

Maria Cristina Caporrino

Clonagem e expressão de uma fosfolipase D
recombinante do veneno da aranha
Loxosceles gaucho.

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação
em Toxinologia do Instituto
Butantan, para obtenção do
título de Mestre em
Toxinologia.

São Paulo

2014

Maria Cristina Caporrino

Clonagem e expressão de uma fosfolipase D
recombinante do veneno da aranha
Loxosceles gaucho.

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação
em Toxinologia do Instituto
Butantan, para obtenção do
título de Mestre em
Toxinologia.

Orientador: Geraldo Santana
Magalhães

São Paulo

2014

FICHA CATALOGRÁFICA

Caporrino, Maria Cristina

Clonagem e expressão de uma fosfolipase D do veneno da aranha *Loxosceles gaucho* / Maria Cristina Caporrino; Orientador: Geraldo Santana Magalhães. – São Paulo, 2014.

80.folhas. : il. color. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Toxinologia, Instituto Butantan, 2014.

1. *Loxosceles gaucho*. 2. Fosfolipase D recombinante. 3. antissoros. 4. Atividades biológicas. 5. Ensaio Imunossorológicos. I. Magalhães, Geraldo Santana (orient.). II. Programa de Pós-Graduação em Toxinologia. Instituto Butantan. III. Título.

Elaborada com instruções fornecidas pela Biblioteca do Instituto Butantan

Ilma Sra: Ana Maria Moura da Silva
Presidente da Comissão de Pós-Graduação em Toxinologia
Instituto Butantan

Eu, Maria Cristina Caporrino, aluna regular de Pós-Graduação em Toxinologia do Instituto Butantan, em nível de Mestrado, venho por meio desta, autorizar a divulgação da dissertação cujo título é: “Clonagem e expressão de uma fosfolipase D recombinante do veneno da aranha *Loxosceles gaucho*”, em arquivo tipo pdf no site da Secretaria da Saúde do Estado de São Paulo.

São Paulo, 10 de Fevereiro de 2014

(Aluno)

De acordo:

(Orientador)

POS-GRADUAÇÃO EM TOXINOLOGIA
INSTITUTO BUTANTAN

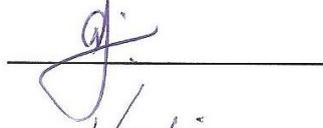
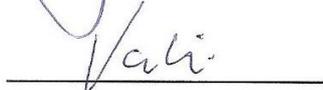
RESULTADO DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO

MESTRADO

NOME DO ALUNA: MARIA CRISTINA CAPORRINO

DATA DO EXAME: 04/04/2014

BANCA EXAMINADORA: Profs. Drs.

NOME	Assinatura	Aprovada	Reprovada
Geraldo Santana Magalhães (Presidente)		(X)	()
Vanessa Rioli		(X)	()
Inácio L. M. J. Azevedo		(X)	()

DECISÃO FINAL: APROVADA (X) REPROVADA ()

Comentários da Banca (opcional):

Parecer de Comissões Institucionais Regulatórias



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
INSTITUTO BUTANTAN



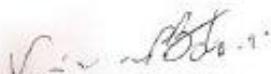
São Paulo, 27 de junho de 2011.

Ilma. Sra.
Dra. Kátia Cristina Barbaro
Pesquisador Científico – Instituto Butantan

Prezada Dra. Katia,

Comunicamos que a Comissão Técnica Nacional em Biossegurança – CTNBio, autorizou o desenvolvimento do projeto de pesquisa: “Isolamento, clonagem e expressão de toxinas da glândula de veneno da aranha *loxosceles gaucho* e interação com anticorpos”, dentro do Certificado de Qualidade em Biossegurança 039/98 – CQB 039/98, ao Laboratório de Imunopatologia, com Nível de Biossegurança 2, NB-2. Em anexo encaminhamos o extrato de Parecer N^o 2949/2011, publicado na seção de “Documentos Publicados do DOU” em 21 de junho de 2011 e disponível no site da CTNBio: <http://www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/16308.html>.

Atenciosamente,


Viviane Fongaro Botosso
Presidente
CIBio-Instituto Butantan

c/c – Dra. Ana Maria Moura da Silva



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA E INSUMOS ESTRATÉGICOS EM SAÚDE
INSTITUTO DE SAÚDE
COMITÊ DE ÉTICA



São Paulo, 12 de fevereiro de 2009.

Protocolo nº: 019/2008 – SES/IS/CEPIS

I – Identificação:

Título: CARACTERIZAÇÃO DE AGENTES INIBIDORES DE AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA EM VENENOS ANIMAIS

Pesquisador: MAYSÁ SPLENDORE DELLA CASA

Instituição onde se realizará o campo: Instituto Butantan

Instituição responsável: Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo

Entrada no CEPIS: 30/07/2008

Data da primeira resposta: 20/08/2008.

II - Descrição breve do projeto:

Trata-se de uma pesquisa laboratorial que visa identificar toxinas de eventual ação anti-trombótica presentes em venenos animais, buscando conhecer o potencial terapêutico para o tratamento de distúrbios na coagulação sanguínea. Para tanto, será realizado um teste sobre a ação anti-trombótica das toxinas utilizando-se plaquetas do sangue humano. Projeto financiado pela FAPESP.

Para a realização do estudo, será colhido sangue de dez doadores saudáveis. A coleta será realizada no Hospital Vital Brasil do Instituto Butantan, por enfermeiras habilitadas. A coleta será repetida em 45 dias. O projeto não deixa claro quantas vezes a coleta será repetida. Também faltam elementos sobre a forma de recrutamento dos doadores, que não foi descrita adequadamente no projeto apresentado. Os critérios de inclusão/exclusão não estão claros e não são apresentadas considerações sobre como uma eventual desistência do doador, caso assim o deseje, será sanada. Essas considerações deverão ser feitas à luz da garantia da autonomia dos participantes do estudo, conforme os princípios norteadores da ética na pesquisa em saúde: autonomia, não maleficência, beneficência e justiça.

*Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Saúde
Rua Santo Antônio, 590 – Bela Vista – CEP 01314-000 - São Paulo/SP
Tel: (11) 3293-2269 - Site: www.isaude.sp.gov.br
E-mail: cepis@isaude.sp.gov.br - E-mail: smsaliva@isaude.sp.gov.br*



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

Av. Dr. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 2627-9585 - Fax: (55) (011) 2627-9505
ceuaib@butantan.gov.br

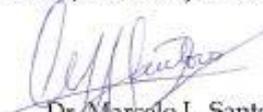
CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Expressão e caracterização de uma esfingomielinase D do veneno da aranha *Loxosceles gaucho* e de seus de peptídeos gerados por ação de MMPS", protocolo nº 886/12, sob a responsabilidade de Geraldo Santana Magalhães - que envolve a criação e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica - está de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009 e de normas complementares, bem como está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 7/3/12.

We certify that the research entitled "Expression and characterization of a sphingomyelinase D from *Loxosceles gaucho* spider venom and its peptides generated by the action of MMPS", protocol number 886/12, under the responsibility of Geraldo Santana Magalhães - which involves the breeding and/or use of animals belonging to phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research - is in agreement with Brazilian laws for use of experimental animals and the Ethical Principles in Animal Research adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation, and was approved by the ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH of BUTANTAN INSTITUTE in the meeting of 3/7/12.

Vigência do Projeto: 03/2012 - 03/2015	Nº de animais/espécie
Laboratório de Imunopatologia	35 coelhos albinos (M)

São Paulo, 9 de março de 2012


Dr. Marcelo L. Santoro
Coordenador da CEUAIB

Dedicatória:

Dedico esse trabalho ao meu pai, meu anjo da guarda, que sempre me apoiou, me ensinou a gostar de estudar e que sempre foi e será a razão de continuar correndo atrás dos meus sonhos...

Agradecimentos:

Ao meu querido orientador, meu chefe, meu amigo, Geraldo Santana Magalhães por dividir comigo seu conhecimento, sua sabedoria, sua paciência e tantas e tantas horas discutindo resultados, planejando experimentos ou simplesmente conversando sobre a vida. A você Geraldo, meu muito obrigado pela oportunidade e por todos os ensinamentos que não se restringem somente a vida acadêmica, mas sim pra vida toda...

À todos os meus “patinhos”: Tamíres, Daniel, Lara, Isa, Paula, Raquel, Rafaela, Lhiri, Jéssica, Marjory, Kelly, e tantos outros... Obrigada por terem paciência comigo, por serem sempre prestativos e estarem sempre ao meu lado em todos os momentos... Ajudar vocês todos dias, apesar de cansativo, só me mostra a cada dia que eu faço o que gosto e faço por vocês!

À Dra. Juciane Castro pelas contribuições imensas, pelas discussões, pelo conhecimento dividido, por compartilharmos segredos e conquistas... Juca, querida, essa amizade é coisa que nem dá pra escrever, obrigada por você ser do jeitinho que é, e por aparecer na minha vida do jeito que apareceu! Nada é por acaso, mas você já sabe disso...

À Dra. Jacy Gameiro pela amizade desde os tempos de faculdade, pelo apoio em todos os momentos de dificuldade (tantos patês de salsicha!!!), acompanhou de perto toda minha trajetória acadêmica e sempre insistir no meu retorno... Tudo isso só foi possível porque você é teimosa e acabou me convencendo!!! Obrigada de coração!!!

À Dra. Ana Moura pelas valiosas correções, e por seu apoio desde o meu primeiro dia de trabalho para que eu ingressasse no mestrado... Muito obrigada por tudo!!!

Às minhas queridas amigas-irmãs Regiane e Mariane pela amizade de tantos anos, por estarem sempre comigo nos bons e maus momentos... Por insistentemente me fazerem parar de vez em quando... Não sei o que seria do meu mundo sem a amizade de vocês...

À minha amiga-irmã de mais de uma década Lygia, por ser minha confidente mais paciente, por vir sempre tomar conta de mim e da minha casa nos momentos de sufoco, por ser minha irmã por tantos anos que mesmo distantes estamos sempre juntas rindo, chorando e vivendo essa amizade que já faz parte da minha história...

À minha família querida que sempre compreendeu minhas ausências, sempre me deu todo suporte e por serem sempre meu porto seguro... A minha mãe guerreira Irene, que sempre disse que eu estudo demais!!!

À meus companheiros de jornada, meus filhos peludos, que mesmo sem saber me ajudam todos os dias com seu carinho...

À todos os funcionários do Laboratório de Imunopatologia pela amizade, pela força, por estarem comigo no mesmo barco da lida diária... Muito obrigada!

À todos os pesquisadores e alunos do Laboratório de Imunopatologia pelo carinho, por todas as contribuições e por fazerem eu me sentir parte de uma grande família...

Às secretárias da Pós-Graduação em Toxinologia, Kimie e Rosana, por toda a ajuda, pela dedicação e por tornarem nossa vida menos difícil...

À Dra. Kátia Cristina Barbaro por proporcionar a oportunidade de fazer parte desse projeto e por todas as contribuições...

À todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização do meu trabalho, meu muito obrigada!

Este trabalho teve apoio financeiro da FAPESP: PROCESSO FAPESP N. 2011/23590-2 e PROCESSO FAPESP N. 2011/23273-7.

“Não é por julgarmos uma coisa boa que nos esforçamos por ela, que a queremos, que a apetecemos, que a desejamos, mas, ao contrário, é por nos esforçarmos por ela, por querê-la, por apetecê-la, por desejá-la, que a julgamos boa.”

Baruch Spinoza

Resumo

Caporrino, M. C. **Clonagem e expressão de uma fosfolipase D recombinante do veneno da aranha *Loxosceles gaucho***. 80 f. Dissertação (Toxinologia). Instituto Butantan, São Paulo, 2014.

O veneno de aranhas *Loxosceles* compreende uma mistura de diversas toxinas que induz uma intensa reação inflamatória local, promove lesão dermonecrótica, agregação plaquetária, anemia hemolítica e insuficiência renal aguda em casos raros. Entre as várias toxinas encontradas no veneno, as fosfolipases D (FLD), também denominadas de toxinas dermonecróticas, são as mais importantes e mais bem estudadas, uma vez que albergam os principais efeitos observados no loxoscelismo. Apesar de sua importância, a análise biológica de FLDs é dificultada pela quantidade reduzida de veneno obtido. Assim, a estratégia de clonagem e expressão destas toxinas, na forma recombinante em sistema bacteriano, tem sido amplamente empregada e é atualmente uma abordagem muito importante para obter grande quantidade destas toxinas no sentido de estudar os seus efeitos biológicos. Contudo, apesar da importância do veneno de *Loxosceles gaucho*, até o presente momento nenhuma FLDs desta espécie foi isolada, clonada ou expressa na forma recombinante. Deste modo, mostramos neste trabalho, a clonagem do cDNA que codifica uma FLD da glândula de veneno de *L. gaucho* em vetor pAE. A proteína recombinante, denominada de LgRec1, foi produzida em *E. coli* e purificada por IMAC, resultando em uma banda única com massa molecular de 32KDa e rendimento de 3,2 mg/L cultura. Análises de atividade biológica desta toxina mostrou que ela é capaz de promover reação local (edema, eritema, equimose e palidez) e dermonecrose; induzir agregação plaquetária; hidrolizar esfingomielina e promover hemólise. Testes de neutralização utilizando anticorpos produzidos em coelhos contra a LgRec1, mostraram-se eficazes em inibir a reação local (~ 65%) e a dermonecrose (~ 100%) promovidas pelo veneno, indicando um potencial para o uso destes anticorpos na neutralização dos efeitos tóxicos do veneno total. Dessa forma, os dados apresentados neste trabalho poderão colaborar para a compreensão dos mecanismos de ação das FLDs no envenenamento provocado pelas aranhas do gênero *Loxosceles*.

Palavras-chave: *Loxosceles gaucho*, fosfolipase D recombinante, antissoros, atividades biológicas, ensaios imunossorológicos.

Abstract

Caporrino, M. C. **Cloning and expression of a recombinant phospholipase D from *Loxosceles gaucho* spider venom.** 80 p. Master thesis (Toxinology). Instituto Butantan, São Paulo, 2014.

The venom of the *Loxosceles* sp spiders comprises a mix of diverse toxins which results in an intense local inflammatory reaction, promotes dermonecrotic skin lesion, platelet aggregation, hemolytic anemia, and acute renal failure in rare cases. Among the toxins found in the venom, the phospholipases D (PLDs) also called dermonecrotic toxins, are the most important and well-studied proteins in the venom, since they assemble the main effects observed in loxoscelism. Despite the importance of these toxins, the biological analyses of PLDs are hampered by their small amount obtained in the venom. Therefore, the strategy of cloning and expression of these toxins in recombinant form in the bacterial system has been widely used and it is currently an important approach to obtain a huge amount of these molecules and to study their biological effects. However, despite the importance of *Loxosceles gaucho* venom, until now, any PLDs from this specie was isolated, cloned or expressed in a recombinant form. Thereby, in this work, we showed the cloning of cDNA that codifies a PLD from *L. gaucho* venom gland in pAE plasmid. The recombinant protein, named LgRec1 was produced in *E. coli* and then purified by IMAC, that resulted in a single band with molecular weight of 32kDa and a yield of 3.2 mg/L for culture medium. Analyzes of biological activity of this toxin showed that is able to promote local reaction (edema, erythema, bruising and pallor) and dermonecrosis; induce platelet aggregation; hydrolyze sphingomyelin and cause hemolysis. Neutralization assays using antibodies produced in rabbits to LgRec1 showed to be effective in inhibiting the local reaction (~ 65%) and dermonecrosis (~ 100%) evoked by whole venom, this indicates a potential use of these antibodies in neutralizing the toxic effects of envenomation. Therefore, the data presented in this work could help us understand the mechanism of action of PLDs in the envenomation caused by *Loxosceles* spider genus.

Key-words: *Loxosceles gaucho*, recombinant phospholipase D, antiserum, biological activities, immunosorological assays.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3'UTR - A região 3' não traduzida

ADP - Adenosina difosfato

APMA - *p-aminophenylmercuric acetate* (acetato de mercúrio p-aminofenil)

ATP - Adenosina trifosfato

BCA - Ácido bicinconínico

BSA - *Bovine serum albumin* (Soro albumina bovina)

C1P - Ceramida 1-fosfato

cDNA - DNA complementar

CGEN - Conselho de Gestão do Patrimônio Genético

CPPI - Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos

DNA - Ácido desoxirribonucléico

dNTPs - Desoxirribonucleotídeos fosfatados

DTT - Ditioneitol

ELISA - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (Ensaio Imunoabsorvente de ligação enzimática)

FLDs - Fosfolipases D

His - Histidina

i.d. - Intradérmica

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis

IMAC - *Immobilized metal affinity chromatography* (Cromatografia de afinidade por metal imobilizado)

INPI - Instituto Nacional de Propriedade Industrial

IPTG - Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranósido

LALPs - Astacina-*like* metaloproteinase

LB - Lúria Bertani

LPA - Ácido lisofosfatídico

LPC - Lisofosfatidilcolina

MMPs - Metaloproteinases de matrix

mRNA - RNA mensageiro

NMR - *Nuclear magnetic resonance* (Ressonância nuclear magnética)

PBS - *Phosphate Buffered Saline* (Tampão salina-fosfato)

PCR - *Polimerase chain reaction* (Reação em cadeia de polimerase)

PRP - Plasma rico em plaquetas

RACE - *Rapid Amplification of cDNA Ends* (Amplificação rápida de término de cDNA)

RNA - Ácido ribonucléico

SAAr - soro antiaracnídico

SALox - soro antiloxoscélico

SDS-PAGE - *SDS-polyacrylamide gel electrophoresis* (Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS)

SEM - *Standard error of the mean* (Erro padrão da média)

SINAN - Sistema de Informação de Agravo de Notificação

SmaseD – Esfingomielinase D

SNR - *Serum Normal Rabbit* (Soro normal de coelho)

TAE - Tampão Tris-Acetato

TBS - *Tris Buffer Saline* (Tampão salina-Tris)

X-Gal – *5-bromo-4-chloro-indolyl- β -D-galactopyranoside*

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	20
1.1	Aranhas do gênero <i>Loxosceles</i>	20
1.2	Loxoscelismo	21
1.3	Epidemiologia e tratamento	24
1.4	Veneno de <i>Loxosceles</i> sp	27
1.5	Fosfolipase-D e suas isoformas recombinantes	30
2.	OBJETIVOS	36
3.	MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1	Animais e obtenção de veneno	37
3.2	Extração de RNA total a partir de glândulas de veneno	37
3.3	Obtenção dos cDNAs referentes a possíveis FLDs	37
3.4	Amplificação dos cDNAs e clonagem	38
3.5	Sequenciamento	39
3.6	Clonagem em vetor pAE e expressão da proteína recombinante	39
3.7	Purificação da proteína recombinante por IMAC	41
3.8	SDS-PAGE	41
3.9	Reação local e atividade dermonecrótica	42
3.10	Atividade esfingomielinásica	42
3.11	Agregação plaquetária	43

3.12	Avaliação da atividade hemolítica (direta e indireta)	43
3.12.1	Obtenção de soro para o teste hemolítico.....	44
3.12.2	Hemácias	44
3.12.3	Atividade hemolítica	44
3.13	Anticorpos anti-veneno e anticorpos monoclonais	45
3.14	ELISA	45
3.15	Western Blotting	45
3.16	Propriedades de neutralização anti-LgRec1 contra veneno total de <i>L. gaucho</i>	46
3.17	Análises estatísticas	47
4.	RESULTADOS	48
4.1	Extração de RNA total das glândulas de veneno de <i>L. gaucho</i>	48
4.2	Reação de PCR dos cDNAs utilizando primer randômico de FLDs	48
4.3	Análise das clonagens por PCR	50
4.4	Sequenciamento	50
4.5	Análises de alinhamento múltiplo de LgRec1	52
4.6	Expressão da LgRec1 em vetor bacteriano	54
4.7	Purificação da proteína recombinante LgRec1	55
4.8	Reação local e atividade dermonecrótica	56
4.9	Atividade esfingomielinásica	57
4.10	Agregação plaquetária	57
4.11	Atividade hemolítica	59
4.12	Análise da capacidade de anticorpos anti-LgRec1 reconhecerem componentes do veneno de <i>L. gaucho</i>	59

4.13	<i>Western blotting</i>	60
4.14	Propriedades neutralizantes de anti-LgRec1 contra o veneno de <i>L. gaucho</i>	62
5.	DISCUSSÃO	64
6.	CONCLUSÕES	68
	REFERÊNCIAS	69
	ANEXOS	80

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aranhas do gênero *Loxosceles*

As aranhas pertencem à ordem Aranea, uma das maiores da classe Arachnida, com cerca de 43.000 espécies descritas. Estão distribuídas em 112 famílias e quase 4 mil gêneros (PLATNICK, 2013). Esses animais são caracterizados por possuírem o corpo segmentado em duas regiões: abdomen e cefalotórax (ou prossoma), que consiste em cabeça e tórax fundidos. As peças bucais são adaptadas para prender a presa e sugar seu conteúdo líquido e consistem em um par de pedipalpos, que tem função sensorial e um par de quelíceras, localizado em frente à abertura bucal. As quelíceras consistem em um grande segmento terminado em ferrão, onde se encontra a abertura para inoculação de veneno (FOELIX, 2011; SAÚDE, 2013).

A maioria das aranhas produz veneno em suas glândulas de veneno que é utilizado para paralisar suas presas além de representar um importante e mecanismo de defesa (DA SILVA *et al.*, 2004; SAÚDE, 2013). Porém, apesar do grande número de representantes, poucos são os gêneros de aranhas de importância médica, sendo três deles encontrados no Brasil e associados a acidentes, tal fato é devido à adaptação destas ao ambiente humano (ISBISTER e FAN, 2011; SAÚDE, 2013).

