

**Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas – ICB
Departamento de Bioquímica e Imunologia**

Lucas Passos Barreto

**Avaliação do impacto de mutações na região C-terminal da
proteína rLID1, uma esfingomielinase do veneno da aranha
Loxosceles intermedia, em sua função**

Belo Horizonte
2017

Lucas Passos Barreto

**Avaliação do impacto de mutações na região C-terminal da
proteína rLID1, uma esfingomielinase do veneno da aranha
Loxosceles intermedia, em sua atividade enzimática**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Minas Gerais, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Imunologia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a. Liza Figueiredo Felicori Vilela

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a. Camila Dias Lopes

Belo Horizonte
2017

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e a Doutrina Espírita, por serem meu norte.

O meu respeito e gratidão aos animais utilizados neste e em tantos outros trabalhos, que anonimamente tanto têm contribuído para o avanço da ciência e o bem da humanidade.

À professora e orientadora Liza Figueiredo Felicori Vilela pela oportunidade de trabalho, confiança e por sempre querer o melhor a minha formação profissional.

À professora e coorientadora Camila Dias Lopes por ter aceitado embarcar neste trabalho de última hora e por dividir um pouco do seu conhecimento e sua tranquilidade comigo.

A todos na secretaria da pós-graduação em bioquímica e imunologia por toda a disponibilidade e atenção.

A todos os companheiros de laboratório com quem convivi e me ajudaram de alguma forma nesse trabalho. Em especial a Camila Franco, Glaécia Nascimento e Andréa Vilela pela boa vontade e paciência.

A Universidade Federal de Minas Gerais e a CAPES por possibilitarem o trabalho.

À minha família pelo suporte e por estarem sempre ao meu lado em todos os momentos importantes.

A todos os amigos que fizeram parte dessa jornada e que sem o companheirismo e os bons momentos juntos seria infinitamente mais difícil qualquer conquista. Em especial a Katherinne Manrique, Carolina Castilholi, Yaovi Todjro, Marco Antônio Tavares, Felipe Saavedra e Henrique Frizzera.

RESUMO

No Brasil, durante o ano de 2015 (últimos dados disponíveis), foram registrados 106.983 casos de acidentes com animais peçonhentos. Desse total, 19.495 envolveram aranhas (18,22%). O estado de Minas Gerais apresentou o maior número de acidentes com animais peçonhentos notificados com 19.474 casos registrados, sendo que 2.269 acidentes foram com aranhas (11,6%). Dentre os acidentes com Aranha, destaca-se o gênero *Loxosceles* (aranha-marrom), responsável por 58% dos acidentes com aranhas em que houve identificação da espécie. No mundo, já foram identificadas cerca de 100 espécies diferentes de *Loxosceles*, dentre elas, 10 são encontradas no Brasil. As espécies de maior importância médica são: *L. intermedia*, *L. gaucho*, *L. similis* e *L. laeta*. O veneno da aranha-marrom possui uma composição extremamente complexa, contendo diversas toxinas. Dentre as enzimas foram identificadas: hidrolases, hialuronidases, lipases, peptidases, collagenases, alcalino fosfatase, 5-ribonucleotidase, fosfohidrolases e proteases. Embora, provavelmente todas as enzimas presentes no veneno sejam capazes de contribuir de alguma forma para a progressão da lesão decorrente do acidente, somente as esfingomielinases D (SMase D), lipases presentes no veneno, foram capazes de produzir lesões dermonecroticas, hemólise e agregação plaquetária em animais de laboratório. Foi demonstrado em laboratório que as SMase D possuem diversos substratos e embora tenha sido demonstrado que em meio fisiológico a SMase D de *L. laeta* é capaz de liberar a colina da lisofosfatidilcolina (LPC), uma molécula de imunossinalização derivada de fosfatidilcolina (PC), assim gerando ácido lisofosfatídico (LPA), conhecido por induzir várias respostas biológicas e patológicas, o mecanismo das SMases D causador dermonecrose ainda não foi totalmente elucidado. Recentemente foi identificado um motivo bem conservado na porção C-Terminal das SMases D (ATXXDNPW) de diferentes espécies e gêneros, logo após a última α -hélice do TIM barril (α/β)₈. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da mutação de aminoácidos conservados D277 e W280 na porção C-Terminal da esfingomielinase rLID1 do veneno de *Loxosceles intermedia*. As proteínas recombinantes rLID1, rLID1_D (D277A), rLID1_W (W280A) e rLID1_DW (D277A e W280A) foram submetidas a modelagem e dinâmica molecular a fim de avaliar os impactos das mutações *in silico*. Constatou-se que as mutações aumentam a flexibilidade da alça catalítica da proteína. Após a avaliação *in silico*, as proteínas foram expressas em BL21 (DE3) Arctic Express, porém, somente as proteínas rLID1, rLID1_D e rLID1_W ficaram solúveis. As proteínas solúveis foram purificadas utilizando cromatografia de afinidade e logo em seguida, cromatografia de gel filtração. Após a obtenção das proteínas puras, foi realizado o teste enzimático para avaliar a atividade das proteínas e foi observado que a proteína mutante rLID1_D possui atividade enzimática similar a proteína *wildtype* rLID1 enquanto a proteína rLID1_W possui atividade enzimática superior. Em seguida, foi realizado o teste biológico em coelho e foi constatado que as proteínas mutantes são capazes de causar dermonecrose, porém, a proteína rLID1_W, na quantidade testada, possui capacidade muito inferior a proteína *wildtype*. Nossos dados indicam que as mutações na região C-Terminal da rLID1 impactam na atividade enzimática e biológica da proteína.

ABSTRACT

In Brazil, during the year 2015 (last available data), there were 106,983 cases of accidents with venomous animals. Of this total, 19,495 involved spiders (18.22%). The state of Minas Gerais had the highest number of accidents with venomous animals reported with 19,474 recorded cases, of which 2,269 were with spiders (11.6%). Among the accidents with Spider, the genus *Loxosceles* (brown spider) stands out, responsible for 58% of the spider accidents in which the species was identified. In the world, about 100 different species of *Loxosceles* have been identified, of which 10 are found in Brazil. The species of major medical importance are: *L. intermedia*, *L. gaucho*, *L. similis* and *L. laeta*. The venom of the brown spider has an extremely complex composition, containing several toxins. Among the enzymes were identified: hydrolases, hyaluronidases, lipases, peptidases, collagenases, alkaline phosphatase, 5-ribonucleotidase, phosphohydrolases and proteases. Although probably all the enzymes present in the venom are able to contribute in some way to the progression of the injury resulting from the accident, only sphingomyelinases D (SMase D), a lipase present in the venom, were able to produce dermonecrotic lesions, hemolysis and platelet aggregation in laboratory animals. It has been demonstrated in the laboratory that SMase D has several substrates and although it has been demonstrated that in physiological medium the SMase D of *L. laeta* is capable of releasing choline from lysophosphatidylcholine (LPC), an immunosuppressing molecule derived from phosphatidylcholine (PC), thus generating lysophosphatidic acid (LPA), known to induce various biological and pathological responses, the mechanism of SMase D causing dermonecrosis is still not fully elucidated. Recently, a well conserved motif was identified in the C-Terminal portion of SMasesD (ATXXDNPW) of different species and genera, shortly after the last α -helix of the TIM barrel (α / β)₈. Thus, the objective of this work was to evaluate the effects of the conserved D277 and W280 amino acid mutation on the C-terminal portion of the rLID1 sphingomyelinase from the *Loxosceles intermedia* venom. The recombinant proteins rLID1, rLID1_D (D277A), rLID1_W (W280A) and rLID1_DW (D277A and W280A) were submitted to modeling and molecular dynamics in order to evaluate the impact of mutations *in silico*. The mutations were found to increase the flexibility of the protein's catalytic loop. After *in silico* evaluation, the proteins were expressed in BL21 (DE3) Arctic Express, however, only the rLID1, rLID1_D and rLID1_W proteins were soluble. Soluble proteins were purified using affinity chromatography and then, gel filtration chromatography. After obtaining the purified proteins, the enzymatic assay was performed to evaluate the activity of the proteins and it was observed that the mutant rLID1_D has enzymatic activity similar to the *wildtype* protein rLID1 while the rLID1_W protein has superior enzymatic activity. After that, it was performed a biological assay and mutant proteins were found to be capable of causing dermonecrosis, but the rLID1_W protein, in the concentration used, has much lower capacity than the *wildtype* protein. Our data indicates that the mutation on C-Terminal of rLID1 impacts both biological and enzymatic activity of the protein.

SUMÁRIO

1. Introdução.....	8
1.1. Animais Peçonhentos no Brasil e no Mundo	8
1.2. As aranhas no Brasil	9
1.3. Loxoscelismo.....	12
1.4. O veneno das aranhas-marrons.....	13
2. Objetivos.....	27
2.1. Objetivo Geral	27
2.2. Objetivos Específicos	27
3. MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1. Modelagem, Dinâmica Molecular e Análise Estrutural	28
3.2. Organismos utilizados	28
3.3. Preparo de células competentes, transfecção e seleção de colônias.....	29
3.4. Expressão das proteínas recombinantes rLID1, rLID1_D, rLID1_W e rLID1_DW em BL-21(DE3).....	30
3.5. Expressão das proteínas recombinantes rLID1, rLID1_D, rLID1_W e rLID1_DW em BL-21(DE3) Arctic Express.....	31
3.6. Lise Celular e Teste de Solubilidade	31
3.7. Purificação das proteínas recombinantes rLID1, rLID1_D e rLID1_W	32
3.8. Análises através de eletroforese SDS-PAGE e Western Blotting	33
3.9. Estimativa Proteica.....	33
3.10. Atividade esfingomielinásica in vitro	34
3.11. Atividade esfingomielinásica in vivo	35
4. Resultados e Discussão	37

4.1.	Modelagem e dinâmica molecular da proteína recombinante rLID1_D, rLID1_W e rLID1_DW	37
4.2.	Expressão e Teste de Solubilidade em BL21 (DE3).....	44
4.3.	Expressão e Teste de Solubilidade em BL21 (DE3) Arctic Express	46
4.4.	Purificação da proteína recombinante rLID1	47
4.5.	Purificação da proteína recombinante rLID1_D.....	49
4.6.	Purificação da proteína recombinante rLID1_W	53
4.7.	Atividade esfingomielinásica in vitro	55
4.8.	Atividade biológica in vivo	58
5.	Conclusões	61
6.	Referências Bibliográficas	62

1. INTRODUÇÃO

1.1. Animais Peçonhentos no Brasil e no Mundo

Segundo a definição do Ministério da Saúde: “Animais peçonhentos são reconhecidos como aqueles que produzem ou modificam algum veneno e possuem algum aparato para injetá-lo na sua presa ou predador”.¹ Devido a esta capacidade ocorrem diversos acidentes relacionados a estes animais, embora não se saiba ao certo o número de casos pelo mundo.

Entre os diversos países no mundo onde ocorrem os acidentes com animais peçonhentos, há uma grande diferença em termos de sistemas de saúde pública, bases socioeconômicas, infraestrutura e valores culturais e sociais, fato que dificulta o levantamento de estatísticas globais. Por exemplo, em alguns deles não é obrigatória a notificação em caso de acidentes com animais peçonhentos ou os cidadãos não procuram ajuda em um hospital e preferem meios alternativos para se tratar.² Além disso, a maioria dos casos de acidentes envolvendo animais peçonhentos ocorre em regiões pobres do planeta, fazendo com que a situação se torne amplamente ignorada. O problema chegou a uma proporção tão grande que em 2009, os acidentes envolvendo serpentes foram adicionados pela Organização Mundial de Saúde (OMS) à lista de doenças tropicais negligenciadas³. No Brasil, visando levantar dados referentes a este problema, na década de 90 foi criado o SINAN - Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Porém, só em agosto de 2010, o Ministério da Saúde adicionou os acidentes com animais peçonhentos a Lista de Notificação Compulsória (LNC).^{1; 4}

Ao analisarmos os dados referentes aos acidentes com animais peçonhentos no Brasil, percebemos que os casos com serpentes estão em 3º lugar, mostrando que para o país, existe uma relevância em estudar não só os acidentes envolvendo serpente, mas também, os casos envolvendo Aranhas (2º Lugar) e Escorpiões (1º Lugar). Durante o ano de 2015, no país, foram registrados 106.983 casos de acidentes com animais peçonhentos. Desse total, 19.495 envolveram aranhas (18,22%) (**Tabela 1**).⁵

Tabela 1. Notificações registradas de tipo de acidente por ano de ocorrência no sistema de informação de agravos de notificação pelo Ministério da Saúde/SVS.⁵

TIPO DE ACIDENTE	2013	2014	2015
SERPENTE	28.431	27.183	18.741
ARANHA	29.988	27.103	19.495
ESCORPIÃO	79.705	88.246	50.246
LARGATA	3.755	3.529	2.556
ABELHA	10.864	14.173	8.929
OUTROS	10.112	10.979	7.016
TOTAL	162.855	171.213	106.983

O estado de Minas Gerais apresentou o maior número de acidentes com animais peçonhentos notificados em 2015 com 19.474 casos registrados. Em 2016, o estado registrou, de janeiro a setembro de 2016, cerca de 21.681 notificações (um aumento relativo ao ano de 2015 de 21,6%), sendo 57,4% em zonas urbanas e 40,3% em zonas rurais. Nas áreas urbanas, a maioria dos acidentes envolveram escorpiões (73,2%), seguido por aranhas (8,2%) e abelhas (7,4%). Nas áreas rurais a maior incidência de casos também envolveram escorpiões (51,6%), seguido por serpentes (17,6%) e aranhas (16,4%).^{5, 6}

1.2. As aranhas no Brasil

As aranhas são animais invertebrados pertencentes ao filo *Arthropoda* (artrópodes), subfilo Chelicerata, família Sicariidae e classe *Arachnida* (aracnídeos). Diferentemente dos artrópodes, seu corpo é dividido em cefalotórax e abdômen. O cefalotórax apresenta quatro pares de pernas, um par de pedipalpos e um par de quelíceras, anatomia utilizada para inoculação

do veneno produzido em glândulas situadas na porção basal da quelícera. Em geral, são predadoras de outros artrópodes, principalmente insetos.^{7; 8; 9}

Os três gêneros de maior importância clínica no Brasil encontram-se na subordem *araneomorphae*: *Loxosceles* (popularmente conhecida como aranha-marrom ou aranha-violino), *Phoneutria* (armadeira) e *Lactrodectus* (viúva-negra). No país, destaca-se o gênero *Loxosceles*, responsável por 58% dos acidentes com aranhas, no qual a espécie foi identificada, no ano de 2015.⁵ No mundo, já foram identificadas cerca de 100 espécies diferentes de *Loxosceles*, dentre elas, 10 são encontradas no Brasil. Porém, as espécies de maior importância médica são *L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta*. Além dessas três espécies, em 2005, a espécie *L. similis*, que anteriormente só havia sido encontrada em cavernas de Minas Gerais, foi encontrada em residências, mostrando ser capaz de se adaptar ao meio urbano e, por este motivo, tem ganhado destaque de pesquisadores e órgãos de saúde pública.^{10; 11; 12; 13; 14; 15; 16}



Figura 1. *Loxosceles reclusa*. Imagem retirada Swanson *et al* 2005¹⁷. Figura mostrando *Loxosceles reclusa*, sua marca distinta em forma de violino e seu padrão típico de olhos (três pares de olhos).

As aranhas do gênero *Loxosceles*, que significa “pernas inclinadas” pela forma como esse gênero inclina as pernas ao descansar, são aracnídeos

pequenos, com o corpo de aproximadamente 1 (um) a 2 (dois) cm e, incluindo as pernas, até 4 (quatro) cm de comprimento. É bem documentado e de conhecimento popular que o gênero possui uma característica estrutural bem peculiar, uma mancha no formato de um violino na superfície dorsal de seu cefalotórax, fato que levou ao seu nome popular de aranha-violino. Porém, outras espécies podem possuir máculas escuras na parte dorsal parecidas com um violino (ex. *Pholcus phalangiodes*), ou a *Loxosceles* pode não apresentar a mancha dependendo da sua idade (aranhas jovens do gênero), fato que torna a identificação através desta característica inconfiável e de fácil má interpretação. Para identificação correta, os especialistas sugerem observar os olhos, enquanto a maioria dos aracnídeos apresentam oito olhos em arranjos de duas fileiras de quatro, o gênero apresenta seis olhos dispostos aos pares, comum as 100 espécies de *Loxosceles* espalhadas pelo mundo (**Figura 1**). Todavia, apesar de ser a forma recomendada, existem espécies próximas filogeneticamente que também possuem a mesma disposição de olhos, *Scytodes* e *Sicarius*, e que podem ser confundidas. ^{11; 17; 18; 19; 20}

As aranhas do gênero podem viver de 3 a 7 anos e, em geral, ocupam grande diversidade de habitats, como raízes e cascas de árvores, folhas secas de palmeiras, bambuzais e cavernas; atrás de móveis, armários, sótãos, garagens, porões de casas, entulhos e madeiras. Podem infestar casas em grandes números, possuem hábitos noturnos, vivendo em teias irregulares e apesar dos acidentes, não são agressivas, picam somente quando espremidas contra o corpo. Além disso, podem viver vários dias ou meses sem comida ou água e podem suportar temperaturas de 8 a 43°C. Todas essas características mostram como esse gênero é altamente adaptado ao convívio com seres humanos, fato que as faz prosperar em ambiente intradomiciliares e peridomiciliares ao ponto que é difícil encontrá-las na natureza. ^{10; 11; 18; 20}

Em 2003, um estudo demonstrou que as aranhas da espécie *L. reclusa* (gênero de importância médica no continente norte americano) preferia se alimentar de presas mortas a presas vivas. Além disso, foi demonstrado em 2010 que a espécie era capaz de se alimentar de insetos mortos por inseticida (λ -cyhalothrin 0.023mg/kg) sem morrer, sugerindo uma relação de sinantropia, em que ao eliminar insetos presentes no ambiente doméstico, o crescimento da

população de aranhas *L. reclusa* seria favorecido. Porém, em 2008 foi demonstrado que a espécie prefere presas vivas quando manipuladas variáveis como fome, tamanho da presa e tempo de morte da presa. Em 2011, na tentativa de acabar com a discussão, Vetter demonstrou que embora a *L. reclusa* se alimente de presas mortas, outras espécies também se alimentam se constringidas ao ambiente de laboratório, mas que isso seria apenas um comportamento oportunístico e não uma preferência por presas mortas. Como o trabalho de 2003 e 2010 receberam ampla atenção da mídia enquanto os outros não, até hoje há confusão em relação aos hábitos da espécie acreditando-se que a espécie prefira presas mortas e que ao tentar eliminar a espécie utilizando inseticidas, estaríamos favorecendo a espécie e não a eliminando. ^{21; 22; 23; 24}

1.3. Loxoscelismo

Quando os acidentes ocorrem com aracnídeos do gênero *Loxosceles*, um dos maiores problemas é a difícil identificação do acidente, já que o veneno não costuma provocar dor no momento da picada e o paciente costuma ficar assintomático nas primeiras 8h-12h após a picada. Ao serem admitidos no hospital, geralmente, os pacientes já apresentam sintomas de dor, eritema, edema e equimose. Sintomas que podem ser facilmente confundidos com diversas doenças dermatológicas. Segundo os dados do Ministério da Saúde, cerca de 40% dos pacientes procuram ajuda somente 24 horas após o acidente, diferente do que acontece com acidentes envolvendo outros gêneros de aracnídeos de importância médica no Brasil (**Tabela 2**). Além disso, somente 20% conseguem ver a aranha na hora da picada e apenas 12 a 14% dos pacientes levam a aranha. ^{5; 25; 26}

Para descrever o conjunto de sintomas e sinais clínicos decorrentes do envenenamento por aranhas do gênero *Loxosceles* é utilizado o termo Loxoscelismo. O quadro clínico pode-se apresentar de duas formas: Loxoscelismo cutâneo (LC) e Loxoscelismo víscero-cutâneo (LVC). O LC é caracterizado por dor, edema e lesões necróticas, representando cerca de 85% dos casos. Em casos mais raros, o paciente pode desenvolver o LVC, que

representa até 15% dos casos, e além de apresentar os sintomas característicos de LC, apresenta também hematúria, hemoglobinúria, falência renal, icterícia e febre. Pode ocorrer também o óbito do paciente, embora não seja frequente e ocorra somente em 0,2 a 1,5% dos casos.^{26; 27; 28; 29; 30}

