros domínios não catalíticos bastante conservados, tais como:

domínio do tipo EGF, domínio do tipo CUB e/ou domínio MAM (GOMIS-RÜTH, 2003).

A família Astacinas recebeu este nome devido à primeira descrição dessas zinco-peptidases ter sido de uma enzima digestiva de *Astacus astacus* (DUMERMUTH *et al.*, 1991; STÖCKER *et al.*, 1995). Fazem parte dessa família proteases digestivas, proteases extracelulares e proteases ligadas à membrana que estão envolvidas no processamento de peptídeos e atuam na ativação de fatores de crescimento, degradação de polipeptídeos e processamento de moléculas extracelulares (DUMERMUTH *et al.*, 1991; BOND; BEYNON, 1995; MÖHRLIN; BOND; STÖCKER, 2004; GOMIS-RÜTH, 2003). As enzimas do tipo astacinas são amplamente conservadas evolutivamente e tem sido encontradas em diferentes espécies, como humanos, camundongos, ratos, anfíbios, peixes, insetos, moluscos e até em bactérias, o que demonstra sua importância biológica (BOND; BEYNON, 1995; MÖHRLIN; BOND; STÖCKER, 2004). Os membros originais da família são: a astacina do *Astacus astacus*, BMP-1 (proteína morfogenética de osso-1) de osso humano, meprinas de rim de camundongo e de intestino humano e UVS.2 uma proteína do desenvolvimento de embriões de *Xenopus laevis* (BOND; BEYNON, 1995). Essas enzimas são sintetizadas como pró-enzimas inativas e a remoção das pró-sequências constitui o principal mecanismo de ativação (BOND; BEYNON, 1995); porém, existe descrição de uma astacina recombinante de *Limulus polyphemus* que possui atividade mesmo na sua forma de pró-enzima (BECKER-PAULY *et al.*, 2009). Nesse artrópode ancestral (*Limulus polyphemus*) foram descritas duas astacinas, uma denominada LAST (“*Limulus* astacin”) que possui o domínio catalítico e a volta de metionina e outra denominada LAST-MAM devido à presença de um domínio MAM na sua porção carboxi-terminal. Tais astacinas foram encontradas em diferentes tecidos e pela distribuição observada no tecido cerebral e no olho acredita-se que possam desempenhar funções no sistema nervoso central (BECKER-PAULY *et al.*, 2009). Em nematódeos *Caenorhabditis elegans* existem 40 genes que codificam astacinas, as quais constituem a família NAS (“Nematode Astacins”). As astacinas de *C. elegans* são divididas em 6 grupos distintos porque elas diferem nas suas estruturas C-terminal, tanto na diversidade de domínios não catalíticos quanto na quantidade de repetições desses domínios na sequência protéica (MÖHRLIN; HUTTER; ZWILLING, 2003). A NAS-37 tem função importante

no desenvolvimento da larva de *C. elegans*, medeia as ecdises e a presença de mutações no gene da NAS-37 resultam em defeitos durante os processos de muda (DAVIS *et al.*, 2004). A astacina descrita como constituinte do veneno de *L. intermedia* (LALP) possui os domínios conservados da família das astacinas (HEXXHXXGXXHEXXRXDR e SXMHY) e não apresenta domínios não catalíticos na porção C-terminal (da SILVEIRA *et al.*, 2007c), como ocorre também no protótipo da família (Astacina de *A. astacus*) e na LAST ("*Limulus* astacin") (GOMIS-RÜTH, 2003; BECKER-PAULY *et al.*, 2009). A função biológica da LALP ainda não é completamente elucidada, uma vez que os estudos com tal toxina ficaram restritos a ensaios "in vitro" devido à dificuldade de obtenção dessa toxina recombinante solúvel, ativa e quantidade suficiente para ensaios "in vivo" (da SILVEIRA *et al.*, 2007c).

Portanto, o presente trabalho objetiva ampliar os estudos a respeito da presença de toxinas da família das astacinas como constituintes de venenos, visto que a LALP foi a primeira descrição de uma astacina em veneno animal. O estudo será focado na identificação de novas astacinas em veneno de *Loxosceles intermedia* e caracterização das metaloproteases do veneno de duas outras espécies de *Loxosceles*: *L. laeta* e *L. gaucho*.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Identificar e caracterizar as metaloproteases dos venenos das três principais espécies de aranha marrom de importância clínica no Paraná: *L. intermedia*, *L. laeta* e *L. gaucho*.

2.2 Objetivos Específicos

- Verificação da existência de diferentes isoformas de metaloproteases do tipo astacinas através de rastreamento da biblioteca de cDNA de glândulas de veneno de *L. intermedia*;
- Subclonagem das diferentes isoformas em vetor de expressão;
- Avaliação de reatividade cruzada dos venenos de *L. intermedia*, *L. laeta* e *L. gaucho* através de reações de imunowestern blotting e ELISA;
- Avaliação da atividade gelatinolítica dos diferentes venenos: *L. intermedia*, *L. laeta* e *L. gaucho*;
- Rastreamento, identificação e caracterização de metaloproteases presentes nos venenos de *L. laeta* e *L. gaucho*.
- Avaliação da identidade aminoacídica entre as diferentes astacinas identificadas e outros membros da família das astacinas já descritos na literatura.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes

Os sais, ácidos, bases, solventes orgânicos e a fenantrolina foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha). Os anestésicos foram adquiridos da empresa Vetbrands (Jacareí, São Paulo). Os marcadores de massa molecular para SDS-PAGE, o BSA, o ágar-ágar, os adjuvantes utilizados nas imunizações, o Ponceau-S, o OPD e os anticorpos secundários utilizados nos ensaios de “Western Blotting”. e ELISA foram adquiridos da Sigma (St. Louis, MI, EUA). As enzimas de restrição e modificação, o marcador de números de pares de bases “Gene Ruler 100 pb DNA Ladder Plus” e o IPTG foram adquiridos da empresa Fermentas (Vilnius, Lituânia). O BCIP, o NBT e o brometo de etídio foram adquiridos da Promega (Madison, WI, EUA). Os reagentes SDS, corante Azul de Coomassie, Tris e Glicina foram adquiridos da GibcoBRL (Grand Island, NY, EUA). O TRIzol, a agarose, a resina Ni-NTA agarose e os reagentes para RT-PCR foram adquiridos da Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA). DEPC e os antibióticos foram adquiridos da USB (Cleveland, OH, EUA). Os oligonucleotídeos empregados em PCR foram sintetizados pela Bioneer (Daejeon, Korea). Os reagentes para meio de cultura, tais como peptona, extrato de levedura e triptona foram adquiridos da BD (Sparks, MD, EUA).

3.2 Animais

Os coelhos neozelandeses adultos pesando aproximadamente 3kg foram obtidos junto ao Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná e utilizados para produção de anticorpos anti-LALP1 seguindo os procedimentos aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR), certificado nº 246 (em anexo). As aranhas utilizadas para obtenção do veneno foram mantidas em condições apropriadas, com água à vontade e com restrição alimentar somente durante os 15 dias antecedentes à coleta do veneno para evitar contaminação com egesta. A utilização de organismos geneticamente modificados foi autorizada pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBIO) (parecer técnico N° 542/2006, DOU N°79, Seção 1, página 9, 26/abril/2006 – em anexo).

3.3 Obtenção do Veneno Total

O veneno de *L. intermedia* foi obtido de aproximadamente 200 aranhas que foram submetidas a eletrochoque de 15V no cefalotórax (FEITOSA *et al.*,1998), a gotícula cristalina de veneno foi coletada das quelíceras com micropipeta, solubilizada em 500 μ L de PBS (NaCl 100mM; Tampão Fosfato de Sódio 10mM; pH 7,3) e mantida em gelo até o final da coleta. Os venenos de *L. laeta* e *L. gaucha* foram gentilmente cedidos pelo CPPI. Os venenos foram dosados através do método de Bradford (BRADFORD,1976), diluídos com PBS para concentração final de 2mg/mL, aliquotados em 50 μ L e armazenados em “freezer” a -20° C.

3.4 Quantificação de Proteínas

A quantificação das proteínas dos venenos totais foi realizada baseada no método do Azul de Coomassie descrito por BRADFORD (1976). Utilizou-se os reagentes do “Kit II BioRad Protein Assay” que contém albumina de soro bovino como padrão de proteína e solução corante – Reativo de Bradford (corante, ácido fosfórico e metanol). O padrão de proteína e o reativo foram diluídos e armazenados conforme instruções do fabricante. Os ensaios foram realizados em microplacas, o que reduz o gasto de proteína no momento da dosagem e aumenta a sensibilidade do método. As amostras protéicas foram submetidas a diluição seriada em PBS (1:10,1:100, 1:1000), o BSA foi diluído em PBS atendendo gradiente linear de 0,25 μ g/mL; 0,5 μ g/mL; 1,0 μ g/mL; 1,5 μ g/mL; 2,0 μ g/mL. Em placa de 96 poços MaxiSorp (Nunc, Roskilde, Dinamarca) foram colocados 20 μ L tanto das amostras de proteína padrão quanto das proteínas de concentração desconhecida; para a leitura do branco foi utilizado 20 μ L de PBS e todas as amostras foram feitas em duplicata. Adicionou-se 200 μ L do reativo de Bradford e após incubação de 5min à temperatura ambiente, as absorbâncias das reações colorimétricas foram mensuradas em leitor de ELISA (Meridiam ELX 800) com filtro 595nm programado para descontar a leitura do branco das leituras das amostras de interesse e calcular a curva a partir das concentrações da proteína padrão.

3.5 Eletroforese em Gel Desnaturante de Poliacrilamida (SDS-PAGE)

Eletroforeses foram realizadas em géis de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS) em condições redutoras (5% de β -mercaptoetanol) ou não redutoras

(ensaios de zimograma). Os géis de separação foram preparados com 12,5% de mistura de acrilamida 30% (29,2% de acrilamida, 0,8% de N, N'-metileno-bis-acrilamida) em volume final de 16mL. A solução foi preparada com 5,4mL de água MiliQ, 4,0mL de tampão "lower" (Tris 1,5M; SDS 0,4% (p/v); pH 8,8) e 6,6mL de mistura de acrilamida 30%. Imediatamente antes de colocar a solução do gel no aparato de corrida, os catalisadores foram adicionados (40µL de APS e 40µL de TEMED). Após a polimerização, os géis de empacotamento ("stacking") foram preparados da mesma maneira que o gel de separação, mas com 3% de mistura de acrilamida 30% e volume final de 6mL. A solução do gel de empacotamento foi preparada com 3,7mL de água ultrapura, 1,5mL de tampão "upper" (Tris 1M; 0,4% SDS (p/v); pH 6,0), 0,8mL de mistura de acrilamida, 40µL de APS e 40µL de TEMED. Para detecção de proteínas após a corrida eletroforética, os géis foram corados com Azul Brilhante de Coomassie 0,02% (p/v) dissolvido em metanol 50% (v/v), ácido acético 10% (v/v) e água ultrapura em quantidade suficiente para completar 100% (v/v).

3.6 Identificação dos cDNAs codificantes da LALP2 e da LALP3

As duas novas isoformas de astacinas do veneno de *L. intermedia* foram identificadas através de pesquisa de homologias frente aos bancos de dados de proteínas, com o uso da ferramenta BLAST ("Basic Local Alignment Search Tool") na página do NCBI ("National Center for Biotechnology Information") (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) (ALTSCHUL *et al.*, 1990), utilizando os cDNAs previamente sequenciados de diferentes clones da biblioteca de cDNA da glândula de veneno de *L. intermedia* já existente no laboratório (CHAIM *et al.*, 2006). Brevemente, esses cDNAs foram obtidos a partir da seleção aleatória de 170 diferentes clones da biblioteca, os quais foram submetidos à minipreparação de plasmídeos e sequenciados. As sequências aminoacídicas deduzidas para a LALP2 e LALP3 foram analisadas quanto à presença de peptídeo sinal hidrofóbico utilizando a ferramenta SignalP disponível na página do Expasy ("Expert Protein Analysis System") (www.expasy.org/tools) que se baseia no método descrito por NILSEN e colaboradores (1997). Os aminoácidos de início das proteínas maduras (sem pré e pró peptídeos) foram identificados por comparação com dados da literatura (FORADORI *et al.*, 2006). As sequências da LALP2 e da LALP3 foram depositadas

no banco de dados do GenBank e os números de acessos são: LALP2 – GQ227490; LALP3 – GQ227491.

3.7 Subclonagem dos cDNAs codificantes da LALP2 e da LALP3 maduras

Após caracterização da LALP2 e LALP3, os cDNAs referentes às astacinas maduras contidos no vetor pSPORT1 da biblioteca de cDNA foram modificados por PCR de alta fidelidade utilizando-se *Pfu* DNA polimerase com oligonucleotídeos iniciadores específicos para originar um produto contendo nas extremidades sítios das enzimas de restrição *Nde* I e *Bam*H I para a LALP2 (FIGURA 6A) e sítios das enzimas de restrição *Xho* I e *Bam*H I para a LALP3 (FIGURA 6B). Os produtos de PCR e o vetor pET-14b foram digeridos com as respectivas enzimas e as reações de ligação foram realizadas com T4 DNA ligase na proporção 3:1 (inserto/vetor) a 16°C por 16h em volume máximo de 10µL. Os produtos das ligações (2µL de cada ligação) foram utilizados para transformação de *E. coli* DH5α eletrocompetente (30µL). As células foram eletroporadas em eletroporador (Gene Pulser X-Cell, BioRad, Hercules, CA, EUA) para entrada dos plasmídeos (2µL) com o inserto de interesse. Imediatamente após a eletroporação, as bactérias foram colocadas em tubo de polipropileno contendo 970µL de meio SOC (triptona 20g/L, extrato de levedura 5g/L; NaCl 0,5g/L; KCl 2,5mM; MgCl₂ 10mM, MgSO₄ 10mM, glicose 0,2M) e mantidas sob agitação branda por 1h a 37°C (período de recuperação). As bactérias recuperadas foram plaqueadas em meio LB-ágar (triptona 10g/L, extrato de levedura 5g/L, NaCl 10g/L, ágar-ágar 15g/L) suplementado com ampicilina (100µg/mL). O plaqueamento foi feito com auxílio de alça de Gauss estéril em duas placas, sendo que em uma delas foi plaqueado 100µl da cultura de ~~bactérias~~ ^{inicial} em SOC e a outra recebeu os 900µl restantes que foram centrifugados (2.000xg, 2min, T.A.) e ressuspensos em 100µl de meio SOC. As placas foram incubadas a 37°C por 16h em BOD (BOD 411D, Nova Ética, Campinas, Brasil).

Para identificar os clones contendo o inserto orientado corretamente, realizou-se PCR de colônia (técnica “toothpick”) com oligonucleotídeos iniciadores do vetor (“T7 promoter” que anela na região promotora T7) e do inserto (mesmo iniciador “anti-sense” utilizado para a clonagem). Nos microtubos de PCR contendo as bactérias foram adicionados tampão para *Taq* DNA polimerase (1 X); dNTPs (0,2mM); MgCl₂ (1,5mM); oligonucleotídeo “T7 promoter” (0,2 mM); oligonucleotídeo

do inserto (0,2mM) e *Taq* DNA polimerase (1,25U/50µl). Essa mistura foi colocada em termociclador e submetida aos ciclos: 1 ciclo a 95°C/5min; 35 ciclos a 95°C/30s – 50°C/30s – 72 °C/1min; 1ciclo 72°C/10min e 1 ciclo de espera a 4°C/∞. O produto foi analisado em gel de agarose 2 % corado com brometo de etídeo.

Os plasmídeos (astacina/pET-14b) de três clones positivos de cada isoforma foram purificados por minipreparação com reagentes do kit “Wizard Plus SV Minipreps DNA purification Systems” (Promega) e as construções corretas foram confirmadas por sequenciamento de ambas as fitas, utilizando os iniciadores “T7 promoter” e “T7 terminator” com reagente “DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit” (GE Healthcare, Piscataway, NJ, EUA) seqüenciados em sequenciador automático “MegaBace™ 1000 DNA Analysing Systems” (GE Healthcare) Os resultados dos sequenciamentos confirmaram a orientação e a correta fase de leitura. A expressão heteróloga será realizada na continuidade do desenvolvimento do projeto durante o doutorado. Realizaremos os testes de expressão, com os quais definiremos as condições ótimas para expressão (temperatura, quantidade de indutor e tempo de indução) das astacinas em *E. coli* na forma solúvel e biologicamente ativas, com intuito futuro de realizar ensaios de atividade “in vitro” e “in vivo”.

3.8 Expressão heteróloga e purificação da LALP1

A expressão da LALP1 em procariotos e a purificação da proteína recombinante foram obtidas como descrito por DA SILVEIRA e colaboradores (2007c).

Uma colônia isolada da construção LALP1/pET-14b em *E. coli* BL21(DE3) pLysS foi inoculada em 15mL de meio LB líquido (triptona 10g/L; extrato de levedura 5g/L e NaCl 10g/L), contendo ampicilina 100µg/mL e cloranfenicol 34µg/ml e esta cultura foi incubada por 16h à 37°C sob agitação (200xg). A partir da diluição dessa cultura saturada (1:100) foi feito inóculo de 1L em meio LB líquido mantido a 37°C sob agitação até atingir densidade ótica entre 0,4-0,6 em 550nm. Nesse momento, a cultura foi refrigerada em banho de água e gelo e a expressão da proteína recombinante foi induzida pela adição de IPTG para uma concentração final de 0,1mM, sendo a cultura incubada por um período de 4h a 30°C, sob agitação. As bactérias foram recuperadas por centrifugação a 9000xg e ressuspensas em 40mL de tampão de extração desnaturante (uréia 8M, NaH₂PO₄ 50mM; NaCl 0,5M e imidazol 10mM) contendo lisozima 1mg/mL. Após 16h em “freezer” a -80°C o lisado foi descongelado, mantido

a 37°C por 30min, passado na “French Pressure Cell Press” (“French Press”) (American Instrument Company, Maryland, United States) 5 vezes consecutivas e centrifugado por 30min à 9000xg. O sobrenadante foi incubado com 1mL da resina Ni-NTA agarose (previamente equilibrada com o mesmo tampão de extração sem lisozima) à temperatura ambiente por 1h. Após este período de ligação, uma coluna foi empacotada com a suspensão de Ni-NTA agarose e lavada exaustivamente em tampão de lavagem desnaturante (uréia 8M; NaH₂PO₄ 50mM, pH 7,8; NaCl 500mM; imidazol 20mM) até que a D.O._{280nm} estivesse igual ou inferior a 0,010. A proteína recombinante desnaturada foi eluída com o tampão de eluição (uréia 8M; NaH₂PO₄ 20mM; NaCl 500mM, imidazol 250mM). O grau de pureza da proteína foi avaliado por SDS-PAGE e o eluato foi dializado exaustivamente contra água deionizada. A proteína obtida na forma insolúvel foi recuperada por centrifugação (4000xg por 10min à 4°C) e ressuspensa em 2mL de PBS. A suspensão da proteína insolúvel foi quantificada por espectrofotometria em 280nm, na presença de hidrocloreto de guanidina 6M e fosfato de sódio 20mM (pH 6,5), levando-se em consideração que 1mg/mL da proteína pura equivale a D.O._{280nm}=0,982, de acordo com os parâmetros físico-químicos determinados com o uso da ferramenta ProtParam, na página do ExPASy.

3.9 Produção de anticorpos policlonais anti-LALP1 em coelhos

As imunizações foram realizadas em dois coelhos adultos de acordo com protocolo de HARLOW e LANE (1998). As inoculações foram realizadas com 100µg da toxina LALP1 insolúvel suspensa em PBS e dividida em 3 alíquotas de 100µL aplicadas em 3 pontos diferentes: dois intramusculares e um intradérmico. A primeira dose do antígeno foi feita com adjuvante completo de Freund e os reforços, aplicados em média a cada 21 dias, foram feitos com adjuvante incompleto de Freund. O soro pré-imune foi obtido antes da primeira imunização através da coleta de aproximadamente 10mL de sangue via veia auricular, sendo o procedimento realizado após a anestesia dos coelhos com cloridrato de ketamina (80mg/Kg) e xilosina (9mg/Kg). O sangue foi colocado em tubo de vidro, mantido a 37°C por 1h e a 4°C por 16h para retração do coágulo e posterior separação do soro por centrifugação (5min a 3000xg). Depois de seguidas imunizações, o soro hiperimune foi obtido seguindo os mesmos procedimentos da coleta realizada para o soro pré-imune. Tanto o soro pré-imune quanto o soro hiperimune foram alíquotados em microtubo (1mL) e armazenados a -20°C. Os soros hiperimune anti-veneno de *L.*

intermedia foram previamente produzidos em coelhos e são utilizados rotineiramente no laboratório (LUCIANO *et al.*, 2004; CHAIM, *et al.*, 2006). Os soros hiperimunes anti-veneno de *L. laeta* e anti-veneno de *L. gaucho* foram gentilmente cedidos pela Prof^a. Dra. Kátia Cristina Barbaro do Laboratório de Imunopatologia do Instituto Butantan, São Paulo.

3.10 ELISA (“Enzyme Linked Imuno Sorbent Assay”)

Imunoensaios utilizando ELISA de captura foram realizados com os venenos de *L. intermedia*, *L. laeta* e *L. gaucho* diluídos em PBS. Placas de 96 poços MaxiSorp (Nunc, Roskilde, Dinamarca) foram sensibilizadas com 100µL/poço da solução de cada veneno (10µg/mL), incubados em câmara úmida por 2h a temperatura ambiente. Os poços foram lavados com PBS e o bloqueio foi realizado com solução de PBS-BSA 3% (200µL por poço) por 2h a temperatura ambiente. Durante o tempo de incubação, foram feitas diluições seriadas dos soros anti-LALP1 e pré-imune em PBS-BSA 3% (1:250, 1:500, 1:1000, 1:2000, 1:3000, 1:5000 e 1:10000). Após a retirada do bloqueio, foi adicionado 100µL de cada uma das diluições dos anticorpos primários nos poços das placas dos diferentes venenos (cada diluição foi feita em quadruplicata, tanto para o soro hiper quanto para o pré-imune) por 16h a 4°C. Novas lavagens foram realizadas com PBS-BSA 3% e as placas foram incubadas por 1h a temperatura ambiente com anticorpo secundário: IgG anti-coelho conjugado com peroxidase (diluição 1:5000). As reações colorimétricas foram reveladas utilizando OPD (orto-fenil diamina) (0,2mg/mL) e peróxido de hidrogênio (0,06%) em tampão citrato de sódio 24mM, pH 5,0. A revelação foi feita no escuro e interrompida com 100µL de solução de ácido sulfúrico 3M. O branco foi realizado da mesma maneira que as demais amostras, porém sem a sensibilização da placa com qualquer veneno. As absorbâncias foram medidas em leitor de ELISA (Meridiam ELX 800) com filtro 490nm. Para a construção do gráfico das médias das leituras obtidas para cada veneno em cada concentração, as leituras do branco e do soro pré-imune foram descontadas das leituras dos testes com soro hiperimune.

3.11 Ensaios de “Western Blotting”

Amostras dos venenos de *L. intermedia*, *L. laeta* e *L. gaucha* (12,5µg de cada) e da LALP1 (5µg) foram preparadas separadamente em tampão de amostra com 5% de β-mercaptoetanol, fervidas por 5min a 100°C e aplicadas em géis desnaturantes de poliacrilamida 12,5% (gel de separação) com “stacking” (gel de empacotamento). A corrida eletroforética foi realizada em cubas com tampão de corrida a 35mA. Após o término da corrida, os perfis protéicos foram transferidos para membrana de nitrocelulose, imersos em tampão de transferência por 16h à voltagem constante de 25mV. Em seguida as membranas foram coradas com Ponceau-S para verificar a eficiência da transferência e recortar as tiras permitindo a posterior incubação com diferentes anticorpos. As tiras de nitrocelulose foram bloqueadas com leite desnatado em pó (Molico, Nestlé) 3% (p/v) em PBS por 1h (T.A.). As membranas contendo os perfis protéicos dos venenos de *L. intermedia*, *L. laeta* e *L. gaucha* foram incubadas com 2mL de solução de soro hiperimune anti-LALP1 (1:1000 diluído na mesma solução de bloqueio) por 2h, T.A. e sob constante agitação. Cada uma das membranas contendo LALP1 foi incubada com 2mL dos diferentes soros hiperimune anti-veneno (1:1000 diluídos na mesma solução de bloqueio): anti-*L. intermedia*, anti-*L. laeta* e anti-*L. gaucha* nas mesmas condições descritas acima. Todas as membranas foram lavadas 5 vezes por 3min com PBS-leite na ausência de anticorpo e incubadas com anticorpos secundários anti-IgG de coelho conjugado à fosfatase alcalina (1:5000) por 1h (T.A.). Após 5 lavagens, as reações foram reveladas com o substrato BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indoil fosfato) e o cromógeno NBT (“nitro blue tetrazolium”) em tampão ótimo para atividade de fosfatase alcalina (Tris-HCl 100mM pH 9,5; NaCl 100mM e MgCl₂ 5mM).

3.12 Ensaios de Zimograma

Os zimogramas foram feitos usando SDS-PAGE 12,5%, contendo 3mg de gelatina/mL de gel. Amostras em estudo (3µg de veneno de *L. intermedia*, *L. laeta* e *L. gaucha*) foram diluídas em tampão de amostra não redutor e submetidas à eletroforese à 4°C (35mA). Os géis foram lavados 2 vezes (20min cada) em 2,5% de Triton X-100 e incubados à 37°C por 16h em tampão ótimo para atividade enzimática (Tris 50mM pH=7,4; NaCl 200mM; CaCl₂ 0,5mM; MgCl₂ 0,5mM; ZnCl₂ 0,5mM). Após o tempo de incubação, os géis foram corados pelo corante Azul Brilhante de

Coomassie e descorados com trocas sucessivas de metanol 50% (v/v). As bandas claras lisadas do substrato contra um fundo de coloração azul indicam a presença da degradação enzimática (proteases). O inibidor 1,10-fenantrolina (5mM), quelante de metal divalente, foi utilizado no tampão de incubação dos zimogramas para verificar se a atividade observada correspondia a metaloproteases.

