

JULIANA FERREIRA DE MOURA

CARACTERIZAÇÃO IMUNOQUÍMICA E MOLECULAR DA
FRAÇÃO DERMONECRÓTICA DO VENENO DA ARANHA
MARROM *Loxosceles intermedia*

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor pelo Programa de Pós-graduação em Farmacologia Bioquímica e Molecular, Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Chávez Olórtgui

**Belo Horizonte
2005**

JULIANA FERREIRA DE MOURA

Mestre em Ciências Farmacêuticas e da Saúde
pela Universidade Federal do Paraná (2000-2001)

Farmacêutica-bioquímica graduada pela
Universidade Federal do Paraná (1995-1999)

Esta tese faz parte do projeto originado a partir do convênio internacional Brasil/França representado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e pelo *Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale* (Inserm)

O trabalho desenvolvido não teria sido possível sem o apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG)

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Carlos Chávez, pelo incentivo à pesquisa, pelo acolhimento e pela oportunidade;

Ao Dr. Claude Granier e a todo seu grupo pelo exemplo pessoal e profissional;

Ao Prof. Dr. Tomaz A. M. dos Santos pela eterna simpatia e pelo exemplo intelectual e moral;

Ao Prof. Dr. Evanguedes Kalapothakis pelo auxílio e pelas sugestões sempre pertinentes;

Aos professores, técnicos e alunos do Programa de Pós-graduação em Farmacologia Bioquímica e Molecular, e do departamento de Bioquímica-Imunologia pelo auxílio e agradável convívio, em especial ao Jamil;

Ao meu amigo Prof. Dr. Wanderson Rocha pela inestimável contribuição;

À amiga Fernanda Bastos pelo trabalho exemplar;

Às minhas lindas *Kaká*, Larissa e Simone, pela amizade incondicional;

À minha família mineira: Ana Lúcia, Áquila, *Cal*, Cécile *Serelepe*, Diogo, *Dri*, *Dudu*, Fabiano, *Fran*, Hugo, Joaquim, *Julinho*, Liza *Carolina*, *Lolô*, Karyne, Kênia, Mário, Michelle, *Mimi*, PC, Paulinha, Paula Henriques, Priscila(s), *Rafinha*, *Rick*, Rodrigo, *Titi* e Vinício pela amizade, alegria e carinho;

Aos queridos Carol(s), Cris, Bê, Helô, Nath pela amizade e bom humor;

Aos meus queridos Thais, Carol, Higgor, Ju, Cibele, Flávia(s) e Gabriel do Laboratório de Biotecnologia e Marcadores Moleculares pela amizade e companheirismo;

Ao Dr. Álvaro Romanha, à Dra. Héliida Andrade e à Juciane do Instituto de Pesquisa René Rachou pela confiança e, principalmente, pela amizade;

À Dra. Ida Gubert e ao Dr. Oldemir Mangili pelo apoio incessante;

A todos do CPPI e ao seu diretor Dr. Rubens Gusso pela gentileza em nos ceder os venenos e os antivenenos.

Ao biólogo César C. Carvalho Jr. pela manutenção das aranhas e extração dos venenos;

À Sônia Mara de Oliveira Costa, secretária do Programa de Pós-graduação, pela amizade, competência e profissionalismo;

Finalmente, agradeço carinhosamente a todos aqueles que, com um sorriso ou com uma palavra de estímulo, fizeram dos meus longos dias de trabalho um incentivo diário.

À minha família

Às minhas alegrias: Fló, Rafinha e Gugu

Ao Michel

*Ao meu pai Umberto,
longe dos olhos mas perto do coração,
dedico a realização do sonho de hoje.*

*“O resultado de qualquer pesquisa científica séria
só pode ser o surgimento de duas novas questões
onde antes, só havia uma.”*

Thorstein Veblen

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE QUADROS.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS	xii
RESUMO	xiv
ABSTRACT.....	xv
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 O ARACNÍDEO E SUA BIOLOGIA	3
1.2 EPIDEMIOLOGIA	5
1.3 QUADRO CLÍNICO	6
1.4 O VENENO.....	8
1.5 MECANISMO DE AÇÃO DO VENENO	11
1.6 PATOLOGIA	14
1.7 DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO	15
1.8 DA GENÔMICA À PROTEÔMICA – O IMPORTANTE PAPEL DA IMUNOLOGIA	16
2 OBJETIVOS	21
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
3 MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1 OBTENÇÃO DE VENENOS.....	24
3.2 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLI- E MONOCLONAIS.....	24
3.2.1 PRODUÇÃO DE SORO DE CAVALO ESPECÍFICO PARA O FATOR DERMONECRÓTICO DO VENENO DE <i>L. intermedia</i>	24
3.2.1.1 Imunização do cavalo com DNF.....	25
3.2.2 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS	25
3.2.2.1 Imunização de camundongos BALB/c.....	25
3.2.2.2 Obtenção dos hibridomas	26
3.2.2.3 Seleção e clonagem dos hibridomas	27
3.2.2.4 Produção de líquido ascítico	27
3.3 CARACTERIZAÇÃO DOS ANTICORPOS MONOCLONAIS	27
3.3.1 GEL EM SDS PAGE, ELETROTRANSFERÊNCIA E <i>IMMUNOBLOTTING</i>	27
3.4 PURIFICAÇÃO DO VENENO TOTAL DE <i>L. intermedia</i> POR COLUNA DE AFINIDADE.....	29
3.4.1 MONTAGEM DA COLUNA DE AFINIDADE	29
3.4.2 PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECONHECIDAS PELO LIMAB7.....	30
3.5 ELETROFORESE BIDIMENSIONAL	31
3.5.1 MIGRAÇÃO EM PRIMEIRA DIMENSÃO – ISOELETROFOCALIZAÇÃO (IEF).....	31
3.5.2 MIGRAÇÃO EM SEGUNDA DIMENSÃO - GEL SDS/PAGE	33
3.5.3 <i>WESTERN BLOTTING</i> DOS GÉIS BIDIMENSIONAIS	36
3.5.3.1 Eletrotransferência	36
3.5.3.2 <i>Immunoblotting</i>	36
3.6 INIBIÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA DE VENENO DE <i>L. intermedia</i> PELO LIMAB7	37
3.6.1 ENSAIO HEMOLÍTICO	37
3.7 NEUTRALIZAÇÃO DA ATIVIDADE ESFINGOMIELINÁSICA DO VENENO DE <i>L. intermedia</i> PELO LIMAB7	38
3.7.1 ENSAIO DE NEUTRALIZAÇÃO DA ATIVIDADE ESFINGOMIELINÁSICA <i>IN VITRO</i>	38
3.8 MÉTODO DE SPOT-SYNTHESIS	39
3.8.1 SÍNTESE DE PEPTÍDEOS SOBRE MEMBRANA DE CELULOSE.....	40
3.8.2 REATIVIDADE DOS ANTICORPOS FRENTE A PEPTÍDEOS SINTÉTICOS LINEARES	41
3.8.2.1 Imunoensaios com peptídeos sintéticos sobre membrana.....	41

3.9 PHAGE DISPLAY	42
3.9.1 BIOSSELEÇÃO DE PEPTÍDEOS SOBRE PLACA	42
3.9.2 SELEÇÃO DE CLONES	47
3.9.3 AMPLIFICAÇÃO DOS CLONES SELECIONADOS	47
3.9.4 PRECIPITAÇÃO DO DNA	48
3.9.5 SEQUENCIAMENTO	49
3.9.6 ANÁLISE DA REATIVIDADE DOS PEPTÍDEOS FRENTE AO LIMAB7 POR <i>DOT BLOT</i>	50
3.10 SÍNTESE PEPTÍDICA	50
3.10.1 PEPTÍDEOS SOLÚVEIS	50
3.10.2 ATIVAÇÃO DA RESINA	51
3.10.3 ATIVAÇÃO E ADIÇÃO DOS AMINOÁCIDOS A SEREM ACOPLADOS	52
3.10.4 CLIVAGEM DO PEPTÍDEO	53
3.11 ANÁLISE DA BIBLIOTECA DE cDNA	53
3.11.1 PREPARO DAS PLACAS DE LISE.....	55
3.11.2 IMUNOSSELEÇÃO	56
3.11.3 EXCISÃO	57
3.11.3.1 Obtenção de colônias isoladas	60
3.11.3.2 PCR de colônias	60
3.11.4 SEQUENCIAMENTO DO CDNA.....	61
3.11.5 Análise do sequenciamento dos cDNAs	63
4 RESULTADOS	64
4.1 CARACTERIZAÇÃO DOS ANTICORPOS MONOCLONAIS	65
4.1.1 AVALIAÇÃO DA ESPECIFICIDADE DO LIMAB7.....	65
4.2 PERFIL PROTEÔMICO DO VENENO DE ARANHAS DO GÊNERO <i>Loxosceles</i>	66
4.3 REATIVIDADE DO LIMAB7 FRENTE AO VENENO DE <i>L. intermedia</i> EM GEL 2D	70
4.4 GEL BIDIMENSIONAL DAS PROTEÍNAS DO VENENO DE <i>L. intermedia</i> PURIFICADAS EM COLUNA DE AFINIDADE	71
4.5 INIBIÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA DO VENENO DE <i>L. intermedia</i> PELO LIMAB7	72
4.6 INIBIÇÃO DA ATIVIDADE ESFINGOMIELINÁSICA DO VENENO DE <i>L. intermedia</i> PELO LIMAB7	73
4.7 IDENTIFICAÇÃO DE EPITOPOS PELO MÉTODO DE SPOT SYNTHESIS	74
4.8 IDENTIFICAÇÃO DE EPITOPOS PELO MÉTODO DE PHAGE DISPLAY	76
4.9 SÍNTESE DE PEPTÍDEOS SOLÚVEIS	78
4.10 REATIVIDADE DO LIMAB7 FRENTE AOS PEPTÍDEOS CÍCLICOS	78
4.10.1 REDUÇÃO E ALQUILAÇÃO DOS PEPTÍDEOS CÍCLICOS	79
4.11 IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS A PARTIR DA BIBLIOTECA DE CDNA DA GLÂNDULA DA ARANHA <i>L. intermedia</i>	80
4.11.1 CARACTERIZAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS PROTÉICAS DEDUZIDAS UTILIZANDO-SE ALGORITMOS	83
4.11.1.1 Peptídeo sinal e proteína madura	83
4.11.1.2 Sítios de glicosilação	86
4.11.1.3 Sítios de fosforilação	86
4.11.1.4 Outros sítios de modificações pós-traducionais.....	87
4.11.1.5 Identificação de seqüências protéicas similares	88
4.11.1.6 Estudo de domínios conservados entre famílias de proteínas.....	92
4.11.1.7 Estudo de homologia estrutural com a Smase I de <i>L. laeta</i>	93
5. DISCUSSÃO	95
6. CONCLUSÕES	105
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107
APÊNDICES	118
ANEXOS	128

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Aranha do gênero <i>Loxosceles</i>	3
Figura 2	Aranhas da espécie <i>L. intermedia</i>	4
Figura 3	Número de acidentes por aranhas do gênero <i>Loxosceles</i> em Curitiba – PR entre os anos de 1987 e 2004	6
Figura 4	Lesão característica do acidente loxoscélico em pessoa adulta	7
Figura 5	Seleção de seqüências peptídicas por <i>Phage display</i>	45
Figura 6	Mapa do vetor Zap Express	54
Figura 7	Mapa circular do vetor pBK- CMV	54
Figura 8	Imunoseleção de fagos lambda	59
Figura 9	Caracterização dos anticorpos monoclonais anti veneno de <i>L. intermedia</i>	65
Figura 10	Avaliação da reatividade do LimAb7 por <i>Western Blotting</i>	66
Figura 11	Gel IPG/SDS PAGE do veneno de <i>L. intermedia</i>	68
Figura 12	Gel IPG/SDS PAGE do veneno de <i>L. laeta</i> (do Brasil)	68
Figura 13	Gel IPG/SDS PAGE do veneno de <i>L. laeta</i> (do Peru)	69
Figura 14	Gel IPG/SDS PAGE do veneno de <i>L. gaucho</i>	69
Figura 15	Reatividade das proteínas do veneno de <i>L. intermedia</i> reconhecidas pelo <i>pool</i> de anticorpos monoclonais	70
Figura 16	<i>Western Blotting</i> das proteínas da fração dermonecrótica do veneno de <i>L. intermedia</i> reconhecidas pelo LimAb7	71
Figura 17	Géis bidimensionais do veneno bruto de <i>L. intermedia</i> e das proteínas purificadas por afinidade corados com Azul de Coomassie	72
Figura 18	Porcentagem de inibição da hemólise LimAb7	73
Figura 19	Porcentagem de neutralização da atividade esfingomielinásica pelo LimAb7	73
Figura 20	Reatividade da seqüência linear da LiD1 frente aos anticorpos poli e monoclonal	74
Figura 21	Avaliação da reatividade de peptídeos lineares de 15 aminoácidos da proteína LiD1 frente ao anticorpo policlonal de cavalo anti DNF	75
Figura 22	Evolução da afinidade dos fagos ao LimAb7 nos <i>pannings</i> I, II e III avaliada por ELISA	76
Figura 23	Evolução dos clones ciclo após ciclo de seleção (PI, PII e PIII)	77
Figura 24	Reatividade dos peptídeos cíclicos sintetizados sobre a membrana de <i>Spot</i> frente ao LimAb7	79
Figura 25	Efeito da redução e da alquilação do mimotopo no reconhecimento pelo LimAb7	80

Figura 26	Perfil eletroforético dos fragmentos de cDNA amplificados ao se utilizar iniciadores T3 e T7	80
Figura 27	Histograma correspondente ao alinhamento das seqüências de aminoácidos de proteínas do veneno de aranhas do gênero <i>Loxosceles</i> com identidade acima de 80%	82
Figura 28	Seqüência de nucleotídeos e aminoácidos da proteína relativa aos clones 20 (A) e 24 (B).....	85
Figura 29	Possíveis sítios de N-glicosilação das proteínas relativas aos clones 20 (A) e 24 (B).....	86
Figura 30	Possíveis sítios de fosforilação das proteínas relativas aos clones 20 (A) e 24 (B).....	87
Figura 31	Alinhamento de seqüências de aminoácidos gerado pelo programa PSI-BLAST para as proteínas correspondentes ao cDNA 20 (A) e 24 (B).....	89
Figura 32	Alinhamento de domínios conservados entre proteínas deduzidas a partir do cDNA dos clones 20 e 24 com proteínas da família GDPD	92
Figura 33	Alinhamento de domínios conservados entre proteínas deduzidas a partir de cDNAs dos clones 20 (A) e 24 (B) com a proteína UgpQ da família GDPD	93
Figura 34	Alinhamento da proteína relativa ao cDNA 24 com a Smase I de <i>L. laeta</i> com estrutura TIM barrel.....	94

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Principais espécies responsáveis pelos acidentes loxoscélicos, número de casos, formas clínicas e mortalidade nos diferentes estados	5
Quadro 2	Evolução da lesão em função do tempo após o acidente loxoscélico	6
Quadro 3	Programação do aparelho IPGphor.....	32
Quadro 4	Descrição dos passos para coloração de gel bidimensional por prata.....	35
Quadro 5	Descrição dos passos para coloração de gel bidimensional por Azul de Coomassie	35
Quadro 6	Reação de PCR de colônias	60
Quadro 7	Programa utilizado na PCR com iniciadores T3 e T7.....	61
Quadro 8	Programa utilizado na PCR para seqüenciamento de cDNA	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Características de algumas das proteínas presentes no veneno de aranhas do gênero <i>Loxosceles</i> quanto à massa molecular e atividade biológica.....	10
Tabela 2	Seqüência de aminoácidos dos clones isolados após seleção a partir de biblioteca de fagos M13.....	78
Tabela 3	Comparação entre as seqüências nucleotídicas dos cDNAs dos clones 20 e 24 com as seqüências de <i>L. boneti</i> 3 e <i>L. laeta</i> H10	81
Tabela 4	Sítios de modificação pós-traducionais das proteínas maduras relativas aos clones 20 e 24	88
Tabela 5	Porcentagem de identidade entre as seqüências de aminoácidos correspondentes às proteínas maduras componentes dos venenos de aranhas do gênero <i>Loxosceles</i> ..	91

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Absorbância
Å	Angstrom
CAM	Complexo de Ataque à Membrana
Aa	Aminoácido
AAS	Soro anti araquinídico
BCIP	5-bromo, 4-cloro, 3 indoilfosfato
BSA	Albumina bovina sérica
CBS	Tampão citrato
cDNA	DNA complementar
CID	Coagulação Intravascular Disseminada
CK2	Caseína cinase II
CM	Carboximetil celulose
CPPI	Centro de Pesquisa e Produção de Imunobiológicos
CV	Cutâneo-visceral
DAB	Diaminobenzidina
DIPC	Diisopropilcarbodiimida
DMC	Diclorometano
DMEM	<i>Dulbecos's Modified Eagles Medium</i>
DMF	N,N'-dimetilformamida
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNF	Fator dermonecrótico do veneno de <i>L. intermedia</i>
DIPC	Diisopropilcarbodiimida
DTE	Ditioeritritol
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminoacético
ELISA	Ensaio Imunoadsorvente ligado à enzima
Fmoc	9-fluorenil metil oxicarbonil
GM-CSF	Fator estimulante de colônias de granulócitos – macrófagos
HAT	Hipoxantina, aminopterina e timidina
HT	Hipoxantina e timidina
HOBt	1 - hidroxibenzotriazol
HPO	Horseradish peroxidase
IEF	Isoeletrofocalização
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina
IPG	<i>Isoelectricfocusing gradient</i>
IPTG	Isopropil β- D- tiogalactosídeo
KLH	<i>Keyhole limpet hemocyanin</i> (hemocianina de caramujo)
kDa	Quilo Daltons
LB	Luria Bertani
Li	<i>Loxosceles intermedia</i>
LiD1	Proteína dermonecrótica 1 do veneno de <i>L. intermedia</i>

LimAb	Anticorpo monoclonal que reconhece o veneno de <i>L. intermedia</i>
LIPAPE	Laboratório Interdisciplinar de Pesquisa em Animais Peçonhentos
LiTx1	Toxina de baixa massa molecular do veneno de <i>L. intermedia</i>
LC	Loxoscelismo Cutâneo
LPA	Ácido Lisofosfatídico
LPC	Lisofosfatidilcolina
LVC	Loxoscelismo Viscero-Cutâneo
MCP	Cofator de membrana reguladora de complemento
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
mRNA	RNA mensageiro
MTT	3-(4, 5-dimetiltiazol 2-il) 2, 5-brometo de difeniltetrazolium
NAGE	Núcleo de Análise do Genoma e Expressão Gênica
OPD	Ortofenilenodiamino
PAGE	<i>Polyacrilamide gel electrophoresis</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PEG	Polietilenoglicol
pfu	<i>Plaque forming unit</i> (unidade formadora de colônia)
pI	Ponto isoelétrico
PKC	Proteína cinase C
PMN	Polimorfonuclear
rpm	Rotações por minuto
SDS	Sódio dodecil sulfato
SmaseD	Esfingomielinase D
TFA	Ácido trifluoroacético
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TU	<i>Unit transducing</i> (Unidade de transdução)
TYR	Tirosina cinase
UI	Unidade Internacional
V	Volts
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
Vh	Volts por hora

RESUMO

Com o objetivo de investigar a bioquímica e a imunquímica de proteínas presentes no veneno de *L. intermedia*, treze anticorpos monoclonais foram produzidos e, um deles, denominado LimAb7, foi capaz de neutralizar a atividade dermonecrótica induzida por esta peçonha em coelhos. Para caracterizar as proteínas reconhecidas por este anticorpo monoclonal, diferentes técnicas foram empregadas como, por exemplo, eletroforese bidimensional, ensaios de neutralização das atividades hemolíticas e esfingomielinásicas, técnica de *Spot-synthesis*, *Phage display* e imunosseleção de uma biblioteca de cDNA da glândula do veneno de *L. intermedia*. Através de um *Western Blotting* feito a partir de um gel bidimensional do veneno bruto de *L. intermedia*, verificou-se que LimAb7 reconheceu, pelo menos, 15 proteínas que fazem parte da família das proteínas da fração dermonecrótica. Além disso, foi capaz de inibir 84 % e 63,5% das atividades hemolíticas e esfingomielinásicas induzidas pelo veneno, *in vitro*, respectivamente. Quanto à técnica de *Phage display*, todos os mimotopos selecionados pelo LimAb7 apresentaram uma porção hidrofílica flanqueada por duas cisteínas, alguns dados sugerem que este anticorpo monoclonal apresenta efeito neutralizante pela ligação a um determinante antigênico dependente de conformação. Neste trabalho, ainda foram identificadas duas seqüências de aminoácidos a partir de uma biblioteca de cDNA da glândula de veneno de *L. intermedia*. A análise das mesmas revelou que as proteínas deduzidas, ambas com 283 aminoácidos, são isoformas que apresentam 46 e 47,5% de similaridade com a LiD1. As massas moleculares das proteínas são de 32.036 e 32.180 Da e seus pontos isoelétricos teóricos 6.36 e 5.94, respectivamente.

ABSTRACT

To investigate the biochemistry and the immunochemistry of proteins from *L. intermedia* spider venom, thirteen monoclonal antibodies were produced. One of them, called LimAb7, was able to neutralize the dermonecrotic activity induced by venom in rabbits. In an effort to characterize the proteins recognized by the neutralizing monoclonal antibody, we have used different approaches as two-dimensional electrophoresis, neutralizing assay of hemolytic and a sphingomyelinase activities, Spot peptide synthesis, *Phage display* technology and immunoscreening of *L. intermedia* venom gland cDNA library. In an *Western Blotting* of *L. intermedia* venom 2D electrophoresis gel, the LimAb7 reacted strongly with at least 15 proteins that can belong to proteins family from dermonecrotic portion. Furthermore, LimAb7 was able to inhibit 84% and 63.5% of hemolytic and sphingomyelinase activities induced by crude venom. By *phage display*, all peptide mimotopes screened by LimAb7 expressed a hydrophilic portion flanked by two cysteines, these findings have suggested that this monoclonal antibody mediates their neutralizing effect by binding to conformational dependent antigenic determinant. Two clones from *L. intermedia* venom gland cDNA library have identified by immunoscreening using LimAb7. The sequence analysis revealed these proteins, both with 283 amino acids, are isoforms with 46 and 47,5% of similarity with LiD1. The molecular weight of 32.036 and 32.180 Da and their theoretical isoelectric points are 6.36 and 5.94, respectively.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Loxoscelismo, araquidismo necrótico ou gangrenoso são alguns dos termos utilizados para descrever lesões cutâneas necróticas degenerativas e manifestações clínicas caracterizadas por falha renal e distúrbios hematológicos provocadas por acidentes com aranhas do gênero *Loxosceles* (Futrell, 1992).

Embora esses aracnídeos apresentem ampla distribuição mundial (Futrell, 1992; Young & Pincus, 2001), na última década, muitos estudos foram realizados com o veneno dessas aranhas motivados pela elevada infestação intradomiciliar e pelo crescente número de casos ocorridos na região sul e sudeste do Brasil, principalmente no estado do Paraná e Santa Catarina. Somente entre os anos de 1989 e 1990, de todos os casos de loxoscelismo notificados no país, 77,4% deles ocorreram na cidade de Curitiba e região metropolitana (Ribeiro *et al.*, 1993), onde a espécie *L. intermedia* é predominante, sendo notificados, no ano de 2004, 3.741 casos (SESA, 2004).

A migração desses aracnídeos para o ambiente urbano foi verificada com o recente ressurgimento de aranhas do gênero *Loxosceles* nos domicílios dos bairros Serra e Belvedere, na cidade de Belo Horizonte, mais precisamente das espécies *L. similis* e *L. anomola* (Silvestre *et al.*, 2005) antes encontradas somente em ambientes cavernícolas.

O veneno desses aracnídeos apresenta numerosas toxinas sendo que algumas das proteínas que o compõem têm sido caracterizadas bioquímica e biologicamente quanto à estrutura e mecanismos de ação que acarretam os efeitos nocivos em mamíferos. Alterações histopatológicas, celulares e sanguíneas, além de caracterizações da resposta inflamatória desencadeada pelo veneno têm sido recentemente descritas, apesar de pouco progresso ter sido alcançado na proposta de um tratamento eficaz para o loxoscelismo (Isbister & White, 2004).

Um dos componentes do veneno responsável pela dermonecrose apresenta características de uma esfingomielinase D ou Smase D (Kurpiewski *et al.*, 1981). Além do interesse científico motivado pelos vários efeitos clínicos dos acidentes loxoscélicos, as toxinas do veneno desses aracnídeos também são alvo de estudos que visam ao desenvolvimento de bioinseticidas (Corzo *et al.*, 2000; Castro *et al.*, 2004), de drogas terapêuticas (Smith & Vane, 2003), ferramentas farmacológicas (Isbister & White, 2004) ou de possíveis vacinas a serem empregadas em locais endêmicos (Araújo *et al.*, 2003).

1.1 O ARACNÍDEO E SUA BIOLOGIA

As aranhas são artrópodes da ordem Araneae caracterizados pela existência de um exoesqueleto articulado quitinoso cujo tamanho compreende desde milímetros a centímetros, raramente excedendo a 20 cm para as formas terrestres. Diferenciam-se dos demais por apresentarem corpo dividido em cefalotórax e abdômen. Esses aracnídeos caracterizam-se pela presença de um par de apêndices mastigadores ou quelíceras, um par de palpos e quatro pares de pernas ligados ao cefalotórax e de duas a oito fiandeiras no abdômen. Em geral são predadoras de outros artrópodes principalmente insetos (Sams *et al.*, 2001; Goyffon, 2002).

Em todo o mundo são aproximadamente 30.000 espécies (Lucas, 1988). Dentre as 20 ou 30 espécies consideradas importantes quanto à toxicidade para o homem, encontram-se as aranhas pertencentes ao gênero *Loxosceles*, família *Loxoscelidae* e superfamília *Plectruoidea* (Sams *et al.*, 2001).

Por tolerarem uma ampla variação de temperatura (Fischer & Vasconcellos-Neto, 2003), esses artrópodes são cosmopolitas, encontram-se tanto em climas tropicais como subtropicais e estão distribuídos por toda a América, Europa (região do Mar Mediterrâneo), África (Futrell, 1992) sendo, mais recentemente, encontradas também na



Figura 1- Aranha do gênero *Loxosceles*

Oceania (Young & Pincus, 2001). São mais de dezessete espécies na África, duas na Europa, mais de cinquenta na América do Norte e do Sul (Futrell, 1992). No Brasil, principalmente nos estados do sul (Paraná e Santa Catarina) e sudeste (São Paulo), são três as principais espécies de interesse médico, *Loxosceles intermedia*, *Loxosceles gaucho* e *Loxosceles laeta* (Ministério da Saúde, 2001).

Estas aranhas são pequenas, apresentam três pares de olhos, medem de um a dois centímetros de corpo e três a quatro centímetros de envergadura, incluindo as pernas (Futrell, 1992). São denominadas, popularmente, de “aranhas marrons” por apresentarem o corpo de cor marrom-amarelada (Fig.1), ou de aranhas-violino por possuírem uma mancha escura na forma do instrumento. A olho nu as outras espécies se diferenciam da *L. intermedia* por particularidades do cefalotórax que, no caso da *L.*

gaucho, apresenta uma mancha clara em forma de estrela (Jorge *et al.*, 1991). Caracterizam-se por não serem agressivas, por construírem teias irregulares de fios adesivos e por seus hábitos noturnos, preferindo lugares escuros e secos (Lucas, 1988).

Na natureza, essas aranhas podem viver por 3 a 7 anos (Andrade *et al.*, 2000) e encontram-se sob pedras, cascas de árvores, em fendas e cavernas. Por se adaptarem facilmente ao ambiente urbano, são encontradas em pilhas de tijolos, telhas e entulhos. Já no ambiente domiciliar alojam-se atrás de móveis, quadros, cantos e outros locais que não são limpos com frequência (Lucas, 1988).

Em um estudo recente, Sandidge (2003) relatou que aranhas da espécie *L. reclusa* preferem as presas mortas às vivas, mesmo que estas tenham sido eliminadas por meio de inseticidas.

Esses aracnídeos resistem por meses sem água ou comida (Futrell, 1992) e ambos os sexos são peçonhentos (Fig. 2), porém a fêmea produz uma maior quantidade de veneno cuja atividade dermonecrótica, em coelhos, mostrou-se mais potente quando comparada à do macho (Oliveira *et al.*, 1999; 2005).



Figura 2 – Aranhas da espécie *L. intermedia*. Aranha macho (à direita) e fêmea (à esquerda).

Modificado a partir de Silva *et al.*, 2004

A glândula de veneno da aranha *L. intermedia* é composta de duas camadas de músculo estriado sendo uma interna e outra externa. As células epiteliais são encontradas lado a lado havendo projeções ao lúmen que é rico em vesículas secretoras contendo veneno. A lâmina basal que separa as células epiteliais secretoras das células musculares das glândulas contém glicoproteínas, resíduos sulfatados glicosaminoglicanos, laminina e entactina (Santos *et al.*, 2000).

1.2 EPIDEMIOLOGIA

As aranhas do gênero *Loxosceles* distribuem-se amplamente pelos continentes sendo encontradas na América do Norte (Futrell, 1992) e do Sul (Ministério da Saúde 2001, Sezerino *et al.*, 1998), África, Europa (Futrell, 1992) e Oceania (Young & Pincus, 2001).

No Brasil, são três as espécies de interesse médico: *Loxosceles intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta*. A maior incidência de casos de loxoscelismo (Quadro 1) ocorre nas regiões sul e sudeste do país sendo a espécie *L. gaucho* encontrada mais frequentemente no estado de São Paulo e *L. laeta* e *L. intermedia* nos estados de Santa Catarina e Paraná, respectivamente (Ministério da Saúde, 2001).

UF	Espécie*	Período	Casos	Forma cutânea (%)	Forma CV** (%)	Mortalidade (%)
SP	<i>L. gaucho</i>	1984-1993	297	96,9	3,1	0,3
PR	<i>L. intermedia</i>	1990-1995	9.980	99,8	0,15	0,1
SC	<i>L. laeta</i>	1984-1996	267	86,9	13,1	1,5

Quadro 1 – Principais espécies responsáveis pelos acidentes loxoscélicos, número de casos, formas clínicas e mortalidade nos diferentes estados

* Agente responsável mais comumente encontrado

** CV - Cutânea - visceral

Fonte:Ministério da Saúde – FUNASA (2001)

Na cidade de Curitiba e região houve um crescimento geométrico da população de aranhas tendo em vista o número de casos de loxoscelismo notificados pela Secretaria Estadual de Saúde Ambiental do Paraná - SESA (Fig. 3). Em 1987, foram registrados 131 acidentes loxoscélicos e, até o mês de setembro do ano de 2004, foram mais de 3500 casos (SESA, 2004).

Não há, comprovadamente, uma razão principal que justifique o aumento tão rápido da população de aranhas e, conseqüentemente do número de acidentes. Acredita-se que o desequilíbrio ecológico tenha afetado um dos principais predadores da aranha marrom, a lagartixa doméstica (*Hemidactylus sp*). Outra hipótese seria o desmatamento e o concomitante desenvolvimento das construções civis, que fizeram com que houvesse uma mudança de seu habitat do ambiente peri- para o intradomiciliar. Além disso, muito provavelmente, as alterações climáticas como o prolongamento do verão, também influenciaram o crescimento populacional das aranhas, uma vez que se nota o aumento da atividade destes aracnídeos nos meses mais quentes do ano (Lucas, 1988;

Ribeiro *et al.*, 1993; Sezerino *et al.*, 1998). Os acidentes com *Loxosceles* ocorrem, sobretudo, em ambiente domiciliar quando a aranha se esconde em uma roupa ou sapato e é inadvertidamente comprimida contra a pele. Conseqüentemente, a maioria das picadas se dá nos membros inferiores e superiores não sendo freqüente nos pés ou tornozelo ou nas mãos (SESA, 2004).

A maioria dos acidentados leva mais de 12 horas para procurar atendimento médico pois, uma grande parcela deles não sente a picada. Dificilmente o paciente vê a aranha e menos de 10% levam a aranha no local de atendimento médico (Ribeiro, *et al.*, 1993).

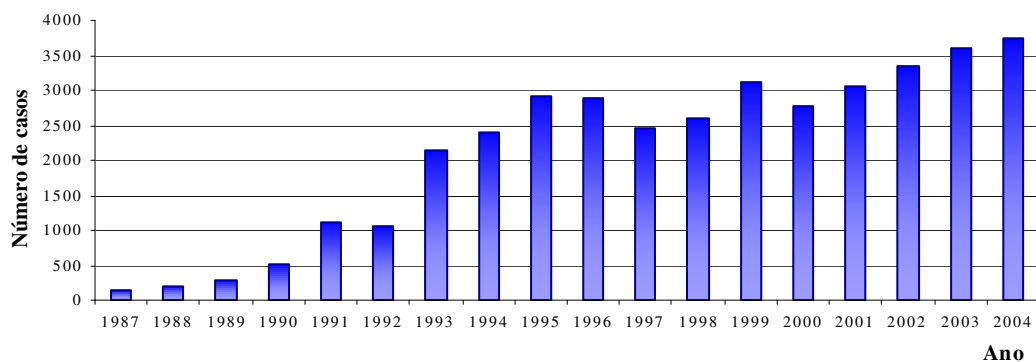


Figura 3 - Número de acidentes por aranhas do gênero *Loxosceles* em Curitiba – PR entre os anos de 1987 e 2004.

Fonte: SESA – Secretaria Estadual de Saúdel, Curitiba – Pr
* Número de casos notificados até setembro de 2004

1.3 QUADRO CLÍNICO

O loxoscelismo caracteriza-se pelo surgimento de uma lesão dermonecrótica que se espalha gravitacionalmente.

Inicialmente, na região atingida aparece um eritema em cujo centro surge uma mácula equimótica. Com o passar das horas ou dias a lesão adquire um aspecto que é denominado de placa marmórea e, vesículas e bolhas de conteúdo hemorrágico podem se formar (Futrell, 1992; Sezerino *et al.*, 1998).

Raramente há febre que, quando ocorre, é um sintoma precoce. No final da primeira ou segunda semana de evolução, muitas vezes, a área necrótica se torna bem delimitada, formando-se, então, uma crosta negra (Fig. 4) que, à medida que seca, diminui de tamanho. No local forma-se uma úlcera de proporções variáveis que, habitualmente, atinge até a hipoderme. Como seqüela, no local da lesão permanece a

cicatriz que pode ser desfigurante ou até mesmo causar prejuízo funcional. Este quadro é denominado de loxoscelismo cutâneo (Futrell, 1992).

O loxoscelismo cutâneo-visceral, que é bem mais raro, ocorre entre 3 (Cardoso *et al.*, 1988) a 13% (Sezerino *et al.*, 1998) dos casos, sobrevêm horas ou dias após a picada e é caracterizado por distúrbios hematológicos como coagulação



Figura 4 - Lesão característica do acidente loxoscélico em pessoa adulta

intravascular disseminada, anemia hemolítica e trombocitopenia, culminando com a insuficiência renal (Quadro 2). Exames laboratoriais podem indicar hemoglobinemia, bilirrubina elevada, hemoglobinúria, leucocitose e proteinúria (Futrell, 1992).

Tempo	Sinais cutâneos	Sinais sistêmicos	Sintomas
1-3 h	Formação de vesícula, eritema, cianose		Ausência de dor
3-12 h			Início da dor e coceira
12-24 h	Edema, eritema, áreas hemorrágicas e isquemia		
24-72 h	Formação da placa marmórea	Erupção, febre, hemólise, trombocitopenia e CID	Náusea, vômito, mialgia, calafrios, fraqueza,
3-7 dias	Início da formação da úlcera, regressão do eritema	Anemia, insuficiência renal aguda	
7-42 dias	Tamanho máximo da lesão		
7-120 dias	Gradual regressão da região necrosada		

Quadro 2 - Evolução da lesão em função do tempo após o acidente loxoscélico*

CID, Coagulação intravascular disseminada

* Sinais cutâneos variam e os sinais sistêmicos e sintomas podem ou não ocorrer

Adaptado de Sams *et al.*, 2001

Há pesquisadores que sugerem que, uma vez que a hemoglobina esteja livre no sangue, há a formação do complexo hemoglobina/haptoglobina cuja passagem pelo glomérulo pode causar danos às células no túbulo renal (Wasserman & Anderson, 1983), por outro lado, avaliações histológicas dos rins de camundongos sugerem que o veneno loxoscélico atua diretamente como um agente nefrotóxico, uma vez que tanto a

necrose (Tambourgi *et al.*, 1998a) como o próprio veneno foram encontrados em estruturas renais (Luciano *et al.*, 2004; Chaim *et al.*, 2005).

Geralmente a picada da aranha é indolor, motivo pelo qual faz com que o paciente somente se dirija ao atendimento médico horas depois do acidente quando se inicia a dor local. Esta dor, que varia de leve a severa, é causada, provavelmente, pela isquemia secundária à vasoconstrição (Futrell, 1992). É sabido que, tanto nos Estados Unidos como no Brasil, muitos dos casos de loxoscelismo notificados são confundidos com outras doenças de pele como infecção por *Staphylococcus* ou *Streptococcus*, antrax cutâneo, infecções por herpes e *Varicella zoster*, picadas de insetos e até mesmo com quadros de úlcera diabética (Vetter *et al.*, 2003; Gubert, 2005).

O prognóstico está relacionado à quantidade do veneno injetado, à espécie (Ministério da Saúde, 2001) e ao sexo da aranha (Oliveira *et al.*, 1999) à velocidade de difusão do veneno (Domingos *et al.*, 2003a), à presença de bactérias como *Clostridium perfringens* (Monteiro *et al.*, 2002), bem como à predisposição genética (Barreto *et al.*, 1985), idade (Sezerino *et al.*, 1998) e à condição do sistema imune (Wasserman & Anderson, 1983) do paciente.

O óbito não é freqüente, podendo ser de 0,2% (Ribeiro *et al.*, 1993), 0,4% (Cardoso *et al.*, 1988) ou de 1,5% (Sezerino *et al.*, 1998). Felizmente, os pacientes que sobrevivem não apresentam seqüelas. Embora os pacientes não apresentem uma resposta imune vigorosa contra toxinas do veneno loxoscélico, anticorpos contra seus componentes foram identificados no soro de vítimas (Barbaro *et al.*, 1992a).

1.4 O VENENO

As espécies de *Loxosceles* estudadas apresentam diferenças significativas quanto às características de seus respectivos venenos ainda que haja homologia quanto às seqüências peptídicas (Fig. 5). Barbaro *et al.* (1996a) demonstraram que o veneno das três principais espécies brasileiras apresenta atividade dermonecrótica semelhante, muito embora os experimentos testando a letalidade mostrem que o veneno de *L. intermedia* é o mais potente enquanto *L. laeta* é o menos tóxico (Barbaro *et al.*, 1996b).

Corroborando estes dados, em uma pesquisa recente, Oliveira *et al.* (2005) verificaram que o veneno de *L. intermedia* apresenta uma maior letalidade em camundongos ainda que apresente menor potencial dermonecrótico e hemolítico quando comparado ao veneno de *L. laeta*.

Comparando-se os venenos de *L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta* quanto ao perfil na filtração em gel (Sephadex G-100), todos os três apresentaram padrões de eluição semelhantes, sendo que o pico com maior massa molecular apresenta atividade letal e dermonecrótica. Na eletroforese SDS-PAGE convencional, o principal componente dos venenos migra a uma distância próxima do padrão de massa molecular de 35 kDa para *L. intermedia* e *L. gaucho*, e de 32 kDa para *L. laeta*, sendo que os venenos de *L. laeta* e *L. intermedia* mostram-se bem mais complexos que o de *L. gaucho* (Barbaro *et al.*, 1996a).

Avaliando-se as seqüências N-terminais dos três venenos constatou-se uma similaridade acima de 50% (Barbaro *et al.*, 1996a) o que explica a reatividade cruzada existente entre estes três venenos evidenciada por ensaios imunométricos (Barbaro *et al.*, 1994; Chávez-Olortegui *et al.*, 1998, Guilherme *et al.*, 2001).