Tabela 2. Notificações de tempo de atendimento por tipo de aranha registradas no sistema de informação de agravos de notificação pelo Ministério da Saúde/SVS. Dados referentes ao ano de 2015.⁵

TEMPO	PHONEUTRIA	LOXOSCELES	LATRODECTUS
0 A 1 HORA	1.666	710	29
1 A 3 HORAS	1018	624	24
3 A 6 HORAS	280	373	5
6 A 12 HORAS	90	325	6
12 A 24 HORAS	65	661	1
24 HORAS+	146	1833	7

A gravidade do acidente pode ser influenciada por fatores relacionados a aranha como estágio de desenvolvimento, sexo (fêmeas produzem mais veneno), quantidade e concentração do veneno injetado. Pode também ser influenciado por outros fatores como local da ferida (lesões em regiões com maior quantidade de tecido lipídico como coxa, glute e abdômen geram piores lesões), idade do indivíduo (crianças desenvolvem casos sistêmicos mais facilmente), tempo até o atendimento e genótipo do paciente.^{13; 18; 26; 31}

1.4. O veneno das aranhas-marrons

Como comum aos venenos de animais peçonhentos em geral, os venenos de *Loxosceles* possuem um perfil heterogêneo entre espécies e dentro da espécie. Os venenos possuem uma mistura complexa de proteínas, peptídeos e componentes de baixa massa molecular.^{31; 32}

O veneno da aranha-marrom normalmente é utilizado para paralisar a presa (insetos) ou como mecanismo de defesa e possui um volume total de cerca de 4µl com uma composição extremamente complexa, contendo diversas toxinas. Análise do transcriptoma das glândulas de veneno de *L. intermedia* mostraram que 43,5% dos transcritos são toxinas. Estima-se que o veneno contenha entre 65 a 100µg de proteínas variando entre 5 a 850kDa em massa molecular, sendo que as moléculas de 5 a 40 kDa são predominantes (**Figura 2**).^{18; 29; 33; 34; 35}

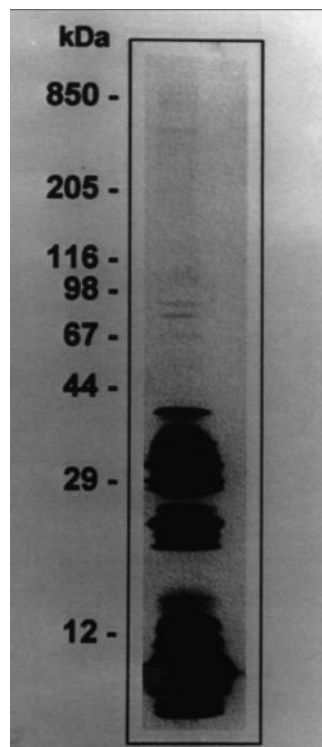


Figura 2. Perfil eletroforético SDS-PAGE das proteínas presentes no veneno bruto de *L. intermedia*. Imagem retirada de Veiga et al, 2000³⁴. As proteínas foram separadas utilizando um gel de poliacrilamida com gradiente linear 3-20% (p/v) em condições não redutoras e coradas por prata. Pode-se perceber que o veneno é rico em proteínas de baixa massa molecular (5 a 40kDa), porém, é possível observar proteínas de alta massa molecular (≥ 40 kDa).

Em 1996, o grupo de Barbaro analisou o veneno bruto de *L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta* através de gel filtração (Sephadex G-100) no qual foram observadas 3 frações, porém, ao realizar o teste de atividade *in vivo*, foi constatado que a atividade dermonecrótica estava presente somente na fração de maior massa molecular. Além disso, as frações obtidas na cromatografia foram submetidas a eletroforese SDS-PAGE, onde foi possível observar perfis

eletroforéticos bem parecidos (figura não mostrada). Foi constatado que, na fração com atividade dermonecrotica, a banda mais forte era de 35 kDa em *L. intermedia* e *L. gaúcho* e 32 kDa *L. laeta* (figura não mostrada). Na época, este resultado foi importante para indicar o provável tamanho da molécula causadora de dermonecrose.³⁶

Em *L. reclusa*, já foram identificadas diversas enzimas como hidrolases, hialuronidases, lipases, peptidases, collagenases, alcalino fosfatase, 5-ribonucleotidase, fosfohidrolases e proteases. Algumas dessas enzimas já foram identificadas também em *L. intermedia*, *L. gaúcho*, *L. laeta* e *L. similis* (**Tabela 3**). Embora, provavelmente todas as enzimas presentes no veneno sejam capazes de contribuir de alguma forma para a progressão da lesão decorrente do acidente, somente as esfingomielinases D (SMases D, aproximadamente 35 kDa), uma lipase presente no veneno, foram capazes de produzir lesões dermonecroticas, hemólise e agregação plaquetária em animais de laboratório.^{11; 25; 37}

Tabela 3. Enzimas encontradas no veneno de aranhas *Loxosceles*. Tabela modificada de Rash & Hodgan 2002³¹ e Da Silva et al 2004¹⁸.

ENZIMA	ARANHAS	REFERENCIAS
HIALURONIDASE	<i>L. rufescens</i>	WRIGHT et al, 1973; GEREN et al, 1976;
	<i>L. laeta</i>	SCHENONE & SUAREZ, 1978; BARBARO et al, 2005;
	<i>L. reclusa</i>	GEREN et al, 1976; YOUNG & PINCUS, 2001;
		BARBARO et al, 2005
	<i>L. deserta</i>	BARBARO et al, 2005
	<i>L. intermedia</i>	BARBARO et al, 2005; DA SILVEIRA et al, 2007c; FERRER et al, 2013.
FOSFATASE ALCALINA	<i>L. reclusa</i>	HEITZ & NORMENT, 1974; GEREN et al, 1976;
		NORMENT et al, 1979
ESTERASE	<i>L. reclusa</i>	WRIGHT et al, 1973; NORMENT et al, 1979
LIPASE	<i>L. reclusa</i>	NORMENT et al, 1979
HIDROLASE	<i>L. reclusa</i>	GEREN et al, 1976; NORMENT et al, 1979
ATPASE	<i>L. reclusa</i>	GEREN et al, 1976
	<i>L. laeta</i>	SCHENONE & SUAREZ, 1978
5`RIBONUCLEOTÍDEO FOSFOHIDROLASE	<i>L. reclusa</i>	GEREN et al, 1976

ESFINGOMIELINASE D/FOSFOLIPASE D	<i>L. intermedia</i>	TAMBOURGI <i>et al</i> , 1998; KALAPOTHAKIS <i>et al</i> , 2002, 2007; ARAÚJO <i>et al</i> , 2003; BARBARO <i>et al</i> , 2005; CHAIM <i>et al</i> , 2006, 2011b; DA SILVEIRA <i>et al</i> , 2006, 2007a; FELICORI <i>et al</i> , 2006; APPEL <i>et al</i> , 2008; GREMSKI <i>et al</i> , 2010; DE GIUSEPPE <i>et al</i> , 2011; GOMES <i>et al</i> , 2011; VUITIKA <i>et al</i> , 2013 CUNHA <i>et al</i> , 2003; BARBARO <i>et al</i> , 2005;
	<i>L. gaucho</i>	MACHADO <i>et al</i> , 2005; GOMES <i>et al</i> , 2011;
	<i>L. laeta</i>	FERNANDES-PEDROSA <i>et al</i> , 2002, 2008; BARBARO <i>et al</i> , 2005; DE SANTI-FERRARA <i>et al</i> , 2009; CATALÁN <i>et al</i> , 2011; GOMES <i>et al</i> , 2011 GOMES <i>et al</i> , 2011; CHATZAKI <i>et al</i> , 2012 FORRESTER <i>et al</i> , 1978; KURPIEWSKI <i>et al</i> , 1981;
	<i>L. similis</i>	REKOW <i>et al</i> , 1983; REES <i>et al</i> , 1988; FUTRELL, 1992;
	<i>L. reclusa</i>	MERCHANT <i>et al</i> , 1998; RAMOS-CERILLO <i>et al</i> , 2004; BARBARO <i>et al</i> , 2005
	<i>L. deserta</i>	BARBARO <i>et al</i> , 2005
	<i>L. rufescens</i>	YOUNG & PINCUS, 2001
	<i>L. boneti</i>	RAMOS-CERILLO <i>et al</i> , 2004
	<i>L. arizonica</i>	BINFORD <i>et al</i> , 2005; ZOBEL-THROPP <i>et al</i> , 2010
	<i>L. adalaida</i>	PRETEL <i>et al</i> , 2005
	PROTEASES	<i>L. rufescens</i>
<i>L. reclusa</i>		ESKAFI & NORMENT, 1976; JONG <i>et al</i> , 1979; BARBARO <i>et al</i> , 2005
<i>L. deserta</i>		BARBARO <i>et al</i> , 2005
<i>L. intermedia</i>		BARBARO <i>et al</i> , 1996, 2005; DE SOUZA <i>et al</i> , 1998; FEITOSA <i>et al</i> , 1998; VEIGA <i>et al</i> , 1999, 2000a,b; DA SILVEIRA <i>et al</i> , 2002, 2007b; ZANETTI <i>et al</i> , 2002; GREMSKI <i>et al</i> , 2010; TREVISANSILVA <i>et al</i> , 2010
<i>L. gaúcho</i>		BARBARO <i>et al</i> , 1996, 2005; BARRETTO <i>et al</i> , 2003; TREVISAN-SILVA <i>et al</i> , 2010
<i>L. laeta</i>		BARBARO <i>et al</i> , 1996, 2005; DA SILVEIRA <i>et al</i> , 2002; FERNANDES-PEDROSA <i>et al</i> , 2008; TREVISAN-SILVA <i>et al</i> , 2010

Em 2002, o gene da LiD1 foi obtido através do sequenciamento do cDNA obtido das glândulas de veneno de *L. intermedia*, com isso foi possível expressar essa proteína de forma heteróloga.³³

A SMase D é capaz de hidrolisar esfingomielina, maior constituinte da camada lipídica das membranas celulares de eucariotos, em ceramida-1-fosfato e colina. Além disso, foi demonstrado que em meio fisiológico a SMase

D de *L. laeta* é capaz de liberar a colina da lisofosfatidilcolina (LPC), uma molécula de imunossinalização derivada de fosfatidilcolina (PC), assim gerando ácido lisofosfatídico (LPA) (**Figura 3**). O LPA é conhecido por induzir várias respostas biológicas e patológicas como agregação de plaquetas, hiperpermeabilidade endotelial e respostas pró-inflamatórias.^{38; 39; 40}

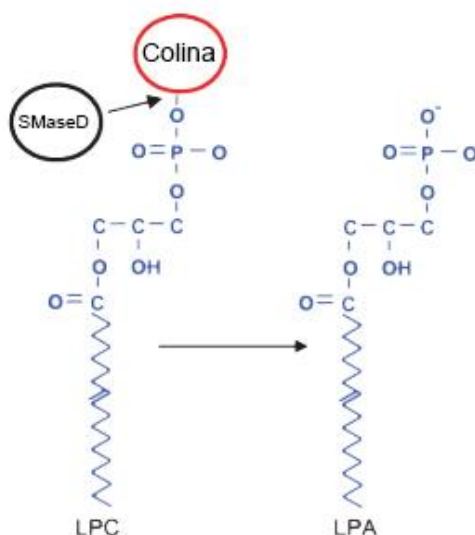


Figura 3. As SMasesD são capazes de liberar a colina do LPC, formando LPA. Imagem adaptada³⁹. Clivagem do LPC em LPA pelas SMasesD.

Em 2005, o grupo de Murakami foi capaz de resolver a estrutura cristalográfica de uma isoforma de SMase D de *L. laeta* (pdb: 1XX1), mostrando que esta proteína se enovela formando um TIM barril (α/β)₈ com inserções de folhas β e α hélices (**Figura 4**). Após o processo de cristalização, a unidade assimétrica continha 4 moléculas formadas por dois dímeros, porém, a dimerização da proteína foi considerada pelo grupo um artefato do empacotamento da cristalização já que durante o experimento de DLS (dynamic light scattering) observou-se que a proteína permanece monomérica em solução. Dentre as características estruturais importantes foi possível observar que a alça catalítica é estabilizada em sua ponta por uma ponte dissulfeto (Cys⁵¹-Cys⁵⁷) e o bolsão do sítio ativo é formado por His¹², Glu³², Asp³⁴, Asp⁹¹, His⁴⁷, Asp⁵², Trp²³⁰, Asp²³³ e Asn²⁵² (**Figura 4**), ambos altamente conservado nas isoformas de SMases D de *Loxosceles*. Além disso, o Mg²⁺ é

coordenado hexaedricamente pelos aminoácidos Glu³², Asp³⁴, Asp⁹¹ e três moléculas de água em um sítio altamente conservado e tem papel fundamental na atividade enzimática da SMase D. Foi proposto um mecanismo catalítico baseado na reação ácido-base envolvendo dois resíduos, His¹² e His⁴⁷, com estabilização realizada pelo íon metálico. A His⁴⁷ age como nucleófilo e inicia o processo de hidrólise atacando a ligação fosfodiéster do substrato. Em seguida, ocorre a doação de hidrogênio da His¹² formando colina e um substrato intermediário. Então, a His¹² desprotonada ataca uma molécula de água (H₂O) que subsequentemente inicia um ataque nucleofílico no intermediário presente no sítio catalítico, resultando e liberando a ceramida-1-fosfato.^{41; 42}

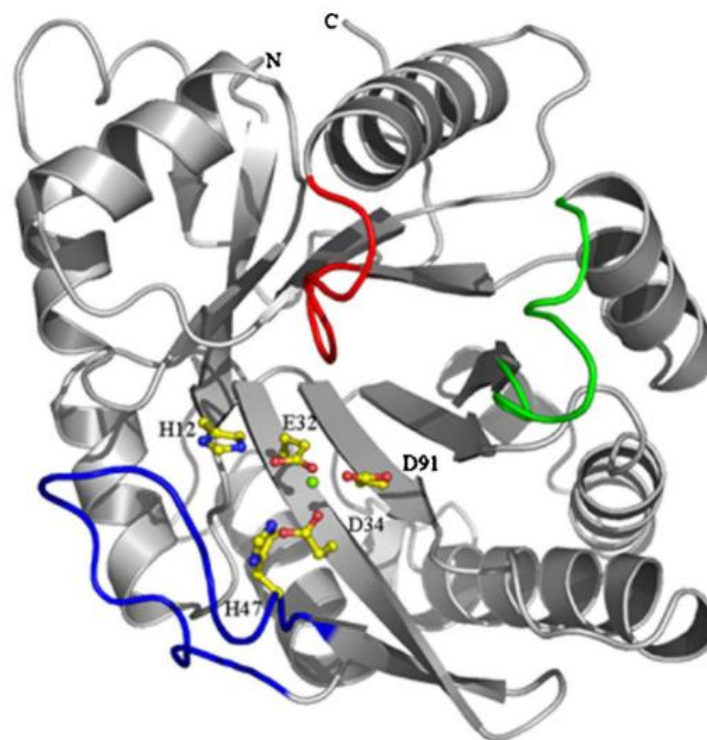


Figura 4. Representação da estrutura de SMase I de *L. laeta* vista através do eixo do barril (α/β). Figura adaptada, gerada por Murakami *et al* utilizando Pymol (DeLano, www.pymol.org)⁴². Estão indicados na figura a alça catalítica B em azul, a alça variável em verde e a alça flexível em vermelho. Além disso, podemos observar marcados na figura o N e C-terminal, bem como os aminoácidos importantes para a função da proteína e o seu cofator Mg²⁺ (esfera verde).

Murakami e colaboradores propuseram uma classificação para as SMases D baseado no alinhamento de suas sequencias e em suas

informações bioquímicas e estruturais. As SMases D da classe I possuem uma única ponte dissulfeto e contém uma alça hidrofóbico estendido. As outras SMases D pertencentes a classe II contém uma ponte dissulfeto adicional entre cadeias, ligando a alça flexível com a alça catalítica. Além disso, as SMases D classe II podem ser subdivididas em II-a, capazes de hidrolisar a esfingomielina, e II-b, incapazes de hidrolisar a esfingomielina. Nas duas subclasses, os resíduos necessários a catálise estão conservados, porém, na classe II-b há duas alterações que possivelmente explicam a diferença na atividade catalítica da enzima. A primeira alteração acontece nos aminoácidos, G95N e P134Q, que fazem com que a entrada do sítio ativo possua um ambiente hidrofílico. A segunda diferença acontece na região responsável por estabilizar, modular e controlar a aproximação do substrato durante a catálise no qual suas cargas estão alteradas devido a um grupo carboxilato.⁴²

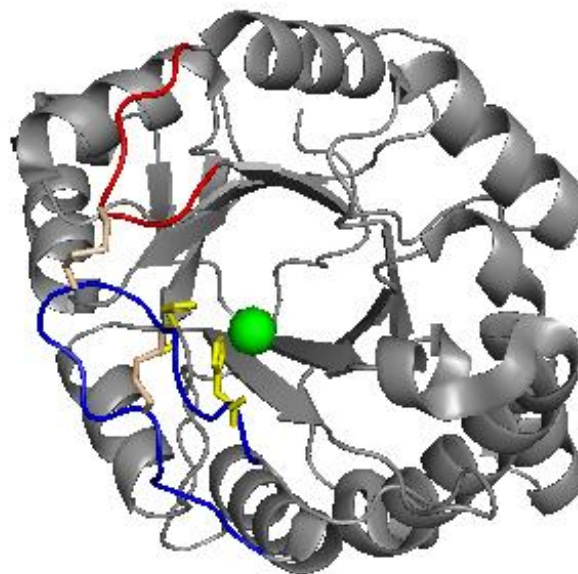


Figura 5. Representação da estrutura de SMaseD de *L. intermedia* vista através do eixo do barril (α/β)₈. Figura gerada por PyMol (DeLano, www.pymol.org). Estão indicados na figura a alça catalítica B em azul, a alça variável em verde. Além disso, podemos observar marcados na figura as duas histidinas catalíticas (H12 e H47).

De Giuseppe *et al* publicaram, em 2011, a estrutura cristalográfica da SMase D classe II de *L. intermedia* (**Figura 5**), denominada por eles de LiRecDT1 (pdb: 3RLH). Anteriormente havia sido demonstrado a capacidade dermonecrótica e hemolítica dessa enzima, porém, faltava resolver sua estrutura cristalográfica. A proteína é um TIM barril (α/β)₈ com inserções

adicionais de folhas β e α hélices e possui 61,6% de identidade com a SMaseD de *L. laeta*. A principal mudança conformacional observada está na ponte dissulfeto adicional (Cys⁵³-Cys²⁰¹) que causa o deslocamento da alça flexível e protege a alça catalítica devido a uma redução volumétrica do sitio catalítico, característico das SMases D classe II (**Figura 6**). Além disso, outra mudança conformacional observada foi uma inserção de cinco resíduos (YLPSL) na alça variável, que faz com que a alça seja menos flexível nas enzimas de classe II. Essas mudanças conformacionais sugerem que as enzimas de classe I e classe II possuem maneiras diferentes de conduzir o substrato ao sitio ativo da proteína. O sitio ativo da LiRecDT1 é conservado como em todas as SMasesD (His¹² e His⁴⁷) e a coordenação do metal Mg²⁺, necessária a estabilização do substrato durante a catalise, é feito de forma hexaédrica (Glu³², Asp³⁴ e Asp⁹¹).⁴³

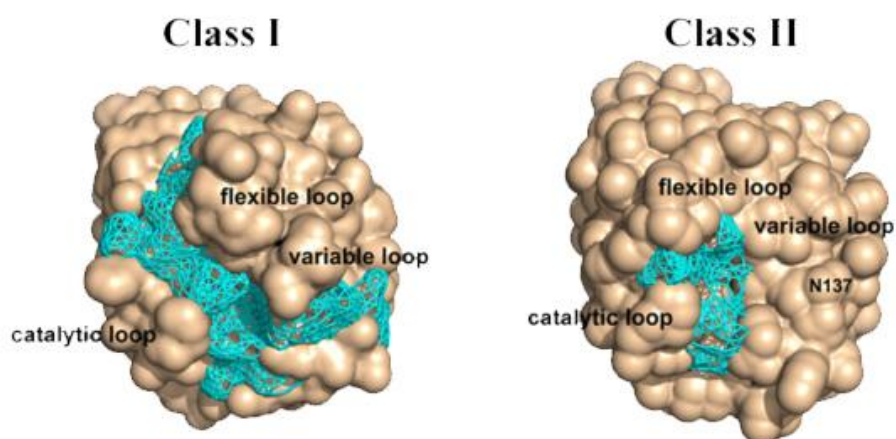


Figura 6. Análise da superfície acessível ao solvente nas proteínas SMasesD Classe I e II. Figura original de Giuseppe, 2011⁴³. Representado em azul claro as maiores cavidades das proteínas SMasesD classe I e II.