3.13 RT-PCR para obtenção de cDNAs das glândulas de veneno de *L. laeta* e *L. gaucho*

Trinta espécimes adultas de *L. laeta* e *L. gaucho* foram submetidas à extração de veneno por eletrochoque e após cinco dias foi realizada a extração de RNA das glândulas. Para tanto, as vidrarias, agulhas e lâminas de barbear (Gillette) foram esterilizadas a 200°C por 8h; os microtubos de 2mL e as ponteiras foram autoclavadas por 40min e todo o procedimento foi realizado utilizando luvas e máscara em sala e bancada previamente limpas com solução de hipoclorito (3%) e álcool 70%, para evitar contaminação com RNases. As aranhas foram anestesiadas em atmosfera de clorofórmio, com a lâmina de barbear foi retirada a porção dorsal do cefalotórax, os pares de glândulas foram coletados com auxílio de agulhas e, imediatamente, congelados nos microtubos em gelo seco. Para a extração do RNA total por método baseado em CHOMEZYNSKI (1993), foram adicionados 750µL de TRIzol aos microtubos com as glândulas congeladas e homogeneizados com homogeneizador de tecidos (Tecnal, São Paulo, Brasil). Após 5min em temperatura ambiente, foram adicionados 150µL de clorofórmio, os microtubos foram vigorosamente agitados por 15 segundos e centrifugados a 20.000xg, por 20min, a 4°C. As três fases formadas após a centrifugação correspondem à fase aquosa contendo RNA, fase protéica e fase orgânica contendo DNA genômico. Com micropipeta retirou-se cuidadosamente a fase aquosa, adicionou-se 375µL de isopropanol e os tubos foram mantidos em T.A. por 10min para precipitação do RNA. Após centrifugação (20.000xg, 30min, 4°C), o sobrenadante foi descartado, adicionou-se cuidadosamente 1mL de etanol 75% para lavar o pellet de RNA e novamente foi centrifugado por 5min. Após retirada do sobrenadante, os microtubos foram abertos em fluxo laminar, imersos em gelo, até secar o pellet que foi ressuspensionado em 10µL de água ultrapura tratada com DEPC (dietilpirocarbonato). O RNA total de glândulas de veneno de *L. laeta* e *L. gaucho* foi submetido a reações

de RT-PCR (Reação em Cadeia da Polimerase com Transcriptase Reversa) para obtenção de cDNAs correspondentes aos mRNAs presentes nas glândulas de veneno. Os microtubos de PCR contendo Oligo DT (0,5µg/µL), RNA total (1µg de *L. laeta* ou *L. gaucho*) e água suficiente para 5µL foram colocados no termociclador (My Cyclor – Thermal Cyclor BioRad) a 72°C por 5min para desnaturação da fita simples de RNA e retornados imediatamente ao gelo. Adicionou-se tampão para transcriptase reversa (1x); 2,5mM de MgCl₂; 0,4mM de dNTPs, 20U de inibidor de RNAase; água DEPC-tratada suficiente para 10µL e foram colocados novamente no termociclador a 42°C para anelamento do oligo-DT. Após 1min, foi adicionado 200U da transcriptase reversa e os microtubos foram submetidos aos ciclos de 25°C/5min, 42°C/60min, 70°C/10min e 4°C/∞ (ciclo de espera).

3.14 Rastreamento de astacinas e PCR de seqüenciamento

Os cDNAs obtidos na RT-PCR foram utilizados como molde em reações de PCR com oligonucleotídeos iniciadores da LALP1 madura (43Rec sense: 5'-CGCGTCGACAATGCTGTGAAATATGACCAG-3' e 43Rec anti-sense 5'CGGGATCCTCACACATTTACATACGGACGT-3'). As reações foram realizadas em tubo de PCR, volume final de 20µL, com DNA polimerase de alta fidelidade com os seguintes reagentes: cDNA de *L. laeta* ou *L. gaucho* (2µL, equivalente a 10% do volume final da reação), tampão para *Pfu* DNA polimerase sem magnésio, dNTPs (0,2mM), MgSO₄ (3mM ou 4mM), 43 Rec sense (0,5mM), 43 Rec anti-sense (0,5mM), *Pfu* DNA polimerase (1,25U/50µL). As reações foram colocadas em termociclador pré-aquecido ("hot-start") a 95°C seguido dos ciclos: 95°C/2min (1 ciclo); 95°C/30s, 55°C/30s, 72°C/3min (10 ciclos); 95°C/30s, 63°C/30s, 72°C/3min (10 ciclos); 72°C/5min (1ciclo); 4°C/∞ (ciclo de espera). Os produtos obtidos foram analisados em gel de agarose 2% corados com brometo de etídeo. Além da análise em gel, esses produtos foram submetidos à PCR de seqüenciamento, na qual as duas fitas foram seqüenciadas utilizando-se os mesmos iniciadores da PCR anterior com o reagente "DYEnamic™ ET Dye Terminator Kit" (GE Healthcare) em seqüenciador automático "MegaBace™ 1000 DNA Analysing Systems" (Amersham Biosciences). As seqüências obtidas foram analisadas no software Genetyx-Mac v7.3. As seqüências dos cDNAs de *L. laeta* e *L. gaucho* foram submetidas ao banco de dados de famílias protéicas – Pfam, disponível em <http://pfam.sanger.ac.uk/> – (FINN

et al., 2008) para identificar a família a que pertenciam e foram comparadas com sequências depositadas no Genbank através da ferramenta BLASTp. As sequências parciais de *L. laeta* e *L. gaucho* foram denominadas LALP4 e LALP5, respectivamente, e depositadas no banco de dados GenBank como “ESTs – (números de acesso: GR277667 para LALP4 e GR277668 para LALP5).

3.15 Alinhamento de Múltiplas Sequências

As sequências aminoacídicas das astacinas de *Loxosceles* foram submetidas à comparação com o banco de dados GenBank através da ferramenta pBLAST disponível no NCBI. Os resultados obtidos foram confrontados e foram escolhidas, para o alinhamento, somente sequências de astacinas de diferentes organismos com valor de e-value $\leq 10^{-5}$. As sequências utilizadas e seus números de acesso do GenBank são: LALP2 (GQ227490), LALP3 (GQ227491), LALP4 (GR277667), LALP5 (GR277668), LALP1 (ABK20019), “Astacin” (CAB43519), LAST (CAQ16892.1), LAST-MAM (CAQ16893.1), NAS-4 (AAB53827), NAS-6 (NP_503121), NAS-7 (CAD99206.1), NAS-15 (NP_508154.2), CBR-NAS-7 (AAP31996.1), hOvast (CAD61265), mOvast (CAD61264), “sTolloid-like” (BAD01492.1), “hTolloid1” (O43897), “hTolloid2” (Q9Y6L7), “mTolloid” (NP033416), “hMeprinA” (NP_005579), “mMeprinA” (NP_032611), “hMeprinB” (NP_005916), “mMeprinB” (NP_032612), “Alveolin” (NP_001098139.1), BP10 (CAA39673), SPAN (AAA30072) and XHE (BAA14003). O alinhamento de múltiplas sequências foi realizado no programa CLUSTALW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>), o sombreamento indicando as conservações aminoacídicas foi obtido pelo programa BOXSHADE (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html) e as identidades aminoacídicas entre sequências foram comparadas para verificar as trocas aminoacídicas entre astacinas de diferentes organismos em relação às astacinas de *Loxosceles*.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Identificação de duas novas isoformas de astacinas presentes no veneno de *L. intermedia*

As sequências protéicas deduzidas a partir das sequências nucleotídicas dos cDNAs das duas novas isoformas de astacinas encontrados na biblioteca de cDNA de glândulas de veneno de *L. intermedia* foram denominados de LALP2 e LALP3 (FIGURAS 6A e 6B). A LALP2 possui o peptídeo sinal hidrofóbico com 21 resíduos de aminoácidos (sublinhado na FIGURA 6A), pró-peptídeo de 31 resíduos e a proteína madura com 204 resíduos (início na asparagina destacada na FIGURA 6A). Já a LALP3 tem peptídeo sinal hidrofóbico com 24 resíduos (sublinhado na FIGURA 6B), pró-peptídeo com 19 resíduos e a proteína madura tem 200 resíduos de aminoácidos (início na asparagina destacada na FIGURA 6B). As sequências das duas isoformas possuem o sítio catalítico com resíduos que são conservados em diferentes membros da família das astacinas (HEXXHXXGFXHEXXRXDR), existem quatro cisteínas (circuladas – Figuras 6A e 6B) que são conhecidas por formarem pontes dissulfeto intra-domínio e a volta de metionina (SXMXY) que contém um resíduo de tirosina envolvido na ligação ao zinco. A pró-LALP2 tem massa molecular estimada em 26,99 kDa com pI=7,84 e a pró-LALP3 tem massa molecular estimada em 25,45 kDa com pI=9,12 e dois sítios possíveis para N-glicosilação (entre colchetes - FIGURA 6B).

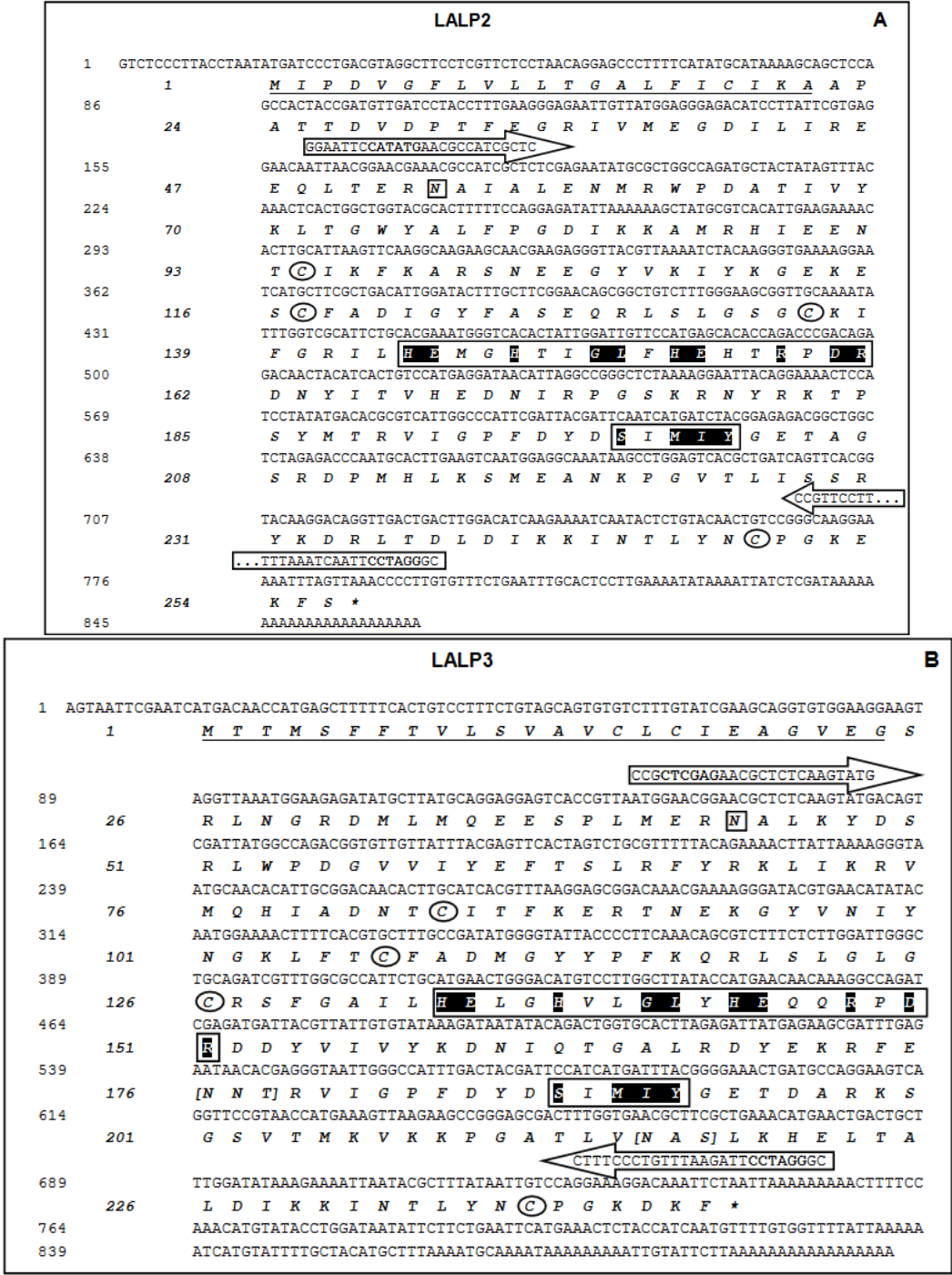


FIGURA 6: SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS E AMINOACÍDICAS DAS DUAS NOVAS ISOFORMAS DE ASTACINAS DO VENENO DE *L. intermedia*. **(A)** Sequência da LALP2. **(B)** Sequência da LALP3. Nas flechas estão os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a subclonagem molecular. O resíduo de asparagina que indica o início das proteínas maduras está destacado por um quadrado. Nos retângulos estão os domínios da família das astacinas com os resíduos conservados destacados em preto. Nos círculos estão os resíduos de cisteína. Em **(B)**, entre colchetes estão destacados dois sítios de N-glicosilação da LALP3.

4.2 Subclonagem molecular dos cDNAs referentes às astacinas maduras de *L. intermedia* (LALP2 e LALP3)

Os insertos referentes às astacinas maduras foram subclonados em vetor pET-14b. Após a ligação dos insertos das astacinas maduras nos plasmídeos de expressão pET-14b e transformação em *E. coli* DH5 α , realizamos PCR das colônias resistentes ao antibióticos utilizando os oligonucleotídeos do pET-14b (T7 e T7 terminator). Como mostrado nas FIGURAS 7A e 7B obtivemos clones positivos para as duas isoformas e escolhemos 3 clones de cada isoforma para realizar minipreparação dos plasmídeos (construção pET-14b/LALP2 e pET-14b/LALP3) e realizar sequenciamento para verificar se a fase de leitura foi mantida e se não houve qualquer alteração nas sequências. Os clones da LALP2 escolhidos foram os clones 2, 9 e 23 e da LALP3 foram escolhidos os clones 5, 9 e 25. Essa escolha foi realizada levando-se em consideração o formato da banda obtida (“sharp”) e a especificidade da reação (ausência de bandas de diferentes tamanhos) (FIGURA 7). A subclonagem em pET-14b foi realizada com o intuito futuro de obter as isoformas de astacinas recombinantes solúveis e ativas para submetê-las a ensaios de atividade biológica “in vitro” (ação frente diferentes moléculas de matriz extracelular, efeitos sobre diferentes linhagens celulares – normais e tumorais –, investigar possível atividade anti-trombótica) e “in vivo” (avaliar atuação das astacinas nos quadros locais e sistêmicos do loxoscelismo).

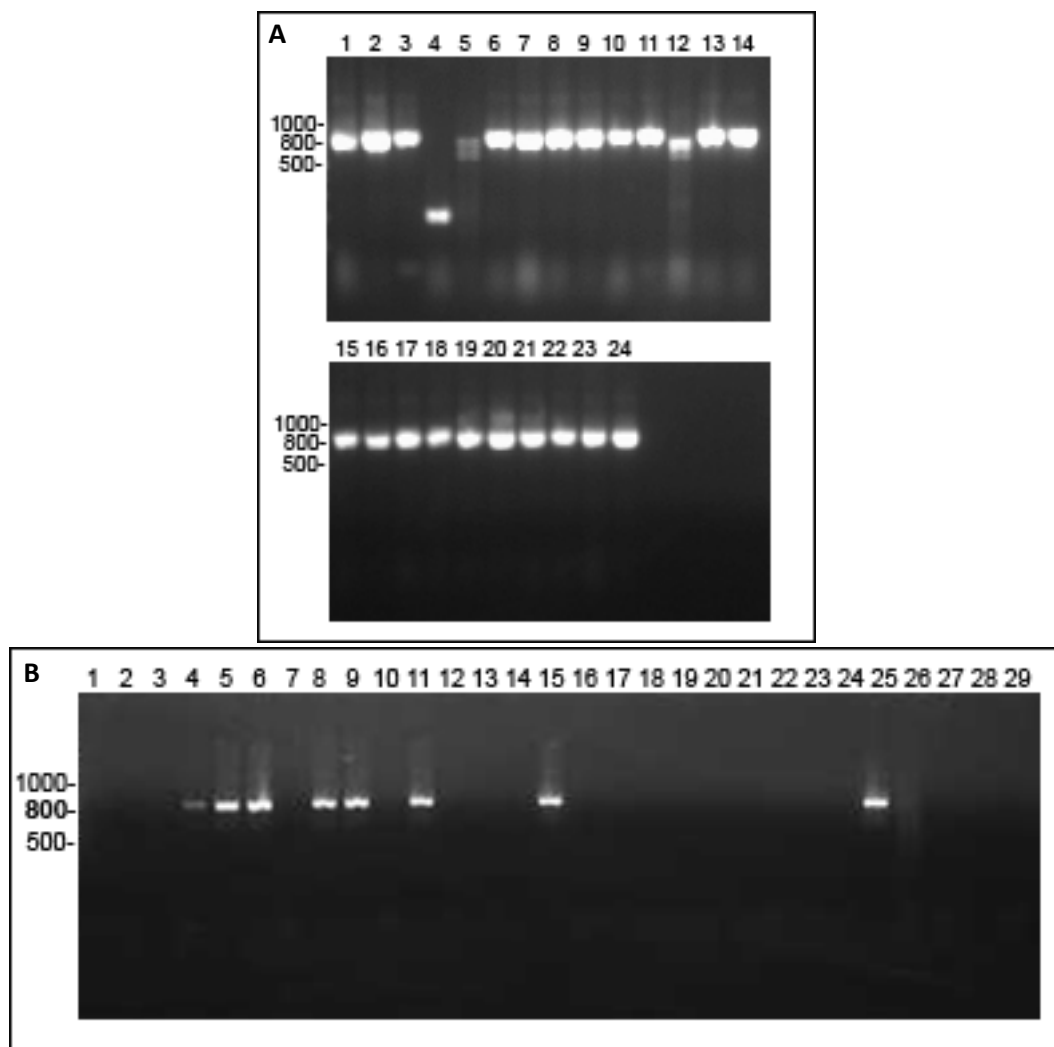


FIGURA 7 - ANÁLISE EM GEL DE AGAROSE DE PCR DE COLÔNIA DAS DUAS ISOFORMAS MADURAS DE ASTACINAS EM pET-14b. No canto esquerdo estão representados os marcadores de pares de bases. **(A)** Representa as 24 colônias testadas da LALP2. As colônias 4 e 5 são colônias negativas e as demais são positivas com banda na altura de aproximadamente 800pb. **(B)** Representa as 29 colônias testadas da LALP3. As colônias 4, 5, 6, 8, 9, 11, 15 e 25 representam colônias positivas com banda na altura de aproximadamente 800pb.

4.3 Reatividade imunológica cruzada de metaloproteases presentes nos venenos de *Loxosceles spp*

Para avaliar a relação da LALP1 – primeira metaloprotease da família das astacinas identificada no veneno de *L. intermedia* (da SILVEIRA *et al.*, 2007c) com toxinas nativas dos venenos de aranhas do gênero *Loxosceles* realizamos ensaios de ELISA e W.B.. Foram realizados esses dois métodos porque nos ensaios de ELISA as proteínas não são previamente desnaturadas e seus epítomos conformacionais são preservados. Já, nos ensaios de W.B., as proteínas são previamente desnaturadas com SDS e reduzidas com β -mercaptoetanol e, portanto, são analisados epítomos lineares e devido à separação eletroforética é possível

identificar as mobilidades eletroforéticas aparentes das proteínas reconhecidas pelos anticorpos. No ELISA (FIGURA 8A) foi utilizado 1µg/poço de veneno total diluído em PBS de cada uma das espécies em estudo (*L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta*) para etapa de sensibilização, incubado posteriormente com diferentes concentrações de soro anti-LALP1 como anticorpo primário (1:250, 1:500, 1:1000, 1:2000, 1:3000, 1:5000 e 1:10000) e o anticorpo secundário utilizado foi IgG anti-coelho na diluição 1:5000. Após revelação com OPD e peróxido de hidrogênio, as absorbâncias foram medidas em leitor de microplaca com filtro 490nm. As maiores absorbâncias foram obtidas nas reações com os venenos de *L. intermedia* e *L. laeta* como antígenos e soro anti-LALP1, sugerindo maior reconhecimento de epítomos não desnaturados relacionados com a LALP1 em proteínas nativas dos venenos dessas espécies quando comparado com o veneno da *L. gaucho* utilizado como antígeno. Na tentativa de identificar a mobilidade eletroforética aparente das toxinas nativas reconhecidas no ensaio de ELISA, foi realizado W.B. com amostras de veneno de *L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta* (12,5µg) e utilizado soro anti-LALP1 como anticorpo primário (1:1000) e anticorpo secundário conjugado com fosfatase alcalina (IgG anti-coelho 1:5000). Os resultados obtidos no W.B. (FIGURA 8B), indicam que os anticorpos anti-LALP1 reconheceram epítomos desnaturados nos venenos das três espécies estudadas com bandas positivas na altura de 25-32kDa para *L. intermedia*, 26-30kDa para *L. gaucho* e 27-29kDa para *L. laeta*. No outro ensaio de W.B. realizado, objetivou-se verificar se toxinas nativas relacionadas à LALP1, presentes nos venenos, são moléculas antigênicas. O ensaio foi realizado com amostras da LALP1 (5µg), soros anti-*L. intermedia*, anti-*L. gaucho*, e anti-*L. laeta* foram utilizados na diluição 1:1000 e os anticorpos secundários (IgG anti-coelho) foram utilizados na diluição 1:5000. Na FIGURA 2C pode-se observar que os anticorpos anti-venenos de cada espécie reconhecem epítomos lineares da LALP1 sugerindo que nos venenos de *L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta* existem proteínas nativas com epítomos imunogênicos relacionados com a metaloprotease recombinante da família das astacinas (LALP1). Portanto, nas imunoreações cruzadas realizadas observa-se que anticorpos anti-LALP1 reconhecem toxinas nativas dos venenos de *L. laeta*, *L. gaucho* e *L. intermedia* e anti-venenos (de *L. laeta*, de *L. gaucho* e de *L. intermedia*) reconhecem a astacina recombinante (LALP1) (FIGURAS 8B e 8C), sugerindo a existência de astacinas nos venenos estudados.

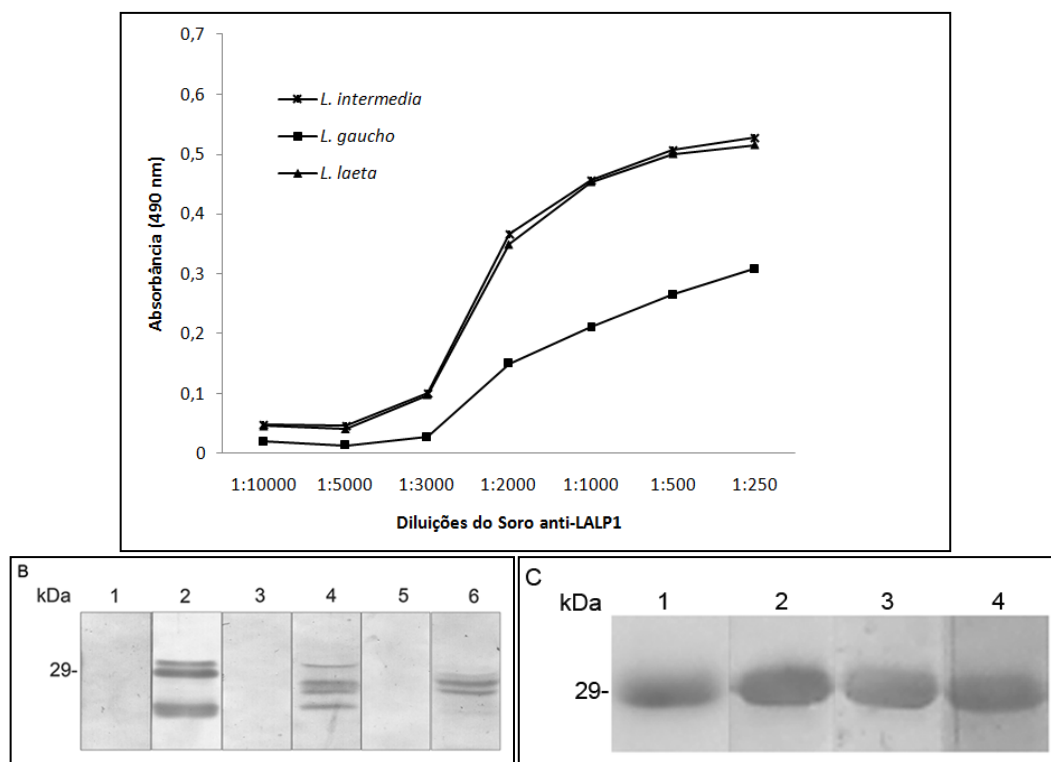


FIGURA 8: REAÇÃO IMUNOLÓGICA CRUZADA ENTRE METALOPROTEASES DOS VENENOS DE *Loxosceles* spp. (A) ELISA realizado utilizando como antígenos 1µg/poço dos venenos de *L. intermedia*, *L. laeta* e *L. gaucha* para reagir com soro hiper imune anti-LALP1 em diferentes concentrações indicadas no eixo X. O eixo Y indica as médias das absorbâncias obtidas após a leitura das reações em 490nm. O experimento foi realizado em quadruplicata contendo branco e reações com soro pré-imune como controles negativos. **(B)** “Western Blot”: colunas 1 e 2 são amostras de veneno de *L. intermedia*, colunas 3 e 4 *L. gaucha* de e colunas 5 e 6 de *L. laeta* (12,5µg de cada veneno em cada amostra). As colunas 2, 4 e 6 mostram as bandas obtidas em cada um dos venenos testados após a revelação das tiras de nitrocelulose incubadas com soro hiper imune anti-LALP1 (1:1000). As colunas 1, 3 e 5 são os controles negativos de cada veneno em que as tiras de nitrocelulose foram incubadas com soro pré-imune (1:1000). **(C)** “Western Blot”: membranas de nitrocelulose contendo amostras da LALP1 (5µg cada amostra) foram incubadas separadamente com soros anti-venenos (1:1000): soro anti-*L. intermedia* (coluna 2), anti-*L. gaucha* (coluna 3) e anti-*L. laeta* (coluna 4). A coluna 1 mostra a amostra de LALP1 corada com PONCEAU-S.