No veneno de *L. reclusa*, espécie importante nos Estados Unidos, um grande número de proteínas foi identificado, entre elas fosfatase alcalina, 5'ribonucleotídeo-fosfoidrolase e hialuronidase. Nenhuma das enzimas citadas acima foi capaz de produzir a lesão dermonecrótica típica em animais porém, somente uma, caracterizada como uma Smase D (32 kDa), mostrou-se capaz de produzir hemólise, agregação plaquetária e lesão dermonecrótica em modelos experimentais (Futrell, 1992).

Verificou-se que esta esfingomielinase apresenta 4 isoformas com diferentes pontos isoelétricos (pI): 8.7, 8.4, 8.2 e 7.8 (Kurpiewski *et al.*, 1981). Valores muito próximos deste, 8.3 e 8.9, foram obtidos por Tambourgi e colaboradores (1998b) para as duas proteínas originadas de dois picos purificados do veneno de *L. intermedia* comprovadamente com atividade dermonecrótica. Foi demonstrado recentemente, utilizando-se gel SDS-PAGE 15%, que espécies européias e americanas do gênero *Loxosceles* como a *L. reclusa* apresentam perfil diferenciado, além de possuírem inúmeras proteínas de baixa massa (Binford & Wells, 2003).

O grupo de Veiga (2000b) verificou que o veneno de *L. intermedia* apresenta proteínas de baixa massa molecular compreendidas entre 5 e 40 kDa e de alta massa molecular, entre 60 e 850 kDa, além de possuir serino-proteases com 85-95 kDa com atividade gelatinolítica que também podem estar envolvidas nas ações do veneno. Corroborando este estudo, mais recentemente, Barbaro *et al.* (2005) demonstraram que além do veneno de *L. intermedia*, os venenos de *L. laeta*, *L. gaucho*, *L. deserta* e *L. reclusa* apresentam atividades gelatinolíticas, caseinolíticas e fibrinogenolíticas, além de hialuronidases com aproximadamente 44 kDa.

Espécie	Molécula	PM (kDa)	Atividade	Referências
<i>L. arizonica</i>	1	ND	ND	
	2	32,08	ND	Binford <i>et al.</i> , 2005
	3	31,04	ND	
<i>L. boneti</i>	1	~30	Esfingolielinásica	Ramos-Cerrillo <i>et al.</i> , 2004
	2	~30	Dermonecrótica	
	3	~30	ND**	
<i>L. gaucho</i>		61	Fibrinogenolítica, caseinolítica e gelatinolítica	Barbaro <i>et al.</i> , 2005
	Hialuronidase	44	Hialuronidásica	
	Loxnecrogina A	31,4		
	Loxnecrogina B	31,6	Dermonecrótica	Cunha <i>et al.</i> , 2003
		131	Caseinolítica e gelatinolítica	Barbaro <i>et al.</i> , 2005
	Hialuronidase	44	Hialuronidásica	
	LiD1	31,4	Sem atividade dermonecrótica Imunogênica.	Kalapothis <i>et al.</i> , 2002; Araújo <i>et al.</i> , 2003
<i>L. intermedia</i>	Loxolisina A	20 - 28	Fibronectinolítica Fibrinogenolítica	Feitosa <i>et al.</i> , 1998
	Loxolisina B	32 - 35	Gelatinolítica	
	Serino-protease	85	Gelatinolítica	Veiga <i>et al.</i> , 2000b
	Protease	ND	Hidrólise de entactina, proteoglicanas e membrana basal	Veiga <i>et al.</i> , 2000a; 2001a,b
		61	Fibrinogenolítica, caseinolítica e gelatinolítica	Barbaro <i>et al.</i> , 2005
	Hialuronidase	44	Hialuronidásica	
	P1	31,2		
	P2	31,3	Dermonecrótica e hemolítica	Tambourgi <i>et al.</i> , 2004
	LiTx 1	7,4		
	LiTx 2	7,9	Inseticida	Castro <i>et al.</i> , 2004
<i>L. laeta</i>	Li Tx 3	5,6		
	H17	32	Dermonecrótica e hemolítica	
	H10		ND**	Fernandes-Pedrosa <i>et al.</i> , 2002
	H13		ND	
		31,8	Fibrinogenolítica	
	Hialuronidase	44	Hialuronidásica	Barbaro <i>et al.</i> , 2005
		131	Gelatinolítica	
<i>L. reclusa</i>	1	~30		
	2	~30	Esfingomielinásica	Ramos-Cerrillo <i>et al.</i> , 2004
	Fosfatase alcalina	ND	ND	
	Hialuronidase	32,5 e 44	Hialuronidásica	Futrell, 1992
	5'ribonucleotídeo fosfoidrolase	ND	ND	Barbaro <i>et al.</i> , 2005
	SmaseD	30-35	Dermonecrótica Agregação plaquetária Hemolítica	Kurpiewski <i>et al.</i> , 1981
		61	Fibrinogenolítica, caseinolítica e gelatinolítica	Barbaro <i>et al.</i> , 2005
<i>L. rufescens</i>	Hialuronidase	32,5	Hialuronidásica	
	Metaloproteases	amplo	Caseinolítica, gelatinolítica e fibrinogenolítica	Young e Pincus, 2001
<i>L. similis</i>	SmaseD	31,2	ND	Silvestre <i>et al.</i> , 2005

Tabela 1 – Características de algumas das proteínas presentes no veneno de aranhas do gênero *Loxosceles* quanto à massa molecular e atividade biológica.

ND – Não demonstrado

** Sem atividade esfingomielinásica ou dermonecrótica

Cunha *et al.* (2003) isolaram e caracterizaram por espectrometria de massa, a partir do veneno de *L. gaucho*, duas proteínas denominadas de Loxnecrogin A e B cujas massas foram de 31.444 Da e de 31.626 Da, respectivamente. Ambas foram capazes de induzir lesão em coelhos sendo que a seqüência parcial da primeira mostrou-se muito similar à da proteína dermonecrótica recombinante, LiD1 (31,253 Da), do veneno de *L. intermedia* obtida através do sequenciamento de cDNA realizado pelo grupo de Kalapothakis (2002).

Através de estudos realizados quanto à composição do veneno utilizando-se ferramentas tais como cromatografia ou biologia molecular, foi possível verificar, entre as várias espécies, a presença de inúmeras proteínas, muitas vezes sem atividade determinada (Tabela 1).

1.5 MECANISMO DE AÇÃO DO VENENO

O mecanismo de ação do veneno está sob constante investigação, principalmente pela sua composição, considerando-se que as muitas proteínas existentes agem, provavelmente, sinergicamente.

O poder necrosante do veneno é muito importante considerando-se que uma aranha adulta possui 4 µl de veneno cujo conteúdo proteico varia entre 65 e 100 µg (Kurpiewski *et al.*, 1981). O que mais intriga os pesquisadores é o fato de como um veneno em uma quantidade, relativamente pequena, pode induzir uma variedade de efeitos patológicos.

Estudos com medicamentos inibidores de complemento diminuem a formação da lesão dermonecrótica em cobaias havendo diminuição da infiltração por leucócitos polimorfonucleares (PMN) verificada através de biópsias. Acredita-se que tanto a ativação do complemento como a infiltração de PMN sejam essenciais para a formação da lesão (Futrell, 1992), ainda que os neutrófilos humanos não sejam ativados pelo veneno, ao contrário, sejam inibidos por ele (Babcock *et al.*, 1986).

Outro evento de importante característica inflamatória foi verificado por Desai *et al.* (2000) com o veneno de *L. deserta* cuja ação, em queratinócitos humanos, mostrou-se estimulante da secreção de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), um potente indutor de angiogênese e de permeabilidade vascular.

Em experimento utilizando células de cordão umbilical humano cultivadas em presença do veneno de *L. reclusa*, Patel *et al.* (1994) mostrou que este é capaz de

induzir estas células a expressar selectina E e a liberar interleucina 8 (IL-8), além do fator estimulador de colônia de granulócitos resultando em uma resposta inflamatória desregulada.

Feitosa *et al.* (1998) demonstrou a presença de duas metaloproteinases presentes no veneno de *L. intermedia*, sendo uma delas gelatinolítica (32 - 35 kDa) e uma segunda com ação fibronectinolítica e fibrinogenolítica (20 - 28 kDa), denominadas de loxolisina B e loxolisina A, respectivamente. A hemorragia no local da picada, a vasodilatação e a injúria na parede dos vasos sanguíneos podem estar relacionadas à ação do veneno sobre a fibronectina presente nas células endoteliais de capilares e responsável pela adesão e agregação plaquetárias.

Um dos possíveis mecanismos de ação do veneno baseia-se no fato de que as toxinas promovem a liberação de laminina além de atuar sobre entactina e heparan sulfato proteoglicanos cujas presenças são extremamente importantes para a estrutura e função de membranas basais. Estas ações hidrolíticas poderiam ser uma justificativa plausível para as propriedades hemorrágicas ou anticoagulantes do veneno, bem como para a toxicidade renal (Veiga *et al.*, 2000a).

O mecanismo pelo qual o veneno loxoscélico provoca nefrotoxicidade ainda é desconhecido, entretanto, há estudos mostrando que, curiosamente, ao contrário do que ocorre com o loxoscelismo cutâneo, não há infiltração de PMN no tecido renal atingido. A ausência de deposição de imunoglobulinas no rim, a concentração sérica normal de complemento e a co-localização do veneno sobre estruturas renais corroboram a proposição da atuação direta do veneno sobre este tecido (Luciano *et al.*, 2004; Chaim *et al.*, 2005).

Tambourgi e colaboradores (1995, 1998b) verificaram que a proteína de 35 kDa purificada a partir do veneno total da *L. intermedia* atua sobre a superfície de eritrócitos humanos ativando o sistema complemento tanto pela via clássica quanto pela via alternativa (Tambourgi *et al.*, 2002). A toxina não age diretamente induzindo a lise eritrocitária, mas aumenta a susceptibilidade da célula à lise mediada por complemento. Fato este que é provocado pela clivagem de glicoforinas da superfície celular e inibido por inibidores das metaloproteinases endógenas, cujo mecanismo de ativação ainda não foi bem esclarecido (Tambourgi *et al.*, 2000). Acredita-se que a via clássica seja ativada através da perda de assimetria da célula e da exposição de fosfatidilserinas da membrana, resultado da atuação da esfingolielinase presente no veneno (Tambourgi *et al.*, 2002).

Ao investigarem os efeitos das toxinas do veneno de *Loxosceles* sobre células endoteliais, Tambourgi e colaboradores (2002) verificaram que houve indução de clivagem de uma proteína co-fator de membrana reguladora de complemento (MCP) e do complexo principal de histocompatibilidade de classe I (MHC I) da superfície celular por ativação de endopeptidases denominadas de metaloproteinases (van den Berg *et al.*, 2002), o que demonstra o efeito indireto do veneno sobre a lise celular e não um efeito proteolítico do veneno. Curiosamente, a clivagem de MCP aumenta a resistência à lise induzida pelo complemento provavelmente devido ao aumento da fluidez da membrana dificultando a inserção do complexo de ataque à membrana (van den Berg *et al.*, 2002).

A hialuronidase é, provavelmente, a responsável parcial pelo espalhamento gravitacional da lesão cutânea (Foil & Norment, 1979). Acredita-se que a atividade hialuronidase em conjunto com enzimas proteolíticas e esfingomielinásicas proporciona, possivelmente, o favorecimento das injúrias teciduais (Barbaro *et al.*, 2005).

O componente mais estudado do veneno destas aranhas é a esfingomielinase D (Smase D), uma enzima, segundo os pesquisadores, capaz de produzir lesões dermonecroticas, hemólise e agregação plaquetária (Kurpiewski *et al.*, 1981). As esfingomielinases são enzimas que catalisam a hidrólise de esfingomielina, presente em membranas celulares, em fosforilcolina e ceramida 1-fosfato, este último um mediador de apoptose (Hannun & Obeid, 1995; Gõni & Alonso, 2002). Em um estudo recente, verificou-se que a Smase D hidrolisa a lisofosfatidilcolina ou LPC (1-o-hexadecilglicero-3-fosfocolina), um importante componente do plasma, a um composto alquilado, o ácido lisofosfatídico ou LPA. Este ácido quando em concentração anormal no sangue pode causar coagulação intravascular e infiltração de neutrófilos (van Meeteren *et al.*, 2004).

Portanto, a patogenia sistêmica ou cutânea do veneno de *Loxosceles* parece estar envolvida com a Smase D, pois esta fração é capaz de agregar plaquetas e lisar eritrócitos (Futrell, 1992).

Estudos preliminares com veneno de *L. gaucho* apontam que TNF- α possa estar indiretamente envolvido no aumento do efeito tóxico, uma vez que ele induz a migração de neutrófilos durante a inflamação, principalmente quando na presença de esfingomielina (Domingos *et al.*, 2003a).

Em um estudo sobre a estrutura ou papel biológico dos resíduos oligossacarídicos das proteínas do veneno de *L. intermedia*, Veiga e colaboradores

(1999) verificaram que não houve diferença significativa na agregação plaquetária desencadeada por proteínas glicosiladas ou deglicosiladas, sugerindo, portanto, que os oligossacarídeos não estão envolvidos na atividade trombocitopênica do veneno, bem como sobre a atividade fibrinogenolítica e fibronectinolítica. Porém, analisando uma metaloproteinase de 32-35 kDa, confirmaram a característica de glicoproteína (sendo o açúcar responsável por 2kDa da proteína) e ainda que a proteína, quando deglicosilada química ou enzimaticamente, tem sua atividade gelatinolítica diminuída acentuadamente.

1.6 PATOLOGIA

Estudos histopatológicos incluem edema e espessamento do endotélio dos vasos sanguíneos, infiltração de células inflamatórias, vasodilatação, coagulação intravascular, degeneração das paredes dos vasos sanguíneos e hemorragia dermo e subcutânea. O acúmulo de PMN é especialmente marcante e o abscesso pode ocorrer em 3 a 5 dias (Futrell, 1992).

Análises histopatológicas em coelhos, modelo animal que melhor representa a dermonecrose, mostraram que durante as primeiras quatro horas, são evidenciados edema, hemorragia, degeneração dos vasos sanguíneos, exudação, trombose, acúmulo de PMN nas vênulas ao redor da lesão e intensa diapedese (Ospedal *et al.*, 2002).

As toxinas do veneno de *L. intermedia* agem sobre as células endoteliais alterando a sua morfologia e provocando a perda de sua adesão em garrafas de cultura. Além disso, *in vivo*, clivam proteoglicanos heparan sulfato e degradam as entactinas, duas principais glicoproteínas componentes da membrana basal dos vasos sanguíneos (Veiga *et al.*, 2001b).

Em um estudo sobre as alterações sofridas pela medula óssea e sangue periférico de animais em teste, demonstrou-se que, embora transitoriamente, ocorre depressão medular provavelmente acarretada pela intensa migração de plaquetas e neutrófilos (Silva *et al.*, 2003).

Curiosamente, não há uma razão que explique por que camundongos e ratos não desenvolvem lesões dermonecróticas induzidas pelo veneno, como ocorre em coelhos e em humanos, mas são modelos de nefrotoxicidade causada pelas toxinas (Luciano *et al.*, 2004).

1.7 DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO

Mesmo com o desenvolvimento de imunoenaios para a detecção (Gomez *et al.*, 2002), identificação e quantificação do veneno em tecido necrosado (Cardoso *et al.*, 1988), em soro (Chávez-Olortegui *et al.*, 1998) e em pêlos de lesão (Miller *et al.*, 2000; Krywko & Gómez, 2002) de pacientes acidentados, o diagnóstico do loxoscelismo ainda depende do reconhecimento do acidente pelo próprio paciente quando o mesmo traz a aranha ao centro médico ou pelo desenvolvimento do quadro clínico e das características da lesão (Málaque *et al.*, 2002). Devido ao pouco conhecimento sobre as características bioquímicas e funcionais do veneno, bem como do total esclarecimento sobre seu mecanismo de ação, o tratamento de pacientes picados por *Loxosceles* é bastante controverso.

O soro antiaraquinídico (AAS) produzido em cavalo pelo Instituto Butantã de São Paulo, que compreende a imunização de cavalos com veneno de escorpiões *Tityus serrulatus*, *Tityus baiensis*, da aranha *Phoneutria nigriventer* e da aranha *Loxosceles gaucho* (Furlanetto *et al.*, 1962) mostrou-se menos eficiente na neutralização, tanto letal como dermonecrótica, do veneno de *L. intermedia* que o soro antiloxoscélico produzido utilizando-se exclusivamente este veneno como antígeno (Braz *et al.*, 1999). Este mesmo soro AAS, quando comparado àquele produzido com venenos de três espécies (*L. intermedia*, *L. laeta* e *L. gaucho*) pelo Centro de Pesquisa e Produção de Imunobiológicos (CPPI), mostrou-se igualmente eficaz quanto à neutralização dermonecrótica e esfingomielinásica até mesmo de venenos como o de *L. deserta* e *L. reclusa* (Barbaro *et al.*, 2005).

O soro antiloxoscélico mostrou-se eficaz diminuindo a mortalidade de crianças acidentadas (Isbister *et al.*, 2003) porém, deve ser utilizado o mais precocemente possível, pois sua eficácia é diminuída quanto maior for o espaço de tempo entre o acidente e a administração do soro (Rees *et al.*, 1987; Barbaro *et al.*, 1992b), tendo em vista que, uma vez tendo o processo inflamatório se instalado, a lesão parece evoluir independente do agente causal (Goyffon, 2002).

Para a utilização da soroterapia tardiamente, deve se considerar que 6,5% (Sezerino *et al.*, 1998) a 20% (Pinhati *et al.*, 1999) dos pacientes apresentam reações adversas à administração do mesmo. Mesmo tendo-se constatado a eficiência do tratamento com antivenenos, seu emprego na terapia depende da experiência dos

médicos locais, pois no estado do Paraná utiliza-se o soro em 11,9% dos casos contra 70% no estado de São Paulo (Ministério da Saúde, 2001; Barbaro & Cardoso, 2003).

Têm sido utilizados prednisona ou dapsona via sistêmica (Silva *et al.*, 2004) além de anti-histamínicos (Shenone, 2003). Os analgésicos aliviam a dor e os anti-sépticos e antibióticos ajudam a prevenir a infecção secundária (Rees *et al.*, 1987). Além dos medicamentos, os médicos aconselham repouso, compressas geladas para minimizar a inflamação, inibir a atividade enzimática e a migração gravitacional (Sams *et al.*, 2001).

Quando se inicia o quadro cutâneo-visceral a hidratação precoce deve ser iniciada para prevenir a insuficiência renal, mas se a diurese não ocorrer uma pequena concentração de manitol ou furosemida é administrada. Se os exames laboratoriais indicam insuficiência renal o paciente é tratado em unidade de terapia intensiva onde é realizada a hemodiálise (Jorge *et al.*, 1991).

Embora o tratamento com esteróides sistêmicos esteja disponibilizado eles não diminuem significativamente a infiltração de PMN ou o tamanho da lesão em experimentos animais (Futrell, 1992).

1.8 DA GENÔMICA À PROTEÔMICA – O IMPORTANTE PAPEL DA IMUNOLOGIA

Até 1960, havia muita dificuldade em se cultivar células produtoras de anticorpos, uma vez que não resistiam muito tempo em cultura. Os estudos imunológicos da época eram, portanto, realizados somente com anticorpos policlonais.

Porém em 1975, Kohler e Milstein, baseando-se nos estudos de Littlefield (1964), que isolou células híbridas em cultura utilizando-se meio HAT (hipoxantina, aminopterina e timidina), conseguiram propor um modelo de seleção clonal. Neste estudo, um hibridoma, formado pela fusão de células B imortalizadas (mielomas) com células normais capazes de secretar anticorpos, foi capaz de ser cultivado indefinidamente. O desenvolvimento de anticorpos monoclonais, portanto, foi um marco na história da Imunologia uma vez que utiliza, justamente, a especificidade da resposta imunológica sendo, por isso, utilizado como uma das mais importantes e versáteis ferramentas de pesquisa biológica.

A par desse fato, anticorpos monoclonais foram produzidos utilizando-se como linfócitos de camundongos imunizados com o veneno bruto de aranhas da espécie *L.*

intermedia (Alvarenga *et al.*, 2003). Como um deles, denominado de LimAb7, foi capaz de neutralizar a atividade dermonecrótica induzida pelo veneno em modelos experimentais, o mesmo foi caracterizado e empregado na investigação de algumas propriedades bio e imunoquímicas do veneno através da utilização de técnicas diversificadas tais como eletroforese bidimensional, *Spot-synthesis*, *Phage display* e imunosseleção de biblioteca de cDNA.

A análise proteômica de venenos (Liang *et al.*, 2000) é uma metodologia importante para a identificação de componentes que são essenciais para uma ação biológica efetiva. O proteoma é definido como uma complementação do estudo genômico, pois abrange o estudo de proteínas que são expressas em um organismo em uma determinada condição, incluindo suas modificações e isoformas (O'Farrel, 1975; Blackstock & Weir, 1999; Rappsilber, & Mann, 2002). Proteínas individuais ou proteomas são normalmente caracterizados utilizando-se técnicas que empregam anticorpos ou espectrometria de massa e os dados obtidos com a análise proteômica podem ser confrontados com aqueles obtidos com a biologia molecular.

No caso das aranhas do gênero *Loxosceles*, assim como na maioria dos animais peçonhentos (Liang *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2004;) é interessante verificar as diferenças entre os perfis protéicos que compõem os venenos, estudo que pode trazer importantes informações sobre os aspectos estruturais bem como funcionais das proteínas.

O grande número de proteínas e peptídeos reflete igualmente a riqueza da diversidade de funções biológicas que podem ser encontradas nessas peçonhas tendo em vista a presença de inúmeras isoformas intra e interespecies (Kurpiewski *et al.*, 1981).

Algo a ser esclarecido seria o fato dessas proteínas apresentarem homologia (Binford *et al.*, 2005), alta reatividade cruzada em se tratando de anticorpos policlonais (Barbaro *et al.*, 1994; Chávez-Olortegui *et al.*, 1998) e diferentes epitopos para anticorpos monoclonais (Guilherme *et al.*, 2001; Alvarenga *et al.*, 2003).

A técnica de *Spot-synthesis* é uma metodologia moderna que tem sido muito utilizada no estudo de sítios de interação de vários sistemas. Porém, a aplicação mais conhecida e abrangente desta metodologia é o mapeamento de epitopos (Laune *et al.*, 2002; Chávez-Olortegui *et al.*, 2002; Alvarenga *et al.*, 2002; Machado de Ávila, 2004; Mendes *et al.*, 2004), embora, mais recentemente, esteja sendo utilizada também na investigação biomédica (Deswal *et al.*, 2005). A identificação de epitopos específicos pode auxiliar os estudos imunoquímicos que podem fornecer informações importantes

sobre os aspectos funcionais de uma molécula e, eventualmente, apresentar informações vitais à engenharia de proteínas e à bioinformática.

Esta técnica baseia-se na verificação da reatividade de anticorpos mono ou policlonais frente a peptídeos sobrepostos sintetizados sobre uma membrana de nitrocelulose (Frank, 1992) de forma a percorrer parte ou a proteína completa, em questão, variando-se de dois em dois ou de três em três aminoácidos C-terminais.

O mapeamento pela técnica de *Spot-synthesis* é possível desde que o epitopo investigado seja linear, entretando, demonstrou-se por cristalografia de complexos antígeno-anticorpo que a maioria dos anticorpos monoclonais reconhece epitopos descontínuos (Davies et. al., 1990).

Considerando-se que o anticorpo neutralizante LimAb7 liga-se a uma região importante da toxina inibindo a atividade dermonecrótica, seria importante determinar seus epitopos fossem eles lineares ou não.

Entre as várias possibilidades de mapeamento de epitopos, a técnica de *phage display* (Smith, 1985) destaca-se na determinação de mimotopos ou epitopos contínuos e descontínuos, principalmente quando se utilizam anticorpos monoclonais cujo epitopo é, na maioria das vezes, conformacional (Cortese et al., 1994). Atualmente, a técnica de *phage display*, encontra-se entre as mais utilizadas para a expressão de peptídeos.

O fago utilizado na técnica de *phage display* (Winter, 1996) é o bacteriófago filamentosso M13 que apresenta 1 μm de comprimento e menos de 65 Å de diâmetro, circundado por cinco proteínas estruturais e DNA de fita simples como material genético (Marvin, 1998; Sidhu, 2001). Todas as cinco proteínas contribuem para a estabilidade da partícula viral, mas a proteína 3 (PIII), além de ser a principal proteína do capsídeo utilizada para a apresentação de peptídeos, é também necessária para o reconhecimento do hospedeiro e para a infecção. Esta técnica se tornou possível quando Smith, em 1985, demonstrou que era possível inserir um gene entre dois domínios de PIII mantendo sua função e, ainda, que a proteína transcrita pudesse ser apresentada na superfície viral fusionada à ela ou à proteína 8 (PVIII). Sendo assim, peptídeos e proteínas poderiam ser expressos através da manipulação do gene III ou VIII de fagos filamentosos (Scott & Smith, 1990; Smith & Petrenko, 1997; Petrenko & Vodyanoy, 2003).

Uma vez o fago tendo sido selecionado, seu DNA pode ser seqüenciado e, dessa forma, a seqüência do inserto pode oferecer informações sobre o peptídeo expresso correspondente, geralmente em fusão com a proteína PVIII. A partir desses dados, o

peptídeo pode ser sintetizado e empregado como ferramenta em imunizações (Fisher & Howden, 1994), imunodiagnósticos (Sompuram *et al.*, 2002), estudo de interações proteína-receptor (Fuchs *et al.*, 2003) ou antígeno-anticorpo (Villard *et al.*, 2003), entre outros.

O peptídeo solúvel é obtido através da síntese sobre resina solúvel cujos aminoácidos utilizados estão disponíveis no mercado com o grupamento amino protegido pelo grupamento Fmoc (fluorenil metil oxicarbonila). Resumidamente, a técnica compreende liberação do grupamento N-terminal do Fmoc utilizando-se piperidina enquanto o aminoácido seguinte tem função carboxila ativada pela ação de DIPC (diisopropilcarbodiimida) e HOBT (hidroxibenzotriazol) para que ocorra a formação da ligação peptídica (Albericio *et al.*, 1997).

O uso de peptídeos sintéticos é muito amplo, sobretudo, quando o assunto são toxinas. A resposta imunológica de camundongos a peptídeos sintéticos correspondentes a específicos epitopos neutralizantes (Calderon-Aranda *et al.*, 1999) é alvo de estudo para a produção de antivenenos mais específicos e de vacinas mais eficientes (Calderon-Aranda *et al.*, 1995).

O objetivo de desenvolver biomoléculas para a obtenção de novos fármacos, vacinas e bioinseticidas fez da biologia molecular uma ferramenta importante neste processo que envolve o estudo do contato entre macromoléculas, sejam estas enzima-substrato ou interação antígeno-anticorpo.

Há algum tempo, a biologia molecular vem sendo empregada com sucesso na caracterização e expressão de toxinas de artrópodes como escorpiões (Guatimosim *et al.*, 1999; Kalapothakis *et al.*, 2001) e aranhas (Penaforte *et al.*, 2000; Kalapothakis *et al.*, 2002).

Recentemente, expressões recombinantes do veneno de aranhas do gênero *Loxosceles* têm sido desenvolvidas, sendo estas providas de atividade biológica (Fernandes-Pedrosa *et al.*, 2002; Ramos-Cerrillo *et al.*, 2004; Binford *et al.*, 2005) ou não (Kalapothakis *et al.*, 2002), mas capazes de induzir resposta imunológica com características neutralizantes dos efeitos letais e dermonecróticos (Araújo *et al.*, 2002).

Para a produção da proteína recombinante correspondente à esfingomielinase D do veneno de *L. intermedia*, uma biblioteca de cDNA, construída a partir de uma população de mRNA extraída da glândula, foi inserida em um vetor (Uni-Zap® XR) que foi clonado em fagos lambda (Kalapothakis *et al.*, 2002). A seleção de clones positivos pode ser realizada através de ELISAs (Kalapothakis *et al.*, 2001) ou ensaios de

imunosseleção (Young & Davis, 1983) empregando-se anticorpos poli ou monoclonais. Dessa forma, o LimAb7 foi empregado na captura de fagos, que ao utilizarem a maquinaria da bactéria, expressam proteínas que poderiam ser reconhecidas imunologicamente.

As tecnologias descritas possibilitam a identificação e caracterização de componentes de venenos, passo inicial para o emprego biotecnológico destas proteínas no desenvolvimento de bioinseticidas (Corzo *et al.*, 2000; Castro *et al.*, 2004), de medicamentos (Smith & Vane, 2003; Wilson *et al.*, 1998) ou de possíveis vacinas (Bittle *et al.*, 1982; Tam, 1988; Chen *et al.*, 2001; Araújo *et al.*, 2003).

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Caracterização imunológica, bioquímica e molecular, (estrutura/função) das proteínas componentes da fração dermonecrótica do veneno da aranha marrom *Loxosceles intermedia*.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ∞ Produzir e caracterizar anticorpos mono- e policlonais específicos para a(s) proteína(s) dermonecrótica(s) do veneno da aranha *Loxosceles intermedia*;
- ∞ Caracterizar proteína(s) dermonecrótica(s) através das técnicas de eletroforese bidimensional;
- ∞ Realizar ensaios de neutralização da atividade dermonecrótica, hemolítica e esfingomielinásica do veneno de *L. intermedia* por anticorpos mono- e policlonais;
- ∞ Identificar os epítopos contínuos de uma das proteínas da fração dermonecrótica (LiD1) utilizando-se anticorpos mono- e policlonais através da técnica de síntese múltipla de peptídeos (*Spot-synthesis*);
- ∞ Identificar os epítopos descontínuos ou conformacionais da LiD1 utilizando-se um anticorpo monoclonal neutralizante – LimAb7 através da técnica de expressão de peptídeos na superfície de fagos (*Phage display Technology*);
- ∞ Empregar o LimAb7 na imunosseleção de isoformas a partir de uma biblioteca de cDNA da glândula do veneno de *L. intermedia*.

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO DE VENENOS

O veneno de aranhas da espécie *L. intermedia* foi fornecido pelo LIPAPE (Laboratório Interdisciplinar de Pesquisa em Animais Peçonhentos – UFPR, Curitiba - PR) e obtido através de eletroestimulação (15V), diluído em tampão fosfato-salina 0,05 mol/l pH 7.4 (PBS) e congelado a – 20°C até o momento de uso.

Os venenos de *L. gaucha* e *L. laeta* foram gentilmente cedidos pelo CPPI (Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos, Piraquara - PR), diluídos em PBS e congelados em alíquotas de 1 mg/ml.

A peçonha da espécie *L. laeta* de origem peruana, e venenos de outros artrópodes como os da aranha *P. nigriventer* e dos escorpiões *T. serrulatus* e *T. bahiensis*, do inseto *A. meliferis* e das serpentes *Bothrops atrox*, *L. muta muta* e *Crotalus terrificus* foram obtidos a partir da coleção de venenos do laboratório do Prof. Dr. Carlos Chávez Olórtgui.

3.2 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLI- E MONOCLONAIS

3.2.1 PRODUÇÃO DE SORO DE CAVALO ESPECÍFICO PARA O FATOR DERMONECRÓTICO DO VENENO DE *L. intermedia*

O soro de cavalo hiperimune específico para o fator dermonecrótico (DNF) do veneno de *L. intermedia* foi produzido no Setor de Imunização e Sangria do CPPI, Piraquara – PR, em condições ideais de saneamento e alimentação.

Inicialmente, o veneno total de *L. intermedia* foi submetido à cromatografia por gel filtração utilizando-se como fase sólida Sephadex G-100 como descrito por Barbaro *et al.* (1994). O eluato foi recromatografado utilizando-se uma coluna de troca iônica (1,6 x 35,5 cm²) com fase sólida de carboximetil celulose (CM52). Como eluente, foi utilizado acetado de amônio 20 mmol/l, pH 4,7 em gradiente linear de cloreto de sódio variando de 0 a 700 mmol/l a um fluxo de 30 ml/h. Cada uma das frações foi testada quanto à atividade dermonecrótica no dorso de coelhos após injeção intradérmica.

O eluato contendo as proteínas dermonecróticas foi utilizado na imunização de um cavalo adulto cujo protocolo está descrito em Chávez-Olortegui *et al.* (1998) com algumas modificações relatadas a seguir.

3.2.1.1 Imunização do cavalo com DNF

Após retirada do sangue pré-imune, o cavalo recebeu uma injeção subcutânea de uma emulsão feita com PBS 0,05 mol/l pH 7.4 e adjuvante completo de Freund contendo 150 µg da fração dermonecrótica.

As três imunizações subsequentes foram feitas em intervalos de 15 dias, sendo desta vez utilizado o adjuvante incompleto de Freund. Uma semana após a última injeção, o cavalo foi sangrado e o soro retirado e congelado.

3.2.2 PRODUÇÃO DOS ANTICORPOS MONOCLONAIS

3.2.2.1 Imunização dos camundongos BALB/c

Cinco camundongos BALB/c fêmeas foram imunizados, inicialmente, por via subcutânea com uma emulsão preparada com 10 µg de veneno total da aranha *Loxosceles intermedia* diluídos em PBS e adjuvante completo de Freund em diluição 1:2.

Após três semanas, cada um dos camundongos recebeu uma injeção via intraperitoneal com uma emulsão em diluição 1:2 que continha 10 µg de veneno total diluídos em PBS e adjuvante de Freund, desta vez, incompleto.

A terceira imunização ocorreu dez dias após, na qual os camundongos receberam nova injeção intraperitoneal contendo 20 µg da peçonha loxoscélica.

Após dez dias, testou-se a reatividade do soro destes animais em um ELISA. Os camundongos cujos soros, em diluição 1:100, apresentaram absorbâncias superiores a 1.0 receberam uma última dose via endovenosa com 5 µg de veneno total diluídos em 100 µl de PBS.

3.2.2.2 Obtenção dos hibridomas

Células sp2/0 foram descongeladas e mantidas em estufa de 37°C em atmosfera de CO₂ de 5%, em meio DMEM 10 (Dulbecco's Modified EAGLES Medium suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 µmol/l de L-glutamina, 100 UI penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina) de forma a se obter um número de células ideal para a fusão (1 x 10⁷ células/ml).

Três dias após a última imunização os camundongos foram sangrados. O camundongo com maior título no ELISA foi sacrificado e seu baço removido assepticamente. O tecido foi transferido para uma placa de Petri estéril contendo 5 ml de meio DMEM e cortado em pequenos fragmentos que foram macerados sobre uma tela de malha fina esterilizada. O material foi passado por uma segunda tela e lavado três vezes com DMEM utilizando-se uma centrífuga refrigerada a 1000 rpm por 10 minutos.

As células de mieloma, repicadas 24 horas antes, foram lavadas conforme descrito anteriormente, diluídas a 1 x 10⁷/ml, misturadas a todas as células obtidas com a maceração do baço e centrifugadas a 1000 rpm e 4 °C por 10 minutos.

Ao sedimento adicionou-se, lentamente, 1 ml de uma solução de polietilenoglicol (PEG) 1500 a 50% (p/v) em DMEM pré-aquecido à 37 °C, agitando-se lentamente o tubo por alguns minutos. Após 1 minuto de repouso foram adicionados 20 ml de DMEM divididos em quatro intervalos de 5 minutos agitando-se lentamente.

As células foram centrifugadas a 4 °C, 800 rpm por 10 minutos e ao precipitado foram adicionados 100 ml de meio seletivo HAT (hipoxantina, aminopterina e timidina) e DMEM suplementado com 20% de soro fetal bovino.

A suspensão final foi distribuída em placas de 96 poços (200 µl/poço) que foram levadas à estufa à 37°C e atmosfera de CO₂ a 5%.

Cinco dias após a obtenção dos hibridomas, o sobrenadante dos poços foi testado em ELISA utilizando-se 5 µg/ml de veneno total de *Loxosceles intermedia* e/ou da fração dermonecrótica purificada, sendo a reatividade verificada com a incubação de imunoglobulina (IgG) específica para camundongo conjugada à horseradish peroxidase (HPO).

3.2.2.3 Seleção e clonagem dos hibridomas

As placas para a clonagem foram previamente preparadas com 100 µl de meio DMEM contendo macrófagos intraperitoneais de camundongos não imunizados. Após contagem das células, a solução de origem foi diluída em meio HT-DMEM suplementado com 20% de soro fetal bovino de forma a se ter uma única célula em cada um dos poços previamente preparados.

Após a segunda clonagem, uma nova seleção por ELISA foi realizada utilizando-se a proteína dermonecrótica recombinante LiD1 (Kalapothakis, 2002) em concentração de 20 µg/ml. Foram selecionados 13 clones positivos os quais foram amplificados e testados em *Western Blotting*.

3.2.2.4 Produção de líquido ascítico

Dez camundongos BALB/c foram inoculados com 0,5 ml de óleo mineral por via intraperitoneal. Sete dias após, cada animal foi inoculado com aproximadamente 106 a 107 hibridomas. Após alguns dias, os camundongos que apresentaram o abdômen aumentado, tiveram o líquido ascítico colhido através de punção no abdômen utilizando-se uma agulha 40x12 mm. Coletas subsequentes foram feitas enquanto houvesse a presença de ascite.

Os líquidos ascíticos foram centrifugados a 8000 rpm por 10 min e o sobrenadante armazenado em freezer -20 °C.

3.3 CARACTERIZAÇÃO DOS ANTICORPOS MONOCLONAIS

3.3.1 GEL SDS-PAGE, ELETROTRANSFERÊNCIA E IMMUNOBLOTTING

Para que fosse possível a caracterização do perfil da reatividade dos anticorpos monoclonais frente ao veneno de *L. intermedia*, assim como o estudo da reatividade cruzada do anticorpo monoclonal 7 (LimAb7) com outros venenos, utilizou-se a técnica de *Western Blotting* descrita a seguir.

O LimAb7 foi escolhido nos ensaios posteriores por apresentar, dentre os outros 12 anticorpos selecionados, a maior absorvância no teste de seleção através de

ELISA (dados não mostrados). Detalhes sobre as principais características deste anticorpo, bem como de sua capacidade neutralizante do veneno de *L. intermedia*, estão descritos no artigo: Alvarenga *et al.*, 2003 “Production of monoclonal antibodies capable of neutralizing dermonecrotic activity of *Loxosceles intermedia* spider venom and their use in a specific immunometric assay”, em anexo.

Gel SDS-PAGE

Dois géis em concentração de 10% de acrilamida (Laemmli, 1970) foram preparados para a migração dos venenos em presença de 10% dodecil sulfato de sódio (SDS) em sistema BioRad. Para ambos os géis utilizaram-se 20 µg por canaleta dos venenos de *L. intermedia* e, para o segundo utilizou-se *L. gaucho*, *L. laeta* (do Brasil e do Peru), *Tityus bayensis* e *serrulatus*, *Apis meliferis*, *Crotalus terrificus*, *Bothrops atrox*, *L. muta muta* e *Phoneutria nigriventer*. Estas amostras foram adicionadas ao tampão de amostra em condições não redutoras (Tris-HCl 0,5 mol/l, pH 6.8, glicerol 10%, SDS 10% (p/v) e azul de bromofenol 0,1% (p/v)) e fervidas por 3 minutos.

A migração aconteceu utilizando-se tampão de migração (Tris 0,025 mol/l, glicina 0,2 mol/l e SDS 0,5% , pH 8.3) sob voltagem de 100 V.

Eletrotransferência

As proteínas do gel foram eletrotransferidas para membrana de nitrocelulose de 0,22 µm (Towbin, 1979) em sistema BioRad Mini-Protean II cell corrente de 24 V durante 16 horas e, posteriormente, por mais uma hora a 48 V em tampão de transferência com pH 8,3 contendo glicina 0,2 mol/l, Tris 0,025 mol/l e metanol 20% (v/v).

Immunoblotting

Após a eletrotransferência, a presença das proteínas foi certificada mergulhando-se a membrana de nitrocelulose em solução de Ponceau 0,2% e 10% de ácido acético.

Após visualização das bandas, a membrana foi lavada em tampão PBS-Tween (PBS-T) 0,05% por três vezes de 5 minutos e, posteriormente, bloqueada com tampão PBS-T 0,3%, por 1 hora, sob agitação e à temperatura ambiente.