Em 2006, Cordes e Binford publicaram um artigo no qual inferiram que as SMasesD contêm um ancestral comum com a família enzimática glicerofosfodiester fosfodiesterases (GDPD), que possui representantes em todas as principais classes de organismos. Além disso, eles foram capazes de identificar um motivo bem conservado na porção C-Terminal das SMasesD (ATXXDNPW), logo após a última α -hélice do TIM barril (α/β)₈ e que não está presente na família GDPD. A descoberta deste motivo bem conservado

sugeriria um evento de divergência em bactéria ou aranha (na época as únicas espécies com SMasesD identificadas), seguido por uma transferência lateral de gene (LGT), pois seria pouco provável que tal motivo bem conservado pudesse surgir evolutivamente duas vezes. Esse motivo foi categorizado pelos autores como sinapomorfico, indicando que as SMasesD compartilham um ancestral comum recente.⁴⁴

Em 2013, Dias-Lopes *et al* identificaram novas sequencias de proteínas similares a Smase D e realizaram diversas análises comparativas. Foram identificadas sequencias de 24 gêneros distintos, 59 espécies e 105 subespécies, pertencentes aos metazoários, fungos e bactérias. As sequencias identificadas foram analisadas filogeneticamente e o grupo mostrou que as SMasesD possivelmente evoluíram por convergência independentemente através de um ancestral comum de GDPD em artrópodes e fungos, contradizendo assim Cordes e Bindford. Foi criada uma arvore de máxima verossimilhança (**Figura 7**) no qual as proteínas de bactéria e aranha não se agruparam, mostrando que o evento de transferência lateral de gene (LGT) é pouco provável. As novas descobertas de sequencias e as análises evolutivas já realizadas mostram que esta área evolutiva pode ser mais explorada.

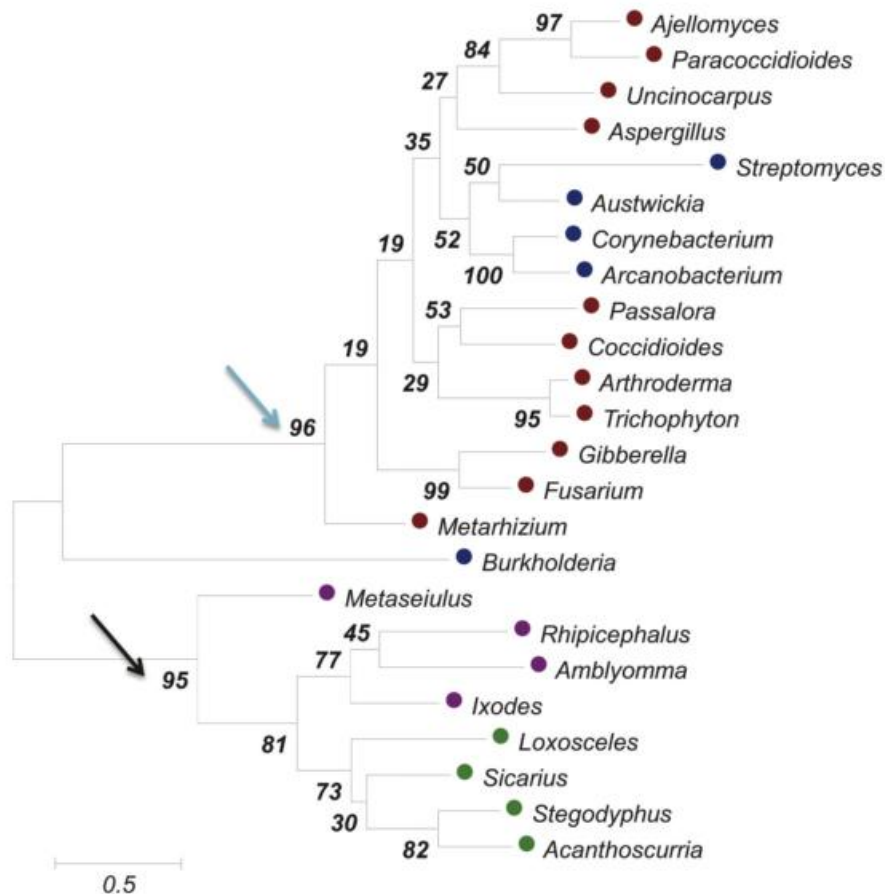


Figura 7. Análise filogenética das sequências *SMAseD-like* publicada por Dias-Lopes et al⁴⁵. Figura original Dias-Lopes et al, 2013. “Os círculos indicam os clados de cada espécie (vermelho para fungo, azul para bactéria, roxo para carrapatos e verde para aranhas). As setas indicam que o alto valor de *bootstrap* sugerem alto nível de confiabilidade no agrupamento de aranhas e carrapatos no mesmo clado (seta preta), assim como, bactéria e fungo (seta azul)”⁴⁵.

Além das análises evolutivas, o grupo alinhou as sequências no qual foi possível observar que os resíduos catalíticos de histidina (His¹² e His⁴⁷) são conservados em todas as espécies, exceto *Metaseiulus occidentalis*, que possui somente uma histidina (His⁴⁷). Além disso, foi observado que os aminoácidos envolvidos com a coordenação octaédrica do íon Mg²⁺ (Glu³², Asp³⁴, Asp⁹¹) e aminoácidos envolvidos com coordenação das ligações de hidrogênio dos aminoácidos catalíticos (Asp³⁴, Trp²³⁰) são estritamente conservados. Os aminoácidos Asp⁵², Asp²³³ e Ans²⁵², presentes no bolsão do sítio ativo da proteína e responsáveis pela coordenação das ligações de hidrogênio em conjunto com os aminoácidos anteriormente citados, não são conservados.⁴⁵

O grupo também foi capaz de demonstrar que o motivo C-terminal das SMases D, anteriormente reportado, está conservado em outros organismos além de bactéria e aranhas (**Figura 8**). Utilizando STING Java Protein Dossier, o grupo analisou a estrutura cristalográfica da SMase de *L. laeta* e descobriu que esse motivo conservado possui resíduos que estabelecem diversos contatos com resíduos presentes em 7 das 8 folhas β internas do TIM Barril $(\alpha/\beta)_8$, todos do lado oposto ao sítio catalítico. Entre os resíduos, dois aminoácidos foram destacados por estabelecerem maior contato energético, Asp277 e Trp280. Segundo a predição, o Trp280 estabelece ponte de hidrogênio com Glu159, Asn225 e Asn278; realiza interações aromáticas com os aminoácidos His191 e Tyr128; e interações hidrofóbicas com os resíduos Trp193, Gly162, Val161, Lys160, Val130 e Tyr128. Por sua vez, o Asp277 estabelece diversos contatos como: interação iônica com Arg271; ligação de hidrogênio com Trp8, Pro279 e Thr274; e interação hidrofóbica com Pro6.⁴⁵

Recentemente, Vuitika *et al* realizaram mutações dirigidas na SMase D de *L. intermedia*. Como sítios de mutação foram escolhidos aminoácidos envolvidos na catálise enzimática (H12A, H47A e H12A-H47A), no sítio de ligação do metal (E32A, D34A e E32A-D34A), no reconhecimento do substrato (K93A, Y228A e W230A), na estabilização da alça flexível através de uma ponte dissulfeto presente somente nas SMases D classe II (C53A-C201A) e um aminoácido controle (G96A).⁴⁶

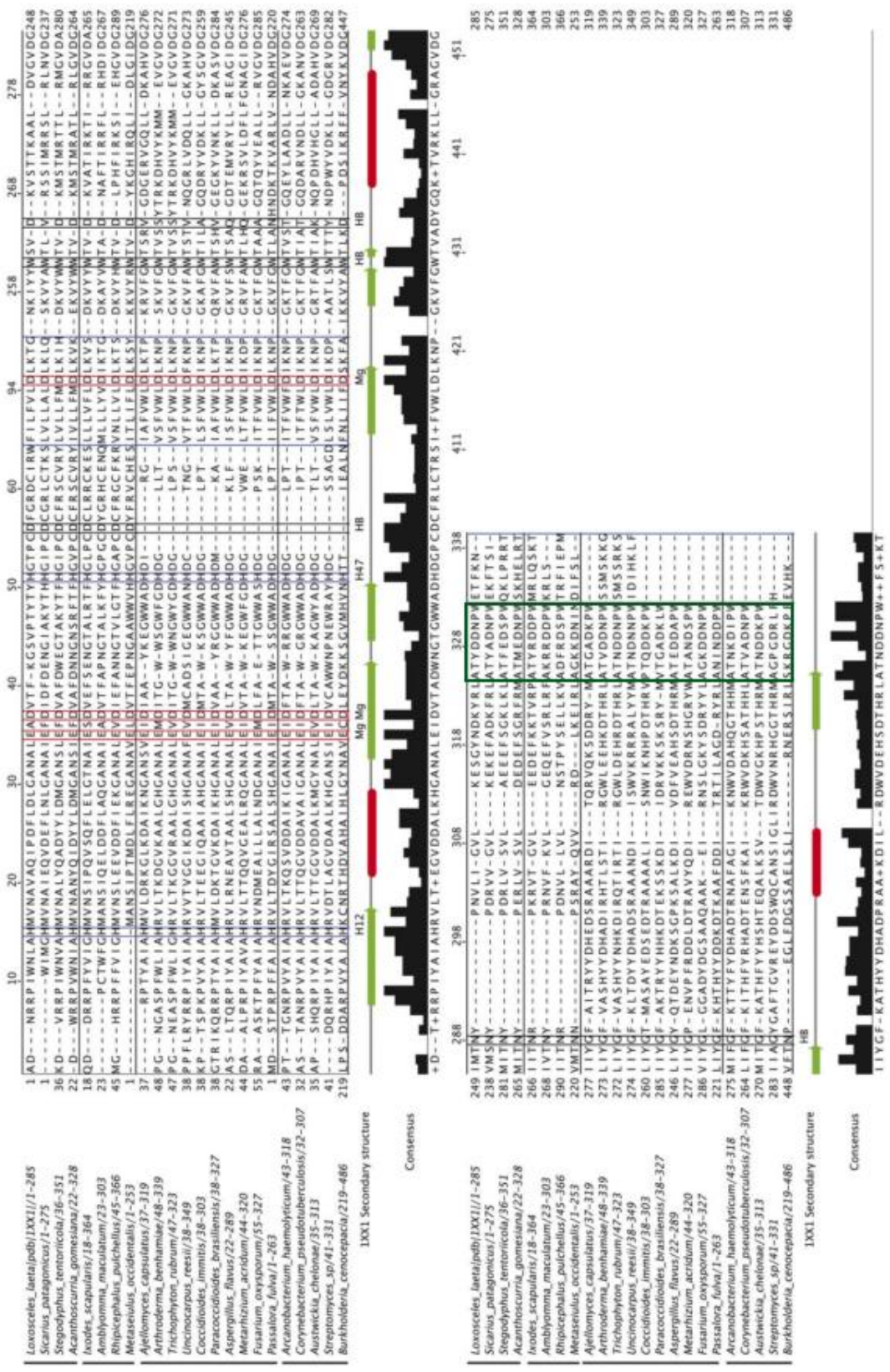


Figura 8. Alinhamento de sequencias múltiplas de SMasesD. Figura modificada.⁴⁵ “Sequencia consenso e estrutura secundária da SMaseD de *L. laeta* (pdb: 1xx1) são mostrados embaixo do alinhamento. Histidinas catalíticas (H12 e H47) são mostradas em azul, Resíduos responsáveis pela coordenação do Mg²⁺ estão marcados em vermelho (marcados como Mg na estrutura secundária). Aminoácidos envolvidos na rede de ligação de hidrogênio estão marcados em vermelho (marcados como HB na estrutura secundária).”⁴⁵ Em verde, região C-Terminal bem conservada.

Ao avaliar a termoestabilidade da proteína, a única mutação em que foi observada alguma alteração foi a mutação realizada nos aminoácidos ligados a estabilização da alça flexível pois houve a remoção da ponte dissulfeto na interface catalítica. Com relação a atividade enzimática, foi observado parada total na atividade fosfolipase D nos mutantes H12A, H47A, H12A-H47A, E32A, D34A e E32A-D34A, enquanto houve uma redução significativa no mutante Y228A. Os mutantes K93A e W230A apresentaram uma redução de 20-30% na atividade enzimática. Foram avaliadas também a atividade hemolítica, permeabilidade vascular (camundongos) e dermonecrose (coelhos). Os mutantes H12A, H12A-H47A e E32A-D34A não apresentaram atividade hemolítica, permeabilidade vascular ou dermonecrose, corroborando com a predição de que esses aminoácidos estão envolvidos com a atividade catalítica da enzima e com a coordenação octaédrica do metal na enzima. O mutante C53A-C201A apresentou 50% de atividade hemolítica, mostrando que a remoção da ponte dissulfeto em SMases D classe II não bloqueia os efeitos citotóxicos da enzima.⁴⁶

Em 2015, Pedroso *et al* publicou um artigo analisando as relações filogenéticas e estruturais das SMases D de 29 espécies diferentes, incluindo aranhas, bactérias e carrapatos. A grande maioria das sequencias identificadas foram classificadas como SMases D classe II e somente as espécies *L. gaucho* e *L. laeta* apresentaram SMases D pertencentes as duas classes (aproximadamente 50% de cada). Foram analisadas filogeneticamente a sequência das proteínas, seus códons e sua sequência nucleotídica através de árvore de máxima verossimilhança e probabilidade bayesiana. Na análise, as SMases D classe I de *L. gaucho* e *L. laeta* ficaram agrupadas em um mesmo clado, indicando uma evolução recente através de um ancestral comum e corroborando com a análise realizada por Dias-Lopes *et al* 2013⁴⁵. Embora a maioria das SMases D classe I tenham ficado agrupadas neste clado, foi possível observar outro clado contendo SMases D classe I, indicando assim, uma evolução convergente para as enzimas classe I. Como a diferença principal entre as enzimas de classe I e classe II está na ponte dissulfeto adicional (Cys⁵³-Cys²⁰¹), este resultado indica que esta condição apareceu independentemente nos dois clados e apresenta uma vantagem evolutiva. Esta

modificação pode ser considerada uma vantagem evolutiva das enzimas classe I em relação as enzimas classe II pois, devido à falta da ponte de dissulfeto, há uma maior exposição do sitio catalítico das enzimas classe I. Outra vantagem evolutiva das enzimas classe I em relação as enzimas classe II foi a observação de que as enzimas classe II possuem maior proporção de aminoácidos neutros e ácidos em seu sitio catalítico, o que dificulta sua interação com membranas plasmáticas.

Visto que estas enzimas tem um papel essencial na toxicidade do veneno e que a função da região C- terminal conservada ainda não foi tão bem estudada como as outras regiões destas proteínas, o presente trabalho tem como intuito o estudo desta região através da produção de proteínas mutantes. Para as mutações, foram escolhidos os aminoácidos D277 e W280 por serem dois aminoácidos bem conservados da região C-Terminal e os aminoácidos que formam o contato mais energético com a estrutura TIM Barril da proteína. Foram produzidos 3 mutantes, D277A, W280A e o mutante duplo, D277A-W280A. O trabalho se dedica a avaliar o efeito das mutações na estrutura da proteína bem como em sua função enzimática.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

- Avaliar os efeitos da mutação de aminoácidos conservados na esfingomielinase rLID1 do veneno de *Loxosceles intermedia* em sua função.

2.2. Objetivos Específicos

- Selecionar os aminoácidos a serem mutados de acordo com a conservação.
- Avaliar o efeito das mutações na estrutura da proteína *in silico*.
- Obter as proteínas mutantes rLID1_D, rLID1_W e rLID1_DW.
- Avaliar o efeito da mutação na atividade *in vitro* e *in vivo* da enzima.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Sintética e Biomiméticos, situado no Instituto de Ciências Biológicas (ICB), da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) em Belo Horizonte, Minas Gerais.

3.1. Modelagem, Dinâmica Molecular e Análise Estrutural

A modelagem e a dinâmica molecular foram realizadas em colaboração com a doutoranda Stefania Monteleone do laboratório do Prof. Dr. Klaus R. Liedl no Instituto de Química Geral, Teórica e Inorgânica da Universidade de Innsbruck.

Para realização da dinâmica molecular foi utilizado como estrutura o acesso 3RLH do PDB (Protein Data Bank). A estrutura foi preparada utilizando o MOE (Molecular Operating Environment) e as simulações de dinâmica molecular realizadas utilizando o programa AMBER 14. Para os mutantes, os resíduos mutados foram trocados utilizando MOE e logo após, feito uma minimização local de energia. As dinâmicas foram todas realizadas com os mesmos parâmetros: modelo da água TIP3P; temperatura 26,85°C (300K); equilíbrio com e sem ligantes restritos (Mg^{2+} e PEG); amostragem sem restrições para 500ns; análise de trajetórias usando CPPTRAJ (AmberTools). Para criação dos modelos utilizados nas figuras foi utilizado o programa PyMOL.

3.2. Organismos utilizados

Para a elaboração deste trabalho foram utilizadas duas cepas de *Escherichia coli* modificadas para a expressão heteróloga de proteínas, BL-21(DE3) e BL-21(DE3) Arctic Express (**Tabela 4**).

Tabela 4. Genótipo das cepas de bactéria utilizadas neste trabalho.

CEPA	GENÓTIPO
BL-21(DE3)⁴⁷	<i>E. coli B F⁻ dcm⁺ ompT hsdS(r_B⁻ m_B⁻) gal λ(DE3)</i>
BL-21(DE3) ARCTIC EXPRESS⁴⁸	<i>E. coli B F⁻ dcm⁺ ompT hsdS(r_B⁻ m_B⁻) gal λ(DE3) Tet^r endA Hte [cpn10 cpn60 Gent^r]</i>

A sequência do gene da LID1 (GI: 33348850)³³ foi obtida no banco de dados GenBank e o gene da LID1, LID1_D (D277A), LID1_W (W280A) e LID1_DW (D277A, W280A) foram sintetizados e subclonados no vetor pET28a-TEV⁴⁹ pela empresa Gen Script®.

3.3. Preparo de células competentes, transfecção e seleção de colônias.

O preparo de células competentes⁵⁰ e a transfecção foram realizados em diversas etapas do trabalho utilizando o mesmo procedimento aqui descrito para as duas cepas BL-21(DE3) e BL-21(DE3) Arctic Express.

Inicialmente, as bactérias foram inoculadas em 20 mL de meio de cultura LB⁵¹ sem antibiótico e o erlenmeyer foi mantido *overnight* (aproximadamente 16h) no shaker (Marconi MA832) a 37°C (310,15K) e 200rpm. No dia seguinte, foi realizada uma expansão da cultura para 100 mL de meio LB sem antibiótico em uma diluição de 50 vezes, que foi incubada até atingir a OD_{600nm} de 0,4. Em seguida, o meio de cultura expandido foi centrifugado a 10,000 g por 5 minutos 4°C (277,15K) (ThermoFisher Heraeus Multifuge X3R), o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuscitado em 20 mL de solução estéril de CaCl₂ 0,1M (mantida 4°C ou 277,15K). O material foi transferido para um banho de gelo no qual permaneceu durante 1 hora e após esse período, centrifugado a 10,000 g por 5 minutos a 4 °C (277,15K). O sobrenadante foi novamente descartado e o *pellet* ressuscitado em 1mL de solução de CaCl₂ 0,1 M e Glicerol 15 %. Foram preparadas alíquotas de 100 µL que foram imediatamente estocadas em freezer a -80°C (193,15K)⁵⁰.