A família Sicariidae, com 127 espécies descritas, compreende os gêneros *Sicarius* e *Loxosceles* (PLATNICK, 2013). As aranhas do gênero *Loxosceles* (Figura 1A), conhecidas popularmente como aranhas-marrons, são animais de corpo pequeno alcançando, quando adultos, aproximadamente 15 mm de corpo e cerca de 30 mm incluindo as patas (DA SILVA *et al.*, 2004). Sua coloração varia de marrom claro a marrom escuro, com um desenho característico no cefalotórax que se assemelha a um violino. Possuem seis pares de olhos, dispostos em 3 pares em formato de “U”, sendo uma díade anterior e duas laterais (Figura 1B) (BONNET, 1996; TAMBOURGI *et al.*, 2010). Esse tipo de organização dos olhos tem sido

descrito como a melhor maneira de identificar essas aranhas (SWANSON e VETTER, 2006).

Possuem um ciclo de vida longo, atingindo a maturidade com um ano e podendo viver por cerca de três anos. Suportam bem mudanças climáticas e longos períodos de fome (SAMS *et al.*, 2001; DA SILVA *et al.*, 2004; VETTER, 2008). São aranhas de hábitos noturnos, sedentárias, não agressivas, fazendo uma teia difusa que serve para perceber a presença da presa. Não são aranhas sociais mas, são capazes de reconhecimento de outros indivíduos da mesma espécie o que reduz as interações agressivas e permite a existência de diversas aranhas no mesmo ambiente (VETTER, 2008).

Por serem animais sinantrópicos, se adaptaram perfeitamente ao ambiente doméstico humano, preferindo esconderem-se atrás ou embaixo de móveis, quadros, rodapés, caixas ou objetos armazenados em depósitos, garagens, porões, e outros ambientes com pouca iluminação e movimentação. Os acidentes ocorrem em sua maioria, quando essas aranhas são comprimidas contra o corpo, principalmente no ato de se vestir ou ao se deitar a cama (FUTRELL, 1992; SWANSON e VETTER, 2006; TAMBOURGI *et al.*, 2010; SAÚDE, 2013).

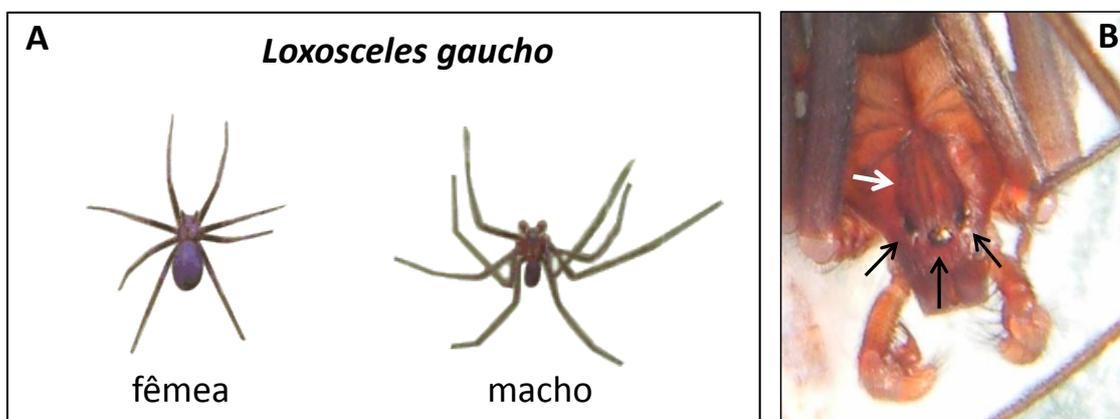


Figura 1 - Espécimes de *Loxosceles*. (A) Espécimes adultos *Loxosceles gaucho* fêmea e macho; (B) *Loxosceles gaucho* em destaque a marca em forma de violino no dorso do cefalotórax (seta branca) e seis olhos dispostos em díades (setas pretas). Fotos: Denise Maria Candido

1.2 Loxoscelismo

Os primeiros registros científicos de que aranhas do gênero *Loxosceles* poderiam provocar acidentes datam do final do século XIX na América do Norte, enquanto os registros sobre a associação entre as reações cutâneas e o acidente provocado por essas aranhas ocorreram em 1929. Na América do Sul os registros dessa associação surgiram inicialmente no Chile, por volta de 1930, e em seguida no Peru, Brasil, Argentina e Uruguai (FUTRELL, 1992; SAMS *et al.*, 2001; VETTER, 2008; ISBISTER e FAN, 2011).

O acidente causado pela picada de aranhas marrons é denominado loxoscelismo e está associado a uma série de sintomas clínicos, entre eles, uma lesão necrótica típica na pele, com aumento progressivo denominado espalhamento gravitacional. A resposta inflamatória, decorrente da picada, é conhecida clinicamente como loxoscelismo cutâneo que, em casos raros, pode progredir para manifestações sistêmicas (loxoscelismo cutâneo-visceral) (DA SILVA *et al.*, 2004; PAULI *et al.*, 2006; CHAIM, *et al.*, 2011).

O loxoscelismo cutâneo é o mais frequente e a picada é praticamente imperceptível com rara lesão imediata evidente. Os primeiros sintomas são dor leve, edema e eritema. A progressão da lesão local ocorre lentamente e por essa razão geralmente o diagnóstico é feito entre 12–24 h após o acidente onde é observado um edema doloroso endurecido, áreas de equimose e isquemia irregular (placa marmórea) e em alguns casos bolhas com conteúdo seroso ou hemorrágico. Poucos dias após o acidente pode-se observar uma grande e profunda necrose presente na maioria dos casos. Com o passar dos dias, essa lesão cutânea é delimitada e adquire uma escara com bordas definidas. A Figura 2 apresenta fotos ilustrativas da progressão do loxoscelismo cutâneo. A recuperação total do tecido pode levar semanas ou meses dependendo da extensão da lesão (FUTRELL, 1992; ISBISTER e FAN, 2011). A severidade do acidente geralmente está relacionada a características do paciente (idade, local da picada, características genéticas) bem como peculiaridades relacionadas à aranha como a quantidade de veneno inoculada, estágio de desenvolvimento, sexo e espécie (TAMBOURGI *et al.*, 2004; TAMBOURGI *et al.*, 2010).

O loxoscelismo sistêmico, ou cutâneo-visceral, é menos comum que a forma cutânea, porém é a mais grave. Além do comprometimento cutâneo, observam-se manifestações clínicas em virtude de hemólise intravascular, como anemia, icterícia e hemoglobinúria, que ocorrem nas primeiras 24 horas após o acidente. Esta forma

é descrita com frequência variável de 1% a 13% dos casos, dependendo da região e da espécie da aranha envolvida. Os casos graves podem evoluir para insuficiência renal aguda, de etiologia multifatorial sendo a principal causa de óbito no loxoscelismo, uma vez que os acidentes provocados pela espécie *L. laeta* apresentam maior letalidade com 1,5% dos casos (SAÚDE, 2001).

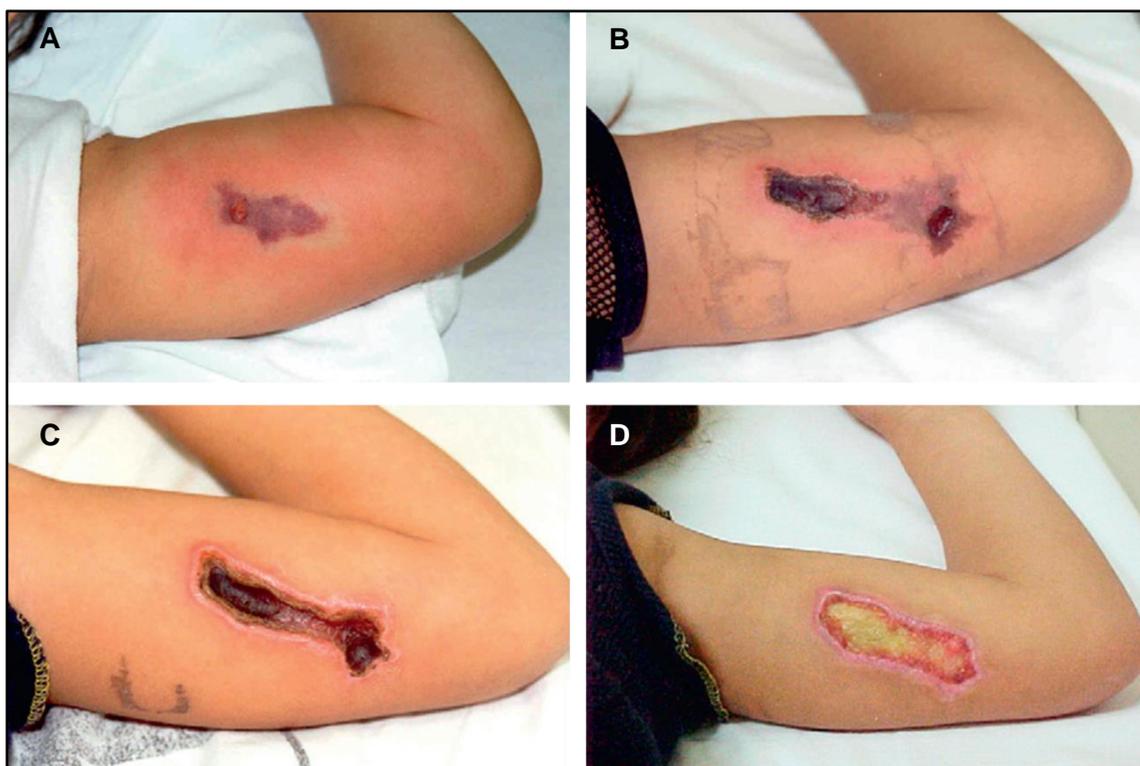


Figura 2 - Progressão de loxoscelismo cutâneo de paciente picado em casa enquanto vestia uma blusa. Ulceração e necrose no dia 1 (A), dia 9 (B) dia 16, (C) e dia 25 (D).
Fonte: ISBISTER, G.K.; FAN, H.W., 2011. Foto: Ceila M. S. Málaque

Os efeitos observados no loxoscelismo ocorrem devido a um processo multifatorial que envolve a degradação de componentes da matriz extracelular por toxinas constituintes do veneno, além de danos na membrana de células endoteliais, epiteliais e plaquetas (PAIXÃO-CAVALCANTE *et al.*, 2006; CHAIM, *et al.*, 2011; TAVARES *et al.*, 2011). Essa cascata de eventos leva a obstrução de pequenos vasos, hemorragia e liberação de mediadores inflamatórios que acarretam na infiltração de leucócitos polimorfonucleares no local da inoculação do veneno (TAMBOURGI *et al.*, 2000; VEIGA *et al.*, 2001; TAMBOURGI *et al.*, 2005).

1.3 Epidemiologia e tratamento

As espécies de *Loxosceles* são distribuídas mundialmente em regiões de clima temperado e tropicais (Figura 3). Das mais de 100 espécies de *Loxosceles* descritas, aproximadamente 50 são nativas das Américas do Norte e Central e 33 são nativas da América do Sul (VETTER, 2008; PLATNICK, 2013). Na América do Norte *L. reclusa* e *L. deserta* são endêmicas e as principais responsáveis pelos acidentes registrados (HOGAN *et al.*, 2004). No Brasil estão descritas 12 espécies: *L. adelaida*, *L. amazonica*, *L. anomala*, *L. chapadensis*, *L. gaucho*, *L. hirsuta*, *L. immodesta*, *L. intermedia*, *L. laeta*, *L. niedeguidonae*, *L. puertoj*, e *L. similis* (PLATNICK, 2013). Apesar do grande número de espécies descritas, a maioria vive em ambiente natural; as três espécies que melhor adaptaram-se ao ambiente urbano (*L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta*) estão relacionadas como agentes do loxoscelismo (VETTER, 2008). A *L. laeta* é distribuída por toda América do Sul, a *L. intermedia* é responsável por acidentes no Brasil e Argentina e *L. gaucho* relacionada a acidentes somente no Brasil (ISBISTER e FAN, 2011). Devido ao caráter sinantrópico dessas aranhas, outras espécies de *Loxosceles* podem começar a colonizar ambientes urbanos como o caso isolado relatado para *L. anomala*, na cidade de Campinas (BUCARETCHI *et al.*, 2010).

As aranhas do gênero *Loxosceles* são os agentes da forma mais grave de araneísmo no Brasil, sendo que o loxoscelismo representou cerca de 31% dos 26285 casos de acidentes com aranhas diagnosticados e notificados ao SINAN-MS no ano de 2011 (SAÚDE, 2013). No ano de 2012 foram notificados 7.434 casos de loxoscelismo (Figura 4), onde os acidentes se concentraram notadamente nas regiões Sul e Sudeste do país (SAÚDE, 2013). Apesar destes dados é difícil saber o real número de acidentes, uma vez que nem todos resultam em lesão e o agente causador raramente é identificado (HOGAN, *et al.*, 2004).

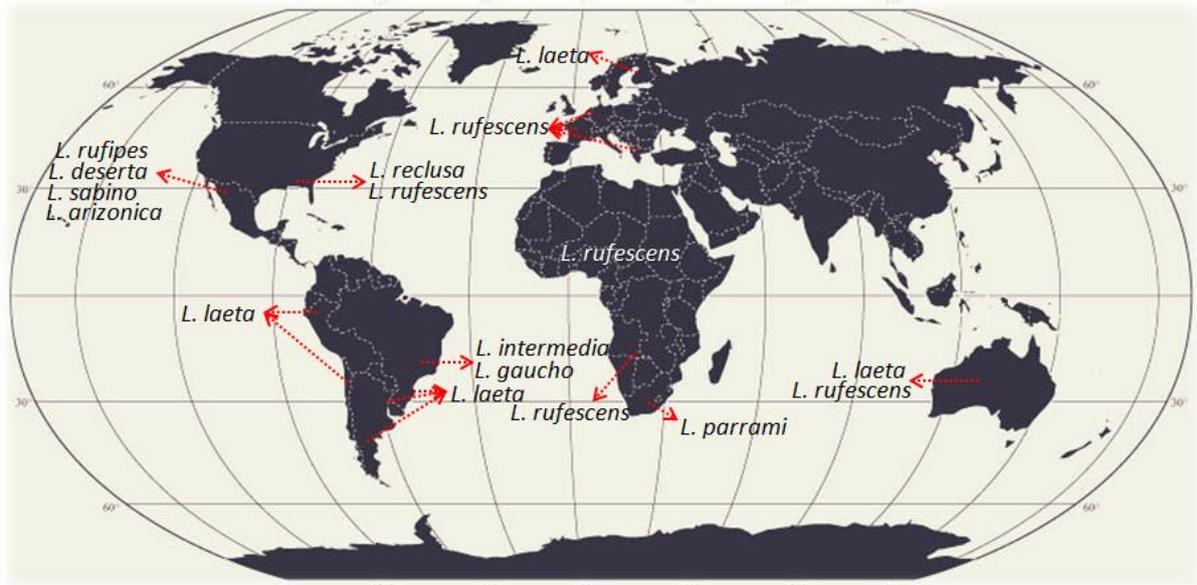


Figura 3 – Distribuição mundial das espécies de *Loxosceles* de importância médica. (adaptado de HOGAN *et al.*, 2004); VETTER, 2008; PLATNICK, 2013.

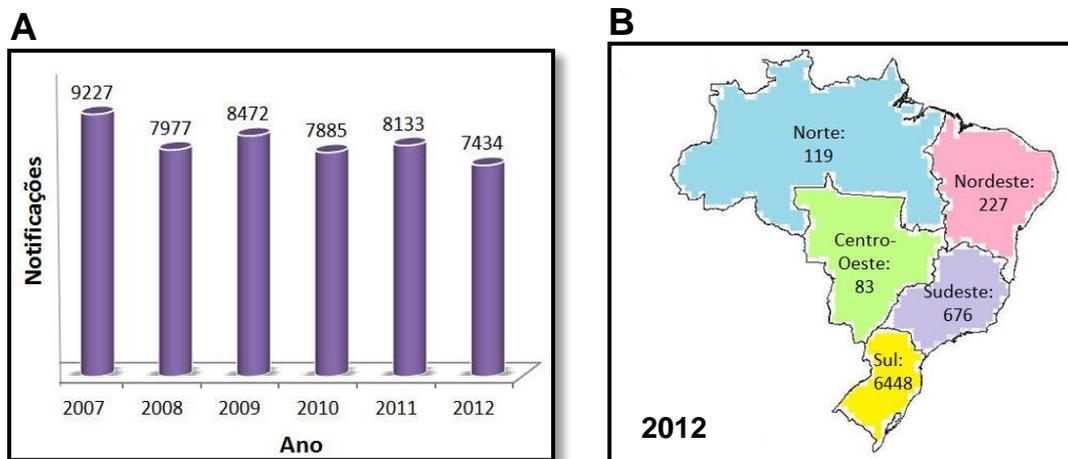


Figura 4 – Notificação dos casos de loxoscelismo no Brasil. (A) Notificação anual dos casos de acidentes por *Loxosceles* sp (2007-2012); (B) Distribuição dos casos de acidentes notificados por *Loxosceles* no ano de 2012 por região no Brasil. Fonte: Ministério da Saúde/SVS-SINAN.

Málaque *et al.* (2002) analisando 359 casos de loxoscelismo, acompanhados no Hospital Vital Brasil nos anos de 1985 a 1996, observaram que 73% dos acidentes ocorriam em áreas urbanas, entre os meses mais quentes do ano e que 42% dos acidentes ocorriam durante o ato de se vestir. Os acidentes com aranha marrom ocorrem quando estas são comprimidas contra o corpo, por isso cuidados com vestimentas e roupas de cama podem ajudar na prevenção de acidentes em áreas endêmicas (FUTRELL, 1992; SEZERINO *et al.*, 1998; MÁLAQUE *et al.*, 2002).

Não existe um consenso mundial sobre o tratamento para os casos de loxoscelismo. No Brasil, a terapia mais empregada é a aplicação de soro antiaracnídico (SAAr) ou antiloxoscélico (SALox), associado ao uso de corticóides (GUILHERME, *et al.*, 2001; SAÚDE, 2001). Esses soros poliespecíficos produzidos pelo Instituto Butantan e pelo CPPI (Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos) e são compostos da porção F(ab')₂ de imunoglobulinas obtidas por meio da imunização de cavalos com um complexo de veneno total proveniente das espécies *Loxosceles gaucho*, *Phoneutria nigriventer* e *Tityus serrulatus* (SAAr) ou a partir do veneno de *L. intermedia*, *L. laeta* e *L. gaucho* (SALox) (HOGAN *et al.*, , 2004; PAULI *et al.*, 2009). As recomendações para utilização do soro SAAr ou SALox estão descritas na Tabela 1.

Além da soroterapia têm sido utilizados analgésicos (prednisona ou dapsona), anti-histamínicos e antibióticos para prevenir o aparecimento de infecção secundária (SAÚDE, 2001; DA SILVA *et al.*, 2004). Também é indicado repouso e compressas com gelo para minimizar a inflamação, inibir a ação enzimática e a migração gravitacional (SAMS *et al.*, 2001; VETTER, 2008).

Tabela 1 - Acidentes por aranhas do gênero *Loxosceles*. Classificação quanto à gravidade, manifestações clínicas, tratamento geral e específico.

Gravidade	Manifestações clínicas	Tratamento
Leve	Aranha identificada, lesão característica, ausência de comprometimento sistêmico.	Sintomáticos: <ul style="list-style-type: none"> ▪ Analgésico ▪ Anti-inflamatório local ▪ Acompanhamento até 72 h após picada*
Moderado	Independentemente da identificação do agente, lesão sugestiva ou característica, manifestações sistêmicas inespecíficas (exantema, febre), ausência de hemólise.	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Soroterapia: cinco ampolas de SAAr IV ou SALox e/ou ▪ Prednisona: adultos 40 mg/dia; crianças 1 mg/kg/dia durante cinco dias
Grave	Lesão característica, manifestações clínicas e/ou evidências laboratoriais de hemólise intravascular.	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Soroterapia: dez ampolas de SAAr IV ou SALox e ▪ Prednisona: adultos 40 mg/dia; crianças 1 mg/kg/dia durante cinco dias

*Pode haver mudança de classificação nesse período.

SAAr: Soro Antiaracnídico; SALox: Soro Antiloxoscélico.

Fonte: Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos, 2001. Ministério da Saúde, Brasil.

1.4 Veneno de *Loxosceles* sp

O veneno das aranhas marrons é uma mistura complexa rica em componentes proteicos tais como: fosfatases alcalinas, hialuronidases, peptidases, 5-ribonucleotidases fosfohidrolases, metaloproteinases, serino proteases, nucleosídeos sulfatados, toxinas inseticidas e fosfolipases-D (FEITOSA *et al.*, 1998; VEIGA *et al.*, 2001; DA SILVA *et al.*, 2004; DE CASTRO *et al.*, 2004; SCHROEDER *et al.*, 2008). A tabela 2 mostra uma compilação resumida das toxinas descritas para espécies de *Loxosceles*.

Tabela 2 - Visão geral das famílias de toxinas presentes no veneno do gênero *Loxosceles*.