Após o bloqueio, a membrana foi lavada por três vezes e, para o primeiro *immunoblotting*, incubada com o líquido ascítico de camundongos contendo o LimAb7 em diluição 1:100 em PBS-T 0,05% e o soro de camundongo antiveneno total em diluição 1:500 como controle positivo. No segundo experimento, as membranas foram incubadas com IgGs LimAb7 purificadas em coluna de proteína A (Amersham Biotech) em concentração de 10 µg/ml e, como controle positivo utilizou-se IgG de camundongo específico para o veneno total em diluição 1:1000. As membranas foram incubadas a temperatura ambiente por 1 hora sob agitação.

Após três lavagens com PBS-T, as membranas foram incubadas por 1 hora à temperatura ambiente e, sob agitação, com anticorpos conjugados à peroxidase. Nas membranas em que foram utilizados o LimAb7 empregou-se o anticorpos de cabra específicos para IgG de camundongos (A 4416 – Sigma) em diluição 1:2000 e nos outros casos, conjugados à HPO específicos para coelho diluídos em PBS-T 0,05% produzidos no laboratório de Imunoquímica de Toxinas.

Após quatro lavagens, sendo as duas primeiras com PBS-T 0,05% e as duas últimas com PBS, a presença da peroxidase foi revelada com uma solução de PBS contendo 0,025% de 4-cloro 1-naftol diluído em 1 ml de metanol, 0,05% de diaminobenzidina (DAB) em presença de H₂O₂ 0,04%(v/v).

3.4 PURIFICAÇÃO DO VENENO TOTAL DE *L. intermedia* POR COLUNA DE AFINIDADE

Com o propósito de se obter proteínas do veneno total de *L. intermedia* reconhecidas pelo LimAb7, uma coluna de afinidade (Young *et al.*, 1975) foi preparada como descrito por Moura *et al.* (2003) conjugando-se LimAb7 à Sepharose 4B® ativada com brometo de cianogênio.

3.4.1 MONTAGEM DA COLUNA DE AFINIDADE

Um grama e meio de Sepharose 4B® ativada com brometo de cianogênio (Sigma, C-9192) foi expandido com uma solução de HCl 1 mmol/l, por 15 minutos, sendo cada grama desta fase sólida equivalente a 3,5 ml de gel.

Após centrifugação por 10 min a 5.000 rpm e à temperatura de 4° C, o gel foi lavado com tampão de ligação (NaHCO₃ 0,1 mol/l, NaCl 0,5 mol/l, pH 8,3). Nesta etapa, o bromo do brometo de cianogênio é retirado, e o cianogênio (-CN) ligado à fase sólida está ativado de forma a reagir com a carboxila da proteína adicionada, formando uma ligação covalente.

A seguir, um pequeno volume de tampão de ligação foi deixado no tubo e 15 mg de LimAb7 foram dissolvidos no gel que ficou sob agitação leve, por 2 horas, à temperatura ambiente.

O gel foi colocado em uma coluna e o sobrenadante separado com a finalidade de se verificar o percentual de ligação das IgGs ao gel. Os grupos que permaneceram ativos foram bloqueados por duas horas à temperatura ambiente com adição de glicina 0,2 mol/l, NaCl 0,5 mol/l, pH 8,0.

Posteriormente, o gel foi submetido a lavagens alternadas com aumento e redução de pH em cinco ciclos, descritos abaixo:

Redução de pH: 40 ml de tampão acetato 0,1 mol/l em 0,5 mol/l de NaCl, pH 4,0;

Aumento de pH: 40 ml de tampão bicarbonato 0,1 mol/l em 0,5 mol/l de NaCl, pH 8,3;

Finalmente, a coluna foi lavada por duas vezes com PBS 0,05 mol/l, pH 7.4 e guardada em geladeira com a adição de azida sódica 0,05%.

3.4.2 PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECONHECIDAS PELO LIMAB7

Após lavagem da coluna de afinidade com PBS 0,05 mol/l pH 7.4 para retirada da azida sódica, dois miligramas do veneno total de *L. intermedia* foram diluídos em 5 ml de PBS e incubados durante 16 h à 5°C sob agitação, na presença de um inibidor de proteases Roche (Cat. 1836153).

Após a incubação, o sobrenadante foi retirado e a coluna lavada com PBS até que a absorbância do eluato atingisse a leitura basal.

As proteínas que foram reconhecidas pelo LimAb7 ficaram retidas na coluna e foram eluídas utilizando-se uma solução de glicina 0,1 mol/l NaCl 0,15 mol/l pH 2,8. O eluato foi neutralizado com tampão Tris/HCl 1 mol/l pH 8,0 e posteriormente dialisado contra PBS.

3.5 ELETROFORESE BIDIMENSIONAL

Esta etapa do trabalho foi desenvolvida no laboratório, sob direção do Prof. Dr. Claude Granier, pertencente à faculdade de Farmácia da Universidade de Montpellier II durante o estágio originado a partir do convênio CNPq/INSERM e da colaboração existente entre o laboratório brasileiro e francês.

Todas as etapas, desde a preparação das soluções até a lavagem da vidraria foram realizadas com a utilização de luvas para evitar contaminações com queratina.

3.5.1 MIGRAÇÃO EM PRIMEIRA DIMENSÃO – ISOELETROFOCALIZAÇÃO (IEF)

Esta primeira fase foi realizada sobre géis com gradientes de pH imobilizados sobre *strips* (finas fitas de plástico) *Immobiline DryStrips Gels* (Pharmacia Biotech) de tamanho constante (7 ou 18 cm), com o intervalo de pH determinado não linear (3-10) utilizando-se o aparelho IPGphor (Pharmacia Biotech) que permite a aplicação de alta voltagem

Preparo das amostras

As amostras ficaram sob agitação durante 30 minutos em agitador rotatório a 20 rpm para completo descongelamento. Posteriormente, as mesmas foram agitadas em vortex e diluídas em:

✓ 125 µl de tampão IEF (isoeletrofocalização), 10 mg/ml de DTE (ditioeritritol) e 1% (1,25 µl) de tampão IPG (gradiente de pH imobilizado) para as *strips* de 7 cm

✓ 350 µl de tampão IEF, 10 mg/ml de DTE e 1% (3,5 µl) de tampão IPG para as *strips* de 18 cm

Após a adição do tampão, as amostras ficaram sob agitação durante 1 h em agitador rotatório a 20 rpm. Utilizaram-se 200 µg de veneno total para a coloração por azul de Coomassie e 100 µg para coloração por prata.

A técnica de coloração do gel a ser utilizada depende da quantidade de proteína utilizada. As diferentes colorações possíveis (azul de Coomassie ou prata) apresentam sensibilidades diferentes e a quantidade de amostra necessária é também variável.

Preparo da Isoeletrofocalização

Após o preparo, as amostras foram pipetadas no centro dos sarcófagos em volume de 125 µl ou de 350 µl dependendo do tamanho da *strip* a ser utilizada. As *strips* foram posicionadas sobre as amostras, sendo o gel colocado em contato com as proteínas.

Após 10 minutos de repouso, adicionou-se óleo mineral para evitar a evaporação da amostra e a cristalização da uréia:

- ✓750 µl de óleo mineral (Drystrip cover fluid) para as *strips* de 7 cm
- ✓1,5 ml de óleo mineral (Drystrip cover fluid) para as *strips* de 18 cm

Os sarcófagos foram posicionados no aparelho IPGphor sendo colocada a parte superior mais no alto do aparelho respeitando as marcas em função do tamanho das *strips*. Programou-se a migração a 20°C e 50 µA/*strip*

Reidratação das *strips*

As *strips* foram reidratadas através da migração passiva durante 4 h (sem corrente) e ativa durante 12 h a 30 V.

Programou-se o IPGphor (Pharmacia Biotech) para término da migração como descrito a seguir:

<i>Strips</i> de 7 cm		<i>Strips</i> de 18 cm	
Voltagem	Tempo	Voltagem	Tempo
500 V	30 min	500 V	1 h
1000 V	30 min	1000 V	1 h
8 000 V em gradiente	1 h	8 000 V em gradiente	2 h
8 000 V até 16 000 Vh		8 000 V até 40 000 Vh	≈ 5 h
Total : 20 000 Vh (Volts/hora)		Total : 50 000 Vh (Volts/hora)	

Quadro 3 – Programação do aparelho IPGphor

Equilíbrio das *strips*

O equilíbrio deve ser feito antes da colocação das strips sobre o gel da segunda dimensão. Nesta fase o gel já deve estar pronto.

As *strips* foram retiradas do sarcófago e equilibradas utilizando-se tampão de equilíbrio (Tris/HCl 50 mmol/l pH8,8; uréia 6 mol/l, glicerol 30% (v/v), SDS 2% (p/v), azul de bromofenol 0,001% (v/v) contendo 65 mmol/l DTT (Ditiotreitol) durante 10 min sob agitação horizontal. Posteriormente, as *strips* foram mergulhadas em um novo tampão de equilíbrio contendo 13,5 mmol/l de iodoacetamida durante 10 minutos sob agitação. A solução contendo iodoacetamida foi, posteriormente, colocada em um béquer e inativada com 2,5 mg/ml de cisteína antes de ser jogada na pia e a solução de DTT armazenada em frasco apropriado para descarte.

3.5.2 MIGRAÇÃO EM SEGUNDA DIMENSÃO - GEL SDS-PAGE

A migração protéica em segunda dimensão foi feita utilizando géis de SDS-PAGE a 12%.

Preparo do padrão de massas moleculares

Pequenos quadrados de papel IEF foram embebidos nas soluções de padrão de massas moleculares com volume de:

- ✓ 10 µl/papel para as *strips* de 7 cm e 50 µl de agarose (0,8%).
- ✓ 20 µl/papel para as *strips* de 18 cm e 50 µl de agarose (0,8%)

Preparo dos géis e das cubas de eletroforese

O tampão de migração (Tris 0,025 mol/l, glicina 0,2 mol/l e SDS 0,5%, pH 8.3) foi preparado e colocados na cuba de eletroforese para homogeneização, mantendo-se a temperatura de 10 °C.

As placas foram lavadas e limpas com etanol e montadas em cuba especial para tal finalidade.

A solução de gel a 12% foi adicionada à cuba e posteriormente, antes de sua polimerização, adicionaram-se 150 ml de gel de elevação que permite o preenchimento total das placas por diferença de densidade.

Delicadamente, 750 µl/gel de n-butanol foram adicionados para linearizar a superfície do gel.

Posicionamento das strips

Após solidificação da agarose, os padrões de massas moleculares foram colocadas em contato com o gel, convencionalmente, à esquerda.

Após lavar a strip no tampão de migração, a fita foi posicionada tendo lado plástico colocado contra a placa de vidro o lado ácido à esquerda, do mesmo lado do marcador do padrão de massa molecular.

Migração dos géis

Para os pequenos géis utilizou-se o sistema de eletroforese BioRad convencional. A migração foi feita inicialmente a 30V por 30 minutos e posteriormente, 200 V até o azul de bromofenol atingir o final do gel.

Para os grandes géis, a migração ocorreu com voltagem de 200V até o azul de bromofenol atingir o final do gel (aproximadamente 14 horas).

Coloração e recorte dos spots

Cada coloração dos géis é feita por uma sucessão de banhos cronometrados e sob agitação leve de forma a garantir a reprodutibilidade.

Os volumes das soluções foram padronizados:

- ✓ 100 ml de solução/gel, para as *strips* de 7 cm.
- ✓ 250 ml de solução/gel para as *strips* de 18 cm

Após a coloração os géis foram escaneados e aqueles corados com Azul de Coomassie, com a ajuda de um software, foram analisados, os spots recortados e congelados a -80°C para posterior análise por espectrometria de massa.

Coloração por prata

Etapa	Descrição	Soluções	Banhos	Duração
1	Fixação	Etanol 40% - ácido acético 10%	3	30 min
1'	Fixação	Etanol 20%	1	10 min
2	Lavagem	Água Milli-Q	1	10 min
3	Sensibilização	Ditionito de sódio 0,3 g/l	1	1 min
4	Lavagem	Água milli-Q	2	1 min
5	Coloração	Nitrato de prata 2,5%	1	40 min
6	Lavagem	Água milli-Q	1	10 a 20 s
7	Revelação	Carbonato de potássio 30g/l, formaldeído 250 $\mu\text{g/l}$, tiosulfato de sódio 10mg/l.	1	10 min
8	Interrupção	Tris 40g/l, ácido acético 2%	1	30 min
9	Conservação	Etanol 20%	1	Max. 1 ano

Quadro 4 – Descrição dos passos para coloração de gel bidimensional por prata.

Coloração por Azul de Coomassie

Etapa	Descrição	Soluções	Banhos	Duração
1	Fixação	Ácido ortofosfórico 2 %, etanol 30%	3	30 min
1'	Fixation	Ácido ortofosfórico 2 %	3	10 min
1''	Fixação	Ácido ortofosfórico 2 %, etanol 18%, sulfato de amônio 12 %.	1	30 min
2	Coloração	Azul de Coomassie 2 %	1	5 dias
3	Conservação	Sulfato de amônio 25 %	1	Max 1 ano

Quadro 5 – Descrição dos passos de coloração de gel bidimensional pelo azul de Coomassie

3.5.3. WESTERN BLOTTING DOS GEIS BIDIMENSIONAIS

3.5.3.1 Eletrotransferência

Dois géis bidimensionais contendo 200 µg do veneno de *L. intermedia* foram eletrotransferidos para uma folha de papel de nitrocelulose 0,22 µm (Towbin, 1979) durante 1 hora e meia a 400 mA.

3.5.3.2 Immunoblotting

O procedimento de lavagem e bloqueio das membranas de nitrocelulose foi feito conforme descrito no item 3.2.3.1.

Incubação com anticorpos

Após o bloqueio, as duas membranas foram lavadas por três vezes com PBS-T 0,05% e, para o primeiro immunoblotting, uma das membranas foi incubada com uma mistura de todas as IgGs, purificadas por coluna de proteína A (Pharmacia Biotech), correspondentes aos anticorpos monoclonais, com exceção do LimAb7 e do LimAb 1, em concentração de 10 µg/ml durante 1 hora à temperatura ambiente. A segunda membrana foi incubada da mesma maneira com uma concentração de 5 µg/ml do LimAb7.

Incubação com o conjugado

Após três lavagens com PBS-T 0,05%, as membranas foram incubadas por 1 hora à temperatura ambiente e, sob agitação, com anticorpos anti camundongo conjugados à peroxidase (A 4416 – Sigma) em diluição 1:2000.

Revelação

Após quatro lavagens com PBS-T 0,05% a presença da peroxidase foi revelada utilizando-se o sistema de quimioluminescência empregando-se o sistema ECL (Pharmacia Biotech).

3.6 INIBIÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA DO VENENO DE *L. intermedia* PELO LIMAB7

Uma das ações características do veneno de aranhas do gênero *Loxosceles* é a indução de hemólise dependente de complemento (Futrel *et al.*, 1979; Tambourgi *et al.*, 1998). Sendo o LimAb7 neutralizante da ação dermonecrótica da peçonha da espécie *L. intermedia* (Alvarenga *et al.*, 2003), avaliou-se a capacidade do mesmo em inativar a hemólise desencadeada por este veneno utilizando-se uma técnica *in vitro* (Oliveira-Lima & Dias-da-Silva, 1970) com algumas modificações conforme descrito abaixo:

3.6.1 ENSAIO HEMOLÍTICO

Inicialmente, duplicatas de 400, 200, 100 e 50 µg de LimAb7 diluídos em 200 µl em de tampão TBS-gel (Trietanolamina 0,025 mol/l, MgSO₄ 5x10⁻⁴ mol/l, CaCl₂ 1,5x10⁻⁴ mol/l, gelatina 0,05%, pH 7.4) foram incubadas com 5 µg de veneno total de *L. intermedia* durante 1 h à 37 °C sob leve agitação, correspondendo à razão veneno: anticorpo de 1:16, 1:8, 1:4 e 1:2. Como controle positivo, sob as mesmas condições, 5 µg de veneno foram incubados com o antiveneno polivalente, em diluição 1:200, produzido em cavalo, gentilmente cedido pelo CPPI, Piraquara, PR. Soro normal de cavalo em diluição 1:200 e IgG irrelevante de camundongo (400 µg) foram utilizados como controles negativos.

Paralelamente à primeira incubação, hemácias de doadores de grupo sanguíneo ORh+ foram coletadas em heparina, lavadas e diluídas em tampão TBS-gel até obtenção da concentração de 5x10⁸ células/ml. Para tanto, 100 µl desta suspensão de eritrócitos foi diluída em 2,4 ml de água destilada e a absorbância lida a 541 nm. O resultado foi utilizado na equação abaixo com a finalidade de se determinar o volume para o qual a suspensão inicial deveria ser diluída para se obter a concentração desejada:

$$\text{Volume final} = \frac{\text{Vol. Inicial} \times A_{541 \text{ nm}}}{0,210}$$

Após a diluição as células foram mantidas em gelo até o uso, momento no qual 200 µl destas hemácias foram adicionadas às duplicatas que foram incubadas por mais 1 hora à 37 °C sob leve agitação.

A seguir, a suspensão de eritrócitos foi lavada com o tampão TBS-gel por cinco vezes utilizando-se centrifugação de 1600 rpm por cinco minutos.

Logo após, as hemácias foram ressuspensas em 400 µl de TBS-gel e incubadas por 1 h à 37 °C com 100 µl de soro proveniente do mesmo doador dos eritrócitos. Após a incubação, as duplicatas foram centrifugadas e o sobrenadante submetido à leitura de absorbância a 541 nm.

Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição de lise tendo como base os valores de hemólise (100%) e de ausência de lise (0%) conseguidas com o veneno total (ausência de anticorpos) e com neutralização obtida com o soro polivalente de cavalo, respectivamente.

3.7 NETRALIZAÇÃO DA ATIVIDADE ESFINGOMIELINÁSICA DO VENENO DE *L. intermedia* PELO LIMAB7

A enzima SmaseD possui a propriedade de hidrolisar a esfingomielina (N- acil-esfingosilfosforilcolina) a ceramida (N-acil- esfingosina) e fosforilcolina (Gõni *et al.*, 2002). Através de um ensaio colorimétrico (Gatt *et al.*, 1978), utilizando-se o substrato comercial TNPAL- (ácido trinitrofenilaminoláurico) sphingomyelin (Sigma), avaliou-se a capacidade do LimAb7 em neutralizar in vitro a atividade esfingomielinásica do veneno de *L. intermedia*, conforme o relatado por Gatt *et al.* (1978) com algumas modificações descritas a seguir.

3.7.1 ENSAIO DE NEUTRALIZAÇÃO DA ATIVIDADE ESFINGOMIELINÁSICA *IN VITRO*

Inicialmente, incubou-se, sob agitação de 500 rpm durante 1 h e à 37 °C, 200 µg de LimAb7 com 5 µg de veneno total de *L. intermedia* diluídos em 100 µl de tampão

PBS 0,05 mol/l pH 7.4, correspondendo à razão 1:16 (mol/l) de veneno em ralação ao anticorpo. Posteriormente, 16 μ M de TNPAL-*sphingomyelin* diluídos em 100 μ l de tampão Tris-HCl, pH 7.4, 0.1% Triton X-100 e 0,02 M $MgCl_2$ foram adicionados à solução anterior que foi novamente incubada por 30 min., utilizando-se um *Thermomixer* em agitação de 1.000 rpm. A reação foi interrompida por adição de 750 μ l de uma mistura de isopropanol/heptano/5% M H_2SO_4 (40:10:1).

A próxima etapa consistiu da adição de 400 μ l de heptano e 400 μ l de água. A solução foi homogeneizada em vórtex e centrifugada por 10 min a 3000 g de forma a separar as duas fases. Posteriormente, a absorbância da fase orgânica foi obtida a 330 nm.

Nas mesmas condições, foi incubado o antiveneno polivalente CPPI utilizado na terapia nas diluições de 1:200, 1:20 e 1:2 (v/v) e, como controle negativo, um anticorpo monoclonal irrelevante.

Os resultados foram expressos em porcentagem de neutralização tendo como base os valores conseguidos com o veneno total (ausência de anticorpos).

3.8 MÉTODO DE SPOT-SYNTHESIS

A técnica de síntese múltipla de peptídeos paralelos sobre membrana de celulose (Frank, 1992) – Spot synthesis - vem sendo utilizada há algum tempo para o mapeamento de sítios de interação em vários sistemas, entretanto, a aplicação desta metodologia no mapeamento de epitopos em toxinas de animais peçonhentas foi recentemente descrita (Chavez-Olortegui *et al.*, 2002; Alvarenga *et al.*, 2002; Machado de Ávila *et al.* 2004; Mendes *et al.*, 2004).

Desta forma, tendo como base o caráter neutralizante da atividade dermonecrótica do veneneno total de *L. intermedia* e reatividade contra à proteína recombinante LiD1 (Kalapothakis *et al.*, 2002), de anticorpos anti-fração dermonecrótica e do LimAb7; peptídeos de 15 e 25 aminoácidos, sobrepostos de três em três e de dois em dois, respectivamente, foram sintetizados sobre uma membrana de celulose a partir da sequência primária da LiD1 utilizando-se o equipamento Abimed *Spot Synthesis*–ASP222, Langenfeld – Alemanha.

3.8.1 SÍNTESE DE PEPTÍDEOS SOBRE MEMBRANA DE CELULOSE

Uma membrana de celulose Intavis (Bergisch Gladbach, Alemanha), suporte para síntese disponível comercialmente, contendo grupamentos hidroxila conjugados ao espaçador polietilenoglicol (PEG) ligado a um aminoácido Fmoc, é inicialmente ativada com uma lavagem de 10 min com uma solução de piperidina 20% em N,N'-dimetilformamida (DMF). A piperidina promove a clivagem do grupamento Fmoc e, conseqüentemente, desprotege a porção N-terminal.

Após três lavagens da membrana com DMF, a remoção da piperidina é monitorada com a posterior lavagem com azul de bromofenol 0.005% (p/v) em DMF. Nesta etapa, os grupamentos amino livres se colorem (azul) somente após total remoção da piperidina.

Posteriormente à desproteção e lavagem, o suporte está pronto para o acoplamento com o primeiro aminoácido que deve ter seu grupo carboxi ativado. Para tanto, 50 µl de uma solução 1,2 mol/l de diisopropilcarbodiimida (DIPC) e 50 µl de 1,2 mol/l de 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) são adicionados previamente a 100 µl de uma solução 0,6 mol/l do aminoácido Fmoc. Como a arginina é um aminoácido muito instável, sua solução deve ser renovada a cada ciclo, portanto, utiliza-se a metade dos volumes descritos. Esta reação formará um éster que reagirá rapidamente com o grupo amino livre propiciando o alongamento da cadeia peptídica.

Seguindo a programação computacional, cada aminoácido Fmoc com sua porção carboxi ativada é adicionado ao *spot* correspondente. Após o acoplamento, a membrana é retirada do aparelho e lavada três vezes com DMF. Os grupos amino livres, ou que não reagiram, são acetilados lavando-se o suporte com anidrido acético 10% (v/v) em DMF por 10 min ou até total descoloração do *spot*. A acetilação previne a clivagem prematura dos grupos Fmoc pelas impurezas presentes na solução de DMF. O excesso de anidrido acético é retirado após três lavagens da membrana com DMF.

O ciclo recomeça com a retirada do grupo protetor Fmoc do aminoácido inicialmente acoplado após lavagem do suporte com piperidina 20% (v/v) em DMF, depois com azul de bromofenol, posteriormente com metanol. A membrana retorna ao sintetizador para acoplagem do próximo aminoácido ativado após secagem usando-se ar frio.

No último ciclo, a desproteção com piperidina é realizada anteriormente à acetilação com anidrido acético 10% (v/v) em DMF. Após lavagem da membrana com

DMF, os grupos laterais dos aminoácidos, inicialmente protegidos, são clivados durante 1 h pela adição de ácido trifluoracético (TFA) e diclorometano na proporção de 1:1 (v/v) contendo 2,5% de trietilsilane. A membrana está pronta após três lavagens com diclorometano seguidas por três com DMF, por outras três com ácido acético 1% em água e finalizando com três lavagens com metanol.

As membranas cujos peptídeos devem ser ciclizados são mantidas sob incubação durante 16 horas em PBS, contendo 10% de DMSO (dimetilsulfóxido) de forma a oxidar as cisteínas para formação da ponte dissulfeto.

Após o uso, cada membrana é lavada com metanol, seca à temperatura ambiente e armazenada a -20°C .

3.8.2 REATIVIDADE DOS ANTICORPOS FRENTE AOS PEPTÍDEOS SINTÉTICOS LINEARES

A reatividade dos peptídeos sintéticos frente aos anticorpos policlonais anti DNF e ao LimAb7 foi avaliada através de ensaios colorimétricos os quais possuem a vantagem de poderem ser reproduzidos por até 70 vezes, caso o uso seja com anticorpos monoclonais. A técnica de *Spot* permite a identificação e o mapeamento de epitopos contínuos de maneira eficiente e rápida seguindo o protocolo descrito a seguir:

3.8.2.1 Imunoensaios com peptídeos sintetizados sobre membrana

As membranas contendo peptídeos sintéticos correspondentes à proteína LiD1 foram lavadas três vezes com tampão TBS (KCl 0,002 mol/l, Tris 0,05 mol/l em salina, pH 7.4) e incubadas, à temperatura ambiente, sob agitação, por 16 horas com solução de bloqueio (Genosys) diluído 1:20 em TBS-Tween 20 0,1% (TBS-T) contendo 0,5% de sacarose. Após bloqueio, as membranas foram lavadas com TBS-T e incubadas com 10 $\mu\text{g/ml}$ de LimAb7 ou com soro de cavalo anti proteína dermonecrótica em diluição 1:3000, à 37°C , sob agitação durante 90 minutos.

Após três lavagens com TBS-T, foram adicionados os conjugados anti camundongo ou anti cavalo, ambos em diluição 1:2.000 conjugados à fosfatase alcalina. As membranas foram mantidas sob agitação, à temperatura ambiente por 60 minutos.

Ambas membranas foram lavadas duas vezes com T-TBS e outras duas subsequentes com tampão citrato - CBS (KCl 0,0025 mol/l, NaCl 0,15 mol/l, ácido cítrico 0,01 mol/l, pH 7,0) por 10 minutos, sob agitação e à temperatura ambiente. Posteriormente, a reatividade dos spots foi detectada após adição do substrato para fosfatase alcalina BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indoifosfato) e MTT 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5- (brometo de difeniltetrazolium) em presença de MgCl₂ 1 mol/L.

A reação, interrompida após duas lavagens da membrana com água, pode ser visualizada pela presença de um precipitado azul sobre os peptídeos (spots) reativos. A intensidade da cor foi analisada utilizando-se o *software* Scrimage (Scion Corporation) disponível em www.scioncorp.com.

Regeneração da membrana de *Spot*

Como retratado anteriormente, uma das vantagens da utilização da membrana de Spot é a possibilidade de reutilização da mesma. Para tanto, após avaliação visual e computacional dos Spots reativos, a membrana é regenerada, ou seja, ela é tratada de forma a eliminar a coloração azul proveniente do substrato da fosfatase alcalina e desfazer o complexo antígeno-anticorpo.

Inicialmente, a membrana é lavada com agitação, por dez minutos, com DMF, utilizando-se capela química, por três vezes ou até total eliminação do corante azul. Após duas rápidas lavagens com água destilada, a membrana é lavada, durante 10 minutos, três vezes, com uma solução denominada de reagente A (uréia 8 mol/l, SDS 1% (p/v) e β-mercaptoetanol 0,1% (v/v)). Posteriormente, a membrana é mergulhada por dez minutos em reagente B (etanol/água/ácido acético 5:4:1) por três vezes e, subsequentemente, lavada com metanol. Após secagem a frio, a membrana está pronta para ser bloqueada novamente ou ser armazenada a -20 °C.

3.9 PHAGE DISPLAY

3.9.1 BIOSSELEÇÃO DOS PEPTÍDEOS SOBRE PLACA

A biosseleção foi realizada como descrito por Villard *et al.* (2003) embora com algumas modificações:

Sensibilização da placa

Para os dois primeiros panning, uma placa flexível de 96 poços (Falcon 3912, Becton Dickinson, Oxnard, CA 93030) foi sensibilizada com 5 µg/ml do anticorpo LimAb7 diluído em 10 ml de Coating Buffer autoclavado (NaHCO₃ 100 mmol/l, pH 8,6) durante 12-16 horas a 4° C.

Para o terceiro e último panning utilizou-se 0,5 µg/ml do LimAb7.

Bloqueio da placa e incubação dos fagos

Após a sensibilização, a placa foi lavada 5 vezes com tampão de lavagem (TBS-T 0,05%) e incubada com uma solução de bloqueio (TBS-T 0,05% e BSA 3%), previamente filtrada a 22 µm, por 2 h à 37 °C sob leve agitação.

Após retirada do bloqueio, a placa foi novamente lavada conforme descrito acima e incubada com os fagos filamentosos.

Biopanning 1 - Incubação dos fagos

Para a primeira seleção, $1,5 \times 10^{11}$ *transducing units* (TU) das bibliotecas dos peptídeos randômicos lineares de 15-mer (X₁₅), de 17-mer (X₈CX₈), de 30-mer (X₃₀) e $2,5 \times 10^{10}$ TU da biblioteca conformacional de 12-mer (XCX₈CX) expressos na superfície de proteínas pIII do fago filamentoso F88.4 foram diluídas em 10 ml de TBS-T 0,05% e incubados, durante 16 h à 4° C, na placa previamente sensibilizada com LimAb7.

Obtenção dos fagos por eluição ácida

Inicialmente a esta etapa, em um tubo de 50 ml, um pré-inóculo da cultura das bactérias foi feita utilizando uma colônia da bactéria *E. coli* (cepa K91) em 10 ml de meio LB com crescimento durante 16 h e à 37 °C, sob agitação de 225 rpm. Utilizaram-se 7 ml do pré-inóculo para 110 ml de LB em um erlenmeyer de 500 ml que ficou sob agitação (225 rpm) à 37 °C durante aproximadamente 3 horas ou o equivalente a

absorbância de 1.8 a 550 nm. A rotação foi então diminuída para 50 rpm para formação do pili por 30 minutos.

Após a incubação das bibliotecas de fagos, a placa foi lavada por 10 vezes de 2 minutos com TBS-T 0.5% e posteriormente, com 5 lavagens de 2 minutos com TBS-T 0,05% à temperatura ambiente.

Os vírus reativos ao LimAb7 foram eluídos ao se adicionar aos poços 90 µl do tampão de eluição (glicina 0,1 mol/l pH 2.2/ BSA 1 mg/ml).

Passados os 30 minutos de incubação da placa que ficou sob agitação a temperatura ambiente, transferiu-se o eluato para um tubo de 15 ml que foi neutralizado com tampão Tris-HCl, 2 mol/l, pH 9,0.

Uma alíquota de 20 µl foi guardada a 4 °C para posterior titulação parcial realizada em conjunto com a titulação final.

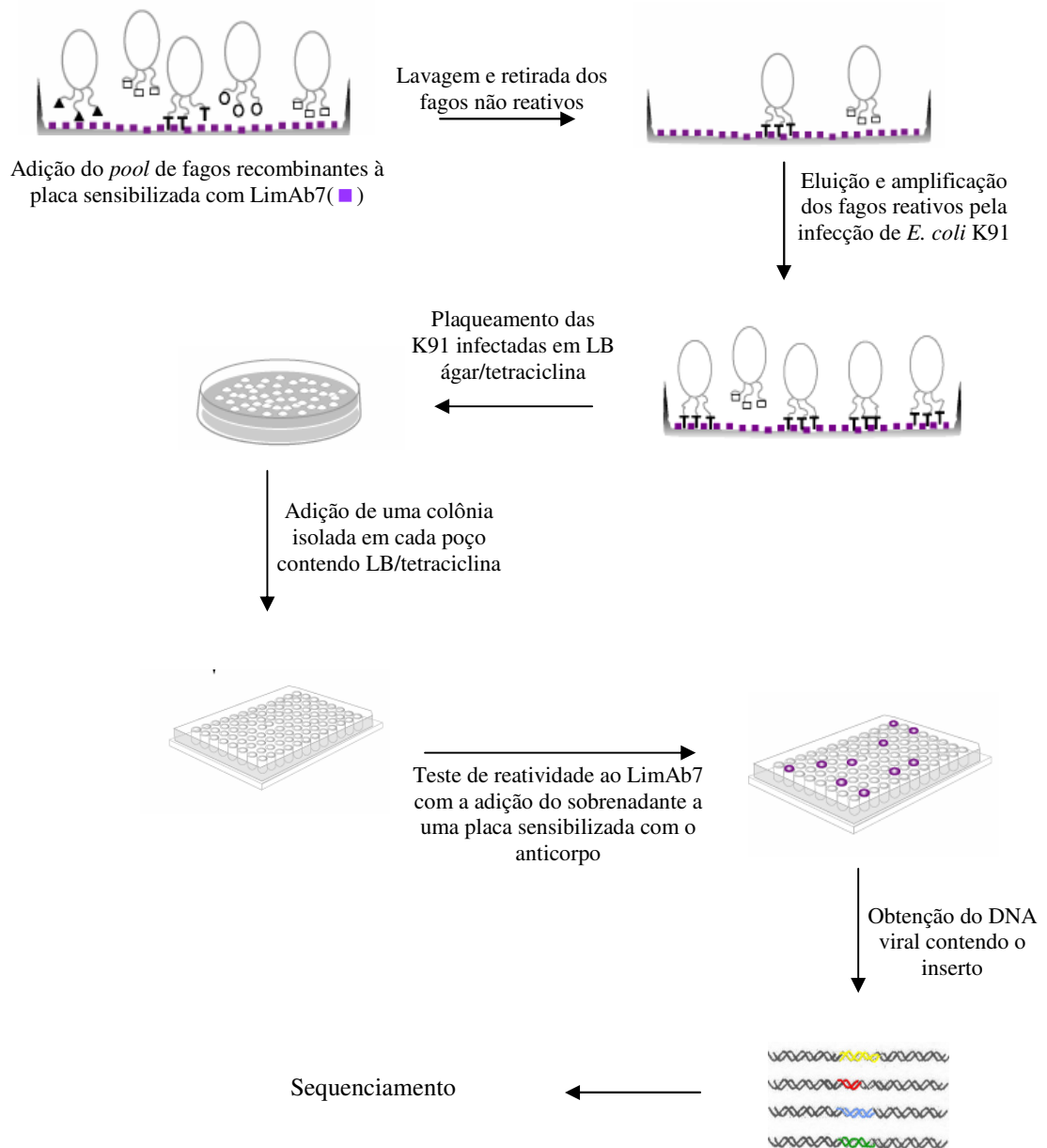
Amplificação

Em 10 ml da solução de bactérias preparadas previamente adicionaram-se 6 ml do eluato contendo os fagos. As células foram incubadas durante 10 minutos à 37 °C sem agitação e posteriormente, adicionadas a 100 ml de meio LB pré-aquecido à 37 °C contendo 0,2 µg/ml de tetraciclina. Após 30 minutos de indução a 225 rpm, ajustou-se a concentração de tetraciclina para 20 µg/ml. O crescimento bacteriano ocorreu durante 16 h à 37 °C e sob agitação de 225 rpm.

Precipitação

A cultura de bactérias contendo os fagos foi colocada em tubo estéril de 250 ml e centrifugada a 4° C a 4000 rpm durante 20 minutos. O sobrenadante contendo os fagos foi transferido a um novo tubo onde foi adicionado 15% de PEG 8000 contendo 20%/NaCl 2,5 mol/l. O conteúdo foi misturado por inversão (100 vezes) e precipitado por 24 h e à 4° C em gelo.

No dia seguinte, a solução de precipitação dos fagos foi centrifugada à 4° C, a 8000 rpm por 40 minutos. O precipitado foi ressuscitado em 3 ml de tampão TBS 50 mmol/l NaCl 150 mmol/l pH 7,5 e a solução transferida para tubos de microcentrífuga e centrifugados 10.000 rpm por 15 minutos para remover os restos celulares.



Fonte: Ilustração modificada a partir do site www.biochem.arizona.edu/miesfeld/teaching/Bioc471-2/pages/Lecture10/Lecture10.html

Figura 5 - Seleção de seqüências peptídicas por phage display. Um pool de fagos M13 recombinantes com fragmentos de DNA aleatórios em seu genoma foram selecionados por afinidade ao LimAb7. Fagos não reativos foram eliminados pelas lavagens e, posteriormente, aqueles que ficaram aderidos ao anticorpo foram eluídos, amplificados pela infecção de bactérias *E. coli* K91, precipitados e submetidos a novo ciclo de seleção. Após três ciclos, bactérias infectadas foram plaqueadas e colônias isoladas foram colocadas em cultura cujo sobrenadante foi testado em um ELISA, sendo o LimAb7 o anticorpo de captura. Clones positivos tiveram seu DNA precipitado e submetido ao sequenciamento.

Titulação

Dez microlitros de cada uma das diluições dos fagos (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-4} e 10^{-8} para a titulação parcial e, 10^{-6} , 10^{-8} , 10^{-10} e 10^{-12} para a titulação final), foram adicionados a 200 μ l de bactérias K91 previamente cultivadas. Incubou-se por 15 minutos à 37 °C sem agitação e mais 15 minutos à 37° C sob agitação de 225 rpm. As células foram então plaqueadas em LB ágar contendo tetraciclina (20 μ g/ml).

No dia seguinte, as colônias foram contadas sendo que cada colônia corresponde a 1 TU/ml ou 20 fagos.

Biopannings 2 e 3

O mesmo procedimento foi seguido para o panning 2 com a exceção de que, 2×10^{11} fagos obtidos com o biopanning 1 foram utilizados na infecção das bactérias K91 e assim, sucessivamente. Para os pannings 3 utilizou-se 0,5 μ g do LimAb7 para a sensibilização da placa.

Elisa para avaliação da evolução da seleção

Utilizou-se a técnica de ELISA para se avaliar a evolução da seleção dos fagos oriundos dos *Bio pannings* 1, 2, 3 e 4. Para tanto uma placa flexível de 96 poços (Falcon 3912, Becton Dicknson, Oxnard, CA 93030) foi sensibilizada com 5 μ g/ml do LimAb7 em Coating Buffer 100 mmol/l pH 8.6, durante 16 h à 4° C.

No dia seguinte, a placa foi lavada 3 vezes com a solução de lavagem (PBS-T 1%) e bloqueada com uma solução PBS-T 1% e 2% de leite em pó desnatado durante 1 hora à 37° C.

Duplicatas de fagos, em concentrações de 10^{10} , 10^9 , 10^8 , 10^7 e 10^6 TU/ml, de cada um dos pannings foram testadas, sendo utilizado como diluente a solução de bloqueio. Como controle positivo do ensaio, utilizou-se o veneno total de *L. intermedia* e como controle negativo, o fago selvagem 10^9 TU/ml. A placa foi então incubada durante 2 horas à 37° C.

Passadas as duas horas de incubação, a placa foi lavada com a solução de lavagem e, posteriormente, adicionou-se o anticorpo anti fago M13 conjugado à

peroxidase em diluição 1:3000 e para o controle positivo, anticorpo anti veneno de *L. intermedia* em diluição 1:1000 utilizando-se como diluente a solução de bloqueio. Incubou-se a placa por 1 h à 37° C.

Após a incubação, a placa foi lavada com solução de lavagem e a revelação foi feita utilizando-se o tampão substrato (citrato trissódico 0,04 mol/l, ácido cítrico 0,01 mol/l e H₂O₂ 0,33% (v/v)) e 0,2 mg/ml de OPD. Após 15 minutos, a reação foi inibida com a adição de 20 µl de H₂ SO₄ 1:20. A leitura foi realizada a 492 nm.

3.9.2 SELEÇÃO DOS CLONES

Após a obtenção de fagos provenientes do panning 3, uma titulação foi realizada conforme descrito acima com a diferença de se utilizar placas grandes de 150 mm para se obter colônias mais isoladas.

Cada uma das colônias foi colocada em um poço de uma placa de cultura contendo 250 µl de meio LB contendo 20 mg/ml de tetraciclina com exceção do poço onde havia somente a bactéria K91 utilizada, posteriormente, como controle negativo. A placa de cultura foi incubada à 37 °C sob agitação durante 16 h.

No dia seguinte, cada um dos sobrenadantes foi testado em duas placas de ELISA previamente sensibilizadas com 5 µg/ml de IgG policlonal de cavalo anti DNF ou com 10 µg/ml do anticorpo policlonal anti M13, seguindo-se o protocolo como descrito acima. Após bloqueio e adição dos sobrenadantes celulares, adicionaram-se 10 µg/ml de LimAb7 que foram detectados pelo anticorpo policlonal específico para IgGs de camundongo conjugado à HPO.