4.4 Efeito gelatinolítico de toxinas nativas dos venenos das três espécies de *Loxosceles* e inibição por 1,10- fenantrolina

Com intuito de relacionar atividade proteolítica das toxinas nativas que foram identificadas nos ensaios de reatividade cruzada nos venenos das três espécies de *Loxosceles* com a atividade descrita para a LALP1 por DA SILVEIRA e colaboradores (2007c), realizamos ensaios de zimograma em gel de poliacrilamida copolimerizado com gelatina com os venenos dessas aranhas. O ensaio foi realizado com 3µg de cada veneno, após a corrida eletroforética o SDS foi trocado por Triton-X100 e os géis foram incubados em tampão ótimo para atividade enzimática na presença e na ausência do inibidor 1,10-fenantrolina (0,5mM) por 16h

a 37°C. Na FIGURA 9A pode-se observar que os venenos de *L. intermedia*, *L. laeta* e *L. gaucho* possuem atividade gelatinolítica na região de 29kDa (região próxima em que foram identificadas toxinas no W.B.). Além disso, ao utilizar no tampão ótimo de incubação do zimograma 1,10-fenantrolina, que é um quelante de metais divalentes, a atividade gelatinolítica foi totalmente bloqueada (FIGURA 9B), caracterizando atividade metaloproteásica. Esses resultados de atividade gelatinolítica reforçam a hipótese inicialmente levantada com os resultados das imunoreações; de que as proteínas relacionadas à LALP1 presentes nos venenos de *L. laeta* e *L. gaucho* são também metaloproteases da família das astacinas, já que o mesmo perfil de atividade foi verificado para LALP1 (da SILVEIRA *et al.*, 2007c).

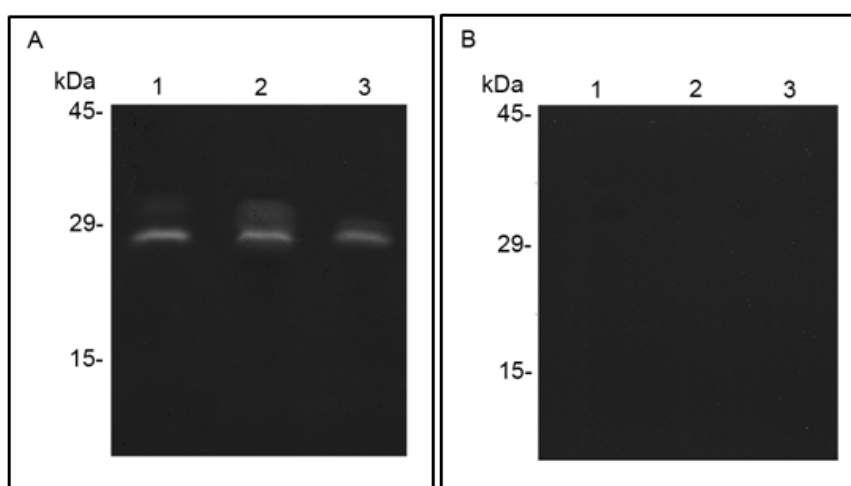


FIGURA 9: ZIMOGRAMA DE GELATINA DOS VENENOS DE *L. intermedia*, *L. laeta* e *L. gaucho*. **(A)** Zimograma de gelatina incubado em tampão ótimo na ausência de inibidor de metaloproteases. **(B)** Zimograma de gelatina incubado com tampão de ótimo na presença de 0,5mM de 1,10-fenantrolina. Tanto em **A** quanto em **B** as colunas 1, 2 e 3 representam, respectivamente, amostras de 3µg de veneno de *L. intermedia*, *L. laeta* e *L. gaucho*.

4.5 Identificação de mRNA de astacinas nas glândulas de venenos de *L. laeta* e *L. gaucho*

Com intuito de melhor caracterizar as metaloproteases presentes nos venenos de *L. laeta* e *L. gaucho* investigamos à qual família essas proteases pertenciam, já que os resultados anteriores (imunoensaios e atividade gelatinolítica) sugeriam que essas proteases poderiam pertencer à família das astacinas. Iniciamos purificando o mRNA de glândulas de venenos de 30 espécimes de aranhas de cada espécie sob investigação. Através de reações de RT-PCR obtivemos os cDNAs e estes foram utilizados como molde em reações de PCR com os oligonucleotídeos iniciadores desenhados para LALP1, como descrito nos

Materiais e Métodos. Foram obtidos fragmentos de aproximadamente 800pb tanto para *L. laeta* quanto para *L. gaucho* (FIGURA 10). Esses fragmentos foram submetidos a sequenciamento e a análise das sequências obtidas mostrou que esses cDNAs codificam metaloproteases da família das astacinas. Utilizamos para este estudo sequências depositadas no Genbank através do BLASTp e também buscamos os domínios de famílias protéicas no Pfam. Os resultados do Pfam mostram que tanto as sequências de *L. laeta* quanto a de *L. gaucho* possuem o domínio aminoacídico característico da família das astacinas. Os resultados do BLAST mostraram que as astacinas de *L. laeta* e *L. gaucho*, denominadas respectivamente de LALP4 e LALP5, possuem alta identidade com a LALP1 e com diferentes astacinas de outros organismos. Nas FIGURAS 11A e 11B temos as sequências dos cDNAs e as sequências aminoacídicas das astacinas dos venenos de *L. laeta* e *L. gaucho*. Podemos observar os resíduos de aminoácidos que compõem o sítio catalítico das astacinas (dentro do retângulo) e os resíduos desse sítio que são extremamente conservados entre as diferentes proteínas que pertencem à família das astacinas (sombreados de preto), juntamente com a volta de metionina (FIGURAS 11A e B – SXXMY sombreado de preto). Essas sequências parciais de *L. laeta* e *L. gaucho* foram depositadas no banco de dados GenBank como “ESTs – Expressed Sequence Tag” (números de acesso: GR277667 para LALP4 e GR277668 para LALP5).

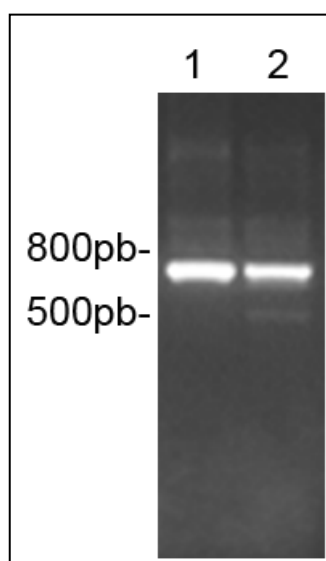


FIGURA 10: GEL DE AGAROSE DOS PRODUTOS DE PCR DE *L. laeta* e *L. gaucho* CORADO COM BROMETO DE ETÍDEO. A coluna 1 mostra o fragmento obtido no PCR com “primers” específicos para LALP1 utilizando cDNA de *L. laeta* como molde e a coluna 2 mostra o fragmento obtido no PCR com “primers” específicos para LALP1 utilizando cDNA de *L. gaucho* como molde.

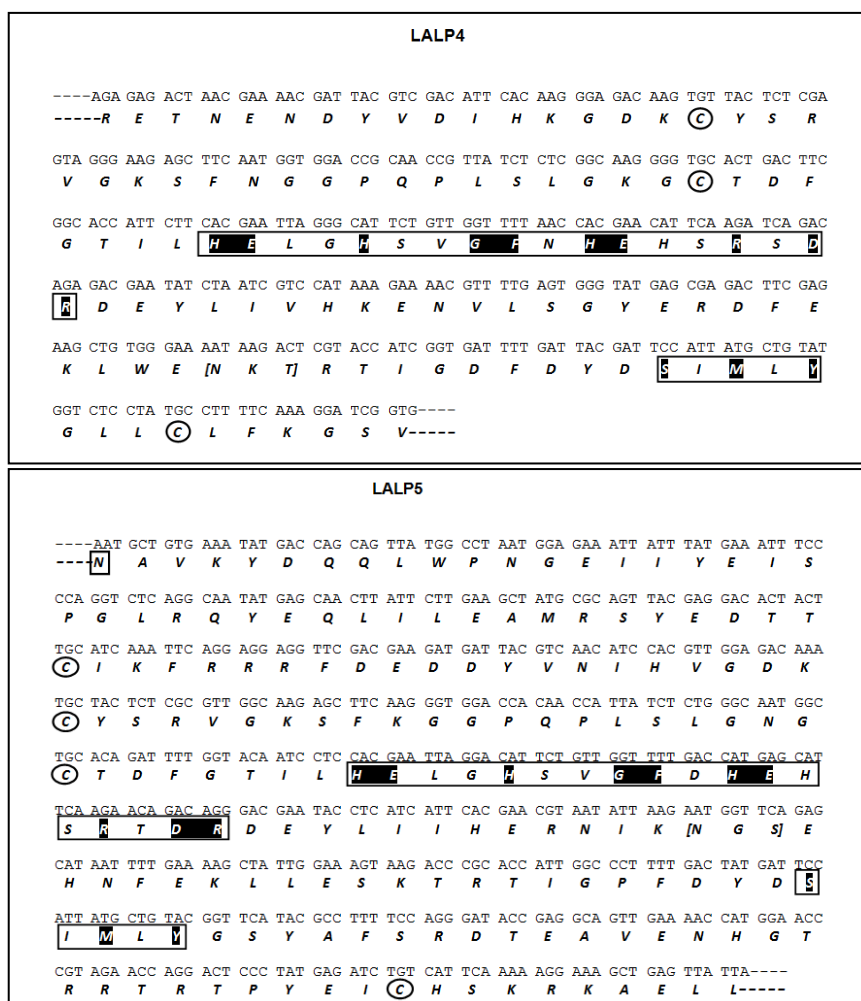


FIGURA 11: SEQUÊNCIA NUCLEOTÍDICA E AMINOACÍDICA DAS ASTACINAS IDENTIFICADAS EM VENENOS DE *L. laeta* E *L. gaucho*. **(A)** Representa a sequência da LALP4 (*L. laeta*). **(B)** Representa a sequência da LALP5 (*L. gaucho*). Dentro dos retângulos estão os domínios da família das astacinas com os resíduos conservados destacados em preto (HEXXHXXGFXHEXRXDR) e a volta de metionina (SXXMY). Nos círculos estão os resíduos de cisteínas. O resíduo de asparagina da astacina de *L. gaucho* que indica o início da proteína madura está destacado por um quadrado.

4.6 Análise comparativa das sequências aminoacídicas das LALPs com astacinas de diferentes organismos

As sequências aminoacídicas das duas novas isoformas de astacinas encontradas na biblioteca de cDNA de glândulas de venenos de *L. intermedia* (LALP2 e LALP3) foram comparadas com o banco de dados GenBank com auxílio do algoritmo BLASTp e o alinhamento de múltiplas sequências foi feito no ClustalW. O alinhamento mostra que a maior conservação aminoacídica, ou seja, existência de resíduos de aminoácidos idênticos ou de resíduos conservados na mesma região, ocorre nas regiões do sítio catalítico, na volta de metionina e em quatro cisteínas que são extremamente conservadas em todas as astacinas (FIGURA 12). O

percentual de positividade que representa tanto as identidades (resíduos aminoacídicos idênticos) quanto a conservação (resíduos aminoacídicos diferentes, mas de mesma natureza) entre as astacinas analisadas está demonstrado na TABELA 1. Dentre as astacinas de *L. intermedia*, a LALP2 e LALP3 possuem a maior positividade (55%), a LALP2 apresenta 43% de positividade com a LALP1 e a LALP3 tem 46% com a LALP1 (TABELA 1). As comparações entre as sequências de astacina de *L. laeta* e *L. gaucho* (LALP4 e LALP5) com as demais astacinas são menos informativas devido ao fato de serem sequências parciais. Contudo, com as comparações dessas sequências parciais com as astacinas de *L. intermedia*, observa-se que a LALP4 e a LALP5 possuem grande homologia com a LALP1 (75%), a LALP4 possui 44% de positividade com a LALP2 e 48% com a LALP3. Já a LALP5 possui 39% de similaridade com a LALP2 e 40% com a LALP3. Baseado nas positivities aminoacídicas, as LALPs são provavelmente homólogas a outros membros da família das astacinas de distintos organismos, tais como: astacinas de nematódeos; ovastacinas de camundongos e humanos; astacina de lagostim *Astacus astacus*; tolóides de humanos, camundongos e aranha; astacina de artrópode ancestral *Limulus polyphemus* e meprinas de humanos e camundongos. Em geral, as maiores similaridades encontradas para as LALPs foram com membros da família das astacinas de nematódeos (NAS). Além disso, as LALPs são mais similares com astacina de artrópodes da espécie *Limulus polyphemus* (LAST e LAST_MAM) do que com outra astacina de aranha (*Achaeearanea tepidariorum*).

LALP2	106	RPDRIDNYITVHEDNIRPGSKRNYRKTSPSYMTRVIG-PFDYI	SIMIIYGETAGSRDPMHLKS
LALP3	105	RPDRIDYVIVYKONIQTGALRDYEKRFEENNRVIG-PFDYI	SIMIIYGETDARKS--GSVT
LALP5	106	RTDRIDYLIITHERNIKNGSEHNFEKLLSKTRTIG-PFDYI	SIMLYGSYAFSRDTEAVEN
LALP1	106	RADRIDFLIITHKENIKNGSEHNFDKLWENNTRTIG-PFDYI	SIMLYGAYAFSKDTRKFKT
LALP4	60	RSDRIDYLIIVHKENVLSGYERDFEKLWENKTRTIG-DEDYI	SIMLYGLLCLFKGSV----
NAS4	107	RQDRIDSYIDVWVONVMNGADDQFEKYNLNVISHLDEPYDYI	SIMHYGPPYAFSGSG-KKTL
NAS15	106	RTDRIDHITIMWNNIQAGMQGQFEKYGHGTIQSLGTGYDYI	SIMHYGTKAFSRNG-QPTM
NAS7	106	RWDRIDNFIDIIWQNIIDRGALDQFCQVDLSKTSYYGQPYDYI	SILHYDSLAFSKNG-FPTM
CBR-NAS-7	106	RWDRIDNFIDIIWQNIIDRGALDQFCQVDLSKTSYYGQPYDYI	SILHYDSLAFSKNG-FPTM
NAS6	105	RADRIDHIIKINWNIILPGMKSFQDKISAVLQDLQGENYDYI	SIMHYDSTAFSRNG-RNTI
hOvast	112	RADRIDRYIRVNWNEILPGFEINFIKS---RSSNMLTPYDYS	SVMHYGRLAFSRFG-LPTI
mOvast	112	RADRIDRYIQVNWNEILPGFEINFIKS---RSTNMLVPYDYS	SVMHYGRFAFSWRG-QPTI
Alveolin	103	RYDRIDQFISVITWNIKPGKQGNFDVK---MGDTLNIIPYDEG	SIMHYGTSYFSKDG-SPTI
hTolloid1	112	RPDRIDNHVTIIRENIQPGQEYNFLKMEPGEVNSLGERYDEI	SIMHYARNTFSRGM-FLDT
mTolloid	112	RPDRIDNHVTIIRENIQPGQEYNFLKMEPGEVNSLGERYDEI	SIMHYARNTFSRGM-FLDT
hTolloid2	112	RPDRIDQHVITIIRENIQPGQEYNFLKMEAGEVSSLGETYDEI	SIMHYARNTFSRGV-FLDT
sTolloid-like	112	RPDRIDKHVCIINKNIMTGQEYNFNKLTTEEVTSLGLAYDYI	SIMHYARNTFSRGT-YLDT
XHE	108	RSDRIDDYVIIHTENIIPDFLKMFEKYN---TNNLGIEYDYI	SVMHYSRYHYSING-DITI
BP10	117	RPDRIDYINVLVQNIQSGROHNEAKYTWGRVTSRNVEYDVG	SIMHYGGYGFSSNG-RPTI
SPAN	117	RPDRIDYINVHFENVNGREHNEAKYTWGVSSTSNVEYDVG	SIMHYGGYGFSSNG-RPTI
Astacin	102	RMDRIDNYVTINYNQVNDPSMTSNFIDITYS---RYVGEDYQY	SIMHYGKYSFSIQWGVLET
LAST	105	RSDRIDYLNHWNINMGMEIWFKKMSVFENRLDITFDYI	SIMLYGETSFSKDGSRVM
LAST-MAM	105	RADRIDYIEVWIDNIIQSMQYNFNKMEPWENNYLNEREDYI	SVMLYGETAFSKDGTSPITV
hMeprinA	104	RTDRIDYVNIWWDQILSGYQHNFDTYDDSLITDLNTPYDYI	SIMHYQPFSEFNKNSVPTI
mMeprinA	104	RTDRIDYVNIWWDQIITDYEHNFNTYDDNTITDLNTPYDYI	SIMHYGPFSEFNKNSIPTI
hMeprinB	105	RSDRIDYVRIMWDRILSGREHNFNTYSDDISDSLNVPYDYI	SVMHYSKTAFO-NGTEPTI
mMeprinB	105	RADRIDYVIIWDRIQPGKEHNFNIYNDVSVDLSLNVPYDYI	SVMHYSKTAFO-NGTESTI
		↑ ↑ ↑	↑ ↑ ↑
LALP2	165	MEANKP--GVTLISSRYKDRITDLDIKKINTLYNCPGKEKFS-----	
LALP3	162	MKVKKP--GATLVNASLKHELTALDIKKINTLYNCPGKDKF-----	
LALP5	165	HGTRRT--RTPYEICHSKRKAELL-----	
LALP1	165	MEPVEP--GLPMKSVIQKGLKSYDIIKVNKLYKCPPVNPYPGGIRPYVNV-----	
LALP4			
NAS4	166	VPKKS----GSERMGQVRKFSDDIDVRKINKLYNCPGVSGNNNNNNNNQINSNSIVNHPO	
NAS15	165	IPKKN----G-ATIGQRNGFSKVDKFKINTLYGCP-VEGEKPTTSAPTSGPIVITVKPV	
NAS7	165	LPKVK----SATIGNARDFSDVDISKINRMYNCP---VEKSVTAPFARARHVPIYSPQ	
CBR-NAS-7	165	LPKVK----SATIGNARDFSDVDISKINRMYNCP---LEKSVTAPFARARHVPIYSPQ	
NAS6	164	ETVENG----FTQVIGTAMDLSPIDIVKINKLYSCK---TKK-----	
hOvast	168	TPLWAP----S-VHIGQRWNLSASDIIRVLKLYGCSPSGPRPRGRGSHAHSTGKSPAPAS	
mOvast	168	IPLWTS----S-VHIGQRWNLSASDIIRVCLYNCQSQSPDSSHGRGFQAQSDGRSLTPAS	
Alveolin	159	QP--NE----G-VNIGQRKRLSQDIDIKINTLYRCGSKY-----	
hTolloid1	171	ILPSRD-DNGIRPAIGQRTLRSLKGDIAQARKLYRCP---ACGETLQESGNLSSPGFPNG	
mTolloid	171	ILPSRD-DNGIRPAIGQRTLRSLKGDIAQARKLYRCP---ACGETLQESSGNLSSPGFPNG	
hTolloid2	171	ILPRQD-DNGVRPTIGQVRRLSQGDIAQARKLYKCP---ACGETLQDGTGNFSAPGFPNG	
sTolloid-like	171	ILPQEDPTQKRPEIGQVRRLSEGDIQTNLLYKCP---SCGKSLQNPSSGILSSPEYPNS	
XHE	164	EPKPDP----NVPIGQRDGLSIIDISKINKLYEON---VCSNLLPYSNGMMISANYPSA	
BP10	176	TTRDPR----LNSRLGQRIALSADIELANLIYECDDIEDCAGANECLNGGYHDTCCNCV	
SPAN	176	TTIDPR----LNSRLGQRTALSADIELANRIYECDDVEDCSNADECLNGGYHADDCDCV	
Astacin	160	IVPLQN-----GIDLIDPYDKAHMLQTD-----ANQINNLYTNECSLR	
LAST	164	TAKD---GTFLEPYNKPGLSKSDIIRINKLYEON-----	
LAST-MAM	165	RPKQP---GVVIGFVWKKPGFSESIVRRVNRLYECFGEVRPPPPKIPDFICDF-----	
hMeprinA	164	TAKI---PEFNSIIGQRLDFSAIDLERLNRMYNCTTHTLLDHCTFEKANICGMIQGT	
mMeprinA	164	TTKI---PEFNTIIGQLPDFSAIDLERLNRMYNCTATHTLLDHCDFEKTNVCGMIQGT	
hMeprinB	164	VTRI---SDFEDVIGQRMDFSDSDILKLNQLYNCSSSLSFMDSCSFELENVCGMIQSSG	
mMeprinB	164	VTRI---SEFEDVIGQRMDFSDYDLKLNQLYNCTSSLSFMDSCDFELENICGMIQSSG	

FIGURA 12: ALINHAMENTO DE SEQUÊNCIAS DE ASTACINAS DE DIFERENTES ORGANISMOS. Os resíduos de aminoácidos que fazem parte do domínio característico da família das astacinas estão destacados na figura. Os resíduos que fazem parte do sítio catalítico e da volta de metionina estão destacados no retângulo por flechas. Os quatro resíduos de cisteínas existentes em cada sequência de astacina estão marcados com asterisco. As sequências comparadas foram: LALP2 ("astacin-like metalloprotease toxin precursor 2 *Loxosceles intermedia*" GQ227490), LALP3 ("astacin-like metalloprotease toxin precursor 3 *Loxosceles intermedia*"

GQ227491), LALP4 ("astacin-like metalloprotease toxin *Loxosceles laeta*", EST - GR277667), LALP5 ("astacin-like metalloprotease toxin *Loxosceles gaucho*", EST - GR277668), LALP ("astacin-like metalloprotease toxin precursor *Loxosceles intermedia*" ABK20019), "Astacin" (*Astacus astacus* CAB43519), LAST ("*Limulus polyphemus* astacin" CAQ16892.1), LAST-MAM ("*Limulus polyphemus* MAM-containing astacin-like metalloprotease" CAQ16893.1), NAS-4 ("Nematode Astacin-4" AAB53827), NAS-6 ("Nematode Astacin-6" NP_503121), NAS-7 ("Nematode Astacin-7" CAD99206.1), NAS-15 ("Nematode Astacin-15" NP_508154.2), CBR-NAS-7 ("*C. briggsae* Nematode Astacin" AAP31996.1), hOvast ("Human Ovastacin" CAD61265), mOvast ("Mouse Ovastacin" CAD61264), sTolloid-like ("Spider Tolloid-Like" BAD01492.1), "hTolloid1" ("Human Tolloid-like 1" O43897), "hTolloid2" ("Human Tolloid-like 2" Q9Y6L7), "mTolloid" ("Mouse Tolloid like" NP_033416), "hMeprinA" ("Human Meprin alpha chain" NP_005579), "mMeprinA" ("Mouse Meprin alpha chain" NP032611), "hMeprinB" ("Human Meprin beta chain" NP_005916), "mMeprinB" ("Mouse Meprin beta chain" NP032612), "Alveolin" ("Fish astacin - *Oryzias latipes*" - NP_001098139.1), BP10 ("Urchin Blastula Protease10" CAA39673), SPAN ("*S. purpuratus* Astacin-like protease" AAA30072) and XHE ("Xenopus Hatching Enzyme" BAA14003).

	LALP2	LALP3	LALP4	LALP5
LALP2		55	44	39
LALP3	55		48	40
LALP4	44	48		72
LALP5	39	40	72	
LALP1	43	46	75	75
Astacin	31	30	34	31
LAST	38	38	49	41
LAST-MAM	34	38	41	37
NAS-4	35	35	44	40
NAS-6	35	35	41	40
NAS-7	32	34	42	38
NAS-15	33	39	42	40
CBR-NAS-7	32	34	41	38
hOvast	25	26	36	30
mOvast	27	29	38	33
sTolloid	28	32	40	31
hTolloid1	31	29	38	31
hTolloid2	30	30	40	31
mTolloid	31	29	38	31
hMeprinA	24	27	33	24
mMeprinA	24	28	33	25
hMeprinB	29	26	35	32
mMeprinB	29	31	33	34
Alveolin	35	36	35	32
BP10	33	31	42	37
SpAN	34	30	42	35
XHE	26	31	38	27

TABELA 1: PORCENTUAL DE POSITIVIDADE OBTIDA A PARTIR DO ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DOS DIFERENTES MEMBROS DA FAMÍLIA DAS ASTACINAS EM RELAÇÃO ÀS LALPs.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Os acidentes com aranhas marrons são caracterizados por quadro clínico de envenenamento com manifestações cutâneas e/ou sistêmicas por seu veneno ser composto por uma mistura de toxinas capazes de causar lesões dermonecroticas com espalhamento gravitacional, trombocitopenia por agregação plaquetária, anemia hemolítica e, em casos mais graves, falência renal aguda (FUTREL, 1992; da SILVA *et al.*, 2004; CHAIM *et al.*, 2006).

Toxinologia é a ciência que se destina ao estudo de toxinas presentes em organismos de todos os reinos. Dentro desse universo, os mecanismos moleculares e celulares que levam aos principais sintomas do loxoscelismo, bem como a caracterização dos componentes dos venenos loxoscélicos e suas atividades biológicas, por não estarem completamente elucidados, são focos de constante investigação científica.

A caracterização bioquímica das toxinas presentes nos venenos loxoscélicos iniciou-se com estudos de bioquímica e imunologia clássicas a partir do veneno total (veneno extraído diretamente das aranhas), nos quais toxinas nativas foram purificadas por diferentes técnicas cromatográficas e caracterizadas. Muito foi descoberto a respeito das participações dessas toxinas nos efeitos deletérios do loxoscelismo com estudos “in vitro” e “in vivo” do veneno total e frações protéicas nativas purificadas (ELGERT *et al.*, 1974; GEREN *et al.*, 1976; FEITOSA *et al.*, 1998; VEIGA *et al.*, 1999; YOUNG; PINCUS, 2001; LUCIANO *et al.*, 2004; BARBARO *et al.*, 2005; MACHADO *et al.*, 2005). Porém, o estudo isolado das toxinas nativas que compõem o veneno total é um tanto limitado, uma vez que a quantidade de veneno obtido através de coleta por eletroestimulação, como descrito por FEITOSA e colaboradores (1998), é de poucos microlitros por animal (raramente ultrapassa 4µl) e contém cerca de 65µg a 100µg de proteínas totais (SAMS *et al.*, 2001). Para a purificação das toxinas nativas são necessários miligramas de veneno total para que ao final do processo sejam obtidos poucos microgramas da fração protéica de interesse. Outro agravante é a grande quantidade de diferentes proteínas presentes no veneno total e predominância dessas na faixa de 5 a 40kDa, o que dificulta ainda mais a eficiência da purificação por técnicas cromatográficas. Alternativamente, os avanços em biologia molecular possibilitaram realizar clonagem, expressão e purificação de quantidades significativas de proteínas

presentes em venenos e avaliar de maneira individualizada estas toxinas que tem atividades muitas vezes sinérgicas e estão na mistura protéica que forma os venenos loxoscélicos (KALAPOTHAKIS *et al.*, 2007).