Toxinas	Características e ações descritas
<p>Fosfolipase D (Membros da família SicTox) (30-35 kDa)</p>	<p>Diversas isoformas com várias atividades, tais como:</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Dermonecrose (Young e Pincus, 2001; Kalapothakis <i>et al.</i>, 2002; Cunha <i>et al.</i>, 2003; Tambourgi <i>et al.</i>, 2004; Barbaro <i>et al.</i>, 2005; Chaim <i>et al.</i>, 2006; Da Silveira <i>et al.</i>, 2006; Da Silveira <i>et al.</i>, 2007; Ribeiro <i>et al.</i>, 2007; Appel <i>et al.</i>, 2008) ▪ Hidrólise de lipídios (Ramos-Cerrillo <i>et al.</i>, 2004; Tambourgi <i>et al.</i>, 2004; Lee e Lynch, 2005; Murakami <i>et al.</i>, 2006; Chaim, Da Silveira, <i>et al.</i>, 2011) ▪ Hemólise (Tambourgi <i>et al.</i>, 1995; Fernandes Pedrosa Mde <i>et al.</i>, 2002; Ribeiro <i>et al.</i>, 2007; Chaves-Moreira <i>et al.</i>, 2009) ▪ Agregação plaquetária <i>in vitro</i> (Da Silveira <i>et al.</i>, 2006; Da Silveira <i>et al.</i>, 2007; Appel <i>et al.</i>, 2008) ▪ Infiltração de células inflamatórias (Lee e Lynch, 2005; Chaim <i>et al.</i>, 2006; Da Silveira <i>et al.</i>, 2006; Da Silveira <i>et al.</i>, 2007) ▪ Edema (Ribeiro <i>et al.</i>, 2007; Appel <i>et al.</i>, 2008) ▪ Distúrbios renais (Chaim <i>et al.</i>, 2006; Kusma <i>et al.</i>, 2008) ▪ Letalidade (Barbaro <i>et al.</i>, 1996; Ribeiro <i>et al.</i>, 2007; Appel <i>et al.</i>, 2008; Kusma <i>et al.</i>, 2008) ▪ Citotoxicidade <i>in vitro</i> (Chaim <i>et al.</i>, 2006; Kusma <i>et al.</i>, 2008; Chaim, Da Silveira, <i>et al.</i>, 2011) ▪ Ativação de citocinas (Barrett, Romine-Jenkins e Blick, 1993; Tambourgi <i>et al.</i>, 1995; Van Meeteren <i>et al.</i>, 2004; Dragulev <i>et al.</i>, 2007)
<p>Peptídeos inseticidas (5-8 kDa)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Membros da família LiTx (De Castro <i>et al.</i>, 2004; Gremski <i>et al.</i>, 2010) ▪ Peptídeos Magi 3 (De Castro <i>et al.</i>, 2004; Fernandes-Pedrosa Mde <i>et al.</i>, 2008; Gremski <i>et al.</i>, 2010) ▪ LiTx: letal para <i>S. frugiperda</i> (De Castro <i>et al.</i>, 2004) ▪ LiTx3: provável ação em canais para Na⁺ (De Castro <i>et al.</i>, 2004)
<p>Metaloproteinases (28-35 kDa)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Metaloproteinase tipo astacina (LALPs) (Da Silveira <i>et al.</i>, 2007; Trevisan-Silva <i>et al.</i>, 2010) ▪ Presente em diferentes venenos de <i>Loxosceles</i> spp. (Young e Pincus, 2001; Da Silveira <i>et al.</i>, 2002; Barbaro <i>et al.</i>, 2005; Fernandes-Pedrosa Mde <i>et al.</i>, 2008; Gremski <i>et al.</i>, 2010) ▪ Atividade sobre gelatina, fibronectina, fibrinogênio e entactina (Stocker <i>et al.</i>, 1995; Feitosa <i>et al.</i>, 1998; Da Silveira <i>et al.</i>, 2002; Da Silveira <i>et al.</i>, 2007)
<p>Hialuronidases (41-43 kDa)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Classificadas como endo-beta-N-acetil-d-hexosaminidases hidrolases (Da Silveira <i>et al.</i>, 2007)

	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Atividade sobre ácido hialurônico e sulfato de condroitina (Barbaro <i>et al.</i>, 2005; Da Silveira <i>et al.</i>, 2007) ▪ Presente em diferentes venenos de <i>Loxosceles</i> spp. (Young e Pincus, 2001; Barbaro <i>et al.</i>, 2005; Da Silveira <i>et al.</i>, 2007; Fernandes-Pedrosa Mde <i>et al.</i>, 2008; Dos Santos <i>et al.</i>, 2009; Gremski <i>et al.</i>, 2010)
Serino proteases (85-95 kDa)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Atividade gelatinolítica (Veiga <i>et al.</i>, 2000) ▪ Ativado <i>in vitro</i> por tripsina (Veiga <i>et al.</i>, 2000) ▪ Presente no veneno de <i>L. intermedia</i> e <i>L. laeta</i> (Fernandes-Pedrosa Mde <i>et al.</i>, 2008; Gremski <i>et al.</i>, 2010)
Inibidor de serino/cisteína proteases (MM N.D.)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Pertencem à família Serpina (Gremski <i>et al.</i>, 2010) ▪ Identificadas em transcriptomas e proteomas de <i>Loxosceles</i> spp. (Fernandes-Pedrosa Mde <i>et al.</i>, 2008; Dos Santos <i>et al.</i>, 2009; Gremski <i>et al.</i>, 2010) ▪ Pode está relacionada com processos de coagulação, fibrinólises e inflamação (Fernandes-Pedrosa Mde <i>et al.</i>, 2008)
TCTP (<i>translationally controlled tumor protein</i>) (~46 kDa)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Identificados em vários venenos de <i>Loxosceles</i> spp. (Fernandes-Pedrosa Mde <i>et al.</i>, 2008; Gremski <i>et al.</i>, 2010) ▪ Funções prováveis: fator de liberação de histamina, em ambiente extracelular, vários papéis intracelulares, tais como, desenvolvimento embrionário, proliferação celular, estabilização de microtubulos (Bommer e Thiele, 2004)
Tipo-Lectina (MM N.D.)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Prováveis características: ligação com carboidrato; envolvimento em organização de matriz extracelular, endocitose, ativação do complemento, etc (Fernandes-Pedrosa Mde <i>et al.</i>, 2008)
Fosfatase alcalina (MM N.D.)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Degradação de substrato sintético p-fosfato nitrofenil (Sales e Santoro, 2008)
ATPase (MM N.D.)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Hidrolise de ATP (Sales e Santoro, 2008)

MM N.D.: Massa molecular não determinada.

Modificado de CHAIM *et al.*, 2011.

Também estão presentes nesses venenos peptídeos de baixa massa molecular, tais como neurotoxinas, peptídeos não neurotóxicos e poliaminas que são as moléculas menos estudadas do veneno de aranhas marrons. Schroeder *et al.* (2008) identificaram derivados de guanosina sulfatada no veneno de *Loxosceles* sp. Através de análises por ressonância magnética nuclear que aparentemente estão presentes no veneno de diversas superfamílias de aranhas. No entanto, a função desses componentes permanece desconhecida.

Análises proteômicas e transcriptômicas têm fornecido a identificação de metaloproteinasas no veneno de diferentes espécies de *Loxosceles*, incluindo *L. intermedia*, *L. gaucho*, *L. deserta*, *L. laeta*, e *L. reclusa*, fornecendo evidências importantes sobre as características e funcionalidade dessas moléculas (MACHADO *et al.*, 2005; FERNANDES-PEDROSA *et al.*, 2008; DOS SANTOS *et al.*, 2009; GREMSKI *et al.*, 2010).

1.5 Fosfolipase-D do veneno de *Loxosceles* e suas isoformas recombinantes

Dentre as diversas toxinas que compõem o veneno loxoscélico, as principais são as Fosfolipases D (FLDs), proteínas identificadas por estudos bioquímicos com peso molecular entre 30-35 kDa (BARBARO *et al.*, 1992). As FLDs, também denominadas toxinas dermonecróticas, são as moléculas com maior destaque nos estudos sobre o loxoscelismo. Isso se deve ao fato de que essas toxinas isoladamente são capazes de evocar os principais efeitos biológicos observados no envenenamento (CHAIM *et al.*, 2011) tais como agregação plaquetária (KURPIEWSKI *et al.*, 1981), dermonecrose (FUTRELL, 1992; TAMBOURGI, *et al.*, 1998), hemólise dependente de complemento (FORRESTER *et al.*, 1978; TAMBOURGI, *et al.*, 1998), danos aos vasos sanguíneos, nefrotoxicidade (LUCIANO *et al.*, 2004) e infiltração de polimorfonucleares (TAMBOURGI *et al.*, 2005). Estudos realizados por Tambourgi *et al.* (2005) e Paixão-Cavalcante *et al.* (2006) mostraram que as FLDs também induzem a expressão de metaloproteinasas da matriz (MMPs) 9 e 2, e que estas poderiam estar relacionadas à patogênese do loxoscelismo cutâneo, uma vez que as MMPs estão envolvidas na remodelação de muitos tecidos e órgãos e são importantes em muitos processos biológicos (BIRKEDAL-HANSEN *et al.*, 1993; CHANG e WERB, 2001).

As toxinas dermonecróticas são também denominadas de Esfingomielinasas D (SmaseD) devido à sua capacidade de hidrolisar esfingomielina gerando colina e ceramida 1-fosfato, C1P (FORRESTER, *et al.*, 1978; KURPIEWSKI *et al.*, 1981; FUTRELL, 1992; TAMBOURGI *et al.*, 1998; TAMBOURGI, *et al.*, 1998). van Meeteren *et al.* (2004) demonstraram que uma SMaseD recombinante isolada da glândula de veneno de *L. laeta* (Smase I) além de promover a hidrólise de esfingomielina, também foi capaz de hidrolisar lisofosfatidilcolina (LPC) gerando o mediador lipídico ácido lisofosfatídico (LPA). Este mediador é um fosfolípide bioativo

com efeitos específicos sobre células circulatórias e endoteliais, com capacidade de ativar plaquetas e atuar na mediação de processos de cicatrização, como a reparação vascular (SIESS, 2002). Além disso, Lee & Lynch (2005) utilizando uma SMaseD recombinante de *L. reclusa* demonstraram sua capacidade em clivar esfingomielina e LPC e também, uma ampla variedade de fosfolípidos, levando-os a sugerir a mudança de nomenclatura de SmaseD para FLD. No entanto, segundo as recomendações da IUBMB (*International Union of Biochemistry and Molecular Biology*) essa proteína está classificada bioquimicamente como esfingomielina fosfodiesterase D sob o número EC 3.1.4.41 (MOSS, 2013).

Trabalhos realizados por Cunha *et al.* (2003) e Machado *et al.* (2005) demonstraram a presença de várias isoformas das toxinas dermonecroticas nativas, chamadas de loxnecroginas no veneno de *L. gaucho*. Esses resultados também foram confirmados com o veneno de *L. intermedia* onde várias isoformas com alto grau de identidade foram clonadas e expressas em sistema bacteriano (DA SILVEIRA *et al.*, 2006; DA SILVEIRA *et al.*, 2007; KALAPOTHAKIS *et al.*, 2007; RIBEIRO *et al.*, 2007). Essas toxinas foram agrupadas em uma família e apresentam a sequência de aminoácidos muito similar, mas possuem atividades biológicas variáveis (KALAPOTHAKIS *et al.*, 2007).

Apesar dos avanços na caracterização dessas enzimas, a base do mecanismo de ação das toxinas dermonecroticas ainda não está totalmente elucidada (MACHADO *et al.*, 2005; VASSILEVSKI *et al.*, 2009). Assim, no sentido de melhor compreender a estrutura destas moléculas, Murakami *et al.* (2006) descreveram a primeira estrutura cristalográfica de uma FLD do veneno de *L. laeta* (Smase I; pdb: 1XX1), onde a análise estrutural sugeriu que a hidrólise de esfingomielina ocorre na dependência do íon metálico magnésio (Mg^{2+}) e que os aminoácidos essenciais na ligação a esse íon são estritamente conservadas entre as espécies. Além disso, essa reação ocorre através de um mecanismo ácido-base envolvendo duas histidinas presentes no sítio catalítico da enzima (His12 e His47). Dessa forma, baseando-se no alinhamento de sequências de outras FLDs, e nos dados bioquímicos e estruturais o autor agrupou as FLDs em duas classes. A classe I, que inclui a Smase I, é caracterizada por possuir uma única ponte dissulfeto na alça catalítica e um *loop* estendido na alça flexível, enquanto a classe II possui duas pontes dissulfeto na alça catalítica e não possui o *loop* estendido na alça flexível. Em outro trabalho, de Giuseppe *et al.* (2011), mostraram a estrutura cristalográfica de

uma FLD do veneno de *L. intermedia* (LiRecDT1; pdb:3RLH) que foi classificada como sendo de classe II (Figura 5).

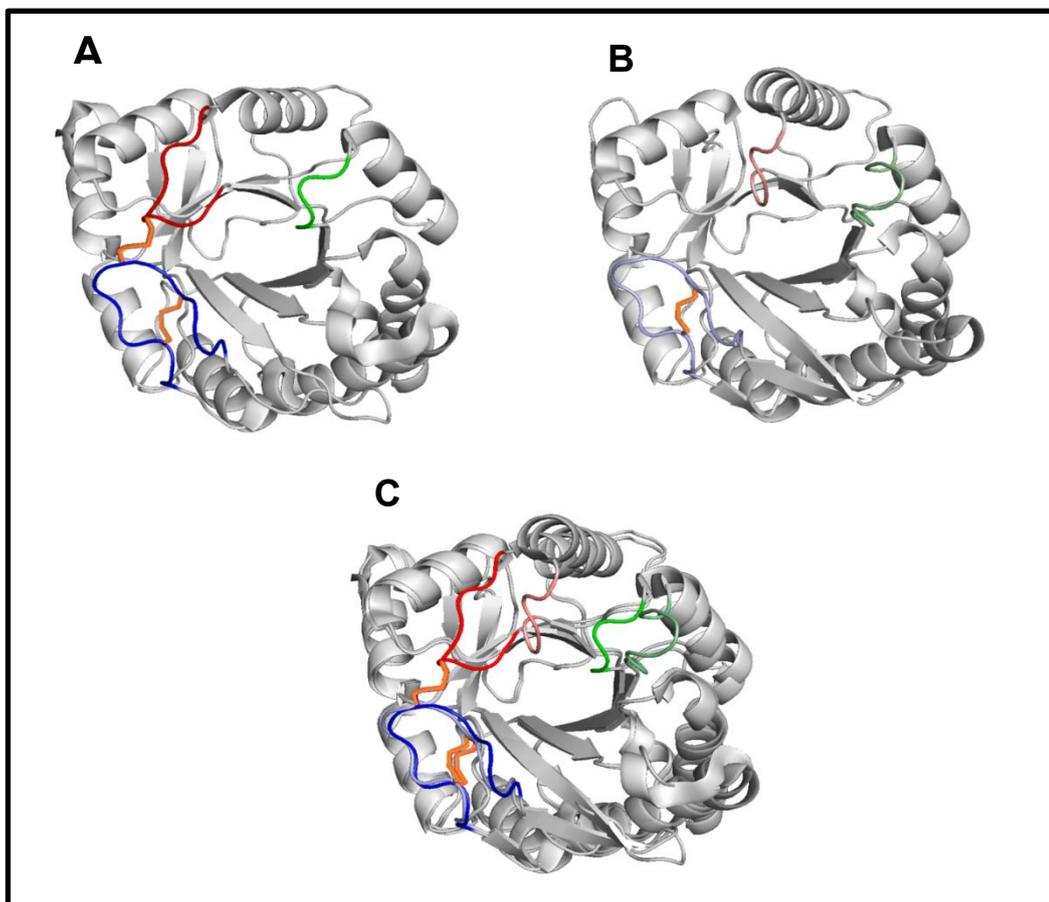


Figura 5 - Estrutura tridimensional das FLDs LiRecDT1 de *L. intermedia* e Smase I de *L. laeta*. (A) LiRecDT1 (PDB: 3LRH), indicado em azul, vermelho e verde estão as alças catalítica, flexível e variável, respectivamente. (B) Smase I (PDB: 1XX1), indicado em azul claro, vermelho claro e verde claro estão as alças catalítica, flexível e variável, respectivamente. (C) Alinhamento tridimensional da LiRecDT1 com Smase I. As pontes de sulfeto estão em laranja. Estruturas retiradas do Protein Data Bank (PDB), visualizadas e alinhadas com o programa PyMol 1.5 (<http://www.pymol.org>).

A investigação sistemática da diversidade de função e estrutura de toxinas de venenos animais é fundamental para compreender o mecanismo de ação das mesmas, contribui para o desenvolvimento de diagnóstico e tratamentos efetivos para o envenenamento (BINFORD *et al.*, 2005). No entanto, o estudo de toxinas do veneno de *Loxosceles* possui um fator limitante, a dificuldade de obtenção do veneno. Um indivíduo dessa espécie libera apenas alguns microlitros de veneno que

contém cerca de 60 µg de proteínas (SAMS *et al.*, 2001). Diante disso, a clonagem e expressão de toxinas pode ser uma ferramenta útil para o entendimento das bases do loxoscelismo.

As técnicas de biologia molecular têm viabilizado a caracterização e a expressão de diversas toxinas recombinantes (SENFF-RIBEIRO *et al.*, 2008). A obtenção de FLDs recombinantes é realizada em sistemas heterólogos baseado na síntese de cDNA a partir de mRNAs obtidos do extrato de glândula de veneno das aranhas marrons.

Os estudos com toxinas recombinantes do veneno de *Loxosceles* iniciaram-se com Fernandes-Pedrosa *et al.* (2002) que clonaram e expressaram a primeira toxina dermonecrótica recombinante funcional isolada de uma biblioteca de cDNA da glândula de veneno de *Loxosceles laeta*. Testes realizados em coelhos mostraram que esta toxina recombinante induziu uma lesão típica do loxoscelismo. Além disso, anticorpos produzidos em coelhos contra esta toxina foram capazes de promover a neutralização da reação dermonecrótica induzida pelo veneno total. Concomitantemente, trabalhos iniciados por Kalapothakis *et al.* (2002) mostraram a obtenção de uma proteína recombinante, LiD1, isolada de uma biblioteca de cDNA da glândula de veneno de *L. intermedia*. Anticorpos produzidos em coelhos contra esta toxina também foram capazes de neutralizar as atividades dermonecróticas do veneno de *L. intermedia*.

Posteriormente, outras duas isoformas de FLDs foram clonadas e expressas a partir de *L. intermedia* (TAMBOURGI *et al.*, 2004). Os autores demonstraram que essas toxinas recombinantes (P1 e P2) possuem todas as propriedades biológicas das toxinas nativas, como atividades dermonecróticas, hemolítica complemento-dependente e a capacidade de hidrolizar esfingomielina (TAMBOURGI *et al.*, 2004).

Atualmente, a geração de toxinas recombinantes permanece em crescente avanço com a finalidade de determinar os mecanismos moleculares e celulares das FLDs. Um exemplo foi a clonagem e expressão de seis isoformas de FLDs: LiRecDT1, LiRecDT2, LiRecDT3, LiRecDT4, LiRecDT5 e LiRecDT6 a partir de uma biblioteca de cDNA da glândula de veneno de *L. intermedia* (CHAIM *et al.*, 2006; DA SILVEIRA *et al.*, 2006; DA SILVEIRA *et al.*, 2007; RIBEIRO *et al.*, 2007; APPEL *et al.*, 2008). Essas proteínas possuem alto grau de similaridade na sequências primária com a conservação do sítio catalítico e com atividades variadas (Tabela 3).

Recentemente, Catalan *et al.* (2011) clonaram e expressaram duas novas isoformas de FLDs de *L. laeta* (LIFLD1 e LIFLD2). Essas duas proteínas apresentavam características diferentes (Tabela 3), mas quando inoculadas separadamente em coelhos, os anticorpos produzidos foram capazes de conferir um efeito imunoprotetor contra a ação dermonecrótica do veneno total de *L. laeta*.

A utilização de toxinas dermonecróticas recombinantes na produção de soro para o tratamento do loxoscelismo foi iniciada por de Almeida *et al.* (2008), que produziram um novo soro anti-loxoscélico em cavalos imunizados a partir de uma mistura de FLDs recombinantes de *L. laeta* e *L. intermedia* (patente no. 0404765-6-020040006198; 3/11/2004, - Instituto Nacional de Propriedade Industrial, INPI, 2005). Esse anti-soro foi avaliado quanto a capacidade de neutralizar os efeitos causados pelo veneno de *L. laeta*, *L. intermedia* e *L. gaucho*. No entanto, apesar desse anti-soro ter demonstrado atividade contra os efeitos tóxicos de *L. intermedia* e *L. laeta*, apresentou fraca atividade frente aos efeitos causados por *L. gaucho*.

Dessa forma, esses dados demonstram a existência de diferenças espécies-específicas significativas entre as toxinas dermonecróticas das aranhas *Loxosceles* e que, a despeito das similaridades estruturais, essas toxinas podem possuir aspectos funcionais diferentes (DA SILVEIRA *et al.*, 2007).

No entanto, apesar dos esforços em obter FLDs recombinantes do veneno de aranhas do gênero *Loxosceles*, até o início deste trabalho, nenhuma FLD recombinante do veneno de *L. gaucho* tinha sido obtida.