3.9.3 AMPLIFICAÇÃO DOS CLONES SELECIONADOS

Como os resultados do ELISA descrito acima não mostraram clones cuja reatividade se sobressaíssem dos demais, novo ensaio foi realizado nas mesmas condições utilizando-se, desta vez, como anticorpo de captura o policlonal anti M13 e, posteriormente, os fagos, o LimAb7 e o conjugado específico para IgGs de camundongo. Quinze clones com as maiores leituras foram amplificados e seqüenciados.

Isolamento dos clones

Para certificar-se da presença de clones únicos, dez placas foram estriadas a partir de cada poço para obtenção de colônias isoladas. No dia seguinte, cada colônia foi colocada em 10 ml de meio LB tetracina (20 µg/ml) utilizados como pré-inóculo.

Precipitação dos fagos

Seguiu-se o protocolo de centrifugação e precipitação dos fagos conforme descrito anteriormente. Antes da precipitação, uma alíquota das bactérias foi guardada a -20°C em meio LB/glicerol 15%. Posteriormente, os fagos foram ressuspensos em 1 ml de TBS autoclavado para posterior extração do DNA.

3.9.4 PRECIPITAÇÃO DE DNA

Para a precipitação de DNA utilizou-se o protocolo proposto pelo kit Qiagen 27704 QIAprep spin M13 (Qiagen, Hilden, Germany) ligeiramente modificado como descrito abaixo:

Precipitação

Os fagos foram centrifugados a 4.500 rpm por 15 minutos em microcentrífuga. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e foi centrifugado novamente para se evitar a presença de bactérias. A cada um dos tubos adicionaram-se 10 µl do tampão MB precipitation para cada ml da solução de fagos. O tubo foi agitado em vortex, e incubado por 3 minutos à temperatura ambiente.

Obtenção do DNA

Transferiram-se 700 µl da solução precipitada para uma coluna e que foi centrifugada por 7.000 rpm durante 15 minutos. A solução da coluna foi recolhida e refiltrada por mais duas vezes. As centrifugações foram repetidas até que todo o volume

fosse filtrado. Na última centrifugação, descartou-se a solução que fluiu. Posteriormente, adicionou-se à coluna 700 µl do MLB buffer que foi centrifugada por 15 minutos a 7.500 rpm, descartando-se o filtrado. Repetiu-se esta etapa com cada uma das colunas.

Posteriormente, foram adicionados 700 µl de PE wash buffer. As colunas foram centrifugadas por 15 minutos e 7.500 rpm descartando-se o filtrado. Repetiu-se a centrifugação mais uma vez para certificar a total retirada do PE wash buffer.

A parte superior da coluna foi colocada em tubo de microcentrífuga estéril, adicionaram-se 50 µl de água Milli-Q autoclada e previamente aquecida à 50° C. Os tubos foram incubados em banho-Maria por 10 minutos à temperatura de 50° C e, posteriormente, centrifugados por 30 segundos e 7.500 g. O filtrado foi quantificado em gel de agarose 1% e congelado a -20° C.

A quantificação do DNA foi realizada conforme descrito no item 3.11.4.

3.9.5 SEQUENCIAMENTO

O DNA de clones positivos previamente quantificados foram amplificados com o primer reverse 5'-TCG GCAAGC TCT TTT AGG-3' e sequenciados utilizando-se o mesmo programa que será descrito no ítem 3.11.3.2.

Análise do sequenciamento

Após a obtenção dos dados do sequenciamento, os cromatogramas foram avaliados quanto à presença da sequência “CC TTC TGC AGC”, local anterior ao início do inserto aleatório no DNA viral. O final deste inserto está posicionado anteriormente à sequência “GGC AAA”.

Para se ter o resultado da tradução utilizou-se o programa de tradução (Proteomics) disponível no endereço www.expasy.ch, mais precisamente a opção DNA, leitura de tradução de proteína 3' 5', utilizando-se a primeira janela de leitura.

3.9.6 ANÁLISE DA REATIVIDADE DOS PEPTÍDEOS FRENTE AO LIMAB7 POR *DOT BLOT*

De forma a se avaliar a importância da ponte dissulfeto presente nos peptídeos selecionados pela técnica de *phage display*, um Dot Blot foi realizado como descrito a seguir. Após titulação dos fagos, 2×10^{10} TU de três diferentes fagos foram pipetados sobre uma membrana de nitrocelulose utilizando-se um aparelho próprio para *Dot Blot*.

O primeiro deles correspondia à sequência mais frequentemente selecionada pelo LimAb7 (N C N K N D H L F A C W), o segundo a um fago irrelevante contendo duas cisteínas (I C A R Q D P A G N C S) e o terceiro fagos silvestres. A membrana foi deixada durante 1h à 37°C e posteriormente, dividida em duas partes.

Uma delas foi tratada com β -mercaptoetanol 2% (v/v) em PBS 0,05 mol/l pH 8,0 durante 30 min à temperatura ambiente para redução das pontes dissulfeto. A alquilação dos peptídeos foi conseguida após incubação da membrana com iodoacetamida 13,5 mmol/l por 30 min à temperatura ambiente.

Após três lavagens com PBS –Tween 20 0,05%, ambas membranas foram bloqueadas com PBS-Tween 20 0,3% e incubadas com 10 μ g/ml de LimAb7 por 1 h à temperatura ambiente. O excesso de anticorpo foi retirado após três lavagens com PBS-Tween 20 0,05%. Em momento posterior, o anticorpo anti camundongo conjugado à HPO foi adicionado à membrana que ficou sob incubação por 1 h à temperatura ambiente.

A reatividade dos mimotopos foi detectada após duas lavagens com PBS-T 0,05% e outras duas com PBS na ausência de detergente, com a adição de DAB 0,1% (p/v), cloronaftol 0.05% (p/v) diluído em metanol 5% (v/v) e de H₂O₂ 0,03% em PBS 0,05 mol/l, pH 7.4.

3.10 SÍNTESE PEPTÍDICA

3.10.1. PEPTÍDEOS SOLÚVEIS

Após a obtenção da sequência do peptídeo correspondente ao mimotopo do LimAb7, avaliou-se quanto às suas propriedades químicas como, por exemplo, a presença ou não de aminoácidos hidrofóbicos ou hidrofílicos, de características ácidas ou básicas e de aminoácidos capazes de formar pontes dissulfeto.

A síntese de peptídeos requer um suporte sólido insolúvel para o primeiro aminoácido, assim como para os demais a serem acoplados. A resina utilizada nesta síntese foi a Amide Rink 0,73 $\mu\text{mol/g}$ em concentração de 40 $\mu\text{mol/l}$.

Cada aminoácido é comercialmente encontrado com o grupamento amino protegido pelo grupamento Fmoc (9-fluorenilmetiloxycarbonil), caso sua cadeia lateral seja reativa ela estará igualmente protegida por um grupo que deve responder às seguintes exigências: ser adaptado à natureza da cadeia lateral e ser clivado pelo TFA.

Uma vez tendo a resina o seu grupo protetor Fmoc liberado pela piperidina, o último aminoácido da sequência do peptídeo é ligado através da carboxila ao grupamento amina da resina formando uma ligação covalente que é clivada ao final da síntese. A cada aminoácido adicionado, a sua porção N-terminal precisa ser protegida e desprotegida. Após cada desproteção, o grupo amino resultante deve ser convertido em um NH_2 livre após cada desproteção. O próximo aminoácido N-protetido deve ser ativado para ser acoplado à sequência em síntese conforme descrito abaixo:

Teste de qualidade da dimetilformamida

A dimetilformamida (DMF) foi testada com 10 μl de azul de bromofenol a 1% para 1 ml do reagente. A cor amarela significa que solução está adequada, caso fique azul o resultado indica presença de grupos amina livres, o que torna a solução imprópria para o uso.

3.10.2 ATIVAÇÃO DA RESINA

A resina foi lavada duas vezes de dois minutos com DMF e, posteriormente, foi deixada coberta por este reagente durante 30 minutos.

O grupo Fmoc protetor da resina foi clivado através de três lavagens de seis minutos pela piperidina 20%. Em seguida, a resina foi lavada mais três vezes com DMF.

Toda a parte prática foi realizada em capela química, sempre com a utilização de luvas devido à toxicidade dos reagentes químicos empregados.

3.10.3 ATIVAÇÃO E ADIÇÃO DOS AMINOÁCIDOS A SEREM ACOPLADOS

O peptídeo foi sintetizado do primeiro aminoácido C-terminal em direção ao N-terminal. A síntese foi iniciada com a seqüência C G A antes do peptídeo a ser produzido, de forma a facilitar a conjugação com carreadores como albumina e KLH (keyhole limpet hemocyanin). As duas cisteínas presentes na seqüência foram substituídas por serinas.

Os aminoácidos foram adicionados em concentração 3 a 4 vezes maior que a quantidade de resina para garantir o acoplamento, para tanto, foram utilizados 160 $\mu\text{mol/l}$ de cada um dos aminoácidos.

Cada aminoácido teve a sua função carboxila (COOH) ativada para possibilitar a formação da ligação peptídica. O aminoácido a ser acoplado foi ativado 5 minutos antes de ser colocado em presença da resina com 160 $\mu\text{mol/l}$ de DIPC e 160 $\mu\text{mol/l}$ de HOBT, ambos em volume final de 250 μl .

Mais 2 ml de DMF foram adicionados agitando-se o tubo levemente, ou DMF/diclorometano (DMC) em razão 1:1 à medida que a cadeia fosse se alongando dificultando o acoplamento ou quando a cadeia fosse se tornando mais hidrofóbica.

Cada aminoácido ficou em reação de acoplamento por duas a três horas sendo o tubo agitado levemente de 20 em 20 minutos.

O ciclo foi finalizado com três lavagens de 2 minutos com DMF e, posteriormente, submetido ao teste da ninhidrina.

Teste da ninhidrina

O método mais conveniente para o rápido monitoramento do processo de acoplamento é o teste da ninhidrina que reage com aminas primárias resultando na coloração conhecida como púrpura de Ruhemann (Albericio & Carpino, 1997). Depois de acoplar o aminoácido, alguns grãos da resina foram colocados em presença de 1 gota de ninhidrina 5% em etanol, duas gotas de fenol 80% em etanol (p/v) e uma gota de cianeto de potássio 0,001 $\mu\text{mol/l}$ em piperidina. O tubo de hemólise foi aquecido por 3 minutos a 110°C.

Se houver um bom acoplamento, os grãos adquirirão cor laranja ou amarela. Caso contrário, a resina ficará de cor azul púrpura.

3.10.4 CLIVAGEM DO PEPTÍDEO

Logo após todos os ciclos terem sido completados, o último grupamento Fmoc foi eliminado com piperidina, assim como todas as proteções laterais além da ligação entre o peptídeo e a resina utilizando TFA conforme descrito abaixo:

Após término do último ciclo, o último aminoácido foi desprotegido através de lavagens com piperidina 20% por 6 minutos por três vezes.

Para a retirada da proteção lateral e do peptídeo da resina adicionou-se ao tubo de síntese a solução 2,5% de beta mercaptoetanol e 2,5% de água em volume final de 5 ml de TFA cuja reação ficou sob agitação lenta por 5 horas.

O peptídeo solubilizado foi colocado em tubo de ensaio vidro onde foi adicionado lentamente éter gelado 4°C até total precipitação. O tubo foi deixado em repouso por 30 minutos, sendo deixado aberto dentro da capela no interior de um béquer para evitar a perda do material por quebra do tubo.

O tubo foi deixado na geladeira durante 16 h e centrifugado a 3000 rpm durante 30 minutos no dia seguinte. O precipitado foi lavado mais 3 vezes com éter gelado. A última etapa foi de retirada do éter e ressuspensão do material em água Milli-Q. Posteriormente, o peptídeo foi liofilizado e testado em Dot Blot e ELISA quanto à reatividade frente ao LimAb7.

3.11 ANÁLISE DA BIBLIOTECA DE cDNA

A biblioteca de cDNA que foi analisada foi obtida extraíndo-se RNAm da glândula do veneno da aranha *Loxosceles intermedia* utilizando-se o kit “Zap cDNA synthesis” (Stratagene) em um trabalho realizado pela equipe do Prof. Dr. Evanguedes Kalapothakis (2002). Esta biblioteca é constituída por fagos lambda portadores do vetor Zap Express – Stratagene (Fig. 6) contendo o fagemídio pBK-CMV (Fig. 7) cujos insertos, maiores que 100 pares de bases, foram clonados entre os sítios de restrição EcoRI e XhoI presentes no sítio múltiplo de clonagem.

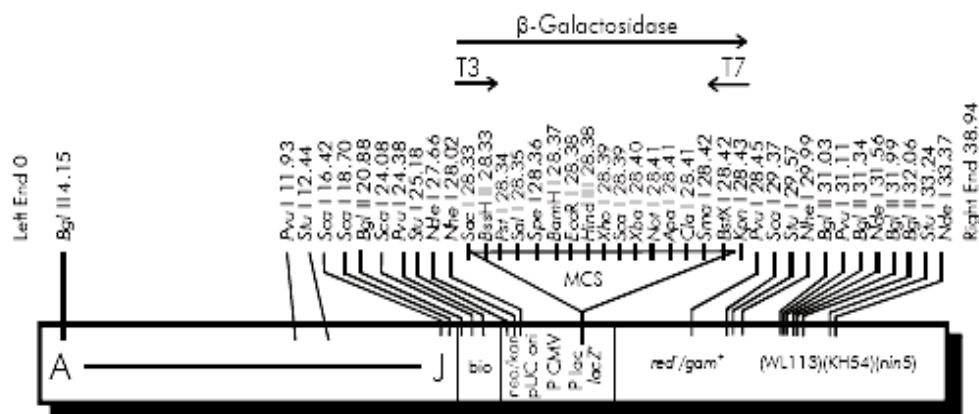
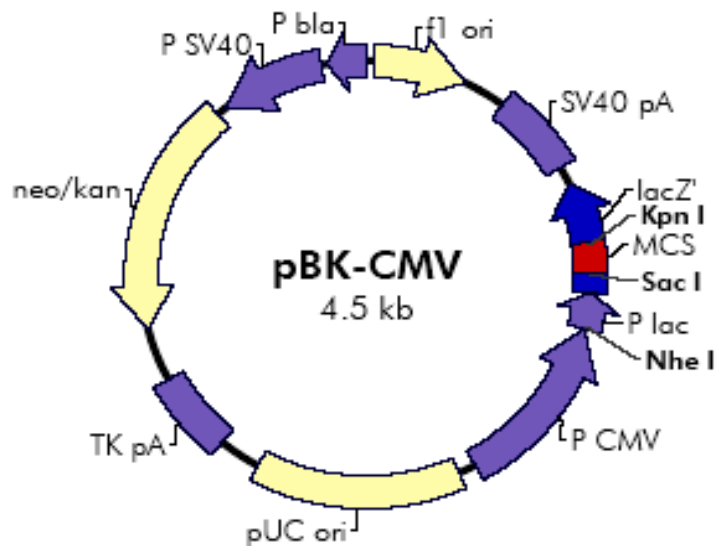


Figura 6 – Mapa do vetor Zap Express



pBK-CMV Multiple Cloning Site Region
(sequence shown 952–1196)



Figura 7 - Mapa circular do vetor pBK- CMV

Iniciou-se a seleção dos clones das 32 sub-bibliotecas, cedidas pelo Prof. Dr. Evanguedes, com a utilização de um *pool* dos fagos lambda que foram selecionados através da técnica de *immunoscreening* adaptada a partir de Sambrook *et al* (1989), como descrito a seguir.

3.11.1 PREPARO DAS PLACAS DE LISE

Placas de LB ágar foram estriadas com cepas de *E. coli* XL1-Blue e XLOLR para que fossem obtidas culturas recentes. No dia seguinte, pré-inóculos das duas bactérias foram feitas em tubos de 50 ml conforme descrito a seguir:

✓XL1-Blue: 5 ml de meio NZY, 50 µl de MgSO₄ 1 mol/l e 50 µl de maltose 20%

✓XLOLR: 5 ml de meio NZY e 50 µl de tetraciclina 12,5 mg/ml

Em um erlenmeyer de 500 ml foram adicionados os 5 ml da cultura de XL1-Blue em 50 ml de meio NZY suplementado com 500 µl de MgSO₄ 1 mol/l e 500 µl de maltose 20%. A cultura foi deixada sob agitação à 37° C até A₆₀₀ de 0.5 a 1.0.

As bactérias em fase logarítmica de crescimento foram centrifugadas por 10 minutos a 4500g e ressuspendidas em MgSO₄ 10 mmol/l até A₆₀₀ de 0.5 (para formação das placas de lise) ou de 1.0 (para excisão).

Titulação

Em um tubo de 15 ml estéril foram pipetados 200 µl da solução de bactérias XL1-Blue diluída em MgSO₄ com A₆₀₀ de 0.5, e 1 µl de uma diluição de 1:10 do pool das 32 sub-bibliotecas originais. Os tubos foram incubados por 15 minutos, à 37°C, sem agitação.

Para as bibliotecas já amplificadas foram utilizadas diluições de 10⁻⁴, 10⁻⁵ ou 10⁻⁶, adicionando-se 1 µl de cada diluição aos 200 µl das células XL1-Blue.

A cada um dos tubos foram adicionados 3 ml de meio NZY top agarose à 48° C que, imediatamente, foram vertidos sobre placas de LB ágar (à temperatura de 37° C).

De mesma maneira, uma placa controle contendo o fago sem inserto foi preparada e incubada por 16 h à 37 °C.

$$\text{Título} = \{ \text{n}^\circ \text{ de colônias de lise (pfu)} \times \text{fator de diluição/ volume plaqueado } (\mu\text{l}) \} \times 1000$$

3.11.2 IMUNOSSELEÇÃO

Preparo da cultura de XL1-Blue

A cultura de XL1-Blue foi preparada conforme descrito acima.

Para se obter colônias isoladas, é necessário haver 2×10^4 colônias de lise em uma placa de 90 mm ou 5×10^4 para placas de 150 mm.

Preparo das placas

Em um tubo de 15 ml, misturaram-se 200 μl da solução de bactérias XL1-Blue ($A_{600} = 0.5$) com um volume de tampão SM (NaCl 0,1 mol/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,008 mmol/l, Tris/HCl 0,05 mol/l pH 7,5; gelatina 0,01% (p/v)) contendo 3×10^4 pfu (90 mm) ou 10^5 (150 mm) do fago lambda. Os tubos foram incubados por 15 minutos à 37° C sem agitação. Três mililitros (90mm) ou 7.5 ml (150 mm) de NZY top agarose à 48° C foram adicionados a cada um dos tubos e vertidos sobre o centro das placas de LB ágar previamente aquecida à 37° C. As placas foram incubadas à 37° C por no máximo doze horas.

Immunoscreening

Usando luvas e pinças, membranas de nitrocelulose (Sigma N-2639) do tamanho do fundo da placa foram umedecidas em solução de IPTG (isopropil β -D-tiogalactopiranosídeo) 10 mmol/l e posicionadas sobre as placas de lise que retornaram à estufa por mais 3 horas.

Posteriormente, as membranas foram marcadas, bem como as placas e lavadas em tampão TNT (Tris-HCl 10 mmol/l, pH 8,0; 150 mmol/l, NaCl e 0,05% Tween 20) por duas vezes de 5 minutos.

As membranas foram, então, bloqueadas com PBS-T 0,3%, lavadas com PBS-T 0,05% por 3 vezes de 5 minutos, incubadas com LimAb7 (5 µg/ml), posteriormente com anticorpos específicos para IgGs de camundongos conjugado à peroxidase em diluição 1:2000 e reveladas com DAB, cloronaftol e peróxido de hidrogênio, conforme descrito no item 3.3.1.

Recuperação dos fagos reativos

As colônias de lise correspondentes aos *spots* reativos foram recortadas do ágar com uma ponteira e colocados em 1 ml de tampão SM contendo 0,5% (v/v) de clorofórmio e guardadas a 4° C. Os tubos ficaram em geladeira por dois dias antes do uso para garantir a total difusão dos fagos.

Segunda e terceira seleções

Cada um dos fagos positivos para LimAb7 foram novamente plaqueados e nova seleção foi realizada para a certificação da positividade dos clones. Durante a segunda seleção, misturou-se ao fago positivo um fago irrelevante como controle negativo. Os clones positivos foram separados para serem excisados e, posteriormente, seqüenciados.

3.11.3 EXCISÃO

A biblioteca constituída por fagos lambda possui em seu genoma o vetor Zap Express contendo o fagemídeo pBK-CMV com insertos de cDNA originados da glândula de veneno da aranha *Loxosceles intermedia*. Este vetor, Zap Express, possui uma origem de replicação dividida em duas regiões subclonadas separadamente, sendo uma delas o sítio de iniciação e a outra o sítio de finalização da síntese de DNA.

Após infecção das bactérias, as proteínas do fago helper reconhecem o iniciador que está no vetor lambda. Uma das duas fitas de DNA é clivada por estas proteínas e nova síntese de DNA se inicia na região de clivagem seguindo até o sinal de finalização.

Além disso, proteínas do fago helper promovem a circularização da molécula de DNA de fita simples originada, incluindo o fagemídeo pBK-CMV e o inserto de cDNA possivelmente clonado, recuperando a região de origem de replicação. Esta última região recuperada está correlacionada ao sinal que permite que o DNA circularizado seja empacotado em partículas do fagemídeo e secretados pelas bactérias. Para tanto, estas bactérias são lisadas e o fago lambda destruído pelo aquecimento a 70°C, sendo os fagemídios não afetados pelo procedimento.

Mais detalhes sobre a excisão e recuperação do fagemídeo estão descritos a seguir:

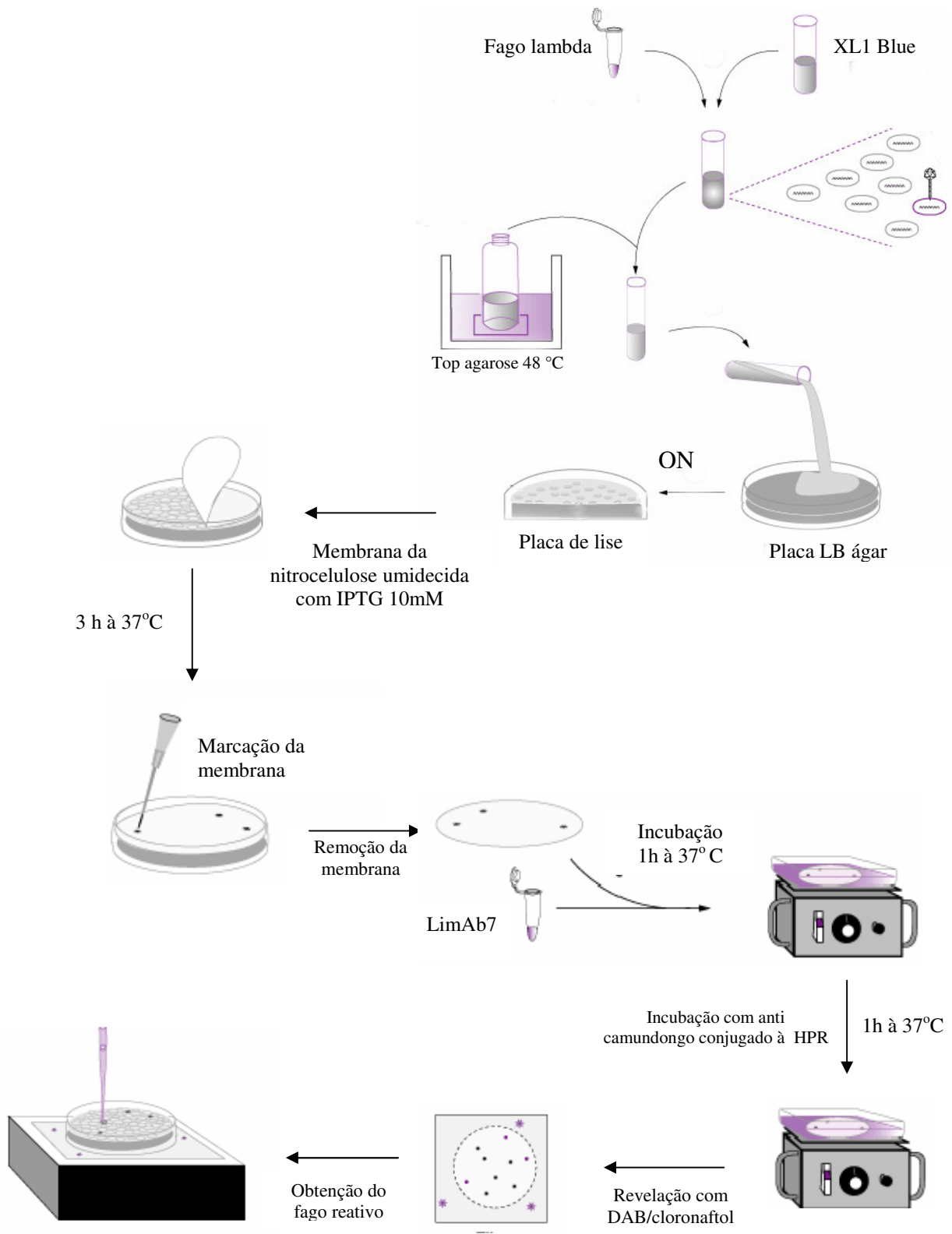
Preparo das bactérias XL1-Blue e XLOLR

O pré-inóculo da XLOLR foi adicionado a 50 ml de meio NZY contendo tetraciclina em concentração final de 12,5 µl/ml. As bactérias XL1-Blue foram preparadas como descrito anteriormente. Ambas culturas foram centrifugadas por 10 minutos a 4500 rpm e ressuspensas em MgSO₄ 10 mmol/l até A₆₀₀ de 1.0, no momento do uso.

Adição dos fagos selecionados e do fago *helper*

Em um tubo de 50 ml, misturaram-se 600 µl da solução de XL1-Blue (A₆₀₀ de 1.0), um volume da solução de fagos selecionados (10⁷ pfu) e de fagos helper (10⁹ pfu). Os tubos foram incubados por 15 minutos à 37° C sem agitação. Adicionou-se, posteriormente, 1 ml de meio NZY suplementado e incubou-se o tubo à 37°C por 2 a 3 horas sob agitação.

Após incubação, os tubos foram colocados em banho-Maria a 65 - 70° C durante 20 minutos. O volume foi colocado em tubos de microcentrífuga e centrifugados a 8000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo estéril e armazenados à 4° C.



FONTE: Ilustração modificada a partir do site www.biochem.arizona.edu/miesfeld/teaching/Bioc471-2/pages/Lecture10/Lecture10.html

Figura 8 – Imunoseleção de fagos lambda. *E. coli* XL1 Blue foram infectadas por fagos lambda com insertos provenientes do cDNA da glândula da aranha *L. intermedia*, estas células foram misturadas ao meio Top agarose e incubadas por 16h à 37°C. No dia seguinte, uma membrana de nitrocelulose foi embebida em IPTG 10 mM e colocada sobre a placa de lise. Após 3 h de incubação à 37°C, a membrana foi testada com LimAB7. Após detecção de reatividade, os fagos foram recolhidos e armazenados em meio SM com 0,5% de clorofórmio (v/v).

3.11.3.1 Obtenção de colônias isoladas

Os fagemídios excisados na etapa anterior foram adicionados em diferentes volumes (5, 10 e 15 μ l) a um tubo de 1,5 ml contendo de 200 μ l de XLOLR ($A_{600} = 1.0$) que ficou sob incubação durante 15 min. à 37°C. Posteriormente, foram adicionados 40 μ l de meio NZY 5x, incubando-se novamente as bactérias por 45 min. à 37°C, desta vez, sob agitação. Duzentos microlitros desta cultura foram plaqueados em meio LB-ágar contendo 50 μ g/ml de canamicina que ficou sob incubação à 37°C até o dia seguinte.

3.11.3.2 PCR de colônias

Para verificar a real existência de insertos de cDNA clonados no vetor excisado pBK-CMV, foi realizada uma PCR a partir das colônias isoladas obtidas conforme descrito no item anterior. Colônias isoladas foram adicionadas a 500 μ l de meio LB líquido contendo 50 μ g/ml de canamicina o qual ficou sob incubação durante uma hora à 37°C sob agitação. Desta cultura, 50 μ l foram submetidos à temperatura de 94°C por 10 min, e a partir disto, 1 μ l foi utilizado para a reação de PCR.

A reação foi realizada utilizando-se primers T3 (5' AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG 3') e T7 (5' GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C 3') e os reagentes descritos no Quadro 6, bem como o programa, batizado de T7, para os ciclos de desnaturação, anelamento e extensão (Quadro 7).

Primer T3	5 pmol
Primer T7	5 pmol
Taq DNA polimerase	1 UI
Tampão IB Taq 10x	2 μ l
Desoxirribonucleotídeos	0,1 mM
DNA (colônia)	1 μ l
Água	q.s.p. 20 μ l

Quadro 6 – Reação da PCR de colônias

Passo	Temperatura (°C)	Tempo
1	95	3 min
2	94	30 seg
3	55	1 min
4	72	2 min
5	Repetição do ciclo 30 vezes	
6	72	5 min

Quadro 7 – Programa utilizado na PCR com iniciadores T3 e T7

Cada uma das amostras foi diluída em tampão de amostra (azul de bromofenol 0,25% (p/v), xilenocianol 0,25% (p/v), glicerol 30% (v/v)) na proporção de 1:6 e aplicado em gel de agarose 1% contendo 0,05% de brometo de etídio.

O gel foi submetido à 80 V em tampão TAE (0,04 mol/l Tris-acetato 0,04 mol/l e EDTA 10 mmol/l, pH 8,0) e observado em transiluminador de luz ultravioleta.

Os clones que foram certificados quanto à presença do inserto foram submetidos a extração de plasmídios em baixa escala (mini prep).

3.11.4 SEQUENCIAMENTO DO CDNA

Os plasmídeos contendo insertos de cDNA referentes a alguma proteína reconhecida pelo anticorpo LimAb7 foram submetidos à extração em baixa escala (mini prep) utilizando-se o kit FlexiPrep (Pharmacia Biotech) de acordo com o protocolo proposto pelo fabricante e quantificados em gel de agarose 1% contendo 0,05% de brometo de etídio em volume final de 30 ml para cuba pequena.

Como padrão utilizou-se soluções contendo 250 ou 500 ng de DNA. Os DNAs diluídos 1:10 foram misturados ao tampão de amostra em proporção 1:6, aplicados no gel e submetidos à eletroforese à 80 V em tampão TAE.

Para o sequenciamento, diluições dos DNAs foram realizadas de forma a obter aproximadamente entre 250 e 300 ng/μl de DNA.

Esta etapa foi realizada no laboratório NAGE (Núcleo de Análise do Genoma e Expressão Gênica) localizado no departamento de Bioquímica da UFMG.

Utilizando-se placas Skirted (96 PCR, Biosciences), foram adicionados a cada reação: 300 ng do DNA molde a ser seqüenciado, 10 pmoles do primer M13 forward M13 (5' CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC 3') ou reverse (5' TCA CAC AGG AAA CAG CTA TGA 3'), 4.0 µl de ET kit (DYEnamic ET DYE terminator Kit, A. Biosciences) e água Milli-Q estéril para volume final de 10 µl.

A reação de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) foi realizada em termociclador MASTERCYCLE Gradient Eppendorf conforme descrito a seguir:

Passo	Temperatura	Tempo
1	95 °C	20 segundos
2	50 °C	15 segundos
3	60 °C	80 segundos
4	Repetição do ciclo por 29 vezes a partir do passo 1	

Quadro 8 - Programa utilizado na PCR para o seqüenciamento de cDNA

Após a PCR, o DNA amplificado foi precipitado adicionando-se 1 µl de acetato de amônio e 30 µl de etanol 96% a cada um dos poços. As placas foram, então, submetidas ao vortex, incubadas por 20 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

Após a incubação, a placa foi centrifugada por 45 min a 3500 rpm e o sobrenadante descartado. A cada um dos poços foram adicionados 100 µl de etanol 70%, sendo o sobrenadante descartado após a placa ser novamente centrifugada por 10 min a 3500 rpm. Após 20 minutos de repouso, o conteúdo dos poços foi ressuscitado em 10 µl de Loading buffer (MegaBACE LPA Buffer, Pharmacia Biotech) e levado ao seqüenciamento no aparelho Mega-Bace 1000 (Pharmacia Biotech).

3.11.5 ANÁLISE DO SEQUENCIAMENTO DOS CDNAS

Após a obtenção dos dados dos sequenciamentos, as seqüências foram analisadas utilizando-se o programa BioEdit, BLASTn e BLASTp disponíveis nos sites: www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html e <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>., respectivamente.

Os contigs foram obtidos através do programa Cap (Assemblage de séquences à Infobiogen) disponível em www.infobiogen.fr/services/analyseq.

Outras análises como a verificação de janelas abertas de leitura ou predição de massa molecular e ponto isoelétrico foram feitas através dos programas ExPasy e ORFs Finder encontrados nos endereços: www.bo.expasy.org/tools/pi.tool.html e www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html, respectivamente.

Para a predição dos peptídeos sinais foram utilizados dois algoritmos: SignalP 3.0 e Polyphobius disponíveis nos endereços: <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/> e <http://phobius.cgb.ki.se/poly.html>, respectivamente.

Os sítios de modificação pós-traducionais, como sítios de fosforilação e glicosilação foram preditos utilizando-se os programas NetPhos 2.0 e NetN- ou NetO-Glyc presentes no site: <http://www.cbs.dtu.dk/services/>.

Os outros sítios de modificação pós-traducionais como N-miristoilação, sulfatação de tirosina, por exemplo, foram estimados pelo programa ProSite disponível no endereço www.expasy.org/cgi-bin/prosite.

Os alinhamentos e o histograma foram obtidos através do programa ClustalW presente no site: www.bo.expasy.org.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DOS ANTICORPOS MONOCLONAIS

As duas seleções realizadas para obtenção dos clones possibilitaram a escolha de 13 anticorpos monoclonais anti veneno de *L. intermedia*. A grande maioria deles apresentou características em comum ao reconhecerem a proteína dermonecrótica com massa em torno de 30 a 35 kDa. As exceções ocorreram com o LimAb 1 que reagiu exclusivamente com proteínas de baixa massa molecular e com o LimAb 12 que reconheceu, além da proteína dermonecrótica, proteínas com massa inferior a ela, como mostrado na figura 9.

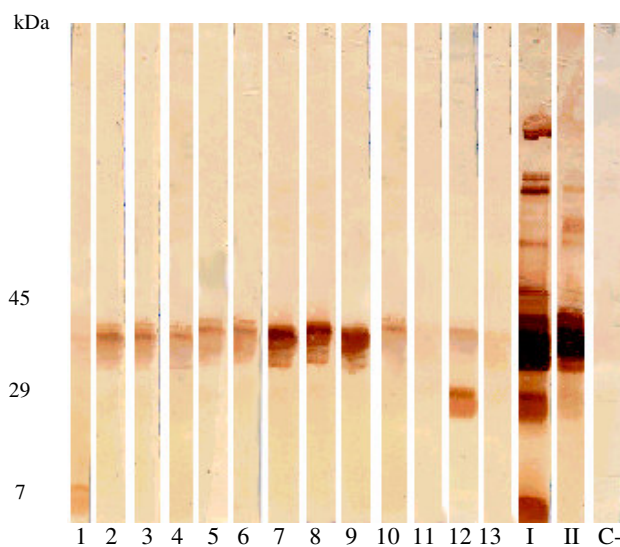


Figura 9 - Caracterização dos anticorpos monoclonais anti veneno de *L. intermedia*. Através da técnica de *Western Blotting* avaliou-se a reatividade do veneno de *L. intermedia* frente ao sobrenadante celular de hibridomas secretores de anticorpos monoclonais (1-13), ao soro policlonal de coelho 1:500 (I), ao soro policlonal de camundongo anti veneno total 1:500 (II) e, como controle negativo, ao soro pré-imune de camundongo (1:500).

4.1.1 AVALIAÇÃO DA ESPECIFICIDADE DO LIMAB7

Dos treze anticorpos monoclonais anti a peçonha de *L. intermedia*, optou-se dar seguimento ao estudo daquele que, por ELISA, mostrou maior reatividade com o veneno bruto deste aracnídeo assim como pela DNF e pela LiD1 (dados não mostrados).

Estudos posteriores foram então realizados com o LimAb7 quanto à sua capacidade de neutralizar, *in vivo*, a atividade dermonecrótica do veneno de *L. intermedia*, bem como de ser empregado em ensaios de imunodiagnóstico. Os detalhes sobre esta etapa do trabalho estão descritos no artigo: Alvarenga et al., 2003, em anexo.

Na avaliação do reconhecimento da proteína dermonecrótica pelo LimAb7 verificou-se também a sua fraca reatividade cruzada com venenos de outras aranhas do gênero *Loxosceles* (Fig. 10A) comprovada por ELISA (Alvarenga *et al.*, 2003).

Venenos de outros artrópodes como os da aranha *P. nigriventer* e dos escorpiões *T. serrulatus* e *T. bahiensis*, do inseto *A. meliferis* e das serpentes *Bothrops atrox*, *L. muta muta* e *Crotalus terrificus* não foram reconhecidos pelo anticorpo neutralizante LimAb7 (Fig. 10B).

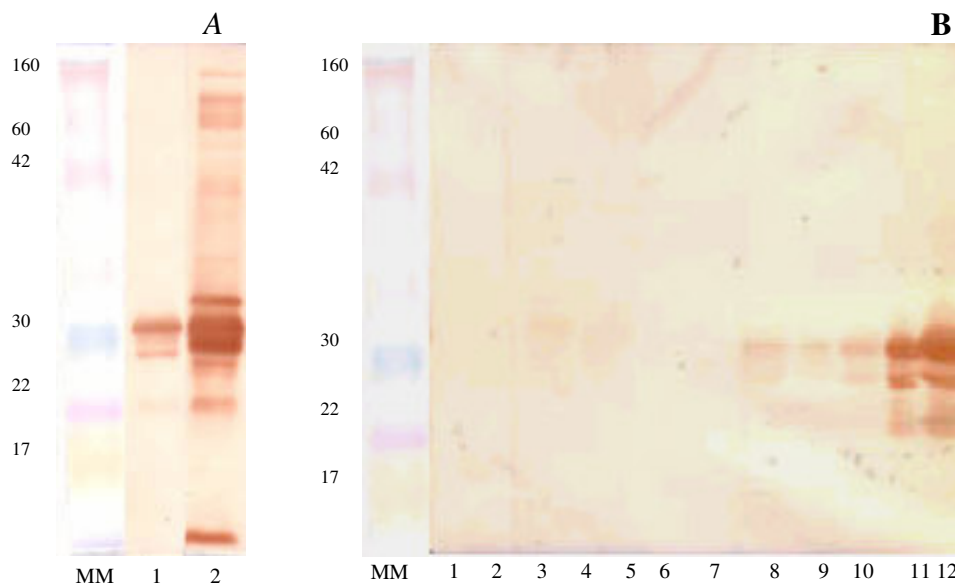


Figura 10 – Avaliação da reatividade do LimAb7 por Western Blotting A) frente ao veneno total de *L. intermedia*: MM. Padrão de massa molecular, 1. LimAb 7 (líquido ascítico 1:100) e 2. anticorpo policlonal de coelho (soro 1:500). B) frente a diversos venenos: 1. *C. terrificus*, 2. *B. atrox*, 3. *A. meliferis*, 4. *P. nigriventer*, 5. *T. serrulatus*, 6. *T. bahiensis*, 7. *L. muta muta*, 8. *L. laeta* (do Peru), 9. *L. laeta* (do Brasil), 10. *L. gaucho*, 11. *L. intermedia* e, como controle positivo: 12. veneno total de *L. intermedia* testado com anticorpo policlonal de cavalo anti fração dermonecrótica (5 µg/ml).