Hoje se acredita que existam mais de uma centena de diferentes membros ou isoformas de uma mesma toxina sendo expressas no veneno total de aranhas do gênero *Loxosceles* (da SILVA *et al.*, 2004; MACHADO *et al.*, 2005; KALAPOTHAKIS *et al.*, 2007). Provavelmente, os efeitos deletérios observados após os acidentes representem a soma total de atividades biológicas das diferentes toxinas do veneno.

As fosfolipases-D são consideradas toxinas chaves para o envenenamento loxoscélico porque sozinhas, tanto as toxinas nativas purificadas quanto as toxinas recombinantes, são capazes de reproduzir a maioria dos sinais e sintomas do loxoscelismo descritos para o veneno total (MACHADO *et al.*, 2005; CHAIM *et al.*, 2006; da SILVEIRA *et al.*, 2006; da SILVEIRA *et al.*, 2007b; de ANDRADE *et al.*, 2006; APPEL *et al.*, 2008, RIBEIRO *et al.*, 2007; de OLIVEIRA-CRISTOFF *et al.*, 2008). Tomando como exemplo o quadro cutâneo em que a resposta inflamatória local é essencial para o desenvolvimento da lesão dermonecrótica (da SILVA *et al.*, 2004; OSPEDAL *et al.*, 2002), as fosfolipases-D são capazes de induzir ativação indireta e desregulada de neutrófilos via células endoteliais de vasos sanguíneos, processo que culmina em necrose (PATEL *et al.*, 1994; DRAGULEV *et al.*, 2007).

As proteases já descritas como componentes dos venenos loxoscélicos são metaloproteases e serinoproteases; porém, estas toxinas foram menos estudadas do que as toxinas dermonecróticas e suas funções nos efeitos deletérios dos venenos de aranhas marrons ainda não estão bem caracterizadas. Os estudos envolvendo hialuronidases, glicosidases responsáveis pela degradação de ácido hialurônico e descritas em venenos de diferentes espécies de *Loxosceles*, sugerem que tais enzimas atuem como fatores que aumentam a difusão das demais toxinas no organismo da vítima e estejam associadas com espalhamento gravitacional das lesões de pele (WRIGHT *et al.*, 1973; YOUNG; PINCUS, 2001; VEIGA *et al.*, 2001a, BARBARO *et al.*, 2005; da SILVA *et al.*, 2004; da SILVEIRA, *et al.*, 2007a).

No veneno de *L. intermedia*, FEITOSA e colaboradores (1998) descreveram existência de duas toxinas nativas com atividade de metaloprotease e somente em 2002, DA SILVEIRA e colaboradores comprovaram que estas metaloproteases eram constituintes próprios do veneno de *L. intermedia* e não provenientes de

contaminação digestiva do veneno, conforme críticas da época. As metaloproteases do veneno de *L. intermedia* degradam componentes protéicos da matriz extracelular como: fibronectina, entactina, proteoglicano de heparan-sulfato e fibrinogênio (VEIGA *et al.*, 2000b, 2001b; ZANETTI *et al.*, 2002). Essas enzimas também foram descritas em venenos de *L. reclusa*, *L. deserta*, *L. rufescens*, *L. gaucho* e *L. laeta* (YOUNG; PINCUS, 2001; BARBARO *et al.*, 2005; MACHADO *et al.*, 2005; FERNANDES-PEDROSA *et al.*, 2008).

DA SILVEIRA e colaboradores (2007c) caracterizaram uma metaloprotease presente no veneno de *L. intermedia* como pertencente à família das astacinas. Em diferentes venenos de animais são encontradas metaloproteases; porém, o trabalho de DA SILVEIRA e colaboradores (2007c) foi o primeiro achado de uma proteína da família das astacinas como constituinte de um veneno animal, uma vez que, as metaloproteases de serpentes são da família das adamalisinas. Os estudos com metaloproteases das demais espécies de *Loxosceles* tiveram como objetivo mostrar que existiam toxinas nativas dos venenos com atividade metaloproteásica e não caracterizaram a família à que essas proteases pertenciam (YOUNG e PINCUS, 2001; BARBARO *et al.*, 2005; MACHADO *et al.*, 2005).

Os resultados obtidos com o desenvolvimento do presente estudo acrescentam informações importantes a respeito das metaloproteases dos venenos loxoscélicos, uma vez que identificamos duas novas isoformas de astacinas no veneno de *L. intermedia* (LALP2 e LALP3) e caracterizamos metaloproteases do veneno de *L. laeta* (LALP4) e *L. gaucho* (LALP5) como também pertencentes à família das astacinas. Tais resultados indicam a existência de uma família gênica para astacinas presente tanto no veneno de uma única espécie (*L. intermedia*) quanto nos venenos de *L. laeta* e *L. gaucho*, sugerindo que essa família gênica esteja presente em todo o gênero *Loxosceles*.

A existência de diferentes isoformas ou membros de astacinas no veneno de *L. intermedia* foi primeiramente cogitada após análise de reações imunológicas usando soro hiperimune anti-LALP1 contra veneno total de *L. intermedia* que revelaram a existência de três bandas em ensaios de W.B. na região de 25-32 kDa (FIGURA 2B). A procura de diferentes isoformas na biblioteca de cDNA de glândulas de veneno de *L. intermedia* comprovaram a existência de mais duas isoformas que denominamos LALP2 e LALP3, caracterizando uma família de astacinas presentes

no veneno de *L. intermedia* com três diferentes isoformas (a LALP, previamente descrita e agora denominada de LALP1, a LALP2 e a LALP3). Portanto, podemos sugerir a existência de uma família gênica para astacinas em *L. intermedia* já que isolamos isoformas bastantes diferentes expressas no mesmo veneno, com as seguintes positivities aminoácidas: LALP1 tanto com LALP2 quanto com LALP3 apresenta 41% de positividade, LALP3 e LALP2 com 49%.

Os resultados obtidos nas reações imunológicas cruzadas mostram que anticorpos contra a astacina de veneno de *L. intermedia* (LALP1) reconhecem epítomos de toxinas existentes nos venenos de *L. laeta* e *L. gaucho*, tanto na forma não desnaturada (FIGURA 2A) quanto na forma desnaturada (FIGURA 2B). As toxinas reconhecidas pelos anticorpos anti-LALP1 possuem atividade gelatinolítica, observada nos experimentos de zimograma (FIGURA 9A) em que as bandas de atividade aparecem na mesma altura das bandas que foram reconhecidas pelos anticorpos (25-32kDa). Além disso, essas toxinas são realmente metaloproteases por terem suas atividades gelatinolíticas bloqueadas por 1,10-fenantrolina (quelante de metal divalente) (FIGURA 9B), resultados que corroboram com os dados da literatura que identificaram metaloproteases nos venenos de *L. laeta*, *L. gaucho* e *L. intermedia* (VEIGA *et al.*, 2000b; VEIGA *et al.*, 2001a; ZANETTI *et al.*, 2002). Anticorpos anti-veneno de *L. laeta* e anti-veneno de *L. gaucho* foram capazes de reconhecer epítomos lineares da LALP1. Esses resultados em conjunto indicam que metaloproteases do veneno de *L. laeta*, *L. gaucho* e *L. intermedia* possuem regiões conservadas que são fortes determinantes antigênicos e que essas toxinas estão relacionadas quanto as suas atividades proteolíticas. Apesar desses achados apontarem para uma alta similaridade entre as toxinas dos diferentes venenos de *Loxosceles*, ainda permanecia a dúvida se as metaloproteases dos venenos de *L. laeta* e *L. gaucho* também pertenciam à família das astacinas. Isso porque, os anticorpos utilizados, apesar de serem anti-astacina recombinante de *L. intermedia*, eram policlonais e não é possível assegurar que os epítomos reconhecidos fazem parte dos domínios protéicos característicos das astacinas. Além disso, não existem inibidores específicos descritos para astacinas (GOMIS-RÜTH, 2003). Para investigar à qual das famílias de metzincinas pertenciam as metaloproteases de *L. laeta* e *L. gaucho*, foram utilizadas técnicas de biologia molecular e ferramentas de bioinformática. Os resultados de sequenciamento e busca no banco de dados Pfam

identificaram que essas enzimas possuem domínio da família das astacinas e, além disso, verificou-se que as sequências parciais das astacinas de *L. laeta* e *L. gaucho* possuem alta identidade aminoacídica com a LALP1 – 75% (TABELA 1).

Todos esses resultados sugerem a existência de uma família gênica de toxinas do tipo astacinas no gênero *Loxosceles*, uma vez que foram identificadas 3 isoformas em *L. intermedia* e também isoformas nas três espécies estudadas e, portanto, essas toxinas possivelmente tem papel importante nos efeitos tóxicos do veneno de aranhas marrom em humanos. Essa idéia não é suportada somente pelos resultados obtidos no presente trabalho, mas também, por comparação com estudos realizados com as fosfolipases-D. Diferentes autores isolaram homólogos de fosfolipases-D em venenos de diferentes espécies do gênero *Loxosceles* e é consenso na literatura que as fosfolipases-D compõem uma família de importantes toxinas nesses venenos (FERNANDES-PEDROSA *et al.*, 2002; KALAPOTHAKIS *et al.*, 2002; TAMBOURGI *et al.*, 2004; da SILVA *et al.*, 2004; RAMOS-CERRILO *et al.*, 2004; RIBEIRO *et al.*, 2007; APPEL *et al.*, 2008). BINFORD e colaboradores (2005) analisaram três cDNAs referentes a fosfolipases-D de *L. arizonica* (espécie da América do Norte) e pontuaram que essas sequências representavam três membros parálogos da família gênica das fosfolipases-D, comprovando existência dessa família de genes através de definição parcial da estrutura gênica referente a esses cDNAs.

Outra evidência de que existe uma família gênica de toxinas do tipo astacinas em todo o gênero *Loxosceles* é a presença de proteínas com massa próxima ao das astacinas em perfis protéicos de diferentes espécies do gênero *Loxosceles* (BARBARO *et al.*, 2005; BINFORD *et al.*, 2009).

A identificação de diferentes isoformas de uma toxina – seja de fosfolipase-D, seja de astacina – em veneno de uma mesma espécie, provavelmente está relacionada com o fato de as diferentes isoformas das toxinas agirem de modo sinérgico e também como mecanismos de defesa biológica às variações do meio (temperatura, alterações de pH, agentes desnaturantes, agentes mutagênicos) que seriam capazes de inibir ou degradar somente algumas isoformas, outras isoformas não seriam alteradas impedindo que uma função importante seja perdida.

As astacinas são ubiquamente distribuídas nos diferentes organismos ao longo da **linha** evolutiva (desde bactérias a mamíferos), indicando que os domínios

das astacinas foram positivamente conservados apesar das forças seletivas, fato que reforça a importância biológica dessas moléculas (BOND; BEYNON, 1995; GOMIS-RÜTH, 2003). Os membros das astacinas podem ter, além dos domínios da família, diferentes módulos na porção C-terminal, o que aumenta ainda mais a diversidade dessas moléculas (GOMIS-RÜTH, 2003), contudo as LALPs identificadas nesse estudo possuem apenas os domínios característicos das astacinas. No presente trabalho, foi realizada a comparação de sequências protéicas de astacinas de diferentes organismos com as cinco astacinas de *Loxosceles*. Os resultados mostraram que, em geral, as LALPs são mais divergentes das astacinas presentes em organismos da ordem Aranea (LALPs comparadas com a astacina do tipo tolóide descrita em aranhas da espécie *Achaearanea tepidariorum*) do que quando comparadas com organismos que são evolutivamente mais distantes, como as astacinas de nematódeos e de *Limulus polyphemus* (artrópode ancestral). Esses achados são similares aos descritos para serinoproteases de nematódeos *Steinernema carpocapsae* que são agrupadas com serinoproteases de insetos das espécies *Anopheles gambiae*, *Agrotis ipsilon* e *Helicoverpa zea* (BALASUBRAMANIA *et al.*, 2009). Divergências desta natureza também são encontradas nos estudos do domínio catalítico de metaloprotease de *Podocoryne cárnea* (hidrozoário) (PMP1) que é mais similar à meprina humana do que à HMP1 de outra espécie de hidrozoários (*Hydra vulgaris*) (PAN *et al.*, 1998). Até o presente momento, pouco se sabe a respeito da evolução das astacinas; MÖHRLEN e colaboradores (2006) estudaram aspectos evolutivos das astacinas presente em todo o sub-reino Eumetazoa, com enfoque maior nas astacinas com função no desenvolvimento embrionário, porém, nesse estudo não foi incluído a astacina de veneno de *L. intermedia* descrita em 2002. Portanto, como a presença de astacinas em venenos animais é um dado bastante recente, estudos filogenéticos com essas sequências podem auxiliar a melhor compreensão da história evolutiva dessas moléculas.

As proteínas da família das astacinas possuem grande diversidade funcional, atuando em diferentes processos biológicos e em diferentes tecidos (BOND; BEYNON, 1995; STÖCKER *et al.*, 1995; GOMIS-RÜTH, 2003). A função das astacinas presentes em venenos animais ainda é desconhecida, já que foram primeiramente descritas em veneno de *Loxosceles* (LALP1) e apesar das toxinas de

veneno de aranhas serem comparáveis com os venenos de serpentes, as metaloproteases de serpentes pertencem à família das adamalisinases o que dificulta tal comparação. A existência de astacina em outra espécie de aranha (*Achaearanea tepidariorum*) também não auxilia na suposição de funções para as astacinas como constituintes de veneno do ponto de vista do envenenamento, pois o veneno da espécie *A. tepidariorum* não é tóxico para humanos e a astacina dessa aranha está envolvida no desenvolvimento embrionário (sequência depositada somente no GenBank).

A primeira hipótese de função biológica das astacinas como constituintes de venenos loxoscélicos é a atuação dessas proteínas como enzimas digestivas, pois as aranhas não são capazes de ingerir suas presas inteiras e desenvolveram digestão externa (RASH; HUDGSON, 2002). Além disso, os dados de homologia indicam semelhanças entre as astacinas de *Loxosceles* com a Astacina de *Astacus astacus* (identidades das LALPs com a astacina de *A. astacus*: LALP2 - 27%; LALP3 26%; LALP4 34% LALP5 31%), que é uma enzima digestiva e também o protótipo da família das astacinas por ter sido o primeiro membro descrito (STÖCKER *et al.*, 1995). A presença de proteases do tipo astacina no fluído digestivo de aranha (*Argiope aurantia*) também reforça a idéia de expressão de astacinas com funções digestivas em aranhas (FORADORI *et al.*, 2006). Porém, é sabido que a função das enzimas do veneno é de parar ou paralisar suas presas, após a atuação do veneno, enzimas produzidas no intestino médio das aranhas são regurgitadas sobre a presa e essas enzimas são descritas como as responsáveis pela digestão (RASH; HUDGSON, 2002). Por outro lado, a habilidade das proteases do tipo astacinas de degradar moléculas constituintes da matriz extracelular indicam outras possíveis funções para essas enzimas nos venenos loxoscélicos. É descrito que metaloproteases de *L. intermedia*, tanto nativas quanto a LALP, são capazes de degradar as cadeias A e B da fibronectina em fragmentos de diferentes tamanhos e metaloproteases de *L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta* degradam parcialmente moléculas de fibrinogênio (cadeias A α e B β) (FEITOSA *et al.*, 1998; VEIGA *et al.*, 1999; VEIGA *et al.*, 2001a; da SILVEIRA *et al.*, 2002; ZANETI *et al.*, 2002; da SILVEIRA *et al.*, 2007c). Tendo em vista que a fibronectina é uma proteína multifuncional envolvida em agregação plaquetária, estabilidade de vasos sanguíneos e que o fibrinogênio é importante nos eventos de coagulação, pode-se

sugerir que a atividade proteolítica das astacinas esteja relacionada com eventos que ocorrem na região da picada, como hemorragia local, alteração da permeabilidade dos vasos e dificuldade de adesão das plaquetas. Essas possíveis funções são também reforçadas por comparações com metaloproteases de venenos de serpentes (FRY *et al.*, 2008; CHEN *et al.*, 2008), por exemplo, a Leucurolisina-B (metaloprotease do veneno de jararaca) é anticoagulante e inibe agregação plaquetária induzida por colágeno (SANCHEZ *et al.*, 2007). As astacinas dos venenos, juntamente com as hialuronidases, podem atuar como fator de espalhamento das demais toxinas por deixarem as estruturas teciduais mais permeáveis ao degradarem diferentes moléculas da matriz extracelular. Outra hipótese possível é que o alvo das astacinas possam ser outras toxinas do próprio veneno que após a ação das proteases se tornam ativas e podem atuar nos efeitos deletérios do loxoscelismo. Ou ainda, as astacinas podem atuar em moléculas do organismo das vítimas, tornando-as ativas e desencadeando diferentes respostas fisiológicas.

O estudo das astacinas extrapola o tópico da toxinologia, tendo grande relevância não somente para o loxoscelismo, mas também para biologia de uma forma geral. Nesse estudo mostramos que metaloproteases do tipo astacinas, as quais foram recentemente descritas como componentes de um veneno animal pela primeira vez na literatura científica, se apresentam como uma família de enzimas, com diferentes isoformas em uma mesma espécie (*L. intermedia*: LALP1, LALP2 e LALP3) e ainda que essa família muito provavelmente é comum a todo gênero *Loxosceles*, uma vez que foram identificadas astacinas nos venenos das 3 espécies estudadas (*L. intermedia*, *L. laeta*: LALP4 e *L. gaucho*: LALP5). Esses resultados além de trazerem novas evidências no estudo das metaloproteases loxoscélicas também apontam para uma gama bastante vasta de possíveis investigações futuras, pois ainda existem muitos pontos a serem estudados e elucidados.

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

Foi possível identificar duas novas isoformas de metaloproteases do tipo astacinas presentes no veneno de *L. intermedia*, mostrando que essas proteases se apresentam como uma família de toxinas no veneno de uma mesma espécie. Além disso, identificamos e caracterizamos metaloproteases presentes nos venenos de *L. laeta* e *L. gauchoi* como também pertencentes à família das astacinas. Por conseguinte, as astacinas são toxinas conservadas nos venenos das três espécies estudadas e, muito provavelmente, serão encontradas em todo o gênero *Loxosceles*. Esses achados reforçam a importância biológica das metaloproteases do tipo astacinas, tanto como toxinas envolvidas nos efeitos nocivos induzidos pelos venenos loxoscélicos em acidentes com humanos (distúrbios hemostáticos, espalhamento da lesão dermonecrotica, processamento de peptídeos), quanto nos diferentes eventos do desenvolvimento das aranhas marrons (paralisação de presas, desenvolvimento embrionário e pós-embrionário – ecdises).

Tendo em vista as inúmeras funções biológicas em que proteases do tipo astacinas podem estar envolvidas, nossos resultados nos instigam a continuar os estudos com essas moléculas, com intuito de compreender não somente a participação destas moléculas no quadro clínico do loxocelismo, mas também a origem e as funções de astacinas como componentes de veneno animal.

Na continuidade desse projeto serão realizados os estudos referentes ao projeto de doutorado, que inclui inicialmente a obtenção de astacinas recombinantes na forma solúvel e ativa que permitam um estudo detalhado da atividade biológica dessas toxinas. A caracterização das astacinas trará novos dados que poderão indicar o papel dessas enzimas não só nos eventos biológicos relacionados aos quadros clínicos do loxoscelismo, mas também no que se refere à função das astacinas na biologia das aranhas como em processos de defesa, de captação e digestão da presa, de desenvolvimento embrionário e ecdises. A elucidação da atividade específica das astacinas e da participação dessas enzimas nos efeitos deletérios do veneno poderá também fornecer dados para o desenvolvimento de tratamentos efetivos para os casos de envenenamento. Do ponto de vista biotecnológico, as astacinas recombinantes também são produtos que apresentam possibilidades bastante interessantes de aplicabilidade médica, farmacêutica e

industrial e o pedido de patente de invenção dos possíveis e variados usos dessas toxinas recombinantes já foi solicitado via o Núcleo de Propriedade Intelectual (NPI) da UFPR. Ainda fazem parte do nosso planejamento para o doutorado estudos filogenéticos das astacinas loxoscélicas e outros membros da família das astacinas buscando compreender a origem evolutiva dessas enzimas em venenos animais e comparar as relações filogenéticas moleculares das astacinas com as relações filogenéticas propostas atualmente para os metazoários.

REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS

- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **Journal of molecular biology**, England, v.215, p.403-410, 1990.
- ANDRADE, R.M.G.; OLIVEIRA, K.C.; GIUSTI, A.L.; SILVA, W.D.; TAMBOURGI, D.V. Ontogenetic development of *Loxosceles intermedia* spider venom. **Toxicon**, England, v.37, p.627-632, 1999.
- APPEL, M.H.; DA SILVEIRA, R.B.; GREMSKI, G.; VEIGA, S.S. Insights into brown spider and loxoscelism. **Invertebrate survival journal**, Italy, v. 2, p. 52-158, 2005.
- APPEL, M.H.; da SILVEIRA R.B.; CHAIM, O.M.; PALUDO, K.S.; SILVA, D.T.; CHAVES, D.M.; da SILVA, P.H.; MANGILI, O.C.; SENFF-RIBEIRO, A.; GREMSKI, W.; NADER, H.B.; VEIGA, S.S. Identification, cloning and functional characterization of a novel dermonecrotic toxin (phospholipase-D) from brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. **Biochimica et biophysica acta**, Netherlands, v.1780, p.167-178, 2008.
- BALASUBRAMANIAN, N.; HAO, Y.J.; TOUBARRO, D.; NASCIMENTO, G.; SIMOES, N. Purification, biochemical and molecular analysis of a chymotrypsin protease with prophenoloxidase suppression activity from the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae*, **International journal for parasitology**, England, v.39, p.975-984, 2009.
- BARBARO, K.C.; EICKSTEDT, V.R.D.; MOTA, I. Adjuvant effect of *Loxosceles gaucho* (South American brown spider) venom. **Toxicon**, England, v.32, p.687-693, 1994.
- BARBARO, K.C.; JARED, C.; MOTA, I. Aranhas venenosas no Brasil. **Ciência Hoje**, Brazil, v.19, p.48-52, 1995.
- BARBARO, K.C.; KNYSACK, I.; MARTINS, R.; HOGAN, C.; WINKEL, K. Enzymatic characterization, antigenic cross-reactivity and neutralization of dermonecrotic activity of five *Loxosceles* spider venoms of medical importance in the Americas. **Toxicon**, England, v.45, p.489-499, 2005.

BECKER-PAULY, C.; BRUNS, B. C.; DAMM, O.; SCHÜTTE, A.; HAMMOUTI, K.; BURMESTER, T.; STÖCKER, W. News from an Ancient World: Two Novel Astacin Metalloproteases from the Horseshoe Crab. **Journal of molecular biology**, England, v.385, p.236-248, 2009.

BINFORD, G.J.; CORDES M.H.J.; WELLS, M.A. Sphingomyelinase D from venom of *Loxosceles* spiders: evolutionary insights from cDNA sequences and gene structure. **Toxicon**, England, v.45, p.547-560, 2005.

BINFORD, G.J.; BODNER, M.R.; CORDES, M.H.; BALDWIN, K.L.; RYNERSON, M.R.; BURNS, S.N.; ZOBEL-THROPP, P.A. Molecular evolution, functional variation, and proposed nomenclature of the gene family that includes sphingomyelinase D in sicariid spider venoms. **Molecular biology and evolution**, United States, v.26, p.547-566, 2009.

BOND, J.S.; BEYNON, R.J. The astacin family of metalloendopeptidases. **Protein Science**, United States, v.4, p.823-840, 1995.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, United States, v.72, p.248-254, 1976.

BÜCHERL, W.; ROSENFELD, G. Aranhas do genero *Loxosceles* e loxoscelismo na América do Sul. **Memórias do Instituto Butantan**, Brasil, v.30, p.167-186, 1954.

CABRERIZO, S.; DOCAMPO, P.C.; CARI, C.; ROZAS, M.O.; DÍAZ, M.; de ROODT A.; CURCI, O. Loxoscelismo: epidemiología y clínica de uma patologia endêmica en el país. **Archivos argentinos de pediatría**, Argentina, v.107, p.152-159, 2009.

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

CHEN, H.S.; TSAI, H.Y.; WANG, Y.M.; TSAI, I.H. P-III hemorrhagic metalloproteinases from Russell's viper venom: cloning, characterization, phylogenetic and functional site analyses, **Biochimie**, France, v.90, p.1486-1498, 2008.

CHOMEZYNSKI, P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. **BioTechniques**, England, v.15, p.532-534, 1993.

da SILVA, P.H.; HASHIMOTO, Y.; DOS SANTOS, F.A.; MANGILI, O.C.; GREMSKI, W.; VEIGA, S.S. Hematological cell findings in bone marrow and peripheral blood of rabbits after experimental acute exposure to *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. **Toxicon**, England, v.42, p.155-161, 2003.

da SILVA, P.H.; SILVEIRA, R.B.; APPEL, M.H.; MANGILI, O.C.; GREMSKI, W.; VEIGA, S.S. Brown spiders and loxoscelism. **Toxicon**, England, v. 44, p. 693-709, 2004.

da SILVEIRA, R.B.; FILHO J.F.S.; MANGILI, O.C.; VEIGA, S.S.; GREMSKI, W.; NADER, H.B.; DIETRICH, C.P. Identification of proteases in the extract of venom glands from brown spiders. **Toxicon**, England, v.40, p.815-822, 2002.

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

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

da SILVEIRA, R.B.; ROMINE, B.P.; CHAIM, O.M.; APPEL, M.H.; SILVA, D.T.; DREYFUSS, J.L.; TOMA, L.; DIETRICH, C.P.; NADER, H.B.; VEIGA, S.S.; GREMSKI, W. Two novel dermonecrotic toxins LiRecDT4 and LiRecDT5 from Brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom: From cloning to functional characterization. **Biochimie**, France, v.59, p.289-300, 2007b.