Para a transformação, foi utilizado o método de choque térmico⁵². Inicialmente, as alíquotas de bactérias competentes foram mantidas em banho de gelo para seu descongelamento gradual. Cada alíquota recebeu 1 a 50 ng de material genético obtido previamente, que foi homogeneizado lentamente. As alíquotas permaneceram no gelo por trinta minutos e em seguida, submetidas ao choque térmico: primeiro, colocadas no banho seco a 42°C (315,15K) por 30 segundos (Fisher Scientific Isotemp) e, em seguida, a 4°C por 5 minutos. Adicionou-se então 900 µL de meio SOC⁵² sem antibiótico no qual permaneceu por 1 hora a 37°C (310,15K), sob agitação de 200rpm. Após esse período, as bactérias transformadas foram semeadas em placas de petri contendo LB Agar⁵¹ e Kanamicina na concentração final de 50 µg/mL, a fim de selecionar as colônias portadoras do inserto capazes de crescer em meio com Kanamicina. As placas foram fechadas, invertidas e mantidas em estufa a 37°C (310,15K) *overnight*. No dia seguinte, foi selecionado um clone que foi inoculado em 20 mL de meio LB contendo Kanamicina (50 µg/mL). Esse material ficou incubado no shaker *overnight* a 37°C (310,15K) e 200rpm. Em seguida, o material foi separado em alíquotas e armazenado no freezer -80°C (193,15K).

3.4. Expressão das proteínas recombinantes rLID1, rLID1_D, rLID1_W e rLID1_DW em BL-21(DE3)

As alíquotas de bactérias BL-21(DE3) contendo o plasmídeo com a proteína de interesse que haviam sido previamente transformadas e estocadas no freezer -80°C (193,15K) foram descongeladas no gelo e em seguida inoculadas em um erlenmeyer de 100 mL com 20mL de meio LB contendo Kanamicina (50 µg/mL) no qual cresceram *overnight* a 37°C (310,15K) e 200rpm. Pela manhã, o meio contendo as bactérias foi vertido em meio de 1000ml LB contendo Kanamicina (50µg/ml) e colocado para crescer sob agitação (200rpm) e a 37°C (310,15K) no qual permaneceu até atingir a fase log de crescimento, que corresponde a uma densidade ótica (OD_{600nm}) entre 0,6-0,8. Após atingir a fase de crescimento ideal das bactérias, a expressão das proteínas recombinantes foi induzida pela adição de isopropyl β-D-1-

thiogalactopyranoside (IPTG) na concentração final de 0,5 mM e deixado a 37 °C (310,15K) e 200 rpm por um período de 4 horas. Após o fim da expressão, o meio de cultura foi centrifugado a 10,000 g por 10 minutos a 4 °C (277,15K) e o *pellet* armazenado no freezer -80 °C (193,15K).

3.5. Expressão das proteínas recombinantes rLID1, rLID1_D, rLID1_W e rLID1_DW em BL-21(DE3) Arctic Express

Todo procedimento de expressão foi realizado de acordo com as recomendações do fabricante da BL-21(DE3) Arctic Express⁴⁸.

As alíquotas de bactérias estocadas no freezer -80 °C (193,15K) foram descongeladas no gelo e em ambiente estéril foram inoculadas em 20 mL de meio LB contendo Gentamicina (20µg/ml) e Kanamicina (50µg/ml) no qual cresceram *overnight* a 37 °C (310,15K) e 200 rpm. Em seguida, a cultura foi transferida para 1000 mL de meio LB sem antibiótico (diluição de 50 vezes) e incubada por 3 horas a 30 °C (303,15K) e 200 rpm. Após esse período de incubação, em ambiente estéril, foi medido a absorbância do meio (OD_{600nm}) que deveria estar entre 0,6-0,8 (fase log de crescimento bacteriano) para seguir para a próxima etapa. O erlenmeyer de 1000 mL contendo a cultura foi incubado a 12°C (285,15K) por 10 min e em seguida foi adicionado o indutor de expressão das proteínas recombinantes, isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG), em uma concentração final de 0,5 mM e o meio de expressão foi incubado por 24 h a 12 °C (285,25K) e 200 rpm. Após o período de expressão de 24 h, as bactérias foram centrifugadas a 10,000 g por 10 minutos a 4°C (277,15K) e o *pellet* foi armazenado no freezer -80 °C (193,15K).

3.6. Lise Celular e Teste de Solubilidade

O *pellet* produzido durante a fase de expressão foi descongelado no gelo e o *pellet* equivalente a 500 mL de volume de expressão foi ressuscitado em 20 mL de Tampão de Lise (50mM Tris-HCl pH 7,5, 300mM NaCl, 20mM Imidazol, 5mM MgSO₄, 1mM PMSF e 0,25% m/v de Lisozima) utilizando o XH-

D Vortex Mixer (Global Trade Technology). Em seguida, foi realizado 3 ciclos de choque térmico no qual o tubo congelava utilizando nitrogênio líquido (-196,15°C ou 77K) e era reaquecido em banho maria a 37°C (310,15K). Após a fase de choque térmico, a amostra sonicada utilizando o equipamento Fisher Scientific Sonic Dismembrator Model 500 durante 3 ciclos de 30 segundos com amplitude 30% e centrifugada a 10,000 g por 30 minutos a 4 °C (277,15K). O sobrenadante foi coletado em um tubo Falcon de 50 mL e separado do *pellet*. Ambas frações (Solúvel e Insolúvel) foram analisados através da técnica de gel de poliacrilamida SDS-PAGE como descritos no item 3.8.

3.7. Purificação das proteínas recombinantes rLID1, rLID1_D e rLID1_W

A purificação da rLID1 já havia sido padronizada anteriormente por Oliveira *et al*⁵³ e o protocolo foi utilizado para purificar a rLID1 e, com algumas modificações, para rLID1_D e rLID1_W.

Para purificação da rLID1, rLID1_D e rLID1_W, foi realizado a técnica de cromatografia de afinidade utilizando a coluna HisTrap HP Ni²⁺ (GE Healthcare Life Sciences) e o equipamento ÄKTA Pure (GE Healthcare Life Sciences). A coluna foi equilibrada utilizando tampão ÄKTA A (50mM Tris-HCl PH 7,5, 300mM NaCl, 20mM Imidazol, 5mM MgSO₄, 1mM PMSF) e em seguida a amostra foi injetada utilizando o fluxo de 5mL min⁻¹ para rLID1⁵³ e 1mL min⁻¹ para rLID1_D e rLID1_W. Para eluição da proteína foi realizado um gradiente de 0 a 100%, utilizando o tampão ÄKTA B (50mM Tris-HCl PH 7,5, 300mM NaCl, 500mM Imidazol, 5mM MgSO₄, 1mM PMSF). A cromatografia foi monitorada através da absorvância a 280nm (aminoácidos contendo anéis aromáticos)⁵⁴ e os picos obtidos foram coletados e submetidos a cromatografia de gel filtração, utilizando a coluna HiLoad 16/600 Superdex 75 pg (GE Healthcare Life Sciences) e o equipamento ÄKTA Pure (GE Healthcare Life Sciences). Foi utilizado para eluição o tampão ÄKTA GF (50mM Tris-HCl PH 7,5, 300mM NaCl, 5mM MgSO₄, 1mM PMSF) e logo após o término da cromatografia, os picos obtidos foram coletados e armazenados a -20 °C (253,15K).

3.8. Análises através de eletroforese SDS-PAGE e Western Blotting

Durante a realização do trabalho utilizou-se diversas vezes a técnica de eletroforese SDS-PAGE⁵⁵ na concentração de 15% de poliacrilamida e 10 % de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS). As amostras foram preparadas utilizando o tampão de amostra em condições redutoras (Tris-HCl 0,5 mol/l, pH 6.8, glicerol 10%, SDS 10% (m/v) e azul de bromofenol 0,1% (m/v), 5,0% β -mercapto-etanol) e fervidas por 5 minutos. As corridas de eletroforese foram realizadas utilizando o sistema eletroforese vertical (CVS10 OmniPage Cleaver Scientific Ltd) por 2 horas a 150V. Para a visualização das bandas proteicas, o gel foi transferido para solução corante (50% metanol; 10% ácido acético e 0,1% do corante Azul de Coomassie brilhante R250 - Vetec[®]) no qual permaneceu por no mínimo 1 hora. Após a coloração do gel, a solução corante foi substituída pela solução descorante (30% etanol; 10% ácido acético) e o gel deixado sob agitação até obter a descoloração adequada para visualização dos perfis proteicos. Foram utilizado os padrões de massa molecular: Pierce[™] Unstained Protein MW Marker e Precision Plus Protein[™] Dual Color Standards BioRad.

3.9. Estimativa Proteica

Para a estimativa da quantidade de proteína presente nas amostras purificadas foi utilizado o colorimétrico descrito por Bradford⁵⁶ em 1976. Os ensaios foram padronizados para microplacas em um volume final de 200 μ l, no qual 180 μ l eram reagente de Bradford⁵⁶ e 20 μ l amostra completada com água (a amostra foi completada com água para que todas as amostras tenham o mesmo volume final). A leitura de absorvância foi realizada no comprimento de onda de 595nm no equipamento Synergy HT (BioTek) e para a conversão da absorvância da amostra em quantidade total de proteína, foi utilizada uma curva padrão de quantidade total de soro albumina bovina (BSA).

3.10. Atividade esfingomielinásica *in vitro*

A atividade de esfingomielinase das proteínas recombinantes rLID1 e rLID1_D foram determinadas utilizando-se o Amplex[®] Red sphingomyelinase assay kit⁵⁷. A atividade esfingomielinase é monitorada indiretamente utilizando 10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine (Amplex[®] Red), reagente fluoróforo sensível a H₂O₂ na presença de HPR (Peroxidase de raiz-forte, *Armoracia rusticana*). Primeiramente, a esfingomielinase hidrolisa a esfingomielina em ceramida e fosforilcolina. Em seguida, a fosfatase alcalina hidrolisa a fosforilcolina em colina, que é oxidada pela colina oxidase em betaína e H₂O₂. Por fim, a H₂O₂ reage com HPR e Amplex[®] Red produzindo resorufina que é uma molécula fluorófora que ao ser excitada a 530-560nm e emite fluorescência no comprimento de onda de 590nm (**Figura 9**).

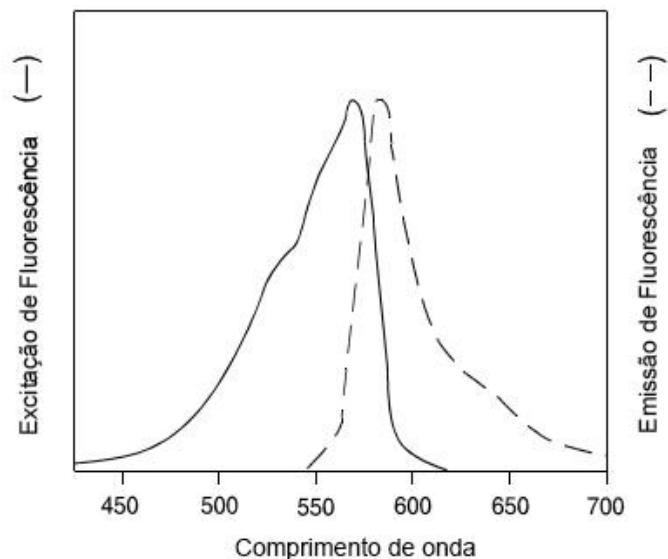


Figura 9. Espectro de Fluorescência da Resorufin. Imagem adaptada do manual **Amplex[®] Red sphingomyelinase assay kit⁵⁷**. Linha cheia representa a excitação da molécula resorufin. Linha tracejada representa a emissão da molécula resorufin quando excitada.

Para o protocolo foram utilizadas as recomendações do fabricante. Os ensaios foram realizados em microplaca de 96 poços pretas de fundo chato e a

fluorescência medida utilizando o equipamento Synergy HT (BioTek) que possui incubadora de temperatura controlada. Em cada poço da microplaca foram adicionados 100 μ L de amostra completada com tampão de reação (0,5M Tris-HCl, 50mM MgCl₂, pH7,4) e 100 μ L do tampão de trabalho (Amplex[®] Red 10mM, HPR 200U/mL, Colina Oxidase 20U/mL, Fosfatase Alcalina 400U/mL, Esfingomielina 5mM e q.s.p. tampão de reação)⁵⁷. Em seguida, a placa foi incubada a 37°C (310,15K) durante 30 minutos e logo após, foi realizada a leitura na faixa de comprimento de onda de 590/35 nm. Para excitação do fluoróforo foi utilizado o comprimento de onda de 530/25 nm (**Figura 9**). Para leituras subsequentes, a microplaca voltou a ser incubada a 37°C (310,15K) e o mesmo comprimento de onda foi utilizado na excitação e na leitura de emissão da microplaca.

3.11. Atividade esfingomielinásica *in vivo*

A atividade dermonecrótica das proteínas recombinantes mutadas foi determinada em coelho com modificações da descrição feita por FURLANETO e ROSA em 1962⁵⁸.

Para controle do teste de atividade in-vivo foi utilizada a proteína recombinante wildtype (rLID1) por esta atividade estar bem padronizada. A quantidade de 2,5 μ g das proteínas dermonecróticas rLID1, rLID1_D e rLID1_W, padronizado previamente por nosso grupo⁵³, foram diluídas em 0,1 ml de PBS e injetados intradermicamente (I.D.) no dorso de dois coelhos fêmeas (n=2) com aproximadamente 2 kg. Após a injeção, os animais foram monitorados por 72 horas e a atividade dermonecrótica definida como a menor concentração da proteína que induz uma área necrótica de 1 cm² foi medida nos tempos 0, 4, 24, 48 e 72h.

Para determinação de uma medida mais precisa da área necrótica foi utilizado um padrão de medidas de áreas (**Figura 10**) obtido do Instituto Nacional de Endemias Rurais (Centro de Pesquisas de Belo Horizonte).

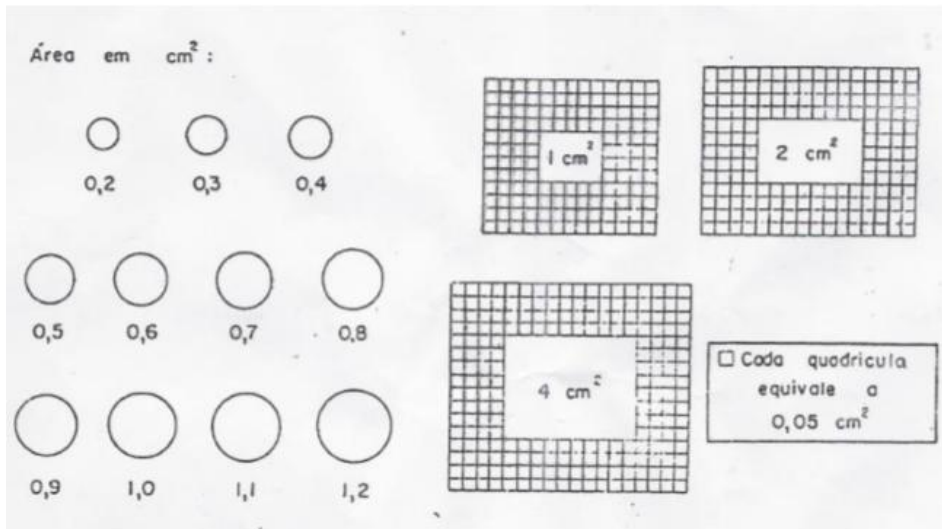


Figura 10. Padrão para medida de área. Padrão obtido do Instituto Nacional de Endemias Rurais – Centro de Pesquisas de Belo Horizonte.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Modelagem e dinâmica molecular da proteína recombinante rLID1_D, rLID1_W e rLID1_DW

A estrutura da proteína rLID1 foi adquirida no Protein Data Bank (PDB) com o acesso 3RLH, que possui somente um resíduo de diferença da proteína expressa neste trabalho (G173S), e preparada utilizando o programa Molecular Operating Software (MOE). O preparo foi realizado efetuando a troca do resíduo de glicina por serina (G173S) na rLID1 e em seguida os mutantes rLID1_D, rLID1_W e rLID1_DW foram modelados em cima da rLID1 realizando a troca dos resíduos de ácido aspártico por alanina (D277A) para a rLID1_D, triptofano por alanina (W280A) para a rLID1_W e a mutação dupla (D277A, W280A) para a rLID1_DW. Finalmente, foi realizada a minimização local de energia. As estruturas foram então submetidas a análise de dinâmica molecular utilizando o programa AMBER 14.

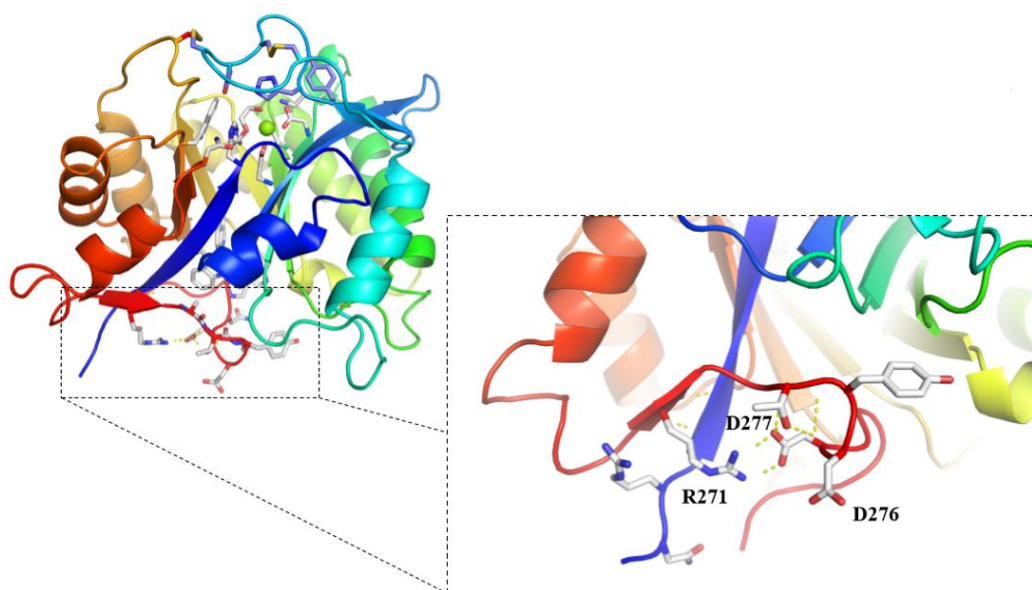


Figura 11. Modelo para a proteína recombinante rLID1. Figura gerada pelo PyMOL a partir da dinâmica molecular. Modelo tridimensional da proteína *wildtype* rLID1 e em zoom a região C-Terminal (em vermelho) e a região N-Terminal (em azul). **D:** Ácido Aspártico **R:** Arginina.

Podemos observar (zoom, **Figura 11**) em azul o N-Terminal da proteína *wildtype* (rLID1) e em vermelho sua região C-Terminal. Logo após última folha- β da proteína, no qual estão representados a arginina na posição 271 (R271), os ácidos aspárticos na posição 276 (D276) e 277 (D277). Dos aminoácidos representados, a arginina na posição 271 (R271) está na última folha- β da proteína, o ácido aspártico da posição 277 faz parte do motivo C-Terminal bem conservado (ATXXDNPW) de todas as SMases D e o ácido aspártico da posição 276 (D276) está em uma posição variável do motivo C-Terminal bem conservado (ATYDDNPW para a rLID1).

Analisando a estrutura mais detalhadamente, constatou-se que o ácido aspártico na posição 277 (D277) forma uma ponte salina com a arginina da posição 271 (R271). Por sua vez, a cadeia principal desta arginina interage com os resíduos da região N-Terminal, que possui a folha- β da histidina catalítica 12 (H12), estabilizando-a (zoom, **Figura 11**). A ponte salina havia sido prevista anteriormente por Dias-Lopes *et al* utilizando STING Java Protein Dossier em 2013⁴⁵, enquanto a interação da cadeia principal com os resíduos da região N-Terminal não foi citado no artigo.