4.2 PERFIL PROTEÔMICO DO VENENO DE ARANHAS DO GÊNERO *Loxosceles*

O perfil eletroforético dos venenos de *L. intermedia* (Fig. 11), de *L. laeta* originárias do Brasil (Fig. 12) e do Peru (Fig. 13) e de *L. gaucho* (Fig. 14), foi analisado utilizando-se, para a primeira dimensão, o sistema IPG SDS-PAGE e, inicialmente, strips de 7 cm para padronização da metodologia e, posteriormente, as de 18 cm sendo ambas com pH variando entre 3–10 de forma não linear. Para a segunda dimensão em gel SDS-PAGE, estando a acrilamida em concentração de 12%, utilizou-se o padrão de massa molecular entre 20 e 200 kDa.

Como mostrado neste estudo, muitas destas proteínas, com massa molecular próxima à faixa de 30 a 35 kDa, podem ser encontradas nos quatro venenos brutos analisados bidimensionalmente. Nesta faixa de massa molecular encontra-se a porção mais expressiva e imunogênica dos venenos, verificando-se que, cada uma das espécies, apresenta diferentes propriedades bioquímicas quanto ao perfil isoelétrico.

Foi possível verificar que as proteínas constituintes do veneno de *L. intermedia* apresentam pI mais básico ($pI > 7$) em relação aos pIs dos venenos de *L. laeta* de origem brasileira e peruana e ainda, existem diversas isoformas entre as massas moleculares de 24 a 20 kDa e outras de maior massa entre 66 e 97 kDa, a maioria com propriedades aniônicas (Fig. 11).

Os dois venenos de *L. laeta* (Fig. 12 e 13) apresentam diferenças entre si mas conservam o caráter mais neutro e uma maior riqueza de proteínas de alto e baixa massa molecular.

O perfil eletroforético da peçonha da aranha *L. gaucho*, dentre os quatro géis analisados, é aquele, cujas proteínas apresentam uma diversidade maior de pI fazendo com que haja uma distribuição mais significativa das mesmas ao longo do eixo ácido-base (Fig. 14).

Os venenos correspondentes às espécies *L. intermedia* e *L. laeta* apresentam ainda, em comum, proteínas de caráter básico com difícil resolução no gel bidimensional.

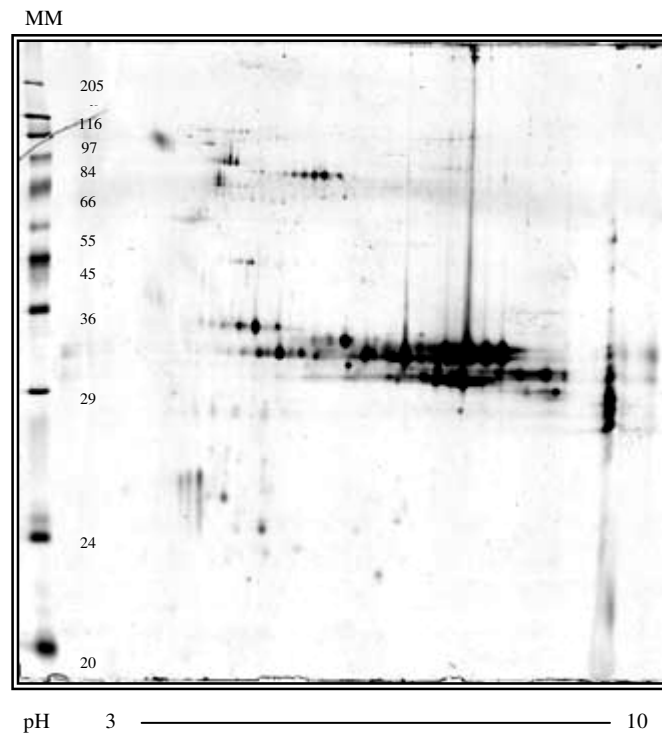


Figura 11 –Gel IPG/SDS PAGE do veneno de *L. intermedia*. Gel bidimensional SDS/PAGE 12%, utilizando-se *strip* de 18 cm pH 3-10 não linear, de 100 µg de veneno de *L. intermedia* corado com prata mostrando a presença de proteínas de alta, média e baixa massa molecular, sendo a fração dermonecrótica (30 - 35kDa) a mais expressiva e com propriedades, em sua maioria, básicas.

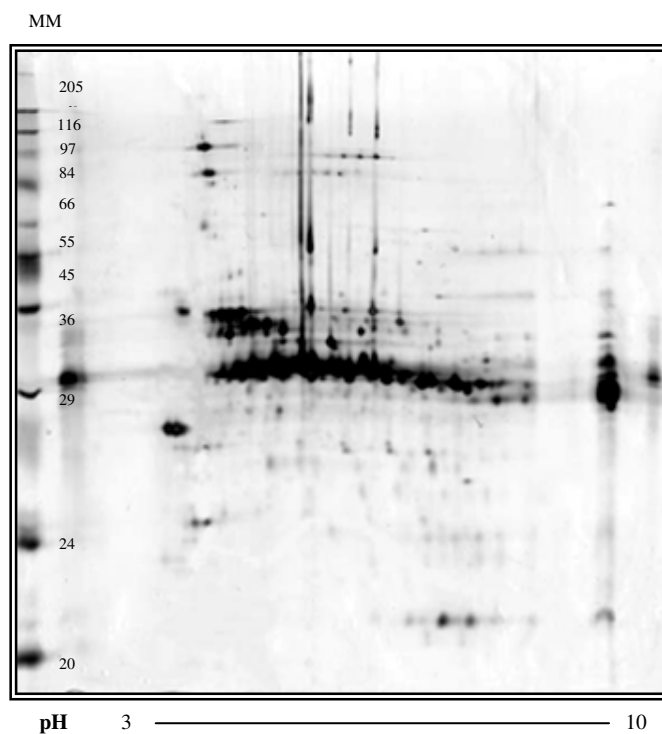


Figura 12 - Gel IPG/SDS-PAGE do veneno de *L. laeta* (do Brasil). Gel bidimensional SDS/PAGE 12%, utilizando-se *strip* de 18 cm pH 3-10 não linear, de 100 µg de veneno bruto de *L. laeta* corado com prata, o qual apresenta um caráter isoelétrico mais neutro além de um número maior de proteínas concentradas entre as massas moleculares de 29 e 36 kDa.

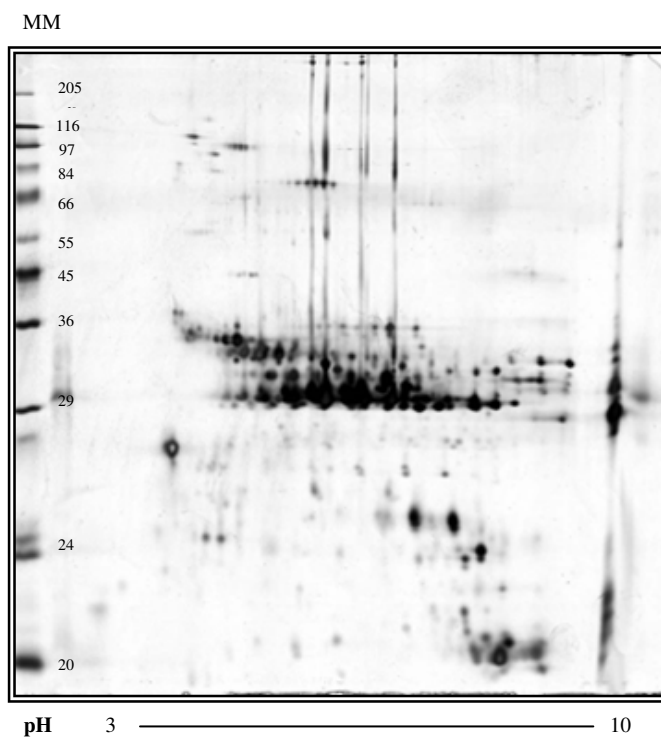


Figura 13 - Gel IPG/SDS PAGE do veneno de *L. laeta* (do Peru). Gel bidimensional SDS/PAGE 12%, utilizando-se *strip* de 18 cm pH 3-10 não linear, de 100 μ g de veneno de *L. laeta* de origem peruana corado com prata o qual apresenta, assim como o veneno da espécie brasileira, um caráter isoelétrico tendendo à neutralidade.

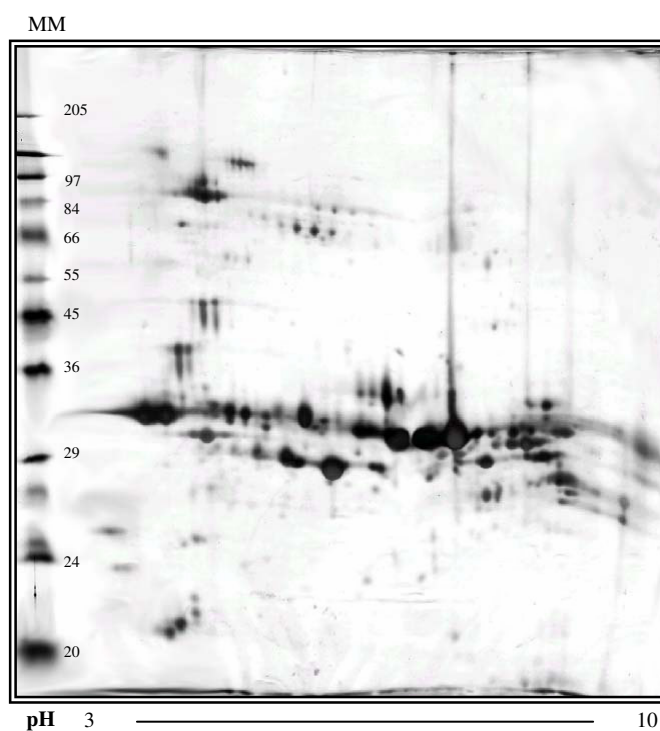


Figura 14 - Gel IPG/SDS PAGE do veneno de *L. gaucho*. Gel bidimensional SDS/PAGE 12%, utilizando-se *strip* de 18 cm pH 3-10 não linear, de 100 μ g do veneno bruto de *L. gaucho* corado pela prata o qual, ao contrário das demais, apresenta inúmeras proteínas distribuídas ao longo do eixo ácido-base, porém, concentradas entre as massas de 29 e 36 kDa.

4.3 REATIVIDADE DO LimAb7 FRENTE AO VENENO DE *L. intermedia* EM GEL 2D

Para se verificar o perfil de reconhecimento das proteínas da fração dermonecrótica pelos outros anticorpos monoclonais, com exceção do LimAb7 e LimAb1, um pool destes anticorpos, em concentração de 10 µg/ml, foi incubada com a membrana de nitrocelulose após eletrotransferência do gel 2D do veneno bruto de *L. intermedia*.

Como mostrado na figura 15, o pool de LimAb identifica várias proteínas da fração dermonecrótica, porém o perfil de reconhecimento é diferente daquele obtido com o LimAb7 (Fig. 16), com exceção das proteínas localizadas na parte mais básica do gel, cuja resolução foi prejudicada pela deficiência da metodologia.

Através da metodologia de *Western Blotting* foi possível verificar que o LimAb7 identifica diferentes isoformas ao longo do eixo ácido-base, havendo um reconhecimento de proteínas com, no mínimo, quatro massas moleculares diferentes.

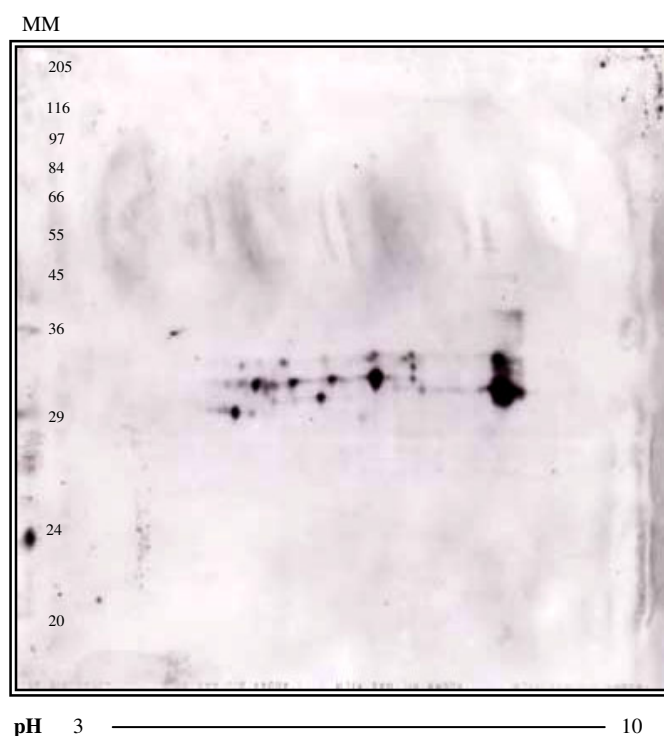


Figura 15 – Reatividade das proteínas do veneno de *L. intermedia* frente ao pool de anticorpos monoclonais. A detecção do complexo antígeno-anticorpo foi feita utilizando-se conjugado anti camundongo 1:2000 e revelação por quimiluminescência.

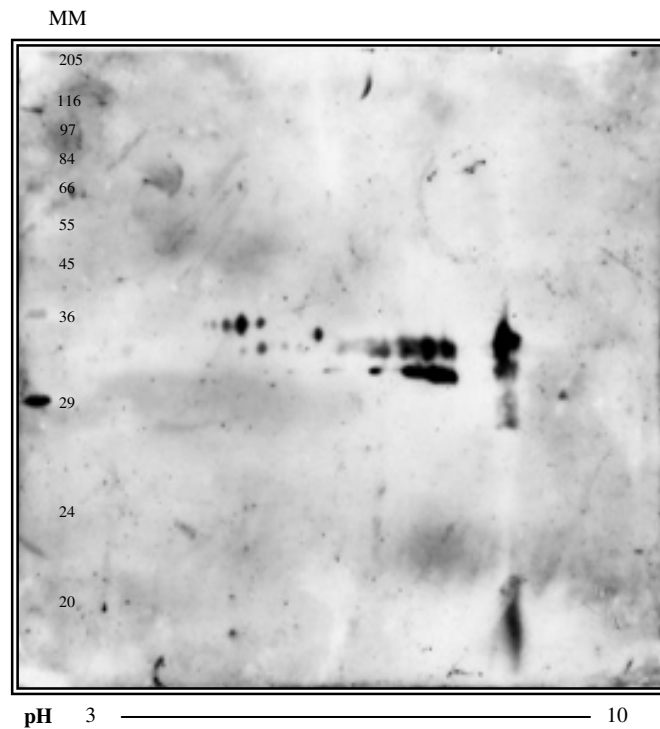


Figura 16 - Western Blotting das proteínas do veneno de *L. intermedia* reconhecidas pelo LimAb7. A detecção foi realizada utilizando-se conjugado anti camundongo 1:2000 e revelação por quimioluminescência.

4.4 GEL BIDIMENSIONAL DAS PROTEÍNAS DO VENENO DE *L. intermedia* PURIFICADAS EM COLUNA DE AFINIDADE

Com o objetivo de se obter somente proteínas, a partir do veneno bruto de *L. intermedia*, que fossem reconhecidas pelo LimAb7, 2,0 mg da peçonha foram eluídos por uma coluna de afinidade tendo o anticorpo monoclonal imobilizado.

Cerca de 1,6 mg de proteína purificada foram recuperados e, destes, 200 µg foram separados em um gel bidimensional utilizando-se *strips* não lineares com pH variando entre 3 e 10 (Fig. 15). De maneira semelhante, o veneno bruto de *L. intermedia* foi separado eletroforéticamente, sendo ambos os géis corados com Azul de Coomassie.

O gel bidimensional das proteínas purificadas por coluna de afinidade revelou que houve uma possível adsorção de outras proteínas ou degradação das mesmas tendo em vista o grande número de proteínas presentes do veneno mostrado pelo gel corado Azul de Coomassie. Outro dado interessante é que o resultado obtido com o *Western Blotting* do gel 2D do veneno bruto de *L. intermedia* utilizando-se o LimAb7, não se reproduz com as proteínas purificadas. Acredita-se que a eluição da coluna de afinidade com pH ácido tenha influenciado o caráter bioquímico das proteínas.

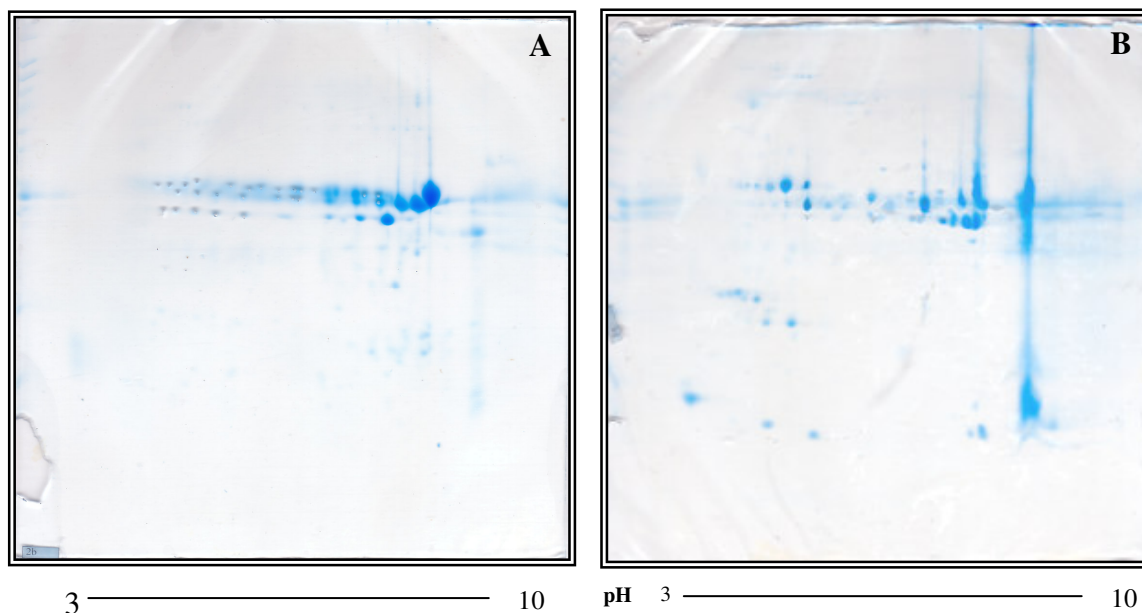


Figura 17 – Géis bidimensionais do veneno bruto de *L. intermedia* e das proteínas purificadas por afinidade corados com Azul de Coomassie. Tanto para o primeiro gel (A), onde migraram proteínas do veneno de *L. intermedia* purificadas por uma coluna de afinidade ao o LimAb7, quanto para o segundo (B), foram utilizados 200 µg de proteína, porém em B foi utilizado o veneno loxoscélico bruto.

4.5 INIBIÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA DO VENENO DE *L. intermedia* PELO LIMAB7

Para se avaliar a capacidade do LimAb7 em inibir a hemólise induzida pelo veneno bruto da aranha *L. intermedia*, eritrócitos ORH+ foram tratados com esta peçonha previamente incubada com diferentes concentrações do anticorpo monoclonal. Como controle negativo foram utilizadas uma IgG irrelevante de camundongo, um soro normal de cavalo e como controle positivo um antiveneno polivalente de cavalo utilizado na terapêutica. Após incubação com soro humano proveniente do mesmo doador das hemácias, a absorbância foi lida a 541 nm. A inibição total da hemólise (100%) foi obtida com a incubação do veneno com o antiveneno terapêutico.

Como mostrado na figura 18, o LimAb7 foi capaz de minimizar a hemólise induzida por 25 µg/ml de veneno, in vitro, em até 52, 2 ±2,3%, 65,8% ±0,7%, 79,2% ±0,3% e 84,7±0,7% utilizando-se 0.25, 0.5, 1.0 e 2.0 mg/ml de anticorpo monoclonal, respectivamente, correspondendo a máxima concentração utilizada à razão veneno:anticorpo de 1:16 (mol/l). Os resultados revelam uma relação dose-dependente nesta redução dos danos hemolíticos causados pelo veneno.

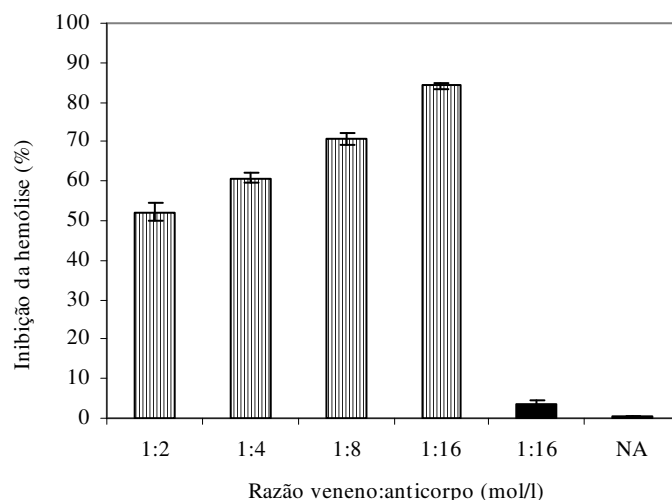


Figura 18 - Percentagem da inibição da hemólise pelo LimAb7. Hemácias humanas foram incubadas com o veneno bruto de *L. intermedia* previamente incubado com LimAb7 (▨), uma IgG de camundongo irrelevante (■) ou com tampão (NA- nenhum anticorpo). A inibição total da lise (100%) foi obtida com a pré-incubação com o antiveneno polivalente terapêutico (1:200).

4.6 INIBIÇÃO DA ATIVIDADE ESFINGOMIELINÁSICA DO VENENO DE *L. intermedia* PELO LIMAB7

Avaliou-se a capacidade do LimAb7 em neutralizar a atividade esfingomielinásica do veneno de *L. intermedia* utilizando-se um ensaio colorimétrico (Gatt *et al.*, 1978) com substrato comercial TNPAL *sphingomyelin* (Sigma). Verificou-se que o LimAb7, na proporção de 1:16 em relação ao veneno, é capaz de neutralizar $63,5 \pm 3,3 \%$ a atividade enzimática enquanto o antiveneno, na diluição 1:20, neutralizou $66,7 \pm 3,8\%$.

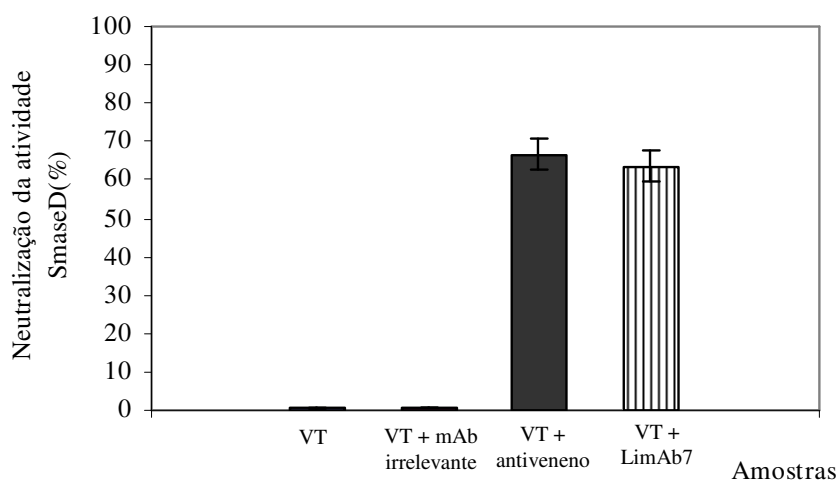


Figura 19 - Percentagem de neutralização da atividade esfingomielinásica pelo LimAb7. O substrato TNPAL-*sphingomyelin* foi adicionado ao veneno bruto de *L. intermedia* previamente incubado somente com tampão, com LimAb7 na razão 1:16 (mol/l) (▨) e com antiveneno CPPI (■) na diluição 1:2 (v/v). Um anticorpo monoclonal irrelevante na razão 1:16 foi usado como controle.

4.7 IDENTIFICAÇÃO DE EPITOPOS PELO MÉTODO DE *SPOT SYNTHESIS*

Com o objetivo de identificar os epítopos reconhecidos pelo anticorpo monoclonal neutralizante do veneno da aranha *L. intermedia*, peptídeos de 25 e 15 aminoácidos correspondentes à seqüência da proteína LiD1 (Kalapothakis *et al.*, 2002) foram sintetizados linearmente sobre duas distintas membranas de celulose. Estas membranas foram testadas com o LimAb7 e não houve reatividade dos *spots* (Fig. 20).

O soro policlonal de cavalo foi capaz de reconhecer várias seqüências diferentes da proteína LiD1 (Fig. 20A I e II). Esta proteína apresenta sua porção N-terminal altamente antigênica assim como um pequena seqüência da região C-terminal como mostrado na análise da membrana constituída por peptídeos sintéticos de 15 aminoácidos sobrepostos (20A - II) representada na figura 21.

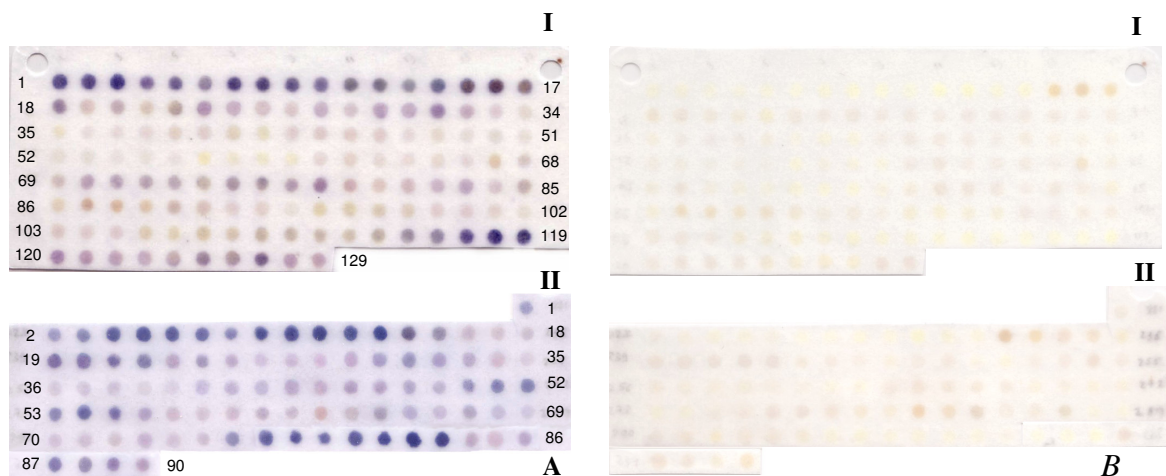


Figura 20. Reatividade da seqüência linear da LiD1 frente aos anticorpos poli e monoclonal. Membrana de celulose constituída por *spots* correspondentes a peptídeos lineares derivados da seqüência de aminoácidos de uma das proteínas da fração dermonecrótica (DNF) do veneno de *L. intermedia* (LiD1). As seqüências de 25 (I) e de 15 resíduos (II) foram testadas quanto à reatividade com um soro policlonal de cavalo anti DNF em diluição 1:3.000 (A) e com 10 µg/ml de LimAb7 (B). *Spots* imunorreativos aparecem como pontos azuis.

Como característica destes epítopos, foi notável a presença de resíduos aparentemente importantes à formação do complexo antígeno-anticorpo (em negrito na figura 21). Nestas regiões imunorreativas há aminoácidos característicos em comum, como, por exemplo, asparagina (N) ou com perfis aromáticos como fenilalanina (F) e tirosina (Y) ou ácidas como ácido aspártico (D).

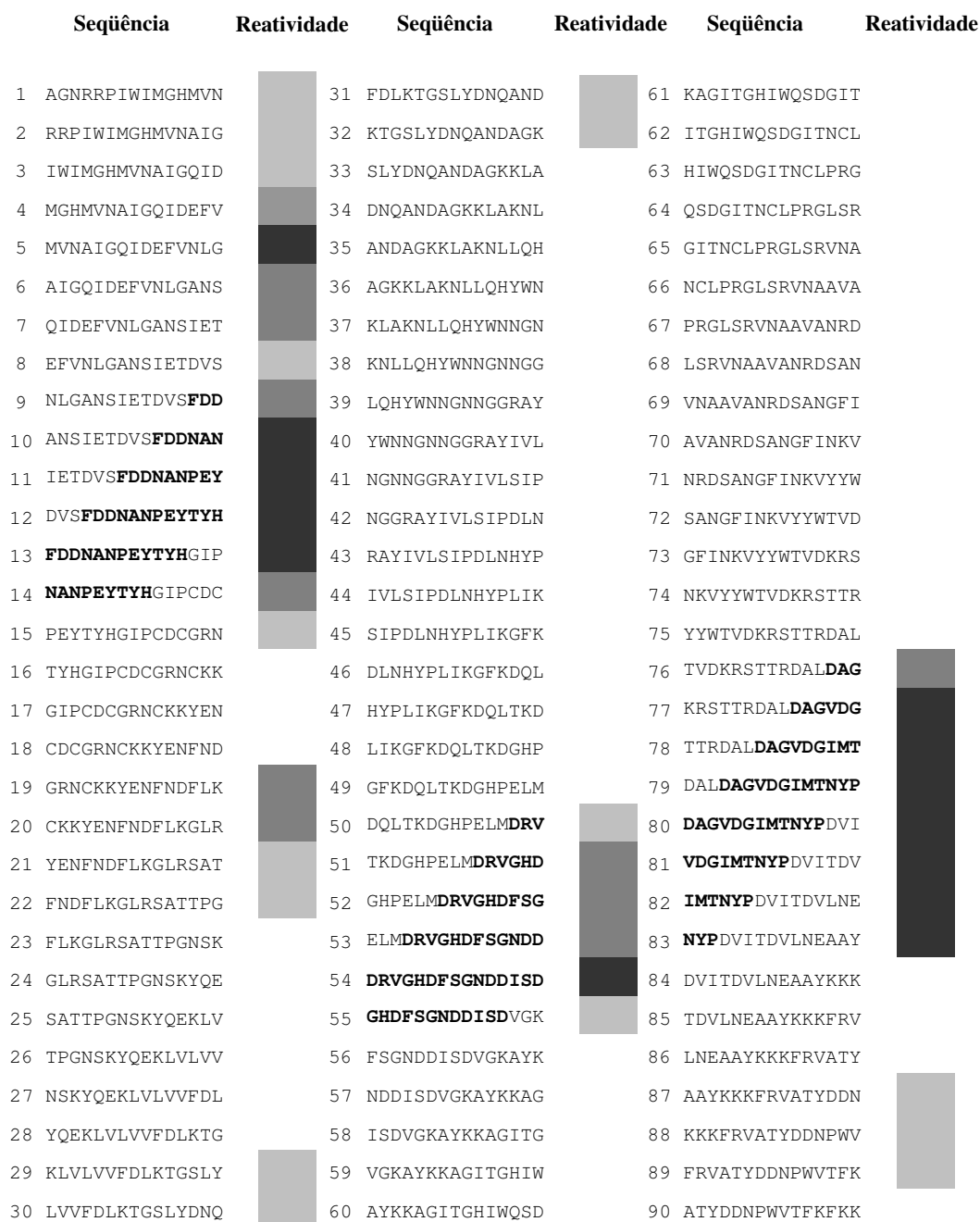


Figura 21. Avaliação da reatividade de peptídeos lineares de 15 aminoácidos da proteína LiD1 frente ao anticorpo policlonal de cavalo anti DNF. A antigenicidade das seqüências peptídicas foi avaliada indiretamente através da intensidade crescente de cor cujo resultado foi obtido através do programa *Scrimage*. Em negrito estão evidenciados os peptídeos que apresentam resíduos importantes à formação do complexo antígeno-anticorpo, alguns aminoácidos se repetem nestas regiões imunorreativas como ácido aspártico (D) e asparagina (N), assim como aqueles com características aromáticas.

4.8 IDENTIFICAÇÃO DE EPITOPOS PELO MÉTODO DE *PHAGE DISPLAY*

Como não houve reatividade do LimAb 7 com peptídeos lineares correspondentes à seqüência da proteína LiD1, especulou-se a possibilidade de seu epítipo ser descontínuo e que, portanto, poderia ser identificado pela técnica de *Phage display*.

Para identificar os peptídeos capazes de mimetizar sítios importantes das proteínas do veneno da aranha *L. intermedia*, o anticorpo neutralizante foi empregado como agente selecionador de uma biblioteca de fagos M13 que expressam em seu capsídeo, peptídeos aleatórios. Após três seleções, foi possível constatar, por ELISA, a evolução da reatividade das partículas virais frente ao LimAb7 em relação a cada um dos *pannings* (Fig.22).

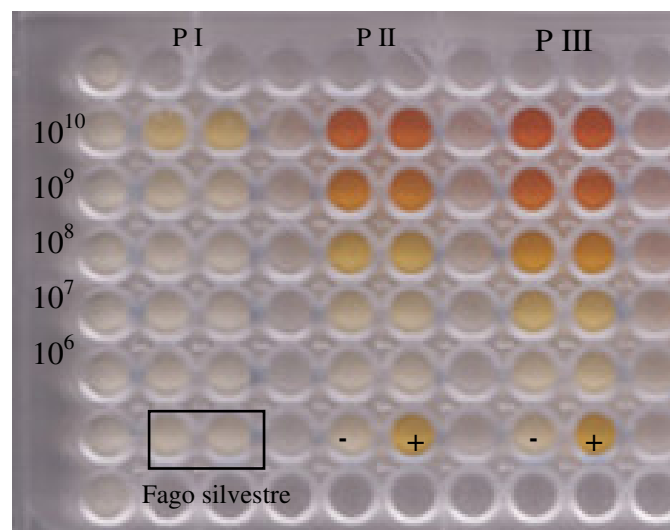


Figura 22 – Evolução da afinidade dos fagos ao LimAb7 nos *pannings* I, II e III avaliada por ELISA. Placa sensibilizada com 0.5 µg/ml de LimAb7 e incubada com uma diluição seriada dos fagos selecionados (10¹⁰ a 10⁶). Como controle do ELISA utilizaram-se 10¹⁰ fagos silvestres e venenos de *L. muta muta* e *L. intermedia* em concentração de 10 µg/ml.

O fago silvestre foi utilizado como controle negativo na avaliação dos *pannings*, e os venenos de *L. muta muta* e de *L. intermedia* foram utilizados como controles negativo e positivo internos do ELISA, respectivamente. As diferenças entre os ciclos de biosseleção podem ser melhor avaliadas levando-se em conta os valores de absorvância ilustrados na figura 23.

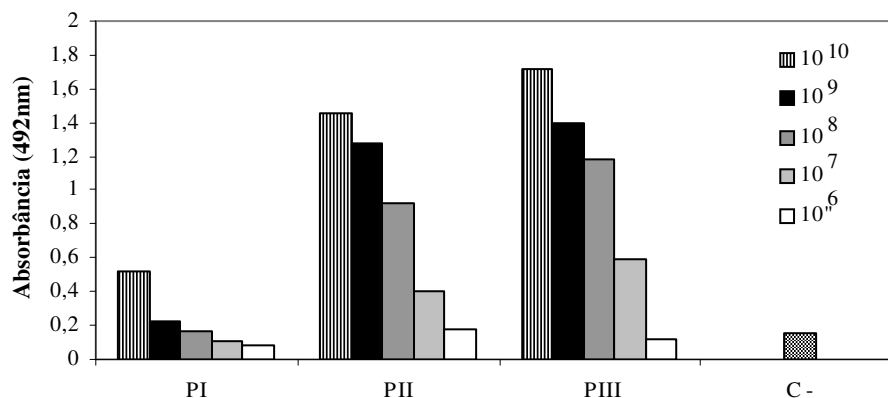


Figura 23 - Evolução dos clones ciclo após ciclo de seleção (PI, PII e PIII). Os fagos foram diluídos (10^{10} a 10^6 /poço) e incubados em uma placa sensibilizada com 5 μ g/ml de LimAb7. Os fagos foram detectados com anticorpo anti M13. Um fago irrelevante foi usado como controle negativo (C-).

Das quatro bibliotecas utilizadas, duas delas foram positivas. Uma destas bibliotecas continha fagos expressando peptídeos de 17-mer (X_8CX_8) contendo uma única cisteína enquanto a segunda, peptídeos de 12-mer (XCX_8CX) com duas cisteínas capazes de formar pontes dissulfeto.

No primeiro ELISA em que foi utilizado o LimAb7 como anticorpo de captura, 94 clones foram positivos, 17 (18,08%) não apresentaram reatividade e, dentre os reativos não houve nenhum clone cuja leitura se sobressaísse aos demais dificultando, assim, a seleção. Dessa forma, um novo ELISA sanduíche, desta vez utilizando-se como anticorpo de captura uma IgG de coelho anti-M13, foi empregado de forma a obter clones que demonstrassem uma afinidade maior ao LimAb7 quando comparados aos demais.

Desta vez, dos clones testados, os 17 não reativos continuaram negativos enquanto somente 36 (38,3%) mostraram-se positivos. A seqüência nucleotídica dos 15 clones mais reativos foi determinada e traduzida para a seqüência de aminoácidos correspondente (Tabela 2). Uma interessante observação foi a de que todas as seqüências peptídicas selecionadas pelo LimAb7 apresentaram dois resíduos de cisteína.

Não foi verificada uma homologia entre a seqüência linear de aminoácidos dos peptídeos e a seqüência primária da proteína LiD1. O alinhamento das seqüências encontradas revelou resíduos consensuais entre elas como a presença de duas cisteínas separadas por 7 ou 8 resíduos, particularmente observada pelo mimotopo derivado de uma biblioteca de 17 resíduos com apenas uma cisteína invariável. Os peptídeos selecionados apresentaram características peculiares como a hidrofília dos resíduos N-terminais e a aromaticidade (W, F, Y) dos resíduos C-terminais. A proporção entre os aminoácidos polares com e sem carga parece ter alguma relação com a imunogenicidade

em relação ao LimAb7 (Tabela 1). Além do mais, a maioria dos clones tem um ácido glutâmico (D) em posição centralizada nas seqüências.

Spot	Seqüência	Proporção entre AA polares sem carga/com carga	Frequência
	<u>Q D E E R</u> V S S C P <u>K</u> V A W T F C	1.75	6
I	N C N <u>K</u> N D <u>H</u> L F A C W	3	5
II	<u>E C T Q</u> <u>K</u> Y <u>D</u> W L F C M	2.5	1
III	<u>E C K S</u> <u>D</u> W M P P Y C P	2	3

Tabela 2. Seqüências de aminoácidos dos clones isolados após seleção a partir da biblioteca de fagos M13. Seqüências de aminoácidos isolados de bibliotecas de 17 e 12-mer após três seleções com LimAb7. Resíduos em consenso estão marcados em cinza. Resíduos polares estão sublinhados, destes, os sem e com carga estão em itálico ou em negrito, respectivamente. A frequência indica o número de vezes que cada seqüência foi independentemente isolada.

4.9 SÍNTESE DE PEPTÍDEOS SOLÚVEIS

O peptídeo “Q D E E R V S S C P K V A W T F C” selecionado pelo LimAb7 pela técnica de *phage display* foi sintetizado com a seqüência adicional “C A G” em sua porção C-terminal para facilitar o acoplamento com carreadores como KLH e/ou BSA, essenciais para uma imunização efetiva.

De forma a diminuir possíveis reações cruzadas devido à presença das duas cisteínas, as mesmas foram substituídas por serinas durante a síntese. O peptídeo sintetizado, portanto, foi construído a partir da seguinte seqüência: “Q D E E R V S S S P K V A W T F S A G C”. Confirmando as suspeitas, não houve reatividade do LiMab7 frente ao peptídeo sintético ao serem utilizadas as técnicas de *Dot Blot* e de ELISA (dados não mostrados).

4.10 REATIVIDADE DO LIMAB7 FRENTE AOS PEPTÍDEOS CÍCLICOS

Com base nos fatos descritos, os peptídeos de 12 resíduos, obtidos a partir da seleção por *phage display*, foram sintetizados sobre uma membrana de celulose com a formação de pontes dissulfeto.