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

DAVIS, M. W.; BIRNIE, A.J.; CHAN, A.C.; PAGE, A.P.; JORGENSEN, E.M. A conserved metalloprotease mediates ecdysis in *Caenorhabditis elegans*. **Development**, England, v.131, p.6001-6008, 2004.

de ANDRADE, S.A.; MURAKAMI, M.T.; CAVALCANTE, D.P.; ARNI, R.K.; TAMBOURGI, D.V. Kinetic and mechanistic characterization of the Sphingomyelinases D from *Loxosceles intermedia* spider venom. **Toxicon**, v.47, p.380-386, 2006.

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

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

DRAGULEV, B.; BAO, Y.; RAMOS-CERRILLO, B.; VAZQUEZ, H.; OLVERA, A.; STOCK, R.; ALGARON, A.; FOX, J.W. Upregulation of IL-6, IL-8, CXCL1, and CXCL2 dominates gene expression in human fibroblast cells exposed to *Loxosceles reclusa* sphingomyelinase D: insights into spider venom dermonecrosis. **The Journal of investigative dermatology**, United States, v.127, p.1264-1266, 2007.

DUMERMUTH, E.; STERCHI, E.E.; JIANG, W.; WOLZ, R.; BOND, J.S.; FLANNERY, A.V.; BEYNON, R.J. The astacin family of metalloendopeptidases. **Journal of biological chemistry**, v.266, p.21381-21385, 1991.

ELGERT, K.D.; ROSS, M.A.; CAMPBELL, B.J.; BARRETT, J.T. Immunological Studies of Brown Recluse Spider Venom. **Infection and immunity**, United States, v. 10, p.1412-1419, 1974.

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

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

FERNANDES-PEDROSA, M.F.; JUNQUEIRA DE AZEVEDO, I.L.; GONCALVES-DE-ANDRADE, R.M.; VAN DEN BERG, C.W.; RAMOS, C.R.; HO, P.L.; TAMBOURGI, D.V. Molecular cloning and expression of a functional dermonecrotic and haemolytic

factor from *Loxosceles laeta* venom. **Biochemical and biophysical research communications**, United States, v.298, p.638–645, 2002.

FERNANDES-PEDROSA, M.F.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I.L.; GONÇALVES-DE-ANDRADE, R.M.; KOBASHI, L.S.; ALMEIDA, D.D.; HO, P.L.; TAMBOURGI, D.V. Transcriptome analysis of *Loxosceles laeta* (Araneae, Sicariidae) spider venomous gland using expressed sequence tags. **BMC Genomics**, England, v.9, p.279, 2008.

FINN, R.D.; TATE, J.; MISTRY, J.; COGGILL, P.C.; SAMMUT, J.S.; HOTZ, H.R.; CERIC, G.; FORSLUND, K.; EDDY, S.R.; SONNHAMMER, E.L.; BATEMAN, A. The Pfam protein families database. **Nucleic Acids Research**, England, v.36, p.D281-D288, 2008.

FORADORI, M.J.; TILLINGHAST, E.K.; SMITH, J.S.; TOWNLEY, M.A.; MOONEY, R.E. Astacin family metallopeptidases and serine peptidase inhibitors in spider digestive fluid. **Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry and molecular biology**, England, v.143, p.257-68, 2006.

FRY, B.G.; SCHEIB, H.; VAN DER WEERD, L.; YOUNG, B.; MCNAUGHTAN, J.; RAMJAN, S.F.; VIDAL, N.; POELMANN, R.E.; NORMAN, J.A. Evolution of an arsenal: structural and functional diversification of the venom system in the advanced snakes (Caenophidia), **Molecular and cellular proteomics: MCP**, United States v.7, p.215-246, 2008.

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

GAJARDO-TOBAR, R. R. Minha experiência sobre loxoscelismo. **Memórias do Instituto Butantan**, Brasil, v.33, p.689-698, 1966.

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

GOMEZ, H.F.; MILLER, M.J.; TRACHY, J.W.; MARKS, R.M.; WARREN, J.S. Intradermal anti-loxosceles Fab fragments attenuate dermonecrotic arachnidism. **Academic emergency medicine**, United States, v.6, p.1195-1202, 1999.

GOMIS-RÜTH, F.X. Structural aspects of the metzincin clan of metalloendopeptidases. **Molecular Biotechnology**, United States, v.24, p.157-202, 2002.

HARLOW, E.; LANE, D. (1988). **Antibodies: a laboratory manual**. 1 ed. New York: Cold Spring Harbor.

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

ISBISTER, G.K.; GRAUDINS, A.; WHITE, J.; WARRELL, D. Antivenom treatment in arachnidism. **Clinical toxicology**, United States, v.41, p.291-300, 2003.

ISBISTER, G.K.; WHITE, J. Clinical consequences of spider bites: recent advances in our understanding. **Toxicon**, England, v.43, p.477-492, 2004.

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

KALAPOTHAKIS, E.; CHATZAK, M. GONÇALVES-DORNEL, H. de CASTRO, C.S.; SILVESTRE, F.G.; LABORNE, F.V.; de MOURA, J.F.; VEIGA, S.S. CHÁVES-OLO, C.; GRANIER, C.; BARBARO, K.C. The Loxtox protein family in *Loxosceles intermedia* (Mello-Leitão) venom. **Toxicon**, England, v.50, p.938-946, 2007.

LUCAS, S. Spiders in Brazil. **Toxicon**, England, v.26, p.759-772, 1988.

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

LUNG, J.M.; MALLORY, S.B. A child with spider bite and glomerulonephritis: a diagnostic challenge. **International journal of dermatology**, United States, v.39, p.287-289, 2000.

MACHADO, L.F.; LAUGESSEN, S.; BOTELHO, E.D.; RICART, C.A.; FONTES, W.; BARBARO, K.C.; ROEPSTORFF, P.; SOUSA, M.V. Proteome analysis of Brown

spider venom: identification of loxnecrogin isoforms in *Loxosceles gaucho* venom. **Proteomics**, Germany, v.5., p.2167-2176, 2005.

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

MARQUES-DA-SILVA, **Loxoscelismo no Estado do Paraná: análise epidemiológica dos acidentes causados por *Loxosceles Heineken & Lowe*, 1832, no período de 1993 a 2000**. Rio de Janeiro. 2002. Dissertação (Mestrado em Ciências na área de Saúde Pública) – Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Osvaldo Cruz.

MARQUES-DA-SILVA, E.; FISCHER, M.L. Distribuição das espécies do gênero *Loxosceles* Heineken & Lowe, 1835 (Araneae; Sicariidae) no Estado do Paraná. **Revista da sociedade brasileira de medicina tropical**, Brazil; v.38, p.331-335, 2005.

MARTINEZ-VARGAS, A.Z. Loxoscelismo, um problema de salud en el Perú. **Boletín de la oficina sanitaria panamericana**, United States v.103, p.378-386, 1987.

MÖHRLÉN, F.; HUTTER, H.; ZWILLING, R. The astacin protein family in *Caenorhabditis elegans*. **European Journal of Biochemistry**, England, v.270, p.4909-4920, 2003.

MÖHRLÉN, F., BOND, J.S., STÖCKER, W. **Other astacin homologues**. In: **Handbook of proteolytic enzymes**. Editora Elsevier. 2 ed. London, 2004.

MÖHRLÉN, F.; MANIURA, M.; PLICKERT, G.; FROHME, M.; FRANK, U. Evolution of astacin-like metalloproteases in animals and their function in development. **Evolution and development**, United States, v.8, p.223-231, 2006.

MONTEIRO, C.L.B.; RUBEL, R.; COGO, L.L.; MANGILI, O.C.; GREMSKI, W.; VEIGA, S.S. Isolation and identification of *Clostridium perfringens* in the venom and fangs of *Loxosceles intermedia* (brown spider): enhancement of the dermonecrotic lesion in loxoscelism. **Toxicon**, England, v.40, p.409-418, 2002.

MOTA, I.; BARBARO, K.C. Biological and biochemical-properties of venoms from medically important *Loxosceles* (Araneae) species in Brazil. **Journal of toxicology. Toxin reviews**, United States, v.14, p.401-421, 1995.

- NILSEN, H.; ENGELBRECHT, J.; BRUNAK, S.; VON HEIJNE, G. A neural network method for identification of procaryotic and eucaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. **International journal of neural systems**, Singapore, v.8, p.581-599, 1997.
- OLIVEIRA, K.C.; ANDRADE, R.M.G.; GIUSTI, A.L.; SILVA, W.D; TAMBOURGI, D.V. Sexlinked variation of *Loxosceles intermedia* spider venoms. **Toxicon**. England, v.37, p.217-221,1999.
- OLVERA, A.; RAMOS-CERRILLO, B.; ESTÉVEZ, J.; CLEMENT, H.; DE ROODT, A.; PANIAGUA-SOLÍS, J.; VÁZQUEZ, H.; ZAVALITA, A.; ARRUZ, M.S.; STOCK, R.P.; ALAGÓN, A. North and South American *Loxosceles* spiders: development of a polyvalent antivenom with recombinant sphingomyelinases D as antigens. **Toxicon**, England, v.48, p.64-74, 2006
- OSPEDAL, K.Z.; APPEL. M.H.; NETO, J.F.; MANGILI, O.C.; VEIGA, S.S.; GREMSKI, W. Histopathological findings in rabbits after experimental acute exposure to the *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. **International journal of experimental pathology**, England, v.84, p.287-294, 2002.
- PAIXÃO-CAVALCANTE, D.; van der BERG, C.W.; GONÇALVES-de-ANDRADE, R.M.; FERNANDES-PEDROSA, M.F.; OKAMOTO, C.K. TAMBOURGI, D.V. Tetracycline Protects against dermonecrosis induced by *Loxosceles* spider venom. **Journal of investigative dermatology**, United States, v.127, p.1410-1418, 2007.
- PAN, T.; GROGER, H.; SCHMID, V.; SPRING, J. A toxin homology domain in an astacin-like metalloproteinase of the jellyfish *Podocoryne carnea* with a dual role in digestion and development, **Development genes and evolution**, Germany, v.208, p.259-266, 1998.
- PATEL, K.D.; MODUR, V.; ZIMMERMANN, G.A.; PRESCOTT, S.M.; MCINTRY, T.M. The necrotic venom of the brown recluse spider induces dysregulated endothelial cell-dependent neutrophil activation. Differential induction of GM-CSF, IL-8 and Eselectin expression. **Journal of clinical investigation**, United States, v.94, p.631-642, 1994.
- PAULI, I.; PUKA, J.; GUBERT, I.C.; MINOZZO, J.C. The efficacy of antivenom in loxoscelism treatment. **Toxicon**, England, v.48, p.123-137, 2006.

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

PIZZI, T.; ZACARIAS, J.; SCHENONE, E. H. Estudio histopatológico experimental en el envenenamiento por *Loxosceles laeta*. **Biológica**, Chile, v.23, p.33-51, 1957.

PLATNICK, N.I. The world spider catalog, version 6.0. American Museum of Natural History, 2007. Disponível em: <<http://research.amnh.org/entomology/spiders/catalog/index.html>> acesso em: 10/09/2009.

PLATNICK, N.I. The world spider catalog, version 8.5. American Museum of Natural History, 2008. Disponível em: <<http://research.amnh.org/entomology/spiders/catalog/index.html>> acesso em: 10/09/2009.

RAMOS-CERRILLO, B.; OLVERA, A.; ODELL, G.V.; ZAMUDIO, F.; PANIAGUA-SOLÍS, J.; ALAGÓN, A.; STOCK, R.P. Isoforms from the North American fiddleback spiders *Loxosceles boneti* and *Loxosceles reclusa*. **Toxicon**, England, v.44, p.507-514, 2004.

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

RIBEIRO, L.A.; EICKSTEDT, V.R.D.; RÚBIO, G.B.G.; KONALSAISEN, J.F.; HANDAR, Z.; ENTRES, M.; CAMPOS, V.A.F.P.; JORGE, M.T. Epidemiologia do acidente por aranhas do gênero *Loxosceles* no Estado do Paraná (Brasil). **Memórias do Instituto Butantan**, Brazil, v.55, p.19-26, 1993.

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

RUPPERT, E.E.; FOX, R.S.; BARNES, R.D. **Zoologia dos invertebrados**, Editora. Roca. 7 ed. São Paulo, 2005.

SAMS, H.H.; HEARTH, S.B.; LONG, L.L.; WILSON, D.C.; SANDERS, D.H.; KING, L.E. Nineteen documented cases of *Loxosceles reclusa* envenomation. **Journal of the american academy of dermatology**, United States, v.44, p.603-608, 2001.

SANCHEZ, E.F.; GABRIEL, L.M.; GONTIJO, S.; GREMSKI, L.H.; VEIGA, S.S.; EVANGELISTA, K.S.; EBLE, J.A.; RICHARDSON, M. Structural and functional characterization of a P-III metalloproteinase, leucurolysin-B, from *Bothrops leucurus* venom, **Archives of biochemistry and biophysics**, United States, v.468, p.193-204, 2007.

SCHENONE, H.; SAAVEDRA, T.; ROJAS, A.; VILLARROEL, F. Loxoscelismo en Chile. Estudios epidemiológicos, clínicos y experimentales. **Revista do instituto de medicina tropical de São Paulo**, Brasil, v.31, p.403-415, 1989.

SCHENONE, H.; LETONJA, T. Notas sobre la biología y distribución geográfica de las arañas del género *Loxosceles*. **Boletín chileno de parasitología**, Chile, v.30, p.27-29, 1975.

SEZERINO, U.M.; ZANNIN, M.; COELHO, L.K.; GONÇALVES, J.; GRANDO, M.; MATTOSINHO, S.G.; BARBARO, K.C. A clinical and epidemiological study of *Loxosceles* spider envenoming in Santa Catarina, Brazil. **Transactions of the Royal Society of tropical medicine and hygiene**, England, v.92, p.546–548, 1998.

SISTEMA NACIONAL DE NOTIFICAÇÕES DE AGRAVOS – SINAN, **Ministério da Saúde**, BRASIL, 2009.

SMS/CE/CVE – SINAM. Secretaria Municipal de Saúde. Centro de Vigilância Epidemiológica, 2009.

STÖCKER, W.; GRAMS, F.; BAUMANN, U.; REINEMER, P.; GOMIS-RÜTH, F.X.; MCKAY, D.B.; BODE, W. The metzincins--topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralysins, and matrixins (collagenases) define a superfamily of zinc-peptidases. **Protein science**, v.4, p.823-840, 1995.

SUAREZ, G.; BIGGERMANN, U.; SCHENONE, H. Estudios bioquímicos Del veneno de *L. laeta* y sus mecanismos de acción. **Boletín chileno de parasitología**, Chile, v.26, p.60-62, 1971.

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

TAMBOURGI, D.V.; FERNANDES-PEDROSA, M.F.; VAN DEN BERG, C.W.; GONÇALVES-DE ANDRADE, R.M.; FERRACINI, M.; PAIXÃO-CAVALCANTE, D.; MORGAN, B.P.; RUSHMERE, N.K. Molecular cloning, expression, function and immunoreactivities of members of a gene family of sphingomyelinases from *Loxosceles* venom glands. **Molecular immunology**, England, v.41, p.831-840, 2004.

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

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

VEIGA, S.S.; FEITOSA, L.; SANTOS, V.L.P.; SOUZA, G.A.; RIBEIRO, A.S.; PORCIONATTO, M.A.; NADER, H.B.; DIETRICH, C.P.; BRENTANI, R.R.; GREMSKI, W. Effect of brown spider venom on basement membrane structures. **The Histochemical journal**, Netherlands, v.32, p.397-408, 2000b.

VEIGA, S.S.; ZANETTI, V.C.; BRAZ, A.; MANGILI, O.C.; GREMSKI, W. Extracellular matrix molecules as targets for brown spider venom toxins. **Brasilian Journal of medical and biological research**, Brazil, v.34, p.843-850, 2001a.

VEIGA, S.S.; ZANETTI, V.C.; FRANCO, C.R.C.; TRINDADE, E.S.; PORCIONATTO, M. A.; MANGILI, O.C.; GREMSKI, W.; NADER, H.B.; DIETRICH, C.P. *In vivo* and *in vitro* cytotoxicity of brown spider venom for blood vessel endothelial cells. **Thrombosis research**, United States, v.102, p.229-237, 2001b.

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

VETTER, R. S. ISBISTER, K.G. Medical aspects of spiders bits. **Annual review of entomology**, United States, v.53, p.409-429, 2008.

WASSERMAN, G.S.; ANDERSON, P.C. Loxoscelism and arachnidism. **Journal of toxicology. Clinical toxicology**, United States, v.21, p.451-472, 1984.

WRIGHT, R.P.; ELGERT, K.; CAMPBELL, B.J.; BARRET, J.T. Hyaluronidase and esterase activities of the venom of the poisonous brown recluse spider. **Archives of biochemistry and biophysics**, United States, v.159, p.415-426, 1973.

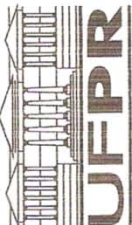
YOUNG, A.R.; PINCUS, S.J. Comparison of enzymatic activity from three species of necrotising arachnids in Australia: *Loxosceles rufescens*, *Badumna insignis* and *Lampona cylindrata*. **Toxicon**, England, v.39, p.391-400, 2001.

ZANETTI, V.C.; da SILVEIRA, R.B.; DREYFUSS, J.L.; HAOACH, J.; MANGILI, O.C.; VEIGA, S.S.; GREMSKI, W. Morphological and biochemical evidence of blood vessel damage and fibrinogenolysis triggered by brown spider venom. **Blood coagulation and fibrinolysis**, England, v.13, p.135-148, 2002.

ANEXOS

8. ANEXOS

8.1 Certificado comitê de ética em experimentação animal

 Ministério da Educação UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ Setor de Ciências Biológicas Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEAA)	
CERTIFICADO N.º 246	
O Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEAA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituído pela PORTARIA N.º 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento do CEEAA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO N.º 01/03-BL, de 09 de maio de 2003, e considerando o contido no Regimento Interno do CEEAA, CERTIFICA que os procedimentos que utilizam animais no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".	
PROCESSO:	APROVADO. RO 06/2007 - 31/07/2007
TÍTULO:	Relação mecanística entre a atividade fosfolipásica e os efeitos tóxicos induzidos pela toxina dermonecrótica do veneno de aranha marrom (<i>Loxosceles intermedia</i>)
AUTORES:	Silvio Sanches Veiga, Rafael Bertoni da Silveira, Helena Bonciani Nader, Silvio Marques Zanata, Dilza Trevisan Silva, Valéria Pereira Ferrer, Anabel de Oliveira, Olga Meiri Chaim
DEPARTAMENTO:	Biologia Celular
	Curitiba, 09 de agosto de 2007.
	 Prof ^{ra} . Ana Maria Caliman Filadelfi Coordenadora do CEEAA

8.2 Parecer técnico CTNBio



Ministério da Ciência e Tecnologia - MCT
Comissão Técnica Nacional de Biossegurança - CTNBio



PARECER TÉCNICO Nº 542/2006

Processo nº: 01200.000022/1997-37

Requerente: Setor de Ciências Biológicas – UFPR.

CNPJ: 000.348.003/0055-03

Endereço: Centro Politécnico da UFPR- Setor de Ciências Biológicas - 2º Piso, Sala 295 - Caixa Postal 19031 Paraná/PR.

Assunto: Solicitação de Extensão do CQB 009/97

Extrato Prévio: 350/2006 Publicado no D.O.U. de 21 de fevereiro de 2006

Reunião: 90ª Reunião Ordinária da CTNBio, ocorrida em 19 de abril de 2006

Decisão: DEFERIDO

A CTNBio, após apreciação do processo de pedido de Parecer Técnico referente à Solicitação de Extensão do CQB (Certificado de Qualidade em Biossegurança) 009/97, conclui pelo DEFERIMENTO, nos termos deste Parecer Técnico. No âmbito das competências dispostas na Lei 11.105/05 e seu decreto 5.591/05, a Comissão concluiu que o presente pedido atende às normas da CTNBio e à legislação pertinente que visam garantir a biossegurança do meio ambiente, agricultura, saúde humana e animal.

PARECER TÉCNICO

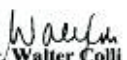
1) Fundamentação técnica

Solicita à CTNBio Parecer Técnico para a extensão de seu CQB do Setor de Ciências Biológicas (UFPR) para a sala de número 198B e sala Preparativa, ambas do departamento de Biologia Celular do mesmo setor. Foram apresentados no processo os currículos dos pesquisadores, a planta baixa do laboratório, o projeto a ser desenvolvido nele assim como as medidas de biossegurança.

2) Medidas de biossegurança descritas no processo.

Os microrganismos a serem manipulados no projeto (bactérias e leveduras) são da classe de segurança I mas, como os genes a serem expressos (toxinas de animais peçonhentos), apresentam riscos à saúde humana o laboratório que solicita a extensão de CQB tem que ser do tipo NB-2. Embora no processo não haja menção específica sobre a classe laboratorial na qual se encaixa este laboratório, todos os equipamentos apresentados são perfeitamente compatíveis com a classe NB-2, portanto, adequados para as manipulações propostas no projeto. Também foram apresentados as medidas adequadas para o transporte dos microrganismos da sala de manipulação (198B) para a sala de esterilização (sala Preparativa). Além disso, foi informado que as instalações acima mencionadas têm acesso a serviço médico emergencial no próprio setor de Ciências Biológicas da UFPR que contém um centro de atendimento médico para alunos, funcionários e professores além do Hospital Universitário.

Atendidas as recomendações e as medidas de biossegurança, recomenda-se, contudo, que sejam devidamente observadas as práticas laboratoriais compatíveis com a classe laboratorial NB-2.


Dr. Walter Colli
Presidente da CTNBio

Secretaria Executiva da CTNBio

SPO – Área 05 – Quadra 03 Bloco B – Térreo – Salas 08 a 10
Brasília, DF – CEP: 70610-200
Fones: (55)(61) 3411.5516 – FAX: (55)(61) 3317-7475

8.3 Artigo científico publicado

Astacin-like metalloproteases are a gene family of toxins present in venom of different species of the brown spider (genus *Loxosceles*)

AUTORES: Dilza Trevisan-Silva, Luiza H. Gremski, Olga M. Chaim; Rafael B. da Silveira; Gabriel O. Meissner; Oldemir C. Mangili; Katia C. Barbaro; Waldemiro Gremski; Silvio S. Veiga; Andrea Senff-Ribeiro.

REVISTA: Biochimie, *in press*, doi: 10.1016/j.biochi.2009.10.003



Contents lists available at ScienceDirect

Biochimie

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biochi

Research paper

Astacin-like metalloproteases are a gene family of toxins present in the venom of different species of the brown spider (genus *Loxosceles*)[☆]

Dilza Trevisan-Silva^a, Luiza H. Gremiski^b, Olga M. Chaim^a, Rafael B. da Silveira^c, Gabriel O. Meissner^a, Oldemir C. Mangili^d, Katia C. Barbaro^e, Waldemiro Gremiski^{a,f}, Silvio S. Veiga^a, Andrea Senff-Ribeiro^{a,*}

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

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 June 2009

Accepted 6 October 2009

Available online xxx

Keywords:

Astacin family

Venom

Loxosceles

Metalloproteases

ABSTRACT

Brown spiders have a worldwide distribution, and their venom has a complex composition containing many different molecules. Herein, we report the existence of a family of astacin-like metalloprotease toxins in *Loxosceles intermedia* venom, as well as in the venom of different species of *Loxosceles*. Using a cDNA library from the *L. intermedia* venom gland, we cloned two novel cDNAs encoding astacin-like metalloprotease toxins, LALP2 and LALP3. Using an anti-serum against the previously described astacin-like toxin in *L. intermedia* venom (LALP1), we detected the presence of immunologically-related toxins in the venoms of *L. intermedia*, *Loxosceles laeta*, and *Loxosceles gaucho*. Zymographic experiments showed gelatinolytic activity of crude venoms of *L. intermedia*, *L. laeta*, and *L. gaucho* (which could be inhibited by the divalent metal chelator 1,10-phenanthroline) at electrophoretic mobilities identical to those reported for immunological cross-reactivity. Moreover, mRNAs extracted from *L. laeta* and *L. gaucho* venom glands were screened for astacin-like metalloproteases, and cDNAs obtained using LALP1-specific primers were sequenced, and their deduced amino acid sequences confirmed they were members of the astacin family with the family signatures (HEXXHXXGXXHE and MXY), LALP4 and LALP5, respectively. Sequence comparison of deduced amino acid sequences revealed that LALP2, LALP3, LALP4, and LALP5 are related to the astacin family. This study identified the existence of gene family of astacin-like toxins in the venoms of brown spiders and raises the possibility that these molecules are involved in the deleterious effects triggered by the venom.

© 2009 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

The astacin family of metalloproteases is formed by zinc endopeptidases. The family was named following the description of the prototypical digestive enzyme astacin from crayfish, *Astacus astacus* [1,2]. The astacin family comprises structurally-related digestive, extracellular, or cell surface-bound proteases that are involved either in digestive functions or peptide processing and play a role in

the activation of growth factors, degradation of polypeptides, and processing of extracellular molecules [1,3,4]. Astacin family members are multifunctional proteases characterized by the consensus sequence HEXXHXXGXXHE, which is the zinc-binding domain, and the Met-turn MXY, both of which are key elements for this family [3]. To date more than 200 astacin-like enzymes have been identified in different organisms, such as humans, mice, rats, amphibians, fishes, sea urchins, insects, mollusks, and even bacteria [4,5], providing support for their biological importance. In the human and mouse genomes, there are six astacin family genes (two meprins, three BMP1/tolloid-like, one ovastacin), but in *Caenorhabditis elegans* there are 40 [6]. Recently, the identification of an astacin-like protease in the venom of the brown spider *Loxosceles intermedia* was described [7]. This molecule, named LALP (*Loxosceles* *A*stacin-*L*ike *P*rotease), was cloned and expressed as a recombinant protein. This is the first

[☆] The nucleotide sequence data reported for *Loxosceles* astacin-like metalloprotease toxins will appear in the GenBank®, EMBL, DDBJ and GSDB Nucleotide Sequence Databases under the accession numbers: Full length - LALP2-GQ227490; LALP3-GQ227491. ESTs - LALP4-GR277667; LALP5-GR277668.

* Corresponding author. Tel.: +55 41 33611750; fax: +55 41 3266 2042.

E-mail address: senffribeiro@ufpr.br (A. Senff-Ribeiro).

astacin family member described in venom and it may exhibit deleterious activity following brown spider envenomation.

Loxoscelism, gangrenous arachnidism, or necrotic arachnidism are terms used to describe lesions and signals induced by bites from *Loxosceles* genus spiders. Loxoscelism is characterized by a dermo-necrotic lesion with gravitational spreading and some involvement at the systemic level, including intravascular hemolysis, acute renal failure, and disseminated intravascular coagulation [8,9].