Tabela 3 – Principais FLDs recombinantes produzidas e atividades biológicas descritas

Toxina recombinante	Espécie isolada	Ações biológicas	Anticorpos neutralizantes	Referências
LiRecDT1	<i>L. intermedia</i>	D↑, E↑, AP↑, PV↑, IC↑, MC↑	ND	(Chaim <i>et al.</i> , 2006; Da Silveira <i>et al.</i> , 2006)
LiRecDT2	<i>L. intermedia</i>	D↑, E↑, H↑, AP↑, PV↑, IC↑	ND	(Da Silveira <i>et al.</i> , 2006)
LiRecDT3	<i>L. intermedia</i>	D∅, E↓, PV↓, AP↓,	ND	(Da Silveira <i>et al.</i> , 2006)
LiRecDT4	<i>L. intermedia</i>	D±, IC↑, AP±, F↑, MC∅	ND	(Da Silveira <i>et al.</i> , 2007)
LiRecDT5	<i>L. intermedia</i>	D±, IC, ↑. AP↓, MC∅, F↓	ND	(Da Silveira <i>et al.</i> , 2007)
LiRecDT6	<i>L. intermedia</i>	D∅, E↓, IC↓, PV↓	ND	(Da Silveira <i>et al.</i> , 2006)
LiD1	<i>L. intermedia</i>	D↑, E↓, H↓, AP ↑	SIM	(Kalapothakis <i>et al.</i> , 2002; Araujo <i>et al.</i> , 2003; Felicori <i>et al.</i> , 2006)
P1	<i>L. intermedia</i>	D↑, E±, H↑, IC↑	SIM	(Tambourgi <i>et al.</i> , 2004; Tambourgi <i>et al.</i> , 2005)
P2	<i>L. intermedia</i>	D↑, E↑, H↑	SIM	(Tambourgi <i>et al.</i> , 2004)
LIFLD1	<i>L. laeta</i>	E↑, H↑	SIM	(Catalan <i>et al.</i> , 2011)
LIFLD2	<i>L. laeta</i>	E∅, H∅	SIM	(Catalan <i>et al.</i> , 2011)
Smase I	<i>L. laeta</i>	D↑, E↑, H↑	SIM	(Fernandes Pedrosa Mde <i>et al.</i> , 2002)

Adaptado de KALAPHOTAKIS *et al.*(2007)

∅ - sem atividade

↑ - alta atividade

± - atividade intermediária

↓ - baixa atividade

ND – não determinada

D – dermonecrose

E – atividade esfingomielinásica

AP – agregação plaquetária in vitro

PV – permeabilidade em células vasculares

IC – Infiltração de células inflamatórias

F – atividade fosfolipásica

MC – Mortalidade em camundongos

H – Hemólise

2. OBJETIVOS

Clonar uma FLD a partir do RNA extraído de glândulas de veneno de *L. gaucho*, expressá-la em sistema bacteriano, determinar suas atividades biológicas, produzir anticorpos contra essa toxina e avaliar o seu potencial de neutralização frente ao veneno total de *Loxosceles gaucho*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais e obtenção de veneno

Os procedimentos envolvendo animais foram realizados após aprovação do Comitê de Ética de Investigação Animal do Instituto Butantan. Para tanto, coelhos adultos (3 a 4 kg) foram providos pelo Biotério do Instituto Butantan, bem como espécimes de *Loxosceles gaucho* foram coletados sob a licença do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis, IBAMA (15383-2); Conselho de Gestão do Patrimônio Genético, CGEN (02001.005110/2008) no estado de São Paulo, Brasil. As aranhas foram alimentadas regularmente, sendo mantidas sem alimentação apenas por uma semana antes da extração do veneno. O veneno foi obtido por meio de estimulação elétrica na região basal das quelíceras conforme descrito em Barbaro *et al.* (1992). Estas amostras foram imediatamente congeladas. A concentração de proteínas foi determinada em duplicata pelo método do ácido bicinconínico (BCA) (SMITH *et al.*, 1985) utilizando BSA (Sigma Chemicals, St Louis, MO, USA) como curva padrão.

3.2 Extração de RNA total a partir de glândulas de veneno

Para a extração do RNA total, foram utilizadas glândulas de veneno de 150 indivíduos de *L. gaucho*. Primeiramente foi realizada extração do veneno desses indivíduos, a fim de aumentar a produção de mRNA contidos nas glândulas. Cinco dias após esse procedimento, as glândulas foram coletadas com auxílio de pinça estéril, maceradas em *potter-elvehjem* em tampão fornecido pelo kit **RNeasy Lipid Tissue Mini** (Quiagen®) seguindo as recomendações do fabricante.

3.3 Obtenção dos cDNAs referentes a possíveis FLDs

Para obtenção de cDNAs referentes á possíveis FLDs , 5 µg do RNA total extraído das glândulas de veneno foi reversamente transcrito para DNA utilizando o kit **3'RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends)** (Invitrogen®) de acordo com as recomendações do fabricante.

3.4 Amplificação dos cDNAs e clonagem

Os cDNAs obtidos foram amplificados através de PCR (*Polimerase chain reaction*) realizada em termociclador (Perkin-Elmer-2400), utilizando a polimerase Platinum® *Pfx* DNA Polymerase (Invitrogen®) que possui a alta fidelidade na amplificação gênica. A reação de PCR consistia de 0,2 mM dNTP; 2 mM MgSO₄; 0,3 μM oligo 1; 0,3 μM oligo 2; 10 ng RNA; 2,5 U Platinum *Taq* High Fidelity; H₂O tridestilada q.s.p. 25 μL, e os ciclos de amplificação: 94°C, por 2 minutos; 94°C e 55°C, por 30 segundos e 68°C, por 45 segundos, com 35 repetições; 68°C, por 5 minutos; 4°C ∞.

A região 3' completa do cDNA da toxina dermonecrótica foi obtida através do *primer reverse* do sistema 3'RACE enquanto que o *forward primer* degenerado (CRGATGWYGVDGAACG) foi gerado a partir do alinhamento de sequências de cDNA de FLDs de *L. laeta* (Smase I- AY093599), *L. intermedia* (LiRecDT1-DQ218155 e LiRecDT2-DQ266399) e *L. reclusa* (SMase D-AY862486), exatamente antes do resíduo alanina da toxina madura. O produto de PCR foi clonado no vetor pGEM®-T Easy Vector Systems (Promega), conforme descrito pelo fabricante (Figura 6).

Estas construções foram utilizadas para transformação de bactérias *E. coli* DH5α quimicamente competentes, que foram plaqueadas em LB-ágar (1 g tripton; 0,5 g extrato de levedura; 1 g NaCl; 15 g ágar) contendo 100 μg/mL de ampicilina, IPTG 0,5 mM e 2 mg/placa de 25 mL X-Gal para seleção de clones positivos. A placa foi incubada *overnight* a 37°C e no dia seguinte a placa continha basicamente colônias azuis (negativas) e brancas (positivas). As colônias positivas foram coletadas com ponteiras (100 μL) estéreis e inoculadas em 50 μL de meio LB contendo 100μg/mL de ampicilina e incubadas a 37°C, sob agitação por 2 horas.

Para avaliar a presença do inserto nessas colônias foi realizado PCR utilizando 5 μL dessa cultura para um volume final de 25 μL de reação (0,2 mM dNP; 1,5 mM MgSO₄; 0,5 μM *primer forward*; 0,5 μM *primer reverse*; 5 μL da cultura; 2,5 U *taq* polimerase; H₂O tridestilada) usando a seguinte ciclagem: 94°C, por 2 minutos; 94°C e 55°C, por 30 segundos e 72°C, por 45 segundos, com 35 repetições; 72°C, por 5 minutos; 4 °C ∞. Como controle negativo, todos os reagentes mencionados foram utilizados, mas os 5 μL de cultura foram substituídos por água.

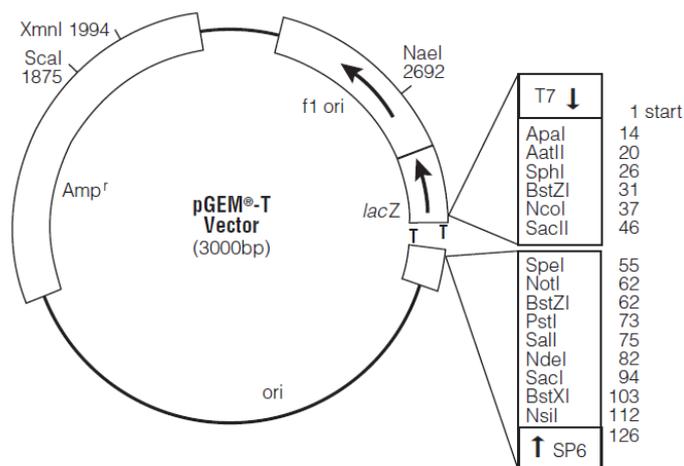


Figura 6 – Esquema do vetor pGEM-T mostrando o sítio de clonagem e os locais dos *primers* T7 e SP6

3.5 Sequenciamento

A fim de aumentar a quantidade de plasmídeos nas colônias positivas para realizar o sequenciamento, 5 μ L de cada colônia foi adicionado a 15 mL de meio LB contendo 100 μ g/mL de ampicilina, incubadas *overnight*, sob agitação, a 37°C. Após a incubação foram realizadas a extração e a purificação plasmidial utilizando o kit Wizard[®]plus Miniprep DNA purification System (Promega) segundo as recomendações do fabricante.

Esses plasmídeos purificados foram utilizados para uma reação de PCR, utilizando *primers* T7 e SP6 que se ligam flanqueando o sítio de policlonagem do vetor pGEM-T e a *Taq* polimerase (Invitrogen[®]). Estes foram sequenciados usando o sequenciador automatizado ABI 3130 e **BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit** (Applied Biosystems[®]).

3.6 Clonagem em vetor pAE e expressão da proteína recombinante

O cDNA da LgRec1 foi amplificado por PCR com primers *forward* e *reverse* contendo sítios para as enzimas de restrição *Bam*HI e *Hind*III, respectivamente. Este fragmento amplificado foi subclonado em fase com uma sequência de marcador

6xHis presente num plasmídeo pAE baseado em promotor T7 (RAMOS *et al.*, 2004) resultando na construção pAE-LgRec1 (Figura 7).

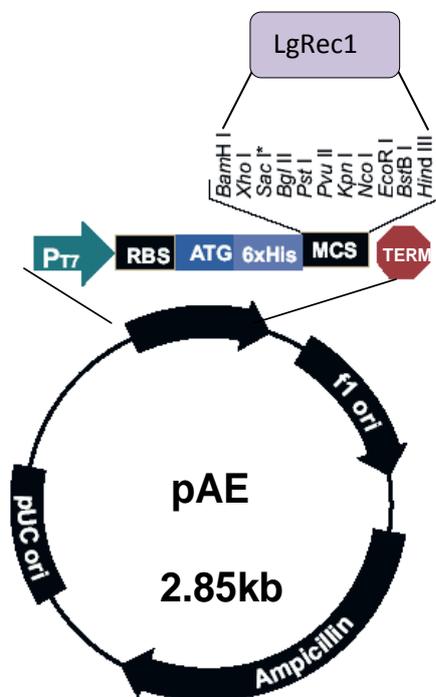


Figura 7– Esquema do vetor pAE com seus sítios de clonagem.

Bactérias *E. coli* BL21 Star™ (DE3) pLysS (Invitrogen™) e C43 (DE3) quimicamente competentes foram transformadas com a construção pAE-LgRec1 e posteriormente plaqueadas em meio LB-ágar contendo 100 µg/mL de ampicilina e 34 mg/mL de cloranfenicol (BL21(DE3)pLysS) ou somente ampicilina 100 µg/mL (C43 (D3)). As placas foram incubadas *overnight* a 37°C. No dia seguinte, uma única colônia foi selecionada e inoculada em 15 mL em meio LB e cultivada *overnight* sob agitação, a 37°C. Essa cultura, chamada de pré-inóculo foi então usada para inocular 250 mL de meio LB (ampicilina) na diluição 1:70 e incubadas a 30°C e 37°C. Essas culturas foram mantidas nessas temperaturas com aeração constante, até atingirem uma D.O.600 = 0,5-0,6. A indução da expressão das toxinas foi realizada pela adição de 1 mM de IPTG e as culturas foram incubadas por um período de 4 horas a 37°C e 30°C. A cultura foi transferida para frasco apropriado e submetida a centrifugação a 8000 g, durante 10 minutos, a 4°C.

3.7 Purificação da proteína recombinante por IMAC

O precipitado de células obtido após o processo realizado acima, foi ressuspenso em tampão de ligação (20 mM de fosfato de sódio pH 7,0, 500 mM NaCl e 20 mM de imidazol) e lisado através de um processo de sonicação intermitentemente, em banho de gelo durante 60 segundos com pausas de 4 minutos para o resfriamento. Esse processo foi repetido por seis vezes. O lisado foi então centrifugado a 10.000 g, por 10 minutos, a 4°C, e o sobrenadante foi utilizado para purificação da proteína recombinante por IMAC utilizando resina (GE®) carregada com níquel de alta performance, seguindo as recomendações do fabricante.

A fração solúvel das células lisadas foi colocada sobre 1 mL de resina de níquel, já lavada e equilibrada em tampão de ligação. A reação de ligação da toxina recombinante à resina foi realizada por cerca de 30 minutos em homogeneizador para tubos tipo gangorra. A seguir foram realizadas três lavagens com tampão de lavagem (fosfato de sódio 20 mM, NaCl 500 mM e Imidazol 100 mM) seguida da eluição (fosfato de sódio 20 mM, NaCl 500 mM e Imidazol 1 M) por 20 minutos sob agitação. O eluído foi submetido a um processo de diálise contra tampão fosfato salina (PBS) e analisados em um gel de SDS-PAGE 12,5% sob condições redutoras. A dosagem da proteína recombinante obtida foi realizada pelo micrométodo modificado de Bradford (BRADFORD, 1976) usando BSA como curva padrão.

3.8 SDS-PAGE

SDS-PAGE (*SDS-polyacrylamide gel electrophoresis*) (LAEMMLI, 1970) foi utilizado em inúmeras situações para averiguar a identidade do perfil eletroforético das proteínas dermonecróticas tanto do veneno de *L. gaucho*, quanto da proteína recombinante LgRec1 em extratos bacterianos. As amostras foram analisadas por SDS-PAGE 12,5% sob condições redutoras com adição prévia de tampão de amostra redutor (2,5% DTT, 62,5 mM Tris pH 6,8, 10% glicerol, 2% SDS, e 0,02% azul de bromofenol), e então fervidas por 5 minutos, aplicadas ao gel e submetidas as seguintes condições de corrida: 110 V, 55 mA, por 1h 40 min.

Após a eletroforese, os géis foram corados com Coomassie Blue R-250 ou por prata. Os marcadores de massa molecular utilizados para calcular a massa molecular das amostras foram **Kaleidoscope** (BioRad prestained standards) e **PageRuler** (Fermentas unstained standards).

3.9 Reação local e atividade dermonecrótica

Para determinar a reação local (edema/eritema/palidez/equimose) e a atividade dermonecrótica da LgRec1, coelhos brancos da Nova Zelândia foram inoculados via i.d. (intra-dérmica) com uma solução 0,2 mL de PBS contendo 3 µg de LgRec1 e o veneno de *L. gaucho* como controle positivo como descrito por Barbaro et al. (BARBARO *et al.*, 1992). Após 24 e 48 horas, sobre a área de reação local e dermonecrótica foi colocado uma folha transparente, e com a ajuda de uma caneta marcadora, as áreas foram copiadas para esta folha. A fim de avaliar as áreas da região lesionada, foi desenhado também sobre a folha um quadrado de área conhecida (2 cm²) e então escaneada. A partir de ferramentas do programa Photoshop CS6 (Adobe), as áreas foram selecionadas individualmente (varinha mágica) e preenchidas com uma cor (balde de tinta). Para que o número de pixels contidos em cada uma das áreas lesionadas fosse determinado, usou-se a ferramenta histograma, com a opção mostrar estatística selecionada. Assim, para o cálculo da área afetada, foi calculada uma proporção entre o número de pixels da área conhecida (quadrado de 2 cm²) com o número de pixels das áreas desconhecidas (lesões).

3.10 Atividade esfingomielinásica

A atividade esfingomielinásica foi avaliada utilizando o Amplex Red ® Kit Assay esfingomielinase (Invitrogen®). Neste ensaio a atividade de esfingomielinase é acompanhada utilizando 10-acetil-3, 7-dihydroxyphenoxazine (Amplex Red Reagent), um fluorogêno sensível a peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Inicialmente, a esfingomielinase provoca hidrólise da esfingomielinina produzindo ceramida e fosforilcolina. Em seguida, ocorre ação da fosfatase alcalina, que hidrolisa a fosforilcolina, a colina é oxidada pela colina oxidase a betaína e H₂O₂. Finalmente,

H₂O₂ na presença de peroxidase, reage com o Amplex Red Reagent estequiometricamente 1:1 para gerar o produto altamente fluorescente, a resorufina.

O veneno de *L. gaucho* ou a proteína LgRec1 nas concentrações de 0,1, 0,5 e 2,5 µg, foram adicionados à mistura do Amplex Red Reagent. A reação foi incubada a 37°C, durante 30 minutos e a fluorescência foi medida no equipamento SpectraMax M2-Molecular Devices usando excitação a 540 nm e emissão de 590 nm.

3.11 Agregação Plaquetária

Todos os procedimentos que envolvem sangue humano foram aprovados pelo Instituto de Saúde de São Paulo - Comissão de Ética para Protocolo Humano: 019/2008/SES/IS/CEPIS.

Sangue total foi colhido de voluntários humanos saudáveis, após consentimento informado. A agregação de plaquetas em (plasma rico em plaquetas) PRP foi realizada como descrito anteriormente (WANG, *et al.*, 2005). Para preparar as suspensões de plaquetas humanas lavadas, o sangue foi colhido em citrato de sódio, e as plaquetas submetidas a processo descrito por Santoro *et al.* (1999). A agregação plaquetária foi monitorada num agregometro Chrono-log, modelo 490, com a temperatura mantida constante a 37°C e utilizando uma barra de agitação à velocidade definida para 1000 rpm. As doses de 20 µg/mL ou 5 ng/mL de LgRec1 foram avaliados sobre a agregação plaquetária. Os agonistas ADP (concentração final, 10 µM) ou trombina (concentração final de 0,02 U/ mL) foram utilizadas como controles positivos para PRP e plaquetas lavadas, respectivamente.

3.12 Avaliação da atividade hemolítica (direta e indireta)

Para avaliação da atividade hemolítica foram utilizados métodos adaptados de Almeida *et al.* (2008) e Chaves-Moreira *et al.* (2009).

3.12.1 Obtenção de soro para o teste hemolítico

Sangue de pacientes saudáveis foi coletado em tubo seco e incubado a 37°C por uma hora. Após esse período foi centrifugado a 2000 g, por 15 minutos. O soro foi coletado e armazenado a -80°C até o momento do uso.

3.12.2 Hemácias

As hemácias foram coletadas em tampão citrato de sódio (9:1). Centrifugadas a 2000 g, por 5 minutos. O plasma foi descartado e as hemácias lavadas 3 vezes com Tampão Tris-Sacarose (Tris-HCl 10 mM pH 7,4, Sacarose 250 mM, MgCl₂ 0,8 mM, CaCl₂ 0,3 mM). Na última lavagem, o tampão foi descartado e o número de hemácias foi determinado (GOMES, 2010).

Uma diluição de 1:10 de hemácias foi preparada em Tris-Sacarose, 100 µL dessa diluição foi dissolvida em 1400 µL de água destilada para rompimento das hemácias. O produto da lise foi lido a 545 nm, e a densidade ótica obtida foi utilizada para determinar o número de hemácias, sabendo-se que 0,700 unidades de absorvância correspondem a 1x10⁹ hemácias.

3.12.3 Atividade hemolítica

Os testes foram realizados em quintuplicata, em placas de 96 poços com fundo em U. Para tanto, foram utilizadas 10⁸ hemácias em um volume final de 100 µL contendo as seguintes concentrações da toxina recombinante: 0; 6,25; 12,5; 25; 50 e 100 µg/mL. Após incubação por 1 hora, a 37° C, sob agitação, as hemácias foram incubadas com 50 µL de soro (atividade indireta) ou com 50 µL de Tris-sacarose (atividade direta) e o controle positivo incubado com 1% de Triton x-100 por 1 hora, a 37°C, sob agitação. Posteriormente, a placa foi centrifugada por 2000 g, por 5 minutos e o sobrenadante lido a 415 nm. Os valores foram convertidos para porcentagem considerando o controle positivo 100% de hemólise. Para os teste foram utilizados o soro e as hemácias do mesmo doador para evitar ativação do complemento pelo reconhecimento dos anticorpos pelo sistema ABO sanguíneo.

3.13 Anticorpos anti-veneno e anticorpos monoclonais

O soro antiaracnidíco (SAAr) (lote 0211124-Instituto Butantan) foi preparado por meio de imunização de cavalos com uma mistura de venenos de *Loxosceles gaucho* (21,5%), *Phoneutria nigriventer* (21,5%), e *Tityus serrulatus* (57%) (CARDOSO *et al.*, 2003). O anticorpo monoclonal (MoALg1) contra a fração de proteínas dermonecróticas de *Loxosceles gaucho* (35 kDa) foi obtida tal como descrito anteriormente (GUILHERME *et al.*, 2001). O anticorpo policlonal produzido para o veneno total de *L. gaucho* (anti-Lg), e anti-LgRec1 foram preparados pela inoculação em coelhos via i.d. de 0,2 ml de NaCl 0,15 M contendo 5 µg de veneno ou da toxina recombinante LgRec1 . Os animais foram re-inoculados 28 e 35 dias depois com a mesma dose dos antígenos. Após o último reforço, o sangue foi colhido a partir da veia marginal da orelha dos animais e o soro obtido por centrifugação (4°C, 10 minutos, 800 g). O soro normal de coelho obtido antes da imunização foi utilizado como controle.

3.14 ELISA

Amostras de soro policlonal anti-Lg, anti-LgRec1, SAAr, MoALg1 foram tituladas quanto ao teor de anticorpos contra o veneno de *L. gaucho* e à proteína recombinante LgRec1 em placas de 96 poços (Polysorp, Nunc, Dinamarca) revestidas com 10 µg/mL de veneno ou LgRec1. Os soros normais do sangue de cavalos, coelhos ou ratos foram utilizados como controles negativos. As placas foram lidas utilizando um leitor de ELISA (Multiskan Espectrofotômetro EFLAB, Helsínquia, Finlândia) e os títulos foram determinados como o recíproco da diluição mais elevada que promovia uma leitura superior a 0,05 no comprimento de onda de 492 nm, uma vez que reações não específicas foram observadas abaixo deste valor.