Os peptídeos cíclicos foram testados quanto à reatividade com o LimAb7 utilizando-se anticorpos policlonais específicos para IgG de camundongo conjugado à peroxidase e a revelação por quimioluminescência. Das três quadruplicatas referentes

aos peptídeos selecionados, somente aquele correspondente à seqüência “N C N K N D H L F A C W” mostrou-se reativo como ilustrado abaixo:

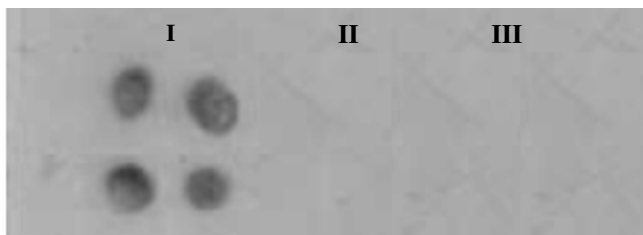


Figura 24. Reatividade dos peptídeos cíclicos, sintetizados sobre membrana de *Spot*, frente ao LiMab7. Peptídeos foram sinterizados sobre membranas de celulose utilizado-se a técnica de *Spot synthesis*. Os peptídeos reativos ao anticorpo monoclonal aparecem como pontos escuros sobre a membrana em quadruplicatas: I (NCNKNDHLFACW), II (ECTQKYDWLFCM) e III (ECKSDWMPPYCP).

4.10.1 REDUÇÃO E ALQUILAÇÃO DOS PEPTÍDEOS CÍCLICOS

O anticorpo monoclonal não reconheceu nenhum *spot* quando testado sobre peptídeos sintéticos baseados na seqüência linear da LiD1 (Fig. 20B). Por outro lado, o LimAb7 reagiu eficientemente com um deles, quando o mesmo fora sintetizado ciclicamente, ou seja, com a formação de uma ponte dissulfeto sobre uma membrana de *Spot* (Fig. 24).

Utilizando-se a técnica de *Dot Blot*, avaliou-se a possibilidade deste reconhecimento estar realmente relacionado à presença da ponte dissulfeto. Sendo assim, o fago que expressava o peptídeo “N C N K N D H L F A C W” foi reduzido, alquilado e testado com o LimAb7 e, como resultado obteve-se significativa redução da reatividade deste peptídeo (Fig. 25).

Corroborando os resultados anteriores, estes dados sugerem que uma ponte dissulfeto intramolecular contribui com a conformação do mimotopo reconhecido pelo LimAb7 porém, as cisteínas não parecem ser fundamentais uma vez que nenhuma reatividade foi detectada quando o peptídeo cíclico irrelevante “I C A R Q D P A G N C S” foi testado com LimAb7 nas mesmas condições que os demais (Fig. 25).

Estes detalhes nos revelam a importância de alguns resíduos em posições estratégicas que permitam a mimetização e, portanto, o reconhecimento do peptídeo pelo anticorpo monoclonal.

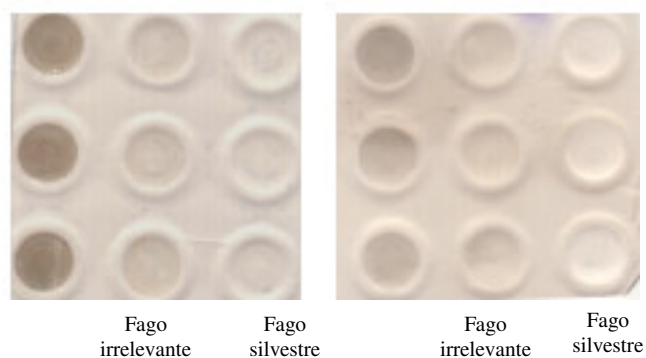


Figura 25. Efeito da redução e alquilação do mimotopo no reconhecimento pelo LimAb7. Em um ensaio de *Dot Blot*, ambas membranas: com peptídeo cíclico “N C N K N D H L F A C W” (A) ou reduzido e alquilado (B) foram testados com LimAb7. Nenhuma reatividade foi detectada com os peptídeos expressos na proteína pVIII do fago irrelevante (“I C A R Q D P A G N C S”) ou do silvestre.

4.11 IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS A PARTIR DA BIBLIOTECA DE CDNA *L. intermedia*

A varredura por *immunoscreening* das 32 sub-bibliotecas de cDNA da glândula de veneno da aranha *L. intermedia* resultou em 42 fagos lambda positivos quanto à reatividade ao LimAb7 dentre os pouco mais de 8.000 investigados na primeira seleção. Destes 42, somente 26 permaneceram positivos após a segunda seleção e apenas 18 reproduziram o resultado após a terceira seleção.

Após a PCR de colônias, verificou-se que destes 18 clones, apenas 2 deles apresentavam fragmentos amplificados com massa molecular entre os massas do padrão correspondentes a 1.353 e 1.078 pares de base (pb), como mostrado na figura 26. Estes fragmentos correspondem à soma do sítio múltiplo de clonagem, contido entre os promotores T3 e T7 (107 pb), com os insertos de cDNA da glândula de veneno da aranha *L. intermedia*.

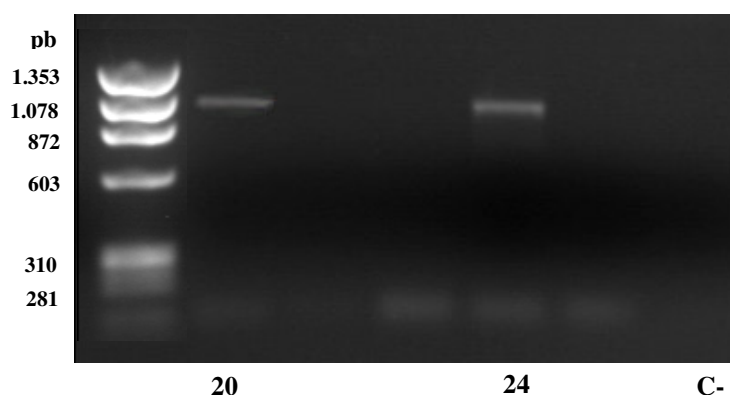


Figura 26 – Perfil eletroforético dos fragmentos de cDNA amplificados ao se utilizar os iniciadores T3 e T7. Bandas de maior massa representam os fragmentos amplificados correspondentes ao inserto de cDNA da glândula de veneno de *L. intermedia* entre os promotores T3 e T7.

O seqüenciamento nucleotídico do cDNA correspondente aos clones 20 e 24 selecionados pelo LimAb7 possibilitou a identificação de duas seqüências, sendo a primeira com 1096 pb e a segunda, com 1000 pb. A análise destas seqüências através de programas disponíveis na rede internacional de computadores revelou algumas características peculiares de cada uma das proteínas.

Ambas seqüências apresentam janela aberta de leitura com início no códon iniciador *ATG* e término no códon de finalização (*stop* códon) *TAA* além de uma região 3' não traduzida contendo um sinal de poliadenilação *AATAAA* e cauda poli-A.

As janelas de leitura de ambos os clones correspondem a uma seqüência deduzida de 304 aminoácidos, porém, a região 3' não traduzida do clone 20 é mais extensa que a do clone 24 (Fig. 28). Além disso, o clone 20 apresenta 21 pares de bases entre o sinal de poliadenilação e a cauda poli-A enquanto o clone 24 possui apenas 9.

Comparando-se as duas seqüências nucleotídicas relativas aos clones 20 e 24, quanto ao grau de identidade da janela aberta de leitura verificou-se uma igualdade correspondente a 98%.

Estudo semelhante foi realizado comparando-se ambas as seqüências nucleotídicas com aquelas existentes no banco de dados BLAST. Levou-se em consideração somente aquelas com homologia acima de 80% e, como resultado, obteve-se, para ambas proteínas, 85% e 83% de identidade com a seqüências de proteínas semelhantes à SmaseD correspondentes ao cDNA de *L. boneti* Smase-like 3 (Genebank AY559845) e de *L. laeta* Smase-like H10 (Genebank, AY093601), respectivamente (Tabela 3).

% Identidade da seqüência nucleotídica	cDNA 24	<i>L. boneti</i> 3*	<i>L. laeta</i> H10
cDNA 20	98,1%	85,5%	83,1%
cDNA 24		85,9%	83,4%
<i>L. boneti</i> 3			81,5%

*Seqüência de cDNA incompleta

Tabela 3 - Comparação entre as seqüências nucleotídicas dos cDNA dos clones 20 e 24 com as seqüências de *L. boneti* 3 e *L. laeta* H10.

O alto grau de conservação de bases nucleotídicas de algumas regiões pode ser visto pelo perfil do histograma (Fig. 27).

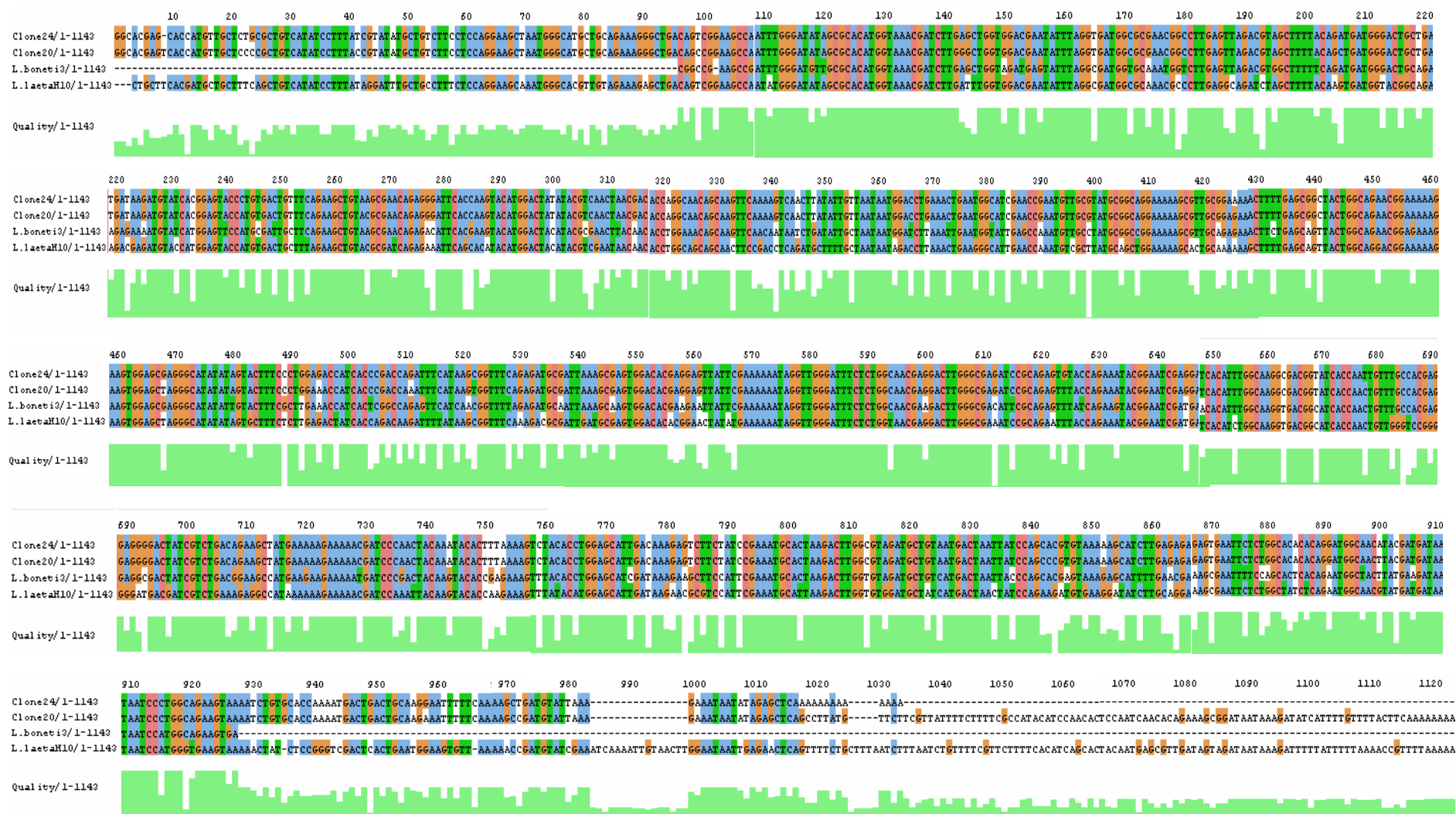


Figura 27 – Histograma correspondente ao alinhamento das seqüências nucleotídicas de proteínas do gênero *Loxosceles* com identidade acima de 85%. As seqüências do clone 20 e clone 24 são comparadas àquelas encontradas no veneno de *L. boneti* cDNA 3 (Genebank AY559845) e *L. laeta* H10 (Genebank AY093600). O grau de conservação entre as seqüências está representada pelo histograma.

4.11.1 CARACTERIZAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS PROTÉICAS DEDUZIDAS UTILIZANDO-SE ALGORITMOS

4.11.1.1 Peptídeo sinal e a proteína madura

Ambas as sequências protéicas deduzidas a partir do seqüenciamento do inserto de cDNA foram submetidas à análise, através de algoritmos, de peptídeos sinais. Para tanto, foram utilizados dois programas: SignalP 3.0 e Polyphobius disponíveis nos endereços: <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/> e <http://phobius.cgb.ki.se/poly.html>, respectivamente. Para a predição do peptídeo sinal foram utilizados os resultados obtidos com Neural Networks (NN) e Hidden Markov Models (HMM) ambos utilizados para sistemas eucariotos.

Esses algoritmos levam em conta a presença de três domínios característicos do peptídeo sinal: uma região amino terminal carregada positivamente (N region), outra não polar e hidrofóbica (H region) e uma última região de clivagem polar (C region). As sequências de aminoácidos destas regiões não são obrigatoriamente conservadas, ao contrário do que acontece com as propriedades físico-químicas dos mesmos.

Através desses programas foi possível estimar os sítios de clivagem. Para tanto foram utilizados três algoritmos sendo que um deles, Signal P-NN, acusou a presença de um propeptídeo composto por cinco ou oito aminoácidos como mostrado na figura 28 e com maiores detalhes nos apêndices I a IV.

Foi possível propor que a região do peptídeo sinal é constituída por 21 aminoácidos incluindo-se aqueles que compõem o provável propeptídeo (Fig. 28). Com estes dados, verificou-se que a proteína madura de ambas as isoformas é constituída por 283 aminoácidos.

Devido às pequenas diferenças existentes entre as proteínas maduras, aquela referente ao clone 20 apresenta o massa molecular e *pI* teóricos de 32.036,18 Da e 6.36, respectivamente. Apesar de haver 98% de identidade entre os cDNAs de ambos os clones, calcula-se que a proteína madura correspondente ao clone 24 tenha massa molecular de 32.180,31 kDa e *pI* de 5.94.

1	10	20	30	40	50	60	70	
ggcaccgagtcacc	ATG TTG CTC CCC GCT GTC ATA TCC TTT ACC GTA TAT GCT TTC CTC CAG GAA GCT							
	Met Leu Leu Pro Ala Val Ile Ser Phe Thr Val Tyr Ala Val Phe Leu Gln Glu Ala							
	M L L P A V I S F T V Y A V F L Q E A							
	-21		-15		-10	-8	-5	
80	90	100	110	120	130			
AAT GGG CAT GCT GCA GAA AGG GCT GAC AGC CGG AAG CCA ATT TGG GAT ATA GCG CAC ATG GTA AAC GAT								
Asn Gly His Ala Ala Glu Arg Ala Asp Ser Arg Lys Pro Ile Trp Asp Ile Ala His Met Val Asn Asp								
N G H A A E R A D S R K P I W D I A H M V N D								
-1	1	5	10	15	20			
140	150	160	170	180	190	200		
CTT GGG CTG GTG GAC GAA TAT TTA GGT GAT GGC GCG AAC GGC CTT GAG TTA GAC GTA GCT TTT ACA GCT								
Leu Gly Leu Val Asp Glu Tyr Leu Gly Asp Gly Ala Asn Gly Leu Glu Leu Asp Val Ala Phe Thr Ala								
L G L V D E Y L G D G A N G L E L D V A F T A								
25	30	35	40					
210	220	230	240	250	260	270		
GAT GGG ACT GCT GAT AAG ATG TAT CAC GGA GTA CCA TGT GAC TGT TTC AGA AGC TGT ACG CGA ACA GAG								
Asp Gly Thr Ala Asp Lys Met Tyr His Gly Val Pro Cys Asp Cys Phe Arg Ser Cys Thr Arg Thr Glu								
D G T A D K M Y H G V P C D C F R S C T R T E								
45	50	55	60	65				
280	290	300	310	320	330	340		
GGA TTC ACC AAG TAC ATG GAC TAT ATA CGT CAA CTA ACG ACA CCA GGC AAC AGC AAG TTC AAA AGT CAA								
Gly Phe Thr Lys Tyr Met Asp Tyr Ile Arg Gln Leu Thr Thr Pro Gly Asn Ser Lys Phe Lys Ser Gln								
G F T K Y M D Y I R Q L T T P G N S K F K S Q								
70	75	80	85	90				
350	360	370	380	390	400	410		
CTT ATA TTG TTA ATA ATG GAC CTG AAA CTG AAT GGC ATC GAA CCG AAT GTT GCG TAT GCG GCA GGA AAA								
Leu Ile Leu Leu Ile Met Asp Leu Lys Leu Asn Gly Ile Glu Pro Asn Val Ala Tyr Ala Ala Gly Lys								
L I L L I M D L K L N G I E P N V A Y A A G K								
95	100	105	110					
420	430	440	450	460	470	480		
AGC GTT GCG GAG AAA CTT TTG AGC GGC TAC TGG CAG AAC GGA AAA AGT GGA GCT AGG GCA TAT ATA GTA								
Ser Val Ala Glu Lys Leu Leu Ser Gly Tyr Trp Gln Asn Gly Lys Ser G A R A Y I V								
S V A E K L L S G Y W Q N G K S G A R A Y I V								
115	120	125	130	135				
490	500	510	520	530	540	550		
CTT TCC CTG GAA ACC ATC ACC CGA CCA AAT TTC ATA AGT GGT TTC AGA GAT GCG ATT AAA GCG AGT GGA								
Leu Ser Leu Glu Thr Ile Thr Arg Pro Asn Phe Ile Ser Gly Phe Arg Asp Ala Ile Lys Ala Ser Gly								
L S L E T I T R P N F I S G F R D A I K A S G								
140	145	150	155					
560	570	580	590	600	610	620		
CAC GAG GAG TTA TTC GAA AAA ATA GGT TGG GAT TTC TCT GGC AAC GAG GAC TTG GGC GAG ATC CGC AGA								
His Glu Glu Leu Phe Glu Lys Ile Gly Trp Asp Phe Ser Gly Asn Glu Asp Leu Gly Glu Ile Arg Arg								
H E E L F E K I G W D F S G N E D L G E I R R								
160	165	170	175	180				
630	640	650	660	670	680	690		
GTT TAC CAG AAA TAC GGA ATC GAG GAT CAC ATT TGG CAA GGC GAC GGT ATC ACC AAC TGT TTG CCA CGA								
Val Tyr Gln Lys Tyr Gly Ile Glu Asp His Ile Trp Gln Gly Asp Gly Ile Thr Asn Cys Leu Pro Arg								
V Y Q K Y G I E D H I W Q G D G I T N C L P R								
185	190	195	200	205				
700	710	720	730	740	750	760		
GGG GAC TAT CGT CTG ACA GAA GCT ATG AAA AAG AAA AAC GAT CCC AAC TAC AAA TAC ACT TTA AAA GTC								
Gly Asp Tyr Arg Leu Thr Glu Ala Met Lys Lys Lys Asn Asp Pro Asn Tyr Lys Lys Thr Leu Lys Val								
G D Y R L T E A M K K K N D P N Y K Y T L K V								
210	215	220	225					
770	780	790	800	810	820			
TAC ACC TGG AGC ATT GAC AAA GAG TCT TCT ATC CGA AAT GCA CTA AGA CTT GGC GTA GAT GCT GTA ATG								
Tyr Thr Trp Ser Ile Asp Lys Glu Ser Ser Ile Arg Asn Ala Leu Arg Leu Gly Val Asp Ala Val Met								
Y T W S I D K E S S I R N A L R L G V D A V M								
230	235	240	245	250				
830	840	850	860	870	880	890		
ACT AAT TAT CCA GCC CGT GTA AAA AGC ATC TTG AGA GAG AGT GAA TTC TCT GGC ACA CAC AGG ATG GCA								
Thr Asn Tyr Pro Ala Arg Val Lys Ser Ile Leu Arg Glu Ser Glu Phe Ser Gly Thr His Arg Met Ala								
T N Y P A R V K S I L R E S E F S G T H R M A								
255	260	265	270					
900	910	920	930	940	950	960	970	
ACT TAC GAT GAT AAT CCC TGG CAG AAG TAA aa tctgtgcacc aaaatgactg actgcaagaa atttttcaaaa gccga								
Thr Tyr Asp Asp Asn Pro Trp Gln Lys								
T Y D D N P W Q K *								
275	280							
980	990	1000	1010	1020	1030	1040	1050	1060
tgtat taagaaata atataagagct cagccttatg ttcttcggtta tttttcttttc gccatacatc caacactcca atcaacacag								
1070	1080	1090	1100					
aaagcggata ataaagatat cattttgttt tactttcaaaa aaaaaa								

A

1	10	20	30	40	50	60	70
ggcacgagcacc	ATG TTG CTC TGC GCT GTC ATA TCC TTT ATC GTA TAT GCT	GTC TTC CTC CAG GAA GCT AAT					
	Met Leu Leu Cys Ala Val Ile Ser Phe Ile Val Tyr Ala	Val Phe Leu Gln Glu Ala Asn					
	M L L C A V I S F I V Y A	V F L Q E A N					
	-21		-15		-10	-8	-5
GGG	CAT GCT GCA GAA AGG GCT GAC AGT CCG AAG CCA ATT TGG GAT ATA GCG CAC ATG GTA AAC GAT CTT						
Gly	His Ala Ala Glu Arg Ala Asp Ser Arg Lys Pro Ile Trp Asp Ile Ala His Met Val Asn Asp Leu						
G	H A A E R A D S R K P I W D I A H M V N D L						
-1	1	5	10	15	20		
GAG CTG GTG GAC GAA TAT TTA GGT GAT GGC GCG AAC GGC CTT GAG TTA GAC GTA GCT TTT ACA GAT GAT							
Glu Leu Val Asp Glu Tyr Leu Gly Asp Gly Ala Asn Gly Leu Glu Leu Asp Val Ala Phe Thr Asp Asp							
E L V D E Y L G D G A N G L E L D V A F T D D							
	25	30	35	40	45		
GGG ACT GCT GAT AAG ATG TAT CAC GGA GTA CCC TGT GAC TGT TTC AGA AGC TGT AAG CGA ACA GAG GGA							
Gly Thr Ala Asp Lys Met Tyr His Gly Val Pro Cys Asp Cys Phe Arg Ser Cys Lys Asr Thr Glu Gly							
G T A D K M Y H G V P C D C F R S C K R T E G							
	50	55	60	65			
280	290	300	310	320	330	340	
TTC ACC AAG TAC ATG GAC TAT ATA CGT CAA CTA ACG ACA CCA GGC AAC AGC AAG TTC AAA AGT CAA CTT							
Phe Thr Lys Tyr Met Asp Tyr Ile Arg Gln Leu Thr Thr Pro Gly Asn Ser Lys Phe Lys Ser Gln Leu							
F T K Y M D Y I R Q L T P G N S K F K S Q L							
	70	75	80	85	90		
350	360	370	380	390	400	410	
ATA TTG TTA ATA ATG GAC CTG AAA CTG AAT GGC ATC GAA CCG AAT GTT GCG TAT GCG GCA GGA AAA AGC							
Ile Leu Leu Ile Met Asp Leu Lys Leu Asn Gly Ile Glu Pro Asn Val Ala Tyr Ala Ala Gly Lys Ser							
I L L I M D L K L N G I E P N V A Y A A G K S							
	95	100	105	110			
420	430	440	450	460	470	480	
GTT GCG GAA AAA CTT TTG AGC GGC TAC TGG CAG AAC GGA AAA AGT GGA GCG AGG GCA TAT ATA GTA CTT							
Val Ala Glu Lys Leu Leu Ser Gly Tyr Trp Gln Asn Gly Lys Ser Gly Ala Arg Ala Tyr Ile Val Leu							
V A E K L L S G Y W Q N G K S G A R A Y I V L							
	115	120	125	130	135		
490	500	510	520	530	540	550	
TCC CTG GAG ACC ATC ACC CGA CCA GAT TTC ATA AGC GGT TTC AGA GAT GCG ATT AAA GCG AGT GGA CAC							
Ser Leu Glu Thr Ile Thr Arg Pro Asp Phe Ile Ser Gly Phe Arg Asp Ala Ile Lys Ala Ser Gly His							
S L E T I T R P D F I S G F R D A I K A S G H							
	140	145	150	155	160		
560	570	580	590	600	610	620	
GAG GAG TTA TTC GAA AAA ATA GGT TGG GAT TTC TCT GGC AAC GAG GAC TTG GGC GAG ATC CGC AGA GTG							
Glu Glu Leu Phe Glu Lys Ile Gly Trp Asp Phe Ser Gly Asn Glu Asp Leu Gly Glu Ile Arg Arg Val							
E E L F E K I G W D F S G N E D L G E I R R V							
	165	170	175	180			
630	640	650	660	670	680	690	
TAC CAG AAA TAC GGA ATC GAG GAT CAC ATT TGG CAA GGC GAC GGT ATC ACC AAT TGT TTG CCA CGA GGG							
Tyr Gln Lys Tyr Gly Ile Glu Asp His Ile Trp Gln Gly Asp Gly Ile Thr Asn Cys Leu Pro Art Gly							
Y Q K Y G I E D H I W Q G D G I T N C L P R G							
	185	190	195	200	205		
700	710	720	730	740	750	760	
GAC TAT CGT CTG ACA GAA GCT ATG AAA AAG AAA AAC GAT CCC AAC TAC AAA TAC ACT TTA AAA GTC TAC							
Asp Tyr Arg Leu Thr Glu Ala Met Lys Lys Lys Asn Asp Pro Asn Tyr Lys Tyr Thr Leu Lys Val Tyr							
D Y R L T E A M K K K N D P N Y K Y T L K V Y							
	210	215	220	225			
770	780	790	800	810	820	830	
ACC TGG AGC ATT GAC AAA GAG TCT TCT ATC CGA AAT GCA CTA AGA CTT GGC GTA GAT GCT GTA ATG ACT							
Thr Trp Ser Ile Asp Lys Glu Ser Ser Ile Arg Asn Ala Leu Arg Leu Gly Val Asp Ala Val Met Thr							
T W S I D K E S S I R N A L R L G V D A V M T							
	230	235	240	245	250		
840	850	860	870	880	890	900	
AAT TAT CCA GCA CGT GTA AAA AGC ATC TTG AGA GAG AGT GAA TTC TCT GGC ACA CAC AGG ATG GCA ACA							
Asn Tyr Pro Ala Arg Val Lys Ser Ile Leu Arg Glu Ser Glu Phe Ser Gly Thr His Arg Met Ala Thr							
N Y P A R V K S I L R E S E F S G T H R M A T							
	255	260	265	270	275		
910	920	930	940	950	960	970	
TAC GAT GAT AAT CCC TGG CAG AAG TAA aat ctgtgcacca aatgactga ctgcaaggaa tttttcaag ctgatgta							
Y D D N P W Q K *							
	280						
980	990	1000					
tt aaagaataa tatagagctc aaaaaaaaaa aaa							

B

Figura 28 – Sequência de nucleotídeos e aminoácidos da proteína relativa aos clones 20 (A) e 24(B). As regiões codificadoras estão representadas por letras maiúsculas e as não traduzidas por letras minúsculas. Os prováveis peptídeos sinais estão em negrito e as supostas proteínas maduras estão evidenciadas em cinza. As regiões de clivagem estimadas por algoritmos estão simbolizadas por traços vermelhos e os sinais de poliadenilação, assim como as cadeias poli-A, estão em itálico. Os propeptídeos estimados pelo Signal P 3.0 - NN estão sublinhados.

4.11.1.2 Sítios de Glicosilação

Glicosilação é uma importante modificação pós-traducional capaz de influenciar o enovelamento, o tráfico, a solubilidade, antigenicidade e a atividade biológica das proteínas, bem como as interações célula-célula.

Tendo como base os achados de Veiga *et al.*(1999) sobre a influência da glicosilação na atividade dos componentes do veneno de *L. intermedia*, investigou-se a presença de sítios de N- e O-glicosilação utilizando-se programas disponíveis no *site*: <http://www.cbs.dtu.dk/services>. A predição destes sítios indicou ausência de potenciais sítios de O-glicosilação nas proteínas relativas aos clones 20 e 24. Por outro lado, há indicação de possíveis sítios de N-glicosilação, porém os algoritmos determinam uma baixa probabilidade devido aos baixos escores (Apêndice V).

Apesar de haver grande homologia entre as seqüências polipeptídicas dos clones 20 e 24, os mesmos divergem no aminoácido 146, onde se tem uma asparagina (N) substituída por um ácido aspártico (D).

1	HAAERADSRK	PIWDIAHMVN	DLGLVDEYLG	DGANGLLELDV	AFTADGTADK	MYHGVPDCDF	RSCSTRTEGFT
71	KYMDYIRQLT	TPGNSKFKSQ	LILLIMDLKL	NGIEPNVAYA	AGKSVAEKLK	SGYWQNGKSG	ARAYIVLSLE
141	TITRPNFISG	FRDAIKASGH	EELFEKIGWD	FSGNEDLGEI	RRVYQKYGIE	DHIWQGDGIT	NCLPRGDYRL
201	TEAMKKKNDP	NYKYTLKVYT	WSIDKESSIR	NALRLGVDAV	MTNYPARVKS	ILRESEFSGT	HRMATYDDNP WQK A

1	HAAERADSRK	PIWDIAHMVN	DLELVDEYLG	DGANGLLELDV	AFTDDGTADK	MYHGVPDCDF	RSCKRTEGFT
71	KYMDYIRQLT	TPGNSKFKSQ	LILLIMDLKL	NGIEPNVAYA	AGKSVAEKLK	SGYWQNGKSG	ARAYIVLSLE
141	TITRPNDFISG	FRDAIKASGH	EELFEKIGWD	FSGNEDLGEI	RRVYQKYGIE	DHIWQGDGIT	NCLPRGDYRL
201	TEAMKKKNDP	NYKYTLKVYT	WSIDKESSIR	NALRLGVDAV	MTNYPARVKS	ILRESEFSGT	HRMATYDDNP WQK B

Figura 29 – Possíveis sítios de N-glicosilação das proteínas relativas aos clones 20 (A) e 24(B). As asparaginas em vermelho são aquelas com escores superiores ao limiar dos algoritmos. O aminoácido localizado na posição 146 da proteína do clone 20, uma asparagina (N₁₄₆), é substituída por um ácido aspártico (D₁₄₆) no clone 24 havendo, dessa forma, a diferença de um estimado sítio de N-glicosilação.

4.11.1.3 Sítios de Fosforilação

Os possíveis sítios de fosforilação foram estimados através do programa NetPhos 2.0 Server disponível em: <http://www.cbs.dtu.dk/services/>.

Esses potenciais sítios estão concentrados principalmente na região C-terminal, como pode ser verificado no apêndice VI.

Estima-se que a T₆₄ encontra-se possivelmente fosforilada na proteína referente ao clone 20, não ocorrendo o mesmo no clone 24. O inverso ocorre com a S₆₂ presente

na proteína relativa ao clone 24 possivelmente fosforilada, característica que não se repete na proteína do clone 20 (Fig. 30).

1	HAAERADSRK	PIWDIAHMVN	DLGLVDEYLG	DGANGLELDV	AF T ADGTADK	MYHGVPDCDF	R S CTRTEGFT
71	KYMDYIRQLT	TPGNSKFKSQ	LILLIMDLKL	NGIEPNVAYA	AGKSVAEKLL	SGYWQNGKSG	ARAYIVLSLE
141	TTTRPNFISG	FRDAIKASGH	EELFEKIGWD	F S GNEDLGEI	RRVYQKYGIE	DHIWQGDGIT	NCLPRGDYRL
211	TEAMKKKNDP	NYKYTLRVYT	WSIDKE S SIR	NALRLGVDAV	MTNYPARVKS	ILRE S EF S GT	HRMATYDDNP WQK A

1	HAAERADSRK	PIWDIAHMVN	DLELVDEYLG	DGANGLELDV	AF T DDGTADK	MYHGVPDCDF	R S CKRTEGFT
71	KYMDYIRQLT	TPGNSKFKSQ	LILLIMDLKL	NGIEPNVAYA	AGKSVAEKLL	SGYWQNGKSG	ARAYIVLSLE
141	TTTRPNFISG	FRDAIKASGH	EELFEKIGWD	F S GNEDLGEI	RRVYQKYGIE	DHIWQGDGIT	NCLPRGDYRL
211	TEAMKKKNDP	NYKYTLRVYT	WSIDKE S SIR	NALRLGVDAV	MTNYPARVKS	ILRE S EF S GT	HRMATYDDNP WQK B

Figura 30 – Possíveis sítios de fosforilação das proteínas relativas aos clones 20 (A) e 24 (B). Dentre os possíveis resíduos fosforilados (em vermelho), dois resíduos diferem quanto a esta probabilidade, são eles T₄₃ e S₆₂, evidenciados em negrito.

4.11.1.4 Outros sítios de modificação pós-traducionais

A análise das seqüências de aminoácidos da proteína madura referente aos clones 20 e 24 foram realizadas utilizando-se o programa ProSite disponível no endereço www.expasy.org/cgi-bin/prosite.

Esta análise revelou, em ambas as proteínas, a existência de sítios de fosforilação pela proteína quinase C (PKC), pela caseína quinase II (CK2) e pela tirosina quinase (TYR) além de sítios de N-miristoilação e sulfação de tirosina.

Proteínas N-miristoiladas possuem uma glicina N-terminal ligada covalentemente ao miristato, um ácido graxo saturado de 14 carbonos. Estas proteínas promovem uma irreversível interação membrana-proteína e proteína-proteína (Farazi *et al.*, 2001).

As proteínas com tirosina sulfatada também participam desta interação causada, muito provavelmente, pelo reconhecimento do grupamento sulfato. Algumas destas proteínas são identificadas como moduladoras de adesão leucocitária inflamatória (Kehoe & Bertozzi, 2000).

Na Tabela 4 estão descritos os sítios catalíticos estimados bem como a posição dos aminoácidos que os compõem.

Modificação por	Clone 20		Clone 24	
	Sítio Catalítico	Posição	Sítio Catalítico	Posição
			ScK	62 – 64
Fosforilação - PKC	TIK	222 – 227	TIK	222 – 227
	SiR	238 – 240	SiR	238 – 240
	ThR	270 – 272	ThR	270 – 272
Sulfatação de Tirosina	dlglvdeYlgdgang	21 - 35	dlelvdeYlgdgang	21 - 35
Fosforilação – CK2	TrtE	64 – 67		
	SvaE	114 – 117	SvaE	114 – 117
			TrpD	143 - 146
	SghE	158 – 161	SghE	158 – 161
	SgnE	172 – 175	SgnE	172 – 175
	TydD	275 - 278	TydD	275 - 278
N-miristoilação	GiepNV	102 – 107	GiepNV	102 – 107
Fosforilação - TYR	GItnCL	198 - 203	GItnCL	198 - 203
	KkknDpn.Y	215 - 222	KkknDpn.Y	215 - 222

Tabela 4 – Sítios de modificação pós-traducional das proteínas maduras relativas aos clones 20 e 24.

PKC – proteína cinase C; CK2 – caseína cinase II; TYR – tirosina cinase

4.11.1.5 Identificação de seqüências protéicas similares

O alinhamento e a verificação de seqüências de aminoácidos conservadas entre proteínas são bastante úteis no que diz respeito às informações sobre a função das mesmas. A análise de similaridade das seqüências de aminoácidos deduzidas a partir do cDNA dos clones 20 e 24 foram realizadas utilizando-se o programa BLASTp.

As seqüências de aminoácidos deduzidas dos cDNAs dos clones 20 e 24 mostraram grande similaridade com proteínas relacionadas a venenos de aranhas do gênero *Loxosceles* variando de 41,4 a 92,3 % (Tabela 5) com escores excelentes que variaram de 5e-62 a e-146 (Fig. 31).

Estas análises também permitiram a identificação de outras proteínas com baixos escores ($E = 0,009$ a $0,16$) que apresentam um alinhamento de 12,5% com a região C-terminal (resíduos 246 a 276) das seqüências estudadas. Estas proteínas, presentes em vários sistemas procaríotos e eucariotos, são classificadas como glicerofosforil-diéster-fosfodiesterases ou GDPD (pfam 03009).

Alinhamentos:		(bits)	Escore
gi 49458048 gb AAT66074.1 	sphingomyelinase D-like protein 3 [Lo...	518	e-146
gi 27372520 gb AAM21156.1 	sphingomyelinase-like protein [Loxosc...	494	e-138
gi 41019463 gb AAP97091.2 	sphingomyelinase P1 precursor [Loxosc...	288	1e-76
gi 57792507 gb AAW56831.1 	sphingomyelinase D precursor [Loxosce...	285	1e-75
gi 33348850 gb AAQ16123.1 	dermonecrotic protein 1 [<i>Loxosceles i...</i>	281	1e-74
gi 41019465 gb AAP97092.2 	sphingomyelinase P2 precursor [Loxosc...	276	5e-73
gi 62275780 gb AAW78234.1 	dermonecrotic protein [<i>Loxosceles sim...</i>	276	5e-73
gi 49458050 gb AAT66075.1 	sphingomyelinase D protein 1 [Loxosce...	272	7e-72
gi 56694551 gb AAW22997.1 	sphingomyelinase D-like protein 2 [Lo...	272	1e-71
gi 49458046 gb AAT66073.1 	sphingomyelinase D protein 1 [Loxosce...	271	2e-71
gi 49458052 gb AAT66076.1 	sphingomyelinase D protein 2 [Loxosce...	270	4e-71
gi 56694553 gb AAW22998.1 	sphingomyelinase D-like protein 3 [Lo...	268	1e-70
gi 41017948 sp Q7Z1Y7 SMAD_LOXAR	Sphingomyelinase D precursor (S...	267	2e-70
gi 27372516 gb AAM21154.1 	sphingomyelinase I [<i>Loxosceles laeta</i>]...	249	9e-65
gi 55775801 gb AAP44735.2 	sphingomyelinase D dermonecrotic enzy...	243	7e-63
gi 27372518 gb AAM21155.1 	sphingomyelinase-like protein [Loxosc...	240	5e-62
gi 19713139 gb AAL93990.1 	Glycerophosphoryl diester phosphodies...	43	0.009
gi 34763559 ref ZP_00144495.1 	Glycerophosphoryl diester phospho...	42	0.027
gi 51328580 gb AAH80230.1 	Glycerophosphodiester phosphodiester...	40	0.058
gi 6459876 gb AAF11631.1 	glycerophosphoryl diester phosphodiest...	40	0.072
gi 41406578 ref NP_959414.1 	hypothetical protein MAP0480 [<i>Mycob...</i>	40	0.12
gi 52142827 ref YP_084004.1 	glycerophosphoryl diester phosphodi...	39	0.14
gi 47527959 ref YP_019308.1 	glycerophosphoryl diester phosphodi...	39	0.15
gi 29896352 gb AAP09632.1 	Glycerophosphoryl diester phosphodies...	39	0.16
...			A

Alinhamentos:		(bits)	Escore
gi 49458048 gb AAT66074.1 	sphingomyelinase D-like protein 3 [Lo...	540	e-152
gi 27372520 gb AAM21156.1 	sphingomyelinase-like protein [Loxosc...	506	e-142
gi 41019463 gb AAP97091.2 	sphingomyelinase P1 precursor [Loxosc...	301	1e-80
gi 33348850 gb AAQ16123.1 	dermonecrotic protein 1 [<i>Loxosceles i...</i>	295	9e-79
gi 57792507 gb AAW56831.1 	sphingomyelinase D precursor [Loxosce...	295	1e-78
gi 41019465 gb AAP97092.2 	sphingomyelinase P2 precursor [Loxosc...	290	3e-77
gi 62275780 gb AAW78234.1 	dermonecrotic protein [<i>Loxosceles sim...</i>	290	5e-77
gi 56694551 gb AAW22997.1 	sphingomyelinase D-like protein 2 [Lo...	285	1e-75
gi 49458052 gb AAT66076.1 	sphingomyelinase D protein 2 [Loxosce...	281	2e-74
gi 41017948 sp Q7Z1Y7 SMAD_LOXAR	Sphingomyelinase D precursor (S...	281	2e-74
gi 49458050 gb AAT66075.1 	sphingomyelinase D protein 1 [Loxosce...	280	3e-74
gi 49458046 gb AAT66073.1 	sphingomyelinase D protein 1 [Loxosce...	278	9e-74
gi 56694553 gb AAW22998.1 	sphingomyelinase D-like protein 3 [Lo...	276	7e-73
gi 27372516 gb AAM21154.1 	sphingomyelinase I [<i>Loxosceles laeta</i>]...	259	7e-68
gi 55775801 gb AAP44735.2 	sphingomyelinase D dermonecrotic enzy...	255	1e-66
gi 27372518 gb AAM21155.1 	sphingomyelinase-like protein [Loxosc...	251	2e-65
gi 31296498 gb AAP46537.1 	sphingomyelinase D-like protein [Loxo...	152	2e-35
gi 31296494 gb AAP46535.1 	sphingomyelinase D - like protein [Lo...	89	2e-16
gi 31296496 gb AAP46536.1 	sphingomyelinase D - like protein [Lo...	50	9e-05
gi 19713139 gb AAL93990.1 	Glycerophosphoryl diester phosphodies...	43	0.011
gi 34763559 ref ZP_00144495.1 	Glycerophosphoryl diester phospho...	42	0.031
gi 51328580 gb AAH80230.1 	Glycerophosphodiester phosphodiester...	40	0.059
gi 15023284 gb AAK78410.1 	Glycerophosphoryl diester phosphodies...	40	0.12
gi 47206474 emb CAF91427.1 	unnamed protein product [<i>Tetraodon n...</i>	39	0.16
gi 49477820 ref YP_036772.1 	glycerophosphoryl diester phosphodi...	39	0.16
gi 52142827 ref YP_084004.1 	glycerophosphoryl diester phosphodi...	39	0.16
...			