The genus *Loxosceles*, Sicariidae family, comprises 100 described species, the majority of which can be found in the Americas, West Indies, and Africa [10,11]. In Brazil, there are three species with medical importance, which are *L. intermedia*, *Loxosceles laeta* and *Loxosceles gaucho* [12].

Loxosceles venom contains several protein toxins and is enriched with molecules of low molecular mass (5–40 kDa) [8,9]. Toxins including alkaline phosphatase, hyaluronidase, metalloproteases, phospholipases-D, and low molecular mass (5.6–7.9 kDa) insecticidal peptides have been identified [7,8,13–18]. Among these venom toxins, phospholipase-D family members (30–35 kDa; also called dermonecrotic toxins) play an essential role on the pathogenesis of loxoscelism [19–22].

The identification of proteases in the brown spider venom comes from previous descriptions by Eskafi and Norment [23], who reported protease activity against *Heliothis virescens* and *Musca domestica* larvae in *Loxosceles reclusa* venom. Using the same model, Jong et al. [24] determined that the venom hydrolyzes L-aminoacyl-β-naphthylamide derivatives. Additionally, it was reported that metalloproteases in the venom of *L. intermedia* degrade gelatin, fibronectin, and fibrinogen [13]. Veiga et al. [25] described the hydrolytic activity of the venom on Engelbreth-Holm-Swarm tumor (EHS)-basement membrane structure, purified entactin, and the protein core of heparan sulfate. Also, *L. intermedia* venom triggers proteolytic activity on the sub-endothelial blood vessel basement membrane and extracellular matrix of endothelial cells in culture [26]. By studying *L. rufescens* venom, Young and Pincus [27] described metalloproteases with caseinolytic, gelatinolytic, and fibrinogenolytic activities. Zanetti et al. [28] described a fibrinogenolytic and metalloprotease-dependent activity in the venom from *L. gaucho* and *L. laeta* and purified a 30-kDa molecule with fibrinogenolytic activity from *L. intermedia* venom. Using venom gland extract from *L. intermedia*, da Silveira et al. [29] reported the presence of metalloproteases and proved those molecules were components of brown spider venoms. The presence of metalloproteases in the venom of different *Loxosceles* species, including *L. intermedia*, *L. gaucho*, *Loxosceles deserta*, *L. laeta*, and *L. reclusa*, provides evidence for a conserved feature and biological significance of these molecules [15]. Finally, the identification, cloning, expression, purification, and functional characterization of a metalloprotease characterized as an astacin-like toxin in the *L. intermedia* venom gland corroborated the previous data describing metalloproteases in *Loxosceles* venoms and was the first report of the presence of an astacin-like enzyme as a constituent toxin in animal venoms [7]. Studies on astacin-like proteases from *Loxosceles* venoms generate additional knowledge not only restricted to loxoscelism but also for astacin family, moreover these molecules show putative biotechnological applications as biotools for research and laboratory protocols and as novel pharmaceuticals (thrombolytic agents for example) [30].

Herein, we report the identification and cloning of two novel metalloproteases (LALP2 and LALP3), which we characterized as astacin-like toxins in the *L. intermedia* venom gland, thereby identifying a gene family of toxins. We also characterized this gene family of astacin-like toxins in the *Loxosceles* genus by immunological cross-reactivity of antibodies against LALP1 with different *Loxosceles* spider venoms. Supporting these findings, LALP1-related

molecules (named LALP4 and LALP5) from other *Loxosceles* species were identified by cDNA cloning and sequencing. The results corroborate previous data that described metalloproteases in *Loxosceles* venoms and demonstrate for the first time that astacins are a gene family present in the venoms of the three analyzed *Loxosceles* species (*L. intermedia*, *L. laeta* and *L. gaucho*) and probably will be found widespread in the genus.

2. Materials and methods

2.1. Reagents

Polyclonal antibodies against *L. intermedia* crude venom toxins and recombinant toxin (LALP1) were produced in rabbits as previously described [31,32]. Crude venom from *L. intermedia* was extracted from wild-caught spiders according to Feitosa et al. [13]. Polyclonal antibodies against *L. laeta* and *L. gaucho* crude venom toxins were a kind gift from Instituto Butantan (São Paulo, São Paulo, Brazil) by Dr. Katia C. Barbaro. Adult *L. laeta* and *L. gaucho* spiders were obtained from CPPI (Curitiba, Paraná, Brazil).

2.2. cDNA library construction

The venom gland cDNA library was previously constructed by our group [33]. Briefly, venom gland mRNAs from adult *L. intermedia* spiders were purified using the FastTrack 2.0 mRNA Isolation Kit (Invitrogen, Carlsbad, USA). cDNAs were synthesized using the SuperScript Plasmid System with Gateway Technology for cDNA Synthesis and Cloning (Invitrogen), cloned into the *Not* I/*Sal* I pre-cut pSPORT1 vector, and transformed into DH5α *Escherichia coli* cells.

2.3. cDNA library screening

Randomly selected colonies (approximately 100 clones) were inoculated in LB containing 100 µg/ml ampicillin and grown overnight at 37 °C (with aeration), and recombinant plasmids were purified using QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN, Valencia, USA). The cloned cDNAs were sequenced on both strands using ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems, Warrington, UK). Reactions were analyzed by an ABI 377 automatic sequencer (Applied Biosystems). The T7 and SP6 promoter regions were used to prime the sequencing reactions. The cDNA sequences were analyzed and used to search the NCBI GenBank protein databases [34].

2.4. Cloning of cDNAs encoding LALP2 and LALP3

cDNAs encoding the putative mature metalloprotease toxins LALP2 and LALP3 were amplified by PCR using *Pfu* DNA Polymerase (Fermentas, Burlington, Canada). The forward primers contained the *Xho* I restriction site for LALP2 and *Nde* I restriction site for LALP3 at the 5' end, and the reverse primers contained the *Bam*HI restriction site and the native stop codon of the cDNA for the both isoforms (Fig. 1). The PCR products were digested with *Xho* I or *Nde* I and *Bam*HI and gel purified using PerfectPrep Gel Cleanup Kit (Eppendorf, Hamburg, Germany). Purified DNAs were subcloned into pET-14b (Novagen, Madison, USA) digested with *Xho* I or *Nde* I and *Bam*HI. The correct construct was confirmed by PCR using T7 as the forward primer and SP6 as the reverse primer and sequencing.

2.5. LALP1 expression and purification

LALP1 was obtained as described by da Silveira et al. [7] The final construct of the mature protein LALP1/pET-14b was transformed

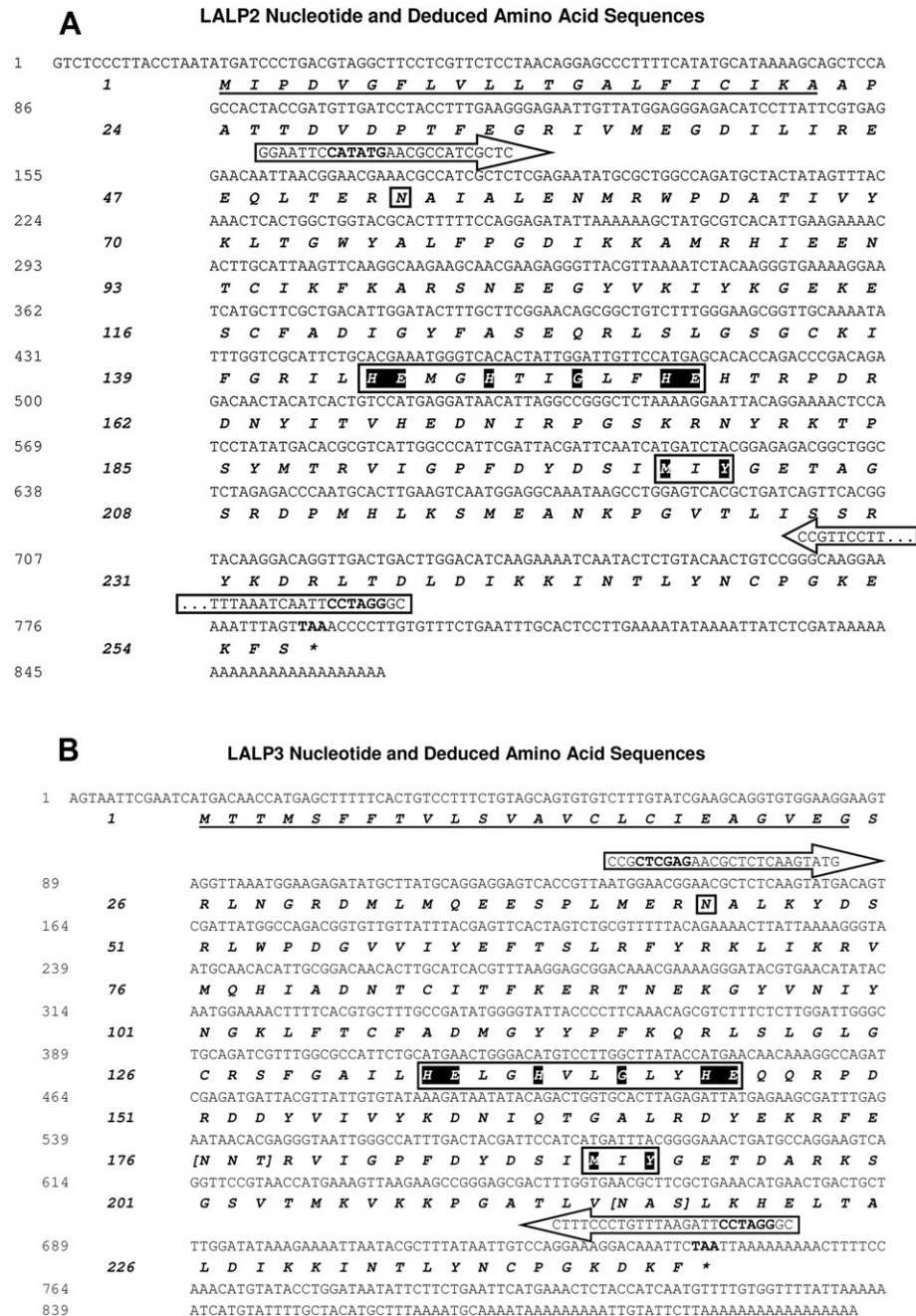


Fig. 1. Molecular cloning of two new isoforms of astacin-like proteases (LALP2 and LALP3) from a *L. intermedia* venom gland cDNA library. Nucleotide and deduced amino acid sequences of cloned cDNAs for LALP2 (A) and LALP3 (B) from the *L. intermedia* venom gland. The predicted signal peptide is underlined in the protein sequence. The positions of primers used for subcloning into the expression vector pET-14b are indicated by arrows. Asparagine (in a box) is the first amino acid of the mature proteins. LALP2 has 204 amino acids and LALP3 has 200 amino acids. The consensus sequences for astacin family members, HEXXHXXGXXHE, which contains the zinc-binding motif (highlighted in another box), and the methionine turn, MXV (highlighted), are also shown. An asterisk indicates the stop codon (TAA) in bold. Brackets mark two potential N-glycosylation sites in LALP3 (B).

into *E. coli* BL21(DE3)pLysS competent cells and plated on to LB agar plates containing 100 µg/ml ampicillin and 34 µg/ml chloramphenicol. Single colonies of LALP were used to inoculate LB broth (ampicillin and chloramphenicol) and grown overnight at 37 °C. These cultures were diluted 1:100 into 1 L of fresh LB broth containing antibiotics, and incubated at 37 °C until the OD₅₅₀ reached 0.5. IPTG (isopropyl β-D-thiogalactoside) was added to a final concentration of 0.05 mM to induce the protein expression and cells were incubated for 4 h at 37 °C with vigorous shaking. Cells were harvested by centrifugation at 4000 g for 7 min at 4 °C, before

being resuspended in 40 ml of a denaturing lysis buffer (20 mM sodium phosphate, pH 7.8, 500 mM NaCl and 6 M guanidinium chloride) and frozen at –20 °C overnight. Cell suspensions were thawed and the lysed material was centrifuged at 9000 g for 30 min at 4 °C. The supernatants were incubated with 1 ml of Ni-NTA (Ni²⁺-nitrilotriacetate) – agarose beads for 30 min at room temperature (25 °C), with gentle agitation. The suspensions were loaded on to a column, and the packed gel was exhaustively washed with the following buffer (20 mM sodium phosphate, pH 8.0, 500 mM NaCl, 8 M urea and 20 mM imidazole). The recombinant

protein was then eluted in 10 ml of elution buffer (20 mM sodium phosphate, pH 8.0, 500 mM NaCl, 8 M urea and 250 mM imidazole). Fractions were pooled and dialysed against 10 mM sodium phosphate buffer (10 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, pH 7.4), for 16 h. After dialysis, the refolded recombinant protein was recovered from the supernatant by centrifugation at 9000 g for 30 min at 4 °C and quantified by Coomassie Blue method (BioRad, Hercules, USA).

2.6. ELISA antibody capture assays

Plates (Nunc MaxiSorp, Roskilde, Denmark) were coated with *L. intermedia*, *L. laeta*, and *L. gaucho* crude venoms (10 µg/ml, 2 h, room temperature). Plates were washed with phosphate buffered saline (PBS) and blocked with 1% bovine albumin (BSA) diluted in PBS (2 h, room temperature). After washing the plates with 0.1% Tween-PBS, they were incubated with primary antisera against LALP1 in different concentrations (2 h, room temperature). The plates were washed again and incubated with secondary antibodies conjugated to horseradish peroxidase (1 h, room temperature). The colorimetric reaction was developed using ortho-phenylenediamine (OPD) and stopped with concentrated sulfuric acid (1 M). Colorimetric results were measured at 490 nm using an automated microplate reader (Meridian ELX 800 Bio-TEK Instruments, INC., Vermont USA) [31].

2.7. Gel electrophoresis, western blotting, and zymogram

Protein concentration was determined using the Coomassie Blue method. Five replicates were carried out. Protein analysis was performed on 12.5% SDS-PAGE under reducing conditions [35] and stained with Coomassie Blue. Samples of *L. intermedia*, *L. laeta*, and *L. gaucho* crude venoms (12.5 µg) were examined by western blot using hyperimmune antisera against LALP1. Samples of LALP1 (5 µg) were examined using hyperimmune antisera against *L. intermedia*, *L. laeta*, or *L. gaucho* crude venoms. Proteolytic activity of *L. intermedia*, *L. laeta* and *L. gaucho* crude venom toxins (3 µg) was analyzed by zymograms (non-reducing 12.5% SDS-PAGE copolymerized with 3 mg/ml gelatin, at 4 °C). After electrophoresis, the gel was washed twice with 2.5% (v/v) Triton X-100 (30 min), incubated overnight with 50 mM Tris/HCl, pH 7.4; 200 mM NaCl; 0.5 mM CaCl₂; 0.5 mM MgCl₂, and 0.5 mM ZnSO₄ at 37 °C, and then stained with Coomassie Blue. A clear area of substrate lysis against a blue background stain indicated the presence of proteolytic activity. For metalloprotease activity inhibition assays 1,10-phenanthroline (5 mM) was used in the incubation buffer. Molecular mass markers were from Sigma.

2.8. Screening for astacin-like metalloprotease (LALP1) homologs in venom glands of *L. laeta* and *L. gaucho*

Thirty adult *L. laeta* and *L. gaucho* spiders were subjected to venom extraction by electrostimulation [13] to stimulate the production of mRNAs in the venom glands. After 5 days, the venom glands were collected and stored immediately in liquid nitrogen. The extraction of total RNAs was done using TRIzol reagent (Invitrogen) [36], and following precipitation with isopropanol, total RNA was diluted in water (10 µl). cDNA was synthesized from *L. laeta* and *L. gaucho* venom gland total RNA using oligo-dT primer (Invitrogen). To screen for astacin-like metalloproteases, PCR was carried out using the RT-PCR products as templates and primers for LALP1 (Forward primer: 5' CGCGTCGACAATGCTGTCAAATATGACCAG 3' and Reverse primer: 5' CGGGATCTCACACATTTACATACGGACGT 3'). cDNAs were sequenced using DYEnamic ET terminator Cycle Sequencing Kit (GE Healthcare, Piscataway, NJ, EUA) in MegaBace™ 1000 DNA Analysing Systems (Amersham Biosciences). The

nucleotide sequences were analyzed using Genetyx-Mac v7.3 software (Software Development, Tokyo, Japan) and deduced amino acid sequences were compared to GenBank protein databases at NCBI.

2.9. Multiple sequences alignment

LALP2, 3, 4 and 5 deduced amino acid sequences were submitted to Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) [34]. From the results, astacin sequences belonging to distinct organisms taxa (E-value ≤ 10⁻⁵) were chosen and aligned using CLUSTAL W2 program (<http://www.ebi.ac.uk/clustal>) [37].

2.10. Animals

Adult rabbits (3 kg) from the Central Animal House of the Federal University of Paraná were used for polyclonal antibody production using *L. intermedia* crude venom and LALP1. All experimental protocols using animals were performed according to the "Principles of laboratory animal care" (NIH Publication no 85–23, revised 1985), "Brazilian Federal Laws," and Ethical Committee Agreement number 256 of Federal University of Paraná.

3. Results

3.1. Molecular cloning of two novel astacin-like metalloproteases from *L. intermedia* venom gland

By screening clones of a cDNA library generated from *L. intermedia* venom gland [16,33], two novel cDNAs encoding astacin-like metalloprotease toxins were identified by a protein-BLAST search. The putative protein products from these cDNAs were named LALP2 and LALP3, based on the previous description of LALP1 [7]. These findings suggest that astacin-like toxins are a gene family present in *L. intermedia* venom. LALP2 sequence analysis revealed a hydrophobic putative signal peptide 21 amino acids in length, and LALP3 sequence analysis revealed a putative signal peptide 24 amino acids in length. Pro-peptides of 31 amino acids for LALP2 and 19 amino acids for LALP3 were deduced based on homology with other astacin-like metalloproteases. LALP2 is predicted to be a mature protein of 204 amino acids and LALP3 a mature protein of 200 amino acids. Both of the mature proteins contain the astacin family signatures HEXXHXXGXXHE (enzymatic catalytic domain) and MXV (Met-turn) separated by 44 amino acids for both LALP2 and LALP3 [3]. The complete cDNA sequence of LALP2 comprises 862 bp, and the calculated molecular mass of the pro-protein is 26.99 kDa with a pI of 7.84. No putative N-glycosylation sites were identified for LALP2 (Fig. 1A). For LALP3 the cDNA sequence has 910 bp, and the calculated molecular mass of the pro-protein is 25.45 kDa with a pI of 9.12. Two putative N-glycosylation sites were identified for LALP3 (Fig. 1B).

3.2. Immunological cross-reactivity of antibodies against LALP1 with different *Loxosceles* spider venoms and antibodies against whole venoms with LALP1 toxin

Initially, to evaluate the relationship between LALP1 (the first astacin-like toxin identified in the *L. intermedia* venom) with native venom toxins of other *Loxosceles* genus spiders, we used polyclonal antisera against recombinant LALP1 [7] and examined antigenic cross-reactivity with whole venoms of different *Loxosceles* species. We performed ELISA antibody capture assays (Fig. 2A) using antibodies that recognize non-denatured epitopes on the antigen, and immunoblots (Fig. 2B and C) to examine antibodies that recognize denaturation-resistant epitopes on the antigen. As shown, antibodies

against LALP1 cross-reacted with native venom toxins for all *Loxosceles* species tested, showing bands at regions of 25–32 kDa for *L. intermedia*, 26–30 kDa for *L. gaucho* and 27–29 kDa for *L. laeta*. These results reveal that whole venoms contain native toxins similar to LALP1 and that this toxin has important and conserved antigenic determinants. Moreover, purified LALP1 was immunoblotted using sera against *L. intermedia*, *L. gaucho*, and *L. laeta* whole venoms. As observed (Fig. 2C), antibodies against native toxins from the three different *Loxosceles* venoms reacted with LALP1, suggesting the existence of this family of genes in different *Loxosceles* species.

3.3. Proteolytic effect and 1,10-phenanthroline inhibitory sensitivity of venom toxins on gelatin

To further evaluate the presence of LALP toxins in different *Loxosceles* venoms, corroborate the above-described immunological data, and strengthen the idea of a conserved family of toxins,

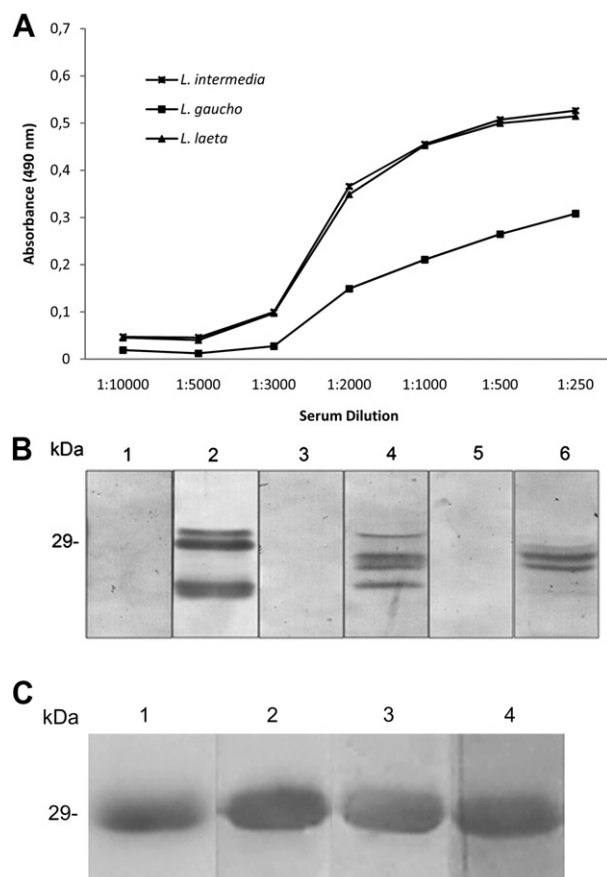


Fig. 2. Immunological cross-reactivity of antibodies against LALP1 with different *Loxosceles* spider venoms and antibodies against different *Loxosceles* spider venoms with LALP1. (A) Antibody-capture ELISAs were carried out using *L. intermedia*, *L. laeta*, and *L. gaucho* crude venom toxins at a concentration of 10 µg/mL immobilized on a solid phase. The reaction was developed using primary antisera against LALP1 at the indicated dilutions (x-axis). (B) *L. intermedia*, *L. gaucho*, and *L. laeta* crude venom toxins (lanes 2, 4 and 6, respectively) each at a concentration of 12.5 µg were resolved by SDS/PAGE (12.5% gel) under reducing conditions and transferred to nitrocellulose membranes that were exposed to antisera against LALP1. Lanes 1, 3 and 5 indicate negative reactions in the presence of pre-immune serum. (C) Samples of purified recombinant toxin LALP1 (5 µg) were separated by 12.5% SDS/PAGE under reducing conditions and transferred onto nitrocellulose membranes that were exposed to antibodies against *L. intermedia* (lane 2), *L. gaucho* (lane 3) and *L. laeta* (lane 4) crude venom toxins. Lane 1 indicates purified LALP1 (5 µg) stained with Ponceau-S solution. Molecular mass marker is shown on the left (size in kDa).

we performed a zymogram experiment containing copolymerized gelatin using different *Loxosceles* spider venoms. As depicted in Fig. 3A, all venoms possess proteases and degraded gelatin at electrophoretic mobilities similar to those previously reported for immunological cross-reactivity. In addition, based on the fact that astacin proteases are zinc metalloproteases, we examined the ability of the divalent metal chelator 1,10-phenanthroline to block the observed proteolytic activity. As shown, 1,10-phenanthroline abolished the gelatinolytic activity of the different *Loxosceles* venoms, further supporting the hypothesized presence of LALPs in venoms (Fig. 3B).

3.4. Identification of mRNA of astacin-like toxins in the venom glands of *L. laeta* and *L. gaucho*

To reinforce the presence of astacin gene family members in the venoms of different brown spiders, we extracted mRNA from the venom glands of *L. laeta* and *L. gaucho*. cDNA was then synthesized using primers for LALP1. The existence of astacin-like molecules in the venom glands of *L. laeta* and *L. gaucho* was further confirmed by sequencing these PCR products. The sequenced cDNAs were identified as astacin-like molecules using the Pfam database [38] and Blastx search [34]. The deduced amino acid sequences for the cDNAs obtained from *L. laeta* (Fig. 4A) and *L. gaucho* (Fig. 4B) have astacin family domains (Peptidase family M12A, Pfam database accession number PF01400) including conserved cysteine residues, the enzymatic catalytic domain (HEXXHXXGXXHE), and the methionine-turn (MXY) (Fig. 4A and B). This proved the presence of astacin-like toxins in *L. laeta* and *L. gaucho* venoms and the existence of astacin-like proteases gene family. These *Loxosceles* astacin-like proteases from *L. laeta* (Fig. 4A) and *L. gaucho* (Fig. 4B) were named LALP4 and LALP5, respectively.

3.5. Multiple alignment analysis of the cDNA-deduced amino acid sequences for LALPs and other members of astacin family

To further explore the conserved amino acid residues among the newly identified toxins and other members of the astacin family, we performed a multiple sequence alignment to compare the amino acid identities among distinct astacin family members. Sequence alignment results (Fig. 5) for LALP1, LALP2, LALP3 (*L. intermedia* astacins), LALP4 (*L. laeta* astacin), and LALP5 (*L. gaucho* astacin) show moderate identities for all five LALPs. LALP2 has 43% identity with LALP1 and LALP3 has 46% identity with LALP1 (Table 1). All LALPs have moderate identities when compared with each other and when compared with other astacin-like proteases (Table 1). In general, LALPs have the greatest identity to nematode astacin protease family members (NAS15, NAS7, NAS6 and NAS4). LALPs are more similar to an ancient arthropod astacin (LAST) than to another spider astacin (Tolloid-like). The predicted amino acid sequences alignment additionally confirmed conserved features for these different molecules (specifically for catalytic domains containing the zinc-binding motif) and strengthened the hypothesis that astacins are a gene family in *Loxosceles* spider venoms (Fig. 5). Based on amino acid identities (Table 1), LALPs are homologous to other astacin family members from a variety of organisms such as nematode astacins; mouse and human ovastacins; crayfish astacin (*A. astacus*); human, mouse and spider tolloids; *Limulus polyphemus* astacin; and human and mouse meprins.