Durante a simulação da dinâmica molecular, quando o ácido aspártico é substituído por uma alanina (D277A) na proteína mutante rLID1_D, foi observado que o ácido aspártico da posição 276 (D276) substitui o resíduo da posição 277 somente em 10% dos casos durante o tempo simulado (200 ns) (**Figura 12**). Portanto, ao realizar a mutação neste resíduo, a ponte salina com a arginina na posição 271 (R271) é perdida. Por sua vez, ao perder a interação com o ácido aspártico 277 (D277), a arginina realiza interações com o solvente em volta (H_2O) e sua cadeia lateral forma uma ponte de hidrogênio com a cadeia principal do N-Terminal. Esta interação parece ser importante, pois, o N-Terminal da proteína pertence a mesma folha- β que um dos resíduos catalíticos, o resíduo de histidina da posição 12 (H12). Além disso, esta folha- β interage com a alça catalítica (que possui o outro resíduo catalítico, H47) através da cadeia lateral do ácido aspártico 53 (D53) e a cadeia principal da arginina 56 (R56).

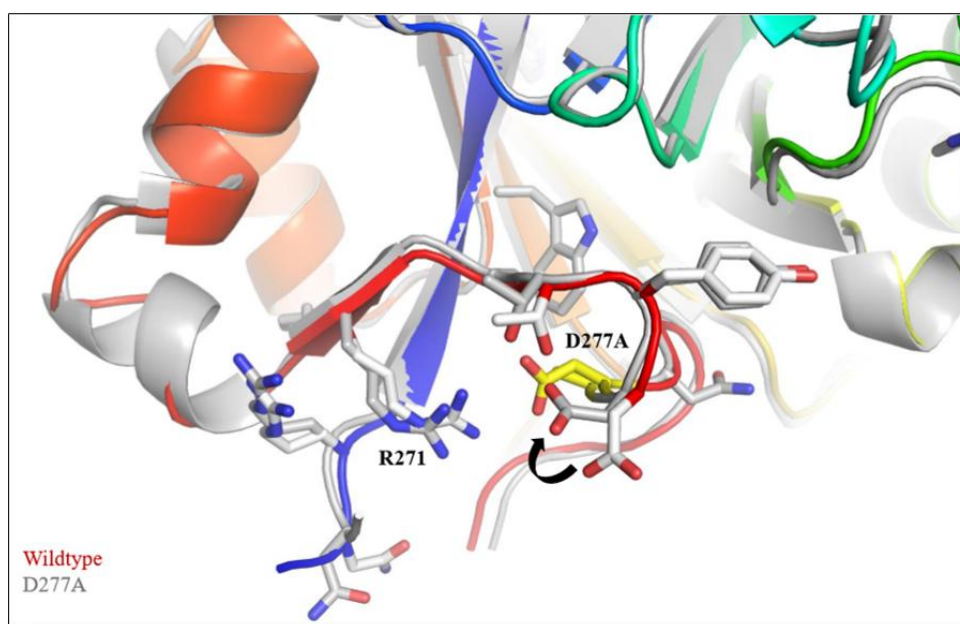


Figura 12. Sobreposição da proteína mutante rLID1_D (D277A) com a proteína *wildtype* rLID1. Figura gerada pelo PyMOL a partir da estrutura mais representativa (cluster 0) gerada na dinâmica molecular. A proteína *wildtype* rLID1, em cor, enquanto a proteína mutante D277A, em cinza. Em amarelo, o D277 na proteína *wildtype* e aminoácido mutado D277A. Em cinza, o D276 que substitui o D277. **D:** Ácido Aspártico **R:** Arginina **A:** Alanina.

Retornando a analisar a estrutura da proteína *wildtype* (rLID1) em relação a segunda proteína mutante (rLID1_W), temos representados (zoom, **Figura 13**) o triptofano na posição 280 (W280), a tirosina na posição 128 (Y128) e o ácido aspártico na posição 159 (D159). Dos aminoácidos representados, somente o triptofano faz parte do motivo C-Terminal bem conservado (ATXXDNPW). A tirosina 128 (Y128) representada faz parte de uma das folhas- β do núcleo do TIM Barril (α/β)₈, enquanto o ácido aspártico 159 (D159) faz parte de uma das α -hélices externas.

Foi possível observar que o triptofano da posição 280 (W280) forma uma interação de hidrogênio com a cadeia principal do ácido aspártico 159 (D159) e interações aromáticas com a histidina da posição 191 (H191, não representada) e a tirosina da posição 128 (Y128). Das interações observadas durante a dinâmica molecular, somente a interação de hidrogênio com o ácido aspártico 159 (D159) não havia sido predita por Dias-Lopes *et al* utilizando o STING Java Protein Dossier em 2013⁴⁵.

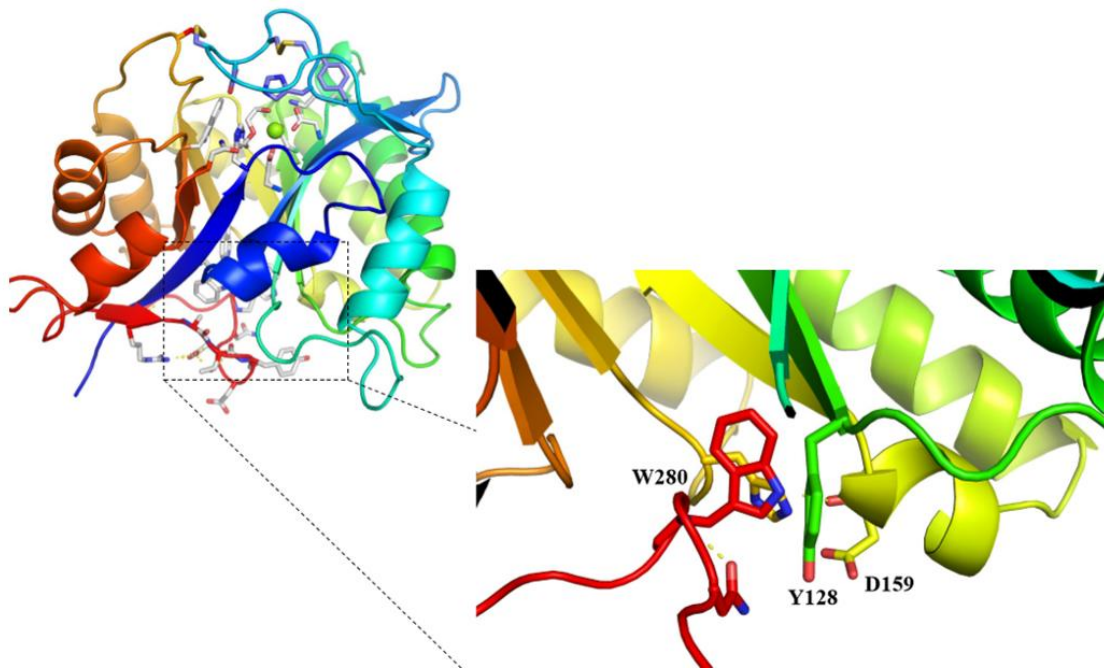


Figura 13. Modelo para a proteína recombinante rLID1. Figura gerada pelo PyMOL a partir da dinâmica molecular. Modelo tridimensional da proteína *wildtype* rLID1 e em zoom a região C-Terminal (em vermelho). **W:** Triptofano **Y:** Tirosina. **D:** Ácido Aspártico.

Durante a simulação da dinâmica molecular da proteína mutante rLID1_W em que o triptofano 280 é substituído por uma alanina (W280A) foi possível observar (**Figura 14**) que a tirosina da posição 128 (Y128) busca substituir o triptofano 280 (W280) em suas interações, porém, é incapaz de formar interação de hidrogênio com o ácido aspártico 159 (D159) para estabilizá-lo.

O deslocamento da tirosina 128 (Y128) buscando substituir as interações do triptofano 280 (W280) faz com que a alça próxima a folha- β em que o triptofano 280 (W280) está inserido se torne menos estável e mais flexível (**Figura 16 B**). Provavelmente o motivo pelo qual há mudança na alça próximo a folha- β e não na folha- β aonde a tirosina está inserida se deva ao fato que esta folha- β forma o núcleo da proteína, portanto, possui diversas interações que a estabilizam e ajudam a estabilizar o núcleo hidrofóbico da proteína sem expô-lo ao ambiente externo, normalmente formado por resíduos polares. Geralmente, quando há desestabilização do núcleo hidrofóbico da proteína, a proteína toda se desestabiliza.

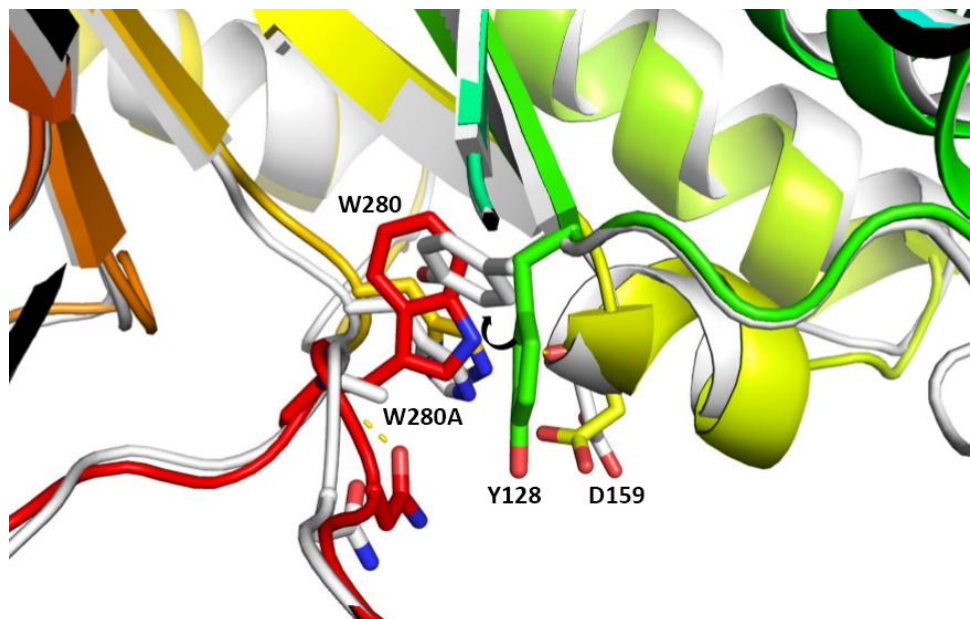


Figura 14. Sobreposição da proteína mutante rLID1_W (W280A) com a proteína *wildtype* rLID1. Figura gerada pelo PyMOL a partir da estrutura mais representativa (cluster 0) gerada na dinâmica molecular. A proteína *wildtype* rLID1, em cor, enquanto a proteína mutante W280A, em branco.

O *B-factor* ou *Debye-Walker factor* pode ser simulado durante uma dinâmica molecular e é interpretado como a medição do deslocamento de átomos da sua posição média em uma estrutura cristalográfica causada pela vibração dependente de temperatura. Em uma proteína, o *B-factor* pode ser interpretado como a flexibilidade do resíduo dentro da estrutura proteica⁵⁹. Durante as análises da proteína *wildtype* e as proteínas mutantes foi gerado um gráfico de flexibilidade relativa por resíduo (**Figura 15**) no qual foi possível prever as regiões da proteína que tiveram alteração na flexibilidade devido as mutações na região C-Terminal bem conservada.

Estão representados em preto, vermelho, verde e azul, a flexibilidade relativa para a proteína *wildtype* rLID1, a proteína mutante rLID1_D (D277A), a proteína mutante rLID1_W (W280A) e a proteína mutante rLID1_DW (D277A, W280A), respectivamente.

B-factor

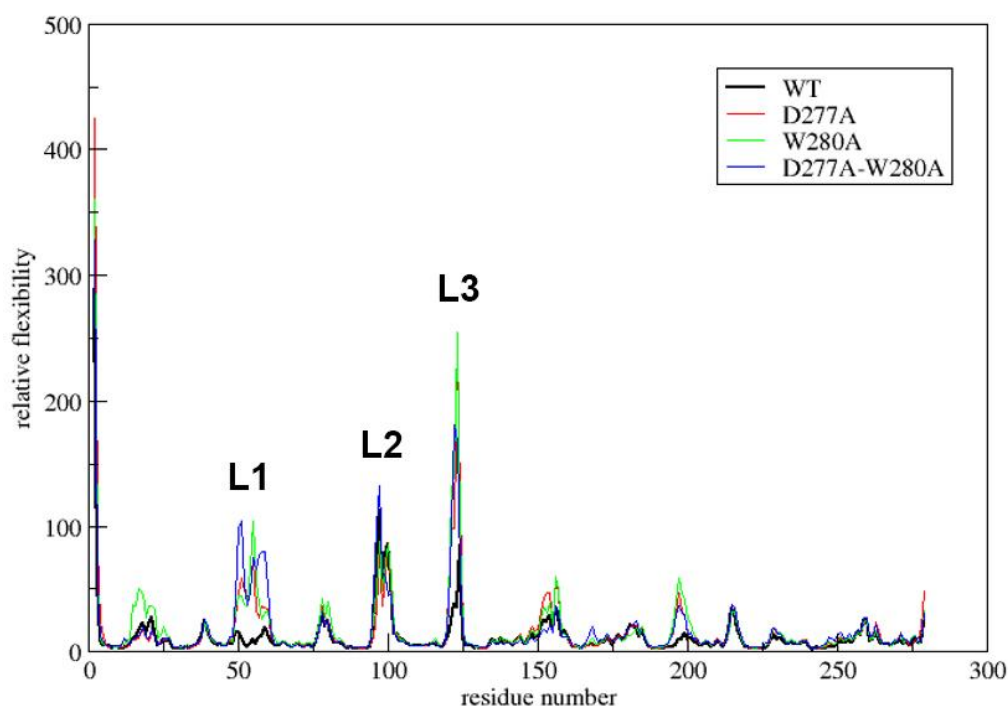


Figura 15. Flexibilidade do resíduo dentro da estrutura proteica da rLID1 e das proteínas mutantes rLID1_D, rLID1_W e rLID1_DW. Gráfico flexibilidade relativa por resíduo (Gráfico B-factor) gerado durante a dinâmica molecular. Linha preta, proteína *wildtype* rLID1; Linha vermelha, proteína mutante rLID1_D (D277A); Linha verde, proteína mutante rLID1_W (W280A); Linha azul, proteína mutante rLID1_DW (D277A, W280A) **L1, L2 e L3:** regiões com aumento de flexibilidade referenciado na **Figura 16.**

Foi observado que houve um leve aumento de flexibilidade próximo aos resíduos 20 (N-Terminal), 159 (D159, discutido anteriormente) e 200 (alça flexível). O aumento de flexibilidade da posição 159 pode ser explicado pelo fato de que na posição 159 temos o ácido aspártico que perde a interação de hidrogênio após a mutação do triptofano 280. Apesar das mutações terem ocorrido nos resíduos 277 e 280, as alterações mais significativas ocorreram nas regiões próximas aos resíduos 60 (**L1, Figura 15**) e 125 (**L3, Figura 15**). Podemos observar também que na região próxima ao resíduo 100 (**L2, Figura 15**) há uma alta flexibilidade, porém, esta flexibilidade está presente na proteína *wildtype* rLID1 e, portanto, não houve aumento de flexibilidade. Ao analisarmos aonde se encontram as regiões L1, L2 e L3 percebemos que todas estas regiões são alças da proteína (**Figura 16**).

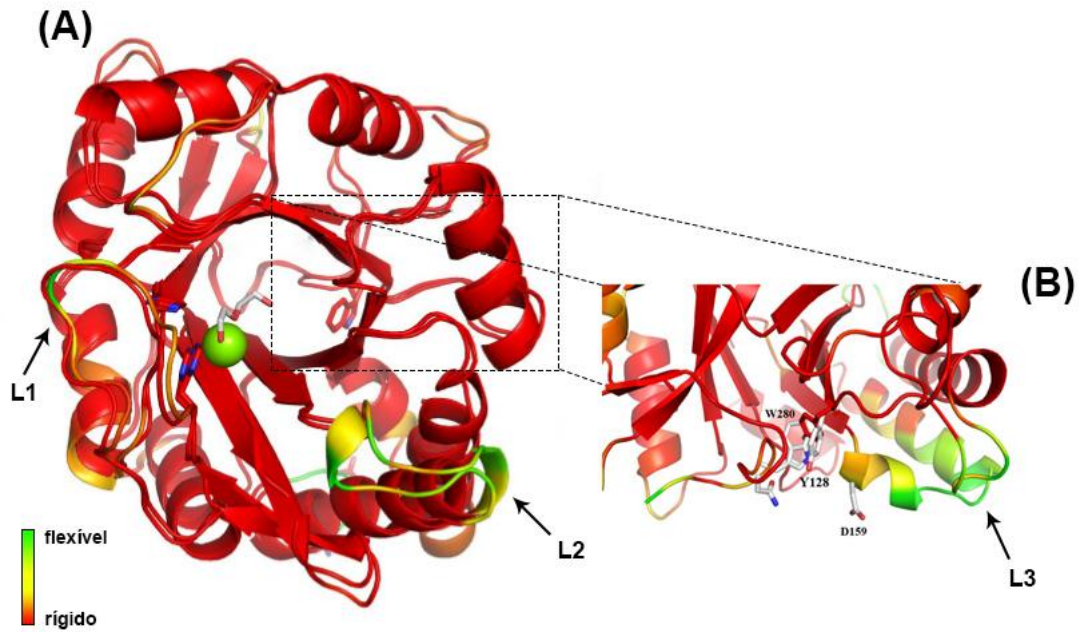


Figura 16. Regiões da proteína rLID1 em que houveram aumento de flexibilidade. A: Sobreposição da proteína mutante rLID1_W (W280A) com a proteína wildtype rLID1 mostrando as regiões nas quais houveram alteração no B factor. **B:** Em zoom a região C-Terminal do modelo tridimensional da proteína *wildtype* rLID1 (sem sobreposição). Esta região está posicionada na parte de trás da figura A. **L1 (alça catalítica), L2 e L3:** regiões com aumento de flexibilidade **W:** Triptofano **Y:** Tirosina. **D:** Ácido Aspártico.

Entre as grandes alterações de flexibilidade, temos a alteração na alça 1 (L1), a alça catalítica da enzima, no qual houve aumento de flexibilidade em todas as proteínas mutadas mas principalmente nas proteínas rLID1_W e rLID1_DW onde houve a mutação do triptofano na posição 280. Este aumento de flexibilidade é especialmente importante pois na alça catalítica da enzima está inserido um dos resíduos responsáveis pela catálise da enzima, a histidina do resíduo 47 (H47), e é uma região conservada em todas as SMases D. O aumento de flexibilidade da alça catalítica se deve principalmente pelo aumento de flexibilidade do resíduo de arginina 56 (R56) que é sempre estável na proteína *wildtype* mas flexível nas proteínas mutantes. Embora, segundo as simulações, tenha ocorrido alteração na flexibilidade da alça catalítica, a dinâmica molecular foi incapaz de explicar o motivo deste aumento de flexibilidade. Além disso, ao analisarmos a estrutura cristalográfica da proteína, percebemos que a alça catalítica das enzimas SMases D classe II está ligado a alça flexível por uma ponte dissulfeto. Nas enzimas desta classe, a alça flexível é reduzida e está envolvida no deslocamento da alça catalítica, protegendo o

sítio catalítico⁴². Porém, apesar da ligação pela ponte dissulfeto, houve somente uma leve alteração de flexibilidade na alça flexível (região próxima ao resíduo 200, **Figura 15**).

Na alça 3 (**L3**) podemos perceber que houve um aumento de flexibilidade em todas as mutações (**Figura 15**), porém, o maior aumento foi causado pela mutação do triptofano na posição 280 (rLID1_W e rLID1_DW). Esta alça é onde está inserido o resíduo tirosina 128 (Y128) que procura substituir as interações feitas pelo triptofano 280 (W280) quando ocorre a mutação pela alanina (W280A). Como discutido anteriormente, esta tirosina está inserida em uma das folha- β do núcleo hidrofóbico da proteína e, portanto, como há diversas interações que estabilizam o núcleo da proteína é mais provável que ocorra uma alteração na alça próximo a folha- β .

As mudanças estruturais observadas durante a dinâmica molecular nos mostram que esta região C-Terminal bem conservada provavelmente tem a função extremamente importante de manter a integridade estrutural da proteína, já que a perda das interações realizadas pelos aminoácidos estudados foi capaz de interferir em outras partes da proteína que estão distantes dos sítios de mutação. A fim de obter mais resultados que comprovam esta teoria, foi realizado a parte experimental na qual essas proteínas foram expressas em sistema bacteriano.