Figura 31 - Alinhamento de seqüências de aminoácidos gerado pelo programa PSI-BLAST para as proteínas correspondentes ao cDNA 20 (A) e 24 (B). As reticências indicam a existência de outras seqüências alinhadas, porém com escores muito superiores aos mostrados.

Este programa permitiu a identificação de várias proteínas homólogas cujas seqüências foram alinhadas (Apêndice VII).

Utilizando-se o programa Clustal W foi possível alinhar as seqüências de homólogas permitindo assim a identificação de aminoácidos ou seqüências peptídicas altamente conservadas entre as proteínas correspondentes a outras espécies de aranhas do gênero *Loxosceles*.

Verifica-se, nitidamente, a conservação das cisteínas intra e interespecies dentre as 15 seqüências de aminoácidos referentes a estas proteínas, incluindo aquelas referentes aos clones 20 e 24 da biblioteca de cDNA da glândula de *L. intermedia* (Apêndice VI). A exceção são duas proteínas componentes do veneno de *L. laeta*, sendo uma delas classificada como uma esfingomielinase D (H17 AY093599) e a segunda, aparentemente, sem atividade esfingomielinásica ou hemolítica (H13 AY093600).

% Identidade	cDNA24	La1	La2	La3	Lb1	Lb3	Li_LiD1	LiP 1	LiP2	LIH10	LIH13	LIH17	Lr_prec	L.r1	L.r2	LsD1
cDNA20	98,0	45,1	45,7	45,6	45,8	91,2	46,0	46,0	44,1	81,6	41,4	44,3	47,9	45,1	46,2	47,1
cDNA24		45,5	46,0	45,3	45,5	92,3	47,5	46,4	44,2	82,0	41,4	44,3	45,9	44,7	46,2	47,5
<i>L.arizonica</i> 1			94,0	90,5	86,7	45,4	79,9	80,9	79,8	44,2	58,2	59,1	87,5	87,8	86,8	80,9
<i>L. arizonica</i> 2				89,4	83,7	46,0	78,8	72,0	68,8	43,6	58,4	61,5	87,0	86,2	86,5	79,6
<i>L.arizonica</i> 3					90,3	46,2	82,0	74,5	72,8	43,1	56,3	58,8	82,6	89,2	87,4	83,5
<i>L. boneti</i> 1						46,5	82,7	91,6	82,6	46,4	58,2	57,4	87,5	91,4	87,5	83,0
<i>L.boneti</i> 3							47,4	48,2	47,6	78,8	41,4	44,4	48,4	45,4	47,6	47,8
<i>L.intermedia</i> LiD1								99,0	88,7	45,2	59,5	59,3	83,3	84,1	85,2	99,6
<i>L. intermedia</i> P1									86,9	41,2	55,8	59,1	83,0	84,5	85,2	99,6
<i>L. intermedia</i> P2										39,9	55,6	58,8	85,2	83,0	87,6	90,0
<i>L.laeta</i> H10											40,9	44,4	45,7	45,3	45,6	45,1
<i>L.laeta</i> H13												81,3	61,4	60,0	45,6	59,8
<i>L. laeta</i> H17													60,0	60,2	59,9	59,6
<i>L.reclusa</i>_prec														90,0	99,3	85,9
<i>L. reclusa</i> 1															90,0	84,1
<i>L reclusa</i> 2																85,6

Tabela 5 – Porcentagem de identidade entre as seqüências de aminoácidos correspondentes às proteínas maduras componentes dos venenos de aranhas do gênero *Loxosceles*. *L. arizonica* - La (cDNA1 (AF512953), cDNA 2 (AY699703), cDNA 3 (AY699704); *L. boneti* - Lb (cDNA 1 (AY559844), cDNA 3 (AY559845); *L. intermedia* - Li (cDNA20, cDNA24, LiD1 (AY340702), P1 (AY304471) e P2 (AY304472); *L. laeta* – Ll (H10 (AY093601), H13 (AY093600) e H17 (AY093599); *L. reclusa* – Lr (Lr_prec (AY862486), cDNA1 (AY559846), cDNA2 (AY559847); *L.similis* – LsD1 (AY929305).

4.11.1.6 Estudo de domínios conservados entre famílias de proteínas

O algoritmo Blastp também indica quando a proteína analisada apresenta algum domínio semelhante a algum outro característico de famílias de proteínas que estão depositadas no banco de dados mantidos pela comunidade científica.

O programa mostrou que a proteínas deduzidas a partir do cDNA dos clones 20 e 24 apresentam a região C-terminal conservada entre si. Dessa forma, a seqüência alinhada à glicerofosforildiéster fosfodiesterase (GDPD), entre os aminoácidos 247 e 276, é igual para ambas, havendo pequena diferença entre os escores, como mostrado na figura abaixo:

Alinhamentos significativos:	Bits	E
Clone 20	37.3	0.002
Clone 24	36.9	0.003

[gnlCDDI26006](#) pfam03009, GDPD, Glycerophosphoryl diester phosphodiester...

Clone 20 ou 24:	247	LKVY T WSID K ESS I R N AL R LGVD A VM T N Y P	276
Sbjct:	209	LKV H V W T V N N E D MR R LL K LGVD G V I T D RP	238

Figura 32 – Alinhamento de domínios conservados entre as proteínas deduzidas a partir dos cDNAs dos clones 20 e 24 com proteínas da família GDPD. Resíduos evidenciados em vermelho são idênticos e aqueles em azul apresentam alguma similaridade.

A família GDPD é constituída por proteínas que podem ser encontradas tanto no citoplasma quanto no citossol de bactérias *E. coli*. Estas enzimas apresentam ampla especificidade para substratos como glicerofosfodiésteres, glicerofosfocolinas, glicerofosfoglicerol, entre outros, hidrolizando-os.

Através dessa mesma base de dados, verificou-se um escore um pouco melhor ($2e-05$) para uma GDPD com 247 aminoácidos (Kasahara *et al.*, 1989), denominada UgpQ (COG0584), encontrada em cepas de *E. coli* K12 (Fig. 33). Houve um alinhamento de 87,5 e 91,8% com as seqüências relativas aos clones 20 e 24, respectivamente.

A proteína deduzida a partir do clone 20 apresenta um domínio conservado semelhante ao da UgpQ entre os resíduos 32 e 264, enquanto aquela derivada do cDNA 24 apresentou maior identidade com a proteína em questão, iniciando o alinhamento no aminoácido 20.

		gnl CDD 10454 COG0584, UgpQ, Glycerophosphoryl diester phosphodiesterase [Energy production and conversion].			
		CD-Length = 257 residues, 87.2% aligned			
		Score = 44.0 bits (103), Expect = 2e-05			
Clone20:	32	G	A	91	
Sbjct:	33	G	A	88	
Clone20:	92	I	L	138	
Sbjct:	89	G	E	148	
Clone20:	139	L	E	196	
Sbjct:	149	F	D	201	
Clone 20:	197	D	G	256	
Sbjct:	202	L	A	248	
Clone 20:	257	R	V	264	
Sbjct:	249	L	A	256	
					A
		gnl CDD 10454 COG0584, UgpQ, Glycerophosphoryl diester phosphodiesterase [Energy production and conversion].			
		CD-Length = 257 residues, 91.8% aligned			
		Score = 43.3 bits (101), Expect = 3e-05			
Clone24:	20	N	D	79	
Sbjct:	21	N	T	80	
Clone24:	80	T	T	130	
Sbjct:	81	G	S	140	
Clone24 :	131	A	R	188	
Sbjct:	141	D	D	196	
Clone24:	189	I	E	248	
Sbjct:	197	P	D	240	
Clone24:	249	A	V	264	
Sbjct:	241	G	L	256	
					B

Figura 33 – Alinhamento de domínios conservados entre as proteínas deduzidas a partir dos cDNAs dos clones 20 (A) e 24 (B) com a proteína UgpQ da família GDPD. Resíduos evidenciados em vermelho são idênticos e aqueles em azul apresenta alguma similaridade.

4.11.1.7 Estudos de homologia estrutural com a SmaseD de *L. laeta*

Ao se alinhar as seqüências de aminoácidos da proteína madura relativa aos clones 20 e 24 com a proteína derivada do cDNA H17 do veneno da aranha *L. laeta* verificou-se uma identidade de 44,3% (Fig. 34) e uma significativa similaridade ($E=3e-66$). Além disso, ambas as proteínas mantêm o padrão de conservação de aminoácidos envolvidos na catálise e na coordenação do metal Mg^{++} (Murakami *et al.*, 2005), inclusive a posição das quatro cisteínas (Apêndice IV).

A proteína recombinante relativa ao clone H17 (Genebank AY093599), denominada Smase I, teve sua estrutura molecular resolvida, recentemente, por cristalografia (Murakami *et al.*, 2005). Este trabalho demonstrou que a unidade

fundamental desta proteína é formada por uma estrutura distorcida TIM Barrel composta por 8 folhas β e 8 alfa hélices.

```

CLUSTAL W (1.82) multiple sequence alignment

Smase I      -----ADNRRPIWNLAHMVAQIPDFLDLGNALVADVTFKGS-VPTYTYHGTPCDFG 54
Clone24     HAAERADSRKPIWDIAHMVNDLVLVDEYLGDGANGLELDVAFTDDGTADKMYHGVPDCDF 60
              **.*:***:***** : : :*. **.* **.*:.... .. **.***

Smase I      RDCIRWEYFNVFLKTLREYTPGNAKYRDGFILFVLDLKTGSLNDQVRPAGENVAKELL 114
Clone24     RSCRTEGFTKYMDYIRQLTTPGNSKFKSQLILLIMDLKLNIEPNVAYAAGKSVAEKLL 120
              *. * * * . :. :. :*: *****:*. : **.:**.* .. : . **.:**.:**

Smase I      QNYWNNGNNGGRAYVVLSPDIGHYEFVRGFKEVLKKEGHEDLLEKVGYDFSGPYLPSLP 174
Clone24     SGYWQNGKSGARAYIVLSLETITRPDFISGFRDAIKASGHEELFEKIGWDFSG----NE 175
              ..**:*:.*.***:***** * : :*: **.:**.* **.:**.*:*****

Smase I      TLDATHEAYKKAGVDGHIWLSGLTNFSPLGDMARLKEAIKSRDSAN-GFINKIYYWSVD 233
Clone24     DLGEIRRVYQKYGIEDHIWQGDGINTCLPRGDY-RLTEAMKKKNDPNYKYTLKVYTWSID 234
              * . :. :*: * :.*** **.* ** * ** **.*:*. :. : * : * **.*

Smase I      KVSTTKAALDVGVDGIMTNYPNVLIGVLKESGYNDKYRLATYDDNPWETFKN 285
Clone24     KESSIRNALRLGVDVMTNYPARVKSILRESEFSGTHRMTYDDNPWQK--- 283
              * * : * * :***:***** : .*:** :. :*:*****:..

```

Figura 34 – Alinhamento da proteína relativa ao cDNA 24 com Smase I de *L. laeta* com estrutura TIM barrel. Os asteriscos indicam a os resíduos em comum entre as seqüências e, os pontos, os aminoácidos com características semelhantes.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

O loxoscelismo é uma síndrome necrótico-hemolítica causada por acidentes com pequenos aracnídeos, popularmente chamados de “aranhas marrons”, pertencentes ao gênero *Loxosceles*. O envenenamento pode provocar uma reação sistêmica que, quando ocorre, pode causar falha renal e, conseqüentemente, ser letal.

As principais responsáveis por estas patologias são proteínas que compõem uma fração da peçonha altamente imunogênica do veneno desses aracnídeos (Chávez-Ortegui *et al.*, 1998; Guilherme *et al.*, 2001; Alvarenga *et al.*, 2003). Esta porção protéica localiza-se, em gel SDS-PAGE, próximo ao padrão de massa molecular de 32 kDa para *L. laeta* e de 35 kDa para as espécies *L. intermedia* e *L. gaucho* (Barbaro *et al.*, 1994). Estudos demonstram que um destes componentes seria uma toxina com atividade esfingomielinásica, denominada de esfingomielinase D - Smase D (Kurpiewski *et al.*, 1981).

O mecanismo de ação pelo qual ocorre a dermonecrose induzida pelo veneno loxoscélico ainda está obscuro. Estudos indicam que a SmaseD catalisa a hidrólise da esfingomielina, um esfingolípido presente na membrana celular, resultando em fosforilcolina e ceramida 1-fosfato, este último caracterizado como um segundo mensageiro na apoptose (Hannun & Yusuf, 1995; Goñi & Alonso, 2002). Recentemente, verificou-se que a SmaseD hidrolisa a lisofosfatidilcolina ou LPC (1-*o*-hexadecilglicero-3-fosfocolina), um importante componente plasmático, a um composto alquilado, o ácido lisofosfatídico ou LPA. Este ácido é um conhecido indutor de agregação plaquetária, de aumento da permeabilidade endotelial e de infiltração de neutrófilos (van Meeteren *et al.*, 2004).

Alguns pesquisadores demonstraram que se trata de um processo multifatorial envolvendo liberação de lamininas além de atuar sobre entactinas e heparan sulfato proteoglicanos cujas presenças são extremamente importantes para a estrutura e função de membranas basais (Veiga *et al.*, 2000a). Além disso, algumas proteínas foram caracterizadas como gelatinolíticas, fibronectinolíticas e fibrinogenolíticas (Feitosa *et al.*, 1998).

Quanto à atividade hemolítica, a SmaseD induz a susceptibilidade de eritrócitos humanos ao sistema complemento (Futrell *et al.*, 1979; Tambourgi *et al.*, 1998). Estudos mostram que esta enzima induz a ativação da via clássica do complemento pela exposição de fosfatidilserinas da membrana eritrocitária que provoca perda da

assimetria (Tambourgi *et al.*, 2002). A via alternativa é ativada pela clivagem de glicoforinas da superfície do glóbulo vermelho por metaloproteinases endógenas (Tambourgi *et al.*, 2000).

Na tentativa de auxiliar no entendimento proteômico, imunoquímico e molecular de proteínas componentes da fração dermonecrótica da peçonha da aranha *Loxosceles intermedia*, anticorpos monoclonais foram produzidos utilizando linfócitos de camundongos sensibilizados com este veneno e os clones selecionados pela reatividade à proteína recombinante LiD1 obtida a partir de uma biblioteca de cDNA da glândula do veneno de *L. intermedia* (Kalapothakis *et al.*, 2002) e com o veneno total de *L. intermedia*.

Dentre os treze anticorpos monoclonais obtidos, um deles, denominado de LimAb 1, identificou proteínas de baixa massa e, os outros doze reconheceram proteínas compatíveis com a fração dermonecrótica do veneno loxoscélico.

Um deles, denominado LimAb7, mostrou eficiente atividade neutralizante do efeito dermonecrótico (Alvarenga *et al.*, 2003) sendo capaz de inibir até 84,7% da hemólise induzida, *in vitro*, pelo veneno total de *Loxosceles intermedia*, porém em concentração 8 vezes maior daquela utilizada no ensaio dermonecrótico. Por outro lado, o anticorpo monoclonal neutralizante, na mesma concentração do ensaio hemolítico, inibiu somente 63,5 % da atividade esfingomielinásica do veneno.

Entretanto, este ensaio deve ser melhor otimizado uma vez que, nas condições em que foi realizado, os resultados obtidos com o antiveneno não reproduziram aqueles encontrados por Barbaro e colaboradores (2005), no qual a atividade esfingomielinásica foi totalmente neutralizada pelo soro polivalente.

Igualmente aos resultados obtidos por Guilherme *et al.* (2001) cujo anticorpo monoclonal fora feito contra o veneno de *L. gaucho*, o LimAb7 mostrou alta especificidade para o veneno utilizado como antígeno, no caso, o da aranha *L. intermedia* e, baixa reatividade cruzada com venenos de outras espécies (Alvarenga *et al.*, 2003). Este fato corrobora a hipótese de que as proteínas responsáveis pelo efeito tóxico podem apresentar diferentes epitopos (Barbaro *et al.*, 1994; Chávez Olórtegui, 1998) e muitas isoformas intra e interespecies (Tambourgi *et al.*, 1998).

Estudos independentes utilizando-se diferentes espécies de aranhas do gênero *Loxosceles* demonstraram a presença de inúmeras proteínas componentes da fração dermonecrótica. Inicialmente, em 1981, Kurpiweski e colaboradores separaram quatro diferentes isoformas ativas, com massa molecular próxima a 32 kDa, a partir do veneno

de *L. reclusa*. Estas proteínas, caracterizadas como SmaseD, apresentaram quatro diferentes pontos isoelétricos (pI): 8.7, 8.4, 8.2 e 7.8.

Posteriormente, duas isoformas com características esfingomielinásicas do veneno de *L. gaucho*, denominadas Loxnecrogin A e B (31,4 e 31,6 kDa) foram caracterizadas por espectrometria de massa (Cunha *et al.*, 2003). Mais recentemente, homólogos de SmasesD intra e interespecies dos venenos de *L. intermedia* (Kalapothakis *et al.*, 2002; Tambourgi *et al.*, 2004), *L. laeta* (Fernandes-Pedrosa *et al.*, 2002), *L. reclusa*, *L. boneti* (Ramos-Cerrillo *et al.*, 2004), *L. arizonica* (Binford *et al.*, 2005) e *L. similes* (Silvestre *et al.*, 2005) foram identificados.

Considerando-se o fato de que as aranhas utilizam seus venenos para paralisar, matar e digerir um número diverso de presas, seria de se esperar a presença de inúmeras isoformas (Rash & Hodgson, 2002). Como mostrado, neste estudo, muitas destas proteínas, com massa molecular próxima à faixa de 30 a 35 kDa, podem ser encontradas nos quatro venenos brutos analisados por isoeletrofocalização utilizando-se a eletroforese bidimensional.

Foi possível verificar que as proteínas constituintes do veneno de *L. intermedia* apresentam pI mais básico (pI>7) em relação aos pIs dos venenos de *L. laeta* de origem brasileira e peruana. Esta característica da fração dermonecrótica desta peçonha corrobora o perfil básico encontrado em outros estudos (Kurpiewski *et al.*, 1981; Tambourgi *et al.*, 1998; Luciano *et al.*, 2004) ainda que existam diferentes proteínas entre os massas moleculares de 24 a 20 kDa e outras de maior massa entre 66 e 97 kDa, todas com propriedades aniônicas.

Curiosamente, ainda que haja grande identidade entre as Smases dos diversos venenos loxoscélicos (Ramos-Cerrillo *et al.*, 2004; Binford *et al.*, 2005; Silvestre *et al.*, 2005) há um amplo espectro de pontos isoelétricos intra e interespecies (Kurpiewski *et al.*, 1981; Tambourgi *et al.*, 1994; Ramos-Cerrillo *et al.*, 2004) o que pode vir a ser um diferencial importante nas condições ideais de atividade e de especificidade dessas enzimas, uma vez que se comprovou, por dicroísmo circular, que mudanças conformacionais provocadas por mudanças de pH alteram as atividades biológicas dessas enzimas (Andrade *et al.*, 2005).

Binford e Wells (2003) demonstraram por SDS-PAGE (15% de acrilamida) a presença de muitos componentes dos venenos de aranhas *Loxosceles* com baixa massa molecular (<8 kDa) e, recentemente, proteínas inseticidas com massa molecular de 7,4, 7,9 e 5,6 kDa (LiTx1, LiTx2 e LiTx3) do veneno de *L. intermedia* foram identificadas

(Castro *et al.*, 2004). Talvez estas proteínas não tenham sido detectadas pela eletroforese 2D devido à limitação do gel em concentração de 12% de acrilamida utilizado no ensaio.

Utilizando-se o anticorpo monoclonal neutralizante LimAb7 em um *Western Blotting* do gel 2D de *L. intermedia* foi possível a identificação de várias outras proteínas de mesma massa molecular mas com diferentes pIs. O fato de estas proteínas terem sido reconhecidas por um mesmo anticorpo monoclonal ou terem epitopos em comum, sugere que estas moléculas possam fazer parte de uma família de proteínas do veneno loxoscélico relacionada com a atividade dermonecrótica e/ou hemolítica. O *pool* de anticorpos monoclonais restantes não apresentou o mesmo perfil de imunorreatividade que o LimAb7, porém também evidenciou um grande número de proteínas.

A diversidade de proteínas com mesma massa molecular e diferentes pIs reconhecidas pelo LimAb7 foi constatada com o resultado obtido com o gel SDS-PAGE 2D de proteínas do veneno de *L. intermedia* recuperadas de uma coluna de afinidade tendo como ligante este anticorpo monoclonal.

Em meio a tantas proteínas homólogas, que epitopo seria este, comum a todas estas proteínas imunorreativas frente ao LimAb7 e tão importante para a manutenção da atividade enzimática desencadeada pelo veneno de *L. intermedia*?

Para tentar responder esta questão, utilizou-se uma das metodologias mais amplamente utilizadas para a identificação de epitopos, a técnica de Spot-synthesis (Frank, 1992; Choulier *et al.*, 2001; Chavez-Olortegui *et al.*, 2002; Alvarenga *et al.* 2002, Machado de Ávila *et al.*, 2004). Esta etapa iniciou-se com a síntese paralela, sobre uma membrana de nitrocelulose, de peptídeos lineares com 15 ou 25 resíduos correspondentes à seqüência de aminoácidos baseada na seqüência de cDNA de uma das proteínas dermonecróticas de *L. intermedia* – LiD1 (Kalapothakis *et al.*, 2002). Esta proteína foi caracterizada previamente como sendo capaz de induzir anticorpos protetores em coelhos desafiados com o veneno bruto de *L. intermedia* (Araújo *et al.*, 2003).

O LimAb7 não foi capaz de se ligar às seqüências lineares de LiD1 mesmo sendo neutralizante das atividades dermonecróticas e hemolíticas, além de ser imunorreativo frente a ela nos ensaios de ELISA ou *Western Blotting*.

A certificação da qualidade da síntese e da reatividade/antigenicidade dos peptídeos foi demonstrada após incubação da membrana com anticorpos policlonais anti

fração dermonecrótica do veneno de *L. intermedia*. A porção N-terminal da proteína mostrou-se mais antigênica correspondendo a uma região altamente conservada entre as diferentes espécies de aranhas do gênero *Loxosceles* (Kalapothakis *et al.*, 2002; Binford *et al.*, 2005). Este fato pode explicar a alta reatividade cruzada (Barbaro *et al.*, 1994; Chávez-Olortegui *et al.*, 1998; Guilherme *et al.*, 2001) e a capacidade de antivenenos polivalentes de neutralizar a atividade dermonecrótica induzida por diferentes espécies (Barbaro *et al.*, 2005; Pretel *et al.*, 2005; Silvestre *et al.*, 2005).

Em um estudo recente do grupo do Prof. Carlos Chávez-Olortegui, anticorpos policlonais purificados por coluna de afinidade tendo peptídeos da região N-terminal imobilizados, demonstraram ser inibidores exclusivos da atividade hemolítica do veneno de *L. intermedia*.

A região N-terminal imunorreativa, incluindo-se uma pequena região C-terminal, apresentou resíduos em comum como asparagina (N) ou ácido aspártico (D) ou com características semelhantes como a fenilalanina (F) e a tirosina (Y).

Embora bibliotecas de fagos filamentosos sejam freqüentemente utilizadas na seleção de peptídeos homólogos à seqüência linear original (Scott & Smith, 1990; Murthy *et al.*, 1998; Choulier *et al.*, 2001), avaliou-se a possibilidade de identificar os epitopos descontínuos do LimAb7 utilizando-se a técnica de *Phage display* (Felici *et al.*, 1993; Adda *et al.*, 1999; Forster-Waldl *et al.*, 2005).

Phage display é uma metodologia, desenvolvida por Smith (1985), que se caracteriza pela combinação de técnicas moleculares na apresentação de peptídeos na superfície de fagos. A partir de uma biblioteca construída em fagos filamentosos, seleciona-se o peptídeo baseando-se em sua afinidade por um ligante-alvo fixado. No caso de anticorpos é possível selecionar e identificar seu(s) respectivo(s) epitopo(s).

Um epitopo é um pequeno determinante da superfície de um ligante com o qual uma segunda molécula tem um contato estérico específico (Smith & Petrenko, 1997). A técnica de *Phage display* (Smith, 1985) permite a determinação de mimotopos ou epitopos contínuos e descontínuos, principalmente quando se utilizam anticorpos monoclonais cuja grande maioria apresenta epitopos conformacionais (Smith & Petrenko, 1997).

O termo mimotopo foi proposto (Geysen *et al.* 1986) para denominar os peptídeos que mimetizavam o determinante antigênico, ou seja, que não apresentam a mesma seqüência de aminoácidos mas que mantêm suas propriedades físico-químicas. De fato, os pesquisadores Scott e Smith (1990) utilizaram anticorpos monoclonais, cujo

epitopo já tinha sido previamente caracterizado em um experimento, para se verificar se o epitopo encontrado por *Phage display* era o mesmo do original. O resultado foi a seleção de epitopos similares, embora não idênticos.

Análises cristalográficas de complexos antígeno-anticorpo mostraram que a maioria dos anticorpos monoclonais reconhece epitopos não lineares (Davies et. al., 1990), portanto, não houve surpresa quando não se encontrou homologia significativa entre a seqüência peptídica apresentada pelos fagos e a seqüência primária da LiD1. Por outro lado, todos os peptídeos isolados apresentaram resíduos em comum (K, D, W, L, F), além de duas cisteínas separadas por 7 ou 8 aminoácidos; fato interessante pois, das quatro bibliotecas utilizadas, aquela de 17-mer apresenta somente uma das cisteínas invariável.

Todos os mimotopos selecionados apresentaram características hidrofílicas nos primeiros resíduos e aminoácidos aromáticos (W, F, Y) no lado oposto. Na maioria dos clones, um resíduo ácido (D) está posicionado centralmente na seqüência. Estas características mostram a importância de alguns resíduos estarem em posições específicas, situação que pode influenciar na ligação antígeno-anticorpo.

O mimotopo selecionado com maior número de aminoácidos ou seja, 17 resíduos, foi sintetizado manualmente tendo suas cisteínas substituídas por duas serinas. A substituição resultou na perda de reatividade do peptídeo frente ao LimAb7 em ensaios de *Dot Blotting* ou ELISA. A importância da presença das cisteínas, de maneira a formar pontes dissulfeto, foi corroborada ao se verificar que este peptídeo após ser sintetizado de forma não cíclica e testado em membrana também não foi reconhecido pelo LimAb7 (dados não mostrados).

Com base nestes dados, verificou-se que quando os mimotopos foram sintetizados sobre uma membrana de nitrocelulose conservando-se as cisteínas e oxidando-as de forma a obter um peptídeo cíclico, um deles foi reativo frente ao LimAb7. Este peptídeo, “N C N K N D H L F A C W”, tem como característica, além da conformação, a presença de três asparaginas (N) intercaladas na região N-terminal e uma razão entre o número de aminoácidos polares *sem carga* sobre os *carregados* superior aos demais, o que pode vir a influenciar na ligação antígeno-anticorpo.

Os outros peptídeos não foram reconhecidos por haver alguma falha na síntese ou, mais provavelmente, por se tratarem de seqüências falso-positivas. Este fato pode acontecer por conta da ocorrência de artefatos durante a imunosseleção, momento em que o peptídeo somente reage com o anticorpo quando o mesmo se encontra na

superfície do fago (Felici *et al.*, 1993). Esta reação cruzada se deve, provavelmente, à contribuição da superfície viral na formação do mimotopo, ou seja, na existência de uma conformação específica entre o peptídeo expresso e a proteína do capsídeo do fago onde ele está ancorado (Murthy *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2001).

Confirmou-se a influência da presença da ponte dissulfeto na ligação do LimAb7 aos seus mimotopo quando as cisteínas destes peptídeos foram reduzidas e, posteriormente, alquiladas o que resultou em significativa redução da reatividade dos mesmos frente ao LimAb7 em um *Dot Blotting*. Estes dados sugerem que os epitopos do anticorpo monoclonal são conformacionais, uma vez que a presença de uma ponte dissulfeto intramolecular auxilia na formação do complexo antígeno-anticorpo. Porém, a presença das cisteínas, aparentemente, não é uma exigência única ao reconhecimento do mimotopo pelo LimAb7, visto que não houve reatividade quando se utilizou um peptídeo irrelevante, como controle negativo, contendo em sua seqüência dois destes resíduos (“I C A R Q D P A G N C S”). Portanto, o determinante antigênico além de ser conformacional, devido à presença da ponte dissulfeto, é dependente da existência de aminoácidos com características específicas em determinadas posições do peptídeo.

Uma vez que o epitopo do LimAb7 tenha sido reconhecido como conformacional e que pareça existir uma grande homologia entre as estruturas das proteínas componentes da fração dermonecrótica dos venenos de aranhas do gênero *Loxosceles* (Andrade *et al.*, 2005), o LimAb7 seria capaz de identificar isoformas da proteína LiD1 a partir de uma biblioteca de cDNA do veneno de *L. intermedia*?

Na tentativa de responder esta questão, um *pool* de trinta e duas sub-bibliotecas de cDNA da glândula de veneno da *L. intermedia*, gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Evanguedes Kalapothakis, foi utilizado como alvo em um *immunoscreening* empregando-se o LimAb7 com agente de captura (Young & Davis, 1983; Sambrook, 1989).

O anticorpo monoclonal neutralizante foi capaz de identificar dois cDNAs referentes aos clones 20 e 24 compostos por 1096 e 1000 pares de bases, respectivamente. Ambos os clones tiveram suas seqüências deduzidas caracterizadas como isoformas contendo um peptídeo sinal parcial e um possível propeptídeo.

Uma característica comum na caracterização de cDNAs a partir do mRNA das glândulas de veneno de aranhas do gênero *Loxosceles* é a dificuldade em se obter a seqüência de cDNA que permita a identificação de um peptídeo sinal completo (Kalapothakis *et al.*, 2002; Fernandes-Pedrosa *et al.*, 2002; Ramos-Cerrillo *et al.*, 2004;

Silvestre *et al.*, 2005). Este fato pode estar relacionado a uma possível degradação do mRNA em virtude da fragilidade da região 5' em questão.

A proteína madura deduzida referente ao clone 20 apresenta o massa molecular e *pI* teóricos de 32.036,18 Da e 6.36, respectivamente. Embora ambas apresentem 98% de identidade entre os seus cDNAs, calcula-se que a proteína madura correspondente ao clone 24 tenha massa molecular de 32.180,31 Da e *pI* de 5.94.

Este dado corrobora os resultados obtidos com o gel bidimensional das proteínas purificadas pela afinidade ao LimAb7 onde foi evidenciada uma variedade de proteínas com massas moleculares semelhantes e diferentes *pIs*, sendo estas diferenças, muitas vezes, estreitas como já reportado em outros estudos (Kurpiewski *et al.*, 1981).

Tendo como base os relato de Veiga e colaboradores (1999) de que a N-deglicosilação do veneno diminui sensivelmente a atividade dos componentes do veneno de *L. intermedia*, avaliou-se a presença de sítios de glicosilação das proteínas relativas aos clones 20 e 24 utilizando-se algoritmos.

Os programas utilizados indicaram a ausência e a baixa probabilidade de existência de sítios de O-glicosilação e N-glicosilação, respectivamente. Perfil semelhante foi visto com a proteína homóloga de *L. laeta*, *Smase-like* H10, fato que poderia explicar a inatividade desta proteína quanto a dermonecrose. Porém, a outra isoforma inativa (Ramos-Cerrillo *et al.*, 2004), originada do cDNA de *L. boneti*, *Smase-like* 3, tem um sítio clássico (“N E S E”) de N-glicosilação na região C-terminal

Curiosamente, as proteínas nativas correspondentes ao clone H17 de *L. laeta* e P1 de *L. intermedia* (Fernandes-Pedrosa *et al.*, 2002; Tambourgi *et al.*, 2004) segundo os autores, com atividade esfingomielinásica, não apresentam potenciais sítios de N-glicosilação (Binford *et al.*, 2005).

As pequenas diferenças existentes entre as proteínas estudadas quanto ao número de potenciais de sítios de fosforilação pode ser uma explicação ao grande número de proteínas com massa molecular e *pIs* semelhantes que aparecem no gel bidimensional dos venenos loxoscélicos.

Outros sítios de modificação pós-traducionais foram avaliados e preditos como, por exemplo, sítios de fosforilação por proteínas cinases C, caseína cinase II, tirosina cinase além de sítios de N-miristoilação e sulfatação de tirosina.

A alta porcentagem de identidade entre as duas proteínas bem como, com as seqüências depositadas nos bancos de dados indicam que ambas fazem parte da família *SmaseD*, muito embora suas homólogas sejam denominadas de *Smase-like* por,

aparentemente, não apresentarem atividade esfingomielinásica ou hemolítica (Fernandes-Pedrosa *et al.*, 2002; Ramos-Cerrilo *et al.*, 2004). Talvez, estas proteínas possam ter outras atividades biológicas do veneno já descritas (Feitosa *et al.*, 1998) como fibrinogenolíticas, fibronectinolíticas ou gelatinolíticas.

As seqüências de aminoácidos deduzidas a partir dos clones 20 e 24 quando comparadas a outras proteínas mantêm o padrão de conservação de alguns aminoácidos, inclusive aqueles envolvidos na catálise e na coordenação do metal Mg^{++} (Murakami *et al.*, 2005). Curiosamente, as quatro cisteínas existentes estão conservadas nas seqüências protéicas já descritas (Kalapothakis *et al.*, 2002; Ramos-Cerrillo *et al.*, 2004; Binford *et al.*, 2005; Silvestre *et al.*, 2005) com exceção de duas proteínas presentes no veneno de *L. laeta* - Smase I ou H17 e *L. laeta* H13.

Mesmo havendo a diferença na presença do par de cisteínas, supõe-se que as duas proteínas selecionadas neste estudo apresentem estrutura TIM barrel (Wierenga, 2001), uma vez que há uma significativa similaridade com a Smase I recombinante de *L. laeta*, recentemente cristalografada (Murakami *et al.*, 2005).

O presente trabalho teve como intenção empregar uma gama de metodologias modernas e outras já consagradas, de forma a utilizar um anticorpo monoclonal com características neutralizantes na identificação de epitopos e componentes do veneno de *L. intermedia* que podem vir a ter alguma utilidade biotecnológica no desenvolvimento de ensaios imunodiagnósticos ou de novas terapias, além de auxiliar no esclarecimento do mecanismo de ação do loxoscelismo.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

1. O veneno de *L. intermedia* é suficientemente imunogênico para permitir a produção de anticorpos monoclonais capazes de reconhecer diferentes proteínas em um gel bidimensional;
2. O anticorpo LimAb7 é capaz de neutralizar tanto a atividade dermonecrótica quanto a hemolítica e esfingomielinásica do veneno total da aranha *L. intermedia*;
3. A técnica de eletroforese bidimensional foi capaz de evidenciar a presença de inúmeros *spots* referentes a proteínas presentes no veneno das três diferentes espécies do gênero *Loxosceles* estudadas;
4. O LimAb7 reconhece epítipo conformacional, não reagindo com peptídeos lineares imobilizados na membrana de *Spot*;
5. A técnica de *Phage display* foi eficiente na seleção de mimotopos do LimAb7, os quais são dependentes de conformação, sendo porém, imprescindível a presença de resíduos específicos em determinadas posições do peptídeo;
6. A metodologia de imunosseleção utilizando-se um anticorpo monoclonal mostrou-se eficaz na identificação de proteínas originadas de uma biblioteca de cDNA;
7. Duas seqüências homólogas, relativas aos clones 20 e 24, originadas da biblioteca de cDNA da glândula de veneno de *L. intermedia*, foram identificadas como isoformas que fazem parte da família de proteínas dermonecróticas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADDA C.G., TILLEY L., ANDERS R.F., FOLEY M. Isolation of peptides that mimic epitopes on a malarial antigen from random peptide libraries displayed on phage. **Infect Immun** 67, 4679-4688, 1999.

ALBERICIO F.; CARPINO L.A. Coupling reagents and activation. In: **Solid-Phase peptide synthesis - Methods in Enzymology**, Ed. Gregg B. Fields, vol. 289, Academic Press, 104-126, 1997.

ALVARENGA L.M., DINIZ C.R., GRANIER C., CHÁVEZ-OLORTEGUI C. Induction of neutralizing antibodies against *Tityus serrulatus* scorpion toxins by immunization with a mixture of defined synthetic epitopes. **Toxicon**, 40, 89-95, 2002.

ALVARENGA L.M., MARTINS M.S., MOURA J.F., KALAPOTHAKIS E., OLIVEIRA J.C., MANGILI O.C., GRANIER C., CHÁVEZ-OLÓRTEGUI C.. Production of monoclonal antibodies capable of neutralizing dermonecrotic activity of *Loxosceles intermedia* spider venom and their use in a specific immunometric assay. **Toxicon** 42, 725-731, 2003.

ANDRADE R.M.G., LOURENÇO W.R., TAMBOURGI D.V. Comparison of the fertility between *Loxosceles intermedia* and *Loxosceles laeta* spiders. **J Arachnol** 28, 245-247, 2000.

ANDRADE S.A., FERNANDES-PEDROSA M.F., ANDRADE R.M.G., OLIVA M.L.V., van den BERG C., TAMBOURGI D.V. Conformational changes of *Loxosceles* venom sphingomyelinases monitored by circular dichroism. **Biochem Biophys Res Commun** 37, 117-123, 2005.

ARAÚJO S.C., CASTANHEIRA P., MAGALHÃES L.A., MANGILI O.C., KALAPHOTAKIS E., CHÁVEZ-OLORTEGUI C. Protection against dermonecrotic and lethal activities of *Loxosceles intermedia* spider venom by immunization with a fused recombinant protein. **Toxicon** 41, 261-267, 2003.

BABCOCK J.L., MARMER D.J., STEELE R.W. Immunotoxicology of brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*) venom. **Toxicon** 24, 783-790, 1986.

BARBARO K.C., CARDOSO J.L.C., EICKSTEDT V.D.R, MOTA I. IgG antibodies to *Loxosceles* sp spider venom in human envenoming. **Toxicon** 30, 1117- 1121, 1992a.

BARBARO K.C., CARDOSO, J.L.C EICKSTEDT V.R.D., MOTA I. Dermonecrotic and lethal components of *Loxosceles gaucho* spider venom. **Toxicon** 30, 331-338, 1992b.

BARBARO K.C., EICKSTEDT V.R.D., MOTA I. Antigenic cross-reactivity of venoms from medically important *Loxosceles* (Araneae) species in Brazil. **Toxicon** 32, 113-120, 1994.

BARBARO K.C., SOUSA M. V., MORHY L. EICKSTEDT V.R.D., MOTA I. Compared chemical properties of dermonecrotic and lethal toxins from spiders of genus *Loxosceles* (Araneae). **J Protein Chem**, 15, 337-343, 1996a.