4. Discussion

In general, venoms of different animals are mixtures of bioactive molecules such as phospholipases, hyaluronidases, peptides, and proteases, which by acting in an additive or synergistic way exert

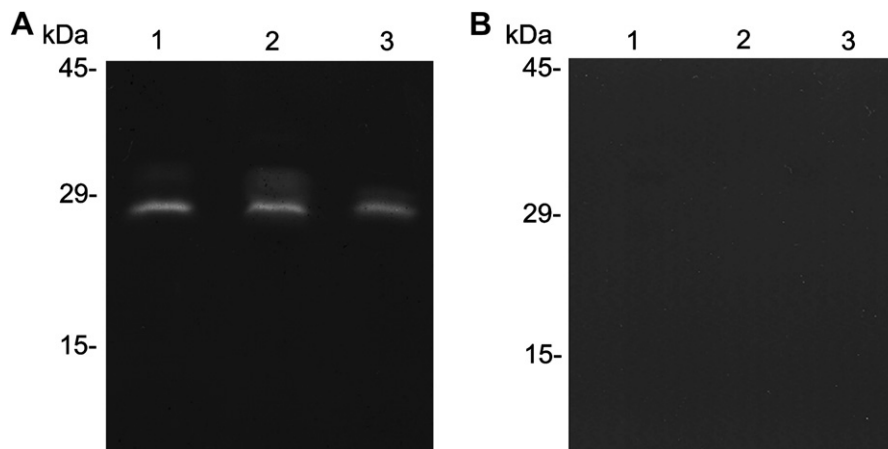


Fig. 3. Proteolytic effect and 1,10-phenanthroline inhibitory sensitivity of venom toxins on gelatin (A) The gelatinolytic activity of *L. intermedia*, *L. laeta*, and *L. gaucha* crude venom toxins was assessed using a zymogram copolymerized with gelatin (3 mg/mL). All venoms have gelatinolytic activity, as demonstrated in lane 1 for *L. intermedia* crude venom toxins, lane 2 for *L. laeta* crude venom toxins, and lane 3 for *L. gaucha* crude venom toxins. (B) The gelatinolytic activities of *L. intermedia* crude venom toxins (lane 1), *L. laeta* crude venom toxins (lane 2), and *L. gaucha* crude venom toxins (lane 3) were abolished when the crude venom toxins were incubated with 1,10-phenanthroline.

deleterious effects. Toxins with proteolytic activities in venoms of different animals have been described as playing a major role in the noxious effects reported followed envenomation, such as edema, hemorrhage, and necrosis [26,32,39].

In this report, we describe the identification of a gene family of astacin-like toxins in *L. intermedia* (LALP2 and LALP3) and in other species of *Loxosceles* (*L. gaucha*, *L. laeta*) suggesting that members of the astacin family will be found in all South America *Loxosceles*.

The idea of homolog members of the astacin family was initially observed using serum against LALP1, which reacted with *L. intermedia* whole venom, producing three bands by western blot (Fig. 2B), suggesting the existence of different isoforms or even different members of the family in the same venom. Additionally, we cloned two novel metalloprotease toxins from the *L. intermedia* venom gland. We named these toxins LALP2 and LALP3 (from *Loxosceles* Astacin-Like Protease), complementing the family of the previously identified member originally named LALP (now called LALP1) [7]. Astacin-like toxins (LALP1, LALP2 and LALP3) can be considered a gene family in *L. intermedia* since multiple members are expressed in this venom.

Based on the cDNA-predicted amino acid sequence, we identified these two venom toxins as belonging to the brown spider astacin-like toxin family. Their primary sequence includes a signal sequence and mature protein sequence similar to those of other astacin-like molecules, particularly LALP1 from *L. intermedia* venom. Several lines of evidence support LALP2 and LALP3 as astacin-like molecules. The nucleotide and deduced amino acid sequences are similar to those of several members of the astacin family. The molecular mass and isoelectric point calculated from deduced amino acid sequences of pro-proteins are very similar to those described for other astacin molecules. Several other pieces of evidence strengthen the identification of LALP2 and LALP3 as astacin-like metalloproteases. LALP2 and LALP3 both have the astacin signature HEXXHXXGXXHE, which is the zinc binding domain of catalytic site, and the Met-turn MXY, an amino acid domain involved in the maintenance of the conformation of the enzyme [4,6].

Our results show three very different astacin homologs within the venom of *L. intermedia*, this data strongly suggest that they are paralog genes, which are different members of a gene family resulted from duplication events that yield multiple copies in the same genome. Paralog genes were already described in *Loxosceles* species, the phospholipase-D (*LoxTox*) gene family [40–42].

The first evidence of the putative existence of different toxins belonging to astacin gene family in different *Loxosceles* species came from the characterization of antigenic cross-reactivity by ELISA and immunoblotting using antibodies against LALP1 [7]. The data suggested that crude venom from *L. intermedia*, *L. laeta*, and *L. gaucha* contains LALP1-like proteins at 25–32 kDa region. Moreover, antibodies raised under identical conditions against whole venoms from *L. intermedia*, *L. gaucha*, and *L. laeta* had high cross-reactivity with recombinant LALP1, which suggested that epitopes present in this toxin are strong antigenic determinants and corroborated the presence of astacin-like toxin members in different *Loxosceles* venoms, thus strengthening the idea of this toxin family widespread in the genus.

However, since we were using polyclonal antibodies, the identification of these toxins from *L. laeta* and *L. gaucha* crude venoms as members of the astacin family had to be confirmed. Astacin members differ from other zinc metalloprotease families in conserved amino acid residues in the catalytic domain and methionine-turn. Therefore, the epitopes recognized in the immunoassays could not be the astacin domains. Whole venoms had gelatinolytic activity, which was completely abolished by 1,10-phenanthroline (a divalent metal chelator), supporting the metalloprotease nature of these proteolytic activities. These results proved that all of these venoms contained metalloproteases, which is in agreement with the literature [13,25,26,28]. The cross-reactivity and zymogram assays showed that proteases from *L. laeta* and *L. gaucha* were related to LALP1, as they showed metalloprotease activity and similar molecular weight by SDS-PAGE. However, what type of metalloprotease they were had to be investigated.

To confirm that the toxins identified by ELISA, immunoblotting and zymogram assays were LALPs and that we had identified the gene family of astacin-like toxins in the *Loxosceles* genus, we extracted total RNA from venom glands of *L. laeta* and *L. gaucha* specimens and screened them for astacin-like metalloproteases via PCR with LALP1 primers. Sequence analysis of the obtained products showed that metalloproteases from *L. laeta* and *L. gaucha* venoms were astacin proteases, with astacin-family signature motifs (HEXXHXXGXXHE and MXY). These *Loxosceles* astacin-like toxins were then named: LALP4 (*Loxosceles* astacin-Like Protease 4 - *L. laeta* astacin-like protease) and LALP5 (*Loxosceles* astacin-Like Protease 5 - *L. gaucha* astacin-like protease).

All these results suggest that there is a gene family of astacin-like toxins in the *Loxosceles* genus, and these toxins may play an

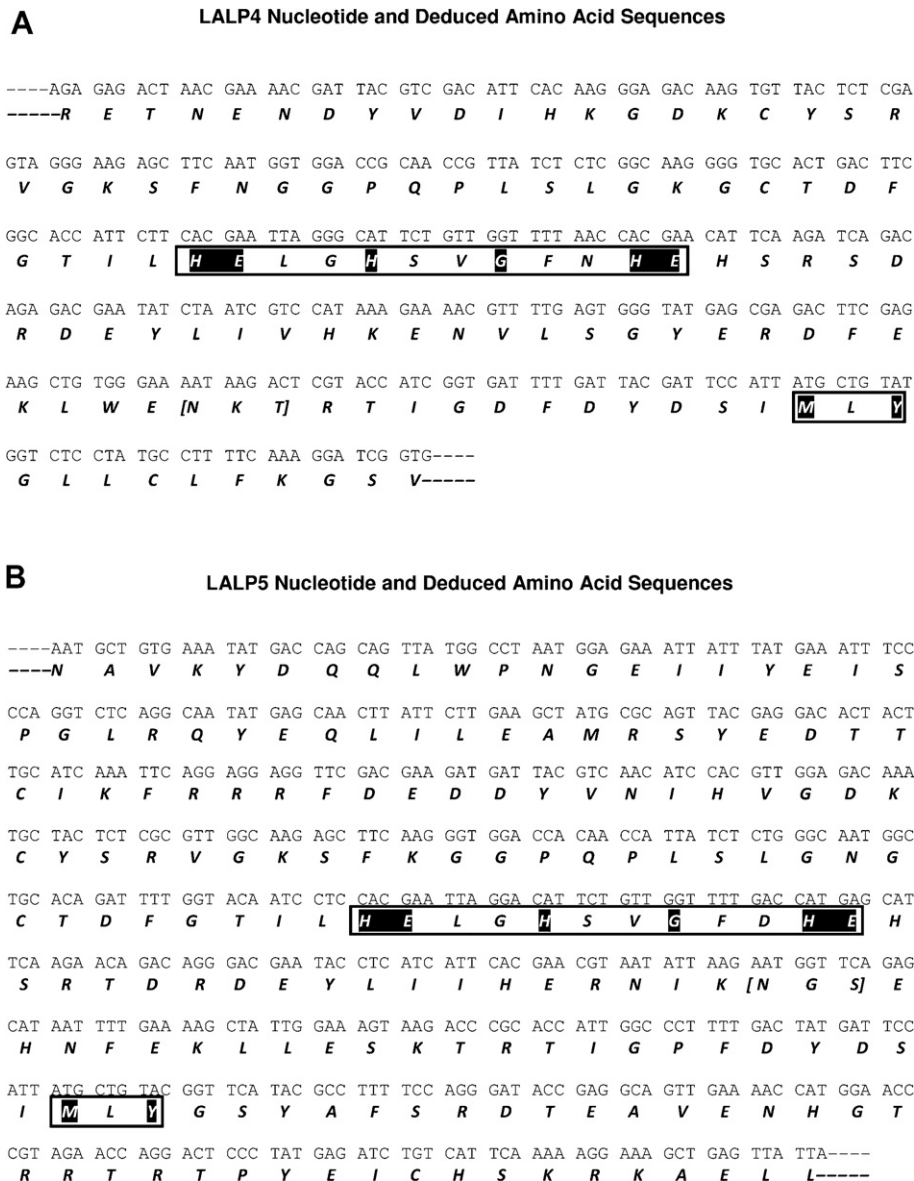


Fig. 4. LALP4 and LALP5 nucleotide and amino acid sequences. (A) The nucleotide and deduced amino acid sequences obtained from sequencing the *L. laeta* PCR product (LALP4). (B) The nucleotide and deduced amino acid sequences obtained from sequencing the *L. gaucho* PCR product (LALP5). The astacin family motifs, the catalytic site (HEXXHXXGXXHE) and the Met-turn (MXY), are indicated with a box for both isoforms. Brackets mark the putative N-glycosylation sites in LALP4 and LALP5.

important role in the injurious effects of venoms from these spiders in human beings. According to previously published data, other *Loxosceles* venom toxins, such as phospholipase-D, which is called dermonecrotic toxin and is the best-characterized toxin, are also a family of important toxins in *Loxosceles* venoms [16,17,33,40–43].

Astacin molecules can be found in almost all animal taxa, revealing that despite selective forces the astacin domain has been conserved [4]. This also suggests the important functions of these molecules. Astacin members have functional heterogeneity, acting in distinct biological processes, in different tissues and organisms [2,4]. We compared astacin family members from different animal taxa to LALPs. Based on protein sequence analysis comparing LALP2, LALP3, LALP4, and LALP5 to several different astacin family members additionally supports these molecules as astacin-like molecules. This comparison indicated that these toxins closely resemble astacin (from *A. astacus*), the prototype of the family [4]. Astacin-like toxins found in *Loxosceles* venoms are more divergent from astacins

present in organisms grouped in the Aranea order (LALPs versus Tolloid-like astacin from *Achaearanea tepidariorum*) than when compared with organisms that are evolutionarily distant, such as the nematode *C. elegans* (*Loxosceles* spp and *C. elegans* are grouped in the same kingdom - Metazoa) and the ancient arthropod *Limulus polyphemus* (*Loxosceles* and *L. polyphemus* share subphylum Chelicerata). These findings based on amino acid sequence similarities with different organism taxa (protein similarities between animals that are evolutionarily distant and protein differences between animals that are evolutionarily close) occur not only for astacins. The nematode *Steinernema carpocapsae* serine protease is clustered with insect *Anopheles gambiae* str. PEST, *Agrotis ipsilon*, and *Helicoverpa zea* serine proteases [44], and the proteinase domain from *Podocoryne carnea* metalloproteinase (PMP1) is more similar to human meprin than to HMP1 from *Hydra vulgaris* (another hydrozoan) [45]. To date, little is known about the evolution of this gene family, thus a further phylogenetic study and analysis will be necessary to understand

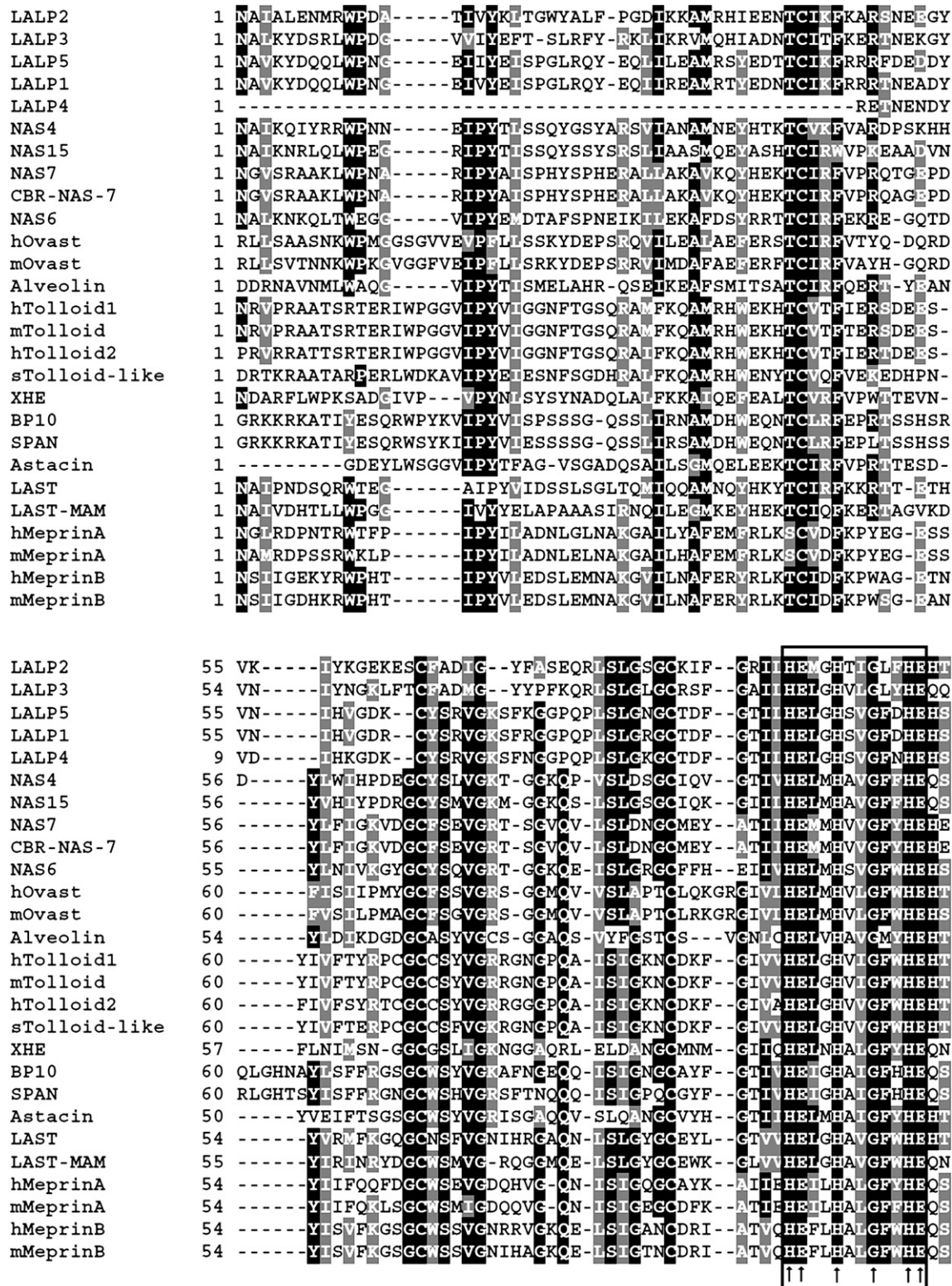


Fig. 5. Multiple alignment analysis of the cDNA-deduced amino acid sequences for the *Loxosceles* astacin-like proteases with other astacin-like metalloproteases. Sequences were aligned using the CLUSTAL W2 program (www.ebi.ac.uk/CLUSTAL). Multiple alignment analysis of amino acid domains of *Loxosceles* astacin-like proteases and other astacin family-related members (listed in the Table 1 legend). Amino acid identities are shaded in black, and conservative substitutions are in gray. Arrows in the box point to the astacin signature sequence and Met-turn.

the evolutionary characteristics of Astacin molecules within the Metazoa [46].

Astacin molecules as components of animal venom were first described in 2007 and, to date, have only been described for

Loxosceles Brown spider venom [7]. Although another astacin (tolloid-like, published in GenBank® Database, 2003, BAD01492.1) involved in embryo development has been found in *A. tepidarium*, a spider whose venom is not toxic to humans. Metalloproteases

LALP2	106	RPDRDNYITVHEDNIRPCKSRNYRKTTPSYMTRVIG-PFDYDSIMYIYGETAGSRDPMHLKS
LALP3	105	RPDRDDYIVYKDNITQTCALRDYKRFENNTRVIG-PFDYDSIMYIYGETDARKS--GSVT
LALP5	106	RTDRDEYLIITHERNIKNGSEHNFEKLLESKTRTIG-PFDYDSIMLYGSAFSDRDEAVEN
LALP1	106	RADRDEFLITHKENIKNGSEHNFDKLWENNTRTIG-PFDYDSIMLYGAYAFSKDTRKFKT
LALP4	60	RSDRDEYLIIVHKENVLSGYERDFEKLWENKTRTIG-DFDYDSIMLYGLLCLFKGVS----
NAS4	107	RQDRDSYIDVWQNVNMGADDQFEKYNLNVISHLDEPYDYASIMHYGPYAFSGSG-KKTL
NAS15	106	RTDRDDHITIMWNNIQAGMQGQFEKYGHGTIQSLGTCYDYGSIMHYGKAFSRNG-QPTM
NAS7	106	RWDRDNFIDITIWONIDRGALDQFGKVDLSKTSYYGQPYDYKSIILHYDSLAFSKNG-FPTM
CBR-NAS-7	106	RWDRDNFIDITIWONIDRGALDQFGKVDLSKTSYYGQPYDYKSIILHYDSLAFSKNG-FPTM
NAS6	105	RADRDDHITINWNNILPGMKSQFDKISAVLQDLOGENYDYKSIIMHYDSTAFSRNG-RNTI
hOvast	112	RADRDYITVWNEILPGSEINFIKS---RSSNMLTPYDYSSVMHYGRFAFSWRG-LPTI
mOvast	112	RADRDYITVWNEILPGSEINFIKS---RSTNMLVPYDYSSVMHYGRFAFSWRG-QPTI
Alveolin	103	RYDRDQFISVIWDNIKPKGQGNFDVK---MGDTLNLPYDFCSIMHYGTSYFSKDG-SPTI
hTolloid1	112	RPDRDNHVTIIRENIQPGQBYNFKLMPEGEVNSLGERYDEDSIMHYARNTFSRGM-FLDT
mTolloid	112	RPDRDNHVTIIRENIQPGQBYNFKLMPEGEVNSLGERYDEDSIMHYARNTFSRGM-FLDT
hTolloid2	112	RPDRDQHVTIIRENIQPGQBYNFKLMPEGEVNSLGERYDEDSIMHYARNTFSRGM-FLDT
sTolloid-like	112	RPDRDKHVQIINKNIMTQGEYNFNKLTTEEVTSLGLAYDASIMHYARNTFSKST-YLDT
XHE	108	RSDRDDYIVITHENIIPDFLKMFEKYN---TNNLGIEYDYASVMHYSRYHSING-DITI
BP10	117	RPDRDDYIVNLYQNIQSGROHNFAKYTWGRVTSRNVEYDVGSIMHYGGYGFSSNG-RPTI
SPAN	117	RPDRDEYIVNHFENVQSGREHNFAKYTWGVTSSNVEYDVGSIMHYGGYGFSSNG-RPTI
Astacin	102	RMDRDNYITINYNQNDPMTSNFDIDTYS--RYVGEDYQYYSIMHYGKYSFSIQWGVLET
LAST	105	RSDRDDYIVNHWENIMNGMEIWFKKMSVFENRLDITFDYDSIMLYGETSFSKDGSRVMT
LAST-MAM	105	RADRDDYIVNHWENIMNGMEIWFKKMSVFENRLDITFDYDSIMLYGETSFSKDGSRVMT
hMeprinA	104	RTDRDDYVNIWWDQILSGYQHNFDTYDDSLITDNLTPYDYESIIMHYQPFSEKNASVPTI
mMeprinA	104	RTDRDDYVNIWWDQIITDYEHNFNTYDDNTITDNLTPYDYESIIMHYQPFSEKNESIPPTI
hMeprinB	105	RSDRDDYVRIWWDRLISGREHNFTYSDDISDSLNVPYDYTSVMHYSKTAFAQ-NGTEPTI
mMeprinB	105	RADRDDYVRIWWDRIQPKGEHNFTIYNDVSDDSLNVPYDYTSVMHYSKTAFAQ-NGTESIT
		↑ ↑
LALP2	165	MEANKP--GVTLISSRYDRLLDIDIKINTLYNCPGKEKFS-----
LALP3	162	MVKKKP--GATLVNASLQHELTALDIKINTLYNCPGKDKF-----
LALP5	165	HGTRRT--RTPYEICHSRKAELL-----
LALP1	165	MEPVEP--GLPMKSVIQGKLSYYDIIVKVNKLYKCPPVNPYPGGIRPYVNV-----
LALP4		-----
NAS4	166	VPKKS----GSERMQGRVKFSSDIDVRKINKLYNCPGVSGNNNNNNNNQINSNSIVNHPQ
NAS15	165	IPKKN----G-ATIGQRNGFSKVDKFKINTLYGCP-VEGEKPTTSAPTSGPIVITVKPV
NAS7	165	IPKVK----SATIGNARDFSDVDISKINRMYNCP---VEKSVTAPFARARHVPIYSPQ
CBR-NAS-7	165	IPKVK----SATIGNARDFSDVDISKINRMYNCP---LEKSVTAPFARARHVPIYSPQ
NAS6	164	ETVENG---FTQVIGTAMDLSPLDIVKINKLYSCK---TKK-----
hOvast	168	TPLWAP---S-VHIGQRWNLSASDITRVKLYGCSPSGPRPRGRGSHAHSTGKSPAPAS
mOvast	168	IPLWTS---S-VHIGQRWNLSASDITRVKLYGCSQSPVDSHGRGFQAQSDGRSLTPAS
Alveolin	159	QP--NE---G-VNIGQRKRLSQLDIQKINTLYRCGSKY-----
hTolloid1	171	ILPSRD-DNGIRPAIGQRTRLSKGDIAQARKLYRCP---ACGETLQESNGNLSSPGFPNG
mTolloid	171	ILPSRD-DNGIRPAIGQRTRLSKGDIAQARKLYRCP---ACGETLQESSGNLSSPGFPNG
hTolloid2	171	ILPRQD-DNGVRPTIGQVRRLSQGDIAQARKLYRCP---ACGETLQDTTGNFSAPGFPNG
sTolloid-like	171	ILPQEDPTQRKRPEIGQVRRLSEGDIATNLLYKCP---SCGKSLQNPSSGILLSPEYPNS
XHE	164	EKPDP----NVPIGQRDGLSILDISKINKLYECN---VCSNLLPYSNGMMISANYPSA
BP10	176	TTRDPR---LNSRLQRTALSPADIELANLIYECDDEDGAGANECLNGGYHDTECNV
SPAN	176	TTIDPR---LNSRLQRTALSPADIELANRIYECDDEDGAGANECLNGGYHDTECNV
Astacin	160	IVPLQN-----GIDLTPYDKAHLQTD-----ANQINNLYTNECSLR
LAST	164	TAKD---GTFLKEPYNKPGLSKSDILRINKLYECN-----
LAST-MAM	165	RPKQP---GVVIGPVWKPFGFSESDVRRVNRLYECFGEVRPPPKIPDFICDF-----
hMeprinA	164	TAKI---PEFNSIIIGQRLDFSAIDLRLNRMYNCTTTHTLLDHCTFEKANICGMIQGTR
mMeprinA	164	TTKI---PEFNTIIIGQLPDFSAIDLRLNRMYNCTATHTLLDHCDFEKTNVCGMIQGTR
hMeprinB	164	VTRI---SDFEDVIGQRMDFSDSLIKLNQLYNCSLSSLFMDSCSFELENVCGMIQSSG
mMeprinB	164	VTRI---SEFEDVIGQRMDFSDYDLIKLNQLYNCTSSLSFMDSCDFELENICGMIQSSG

Fig. 5. (continued).

from snake venoms (SVMPs) belong to a distinct metzincin family, the adamalysin II family [2,43].