4.2. Expressão e Teste de Solubilidade em BL21 (DE3)

O protocolo de expressão da rLID1 em BL21 (DE3) havia sido padronizado anteriormente por Oliveira *et al*⁵³. Para verificar a solubilidade da rLID1_D, rLID1_W e rLID1_DW, foi realizado um piloto de expressão em BL21 (DE3), comparando com a proteína rLID1, que é solúvel ao ser expressa nesse sistema de expressão⁵³. Para isso, os genes subclonados em pET28a-TEV referentes a cada proteína foram transformados em BL21 (DE3) competentes. Após 4 horas de expressão a 37°C, foi realizado a lise celular e as amostras centrifugadas para obtenção da fração solúvel e a fração insolúvel. Por fim, as amostras de tempo zero (T0), tempo final (T4), fração solúvel (SF) e fração

insolúvel (IF) foram submetidas a um gel SDS-PAGE 15% (**Figura 17**) para análise da expressão. A proteína tem um tamanho esperado de 33kDa e o padrão utilizado foi Pierce™ Unstained Protein MW Marker.

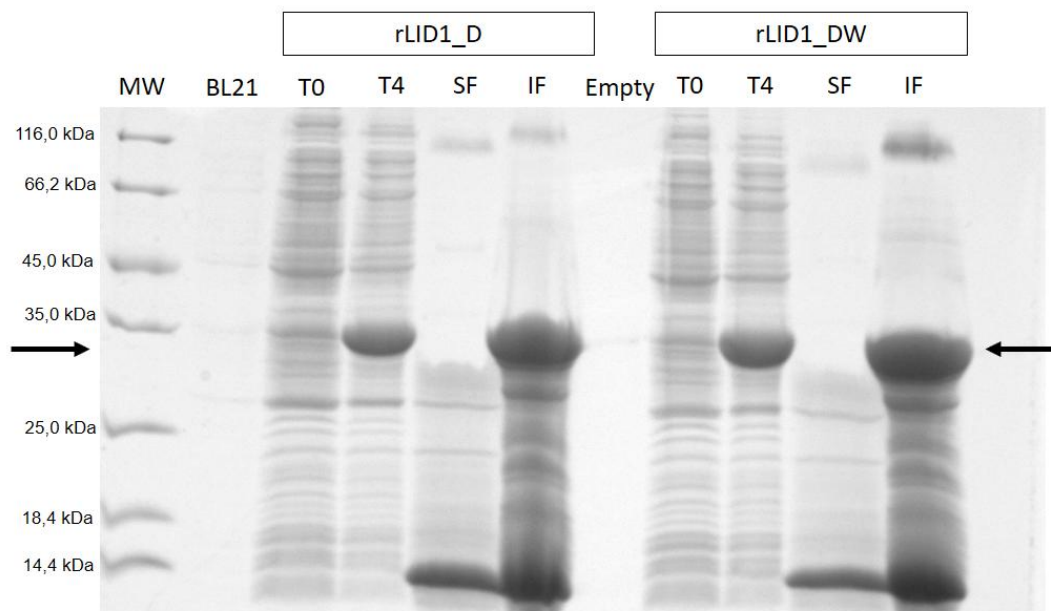


Figura 17. Expressão da rLID1_D, rLID1_DW em BL21(DE3) utilizando 4 horas de expressão e 0,5mM de IPTG. As canaletas de tempo zero (T0) referem-se a uma alíquota do meio contendo bactéria antes da adição de IPTG e as canaletas tempo final (TF) referem-se a uma alíquota do meio contendo bactéria após o período de expressão de 4 horas. As canaletas fração insolúvel (IF) e fração solúvel (SF) referem-se a alíquotas do meio contendo bactéria após a lise celular e separação através da centrifugação.

Observamos nas canaletas T0 e T4 da **Figura 17** que após o período de expressão há uma banda em 33kDa referente as proteínas de interesse, mostrando que houve expressão da proteína após 4 horas. Porém, após lise celular podemos constatar que as proteínas (LID1_D e LID1_DW) ficaram predominantemente na fração insolúvel (IF). Dessa forma, decidiu-se expressar essas proteínas em sistema de expressão BL21 (DE3) Arctic Express por facilitar o dobramento da proteína ao realizar a expressão em baixas temperaturas (12°C) e ao mesmo tempo, realizar a co-expressão de duas chaperonas (Cpn10 e Cpn60). Como controle do processo, foi escolhido a rLID1 que nunca havia sido expressa anteriormente nesta cepa, porém, serve de modelo para outras proteínas expressas neste trabalho.

4.3. Expressão e Teste de Solubilidade em BL21 (DE3) Arctic Express

Para expressão em BL21 (DE3) Arctic Express os genes de rLID1, rLID1_D, rLID1_W e rLID1_DW subclonados em pET28a-TEV foram transfectados na cepa de interesse e a expressão realizada conforme a metodologia proposta pelo fornecedor⁴⁸. O *pellet* gerado durante o protocolo de expressão foi ressuspendido utilizando tampão de lise e submetido ao protocolo de lise conforme previamente descrito em “Material e Métodos” (Item 3.5).

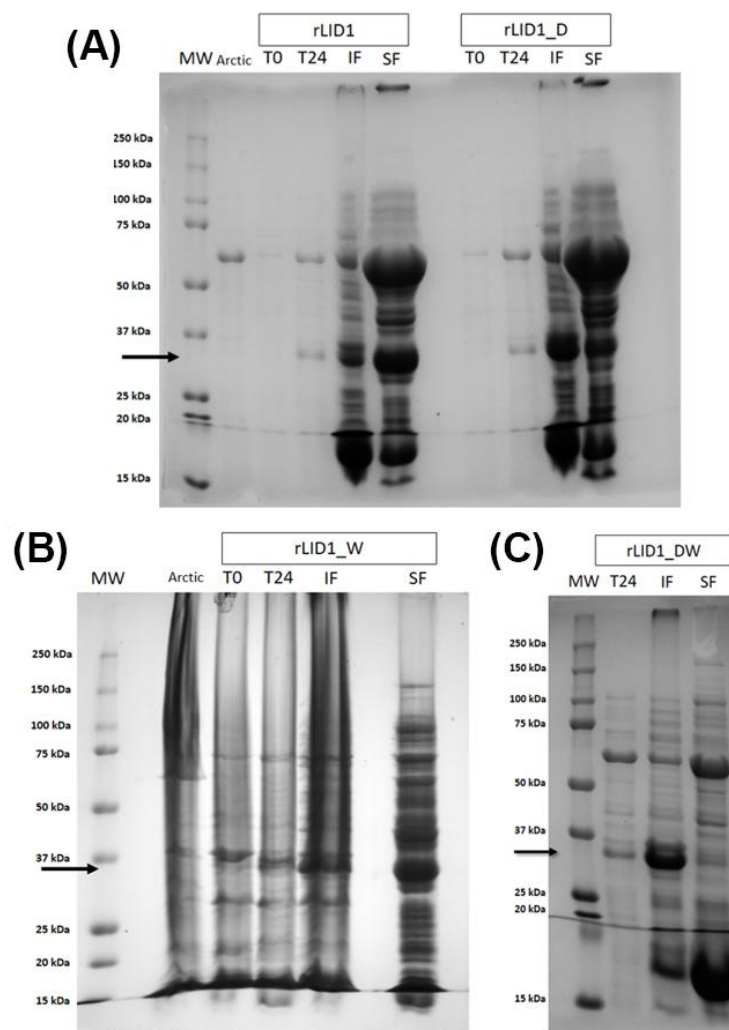


Figura 18. Expressão da rLID1, rLID1_D (A), rLID1_W (B) e rLID1_DW (C) em BL21(DE3) Arctic Express utilizando 24 horas de expressão e 0,5mM de IPTG. As canaletas de tempo zero (T0) referem-se a uma alíquota do meio contendo bactéria antes da adição de IPTG e as canaletas tempo final (TF) referem-se a uma alíquota do meio contendo bactéria após o período de expressão de 24 horas. As canaletas fração insolúvel (IF) e fração solúvel (SF) referem-se a alíquotas do meio contendo bactéria após a lise celular e separação através da centrifugação.

Em cada etapa do experimento foram separadas alíquotas para serem analisadas no final utilizando gel SDS-PAGE 15%. As alíquotas separadas foram: Arctic Express sem ser transfectada submetida ao protocolo de expressão, tempo inicial (T0), tempo final (T24), fração insolúvel (IF), e fração solúvel (SF). Para a análise utilizando gel SDS-PAGE 15% foi utilizado o padrão Precision Plus Protein™ Dual Color Standards BioRad.

Ao analisar os resultados (**Figura 18**), podemos perceber pelas canaletas tempo inicial (T0) e tempo final (T24) que houve a expressão de todas as proteínas de interesse. Observamos ainda, que as proteínas rLID1 e rLID1_W, permaneceram predominantemente na fração solúvel (SF) (**Figura 18 A e B**), enquanto a proteína rLID1_D ficou parcialmente solúvel (**Figura 18 A**) e a proteína rLID1_DW ficou completamente insolúvel (**Figura 18 C**). Além da banda de massa esperada (33kDa) foi possível observar também em alguns géis, uma banda por volta de 60kDa (**Figura 18 A e C**) sendo expressa em conjunto com a banda da nossa proteína. Embora a confirmação só possa ser feita através de Western Blotting, essa cepa de bactéria possui duas chaperonas de 10kDa e 57kDa (Cpn10 e Cpn60, respectivamente) que ajudam no dobramento das proteínas a baixa temperatura e são expressas constitutivamente, podendo assim, aparecer no gel de SDS 15%.

Foi observado na dinâmica molecular que os aminoácidos D277 e W280 presentes na proteína wildtype rLID1 fazem diversas interações importantes que participam na estabilização da estrutura proteica. Por este motivo, é provável que ao ocorrer mutação de dois aminoácidos como no caso da rLID1_DW (D277A, W280A) o dobramento da proteína fique prejudicado, formando corpos de inclusão e tornando-a insolúvel.

4.4. Purificação da proteína recombinante rLID1

O protocolo de purificação da rLID1 havia sido alterado e padronizado anteriormente por Oliveira *et al*⁶³ para a expressão em BL21 (DE3), portanto, foi utilizado o mesmo protocolo de purificação para a expressão em BL21

(DE3) Arctic Express. A fração solúvel do lisado contendo rLID1 foi submetida a cromatografia de afinidade em coluna HisTrap HP Ni²⁺ e eluída utilizando tampão de eluição contendo 500mM de imidazol com um gradiente de 0 a 100% no qual foi observado somente um pico de absorbância no 280nm (**Figura 19 A**).

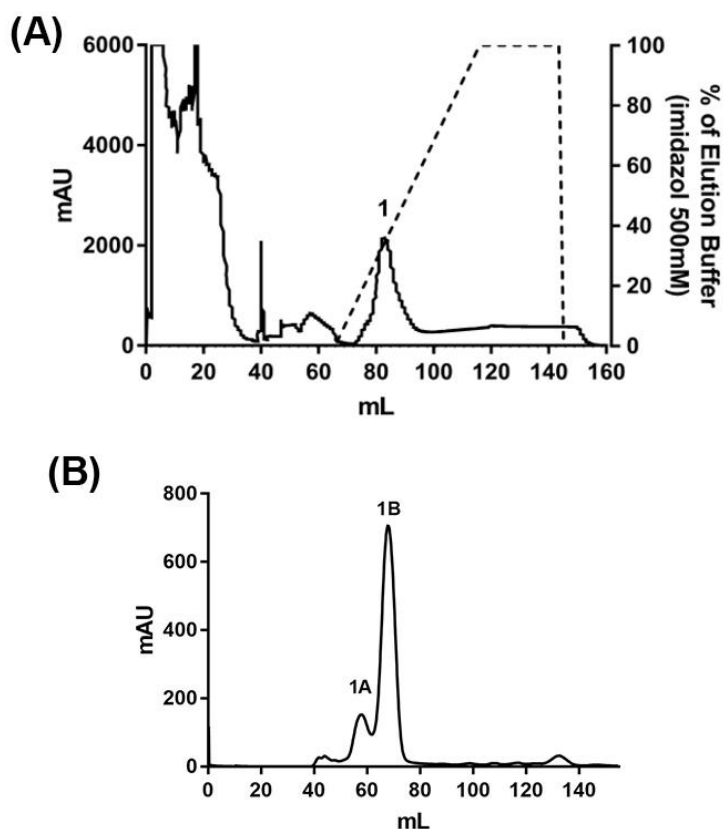


Figura 19. Purificação da esfingomielinase D recombinante de *Loxosceles intermedia* (rLID1). **A:** Perfil cromatográfico da purificação da proteína rLiD1 em coluna HisTrap HP Ni²⁺. Linha cheia representa a absorbância a 280nm; Linha tracejada representa a concentração do tampão de eluição. **B:** Perfil cromatográfico em coluna de Gel Filtração (HiLoad 16/600 Superdex 75pg GE Helathcare), da fração 1 oriunda de cromatografia de afinidade em coluna HisTrap HP Ni²⁺.

As frações obtidas referentes ao pico foram submetidas a cromatografia de gel filtração (HiLoad 16/600 Superdex 75pg) para troca de tampão (**Figura 19 B**) no qual foram obtidos dois picos de absorção no 280nm. Segundo o manual do fabricante da coluna utilizada para a gel filtração, o volume no qual a proteína foi eluída está um pouco abaixo do padrão de 44kDa utilizado no manual, indicando que possivelmente é a proteína no tamanho esperado de 33kDa.⁶⁰ Como a purificação da rLID1 já está padronizada e não houve nada diferente do esperado, as frações obtidas não foram analisadas através da

técnica de eletroforese. A expressão e purificação apresentou o rendimento de 7.2 mg/L de expressão.

4.5. Purificação da proteína recombinante rLID1_D

Para a purificação da proteína recombinante rLID1_D foi utilizado como base o protocolo de purificação da rLID1, porém, com algumas modificações. A fração solúvel do meio de expressão lisado contendo rLID1_D referente a 1 litro de expressão foi submetida a cromatografia de afinidade em coluna HisTrap HP Ni²⁺ em um fluxo reduzido de 1mL/min no qual o *flowthrough* foi coletado para posterior análise utilizando eletroforese. A proteína foi eluída da coluna utilizando tampão de eluição contendo 500mM de imidazol com um gradiente de 0 a 100% no qual foram observados três picos de absorbância no 280nm (**Figura 20 A**), diferente do observado anteriormente no resultado da rLID1 (**Figura 19 A**). Normalmente, através da experiência do grupo, é possível observar essa separação em três picos para rLID1 durante a cromatografia de afinidade quando as amostras são armazenadas inadequadamente e estão de alguma forma degradadas. Durante o experimento, todas as alíquotas de expressão foram armazenadas no ultrafreezer -80°C, portanto, apesar de ser uma característica apresentada quando há degradação, parece ser pouco provável.

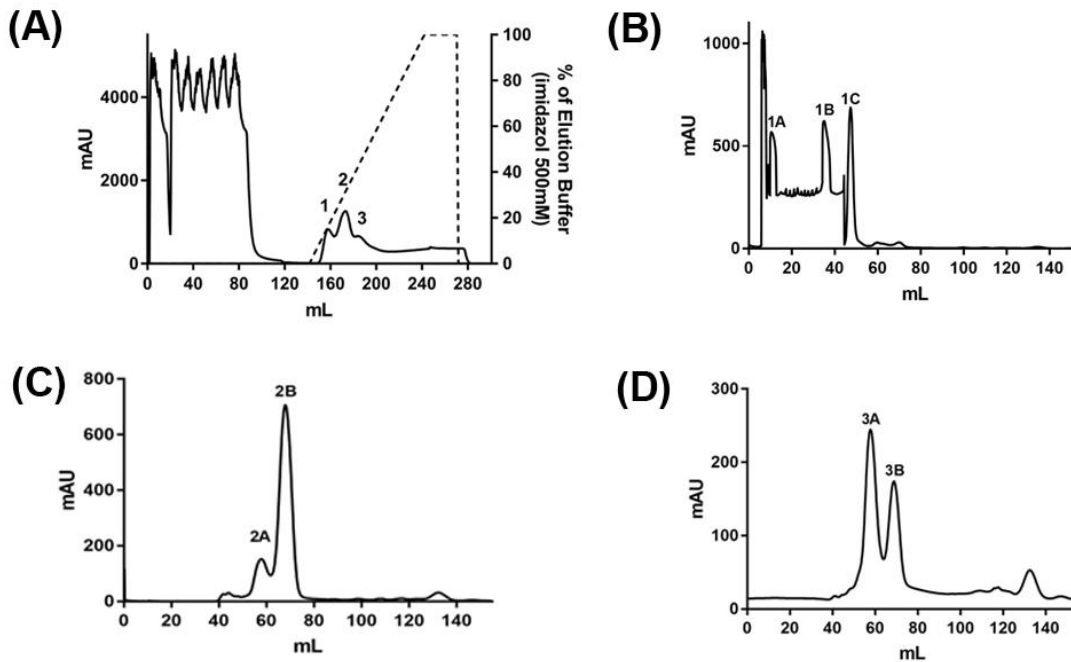


Figura 20. Purificação da proteína recombinante rLID1_D. **A:** Perfil cromatográfico da purificação da proteína rLID1_D em coluna de afinidade (HisTrap HP Ni²⁺). Linha cheia representa a absorbância a 280nm; Linha tracejada representa a concentração do tampão de eluição. **B, C e D:** Perfil cromatográfico em coluna de Gel Filtração (HiLoad 16/600 Superdex 75pg GE Helathcare), das frações 1,2 e 3 (respectivamente) oriunda de cromatografia de afinidade em coluna de afinidade.

As frações referentes aos três picos obtidos durante a cromatografia de afinidade foram submetidas separadamente a cromatografia de gel filtração (HiLoad 16/600 Superdex 75pg) para troca de tampão no período máximo de 12 horas (**Figura 20 B, C e D**).

Foi escolhido para a primeira troca de tampão as frações oriundas do pico 2 da cromatografia de afinidade por se tratar do pico de maior absorbância a 280nm (**Figura 20 A**). Além disso, mesmo quando há degradação do *pellet* de expressão e observamos três picos durante a fase de cromatografia de afinidade, é possível purificar a rLID1 escolhendo as frações do pico 2. As frações foram homogeneizadas e concentradas utilizando vivaspin para realização da cromatografia de gel filtração que suporta somente 5 mL de amostra segundo o manual⁶⁰. Foram obtidos dois picos de absorção a 280nm, porém, somente o pico 2B apresentou uma absorção satisfatória (**Figura 20 C**).

Apesar disso, as frações referentes aos dois picos foram coletadas para posterior análise através da técnica de eletroforese.

As frações oriundas do pico 1 (**Figura 20 A**) foram homogeneizadas e concentradas utilizando vivaspin. A cromatografia foi realizada *overnight* e ficou com características bem distintas dos outros cromatogramas (**Figura 20 B**). Esse comportamento pode ser explicado pela presença de bolhas e sujeira provenientes da corrida anterior na coluna. A corrida realizada para a purificação do pico 1 foi realizada logo após a corrida do pico 2 e mesmo efetuando a limpeza entre corridas pode ter ficado resquícios da corrida anterior na coluna. Segundo o manual da coluna⁶⁰, o volume vazio da coluna sai com 40mL de corrida, o que indica que os picos 1A e 1B são realmente sujeiras provenientes da corrida anterior. Apesar disso, esses picos possuem uma absorção alta, por este motivo, foi decidido coletar as frações referentes a esses picos para posterior análise.

Para realizar a terceira corrida de gel filtração, referente ao pico 3 da cromatografia de afinidade, foi realizada uma limpeza mais extensa da coluna. As frações oriundas do pico 3 (**Figura 20 A**) foram homogeneizadas e concentradas utilizando vivaspin. Durante a cromatografia de gel filtração foram obtidos dois picos de baixa absorbância a 280nm (**Figura 20 D**), que foram coletados para análise através de eletroforese.

Após a etapa de purificação e troca de tampão a fim de localizar a fração correspondente a proteína recombinante de rLID1_D e verificar sua pureza, foi realizado uma eletroforese em gel poliacrilamida SDS-PAGE 15% com o *flowthrough* proveniente da cromatografia de afinidade e as frações correspondentes aos picos de absorção a 280nm durante a fase de cromatografia de gel filtração (**Figura 21**).