3.15 Western Blotting

As amostras de veneno de *L. gaucho* (10 µg) e LgRec1 (5 µg) foram submetidas a eletroforese sob condições redutoras como descrito anteriormente (SDS-PAGE 12,5%). As proteínas fracionadas por eletroforese, foram transferidas para membrana de nitrocelulose seguindo a metodologia proposta por Towbin *et al.*

(1979) por 1 hora, a 200 mA utilizando o Trans-Blot[®] SD Semi-Dry Transfer Cell (BioRad[®]). Após a transferência, as membranas de nitrocelulose foram coradas com Ponceau S (Merk[®]) 1:20 para verificar a eficiência da transferência, para retirar o corante as membranas foram lavadas com TBS (Tris 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5) até completa remoção do mesmo. Após a descoloração, as membranas foram bloqueadas com solução de TBS e Caseína 5% por 2 horas sob agitação e então lavadas com TBS mais 0,05% de Tween 20. Em seguida, cada uma das membranas foram incubadas por 2 horas, com os anticorpos primários (anti-Lg, SAAR, MoALg1 ou anti-LgRec1) diluídos 1:250 em TBS - Caseína 5%. Após esse período, as membranas foram lavadas por 15 minutos com TBS-Tween (a lavagem repetida por 3 vezes). Para detectar as proteínas imunorreativas, cada membrana foi incubada com um dos anticorpos secundários marcados com peroxidase (anti-IgG de cavalo, anti-IgG de coelho ou anti-IgG de rato) diluídos 1:500 em TBS - Caseína 5%, por 2 horas, sob agitação. Após esse período, as membranas foram por 15 minutos com TBS-Tween (a lavagem repetida por 3 vezes). Os componentes antigênicos foram detectados pela adição de uma solução com 0,05% de 4-cloro-1-naftol em metanol a 15% v/v, na presença de 0,03% de H₂O₂ (v/v). A reação foi interrompida com sucessivas lavagens com água corrente.

3.16. Propriedades de neutralização de anti-LgRec1 contra veneno total de *L. gaucho*

Para analisar a neutralização da reação local e a atividade dermonecrótica induzida pelo veneno de *L. gaucho*, amostras de 1,5, 3 e 6 µg de veneno foram incubadas separadamente com 200 µL de soro anti-LgRec1 por 30 minutos, a 37°C. Em seguida, essas amostras foram centrifugadas e os sobrenadantes foram injetados i.d. no dorso depilado de coelho.

Como controle, soro normal de coelho (SNR) foi incubado com as mesmas doses de veneno de *L. gaucho*. As áreas de lesão local foram avaliadas 24 e 48 horas após a injeção e descritas como a média ± SEM de três áreas diferentes (mm²) para cada um dos parâmetros estudados (n = 3).

3.17 Análises estatísticas

Os resultados foram expressos como média \pm SEM (erro padrão da média). *One-way* ou *two-way* ANOVA (análise de variância), seguido pelo teste de Bonferroni, foi utilizado para analisar os dados, empregando Software SigmaStat 3.5. Sempre que necessário, a transformação de dados foi utilizada para obter homocedasticidade e distribuição normal. Valores com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4. RESULTADOS

4.1 Extração de RNA total das glândulas de veneno de *L. gaucho*

O RNA total extraído das glândulas de veneno apresentou as bandas 28S, 18S e 5S correspondentes aos RNAs ribossômicos, não sendo observada degradação (Figura 8). Este RNA foi então utilizado para realizar a síntese de cDNA utilizando o kit **3' RACE** System (Invitrogen®).

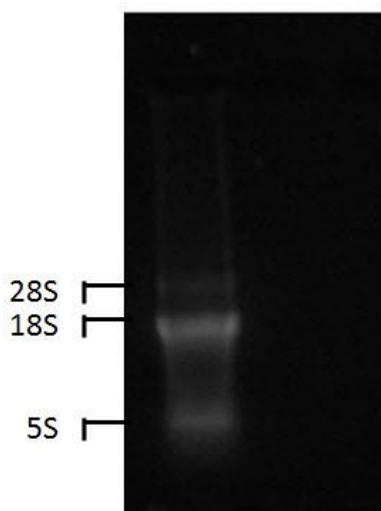


Figura 8 - Análise da extração de RNA total da glândula de veneno de *L. gaucho* visualizado em gel de agarose 1 % contendo gelRed® .

4.2 Reação de PCR dos cDNAs utilizando *primer* randômico de FLDs

Para obter a amplificação dos cDNAs referentes às toxinas maduras, uma reação de PCR foi feita utilizando um *primer forward* degenerado desenhado a partir do alinhamento dos cDNAs de FLDs com atividade fosfolipásica conhecida, como LiRecDT1, LiRecDT2, SMase I e SMase D (Figura 9). Como *primer reverse*, foi utilizado o do kit **3' RACE**. Após a realização do PCR, obtivemos uma banda por volta de 1000 pb (Figura 10).

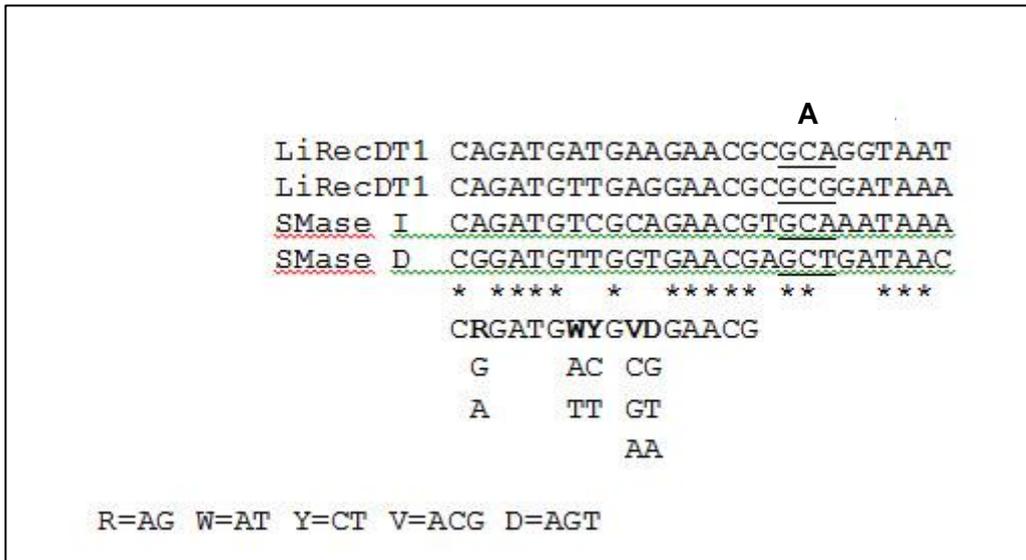


Figura 9 - Desenho do *primer forward* degenerado, baseado no alinhamento de FLDs com atividade dermonecrótica LiRecDT1 (ABA62021) e LiRecDT2 (ABB69098) de *L. intermedia*, SMase I (AAM21154) de *L. laeta* e SMase D (AAW56831) de *L. reclusa*. A sequência de DNA que codifica o primeiro aminoácido da proteína madura alanina (A) encontra-se grifado.

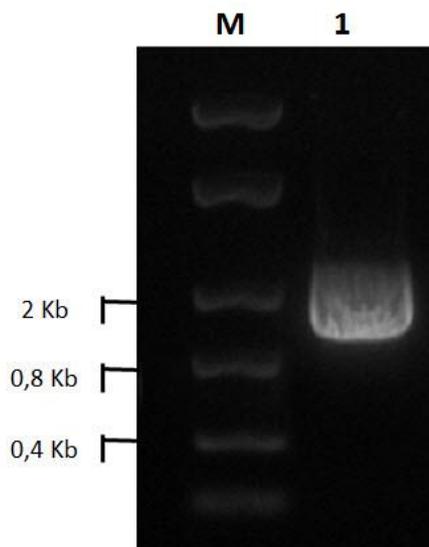


Figura 10 – Gel de agarose 1 % corado com gelRed® (Biotium) mostrando produto de PCR realizado com o cDNA. Para a reação foram utilizados o *primer forward* randômico e o *primer reverse* contido no kit 3'RACE. M - marcador de tamanho molecular; 1 - Produto de PCR.

4.3 Análise das clonagens por PCR

O produto de amplificação por PCR foi posteriormente clonado no vetor pGEM-T e esta construção transformada em bactérias *E. coli* DH5 α quimicamente competentes. Para avaliar se as colônias brancas selecionadas continham inserto, as mesmas foram submetidas à análise por PCR utilizando os *primers* SP6 e T7 que se ligam a regiões que flanqueiam a região de clonagem. As colônias positivas (Figura 11) tiveram seus plasmídeos extraídos com o kit Wizard[®]plus Miniprep DNA purification System (Promega[®]), e em seguida, submetidos ao processo de sequenciamento.

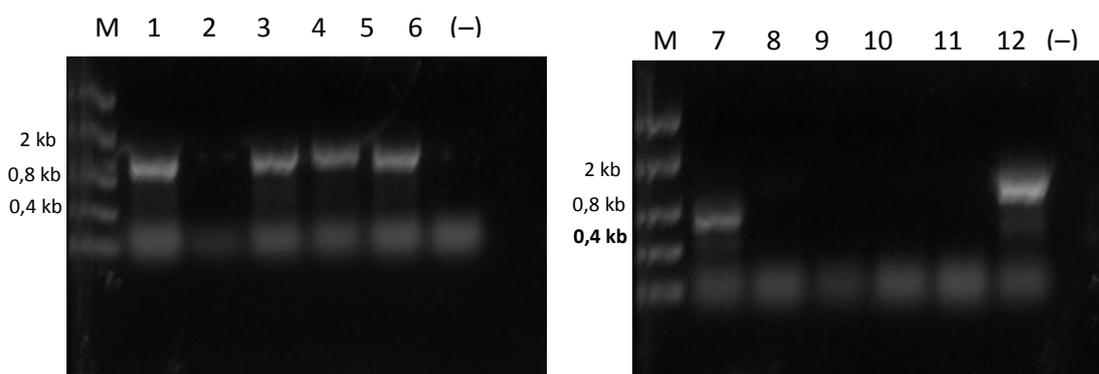


Figura 11 – Seleção de clones positivos de bactérias *E. coli* DH5 α transformadas com o vetor pGEMT em gel 1 % agarose corado com gelRed[®] (Biotium). A reação de PCR foi realizada com os *primers* SP6 e T7. (M) Marcador; (1-12) clones; (-) controle negativo.

4.4 Sequenciamento

Os clones que se mostraram positivos através do PCR foram utilizados para sequenciamento. A sequência de DNA de um dos clones e sua tradução está representada na Figura 12. A proteína madura predita foi denominada de LgRec1 e está depositada no GenBank, sob o número JX866729. Essa proteína mostrou ser composta por 290 aminoácidos, com uma massa molecular de 31,477 kDa e pI de 6,42. A região 3'UTR apresentou-se constituída de 110 pb contendo um sinal de poliadenilação predito.

4.5 Análises de alinhamento múltiplo de LgRec1

O alinhamento múltiplo da sequência de aminoácidos de LgRec1 com as sequências de FLDs utilizados para conceber os *primers forward* degenerados são mostrados na Figura 13. A LgRec1 mostrou compartilhar 56,64% de identidade com a SMase I de *L. laeta*, 79,64% com SMase D de *L. reclusa*, 78,21% com LiRecDT1 e 76,79% com LiRecDT2, ambas de *L. intermedia*. Como pode ser visto a partir do alinhamento, todos os resíduos envolvidos na catálise (letras em negrito) nas FLDs estão preservados na LgRec1, bem como os aminoácidos envolvidos na ligação de íons Mg²⁺ (asteriscos).

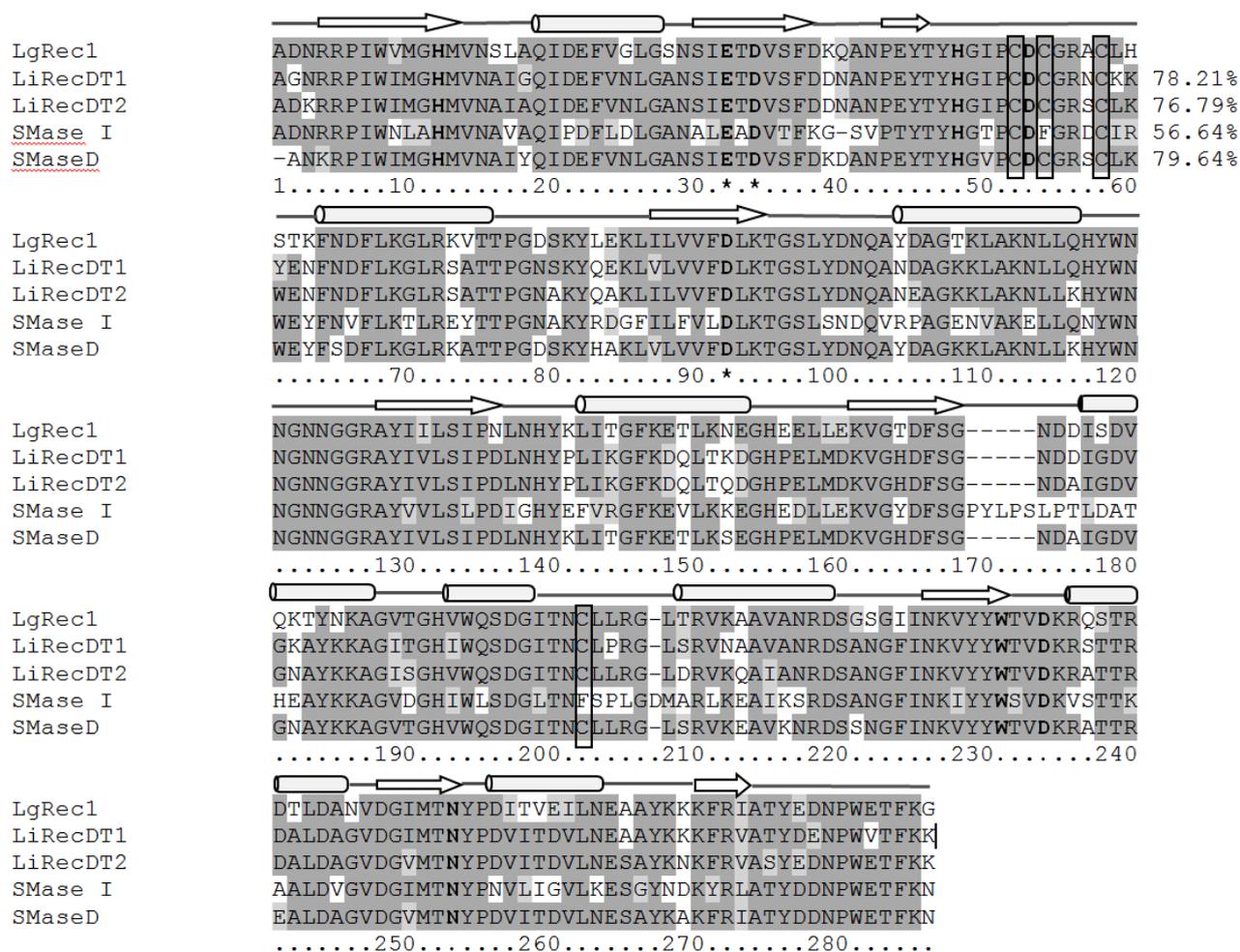


Figura 13 - Análise de alinhamento múltiplo de seqüências de aminoácidos deduzidas de LgRec1 (JX866729) de *L. gaucho*, SMase I (AAM21154) de *L. laeta*, SMase D (AAW56831) de *L. reclusa* e LiRecDT1 (ABA62021) e LiRecDT2 (ABB69098) de *L. intermedia*. As porcentagens relativas estão à direita e indicam a identidade partilhada entre LgRec1 e as outras moléculas. As cisteínas estão marcadas em caixa, enquanto nas regiões sombreadas em cinza escuro e claras mostram aminoácidos idênticos e conservados, respectivamente. Os resíduos que estão envolvidos na catálise são apresentadas em negro e os aminoácidos responsáveis pela ligação dos íons de Mg²⁺ estão indicados por asteriscos. Estruturas secundárias com base no cristal de LiRecDT1 (PDB código: 3RLH) estão representadas acima como α -hélice (—), folha β (□) e as regiões helicoidais (\Rightarrow). O alinhamento das seqüências e o sombreado dos aminoácidos foram realizadas com os programas Clustal W2 ([www.ebi.ac.uk / CLUSTAL](http://www.ebi.ac.uk/CLUSTAL)) e Mobylye (<http://mobylye.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py?form=boxshade>), respectivamente.

4.6 Expressão da LgRec1 em vetor bacteriano

O vetor pAE (RAMOS *et al.*, 2004) possui o promotor T7 (P_{T7}), que é reconhecido pela T7 RNA polimerase do fago λ , e o gene desta polimerase encontra-se inserido no cromossomo das bactérias designadas como DE3 sob controle do promotor *lacUV5*, que é induzível por IPTG.

Nos testes iniciais de expressão da LgRec1 foram utilizadas 2 cepas de *E. coli*, BL21 (DE3) pLysS e C43 (DE3). Além disso, também foram analisadas duas temperaturas de expressão ideal, 30°C e 37°C, no sentido de identificar condições ideais de expressão das proteínas recombinantes. Em todos os testes houve expressão da proteína recombinante. Todas as amostras foram avaliadas em SDS-PAGE (Figura14).

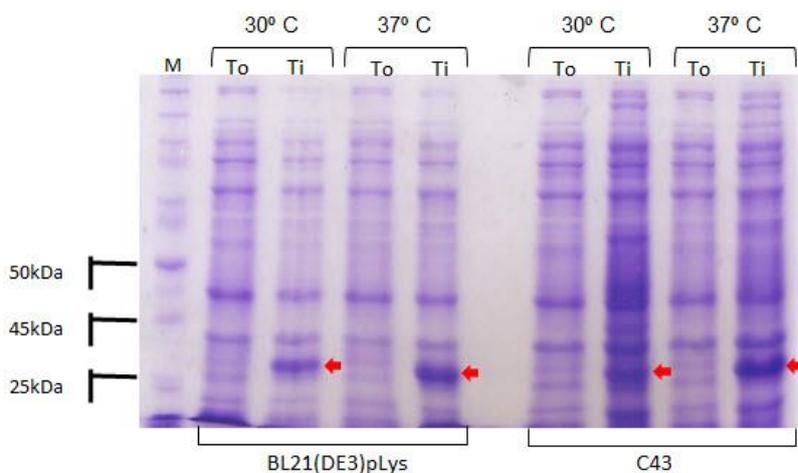


Figura 14 – Gel SDS-PAGE 12,5% mostrando as expressões realizadas com a construção pAE-LgRec1 em bactérias *E.coli* BL-21 (DE3) pLys e C43 (DE3). M – marcador de peso molecular; To- extrato bacteriano antes da indução, Ti- extrato bacteriano após a indução. As setas vermelhas indicam a proteína expressa após 4 horas de indução com 1 mM de IPTG.

4.7 Purificação da proteína recombinante LgRec1

Após expressão das proteínas nas duas linhagens bacterianas e nas temperaturas de 30°C e 37°C, partiu-se para o processo de purificação dos extratos bacterianos através da cromatografia de afinidade em resina de Niquel-sefarose. Em todas as condições testadas, a proteína recombinante purificada mostrou-se solúvel, com poucos contaminantes e apresentou um rendimento aproximado de 3,2 mg por litro de cultura, quando submetida a dosagem por micro método de Bradford (BRADFORD, 1976). Todas as amostras foram avaliadas em SDS-PAGE (Figura 15). Deste modo, selecionamos a expressão em BL21(DE3) pLys a 37°C como padrão para purificações posteriores.

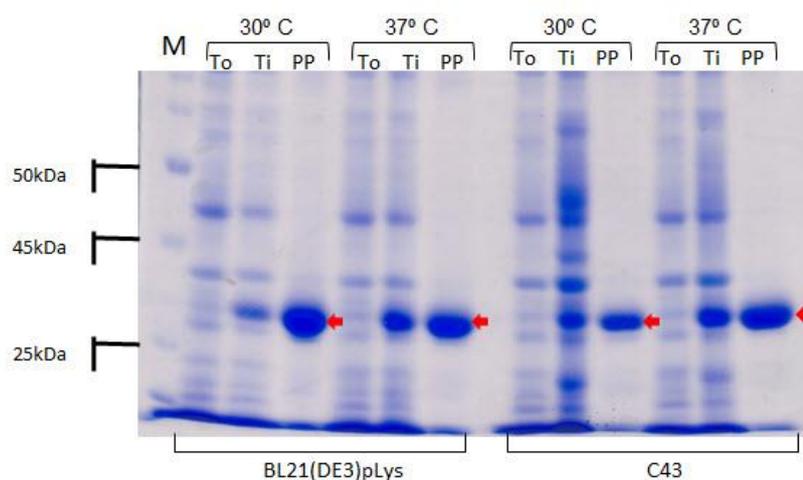


Figura 15 – Gel SDS-PAGE 12,5% mostrando a purificação da proteína recombinante LgRec1 expressas em *E. coli* BL-21(DE3) pLys e C43 (DE3). M – marcador de peso molecular; To- extrato bacteriano antes da indução; Ti- extrato bacteriano após a indução; PP- proteína purificada. As setas em vermelho indicam a proteína purificada por IMAC com tamanho entre 30-32 Kda.

4.8 Reação local e atividade dermonecrótica

Para avaliar a reação local e a atividade dermonecrótica induzida por LgRec1, dorsos de coelhos foram depilados e posteriormente injetados intradermicamente com 3 μg da toxina recombinante ou veneno total de *L. gaucho* (controle positivo).

Como pode ser observado na Figura 16, a toxina recombinante causou uma reação inflamatória local (A) e dermonecrose (B), semelhantes às induzidas pelo veneno total de *L. gaucho*. As lesões macroscópicas foram analisadas posteriormente em 24 e 48 horas.