The mechanisms by which *Loxosceles* venoms act are still being elucidated. Today, using molecular biology and proteomic techniques it is believed that there are more than one hundred different toxins and or isoforms of the same toxin in brown spider whole

venom [9,40,42,43]. It is possible that the deleterious effects observed after bites represent the sum total of individual biological properties triggered by different toxins in the venom. For instance, in the dermonecrosis observed followed envenomation, the inflammatory response plays an essential role in the skin lesion [7,9,22]. In this case, dermonecrotic toxins induce indirect and

Table 1

Percentage of identity between astacin family members. Proteins compared are as follows: LALP2 (astacin-like metalloprotease toxin precursor 2 *L. intermedia* GQ227490), LALP3 (astacin-like metalloprotease toxin precursor 3 *L. intermedia* GQ227491), LALP4 (astacin-like metalloprotease toxin *Loxosceles laeta*, EST - GR277667), LALP5 (astacin-like metalloprotease toxin *Loxosceles gaucho*, EST - GR277668), LALP (astacin-like metalloprotease toxin precursor *L. intermedia* ABK20019), Astacin (*A. astacus* CAB43519), LAST (*L. polyphemus* – an ancient arthropod – astacin CAQ16892.1), LAST-MAM (*L. polyphemus* MAM-containing astacin-like metalloprotease CAQ16893.1), NAS-4 (Nematode Astacin-4 AAB53827), NAS-6 (Nematode Astacin-6 NP503121), NAS-7 (Nematode Astacin-7 CAD99206.1), NAS-15 (Nematode Astacin-15 NP_508154.2), CBR-NAS-7 (*C. briggsae* Nematode Astacin AAP31996.1), hOvast (Human Ovastacin CAD61265), mOvast (Mouse Ovastacin CAD61264), sTolloid-like (Spider Tolloid-Like BAD01492.1), hTolloid1 (Human Tolloid-like 1 O43897), hTolloid2 (Human Tolloid-like 2 Q9Y6L7), mTolloid (Mouse Tolloid-like NP033416), hMeprinA (Human Meprin alpha chain NP005579), mMeprinA (Mouse Meprin alpha chain NP032611), hMeprinB (Human Meprin beta chain NP005916), mMeprinB (Mouse Meprin beta chain NP032612), Alveolin (Fish astacin – *Oryzias latipes* – NP_001098139.1), BP10 (Urchin Blastula Protease10 CAA39673), SPAN (*S. purpuratus* Astacin-like protease AAA30072) and XHE (Xenopus Hatching Enzyme BAA14003).

	LALP2	LALP3	LALP4	LALP5
LALP2	–	55	44	39
LALP3	55	–	48	40
LALP4	44	48	–	72
LALP5	39	40	72	–
LALP1	43	46	75	75
Astacin	31	30	34	31
LAST	38	38	49	41
LAST-MAM	34	38	41	37
NAS-4	35	35	44	40
NAS-6	35	35	41	40
NAS-7	32	34	42	38
NAS-15	33	39	42	40
CBR-NAS-7	32	34	41	38
hOvast	25	26	36	30
mOvast	27	29	38	33
sTolloid	28	32	40	31
hTolloid1	31	29	38	31
hTolloid2	30	30	40	31
mTolloid	31	29	38	31
hMeprinA	24	27	33	24
mMeprinA	24	28	33	25
hMeprinB	29	26	35	32
mMeprinB	29	31	33	34
Alveolin	35	36	35	32
BP10	33	31	42	37
SPAN	34	30	42	35
XHE	26	31	38	27

dysregulated neutrophil activation caused by blood vessel endothelia [47,48], which culminates in an aseptic coagulative necrosis.

Based on the results reported herein, astacin-like toxins are a very representative and conserved molecule among venoms of different *Loxosceles* species, constituting a gene family that is widespread in the South America *Loxosceles* and probably will be found throughout the genus. The presence of proteins in the astacin size range that are visible in SDS-PAGE protein profiles of species across the genus reinforce this idea [15,41]. What are the biological functions played by astacin-like proteases in brown spider venoms? The first hypothesis we propose is based on the homology of venom LALPs with astacin from *A. astacus*, the first member of family described [2], which is a digestive enzyme. Astacin-like venom proteases could possess a digestive function used to initially degrade molecules in prey, which could then be carried away as food. The presence of astacin-like proteases in the digestive egesta of the spider *Argiope aurantia* [49] corroborates the suggestion of the expression of astacin-like molecules with digestive functions in spiders. Moreover, another putative function triggered by astacin-like brown spider venom toxins is the ability to degrade extracellular matrix constituents. Metalloproteases from *L. intermedia* crude venom degrade both A and B chains of

fibronectin into a variety of smaller fragments, an event inhibited by 1,10-phenanthroline [7,13,29,50,51]. Since fibronectin is a multifunctional protein involved in platelet aggregation, blood vessel stability, and wound healing, we suggest a relationship between the proteolytic activity of this venom with local hemorrhage, imperfect platelet adhesion, and difficulties in wound healing, which can occur near bite sites. Also, brown spider venom metalloproteases from *L. intermedia*, *L. gaucho*, and *L. laeta* partially digest fibrinogen [7,13,28,29]. Such venom fibrinogenolysis could play a role during local hemorrhage described in the dermis of bite victims. Additionally, *L. intermedia* venom degrades entactin and the protein core of purified heparan sulfate proteoglycan [25,26,51], two important constituents of basement membranes (specialized forms of extracellular matrix), which play essential roles in blood vessel stability and platelet adhesion. Again, such proteolysis could be involved in local hemorrhage at the bite site and increased vascular permeability following brown spider accidents. By degrading extracellular matrix molecules, brown spider venom proteases also could render tissue structures more permeable and play a role in the spreading of other noxious toxins through the bodies of victims. Strengthening these hypotheses, metalloproteases are well-described molecules in different snake venoms [52–54]. In *Sistrurus catenatus edwardsii* (Desert Massasauga) venom, metalloprotease comprises 12% of all transcripts [55]. Snake venom metalloproteases (SVMPs) are related to injurious effects in envenomation. For example, Leucorolis-B (SVMP from white-tailed jararaca venom) can promote anticoagulation and inhibit collagen-induced platelet aggregation, thus playing a role in victim's local hemorrhage [56]. Additionally, a protease toxin in the venom could be important for the processing of other peptide-derived toxins that, after proteolysis, are active and may be involved in the deleterious effects of loxocelism [7].

Another important question that remains concerning astacin-like brown spider proteases is why different isoforms of toxins are produced in the same animal's venom (paralog genes). We may speculate that this family of toxins is a sum or synergistic adaptation to paralyze and kill insect prey, as well as a form of defense. In addition, different isoforms of the same toxin may represent a biological mechanism of defense against environmental influences (such as humidity, pH, natural inhibitors, and denaturing agents), which under different conditions may inhibit some toxins but not others.

In summary, based on immunological cross-binding, biochemical activity, sensitivity to enzyme inhibitors, and molecular biology approaches we identified the existence of brown spider venom toxins belonging to a gene family of astacin-like proteases. This discovery shows that these astacin-like proteases in brown spider venom are conserved and may therefore have biological significance. Moreover, based on immunological cross-reactivity and molecular biology techniques, we cloned two novel astacin-like toxins from the venom gland of *L. intermedia*, which were characterized as astacin-like proteases due to their conserved catalytic domain and additional molecular signatures. These data also confirm the existence of the astacin-like proteases gene family in all species studied herein and suggest it is present throughout the genus. Together, these results provide insight into loxocelism and can further contribute to the understanding of this metalloprotease family.

Acknowledgments

For help with bioinformatic analysis we thank Dr. Christian M. Probst from Carlos Chagas Institute (Curitiba, Paraná, Brazil). We particularly thank the two anonymous reviewers for comments and suggestions that improved the manuscript. This work was supported by grants from Secretaria de Estado de Ciência, Tecnologia e

Ensino Superior (SETI) do Paraná, Fundação Araucária-PR, CNPq, FAPESP and CAPES, Brazil.

References

- [1] E. Dumermuth, E.E. Sterchi, W.P. Jiang, R.L. Wolz, J.S. Bond, A.V. Flannery, R. J. Beynon, The astacin family of metalloendopeptidases. *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 21381–21385.
- [2] W. Stocker, F. Grams, U. Baumann, P. Reinemer, F.X. Gomis-Ruth, D.B. McKay, W. Bode, Themetzincins – topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralysins, and matrixins (collagenases) define a superfamily of zinc-peptidases. *Protein Sci.* 4 (1995) 823–840.
- [3] W. Bode, F.X. Gomis-Ruth, W. Stockler, Astacins, serralysins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the 'metzincins'. *FEBS Lett.* 331 (1993) 134–140.
- [4] J.S. Bond, R.J. Beynon, The astacin family of metalloendopeptidases. *Protein Sci.* 4 (1995) 1247–1261.
- [5] E.E. Sterchi, W. Stocker, J.S. Bond, Meprins, membrane-bound and secreted astacin metalloproteinases. *Mol. Aspects Med.* 29 (2008) 309–328.
- [6] M.P. Sarras Jr., BMP-1 and the astacin family of metalloproteinases: a potential link between the extracellular matrix, growth factors and pattern formation. *Bioessays* 18 (1996) 439–442.
- [7] R.B. da Silveira, A.C. Wille, O.M. Chaim, M.H. Appel, D.T. Silva, C.R. Franco, L. Toma, O.C. Mangili, W. Gremiski, C.P. Dietrich, H.B. Nader, S.S. Veiga, Identification, cloning, expression and functional characterization of an astacin-like metalloprotease toxin from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. *Biochem. J.* 406 (2007) 355–363.
- [8] J.M. Futrell, *Loxoscelism*. *Am. J. Med. Sci.* 304 (1992) 261–267.
- [9] P.H. da Silva, R.B. da Silveira, M.H. Appel, O.C. Mangili, W. Gremiski, S.S. Veiga, Brown spiders and loxoscelism. *Toxicon* 44 (2004) 693–709.
- [10] W.J. Gertsch, The spider genus *Loxosceles* in South American (Araneae, Scytodidae). *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* 136 (1967) 117–174.
- [11] W.J. Gertsch, F. Ennik, The spider genus *Loxosceles* in North America, Central America, and the West Indies (Araneae, Loxoscelidae). *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* 175 (1983) 264–360.
- [12] K.C. de Oliveira, R.M. Gonçalves de Andrade, R.M. Piazza, J.M. Ferreira Jr., C. W. van den Berg, D.V. Lambourgi, Variations in *Loxosceles* spider venom composition and toxicity contribute to the severity of envenomation. *Toxicon* 45 (2005) 421–429.
- [13] L. Feitosa, W. Gremiski, S.S. Veiga, M.C. Elias, E. Graner, O.C. Mangili, R. Brentani, Detection and characterization of metalloproteinases with gelatinolytic, fibronectinolytic and fibrinogenolytic activities in brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. *Toxicon* 36 (1998) 1039–1051.
- [14] C.S. de Castro, F.G. Silvestre, S.C. Araujo, M.Y. Gabriel de, O.C. Mangili, I. Cruz, C. Chavez-Olortegui, E. Kalapothakis, Identification and molecular cloning of insecticidal toxins from the venom of the brown spider *Loxosceles intermedia*. *Toxicon* 44 (2004) 273–280.
- [15] K.C. Barbaro, I. Knysak, R. Martins, C. Hogan, K. Winkel, Enzymatic characterization, antigenic cross-reactivity and neutralization of dermonecrotic activity of five *Loxosceles* spider venoms of medical importance in the Americas. *Toxicon* 45 (2005) 489–499.
- [16] R.B. da Silveira, R.B. Pigozzo, O.M. Chaim, M.H. Appel, J.L. Dreyfuss, L. Toma, O. C. Mangili, W. Gremiski, C.P. Dietrich, H.B. Nader, S.S. Veiga, Molecular cloning and functional characterization of two isoforms of dermonecrotic toxin from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom gland. *Biochimie* 88 (2006) 1241–1253.
- [17] R.B. da Silveira, R.B. Pigozzo, O.M. Chaim, M.H. Appel, D.T. Silva, J.L. Dreyfuss, L. Toma, C.P. Dietrich, H.B. Nader, S.S. Veiga, W. Gremiski, Two novel dermonecrotic toxins LiRecDT4 and LiRecDT5 from brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom: from cloning to functional characterization. *Biochimie* 89 (2007) 289–300.
- [18] R.B. da Silveira, O.M. Chaim, O.C. Mangili, W. Gremiski, C.P. Dietrich, H. B. Nader, S.S. Veiga, Hyaluronidases in *Loxosceles intermedia* (Brown spider) venom are endo-beta-N-acetyl-d-hexosaminidases hydrolases. *Toxicon* 49 (2007) 758–768.
- [19] J. Kusma, O.M. Chaim, A.C. Wille, V.P. Ferrer, Y.B. Sade, L. Donatti, W. Gremiski, O.C. Mangili, S.S. Veiga, Nephrotoxicity caused by brown spider venom phospholipase-D (dermonecrotic toxin) depends on catalytic activity. *Biochimie* 90 (2008) 1722–1736.
- [20] B. Ramos-Cerrillo, A. Olvera, G.V. Odell, F. Zamudio, J. Paniagua-Solis, A. Alagón, R.P. Stock, Genetic and enzymatic characterization of sphingomyelinase D isoforms from the North American fiddleback spiders *Loxosceles boneti* and *Loxosceles reclusa*. *Toxicon* 44 (2004) 507–514.
- [21] D.M. Elston, J.S. Eggers, W.E. Schmidt, A.B. Storrow, R.H. Doe, D. McGlasson, J. R. Fischer, Histological findings after brown recluse spider envenomation. *Am. J. Dermatopathol* 22 (2000) 242–246.
- [22] K.Z. Ospedal, M.H. Appel, J. Fillus Neto, O.C. Mangili, S. Sanches Veiga, W. Gremiski, Histopathological findings in rabbits after experimental acute exposure to the *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. *Int. J. Exp. Pathol.* 83 (2002) 287–294.
- [23] F.M. Eskafi, B.R. Norment, Physiological action of *Loxosceles reclusa* (G&M) venom on insect larvae. *Toxicon* 14 (1976) 7–13.
- [24] Y.S. Jong, B.R. Norment, J.R. Heitz, Separation and characterization of venom components in *Loxosceles reclusa*—II. Protease enzyme activity. *Toxicon* 17 (1979) 529–537.
- [25] S.S. Veiga, L. Feitosa, V.L. dos Santos, G.A. de Souza, A.S. Ribeiro, O.C. Mangili, M.A. Porcionatto, H.B. Nader, C.P. Dietrich, R.R. Brentani, W. Gremiski, Effect of brown spider venom on basement membrane structures. *Histochem. J.* 32 (2000) 397–408.
- [26] S.S. Veiga, V.C. Zanetti, C.R. Franco, E.S. Trindade, M.A. Porcionatto, O. C. Mangili, W. Gremiski, C.P. Dietrich, H.B. Nader, In vivo and in vitro cytotoxicity of brown spider venom for blood vessel endothelial cells. *Thromb. Res.* 102 (2001) 229–237.
- [27] A.R. Young, S.J. Pincus, Comparison of enzymatic activity from three species of necrotising arachnids in Australia: *Loxosceles rufescens*, *Badumna insignis* and *Lampona cylindrata*. *Toxicon* 39 (2001) 391–400.
- [28] V.C. Zanetti, R.B. da Silveira, J.L. Dreyfuss, J. Haoach, O.C. Mangili, S.S. Veiga, W. Gremiski, Morphological and biochemical evidence of blood vessel damage and fibrinogenolysis triggered by brown spider venom. *Blood Coagul. Fibrinolysis* 13 (2002) 135–148.
- [29] R.B. da Silveira, J.F. dos Santos Filho, O.C. Mangili, S.S. Veiga, W. Gremiski, H. B. Nader, C.P. von Dietrich, Identification of proteases in the extract of venom glands from brown spiders. *Toxicon* 40 (2002) 815–822.
- [30] A. Senff-Ribeiro, P. Henrique da Silva, O.M. Chaim, L.H. Gremiski, K.S. Paludo, R. Bertoni da Silveira, W. Gremiski, O.C. Mangili, S.S. Veiga, Biotechnological applications of brown spider (*Loxosceles* genus) venom toxins. *Biotechnol. Adv.* 26 (2008) 210–218.
- [31] E. Harlow, D. Lane, Using Antibodies: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988.
- [32] M.N. Luciano, P.H. da Silva, O.M. Chaim, V.L. dos Santos, C.R. Franco, M. F. Soares, S.M. Zanata, O.C. Mangili, W. Gremiski, S.S. Veiga, Experimental evidence for a direct cytotoxicity of *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom in renal tissue. *J. Histochem. Cytochem.* 52 (2004) 455–467.
- [33] O.M. Chaim, Y.B. Sade, R.B. da Silveira, L. Toma, E. Kalapothakis, C. Chavez-Olortegui, O.C. Mangili, W. Gremiski, C.P. von Dietrich, H.B. Nader, S.S. Veiga, Brown spider dermonecrotic toxin directly induces nephrotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 211 (2006) 64–77.
- [34] S.F. Altschul, T.L. Madden, A.A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, D. J. Lipman, Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25 (1997) 3389–3402.
- [35] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (1970) 680–685.
- [36] D. Simms, P.E. Cizdziel, P. Chomczynski, TRzol: a new reagent for optimal single-step isolation of RNA. *Focus* 15 (1993) 99–102.
- [37] J.D. Thompson, D.G. Higgins, T.J. Gibson, CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22 4673–4680.
- [38] R.D. Finn, J. Tate, J. Mistry, P.C. Coggill, J.S. Sammut, H.R. Hotz, G. Ceric, K. Forslund, S.R. Eddy, E.L. Sonnhammer, A. Bateman, The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res.* 36 (Database issue) (2008) 281–288.
- [39] J.W. Fox, B.J. Bjarnason, Atrolysins: metalloproteinases from *Crotalus atrox* venom. *Methods Enzymol.* 248 (1995) 368–387.
- [40] E. Kalapothakis, M. Chatzaki, H. Goncalves-Dornelas, C.S. de Castro, F. G. Silvestre, F.V. Laborne, J.F. de Moura, S.S. Veiga, C. Chavez-Olortegui, C. Granier, K.C. Barbaro, The Loxtox protein family in *Loxosceles intermedia* (Mello-Leitao) venom. *Toxicon* 50 (2007) 938–946.
- [41] G.J. Binford, M.R. Bodner, M.H.J. Cordes, K.L. Baldwin, M.R. Rynerson, S. N. Burns, P.A. Zobel-Thropp, Molecular evolution, functional variation, and proposed nomenclature of the gene family that includes sphingomyelinase D in sciarid spider venoms. *Mol. Biol. Evol.* 26 (2009) 547–566.
- [42] M.H. Appel, R.B. da Silveira, O.M. Chaim, K.S. Paludo, D.T. Silva, D.M. Chaves, P. H. da Silva, O.C. Mangili, A. Senff-Ribeiro, W. Gremiski, H.B. Nader, S.S. Veiga, Identification, cloning and functional characterization of a novel dermonecrotic toxin (phospholipase D) from brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. *Biochim. Biophys. Acta* 1780 (2008) 167–178.
- [43] L.F. Machado, S. Laugesen, E.D. Botelho, C.A. Ricart, W. Fontes, K.C. Barbaro, P. Roepstorff, M.V. Sousa, Proteome analysis of brown spider venom: identification of loxneocrogin isoforms in *Loxosceles gaucha* venom. *Proteomics* 5 (2005) 2167–2176.
- [44] N. Balasubramanian, Y.J. Hao, D. Toubarro, G. Nascimento, N. Simoes, Purification, biochemical and molecular analysis of a chymotrypsin protease with prophenoloxidase suppression activity from the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae*. *Int. J. Parasitol.* 39 (2009) 975–984.
- [45] T. Pan, H. Groger, V. Schmid, J. Spring, A toxin homology domain in an astacin-like metalloproteinase of the jellyfish *Podocoryne carnea* with a dual role in digestion and development. *Dev. Genes Evol.* 208 (1998) 259–266.
- [46] F. Möhrle, M. Maniura, G. Plickert, M. Frohme, U. Frank, Evolution of astacin-like metalloproteases in animals and their function in development. *Evol. Dev.* 8 (2006) 223–231.
- [47] K.D. Patel, V. Modur, G.A. Zimmerman, S.M. Prescott, T.M. McIntyre, The necrotic venom of the brown recluse spider induces dysregulated endothelial cell-dependent neutrophil activation. Differential induction of GM-CSF, IL-8, and E-selectin expression. *J. Clin. Invest.* 94 (1994) 631–642.

- [48] B. Dragulev, Y. Bao, B. Ramos-Cerrillo, H. Vazquez, A. Olvera, R. Stock, A. Algaron, J.W. Fox, Upregulation of IL-6, IL-8, CXCL1, and CXCL2 dominates gene expression in human fibroblast cells exposed to *Loxosceles reclusa* sphingomyelinase D: insights into spider venom dermonecrosis. *J. Invest. Dermatol.* 127 (2007) 1264–1266.
- [49] M.J. Foradori, E.K. Tillinghast, J.S. Smith, M.A. Townley, R.E. Mooney, Astacin family metalloproteinases and serine peptidase inhibitors in spider digestive fluid. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 143 (2006) 257–268.
- [50] S.S. Veiga, W. Gremski, V.L. dos Santos, L. Feitosa, O.C. Mangili, H.B. Nader, C. P. Dietrich, R.R. Brentani, Oligosacchari de residues of *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom proteins: dependence on glycosylation for dermonecrotic activity. *Toxicon* 37 (1999) 587–607.
- [51] S.S. Veiga, V.C. Zanetti, A. Braz, O.C. Mangili, W. Gremski, Extracellular matrix molecules as targets for brown spider venom toxins. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 34 (2001) 843–850.
- [52] B.G. Fry, H. Scheib, L. van der Weerd, B. Young, J. McNaughtan, S.F. Ramjan, N. Vidal, R.E. Poelmann, J.A. Norman, Evolution of an arsenal: structural and functional diversification of the venom system in the advanced snakes (Caenophidia). *Mol. Cell. Proteomics* 7 (2008) 215–246.
- [53] H.S. Chen, H.Y. Tsai, Y.M. Wang, I.H. Tsai, P-III hemorrhagic metalloproteinases from Russell's viper venom: cloning, characterization, phylogenetic and functional site analyses. *Biochimie* 90 (2008) 1486–1498.
- [54] J. Boldrini-Franca, R.S. Rodrigues, F.P. Fonseca, D.L. Menaldo, F.B. Ferreira, F. Henrique-Silva, A.M. Soares, A. Hamaguchi, V.M. Rodrigues, A.R. Otaviano, M.I. Homs-Brandeburgo, *Crotalus durissus collilineatus* venom gland transcriptome: analysis of gene expression profile. *Biochimie* 91 (2009) 586–595.
- [55] S. Pahari, S.P. Mackessy, R.M. Kini, The venom gland transcriptome of the Desert *Massasauga rattlesnake* (*Sistrurus catenatus edwardsii*): towards an understanding of venom composition among advanced snakes (Superfamily Colubroidea). *BMC Mol. Biol.* 8 (2007) 115.
- [56] E.F. Sanchez, L.M. Gabriel, S. Gontijo, L.H. Gremski, S.S. Veiga, K.S. Evangelista, J.A. Eble, M. Richardson, Structural and functional characterization of a P-III metalloproteinase, leucurolysin-B, from *Bothrops leucurus* venom. *Arch. Biochem. Biophys.* (2007).

8.4 Artigo científico submetido

Phospholipase-D activity and inflammatory response induced by brown spider dermonecrotic toxin: Endothelial cell membrane as target for toxicity

AUTORES: Olga M. Chaim, Rafael B. da Silveira, Dilza Trevisan-Silva, Valéria P.Ferrer, Isabela C. Rossato, Waldemiro Gremski, Hélio K. Takahashi, Marcos S. Toledo, Helena B. Nader, Silvio S. Veiga.

REVISTA: Biochemical Journal, submetido em junho/2009

Phospholipase-D activity and inflammatory response induced by brown spider dermonecrotic toxin: Endothelial cell membrane as target for toxicity

Olga M. Chaim^{*†}, Rafael B. da Silveira[‡], Dilza Trevisan-Silva[†], Valéria P. Ferrer[†], Isabela C. Rossato[†], Waldemiro Gremski^{†§}, Hélio K. Takahashi^{*}, Marcos S. Toledo^{*}, Helena B. Nader^{*}, Silvio S. Veiga^{†1}.

^{*}Department of Biochemistry, Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil;

[†]Department of Cell Biology, Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil;

[‡]Department of Structural, Molecular Biology and Genetics, State University of Ponta Grossa, Ponta Grossa, Brazil; [§]Catholic University of Paraná, Health and Biological Sciences Institute, Curitiba, Brazil.

¹corresponding author

Silvio S. Veiga

Department of Cell Biology, Federal University of Paraná, Jardim das Américas, 81531-990, Curitiba, Paraná, Brazil.

Fax: +55 41 3266 2042

E-mail: veigass@ufpr.br

SYNOPSIS

Brown spider dermonecrotic toxins (phospholipases-D) are the most well-characterized biochemical constituents of *Loxosceles* spp. venom. Recombinant forms are capable of reproducing most all cutaneous and systemic manifestations such as dermonecrotic lesions, hematological disorders, and renal failure. There is currently no direct confirmation for a relationship between dermonecrosis and inflammation induced by dermonecrotic toxins and their enzymatic activity. We modified a toxin isoform by site-directed mutagenesis to elucidate if phospholipase-D activity is directly related to the biological effects. The mutated toxin has a histidine residue at position 12 (conserved catalytic domain) that has been replaced with alanine. LiRecDT1H12A sphingomyelinase activity was drastically reduced and CD analysis demonstrated similar spectra for both isoforms, confirming the mutation did not change general secondary structures of the molecule or its stability. Venom and LiRecDT1 antisera showed antigenic cross-reactivity to both toxins by ELISA and immunoblotting. Dermonecrosis was abolished by mutation, whereas rabbit skin revealed a decreased inflammatory response for LiRecDT1H12A compared to LiRecDT1. Residual phospholipase activity was confirmed increasing concentrations of LiRecDT1H12A by dermonecrosis and fluorometric measurement *in vitro*. Lipid array showed that toxins have an affinity for the same lipids and were both toxins detected on RAEC cell surface. Confocal analysis suggested redistribution of lipid rafts on the RAEC membrane only after exposure to the LiRecDT1. Choline release *in vitro* and HPTLC analyses of LiRecDT1 treated- purified phospholipids and RAEC membrane detergent extracts corroborate with morphological changes as phospholipase-D dependent toxic mechanism, which has no substrate specificity resulting in broad range of bioactive lipids.

Key words: venom, *Loxosceles intermedia*, dermonecrotic toxin, phospholipase-D, endothelial cells, inflammatory response.

short title: brown spider phospholipase-D and cell membrane

8.5 Participação em congresso



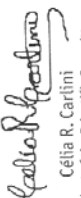


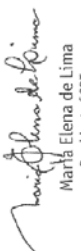
XVI World Congress of the International Society on Toxinology
X Congresso da Sociedade Brasileira de Toxinologia
Biodiversity in Toxins: Tools for Biological Research and Drug Development

CERTIFICATE

We certify that **DILZA TREVISAN SILVA** attended to the XVI World Congress of the Internacional Society on Toxinology and X Congresso da Sociedade Brasileira de Toxinologia.

Cabo de Santo Agostinho, Pernambuco, Brazil.
March 15-20, 2009.


Célia R. Carlini
President of the Scientific Committee


Maria Elena de Lima
President of SBTox