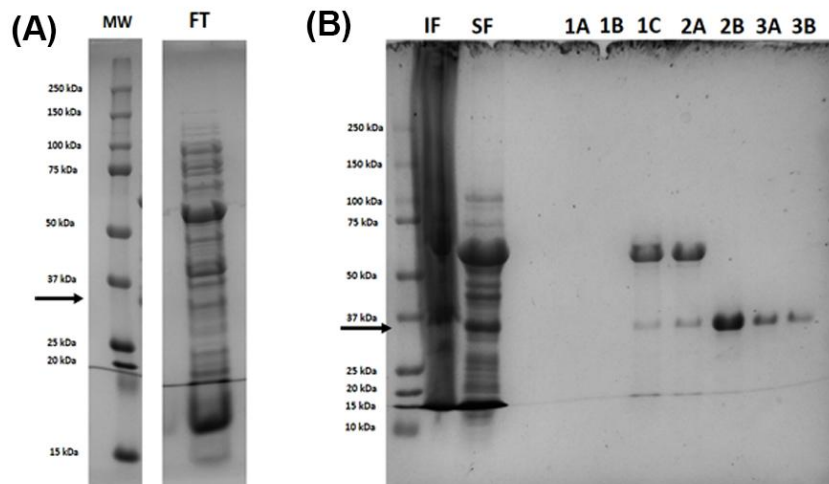


Figura 21. Análise da purificação da proteína recombinante rLID1_D. A: Gel de poliacrilamida SDS-PAGE 15%, correspondente a coleta do *Flowthrough* (FT) feita durante a cromatografia de afinidade. B: Gel de poliacrilamida SDS-PAGE 15%, correspondente as frações da purificação de rLID1_D (**Figura 20**) corado por *comassie blue*. IF: Fração solúvel. SF: Fração solúvel.

Durante a primeira eletroforese foi possível observar que o *flowthrough* da amostra aplicada durante a cromatografia de afinidade teve somente uma banda fraca correspondente a 33kDa, mostrando que provavelmente toda a proteína recombinante se ligou a coluna de afinidade (**Figura 21 A**).

Durante a segunda eletroforese, a fim de analisar as frações referentes aos picos de purificação e troca de tampão, podemos observar a presença de uma banda de 33kDa nas frações 1C, 2A, 2B, 3A e 3B. Este fato provavelmente se deve a intercessão entre os três picos durante a cromatografia de afinidade, no qual não houve separação completa dos picos e ao coletar os picos acaba-se tendo resquícios dos outros picos. Como durante a eletroforese foi aplicada a mesma quantidade de amostra em todas as canaletas, podemos concluir que a banda 2B é aonde há mais da proteína recombinante purificada. Esse pico é também o pico em que se esperava que a proteína purificada iria sair.

Além da banda em 33kDa, podemos notar que houve uma banda forte por volta de 60kDa nas amostras 1C e 2A. É possível levantar duas hipóteses para a presença desta banda: a primeira hipótese que seria uma banda causada

pela formação de dímeros da proteína recombinante rLID1_D; a segunda hipótese seria a presença de contaminante com a chaperona Cpn60 (57kDa) presente na cepa BL21(DE3) Arctic Express utilizada durante a fase de expressão e que ajuda no dobramento da proteína de interesse.

A técnica de eletroforese SDS-PAGE se trata de uma técnica desnaturante e embora existam relatos na literatura de proteínas oligoméricas que são resistentes a desnaturação realizada durante o SDS-PAGE⁶¹, é pouco provável que seja o caso desta proteína. Além disso, durante a cristalização da SMaseD de *L. laeta*, enzima com alta identidade com a SMaseD de *L. intermedia*, foi relatado a formação de dímeros, porém, devido ao experimento de DLS realizado pelo grupo em que se constatou que em solução há somente monômeros, esses dímeros observados foram considerados apenas um artefato da cristalização⁴¹. Ainda, há trabalhos na literatura que relatam que a proteína Cpn60 foi purificada em coluna de afinidade de níquel junto de algumas proteínas de interesse^{62; 63}. Portanto, embora só se possa confirmar através da técnica de western blotting, podemos concluir que esta banda provavelmente se trata da proteína Cpn60 que foi co-purificada junto da proteína rLID1_D. A expressão e purificação apresentou o rendimento de 1,3 mg/L de expressão.

4.6. Purificação da proteína recombinante rLID1_W

Para a purificação da proteína recombinante rLID1_W foi utilizado como base o protocolo modificado de purificação da rLID1_D. Primeiramente a fração solúvel do meio de expressão lisado contendo rLID1_W referente a 1 litro de expressão foi submetida a cromatografia de afinidade em coluna HisTrap HP Ni²⁺ em um fluxo de 1mL/min no qual o flowthrough foi coletado para posterior análise utilizando eletroforese. A proteína foi eluída da coluna utilizando tampão de eluição contendo 500mM de imidazol com um gradiente de 0 a 100% no qual foram observados três picos de absorbância no 280nm (**Figura 22 A**) como durante a cromatografia de afinidade da rLID1_D (**Figura 20 A**). Embora tenha sido observado três picos sobrepostos, a sobreposição dos

picos estão mais próximas entre si, o que lembra muito a cromatografia de afinidade da rLID1 que apresentou somente um pico (**Figura 19 A**).

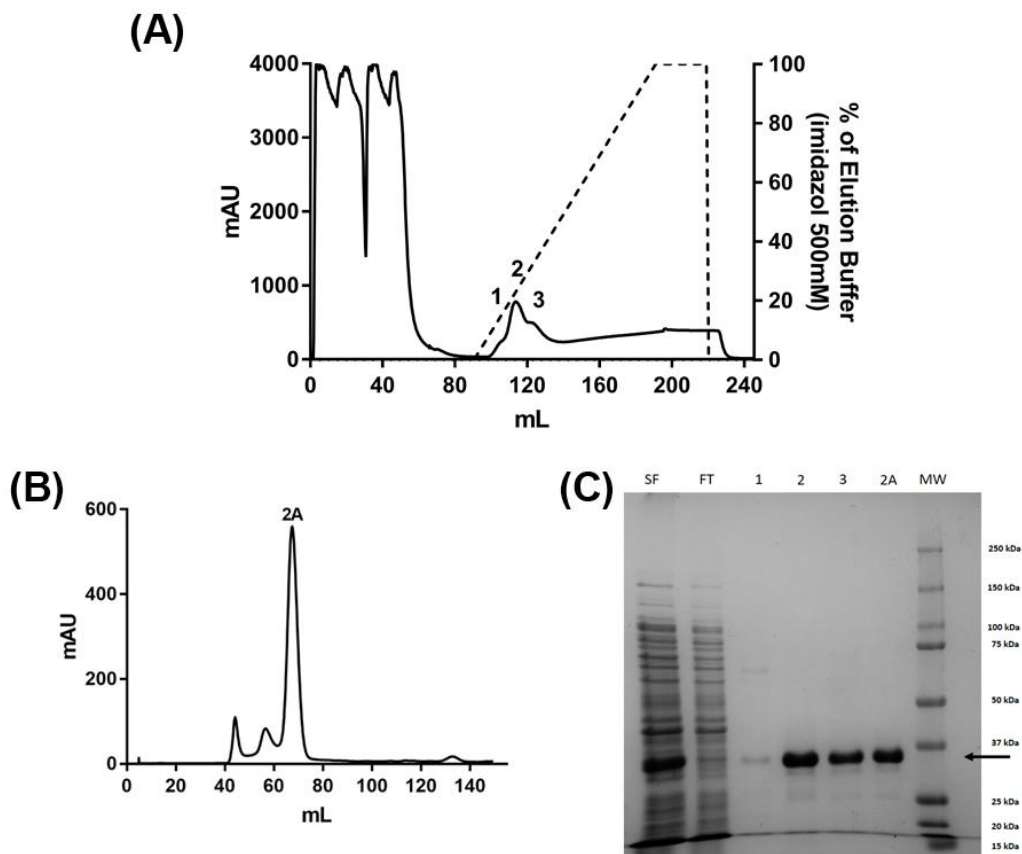


Figura 22. Purificação da proteína recombinante rLID1_W. **A:** Perfil cromatográfico da purificação da proteína rLID1_W em coluna de afinidade (HisTrap HP Ni²⁺). Linha cheia representa a absorvância a 280nm; Linha tracejada representa a concentração do tampão de eluição. **B:** Perfil cromatográfico de exclusão molecular em coluna de Gel Filtração (HiLoad 16/600 Superdex 75pg GE Helathcare), da fração 2 oriunda de cromatografia de afinidade em coluna de afinidade. **C:** Gel de poliacrilamida SDS-PAGE 15%, correspondente as frações da purificação de rLID1_W corado por *comassie blue*. SF: Fração solúvel. FT: *Flowthrough*.

Com a experiência da purificação da rLID1 e a experiência adquirida durante a purificação da rLID1_D foi coletado amostra dos três picos da cromatografia de afinidade, porém, somente o pico 2 foi submetido a troca de tampão utilizando cromatografia de gel filtração (HiLoad 16/600 Superdex 75pg). As frações referente ao pico 2 oriundas da cromatografia de afinidade foram homogeneizadas e concentradas utilizando vivaspin, para realização da cromatografia de gel filtração que suporta somente 5 mL de amostra, segundo

o manual⁶⁰. Foram observados três picos de absorção no 280nm, porém, somente um pico possui absorção satisfatória (**Figura 22 B**).

Após a etapa de purificação e troca de tampão foi realizado uma eletroforese em gel poliacrilamida SDS-PAGE 15% com a fração solúvel do meio de expressão (SF), o *flowthrough* proveniente da cromatografia de afinidade (FT), amostras dos três picos obtidos durante esta etapa e amostra proveniente do pico 2A obtido durante a troca de tampão do pico 2 da cromatografia de afinidade (**Figura 22 C**). Ao observamos o gel, percebemos que o *flowthrough* (FT) possui somente uma banda fraca correspondente a 33kDa, mostrando que provavelmente toda a proteína recombinante se ligou a coluna de afinidade. Como não houve separação completa dos picos de absorção podemos observar a presença de uma banda de 33kDa nas amostras referentes aos picos 1,2 e 3 da cromatografia de afinidade. Porém, esta banda está mais forte no pico 2, o que sugere que a proteína seja proveniente deste pico e tenha contaminado os outros dois picos. Além disso, podemos observar que apesar de haver algumas bandas contaminantes no pico 2A, a proteína recombinante rLID1_W está em maior quantidade e relativamente pura. A expressão e purificação apresentou o rendimento de 1,3 mg/L de expressão.

4.7. Atividade esfingomielinásica *in vitro*

Após a purificação e troca de tampão, as frações puras foram homogeneizadas e as suas concentrações estimadas, utilizando o método de Bradford⁵⁶, no qual constatou-se a concentração de 0,36 µg/µl para rLID1 e 0,48 µg/µl para rLID1_D e rLID1_W.

Com o objetivo de avaliar a funcionalidade das enzimas mutantes rLID1_D e rLID1_W foram realizados testes de atividade enzimática utilizando o Amplex® Red sphingomyelinase assay kit, de acordo com as recomendações do fabricante⁵⁷. Apesar das SMases D apresentarem capacidade catalítica de diferentes substratos^{38; 40; 64}, o kit possui somente a esfingomielina como possível substrato. Como a atividade da enzima depende da quantidade de enzima adicionada a reação do kit, para saber qual a melhor quantidade de

trabalho foi realizado um teste preliminar (**Figura 23**) com diferentes concentrações da enzima rLID1 (0,5µg; 1µg; 1,5µg; 2,5µg; 5µg; 7,5µg). Foi escolhida esta SMase D em detrimento das enzimas mutantes para a realização do teste preliminar porque este teste de atividade está bem padronizado na literatura^{45; 46; 53}. Para controle positivo da reação, o kit utiliza a esfingomielinase (PLD) de *Bacillus cereus* e H₂O₂ por ser substrato da peroxidase de raiz-forte (*Azorella robusta*), última reação do kit e a reação que irá produzir fluorescência.

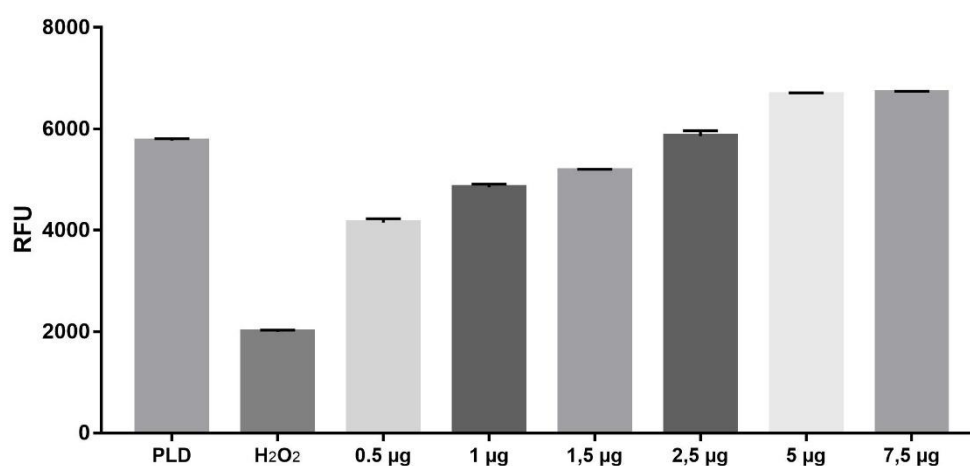


Figura 23. Avaliação da atividade esfingomielinásica de rLID1 quantidade dependente. Atividade esfingomielinásica da rLID1 utilizando diferentes quantidades (0,5µg; 1µg; 1,5µg; 2,5µg; 5µg; 7,5µg), usando o Amplex Red Sphingomyelinase Assay kit (Invitrogen)⁵⁷. Controles positivos, esfingomielinase (PLD) de *Bacillus cereus* e H₂O₂.

Podemos observar pelos resultados que a proteína rLID1 possui alta capacidade esfingomielinásica e que mesmo em baixas quantidades (0,5µg) é capaz apresentar altos índices de unidade relativa de fluorescência (RFU). Além disso, foi possível observar que a partir de 5µg de proteína (para o tempo medido), é atingido um platô na reação, no qual apesar do aumento da quantidade de enzima, não há aumento de atividade da proteína. Isto provavelmente acontece devido à alta capacidade esfingomielinásica em que nesta concentração e tempo de reação a enzima é capaz de esgotar a reação.

Ao avaliar a funcionalidade das enzimas mutantes é necessário que a concentração trabalhada esteja dentro do limite de linearidade e que seja capaz de apresentar alta atividade esfingomielinásica. Portanto, foi escolhido para trabalhar 0,5 µg de enzima.

Após avaliar a melhor quantidade de enzima foi possível realizar o teste de atividade enzimática comparando a proteína *wildtype* rLID1 com as proteínas mutantes rLID1_D e rLID1_W (**Figura 24**).

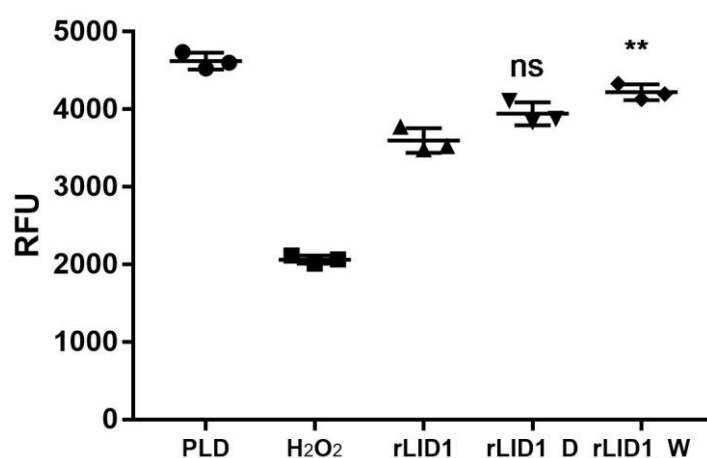


Figura 24. Avaliação da atividade esfingomielinásica das enzimas rLID1_D e rLID1_W em relação a proteína *wildtype* rLID1. Teste de atividade esfingomielinásica utilizando 0,5 µg de enzima, 30 minutos de reação e o Amplex Red Sphingomyelinase Assay kit (Invitrogen)⁵⁷. Controles positivos, esfingomielinase (PLD) de *Bacillus cereus* e H₂O₂. ns: não significativo. **: (p ≤ 0.01)

O teste foi realizado de acordo com as recomendações do manual⁵⁷, no qual é utilizado como controle positivo a esfingomielinase (PLD) de *Bacillus cereus* e a H₂O₂. Todas as medidas de RFU referentes as cinco amostras foram realizadas em triplicata e o resultado foi analisado através do GraphPrism 7, no qual foi realizado o teste estatístico *one-way* ANOVA e o pós teste de comparação múltipla, Bonferroni. Além disso, as medições foram analisadas utilizando o site GraphPrism Outlier que utiliza o teste de Grubbs para garantir que nenhuma amostra fosse um *outlier*⁶⁵.

Analisando o resultado (**Figura 24**) observamos que a proteína *wildtype* rLID1 e a proteína rLID1_D não obtiveram diferença significativa em seus

resultados de atividade. Enquanto, a proteína *wildtype* rLID1 e a proteína rLID1_W obtiveram diferença significativa ($p \leq 0.01$).

Esta diferença significativa pode ser explicada pelos resultados obtidos anteriormente na dinâmica molecular no qual foram discutidas as alterações na flexibilidade estrutural. Na alça catalítica da enzima está inserido um dos resíduos responsáveis pela catalise da enzima (H47) e junto da alça flexível protegem o sítio catalítico da enzima. Como substrato das SMases D temos diversos lipídeos, geralmente grandes. Um aumento de flexibilidade, apesar de provavelmente atrapalhar o encontro do resíduo da histidina 47 (H47) com o substrato, pode facilitar a entrada do substrato no sítio catalítico, aumentando assim a eficiência catalítica da enzima.

4.8. Atividade dermonecrótica, hemorrágica e edematogênica *in vivo*

Após a observação da atividade enzimática das proteínas mutantes *in vitro*, foi realizado o teste de atividade *in vivo*. Para a realização do teste, foi escolhido a DMN da proteína *wildtype* rLID1, nosso controle positivo, previamente padronizada por Oliveira *et al*⁵³. As amostras contendo 2,5 µg de proteína foram injetadas intradermicamente em dois coelhos fêmeas (n=2) e a ferida avaliada por 72 h, no qual foram medidas a área de necrose, a área de hemólise da ferida e o comprimento do edema, utilizando um paquímetro.

Durante o experimento foi observado que as duas enzimas mutantes são capazes de causar a necrose, porém, a enzima mutante rLID1_W (W280A) teve uma capacidade dermonecrótica muito inferior a rLID1 e rLID1_D na concentração testada (**Figura 25**). Durante a etapa de atividade *in vitro*, a rLID1_W foi capaz de clivar a esfingomielina, principal constituinte da membrana celular de células de eucariotos, com maior eficiência que a proteína rLID1 e rLID1_D, por este motivo, era esperado que esta proteína fosse capaz de causar necrose igual ou maior que a proteína *wildtype*. Foi levantada duas hipóteses para explicar esse comportamento, na primeira hipótese, embora a clivagem da esfingomielina contribua para causar a necrose pode ser que na verdade a clivagem de outro substrato, como o LPC,

seja o principal causador da dermonecrose e a mutação no triptofano 280 da proteína fez com que houvesse alteração na preferência de substrato da proteína. Na segunda hipótese, a região C-Terminal estaria envolvida com a atividade biológica da proteína, facilitando o acesso ao substrato esfingomielinina, constituinte das membranas celulares. Para melhor avaliar estas hipóteses, é necessário a realização de mais experimentos. Um possível experimento seria a realização de um ensaio de sobreposição proteína-lipídeo (FatBlot), no qual é possível avaliar a preferência da enzima por diferentes substratos.