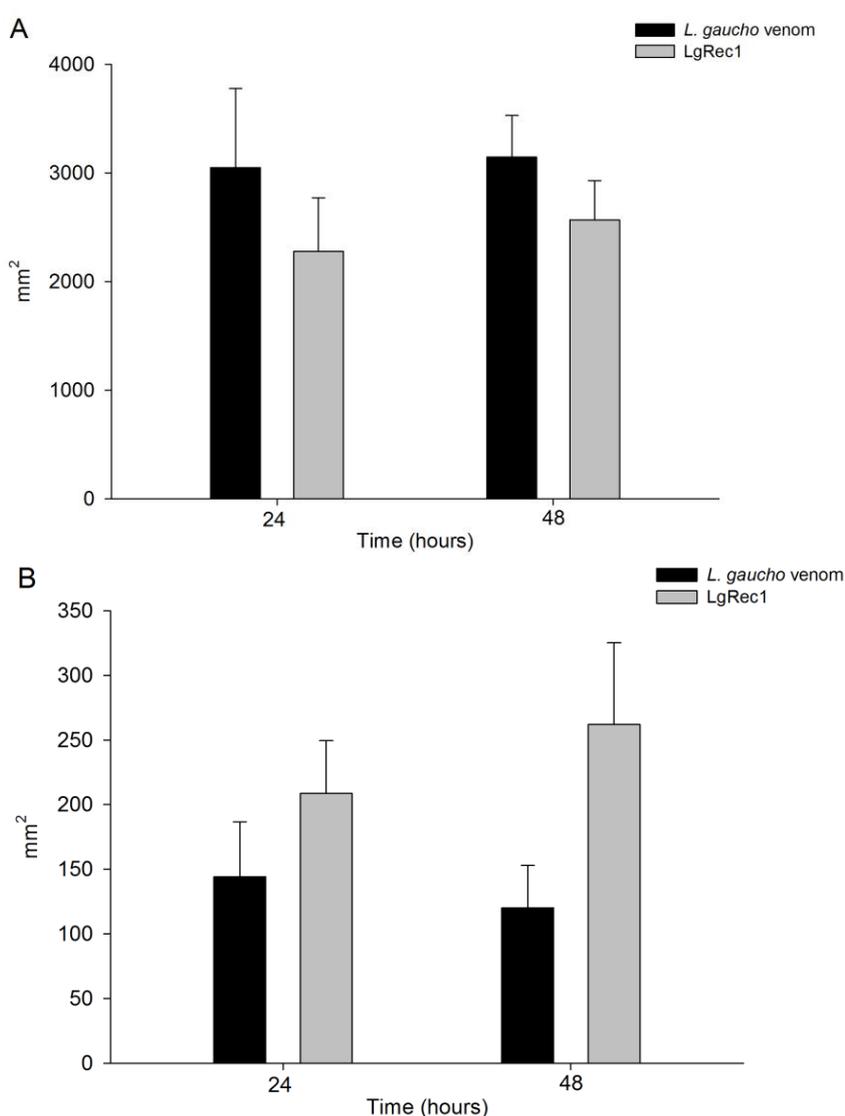


Figura 16 - Áreas de edema / eritema / equimoses / palidez (A) e dermonecrose (B) induzida pelo veneno de *L. gaucho* e LgRec1. As amostras (3 μg) foram injetados i.d. na pele do flanco dorsal depilado de coelhos. As zonas de reação local (mm^2) foram medidas 24 e 48 h após a injeção.

4.9 Atividade esfingomielinásica

Para avaliar a atividade esfingomielinásica da toxina recombinante LgRec1 foi utilizado o kit Amplex-Red Assay (Molecular Probes-Invitrogen). Como controle positivo da reação foi utilizado veneno total de *L. gaucho*. Como pode ser observado na Figura 17, a atividade esfingomielinásica de LgRec1 foi dependente de concentração e mostrou uma atividade semelhante a do veneno total.

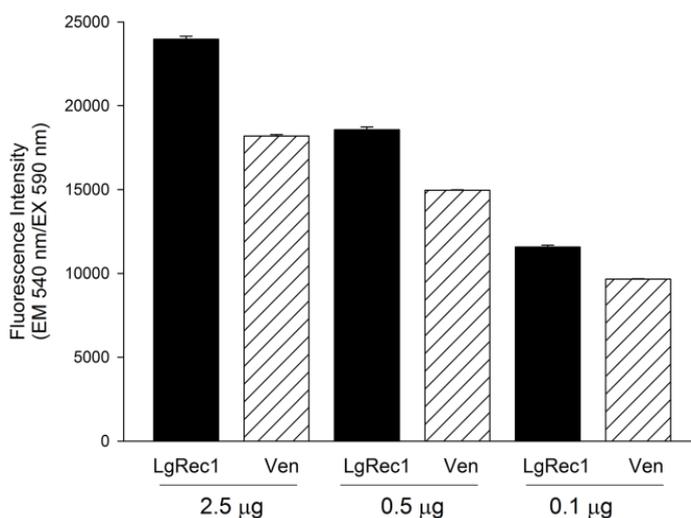


Figura 17 - Atividade esfingomielinásica comparativa do veneno de *L. gaucho* e da proteína recombinante LgRec1. A atividade esfingomielinásica do veneno total (Ven) ou de LgRec1 foi avaliada pelo Amplex Assay Kit Red a 37 °C durante 30 minutos e a fluorescência foi medida num leitor de microplacas usando excitação a 540 nm e emissão a 590 nm. Para as reações foram utilizadas 2,5, 0,5 e 0,1 µg de veneno total ou LgRec1. Os valores indicados são a média ± SEM.

4.10 Agregação Plaquetária

A LgRec1 foi avaliada quanto à sua capacidade de promover agregação plaquetária *ex vivo* em PRP ou em suspensão de plaquetas lavadas. Em ambos os testes, antes da adição da toxina recombinante, a viabilidade das plaquetas foi verificada pela adição de 10 µM de ADP (Figura 18A) ou 0,02 U/mL de trombina, respectivamente (Figura 18C).

LgRec1 induziu agregação plaquetária em PRP nas concentrações de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 18B), mas quando se utilizou plaquetas lavadas, a toxina recombinante, mesmo na concentração de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, não foi capaz de induzir agregação plaquetária (Figura 18C). A fim de verificar se as plaquetas lavadas estavam ainda viáveis, imediatamente após o estímulo com LgRec1, as plaquetas foram desafiadas com trombina. Os resultados mostraram que estas plaquetas, apesar da presença de LgRec1, ainda eram capazes de formar agregados (Figura 18C), indicando que a toxina recombinante não interferiu na viabilidade das plaquetas lavadas.

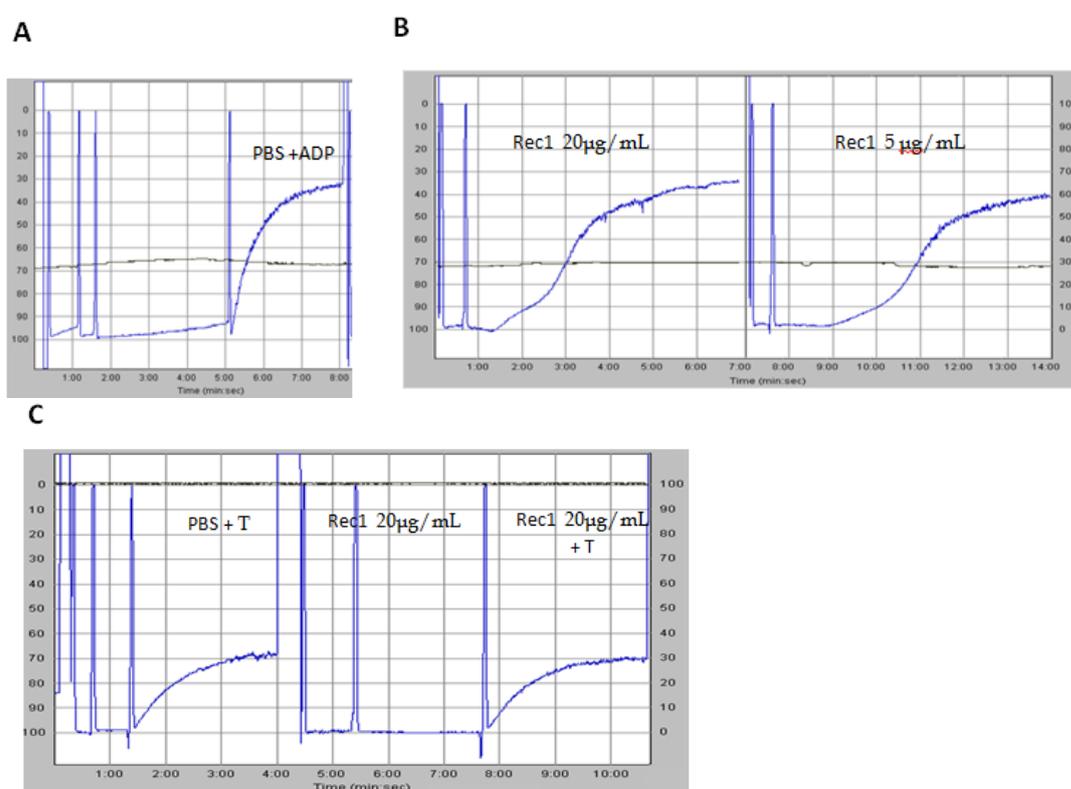


Figura 18 - A agregação de plaquetas induzida por LgRec1. (A) Controle positivo mostrando viabilidade das plaquetas com PBS e estimuladas com 10 μM de ADP. (B) O plasma rico em plaquetas foi incubado com 20 μg ou 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LgRec1. (C) As plaquetas lavadas foram incubadas com PBS ou 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LgRec1, e depois estimuladas ou não com 0,02 U/mL de trombina (T).

4.11 Atividade Hemolítica

A avaliação da capacidade da proteína recombinante LgRec1 de promover lise em hemácias humanas foi realizada com e sem participação de complemento.

A partir da análise da Figura 19, após uma hora de tratamento, seguido pela adição de soro do mesmo doador, a LgRec1 promoveu hemólise. Por outro lado, o tratamento de uma hora com a proteína LgRec1 não levou à hemólise das hemácias.

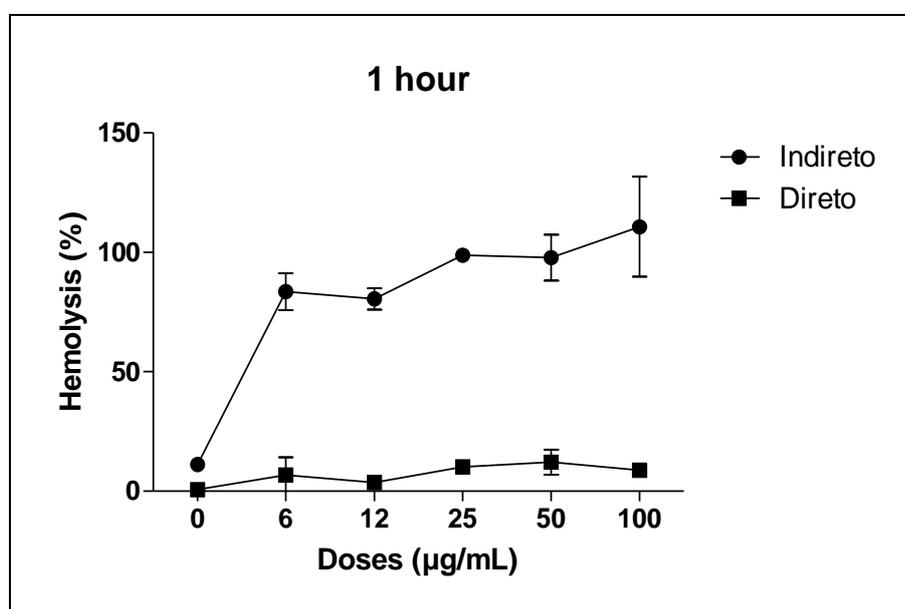


Figura 19 – Avaliação da atividade hemolítica indireta (com soro) e direta (sem soro). As hemácias foram incubadas com concentrações crescentes (0/ 6,25/ 12,5/ 25/ 50 e 100µg/ml) da proteína recombinante LgRec1. Valores indicados em porcentagem baseados no controle positivo (hemácias tratadas com Triton 1%).

4.12 Análise da capacidade de anticorpos anti-LgRec1 reconhecerem componentes do veneno de *L. gaucho*.

A proteína recombinante foi então utilizada para imunizar coelhos, como anteriormente descrito em Materiais e Métodos, e a eficácia do soro resultante dessa imunização foi então comparada com a do soro anti-veneno de *L. gaucho*, o soro anti-aracnido do Instituto Butantan e o anticorpo monoclonal MoALg1, todos com

reconhecida atividade na neutralização dos efeitos do veneno de *L. gaucho*. Primeiramente os anticorpos anti-LgRec1, anti-Lg, SAAr e MoALg1 foram avaliados quanto a sua capacidade em reconhecer o veneno total de *L. gaucho* e LgRec1 em ensaio de ELISA. A Tabela 3 mostra os títulos obtidos para cada anticorpo. Pode-se notar que os anticorpos anti-LgRec1 reconhecem componentes do veneno de *L. gaucho*. Além disso, todos os anticorpos reconheceram componentes do veneno de *L. gaucho*, bem como a toxina recombinante LgRec1.

Tabela - 4 Títulos de anticorpos contra veneno de *L. gaucho* venom e LgRec1 determinado por ELISA.

Anticorpos	Antígeno	
	Veneno de <i>L. gaucho</i>	LgRec1
Anti-LgRec1	8,000 [#]	128,000
Anti-Lg	32,000	256,000
SAAr	2,048,000	4,096,000
MoALg1	64,000	256,000

[#] Título de ELISA. Os títulos representam o recíproco da maior diluição que promove uma absorbância maior que 0,050 a 492 nm, sendo que reações não específicas foram observadas abaixo desse valor.

4.13 Western Blotting

Para analisar o reconhecimento da LgRec1 pelos soros produzidos contra componentes do veneno (SAAr, MoALg1 e anti-Lg) e pelo soro policlonal produzido contra a proteína recombinante (anti-LgRec1) foi empregada a técnica de *Western Blotting*. O veneno total de *L. gaucho* serviu de controle positivo, pois é reconhecido por todos os soros utilizados.

Primeiramente, as amostras de veneno de *L. gaucho* e a LgRec1 foram submetidas a um gel de SDS-PAGE 12,5%, foi corado por prata (Figura 20A), no qual a toxina recombinante apresentou uma massa molecular de aproximadamente 32 kDa. Posteriormente, em outro gel, contendo as mesmas amostras, foi realizado o *Western Blotting*. Observando a Figura 20B, tanto o soro anti-LgRec1, quanto o anticorpo monoclonal MoALg1 reconheceram uma banda única no veneno bruto de

L. gaucho indicando um motivo conservado entre LgRec1 e outras FLDs nativas presentes no veneno (Barbaro *et al.*, 1994; BARBARO *et al.*, 1996).

Como esperado, muitos componentes do veneno foram reconhecidos por anti-Lg e o soro antiaracnídico (SAAr), visto que ambos são soros policlonais e, portanto, capazes de reconhecer diversos componentes do veneno total.

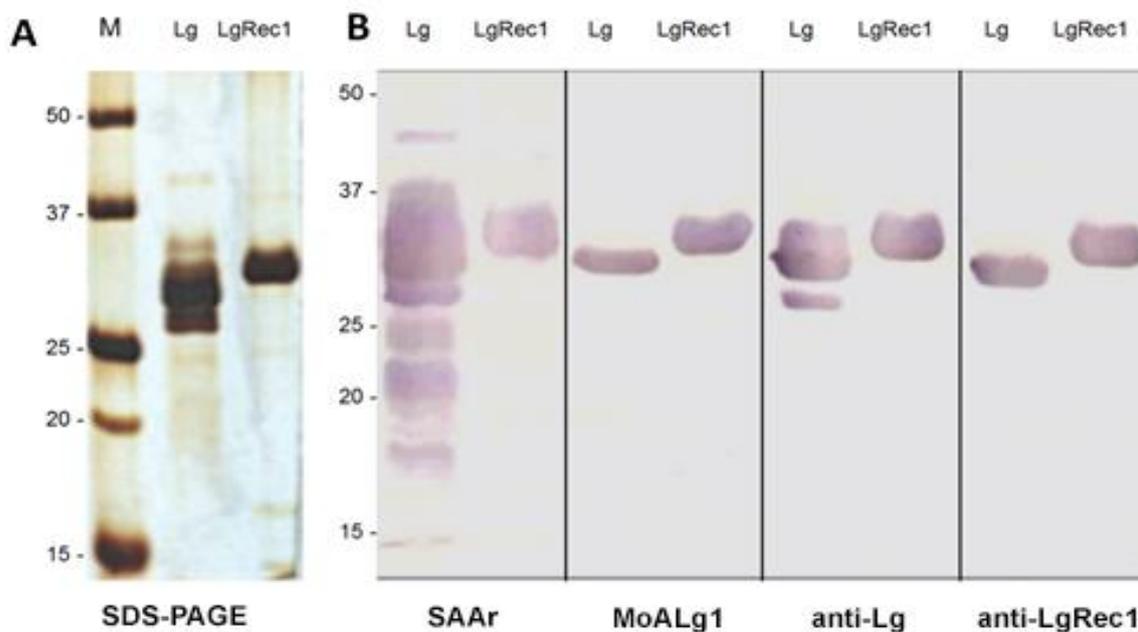


Figura 20 - Análise de Western blotting. (A) Gel de SDS-PAGE 12% corado por prata contendo veneno de *L. gaucho* (Lg) e a toxina recombinante LgRec1. (B) Western blotting do veneno total de *L. gaucho* (Lg) e a toxina recombinante LgRec1. As proteínas foram fracionadas por SDS-PAGE, transferidas para uma membrana de nitrocelulose e incubadas individualmente com soro anti-aracnídico (SAAr), anticorpo monoclonal contra proteínas dermonecroticas de veneno de *L. gaucho* (MoALg1), soro policlonal anti-*L. gaucho* (anti-Lg) e soro policlonal contra a proteína recombinante LgRec1 (anti-LgRec1). Os números à esquerda correspondem à posição dos marcadores de massa molecular (M).

4.14 Propriedades neutralizantes de anti-LgRec1 contra o veneno de *L. gaucho*

Uma vez que o soro anti-LgRec1 reconhecia uma fração correspondente às toxinas dermonecrótica no veneno de *L. gaucho*, o seu potencial para neutralizar as atividades tóxicas deste veneno foi avaliado *in vivo*. Assim, o soro anti-LgRec1 foi incubado com diferentes quantidades de veneno bruto e injetado por via intradérmica no flanco dorsal de coelhos adultos. A área da lesão foi medida 24 e 48 horas após a injeção para determinar a extensão da dermonecrose e a reação local. De acordo com a Figura 21A, o soro anti-LgRec1 neutralizou a reação inflamatória, principalmente na dose mais baixa do veneno de *L. gaucho* (cerca de 70%), enquanto que a dermonecrose foi quase completamente abolida, mesmo quando doses mais elevadas de veneno foram utilizadas (Figura 21B).

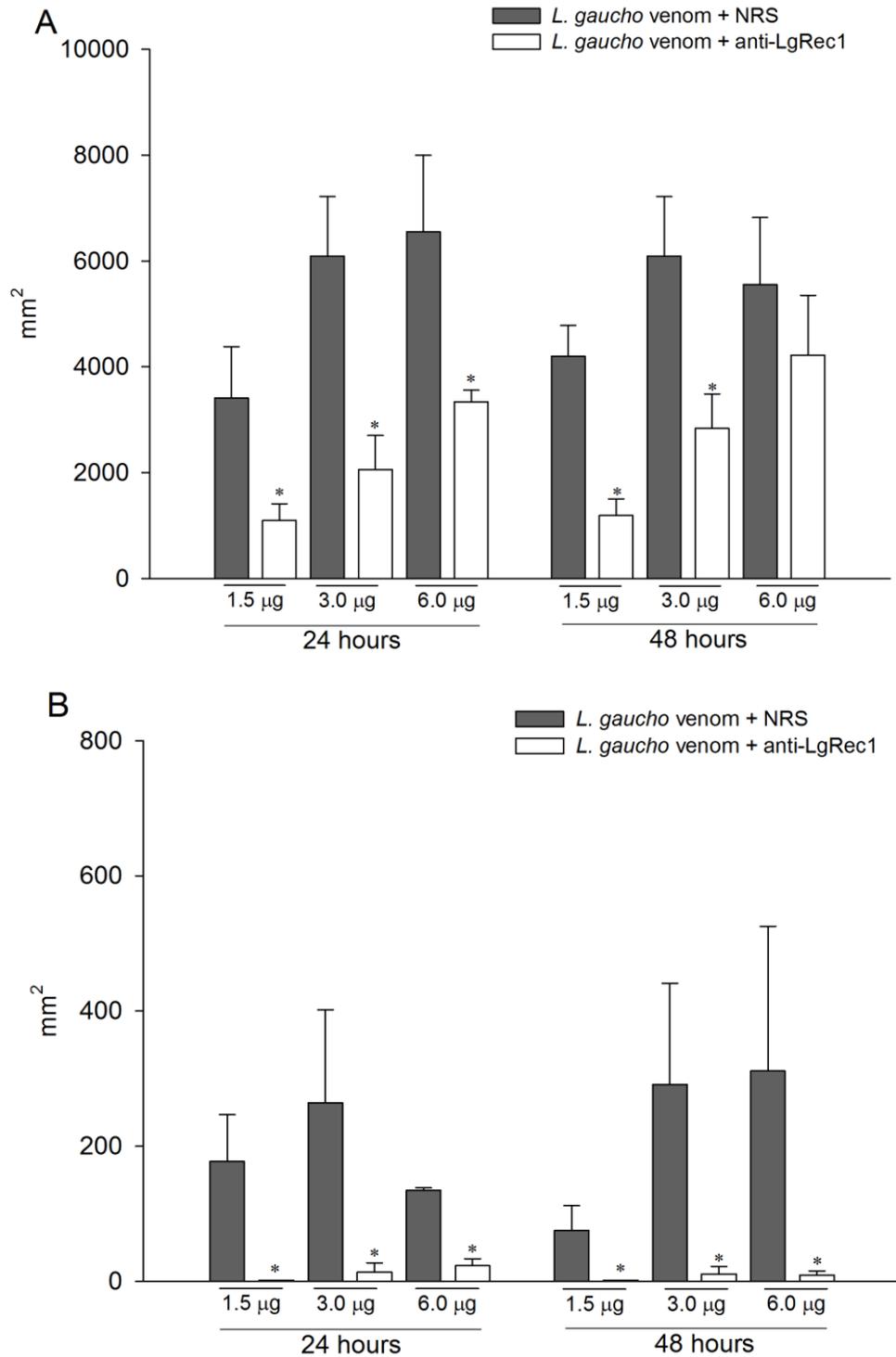


Figura 21 - Áreas de edema / eritema / equimoses / palidez (A) e dermonecrosis (B) induzida pelo veneno de *L. gaucho* (1,5/ 3,0 e 6,0 μg), após incubação com soro normal de coelho (NRS), ou anti-soro LgRec1. Diferentes quantidades de veneno bruto foram incubadas com 0,2 mL de anti-soro LgRec1 durante 30 min a 37°C, centrifugadas e o sobrenadante injectado ID no dorso de coelhos. As zonas de reacção local (mm²) foram medidas 24 e 48 h após a injeção.