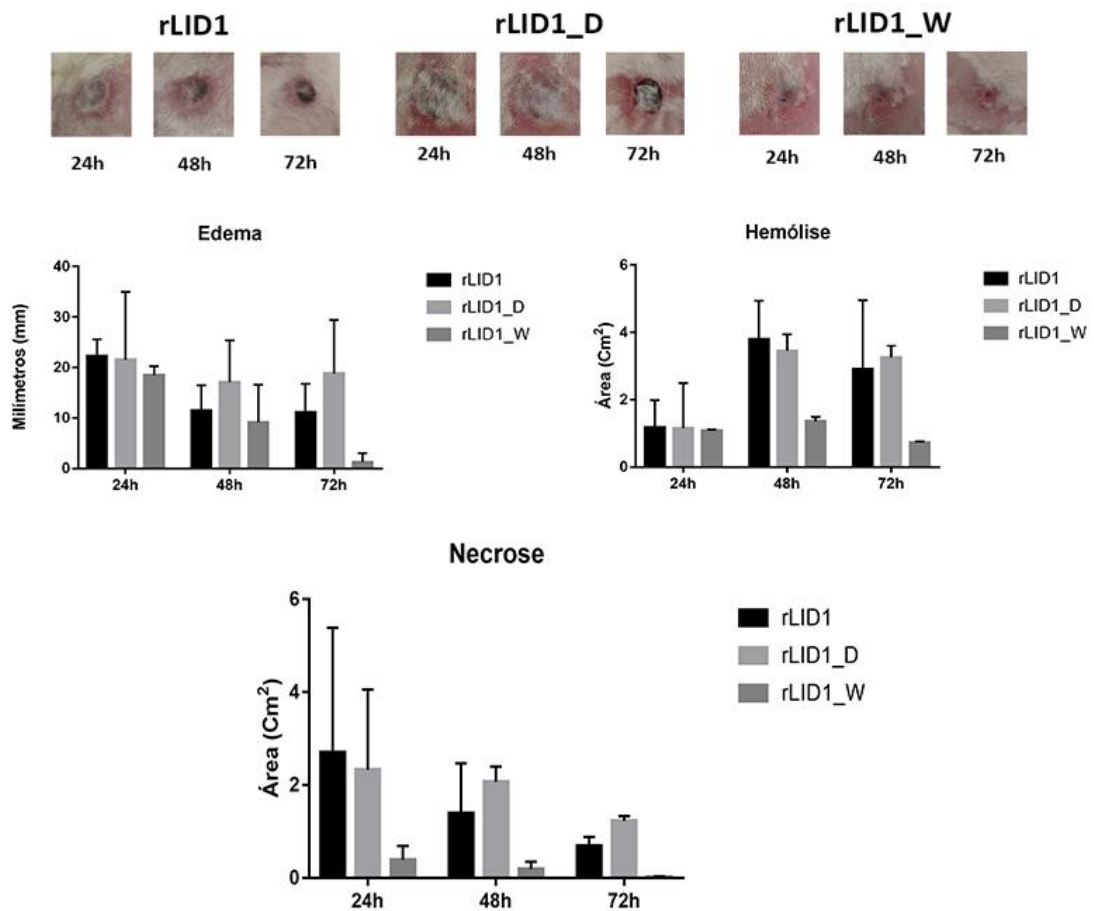


Figura 25. Avaliação da atividade biológica das enzimas rLID1_D e rLID1_W em relação a proteína wildtype rLID1. Teste de atividade esfingomielinásica utilizando 2,5 µg de enzima em um intervalo de 72h. Foram avaliados Hemólise, Necrose e Edema causados pelas proteínas mutantes.

Nos animais e na concentração testada, a proteína rLID1_D, após 72h, causou uma lesão necrótica superior ao controle positivo rLID1. Porém, devido ao desvio padrão alto entre os animais testados, principalmente antes de 72h, é necessário realizar mais experimentos para que se possa aumentar o N do experimento e assim confirmar o aumento.

5. CONCLUSÕES

- Foi possível confirmar *in silico* as interações propostas por Dias-Lopes *et al* 2016⁴⁵, e avaliar a interação da região C-Terminal com as outras regiões da proteína.
- As análises *in silico* foram capazes de mostrar que as mutações alteram a flexibilidade da alça catalítica, embora não tenha sido possível concluir porque desta alteração de flexibilidade.
- As proteínas mutantes foram incapazes de serem expressas em sua forma solúvel utilizando o chassi de expressão BL21 (DE3).
- Foi possível produzir as proteínas mutantes rLID1_W (W280A) e rLID1_D (D277A) em sua forma solúvel utilizando vetor de expressão e chassi bacteriano. Essas enzimas foram expressas e purificadas com sucesso utilizando o mesmo protocolo de expressão da proteína wildtype rLID1.
- A proteína duplamente mutante rLID1_DW permaneceu insolúvel ao utilizar o vetor de expressão e os dois chassis bacterianos testados.
- As duas proteínas mutantes, rLID1_W (W280A) e rLID1_D (D277A), apresentam atividade enzimática esfingomielinásica similar a proteína wildtype. Porém, a proteína rLID1_W (W280A) possui atividade esfingomielinásica maior que a proteína wildtype rLID1. Esse aumento provavelmente ocorre pela maior flexibilidade da alça catalítica nas proteínas mutadas, gerando assim, uma maior facilidade para a entrada do substrato no sitio catalítico.
- As proteínas mutantes rLID1_W (W280A) e rLID1_D (D277A) foram capazes de causar necrose nos testes *in vivo*. Porém, a proteína rLID1_W causou uma necrose muito inferior a proteína *wildtype* e a proteína rLID1_D.
- No teste *in vivo* a proteína rLID1_D (D277A) foi capaz de causar uma lesão maior que a proteína wildtype rLID1, após 72 h de observação. Porém, é necessário aumentar o número de animais utilizados para confirmar este dado.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 SAÚDE, M. D. Portal da Saúde - Acidentes por animais peçonhentos. <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/svs/acidentes-por-animais-peconhentos>, 2017. Acesso em: 10/01/2017.
- 2 KASTURIRATNE, A. et al. The Global Burden of Snakebite: A Literature Analysis and Modelling Based on Regional Estimates of Envenoming and Deaths. **PLOS Medicine**, v. 5, n. 11, p. e218, 2008. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1371%2Fjournal.pmed.0050218> >.
- 3 WHO. World Health Organization. 2017. Disponível em: < <http://www.who.int/> >.
- 4 SAÚDE, M. D., 2016. Disponível em: < <http://portalsinan.saude.gov.br/acidente-por-animais-peconhentos> >. Acesso em: 05/05/2017.
- 5 NET, M. D. S. S.-S. D. I. D. A. D. N.-S. DATASUS - Tecnologia da Informação a Serviço do SUS. Disponível em: < <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinannet/cnv/animaisbr.def> >. Acesso em: 10-01-2017.
- 6 CÉSAR, M. SES-MG Alerta sobre cuidados com animais peçonhentos. <http://www.saude.mg.gov.br/>, 2016. Disponível em: < <http://www.saude.mg.gov.br/dengue/story/8847-ses-mg-alerta-sobre-cuidados-com-animais-peconhentos> >. Acesso em: 10/01/2017.
- 7 STARRETT, J. et al. High phylogenetic utility of an ultraconserved element probe set designed for Arachnida. Oct 21 2016. ISSN 1755-098x.
- 8 RUPPERT, E. E.; FOX, R. S.; BARNES, R. D. **Zoologia dos invertebrados: uma abordagem funcional-evolutiva**. Roca, 2005. ISBN 9788572415712. Disponível em: < <https://books.google.com.br/books?id=nR69XDvhISAC> >.
- 9 PECHENIK, J. A. **Biologia dos Invertebrados 7ed**. 2016. ISBN 9788580555813. Disponível em: < <https://books.google.com.br/books?id=QzeeDAAAQBAJ> >.

¹⁰ HOGAN, C. J.; BARBARO, K. C.; WINKEL, K. Loxoscelism: old obstacles, new directions. **Ann Emerg Med**, v. 44, n. 6, p. 608-24, Dec 2004. ISSN 0196-0644.

¹¹ FUTRELL, J. M. Loxoscelism. **Am J Med Sci**, v. 304, n. 4, p. 261-7, Oct 1992. ISSN 0002-9629 (Print)

0002-9629.

¹² GERTSCH, W. J., -. **The spider genus Loxosceles in South America (Araneae, Scytodidae). Bulletin of the AMNH ; v. 136, article 3.** New York : [American Museum of Natural History], 1967. Disponível em: < <http://www.biodiversitylibrary.org/item/167677> >.

¹³ 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, Dec 15 2010. ISSN 0041-0101.

¹⁴ MARTINS, R.; KNYSAK, I.; BERTANI, R. A new species of Loxosceles of the laeta group from Brazil (Araneae: Sicariidae). **Zootaxa**, v. 94, n. 1, p. 1-6, 2002. ISSN 1175-5334.

¹⁵ SILVESTRE, F. G. et al. Characterization of the venom from the Brazilian Brown Spider Loxosceles similis Moenkhaus, 1898 (Araneae, Sicariidae). **Toxicon**, v. 46, n. 8, p. 927-36, Dec 15 2005. ISSN 0041-0101 (Print)

0041-0101.

¹⁶ DANTAS, A. E. et al. Description of Loxtox protein family and identification of a new group of Phospholipases D from Loxosceles similis venom gland. **Toxicon**, v. 120, p. 97-106, Sep 15 2016. ISSN 0041-0101.

¹⁷ SWANSON, D. L.; VETTER, R. S. Bites of brown recluse spiders and suspected necrotic arachnidism. **N Engl J Med**, v. 352, n. 7, p. 700-7, Feb 17 2005. ISSN 0028-4793.

¹⁸ DA SILVA, P. H. et al. Brown spiders and loxoscelism. **Toxicon**, v. 44, n. 7, p. 693-709, Dec 01 2004. ISSN 0041-0101 (Print)

0041-0101.

- ¹⁹ GONÇALVES DE ANDRADE, R. M.; LOURENÇO, W. R.; TAMBOURGI, D. V. Comparison of the fertility between *Loxosceles intermedia* and *Loxosceles laeta* spiders. **Journal of Arachnology**, v. 28, n. 2, p. 245-247, 2000/09/01 2000. ISSN 0161-8202. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1636/0161-8202\(2000\)028\[0245:COTFBL\]2.0.CO;2](http://dx.doi.org/10.1636/0161-8202(2000)028[0245:COTFBL]2.0.CO;2) >.
- ²⁰ SWANSON, D. L.; VETTER, R. S. Loxoscelism. **Clin Dermatol**, v. 24, n. 3, p. 213-21, May-Jun 2006. ISSN 0738-081X (Print)
0738-081x.
- ²¹ VETTER, R. S. Scavenging by spiders (Araneae) and its relationship to pest management of the brown recluse spider. **J Econ Entomol**, v. 104, n. 3, p. 986-9, Jun 2011. ISSN 0022-0493 (Print)
0022-0493.
- ²² SANDIDGE, J. S. Arachnology: scavenging by brown recluse spiders. **Nature**, v. 426, n. 6962, p. 30, Nov 06 2003. ISSN 0028-0836.
- ²³ CRAMER, K. L. Are brown recluse spiders, *Loxosceles reclusa* (Araneae, Sicariidae) scavengers? The influence of predator satiation, prey size, and prey quality. **The Journal of Arachnology**, v. 36, n. 1, p. 140-144, 2008.
- ²⁴ NAVARRO-SILVA, M. A. et al. Chemical control of *Loxosceles intermedia* (Araneae: Sicariidae) with pyrethroids: field and laboratory evaluation. **J Econ Entomol**, v. 103, n. 1, p. 166-71, Feb 2010. ISSN 0022-0493 (Print)
0022-0493.
- ²⁵ MALAQUE, C. M. et al. Clinical and epidemiological features of definitive and presumed loxoscelism in Sao Paulo, Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 44, n. 3, p. 139-43, May-Jun 2002. ISSN 0036-4665 (Print)
0036-4665.
- ²⁶ SEZERINO, U. M. et al. 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, Sep-Oct 1998. ISSN 0035-9203 (Print)
0035-9203.

²⁷ SCHENONE, H. et al. [Loxoscelism in Chile. Epidemiologic, clinical and experimental studies]. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 31, n. 6, p. 403-15, Nov-Dec 1989. ISSN 0036-4665 (Print)

0036-4665.

²⁸ DE OLIVEIRA, K. C. et al. Variations in Loxosceles spider venom composition and toxicity contribute to the severity of envenomation. **Toxicon**, v. 45, n. 4, p. 421-9, Mar 15 2005. ISSN 0041-0101 (Print)

0041-0101.

²⁹ SAMS, H. H. et al. Necrotic arachnidism. **J Am Acad Dermatol**, v. 44, n. 4, p. 561-73; quiz 573-6, Apr 2001. ISSN 0190-9622 (Print)

0190-9622.

³⁰ RIBEIRO, L. A. et al. Epidemiologia do acidente por aranhas do gênero Loxosceles Heinecken & Lowe no Estado do Paraná (Brasil). **Mem Inst Butantan**, p. 19-26, 1993.

³¹ RASH, L. D.; HODGSON, W. C. Pharmacology and biochemistry of spider venoms. **Toxicon**, v. 40, n. 3, p. 225-54, Mar 2002. ISSN 0041-0101 (Print)

0041-0101.

³² JACKSON, H.; PARKS, T. N. Spider toxins: recent applications in neurobiology. **Annu Rev Neurosci**, v. 12, p. 405-14, 1989. ISSN 0147-006X (Print)

0147-006x.

³³ KALAPOTHAKIS, E. et al. 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, Dec 2002. ISSN 0041-0101 (Print)

0041-0101.

³⁴ VEIGA, S. S. et al. Identification of high molecular weight serine-proteases in Loxosceles intermedia (brown spider) venom. **Toxicon**, v. 38, n. 6, p. 825-39, Jun 2000. ISSN 0041-0101 (Print)

0041-0101.

- 35 GREMSKI, L. H. et al. A novel expression profile of the *Loxosceles intermedia* spider venomous gland revealed by transcriptome analysis. **Mol Biosyst**, v. 6, n. 12, p. 2403-16, Dec 2010. ISSN 1742-2051.
- 36 BARBARO, K. C. et al. 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, May 1996. ISSN 0277-8033 (Print)
0277-8033.
- 37 FEITOSA, L. et al. Detection and characterization of metalloproteinases with gelatinolytic, fibronectinolytic and fibrinogenolytic activities in brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. **Toxicon**, v. 36, n. 7, p. 1039-51, Jul 1998. ISSN 0041-0101 (Print)
0041-0101.
- 38 VAN MEETEREN, L. A. et al. Spider and bacterial sphingomyelinases D target cellular lysophosphatidic acid receptors by hydrolyzing lysophosphatidylcholine. **J Biol Chem**, v. 279, n. 12, p. 10833-6, Mar 19 2004. ISSN 0021-9258 (Print)
0021-9258.
- 39 MOOLENAAR, W. H.; VAN MEETEREN, L. A.; GIEPMANS, B. N. The ins and outs of lysophosphatidic acid signaling. **Bioessays**, v. 26, n. 8, p. 870-81, Aug 2004. ISSN 0265-9247 (Print)
0265-9247.
- 40 LEE, S.; LYNCH, K. R. Brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*) venom phospholipase D (PLD) generates lysophosphatidic acid (LPA). **Biochem J**, v. 391, n. Pt 2, p. 317-23, Oct 15 2005. ISSN 0264-6021.
- 41 MURAKAMI, M. T. et al. Structural basis for metal ion coordination and the catalytic mechanism of sphingomyelinases D. **J Biol Chem**, v. 280, n. 14, p. 13658-64, Apr 08 2005. ISSN 0021-9258 (Print)
0021-9258.
- 42 MURAKAMI, M. T. et al. 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, Mar 31 2006. ISSN 0006-291X (Print)
0006-291x.

- 43 DE GIUSEPPE, P. O. et al. 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, Jun 17 2011. ISSN 0006-291x.
- 44 CORDES, M. H. J.; BINFORD, G. J. Lateral gene transfer of a dermonecrotic toxin between spiders and bacteria. **Bioinformatics**, v. 22, n. 3, p. 264-268, 2006. ISSN 1367-4803. Disponível em: <
<http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/bti811> >.
- 45 DIAS-LOPES, C. et al. Identification of new sphingomyelinases D in pathogenic fungi and other pathogenic organisms. **PLoS One**, v. 8, n. 11, p. e79240, 2013. ISSN 1932-6203.
- 46 VUITIKA, L. et al. Active site mapping of *Loxosceles* phospholipases D: Biochemical and biological features. **Biochim Biophys Acta**, v. 1861, n. 9 Pt A, p. 970-9, Sep 2016. ISSN 0006-3002 (Print)
0006-3002.
- 47 **BL21(DE3) Competent Cells, BL21(DE3)pLysS Competent Cells, and BL21 Competent Cells Instruction Manual.** St. Claire, California, USA: Agilent Technologies, Inc., 2010.
- 48 **ArcticExpress Competent Cells and ArcticExpress (DE3) Competent Cells Instruction Manual.** St. Claire, California, USA: Agilent Technologies, Inc., 2015.
- 49 CARNEIRO, F. R. et al. Spectroscopic characterization of the tumor antigen NY-REN-21 and identification of heterodimer formation with SCAND1. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 343, n. 1, p. 260-8, Apr 28 2006. ISSN 0006-291X (Print)
0006-291x.
- 50 SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual.** Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. ISBN 9780879695774. Disponível em: <
<https://books.google.it/books?id=Bosc5JVxNpkC> >.
- 51 BERTANI, G. Lysogeny at Mid-Twentieth Century: P1, P2, and Other Experimental Systems. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 3, p. 595-600, 2004. ISSN 0021-9193

1098-5530. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC321500/> <

52 HANAHAN, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **J Mol Biol**, v. 166, n. 4, p. 557-80, Jun 05 1983. ISSN 0022-2836 (Print)

0022-2836.

53 OLIVEIRA, C. F. et al. Protective antibodies against a sphingomyelinase D from *Loxosceles intermedia* spider venom elicited in mice with different genetic background. **Vaccine**, v. 34, n. 33, p. 3828-34, Jul 19 2016. ISSN 0264-410x.

54 NELSON, D. L.; COX, M. M.; LEHNINGER, A. L. **Lehninger principles of biochemistry**. New York: W.H. Freeman, 2013. ISBN 9781464109621 1464109621 9781429234146 1429234148.

55 WEBER, K.; OSBORN, M. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. **J Biol Chem**, v. 244, n. 16, p. 4406-12, Aug 25 1969. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258.

56 BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-54, May 07 1976. ISSN 0003-2697 (Print)

0003-2697.

57 **Amplex® Red Sphingomyelinase Assay Kit Manual**. Carlsbad, California, USA: Invitrogen, 2006.

58 FURLANETO, R. S. R., R. R. Efeito neutralizante do soro anti-loxoscélico administrado em tempos variáveis após a inoculação do veneno. **Ciência e Cultura**, v. 14, n. 4, 1962.

59 PARTHASARATHY, S.; MURTHY, M. R. Analysis of temperature factor distribution in high-resolution protein structures. **Protein Sci**, v. 6, n. 12, p. 2561-7, Dec 1997. ISSN 0961-8368 (Print)

0961-8368.

- 60 SCIENCES, G. H. L. **Superdex™ prep grade and prepacked HiLoad™ columns**. Buckinghamshire, HP7 9NA, UK: GE Healthcare UK Limited, 2013. Disponível em: <
https://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/1314823637792/litdoc18110052_20161012163821.pdf>.
Acesso em: 05/04/2017.
- 61 WEISZ, O. A.; SWIFT, A. M.; MACHAMER, C. E. Oligomerization of a membrane protein correlates with its retention in the Golgi complex. **J Cell Biol**, v. 122, n. 6, p. 1185-96, Sep 1993. ISSN 0021-9525 (Print)
0021-9525.
- 62 JOSEPH, R. E.; ANDREOTTI, A. H. Bacterial expression and purification of Interleukin-2 Tyrosine kinase: Single step separation of the chaperonin impurity. **Protein expression and purification**, v. 60, n. 2, p. 194-197, 04/11 2008. ISSN 1046-5928
1096-0279. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2581883/>>.
- 63 BELVAL, L. et al. A fast and simple method to eliminate Cpn60 from functional recombinant proteins produced by E. coli Arctic Express. **Protein Expr Purif**, v. 109, p. 29-34, May 2015. ISSN 1046-5928.
- 64 CHAIM, O. M. et al. 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, Feb 2011. ISSN 0006-3002 (Print)
0006-3002.
- 65 GRAPHPAD SOFTWARE, I. Outlier Calculator. 2017. Disponível em: <
<https://graphpad.com/quickcalcs/Grubbs1.cfm>>. Acesso em:
11/03/2017.