5. DISCUSSÃO

Os acidentes provocados por aranhas do gênero *Loxosceles* levam ao desenvolvimento de uma síndrome conhecida como loxoscelismo. Os sintomas associados à essa síndrome incluem lesão dermonecrótica, espalhamento gravitacional e intensa resposta inflamatória. Além disso, o quadro clínico pode progredir para sintomas sistêmicos incluindo distúrbios hematológicos e falência renal (FUTRELL, 1992; SWANSON e VETTER, 2006).

Os venenos de aranhas, assim como de outros animais peçonhentos, são uma mistura complexa de diversas proteínas, toxinas e componentes de baixo peso molecular (CHAIM *et al.*, 2011). O veneno destas aranhas é constituído em sua grande maioria por toxinas de massa molecular de 32-35 kDa, denominadas de Fosfolipases D (FLDs). Estas toxinas estão associadas aos principais efeitos sistêmicos observados no loxoscelismo (TAMBOURGI *et al.*, 2010). Devido à importância dessas FLDs no envenenamento, grande esforço tem sido realizado para entender os mecanismos moleculares e celulares do envenenamento a partir do estudo dessas toxinas.

Contudo, apesar de vários estudos realizados, o mecanismo de ação das toxinas presentes no veneno deste gênero ainda não está totalmente esclarecido. Um dos principais obstáculos a este estudo é a pequena quantidade de veneno extraída por animal e, o isolamento posterior de suas toxinas. Deste modo, muitas FLDs foram clonadas a partir de glândulas de veneno de *L. intermedia* (KALAPOTHAKIS *et al.*, 2002; DA SILVEIRA *et al.*, 2006; DA SILVEIRA *et al.*, 2007; KALAPOTHAKIS *et al.*, 2007; RIBEIRO *et al.*, 2007) e *L. laeta* (FERNANDES-PEDROSA *et al.*, 2002; TAMBOURGI *et al.*, 2004; DE SANTI-FERRARA *et al.*, 2009; CATALAN *et al.*, 2011) e expressas em sistema bacteriano, permitindo assim a obtenção de maiores quantidades dessas FLDs, tornando possível até mesmo a determinação de estruturas cristalográficas (BARBARO *et al.*, 1994; MURAKAMI *et al.*, 2006; DE GIUSEPPE *et al.*, 2011).

Apesar do sucesso desses trabalhos na obtenção de quantidades significativas de FLDs de espécies de *Loxosceles*, até o presente momento, nenhuma FLDs de *L. gaucho* foi clonada e expressa em sistema heterólogo.

Portanto, neste trabalho, mostramos a clonagem e caracterização biológica de uma FLD, denominada LgRec1, a partir de glândulas de veneno de *L. gaucho*.

No processo de clonagem utilizamos *primers* degenerados concebidos através do alinhamento de cDNAs de FLDs descritos para outras espécies de *Loxosceles* que possuem elevada atividade fosfolipásica, tais como a SMase I, LiRecDT2, LiRecDT1 e SMase D. Após a clonagem e sequenciamento, verificamos que dentre as FLDs utilizadas para desenhar os *primers* degenerados, a LgRec1 apresentou maior identidade com a SMase D (79,64%). No entanto, uma pesquisa de nucleotídeos no BLAST mostrou que LgRec1 partilha identidade muito mais elevada (93%, E-value = 0) com uma esfingomielina fosfodiesterase-D LvSicTox alphaC1ai (COJAZ1) do veneno de *L. variegata*. Vale ressaltar que, uma vez que os *primers* degenerados foram desenhados imediatamente antes da sequência N-terminal das FLDs, o peptídeo sinal da LgRec1 não pôde ser determinado.

A expressão da proteína recombinante LgRec1 foi realizada com sucesso em *E. coli* e a inoculação desta proteína purificada em pele de coelho promoveu o desenvolvimento de reação local (edema, eritema, equimose e palidez) e dermonecrose de forma semelhante ao veneno total e sintomas análogos aos observados com outras FLDs recombinantes de *L. intermedia* (DA SILVEIRA *et al.*, 2007; APPEL *et al.*, 2008) e *L. laeta* (FERNANDES-PEDROSA *et al.*, 2002; DE SANTI-FERRARA *et al.*, 2009). Além disso, LgRec1 promoveu agregação plaquetária em uma concentração de 5 µg/mL. Esta atividade biológica também tem sido descrita para outras FLDs recombinantes testadas em PRP. Felicori *et al.* (2006) demonstraram que recLiD1, uma esfingomielinase recombinante, promoveu a agregação plaquetária de maneira dose dependente e da Silveira *et al.* (2007) mostraram que duas FLDs recombinantes, LiRecDT4 e LiRecDT5, exibiram diferentes efeitos sobre a agregação plaquetária. Embora a LgRec1 tenha induzido agregação plaquetária em PRP, esta atividade não foi observada em plaquetas lavadas. Também pudemos observar que a LgRec1 não alterou a viabilidade das plaquetas, sendo que as mesmas continuavam ainda responsivas a estímulos de trombina após o tratamento com a toxina recombinante.

FLDs de *Loxosceles* são capazes de hidrolisar esfingomielina promovendo a geração de ceramida 1-fosfato (C1P), bem como lisofosfolipídeos gerando o mediador lipídico ácido lisofosfatídico (LPA) (MURAKAMI *et al.*, 2006). Sabe-se que o mediador LPA pode ativar células endoteliais e leucócitos (ZHAO e NATARAJAN,

2009), bem como induzir a ativação e agregação de plaquetas através da estimulação dos receptores LPA3 e LPA1 (ROTHER *et al.*, 2003; CATALAN *et al.*, 2011). Portanto, acredita-se que LPA possa ser responsável pela atividade de agregação de plaquetas. No entanto, os estudos de Tavares *et al* (2011) utilizando veneno de *L. gaucho* e sua fração FLD sugerem que esta atividade não é dependente da via de LPA. Sendo assim, mais estudos devem ser realizados a fim de esclarecer o mecanismo pelo qual FLDs induzem a agregação plaquetária em plasma.

Vários estudos têm demonstrado que FLDs isoladas do veneno de *Loxosceles* apresentam atividade hemolítica *in vitro* (RIBEIRO *et al.*, 2007; CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2009; TAMBOURGI *et al.*, 2010). Neste estudo, para o tratamento proposto (uma hora de incubação com a LgRec1), observamos atividade hemolítica somente no ensaio indireto (com adição de soro). Estudos têm demonstrado que FLDs isoladas do veneno de *Loxosceles* promove hemólise por ativação do sistema complemento facilitando a ligação direta de C1q à membrana do eritrócito, que provoca ativação da via clássica resultando na hemólise (TAMBOURGI *et al.*, 2002; TAMBOURGI *et al.*, 2007). Contudo, experiências realizadas sem fatores do complemento mostram que a hemólise é dependente do metabolismo de fosfolípidos de membrana, tais como esfingomiélin e lisofosfatidilcolina, gerando produtos bioativos que estimulam o influxo de cálcio para as células vermelhas do sangue (CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2011). Portanto, estes dois mecanismos podem agir em conjunto para causar hemólise *in vivo*.

A fim de determinar quais atividades biológicas são dependentes da atividade catalítica de uma FLD (KUSMA *et al.*, 2008), a proteína recombinante LiRecDT1, isolada do veneno de *L. intermedia* foi comparada com a sua forma mutada, em que a histidina (His12) foi substituída por uma alanina. Os resultados mostraram que a atividade catalítica desempenha um papel essencial na nefrotoxicidade (KUSMA *et al.*, 2008), na hemólise direta de hemácias humanas (CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2009), na atividade esfingomiélinásica e dermonecrótica (CHAIM *et al.*, 2011). No entanto, esta mutação não interfere com a propriedade da molécula de ligação aos lípidos, provavelmente devido aos domínios hidrofóbicos presentes na molécula que podem ligar-se a lípidos (CHAIM *et al.*, 2011).

A análise por *Western Blot*, mostrou que a LgRec1 foi reconhecida pelo soro antiaracnídico (SAAr) e pelo soro policlonal produzido contra a fração de proteínas

dermonecróticas purificadas do veneno bruto de *Loxosceles gaucho* (anti-Lg). Além disso, o soro produzido em coelhos contra a proteína recombinante foi capaz de reconhecer uma única banda no veneno bruto.

A utilização de misturas de FLDs recombinantes para produzir anticorpos eficazes na neutralização do veneno de *Loxosceles* vem sendo explorada com resultados interessantes. Deste modo, Olvera *et al.* (2006) demonstraram que o soro polivalente de cavalo preparado a partir de uma mistura de FLDs recombinantes (Lb1 de *Loxosceles boneti*, Lr1 de *L. reclusa* e LI1 de *L. laeta*) neutralizou a letalidade destes três venenos. Além disso, de Almeida *et al.* (2008) também utilizando uma mistura de FLDs (P1 e P2 de *L. intermedia* e SMase I de *L. laeta*), produziu um soro anti-*Loxosceles* que mostrou alta capacidade de neutralização contra os venenos de *L. intermedia* e *L. laeta*. No entanto, este anti-soro mostrou ser menos eficaz para neutralizar os efeitos tóxicos do veneno de *L. gaúcho*, sugerindo que pequenas diferenças nas FLDs de *L. gaucho* podem ter evitado a neutralização das principais atividades evocadas por estas moléculas.

Portanto, estas observações nos levaram a produzir anticorpos contra LgRec1 e avaliar a capacidade protetora deste anti-soro na neutralização contra o veneno de *L. gaucho*. Os resultados demonstraram que anticorpos contra LgRec1 foram capazes de neutralizar a reação local e a atividade dermonecrótica em cerca de 70% e 100%, respectivamente. Deste modo, a adição de LgRec1 na formulação do soro de imunização contra as três espécies de *Loxosceles* de importância médica no Brasil, pode ser uma abordagem interessante na produção de antiveneno.

Em resumo, os resultados apresentados aqui descrevem a clonagem de uma FLD de *L. gaucho* e mostram suas principais atividades biológicas. Os nossos resultados apontam para o uso pontencial da LgRec1 para produção de anticorpos protetores em conjunto com outras FLDs de *Loxosceles*. Além disso, a comparação da sequência da LgRec1, juntamente com predições 3D de outras fosfolipases D depositadas nos bancos de dados, poderá ser útil para determinar possíveis peptídeos imunogênicos, explorando desta forma, partes da molécula que possam ser utilizadas para produção de anticorpos neutralizantes.

6. CONCLUSÕES

A estratégia de clonagem adotada nesse trabalho, utilizando *primers* degenerados obtidos a partir de sequências de FLDs já descritas na literatura, mostrou-se eficiente para obtenção do cDNA, que codifica a proteína LgRec1 a partir de glândulas de veneno de *L. gaucho*. A expressão da LgRec1 na forma solúvel foi realizada com sucesso em sistema bacteriano, com um rendimento de 3,2 mg por litro de cultura.

A LgRec1 mostrou as principais atividades biológicas descritas para FDLs nativas do veneno de aranhas do gênero *Loxosceles*, como a capacidade de promover reação local e dermonecrose *in vivo* e atividade esfingomielinásica *in vitro*. Além disso, a LgRec1 foi capaz de promover agregação plaquetária e atividade hemolítica em hemácias humanas, indicando que ambas atividades dependem de componentes plasmáticos.

O soro policlonal anti-LgRec1 foi capaz de neutralizar os principais efeitos locais e dermonecrose, observados no envenenamento por *L. gaucho*. Dessa forma, a utilização da LgRec1 em conjunto com outras FLDs recombinantes de *Loxosceles* pode ser promissora para a produção de anticorpos protetores contra o veneno total.

Em conjunto, os dados produzidos neste trabalho podem contribuir significativamente para uma melhor compreensão do mecanismo desta molécula sobre a fisiopatologia do envenenamento loxoscélico.

REFERÊNCIAS

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. **Biochim Biophys Acta**, v. 1780, n. 2, p. 167-78, 2008.

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

BARBARO, K. C.; CARDOSO, J. L.; EICKSTEDT, V. R.; MOTA, I. Dermonecrotic and lethal components of *Loxosceles gaucho* spider venom. **Toxicon**, v. 30, n. 3, p. 331-8, 1992.

BARBARO, K. C.; EICKSTEDT, V. R.; MOTA, I. Antigenic cross-reactivity of venoms from medically important *Loxosceles* (Araneae) species in Brazil. **Toxicon**, v. 32, n. 1, p. 113-20, 1994.

BARBARO, K. C.; KNYSAK, I.; MARTINS, R.; HOGAN, C.; WINKEL, K. Enzymatic characterization, antigenic cross-reactivity and neutralization of dermonecrotic activity of five *Loxosceles* spider venoms of medical importance in the Americas. **Toxicon**, v. 45, n. 4, p. 489-99, 2005.

BARBARO, K. C.; SOUSA, M. V.; MORHY, L.; EICKSTEDT, V. R.; MOTA, I. Compared chemical properties of dermonecrotic and lethal toxins from spiders of the genus *Loxosceles* (Araneae). **J Protein Chem**, v. 15, n. 4, p. 337-43, 1996.

BARRETT, S. M.; ROMINE-JENKINS, M.; BLICK, K. E. Passive hemagglutination inhibition test for diagnosis of brown recluse spider bite envenomation. **Clin Chem**, v. 39, n. 10, p. 2104-7, 1993.

BINFORD, G. J.; CORDES, M. H.; WELLS, M. A. Sphingomyelinase D from venoms of *Loxosceles* spiders: evolutionary insights from cDNA sequences and gene structure. **Toxicon**, v. 45, n. 5, p. 547-60, 2005.

BIRKEDAL-HANSEN, H.; MOORE, W. G.; BODDEN, M. K.; WINDSOR, L. J.; BIRKEDAL-HANSEN, B.; DECARLO, A.; ENGLER, J. A. Matrix metalloproteinases: a review. **Crit Rev Oral Biol Med**, v. 4, n. 2, p. 197-250, 1993.

BOMMER, U. A.; THIELE, B. J. The translationally controlled tumour protein (TCTP). **Int J Biochem Cell Biol**, v. 36, n. 3, p. 379-85, 2004.

BONNET, M. The *Loxosceles* spider. **Brit Homoeop journal**, v. 85, p. 205-213, 1996.

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

BUCARETCHI, F.; DE CAPITANI, E. M.; HYSLOP, S.; SUTTI, R.; ROCHA-E-SILVA, T. A.; BERTANI, R. Cutaneous loxoscelism caused by *Loxosceles anomala*. **Clin Toxicol (Phila)**, v. 48, n. 7, p. 764-5, 2010.

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

CHAIM, O. M.; DA SILVEIRA, R. B.; TREVISAN-SILVA, D.; FERRER, V. P.; SADE, Y. B.; BOIA-FERREIRA, M.; GREMSKI, L. H.; GREMSKI, W.; SENFF-RIBEIRO, A.; TAKAHASHI, H. K.; TOLEDO, M. S.; NADER, H. B.; VEIGA, S. S. Phospholipase-D activity and inflammatory response induced by brown spider dermonecrotic toxin: endothelial cell membrane phospholipids as targets for toxicity. **Biochim Biophys Acta**, v. 1811, n. 2, p. 84-96, 2011.

CHAIM, O. M.; SADE, Y. B.; DA SILVEIRA, R. B.; TOMA, L.; KALAPOTHAKIS, E.; CHAVEZ-OLORTEGUI, C.; MANGILI, O. C.; GREMSKI, W.; VON DIETRICH, C. P.; NADER, H. B.; SANCHES VEIGA, S. Brown spider dermonecrotic toxin directly induces nephrotoxicity. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 211, n. 1, p. 64-77, 2006.

CHAIM, O. M.; TREVISAN-SILVA, D.; CHAVES-MOREIRA, D.; WILLE, A. C.; FERRER, V. P.; MATSUBARA, F. H.; MANGILI, O. C.; DA SILVEIRA, R. B.; GREMSKI, L. H.; GREMSKI, W.; SENFF-RIBEIRO, A.; VEIGA, S. S. Brown spider (*Loxosceles* genus) venom toxins: tools for biological purposes. **Toxins (Basel)**, v. 3, n. 3, p. 309-44, 2011.

CHANG, C.; WERB, Z. The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. **Trends Cell Biol**, v. 11, n. 11, p. S37-43, 2001.

CHAVES-MOREIRA, D.; CHAIM, O. M.; SADE, Y. B.; PALUDO, K. S.; GREMSKI, L. H.; DONATTI, L.; DE MOURA, J.; MANGILI, O. C.; GREMSKI, W.; DA SILVEIRA, R. B.; SENFF-RIBEIRO, A.; VEIGA, S. S. Identification of a direct hemolytic effect dependent on the catalytic activity induced by phospholipase-D (dermonecrotic toxin) from brown spider venom. **J Cell Biochem**, v. 107, n. 4, p. 655-66, 2009.

CHAVES-MOREIRA, D.; SOUZA, F. N.; FOGACA, R. T.; MANGILI, O. C.; GREMSKI, W.; SENFF-RIBEIRO, A.; CHAIM, O. M.; VEIGA, S. S. The relationship between calcium and the metabolism of plasma membrane phospholipids in hemolysis induced by brown spider venom phospholipase-D toxin. **J Cell Biochem**, v. 112, n. 9, p. 2529-40, 2011.

CUNHA, R. B.; BARBARO, K. C.; MURAMATSU, D.; PORTARO, F. C.; FONTES, W.; DE SOUSA, M. V. Purification and characterization of loxnecrogin, a dermonecrotic toxin from *Loxosceles gaucho* brown spider venom. **J Protein Chem**, v. 22, n. 2, p. 135-46, 2003.

DA SILVA, P. H.; DA SILVEIRA, R. B.; APPEL, M. H.; MANGILI, O. C.; GREMSKI, W.; VEIGA, S. S. Brown spiders and loxoscelism. **Toxicon**, v. 44, n. 7, p. 693-709, 2004.

DA SILVEIRA, R. B.; DOS SANTOS FILHO, J. F.; MANGILI, O. C.; VEIGA, S. S.; GREMSKI, W.; NADER, H. B.; VON DIETRICH, C. P. Identification of proteases in the extract of venom glands from brown spiders. **Toxicon**, v. 40, n. 6, p. 815-22, 2002.

DA SILVEIRA, R. B.; PIGOZZO, R. B.; CHAIM, O. M.; APPEL, M. H.; DREYFUSS, J. L.; TOMA, L.; MANGILI, O. C.; GREMSKI, W.; DIETRICH, C. P.; NADER, H. B.; VEIGA, S. S. Molecular cloning and functional characterization of two isoforms of dermonecrotic toxin from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom gland. **Biochimie**, v. 88, n. 9, p. 1241-53, 2006.

DA SILVEIRA, R. B.; PIGOZZO, R. B.; CHAIM, O. M.; APPEL, M. H.; SILVA, D. T.; DREYFUSS, J. L.; TOMA, L.; DIETRICH, C. P.; NADER, H. B.; VEIGA, S. S.; GREMSKI, W. Two novel dermonecrotic toxins LiRecDT4 and LiRecDT5 from brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom: from cloning to functional characterization. **Biochimie**, v. 89, n. 3, p. 289-300, 2007.

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

DE CASTRO, C. S.; SILVESTRE, F. G.; ARAUJO, S. C.; GABRIEL DE, M. Y.; MANGILI, O. C.; CRUZ, I.; CHAVEZ-OLORTEGUI, C.; KALAPOTHAKIS, E. Identification and molecular cloning of insecticidal toxins from the venom of the brown spider *Loxosceles intermedia*. **Toxicon**, v. 44, n. 3, p. 273-80, 2004.

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

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

DOS SANTOS, L. D.; DIAS, N. B.; ROBERTO, J.; PINTO, A. S.; PALMA, M. S. Brown recluse spider venom: proteomic analysis and proposal of a putative mechanism of action. **Protein Pept Lett**, v. 16, n. 8, p. 933-43, 2009.

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. **J Invest Dermatol**, v. 127, n. 5, p. 1264-6, 2007.

FEITOSA, L.; GREMSKI, W.; VEIGA, S. S.; ELIAS, M. C.; GRANER, E.; MANGILI, O. C.; BRENTANI, R. R. Detection and characterization of metalloproteinases with gelatinolytic, fibronectinolytic and fibrinogenolytic activities in brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. **Toxicon**, v. 36, n. 7, p. 1039-51, 1998.

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

FERNANDES-PEDROSA M., F.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO I., L.; GONCALVES-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**, v. 9, p. 279, 2008.

FERNANDES-PEDROSA M., F.; JUNQUEIRA DE AZEVEDO IDE, 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. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 298, n. 5, p. 638-45, 2002.

FOELIX, R. F. **Biology of spiders**. 3 rd. New York , USA: Oxford University Press, 2011.

FORRESTER, L. J.; BARRETT, J. T.; CAMPBELL, B. J. Red blood cell lysis induced by the venom of the brown recluse spider: the role of sphingomyelinase D. **Arch Biochem Biophys**, v. 187, n. 2, p. 355-65, 1978.

FUTRELL, J. Loxoscelism. **American Journal Medical Science**, v. 304, p. 261-267, 1992.

GOMES, T. D. C. **Citólise mediada pela Leishporina de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*: Requisitos para a ligação da citolisia à membrana, visualização de estruturas *pore-like* e estratégias para sua identificação molecular**. 117 f. Tese (Doutorado em Bioquímica e Imunologia)- Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

GREMSKI, L. H.; DA SILVEIRA, R. B.; CHAIM, O. M.; PROBST, C. M.; FERRER, V. P.; NOWATZKI, J.; WEINSCHUTZ, H. C.; MADEIRA, H. M.; GREMSKI, W.; NADER, H. B.; SENFF-RIBEIRO, A.; VEIGA, S. S. A novel expression profile of the *Loxosceles intermedia* spider venomous gland revealed by transcriptome analysis. **Mol Biosyst**, v. 6, n. 12, p. 2403-16, 2010.

GUILHERME, P.; FERNANDES, I.; BARBARO, K. C. Neutralization of dermonecrotic and lethal activities and differences among 32-35 kDa toxins of medically important *Loxosceles* spider venoms in Brazil revealed by monoclonal antibodies. **Toxicon**, v. 39, n. 9, p. 1333-42, 2001.

HOGAN, C. J.; BARBARO, K. C.; WINKEL, K. Loxoscelism: old obstacles, new directions. **Ann Emerg Med**, v. 44, n. 6, p. 608-24, 2004.

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

KALAPOTHAKIS, E.; ARAUJO, S. C.; DE CASTRO, C. S.; MENDES, T. M.; GOMEZ, M. V.; MANGILI, O. C.; GUBERT, I. C.; CHAVEZ-OLORTEGUI, C. Molecular cloning, expression and immunological properties of LiD1, a protein from

the dermonecrotic family of *Loxosceles intermedia* spider venom. **Toxicon**, v. 40, n. 12, p. 1691-9, 2002.

KALAPOTHAKIS, E.; CHATZAKI, M.; GONCALVES-DORNELAS, H.; DE CASTRO, C. S.; SILVESTRE, F. G.; LABORNE, F. V.; DE MOURA, J. F.; VEIGA, S. S.; CHAVEZ-OLORTEGUI, C.; GRANIER, C.; BARBARO, K. C. The Loxtox protein family in *Loxosceles intermedia* (Mello-Leitão) venom. **Toxicon**, v. 50, n. 7, p. 938-46, 2007.

KURPIEWSKI, G.; FORRESTER, L. J.; BARRETT, J. T.; CAMPBELL, B. J. Platelet aggregation and sphingomyelinase D activity of a purified toxin from the venom of *Loxosceles reclusa*. **Biochim Biophys Acta**, v. 678, n. 3, p. 467-76, 1981.

KUSMA, J.; CHAIM, O. M.; WILLE, A. C.; FERRER, V. P.; SADE, Y. B.; DONATTI, L.; GREMSKI, W.; MANGILI, O. C.; VEIGA, S. S. Nephrotoxicity caused by brown spider venom phospholipase-D (dermonecrotic toxin) depends on catalytic activity. **Biochimie**, v. 90, n. 11-12, p. 1722-36, 2008.

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

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

LUCIANO, M. N.; DA SILVA, P. H.; CHAIM, O. M.; DOS SANTOS, V. L.; FRANCO, C. R.; SOARES, M. F.; ZANATA, S. M.; MANGILI, O. C.; GREMSKI, W.; VEIGA, S. S. Experimental evidence for a direct cytotoxicity of *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom in renal tissue. **J Histochem Cytochem**, v. 52, n. 4, p. 455-67, 2004.

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**, v. 5, n. 8, p. 2167-76, 2005.

MALAUQUE, C. M.; CASTRO-VALENCIA, J. E.; CARDOSO, J. L.; FRANCCA, F. O.; BARBARO, K. C.; FAN, H. W. Clinical and epidemiological features of definitive and presumed loxoscelism in São Paulo, Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 44, n. 3, p. 139-43, 2002.

MOSS, G. P. **Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology**. London: School of Biological and Chemical Sciences, University of London. 2014 2013.

MURAKAMI, M. T.; FERNANDES-PEDROSA, M. F.; DE ANDRADE, S. A.; GABDOULKHAKOV, A.; BETZEL, C.; TAMBOURGI, D. V.; ARNI, R. K. Structural insights into the catalytic mechanism of sphingomyelinases D and evolutionary relationship to glycerophosphodiester phosphodiesterases. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 342, n. 1, p. 323-9, 2006.

OLVERA, A.; RAMOS-CERRILLO, B.; ESTEVEZ, J.; CLEMENT, H.; DE ROODT, A.; PANIAGUA-SOLIS, J.; VAZQUEZ, H.; ZAVALETA, A.; ARRUZ, M. S.; STOCK, R. P.; ALAGON, A. North and South American *Loxosceles* spiders: development of a polyvalent antivenom with recombinant sphingomyelinases D as antigens. **Toxicon**, v. 48, n. 1, p. 64-74, 2006.

PAIXAO-CAVALCANTE, D.; VAN DEN BERG, C. W.; DE FREITAS FERNANDES-PEDROSA, M.; GONCALVES DE ANDRADE, R. M.; TAMBOURGI, D. V. Role of matrix metalloproteinases in HaCaT keratinocytes apoptosis induced by *Loxosceles* venom sphingomyelinase D. **J Invest Dermatol**, v. 126, n. 1, p. 61-8, 2006.

PAULI, I.; MINOZZO, J. C.; DA SILVA, P. H.; CHAIM, O. M.; VEIGA, S. S. Analysis of therapeutic benefits of antivenin at different time intervals after experimental envenomation in rabbits by venom of the brown spider (*Loxosceles intermedia*). **Toxicon**, v. 53, n. 6, p. 660-71, 2009.

PAULI, I.; PUKA, J.; GUBERT, I. C.; MINOZZO, J. C. The efficacy of antivenom in loxoscelism treatment. **Toxicon**, v. 48, n. 2, p. 123-37, 2006.

PLATNICK, N. **The world spider catalog, version 13.5..** *American Museum of Natural History*. <http://research.amnh.org/iz/spiders/catalog/SICARIIDAE.html>. Acesso em 15 Jul. de 2013.

RAMOS-CERRILLO, B.; OLVERA, A.; ODELL, G. V.; ZAMUDIO, F.; PANIAGUA-SOLIS, J.; ALAGON, A.; STOCK, R. P. Genetic and enzymatic characterization of sphingomyelinase D isoforms from the North American fiddleback spiders *Loxosceles boneti* and *Loxosceles reclusa*. **Toxicon**, v. 44, n. 5, p. 507-14, 2004.

RAMOS, C. R.; ABREU, P. A.; NASCIMENTO, A. L.; HO, P. L. A high-copy T7 *Escherichia coli* expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide. **Braz J Med Biol Res**, v. 37, n. 8, p. 1103-9, 2004.

RIBEIRO, R. O.; CHAIM, O. M.; DA SILVEIRA, R. B.; GREMSKI, L. H.; SADE, Y. B.; PALUDO, K. S.; SENFF-RIBEIRO, A.; DE MOURA, J.; CHAVEZ-OLORTEGUI, C.; GREMSKI, W.; NADER, H. B.; VEIGA, S. S. Biological and structural comparison of recombinant phospholipase D toxins from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. **Toxicon**, v. 50, n. 8, p. 1162-74, 2007.

ROTHER, E.; BRANDL, R.; BAKER, D. L.; GOYAL, P.; GEBHARD, H.; TIGYI, G.; SIESS, W. Subtype-selective antagonists of lysophosphatidic Acid receptors inhibit platelet activation triggered by the lipid core of atherosclerotic plaques. **Circulation**, v. 108, n. 6, p. 741-7, 2003.

SALES, P. B.; SANTORO, M. L. Nucleotidase and DNase activities in Brazilian snake venoms. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**, v. 147, n. 1, p. 85-95, 2008.

SAMS, H. H.; DUNNICK, C. A.; SMITH, M. L.; KING, L. E., JR. Necrotic arachnidism. **J Am Acad Dermatol**, v. 44, n. 4, p. 561-73; quiz 573-6, 2001.

SANTORO, M. L.; SOUSA-E-SILVA, M. C.; GONCALVES, L. R.; ALMEIDA-SANTOS, S. M.; CARDOSO, D. F.; LAPORTA-FERREIRA, I. L.; SAIKI, M.; PERES, C. A.; SANO-MARTINS, I. S. Comparison of the biological activities in venoms from three subspecies of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*, *C. durissus cascavella* and *C. durissus collilineatus*). **Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol**, v. 122, n. 1, p. 61-73, 1999.

SAÚDE, M. D. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. p. 52-56, 2001. Portal da saúde. <http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude>. Acesso em 07 Jul. de 2013.

SCHROEDER, F. C.; TAGGI, A. E.; GRONQUIST, M.; MALIK, R. U.; GRANT, J. B.; EISNER, T.; MEINWALD, J. NMR-spectroscopic screening of spider venom reveals sulfated nucleosides as major components for the brown recluse and related species. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 38, p. 14283-7, 2008.

SENFF-RIBEIRO, A.; HENRIQUE DA SILVA, P.; CHAIM, O. M.; GREMSKI, L. H.; PALUDO, K. S.; BERTONI DA SILVEIRA, R.; GREMSKI, W.; MANGILI, O. C.; VEIGA, S. S. Biotechnological applications of brown spider (*Loxosceles* genus) venom toxins. **Biotechnol Adv**, v. 26, n. 3, p. 210-8, 2008.

SEZERINO, U. M.; ZANNIN, M.; COELHO, L. K.; GONCALVES JUNIOR, J.; GRANDO, M.; MATTOSINHO, S. G.; CARDOSO, J. L.; VON EICKSTEDT, V. R.; FRANCA, F. O.; BARBARO, K. C.; FAN, H. W. A clinical and epidemiological study

of *Loxosceles* spider envenoming in Santa Catarina, Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 92, n. 5, p. 546-8, 1998.

SIESS, W. Athero- and thrombogenic actions of lysophosphatidic acid and sphingosine-1-phosphate. **Biochim Biophys Acta**, v. 1582, n. 1-3, p. 204-15, 2002.

SMITH, P. K.; KROHN, R. I.; HERMANSON, G. T.; MALLIA, A. K.; GARTNER, F. H.; PROVENZANO, M. D.; FUJIMOTO, E. K.; GOEKE, N. M.; OLSON, B. J.; KLENK, D. C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Anal Biochem**, v. 150, n. 1, p. 76-85, 1985.

STOCKER, W.; GRAMS, F.; BAUMANN, U.; REINEMER, P.; GOMIS-RUTH, 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 Sci**, v. 4, n. 5, p. 823-40, 1995.

SWANSON, D. L.; VETTER, R. S. Loxoscelism. **Clin Dermatol**, v. 24, n. 3, p. 213-21, 2006.

TAMBOURGI, D. V.; DE, F. F. P. M.; VAN DEN BERG, C. W.; GONCALVES-DE-ANDRADE, R. M.; FERRACINI, M.; PAIXAO-CAVALCANTE, D.; MORGAN, B. P.; RUSHMERE, N. K. Molecular cloning, expression, function and immunoreactivities of members of a gene family of sphingomyelinases from I venom glands. **Mol Immunol**, v. 41, n. 8, p. 831-40, 2004.

TAMBOURGI, D. V.; DE SOUSA DA SILVA, M.; BILLINGTON, S. J.; GONCALVES DE ANDRADE, R. M.; MAGNOLI, F. C.; SONGER, J. G.; VAN DEN BERG, C. W. Mechanism of induction of complement susceptibility of erythrocytes by spider and bacterial sphingomyelinases. **Immunology**, v. 107, n. 1, p. 93-101, 2002.

TAMBOURGI, D. V.; GONCALVES-DE-ANDRADE, R. M.; VAN DEN BERG, C. W. Loxoscelism: From basic research to the proposal of new therapies. **Toxicon**, v. 56, n. 7, p. 1113-9, 2010.

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

TAMBOURGI, D. V.; MAGNOLI, F. C.; VON EICKSTEDT, V. R.; BENEDETTI, Z. C.; PETRICEVICH, V. L.; DA SILVA, W. D. Incorporation of a 35-kilodalton purified protein from *Loxosceles intermedia* spider venom transforms human erythrocytes into activators of autologous complement alternative pathway. **J Immunol**, v. 155, n. 9, p. 4459-66, 1995.

TAMBOURGI, D. V.; MORGAN, B. P.; DE ANDRADE, R. M.; MAGNOLI, F. C.; VAN DEN BERG, C. W. *Loxosceles intermedia* spider envenomation induces activation of an endogenous metalloproteinase, resulting in cleavage of glycophorins from the erythrocyte surface and facilitating complement-mediated lysis. **Blood**, v. 95, n. 2, p. 683-91, 2000.

TAMBOURGI, D. V.; PAIXAO-CAVALCANTE, D.; GONCALVES DE ANDRADE, R. M.; FERNANDES-PEDROSA M., F.; MAGNOLI, F. C.; PAUL MORGAN, B.; VAN DEN BERG, C. W. *Loxosceles* sphingomyelinase induces complement-dependent dermonecrosis, neutrophil infiltration, and endogenous gelatinase expression. **J Invest Dermatol**, v. 124, n. 4, p. 725-31, 2005.

TAMBOURGI, D. V.; PEDROSA, M. F.; DE ANDRADE, R. M.; BILLINGTON, S. J.; GRIFFITHS, M.; VAN DEN BERG, C. W. Sphingomyelinases D induce direct association of C1q to the erythrocyte membrane causing complement mediated autologous haemolysis. **Mol Immunol**, v. 44, n. 4, p. 576-82, 2007.

TAMBOURGI, D. V.; PETRICEVICH, V. L.; MAGNOLI, F. C.; ASSAF, S. L.; JANCAR, S.; DIAS DA SILVA, W. Endotoxemic-like shock induced by *Loxosceles* spider venoms: pathological changes and putative cytokine mediators. **Toxicon**, v. 36, n. 2, p. 391-403, 1998.

TAVARES, F. L.; PEICHOTO, M. E.; RANGEL DDE, M.; BARBARO, K. C.; CIRILLO, M. C.; SANTORO, M. L.; SANO-MARTINS, I. S. *Loxosceles gaucho* spider venom and its sphingomyelinase fraction trigger the main functions of human and rabbit platelets. **Hum Exp Toxicol**, v. 30, n. 10, p. 1567-74, 2011.

TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 76, n. 9, p. 4350-4, 1979.

TREVISAN-SILVA, D.; GREMSKI, L. H.; CHAIM, O. M.; DA SILVEIRA, R. B.; MEISSNER, G. O.; MANGILI, O. C.; BARBARO, K. C.; GREMSKI, W.; VEIGA, S. S.; SENFF-RIBEIRO, A. Astacin-like metalloproteases are a gene family of toxins present in the venom of different species of the brown spider (genus *Loxosceles*). **Biochimie**, v. 92, n. 1, p. 21-32, 2010.

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

VASSILEVSKI, A. A.; KOZLOV, S. A.; GRISHIN, E. V. Molecular diversity of spider venom. **Biochemistry (Mosc)**, v. 74, n. 13, p. 1505-34, 2009.

VEIGA, S. S.; FEITOSA, L.; DOS SANTOS, V. L.; DE SOUZA, G. A.; RIBEIRO, A. S.; MANGILI, O. C.; PORCIONATTO, M. A.; NADER, H. B.; DIETRICH, C. P.; BRENTANI, R. R.; GREMSKI, W. Effect of brown spider venom on basement membrane structures. **Histochem J**, v. 32, n. 7, p. 397-408, 2000.

VEIGA, S. S.; ZANETTI, V. C.; FRANCO, C. R.; TRINDADE, E. S.; PORCIONATTO, M. A.; MANGILI, O. C.; GREMSKI, W.; DIETRICH, C. P.; NADER, H. B. In vivo and in vitro cytotoxicity of brown spider venom for blood vessel endothelial cells. **Thromb Res**, v. 102, n. 3, p. 229-37, 2001.

VETTER, R. S. Spiders of the genus *Loxosceles* (Araneae, Sicariidae): a review of biological, medical and psychological aspects regarding envenomations. **The J. Arach.**, v. 36, p. 150-163, 2008.

WANG, W. J.; SHIH, C. H.; HUANG, T. F. Primary structure and antiplatelet mechanism of a snake venom metalloproteinase, acurhagin, from *Agkistrodon acutus* venom. **Biochimie**, v. 87, n. 12, p. 1065-77, 2005.

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

ZHAO, Y.; NATARAJAN, V. Lysophosphatidic acid signaling in airway epithelium: role in airway inflammation and remodeling. **Cell Signal**, v. 21, n. 3, p. 367-77, 2009.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Biochimie

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

Research paper

Cloning, expression and characterization of a phospholipase D from *Loxosceles gaucho* venom gland



Geraldo S. Magalhães^{a,*}, Maria C. Caporrino^a, Maisa S. Della-Casa^a, Louise F. Kimura^a, José P. Prezotto-Neto^a, Daniel A. Fukuda^a, José A. Portes-Junior^a, Ana G.C. Neves-Ferreira^c, Marcelo L. Santoro^b, Katia C. Barbaro^a

^a Laboratory of Immunopathology, Butantan Institute, Av. Vital Brasil 1500, 05503-900 São Paulo, SP, Brazil

^b Laboratory of Pathophysiology, Butantan Institute, Av. Vital Brasil 1500, 05503-900 São Paulo, SP, Brazil

^c Laboratory of Toxinology, Oswaldo Cruz Institute, HoCruz, Av. Brasil 4365, 21040-900 Rio de Janeiro, RJ, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 January 2013

Accepted 4 June 2013

Available online 14 June 2013

Keywords:

Spider venom

Loxosceles

Recombinant PLD

Brown spider

Dermonecrosis

ABSTRACT

Loxosceles venom comprises a mixture of diverse toxins that induces intense local inflammatory reaction, dermonecrotic injury, platelet aggregation, hemolytic anemia and acute renal failure. Among several toxins in the venom, phospholipases D (PLDs), also called dermonecrotic toxins, are the most important and best studied, since they account for the main effects observed in loxoscelism. Despite their importance, biological analysis of PLDs is hampered by the minute amounts normally purified from the venom, and therefore many efforts have been made to clone those toxins. However, to date, no PLD from *Loxosceles gaucho* has been obtained in a heterologous system. Thus, in this work we show the cloning of a PLD from *L. gaucho* venom gland, named LgRec1, which was successfully expressed in a bacterial system. LgRec1 evoked local reaction (edema, erythema, ecchymosis, and paleness), dermonecrosis and hemolysis. It was also able to hydrolyze sphingomyelin and promote platelet aggregation. ELISA and Western blot analysis showed that LgRec1 was recognized by an anti-*L. gaucho* venom serum, a commercial arachnidic antivenom as well as a monoclonal antibody raised against the dermonecrotic fraction of *L. gaucho* venom. In addition, LgRec1 demonstrated to be highly immunogenic and antibodies raised against this recombinant toxin inhibited local reaction (~65%) and dermonecrosis (~100%) elicited by *L. gaucho* whole venom. Since PLDs are considered the major components accounting for the local and systemic envenomation effects caused by spiders from genus *Loxosceles*, the information provided here may help to understand the mechanisms behind clinical symptomatology.

© 2013 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

Loxosceles spider venom induces a necrotic-hemolytic syndrome in patients [1]. At least three different *Loxosceles* species of medical importance are known in Brazil (*Loxosceles intermedia*, *Loxosceles gaucho*, and *Loxosceles laeta*), and according to the Brazilian Ministry of Health around 7900 cases of loxoscelism were reported in 2010. In fact, owing to the frequency and morbidity of *Loxosceles* bites, it is considered the most important form of arachnidism in Brazil [2]. The clinical picture caused by *Loxosceles* spiders is mainly characterized by an intense inflammatory reaction and dermonecrosis at the bite site. In severe cases, massive intravascular hemolysis may result in acute renal failure, which is

the primary cause of death in loxoscelism [1,3–5]. In Brazil, therapeutics include antivenom administration, associated or not with corticosteroids [6].

Studies have shown that *Loxosceles* venom is rich in proteases, hyaluronidases, hydrolases, lipases, peptidases, collagenases, phospholipases D, alkaline phosphatases and other components [3,7,8]. Phospholipases D (PLDs) – also called dermonecrotic toxins, sphingomyelinases D or SMases – are considered the major components accounting for the local and systemic effects of *Loxosceles* venom, and are thereby the most important and best studied toxins therein. Many reports have shown that native PLDs may cause massive inflammatory response, dermonecrosis, hemolysis and platelet aggregation [9–11]. Due to the importance of PLDs in *Loxosceles* envenomation, great efforts have been made to understand the mechanism of action of these toxins. However, the difficulty in obtaining large amounts of venom and isolating its toxins represent a limiting factor. Therefore, many PLDs have been cloned

* Corresponding author. Tel.: +55 11 26279777; fax: +55 11 26279581.

E-mail addresses: gs.maga@butantan.gov.br, gs.maga@usp.br (G.S. Magalhães).