BARBARO K.C., FERREIRA M.L., CARDOSO D.F., EICKSTEDT V.R.D., MOTA I. Identification and neutralization of biological activities in the venoms of *Loxosceles* spider. **Braz J Med Biol Res** 29, 1491-1497, 1996b.

BARBARO K.C., CARDOSO J.L.C. **Mecanismo de ação do veneno de *Loxosceles* e aspectos clínicos do loxoscelismo**. In: CARDOSO J.L.C., FRANÇA F.O.S, WEN F.H., MÁLAQUE C.M.S., HADDAD V. Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. Savier, São Paulo, 160-174, 2003.

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

BARRETO O.C.O., CARDOSO J.L.C., De CILLO D. Viscerocutaneous form of loxoscelism and erythrocyte glucose-6-phosphate deficiency. **Rev Inst Med Trop São Paulo** 27, 264-267, 1985.

- BINFORD G.J., WELLS M.A. The phylogenetic distribution of sphingomyelinase D activity in venoms of haplogyne spiders. **Comp Biochem Physiol B**, 135, 25-33, 2003.
- BINFORD G.J., CORDES M.H., WELLS M.A. Sphingomyelinase D from venoms of *Loxosceles* spiders: evolutionary insights from cDNA sequences and gene structure. **Toxicon** 45, 547-560, 2005.
- BITTLE J.L., HOUGHTEN R.A., ALEXANDER H., SHINNICK T.M., SUTCLIFFE J.G., LERNER R.A., ROWLANDS D.J., BROWN F. Protection against foot and mouth disease by immunization with a chemically synthesized peptide from the viral nucleotide sequence. **Nature** 298, 30-33, 1982.
- BLACKSTOCK W.P., WEIR M.P. Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. **Trends Biotechnol** 17, 121-127, 1999.
- BRAZ A., MINOZZO J.C., ABREU J.C., GUBERT I.C., CHÁVEZ-OLÓRTEGUI C. Development and evaluation of the neutralizing capacity of horse antivenom against the Brazilian spider *Loxosceles intermedia*. **Toxicon** 37, 1323-1328, 1999.
- CALDERON-ARANDA E.S., OLAMENDI-PORTUGAL A., POSSANI L.D. The use of synthetic peptides can be a misleading approach to generate vaccines against scorpion toxins. **Vaccine** 13, 1198-1206, 1995.
- CALDERON-ALANDA E.S., SELISKO B., YORK E.J., GURROLA G.B., STEWART J.M., POSAN L.D. Mapping of an epitope recognized by a neutralizing monoclonal antibody specific to toxin Cn2 from the scorpion *Centruroides noxius*, using discontinuous synthetic peptides. **Eur J Biochem** 264, 746-755, 1999.
- CARDOSO J.L.C, FERANÇA C.D.S., von EIKSTEDT V.R.D., BORGES I., NOGUEIRA M.T. Loxoscelismo. Estudo de 242 casos (1980-1984). **Rev Soc Bras Toxicol** 1, 50-60, 1988.
- CASTRO C.S., SILVESTRE F.G., ARAUJO S.C., YAZBECK G.M., MANGILI O.C., CRUZ I., CHÁVEZ-OLÓRTEGUI C., KALAPOTHAKIS E. Identification and molecular cloning of insecticidal toxins from the venom of the brown spider *Loxosceles intermedia*. **Toxicon** 44, 273-280, 2004.
- CHAIM O.M., SADE Y.B., SILVEIRA R.B.S., TOMA L., KALAPOTHAKIS E., CHÁVEZ-OLÓRTEGUI C., MANGILI O.C., GREMSKI, W., VON DIETRICH K.C., NADER H.B., VEIGA, S.S. Brown spider dermonecrotic toxin directly induces nephrotoxicity. **Tox Applied Pharma** 2005 (*in press*).
- CHÁVEZ-OLÓRTEGUI C., ZANETTI V.C., FERREIRA A.P., MINOZZO J.C., MANGILI O.C., GUBERT I.C. ELISA for the detection of venom antigens in experimental and clinical envenoming by *Loxosceles intermedia* spiders. **Toxicon** 36, 563-569, 1998.
- CHAVEZ-OLORTEGUI C, MOLINA F, GRANIER C. Molecular basis for the cross-reactivity of antibodies elicited by a natural anatoxin with alpha- and beta-toxins from the venom of *Tityus serrulatus* scorpion. **Mol Immunol** 38, 867-876, 2002.
- CHEN X., SCALA G, QUINTO I. Protection of rhesus macaques against disease progression from pathogenic SHIV-89.6PD by vaccination with *phage display* HIV-1 epitopes. **Nat Med** 7, 1225-1231, 2001.
- CHOULIER L., LAUNE D., ORFANOUDAKIS G., WLAD H., JANSON J-C., GRANIER C., ALTSCHUH D. Delineation of a linear epitope by multiple synthesis and *phage display*., *J Immunol Methods*. 249, 253-264, 2001.
- CORTESE R., FELICI F., GALFRE G., LUZZAGO A., MONACI P, NICOSIA A. Epitope Discovery using peptide libraries displayed on phage. **Trends Biotech** 12, 262-267, 1994.
- CORZO G., ESCOUBAS P., STANKIEWICZ M., PELHATE M., KRISTENSEN C.P., NAKAJIMA T. Isolation, synthesis and pharmacological characterization of delta-palutoxins IT, novel insecticidal toxins from the spider *Paracoelotes luctuosus* (Amarauroidae). **Eur J Biochem** 267, 5783-5795, 2000.

- CUNHA R.B., BARBARO K.C., MURAMATSU D., PORTARO F.C.V., FONTES W., SOUSA M.V. Purification and characterization of Loxnecrogin, a dermonecrotic toxin from *Loxosceles gaucho* brown spider venom. **J Prot Chem** 22, 135-146, 2003.
- DAVIES D.R., PADLAN E.A., SHERIFF S. Antibody-antigen complexes. **Annu Rev Biochem** 59, 439-473, 1990.
- DESAI A., LANKFORD H.A., WARREN J.S. *Loxosceles deserta* spider venom induces the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in keratinocytes. **Inflammation** 24, 1-9, 2000.
- DESWAL R., SINGH R., LYNN A.M., FRANK R. Identification of immunodominant regions of *Brassica juncea* glyoxalase I as potential antitumor immunomodulation targets. **Peptides** 26, 395-404, 2005.
- DOMINGOS M.O., BARBARO K.C., TYNAN W., PENNY J., LEWIS D.J.M., NEW R.R.C. Influence of sphingomyelin and TNF-alfa release on lethality and local inflammatory reaction induced by *Loxosceles gaucho* spider venom in mice. **Toxicon** 42, 471-479, 2003.
- FARAZI T.A., WAKSMAN G., GORDON J.I. The biology and enzymology of protein *n*-myristoylation. **J Biol Chem** 276, 39501 – 39504, 2001.
- FEITOSA L., GREMSKI W., VEIGA S., ELIAS M.C.Q.B., GRANER E., MANGILI O. BRENTANI R.R. Detection and characterization of metalloproteinases with gelatinolytic, fibronectinolytic and fibrinogenolytic activities in brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. **Toxicon** 36, 1039-1051, 1998.
- FELICI F., LUZZAGO A., FOLGORI A., CORTESE R. Mimicking of discontinuous epitopes by phage-displayed peptides II. Selection of clones recognized by a protective monoclonal antibody against the *Bordetella pertussis* toxin from phage peptide libraries. **Gene** 128, 21-27, 1993.
- FERNANDES-PEDROSA M.F.F., AZEVEDO I.L.M.J., GONÇALVES DE ANDRADE R. M., van den BERG C.W., RAMOS C.R.R., HO P.L., TAMBOURGI D.V. Molecular cloning and expression of a functional dermonecrotic and haemolytic factor from *Loxosceles laeta* venom. **Biochem Bioph Res Commun** 298, 638-645, 2002.
- FISHER P.M., HOWDEN M.E.H. Synthetic peptide antigens of tetanus toxin. **Mol Immunol** 31, 1141-1148, 1994.
- FISCHER M.L., VASCONCELLOS-NETO J. Determination of the maximum and minimum lethal temperatures (LT₅₀) of *Loxosceles intermedia* Mello-Leitão, 1934 and *L. laeta* (Nicolet, 1849) (Araneae, Sicariidae). **J Ther Biol** 28, 563-570, 2003.
- FOIL L.D., NORMENT B.R. Envenomation by *Loxosceles reclusa*. **J Med Entomol** 16, 18-25, 1975.
- FORSTER-WALDL E., RIEMERB A.B., DEHOF A.K., NEUMANN D., BRAMSWIG K., BOLTZ-NITULESCU G., PEHAMBERGER H., ZIELINSKI C.C., SCHEINER O., POLLAK A., LODE H., JENSEN-JAROLIM E. Isolation and structural analysis of peptide mimotopes for the disialoganglioside GD2, a neuroblastoma tumor antigen. **Mol Immunol** 42, 319-325, 2005.
- FRANK R. Spot-synthesis: na easy technique for the positionally addressable, parallel chemical synthesis on a membrane support. **Tetrahedron** 48, 9217-9232, 1992.
- FUCHS S., KASHER R., BALASS M., SCHERF T., HAREL M., FRIDKIN M., SUSSMAN J.L., KATCHALSKI-KATZIR E. The binding site of acetylcholine receptor: from synthetic peptides to solution and crystal structure. **Ann N Y Acad Sci** 998, 93-100, 2003
- FURLANETTO R.S., BÜRCHEL W., ROSA R.R., SALIBA F., NAVAS J. Observação dos efeitos do veneno loxoscélico e avaliação de sua atividade. **Ciênc Cul** 14, 254, 1962.

- FUTRELL J.M., MORGAN B.B., MORGAN P.N. An *in vitro* model for studying hemolysis associated with venom from the brown recluse spider (*L. reclusa*). **Toxicon** 17, 355-362, 1979.
- FUTRELL J.M., Loxoscelism. **The Am J Med Sci** 304, 261-267, 1992.
- GARRELS JI, McLAUGHLIN C.S., FUTCHERM B., LATTE G.I., KOBAYASH R., SCHWEDER B., VOLPE T., AMDERSEN D.S., MESQUITA-FUENTES R., PAYNE W.E. Proteome studies of *Saccharomyces cerevisiae*: identification and characterization of abundant proteins. **Electrophoresis** 18, 1347-1360, 1997.
- GATT S, DINUR T, BARENHOLZ Y. A spectrophotometric method for determination of sphingomyelinase. **Biochim Biophys Acta** 530, 503-507, 1978.
- GEREN C.R., CHAN T.K., WARD B.C., HOWELL D.E., PINKSTON K., ODELL G.V. Composition and properties of extract of fiddleback (*Loxosceles reclusa*) spider venom apparatus. **Toxicon** 11, 471-479, 1973.
- GEYSEN H.M., RODDA S.J., MASON T.J. A priori delineation of a peptide which mimics a discontinuous antigenic determinant. **Mol. Immunol.** 23; 709-715, 1986.
- GOMEZ H.F., KRYWKO D.M., STOECKER W.V. A new assay for the detection of *Loxosceles* species (brown recluse) spider venom. **Ann Emerg Med** 39, 469-474, 2002.
- GOÑI F.M., ALONSO A. Sphingomyelinases: enzymology and membrane activity. **FEBS Letters**, 531, 38-46, 2002.
- GOYFFON M. L'aranéisme. **Revue Française des Laboratoires** 342, 49-53, 2002.
- GUATIMOSIN S.C.F., PRADO V.F., DINIZ C.R., CHÁVEZ-OLORTEGUI C., KALAPOTHAKIS E. Molecular cloning and genomic analysis of TsNTxP, an immunogenic protein from *Tityus serrulatus* scorpion venom. **Toxicon** 37, 507-517, 1999.
- GUBERT I.C. **Estudos epidemiológicos dos acidentes com a aranha-marrom *Loxosceles intermedia* em Curitiba, estado do Paraná, e avaliação do método de ELISA como ferramenta de diagnóstico.** Belo Horizonte, 2005, 100 fls. Tese de doutorado, Programa de pós-graduação em Farmacologia, Bioquímica e Molecular. Instituto de Ciências Biológicas, UFMG.
- GUILHERME P., FERNANDES I., BARBARO K.C. Neutralization of dermonecrotic and lethal activities and differences among 32-35 kDa toxins of medically important *Loxosceles* spider venoms in Brazil revealed by monoclonal antibodies. **Toxicon** 39, 1333-1342, 2001.
- HANNUN Y.A., OBEID L.M. Ceramide: an intracellular signal for apoptosis. **TIBS** 20, 73-77, 1995.
- HOGAN C.J. BARBARO K.C., WINKEL K., Loxoscelism: Old Obstacles, New Directions. **Ann Emerg Med** 44, 608-624, 2004
- ISBISTER G.K., GRAUDINS A., WHITE J., WARREL D. Antivenom treatment in arachnidism. **J Toxicol Clin Toxicol** 41, 291-300, 2003.
- ISBISTER G.K., WHITE J. Clinical consequences of spider bites: recent advances in our understanding. **Toxicon** 43, 477-492, 2004.
- JORGE M.T., VON EICKSTEDT V.R.D, KNYSAK I., FISMAN LFZ., RIBEIRO L.A. Acidentes por picadas de aranhas. **Arq Bras Med** 65, 457-468, 1991.
- KALAPOTHAKIS E., JARDIM S., MAGALHÃES A.C., MENDES T.M., DeMARCO L., AFONSO L.C.C., CHÁVEZ-OLORTEGUI C. Screening of expression libraries using ELISA: identification of immunogenic proteins from *Tityus bahiensis* and *Tityus serrulatus* venom. **Toxicon** 29, 679-685, 2001.

- KALAPOTHAKIS E., ARAUJO S.C., CASTRO C.S., GOMEZ M.V., MANGILI O.C., GUBERT I.C., DINIZ C.R., CHÁVEZ-OLÓRTEGUI C. Molecular cloning, expression and immunological properties of LID1, a protein from the dermonecrotic family of *Loxosceles intermedia* spider venom. **Toxicon** 40, 1691-1699, 2002.
- KASAHARA M., MAKINO K., AMEMURA M., NAKATA A. Nucleotide sequence of the *ugpQ* gene encoding glycerophosphoryl diester phosphodiesterase of *Escherichia coli* K-12. **Nucleic Acids Res** 17, 2854, 1989.
- KEHOE J.W., BERTOZZI C.R. Tyrosine sulfation: a modulator of extracellular protein-protein interactions. **Chem Biol** 7, 57-61, 2000.
- KOHLER G., MILSTEIN C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature** 256, 495-497, 1975 In: **J Immunol**, Pillars Article, 174, 2453-2455, 2005.
- KRYWKO D.M., GOMEZ H.F. Detection of *Loxosceles* species venom in dermal lesions: a comparison of 4 venom recovery methods. **Annals of Emergency Medicine** 39, 475-480, 2002.
- KURPIEWSKI G., FORRESTER L.J., BARRET J.T., CAMBELL B.J. Platelet aggregation and sphingomyelinase D activity of a purified toxin from the venom of *Loxosceles reclusa*. **Biochem Biophys Acta** 678, 467-476, 1981.
- LAEMMLI U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. **Nature** 227, 680-685, 1970.
- LAUNE D., MOLINA F, FERRIERES G., VILLARD S., BES C., RIEUNIER F., CHARDES T., GRANIER C. Application of the Spot method to the identification of peptides and amino acids from the antibody paratope that contribute to antigen binding. **J. Immunol. Methods** 267, 53-70, 2002.
- LI S., WANG J., ZHANG X., REN Y., WANG N., ZHAO K., CHEN X., ZHAO C., LI X., SHAO J., YIN J., WEST M.B., XU N., LIU S. Proteomic characterization of two snake venoms: *Naja naja atra* and *Agkistrodon halys*. **Biochem. J.** 384, 119-127, 2004.
- LIANG S., XIAOLAN L., CAO M., XIE J., CHEN P., HUANG R. Identification of venom proteins of spider *S. huwena* on two-dimensional electrophoresis gel by N-terminal microsequencing and mass spectrometric peptide mapping. **J Prot Chem** 19, 225-229, 2000.
- LITTLEFIELD J.W. Selection of hybrids from matings of fibroblast in vitro and their presumed recombinants. **Science** 145, 709-710, 1964.
- LUCAS S. Spiders in Brazil. **Toxicon** 26, 759-772, 1988.
- LUCIANO M.N., SILVA P.H., CHAIM O.M., SANTOS V.P., FRANCO C.R.C., SOARES M.F.S., ZANATA S.M., MANGILI O.C., GREMSKI W., VEIGA S.S. Experimental evidence for a direct cytotoxicity of *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom on renal tissue. **J Histochem Cytochem** 52, 455-467, 2004.
- MACHADO DE AVILA RA, ALVARENGA LM, TAVARES CA, MOLINA F, GRANIER C, CHAVEZ-OLORTEGUI C. Molecular characterization of protective antibodies raised in mice by *Tityus serrulatus* scorpion venom toxins conjugated to bovine serum albumin. **Toxicon** 44, 233-241, 2004.
- MÁLAQUE C.M.S, CASTRO-VALENCIA J.E., CARDOSO J.L.C., FRANÇA F.O.S., BARBARO K.C., FAN H.W. Clinical and epidemiological features of definitive and presumed loxoscelism in São Paulo, Brazil. **Rev Inst Med Trop S Paulo** 44, 2002.
- MANOUTCHARIAN K., SOTELO J., GARCIA E., CANO A., GEVORKIAN G. Characterization of cerebrospinal fluid specificities in neurocysticercosis fusing *phage display* peptide library. **Clin Immunol** 91, 117-121, 1999.
- MARVIN D.A. Phage structure, infection and assembly. **Curr Opin Struct Biol.** 8, 150-158, 1998.

- MENDES T.M., MARIA W.S., GRANIER C., CHÁVEZ-OLÓRTEGUI C., KALAPOTHAKIS E. Epitope mapping of the antigenic protein TsNTxP from *Tityus serrulatus* scorpion venom using mouse, rabbit and sheep antibodies. **Toxicon** 44, 617-624, 2004.
- MERCHANT M.L., HINTON J.F., GEREN C.R. Sphingomyelinase D activity of brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*) venom as studied by ³¹P-NMR: effects on the time-course of sphingomyelin hydrolysis. **Toxicon** 36, 537-545, 1998.
- MILLER M.J., GOMEZ H.F., SNIDER R.J., STEPHENS E.L., CZOP R.M., WARREN J.S. Detection of *Loxosceles* venom in lesional hair shafts and skin: application of a specific immunoassay to identify dermonecrotic arachnidism. **Am J Emerg Med** 18, 626-628, 2000.
- MINISTERIO DA SAÚDE – Fundação Nacional da Saúde. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. 2ª. ed, Brasília, 45-58, 2001.
- MONTEIRO C.L., RUBEL R., COGO L.L., MANGILI O.C., GREMSKI W., VEIGA S.S. Isolation and identification of *Clostridium perfringens* in the venom and fangs of *Loxosceles intermedia* (brown spider): enhancement of the dermonecrotic lesion in loxoscelism. **Toxicon** 40, 409-418, 2002.
- MOURA J.F., DELACERDA L., SANDRINI R., BORBA F.M., CASTELO D.N., SADE R.S., SELLA S., MINOZZO J.C., CALLEFE L.G., FIGUEIREDO B.C. ELISA for determination of human growth hormone: recognition of helix 4 epitopes. **J Biomed Biotechnol** 3, 143-149, 2004.
- MURAKAMI M.T., FERNANDES-PEDROSA M.F., TAMBOURGI D.V., ARNI R.K. Structural Basis for Metal-Ion Coordination and the Catalytic Mechanism of Sphingomyelinases D. **J Biol Chem** 280, 13658-13658, 2005.
- MURTHY K.K.; SHEN S.-H., BANVILLE D. Epitope mapping of SPH-1 monoclonal antibodies using peptide *phage display*. **Biochem Biophys Res Commun** 248, 69-74, 1998.
- MURTHY K.K., EIKEL I., SHEN S.H., BANVILLE D. Fusion proteins could generate false positives in peptide *phage display*. **Biotechniques** 26, 142-149, 1999.
- O'FARRELL P. H., High resolution two-dimensional electrophoresis of protein. **J Biol Chem** 250, 4007-4021, 1975.
- OLIVEIRA K.C., ANDRADE R.M.G., GIUSTI A.L., SILVA W.D., TAMBOURGI D.V. Sex-linked variation of *Loxosceles intermedia* spider venoms. **Toxicon** 37, 217-221, 1999.
- OLIVEIRA K.C., ANDRADE R.M.G., PIAZZA R.M.F., FERREIRA J.C.C., van den BERG C.W., TAMBOURGI D.V. Variations in *Loxosceles* spider venom composition and toxicity contribute to the severity of envenomation. **Toxicon** 45, 421-429, 2005.
- OLIVEIRA-LIMA A., DIAS-DA-SILVA, W. **Imunologia , Imunopatologia, Alergia – Métodos** Capítulo 6 – Provas Sorológicas com Complemento. 1a. ed, Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 79-80, 1970.
- OSPEDAL K.Z., APPEL M.H., FILLUS J., MANGILI O.C., VEIGA S.S., GREMSKI W. Histopathological findings in rabbits after experimental acute exposure to the *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. **Int J Exp Path** 84, 287-294, 2002.
- PATEL K.D., MODUR V., ZIMMERMAN G.A., PRESCOTT S.M., MCINTYRE T.M. The necrotic venom of brown recluse spider induces dysregulated endothelial cell-dependent neutrophil activation – Differential induction of GM-CSF, IL-8 and E-selectin expression. **J Clin Invest** 94, 631-642, 1994.
- PENAFORTE C.L., PRADO V.F., PRADO M.A., ROMANO-SILVA M.A., GUIMARÃES P.E., DeMARCO L., GOMEZ M.V., KALAPOTHAKIS E. Molecular cloning of cDNAs encoding insecticidal neurotoxic peptides from spider *Phoneutria nigriventer*. **Toxicon** 38, 1443-1449, 2000.

- PETRENKO V.A., VODYANOV V.J. *Phage display* for detection of biological threat agents. **J Microbiol Met** 53, 253-262, 2003.
- PINHATI H.M.S., KONO A., CARDOSO J.L.C., MÁLAQUE C.M.S, FAN H.M. Reações adversas precoces ao soro anti-aracnídeo em pacientes picados por *Loxosceles*, Phoneytria e escorpião. **Rev Soc Bras Med Trop** 32 (suplemento 1), 497-498, 1999.
- PRETEL F., ANDRADE R.M.G., MAGNOLI F.C., SILVA M.E.S., FERREIRA J.M.C., van den BERG TAMBOURGI D.V. Analysis of the toxic potential of venom from *Loxosceles adelaida* a Brazilian brown spider from karstic areas. **Toxicon** 45, 449-458, 2005.
- RAMOS-CERRILLO B., OLVERA A., ODELL G.V., ZAMUDIO F., PANIAGUA-SOLÍS J., ALAGÓN A., STOCCK R.P. Genetic and enzymatic characterization of sphingomyelinase D isoforms from the North American fiddleback spiders *Loxosceles boneti* and *Loxosceles reclusa*. **Toxicon** 44, 507-514, 2004.
- RAPPSILBER J., MANN, M. What does it mean to identify a protein in proteomics? **TRENDS Biochem Sci** 27, 2, 74 - 78, 2002.
- RASH L.D., HODGSON W.C. Pharmacology and biochemistry of spider venom. **Toxicon** 40, 3, 225-254, 2002.
- REES R., CAMPBELL D., RIEGER E., KING E. L. The diagnosis and treatment of brown recluse spider biter. **Ann Emerg Med** 16, 945-949, 1987.
- RIBEIRO L.A., Von EICKSTEDT V.R., RÚBIO G.B.G., KONOLSAISEN J. F., HANDAR Z., ENTRES M., CAMPOS V.A.F.P., JORGE M. T. Epidemiologia do acidente por aranhas do gênero *Loxosceles* Heinecken & Lowe no estado do Paraná (Brasil). **Mem Inst Butantan** 55, 19-26, 1993.
- SAMBOOK J., FRITSCH E.F., MANIATS T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. Second ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989.
- SAMS H.H., DUNNICK C.A., SMITH M.L., KING L.E. Necrotic arachdism. **J Am Acad Dermatol** 44, 61-573, 2001.
- SANTOS V.L.P., FRANCO C.R.C., VIGGIANO R.L.L., SILVEIRA R.B., CANTÃO M.P., MANGILI O.C., VEIGA S.S., GREMSKI W. Structural and ultrastructural description of the venom gland of *Loxosceles intermedia* (brown spider). **Toxicon** 38, 265-285, 2000.
- SANDIDGE J.S. Arachnology: scavenging by brown recluse spiders. **Nature** 30, 426-430, 2003.
- SCHENONE H. Toxic pictures produced by spider bites in Chile: Lactrodectism and Loxoscelism. **Rev Med Chi** 131, 437-444, 2003.
- SCOTT J.K., SMITH G.P. Searching for peptides ligands with an epitope library. **Science** 249, 386-390, 1990.
- SESA - Secretaria Estadual de Saúde Ambiental do Paraná. Acidentes por animais peçonhentos. Dados do Paraná. Disponível em <http://www.saude.pr.gov.br> Acesso em 15 dez. 2004.
- SEZERINO U. M., ZANNIN M., COELHO L.K., GONÇALVES J., GRANDO M., MATTOSINHO S.G., CARDOSO J.L.C., FRANÇA F.O.S., BARBARO K.C., FAN H.W. A clinical and epidemiological study of *Loxosceles* spider in Santa Catarina, Brazil. **Trans Royal Soc Trop Med Hyg** 92, 546-548, 1998.
- SIDHU S.S. Engineering M13 for *phage display*. **Biomol Eng**, 18, 57-63, 2001.
- SILVA P.H., HASHIMOTO Y., SANTOS F.A., MANGILI O. C., GREMSKI W., VEIGA S.S. Hematological cell findings in bone marrow and peripheral blood of habbits after experimental acute exposure to *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. **Toxicon** 42, 155-161, 2003.

- SILVA P.H., SILVEIRA R.B., APPEL M.H., MANGILI O.C., GREWSKI W., VEIGA S.S. Brown spiders and loxoscelism. **Toxicon** 44, 693-709, 2004.
- SILVESTRE F.G., CASTRO C.S., DE MOURA J.F., GIUSTA M.S., de MARIA M., ÁLVARESC, F.C.F., LOBATO É.S.S., ASSIS R A, GONÇALVES L.A., GUBERT I.C., CHÁVEZ-OLORTEGUI, C., KALAPOTHAKIS E., Characterization of the venom from the brazilian brown spider *Loxosceles similes* moenkhaus, 1898 (araneae, sicariidae). **Toxicon** 2005 (*in press*).
- SINCHAIKUL S., SOOKKHEO B., TOPANURUK S., JUAN, H., PHUTRAKUL S., CHEN S. Bioinformatics, functional genomics, and proteomics study of *Bacillus* sp. **J Chromatography B**, 771, 1-2, 261-287, 2002.
- SMITH G.P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. **Science**, 228, 1313-1317, 1985.
- SMITH G.P., PETRENKO V.A. *Phage display*. **Chem Rev**, 97, 91-410, 1997.
- SMITH C.G., VANE J.R. The Discovery of Captopril. **The FASEB Journal** 17, 788-789, 2003.
- SOMPURAM S.R., KODELA, V, WESCOTT, C., RADCLIFFE, G., NOGEN, S.A Synthetic peptides identified from phage-displayed combinatorial libraries as immunodiagnostic assay surrogate quality-control targets. **Clin Chem**, 48, 410-20, 2002.
- TAM J.P. Synthetic peptide vaccine design synthesis and properties of a high-density multiple antigenic peptide system. **Proc Natl Acad Sci USA**, 85, 5409-5413, 1988.
- TAMBOURGI D.V., MAGNOLI F.C., Von EICKSTEDT V.R.D., BENEDETTI Z.C., PETRICEVICH V.L., DIAS DA SILVA W. Incorporation of a 35-Kilodalton purified protein from *Loxosceles intermedia* spider venom transforms human erythrocytes into activators of autologous complement alternative pathway. **J Immunol** 155, 4459-4466, 1995.
- TAMBOURGI D.V., MAGNOLI F.C., Von EICKSTEDT V.R.D., MORGAN B.P., ALVES E.W., DIAS DA SILVA W. Sphingomyelinases in the venom of the spider *Loxosceles intermedia* are responsible for both dermonecrosis and complement-dependent hemolysis.venom transforms human erythrocytes into activators of autologous complement alternative pathway. **Biochem Bioph Res Commun**, 251, 366-373, 1998a.
- TAMBOURGI D.V., PETRICEVICH V.L., MAGNOLI F.C., ASSAF S.L.M.R., JANCAR S., DIAS DA SILVA W. Endotoxemic-like shock induced by *Loxosceles* spider venoms: Pathological changes and putative cytokine mediators. **Toxicon** 36, 391-403, 1998b.
- TAMBOURGI D.V., MORGAN B.P., ANDRADE R.M.G., MAGNOLI F.C., van den BERG C.W. *Loxosceles intermedia* spider envenomation induces activation of an endogenous metalloproteinase, resulting in cleavage of glycophorins from the erythrocyte surface and facilitating complement-mediated lysis. **Blood** 95 683-691, 2000.
- TAMBOURGI D.V, SILVA M.S., BILLINGTON S.J., ANDRADE R.M.G., MAGNOLI F.G., SONGER J.G. Mechanism of induction of complement susceptibility of erythrocytes by spider and bacterial sphingomyelinases. **Immunology** 107, 93-101, 2002.
- TAMBOURGI D.V., FERNANDES-PEDROSA M.F., VAN DEN BERG C.W., GONCALVES-DE-ANDRADE R.M., FERRACINI M., PAIXAO-CAVALCANTE D., MORGAN B.P., RUSHMERE N.K. Molecular cloning, expression, function and immunoreactivities of members of a gene family of sphingomyelinases from *Loxosceles* venom glands. **Mol. Immunol** 41, 831-840, 2004.
- TOWBIN H., STAHELIN T., GORDON J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc Natl Acad Sci USA** 76, 4350-4354, 1979.

- VAN DEN BERG C.W., ANDRADE R.M.T., MAGNOLI F.G., MARCHBANK K.J., TAMBOURGI D.V. *Loxosceles* spider venom induces metalloproteinase mediated cleavage of MCP/CD46 and MHC and induces protection against C-mediated lysis. **Immunology** 107, 102-110, 2002.
- VAN MEETEREN L.A., FREDERIKS F., GIEPMANS B.N.G., PEDROSA M.F.F., BILLINGTON S.J., JOST B.H., TAMBOURGI D.V., MOOLENAAR W.H. Spider and bacterial sphingomyelinases D target cellular lysophosphatic acid receptors by hydrolyzing lysophosphatidylcholine. **J Biol Chem** 279, 10833-10836, 2004.
- VEIGA S.S., GREMSKI W., SANTOS V.L.P., FEITOSA L., MANGILI O.C., NADER H.B., DIETRICH C.P., BRENTANI R.R. Oligosaccharide residues of *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom proteins: dependence on glycosilation for dermonecrotic activity. **Toxicon** 37, 587-607, 1999.
- VEIGA S.S., FEITOSA L., SANTOS V.L.P., SOUZA G.A., RIBEIRO A.S., MANGILI O.C., PORCIONATTO M.A., NADER H.B., DIETRICH C.P., BRENTANI R.R., GREMSKI W. Effect of brown spider venom on basement membrane structures. **Histochem J** 32, 397-408, 2000a.
- VEIGA S.S., SILVEIRA R.B., DREYFUSS J.L., HAOACH J., PEREIRA A.M., MANGILI O.C., GREMSKI W. Identification of high molecular weight serine-proteases in *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. **Toxicon** 38, 825-839, 2000b.
- VEIGA S.S., ZANETTI V.C., BRAZ A., MANGILI O.C., GREMSKI W. Extracellular matrix molecule as targets for brown spider venom toxins. **Braz J Med Biol Res** 34, 843-850, 2001a.
- VEIGA S.S., ZANETTI V.C., FRANCO C.R.C., TINDADE E.S., PORCIONATTO M.A., MANGILI O.C., GREMSKI W., DIETRICH C.P., NADER H.B. In vivo and in vitro cytotoxicity of brown spider venom for blood vessel endothelial cells. **Thrombosis Res** 102, 229-237, 2001b.
- VETTER R.S., CUSHING P.E., CRAWFORD R.L., ROYEE L.A. Diagnoses of brown recluse spider bites (loxoscelism) greatly outnumber actual verifications of the spider in four western American states. **Toxicon** 42, 413-418, 2003.
- VILLARD S., LACROIX-DESMAZES S., KIEBER-EMMONS T., PIQUER D., GRAILLY S., BENHIDA A., KAVERI S.V., SAINT-REMY J.M., GRANIER C. Peptide decoys selected by *phage display* block in vitro and in vivo activity of a human anti-FVIII inhibitor. **Blood**, 102, 3, 949-952, 2003.
- WASSERMAN G.S., ANDERSON P.C. Loxoscelism and necrotic arachnidism. **J Toxicol Clin Toxicol.** 21, 451-472, 1983.
- WIERENGA R.K. The TIM-barrel fold: a versatile framework for efficient enzymes. **FEBS letters** 492, 193-198, 2001.
- WILSON D.R., FINLAY B.B. *Phage display*: applications, innovations, and issues in phage and host biology. **Can J Microbiol**, 44, 313-329, 1998.
- WINTER J. Bacteriophage *display* libraries In: **Protein Engineering: Principles and Practice**. Ed. Jeffrey L. Cleland and Charles S. Craik, Wiley-Liss, Inc, 349-367, 1996.
- YUAN O., PESTKA J.J., HESPENHEIDE B.M., KUHN, L.A., LINZ, J.E., HART, L.P. Identification of mimotopes peptides wich bind to the micotoxin deoxynivalenol-specific monoclonal antibody. **App Environ Microbiol** 65, 3279-3286, 1999.
- YOUNG N.S., CURD J.G., ESTLAKE A., FURIE B., SCHECHTER A.N. Isolation of antibodies specific to sickle hemoglobin by affinity chromatography using a synthetic peptide. **Proc Natl Acad Sci USA** 72, 4759-4763, 1975.
- YOUNG R.A., DAVIS R.W. Efficient isolation of genes by using antibodies probes. **Proc Natl. Acad. Sci. USA** 80, 1194-1198, 1983.

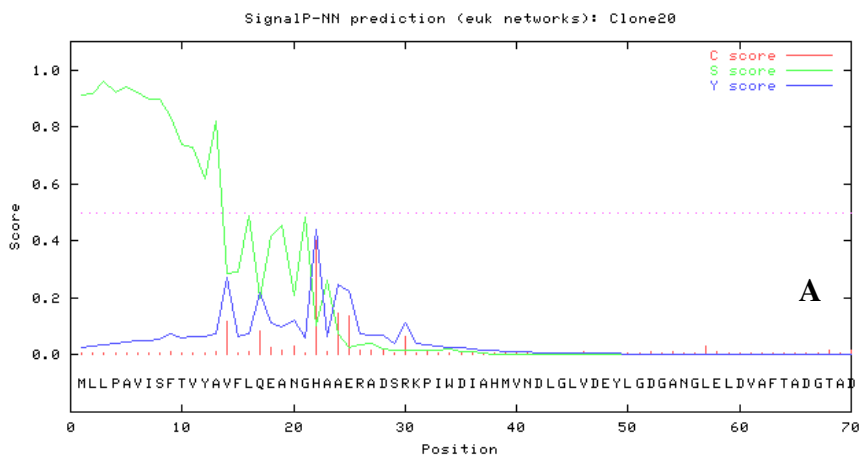
YOUNG A.R., PINCUS S.J. Comparison of enzymatic activity from three species of necrotising arachnids in Australia: *Loxosceles rufescens*, *Badumma insignis* and *Lampona cylindrata*. **Toxicon** 39, 391-400, 2001.

ZAP Express cDNA síntesis kit and ZAP Express cDNA gigack III gold cloning kit. **Instuccion manual Stratagene**.

ZHANG M.Y., SCHILLBERG S., ZIMMERMAN S., LIAO Y.C., FISHER R., BREUER G. GST fusion proteins cause false positives during selection of viral movement protein specific single chain antibodies. **J Virol Methods** 91, 139-147, 2001.

APÊNDICES

Apêndice I	Predição de peptídeo sinal das proteínas relativas aos clones 20 (A) e 24 (B) realizada pelo o programa SignalP 3.0 – NN.....	120
Apêndice II	Predição de peptídeo sinal das proteínas relativas aos clones 20 (A) e 24 (B) realizada pelo programa SignalP 3.0-HMM	121
Apêndice III	Predição de peptídeo sinal da proteína relativa ao clone 20 realizada pelo programa Polyphobius.....	122
Apêndice IV	Predição de peptídeo sinal da proteína relativa ao clone 24 realizada pelo programa Polyphobius.....	123
Apêndice V	Possíveis sítios de N-glicosilação das proteínas relativas aos clones 20 (A) e 24 (B)	124
Apêndice VI	Possíveis sítios de fosforilação das proteínas relativas aos clones 20 (A) e 24 (B)	125
Apêndice VII	Alinhamento múltiplo das seqüências correspondentes às isoformas de Smases	127
Apêndice VIII	Cromatograma do sequenciamento do clone 20.....	128
Apêndice IX	Cromatograma do sequenciamento do clone 24.....	133

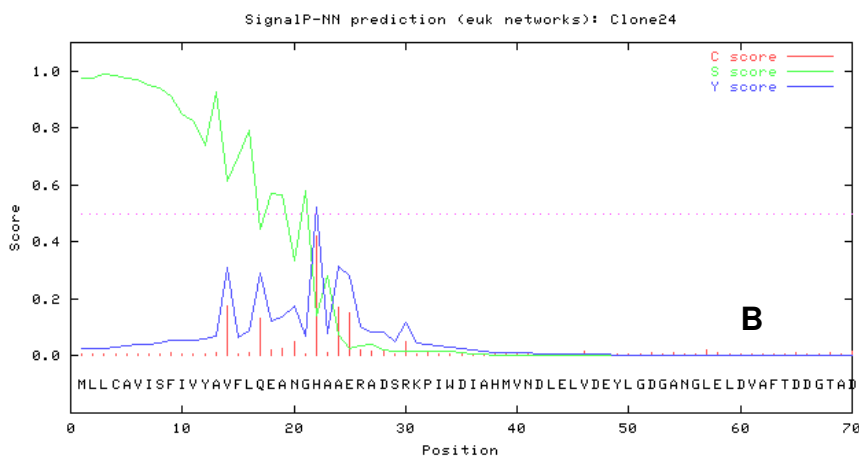


Clone20

Measure Position Value Cutoff signal peptide?

max. C	22	0.402	0.32	YES
max. Y	22	0.442	0.33	YES
max. S	3	0.961	0.87	YES
mean S	1-21	0.664	0.48	YES

Most likely cleavage site between pos. 21 and 22: ANG-HA



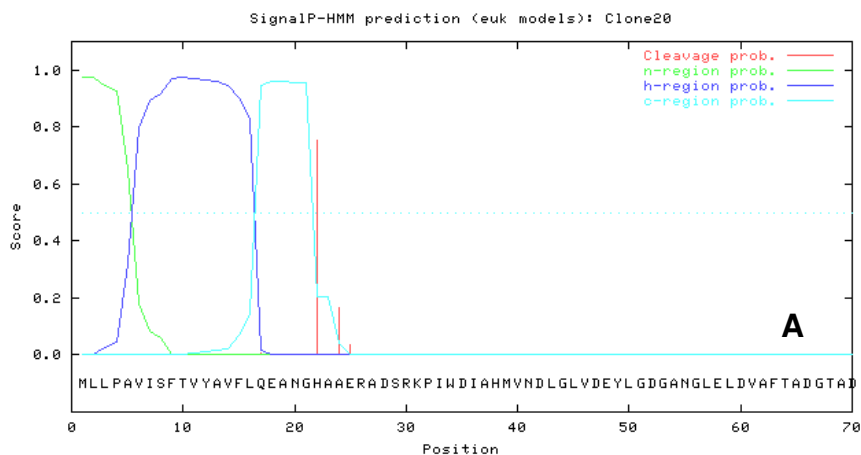
Clone24

Measure Position Value Cutoff signal peptide?

max. C	22	0.419	0.32	YES
max. Y	22	0.521	0.33	YES
max. S	3	0.990	0.87	YES
mean S	1-21	0.791	0.48	YES

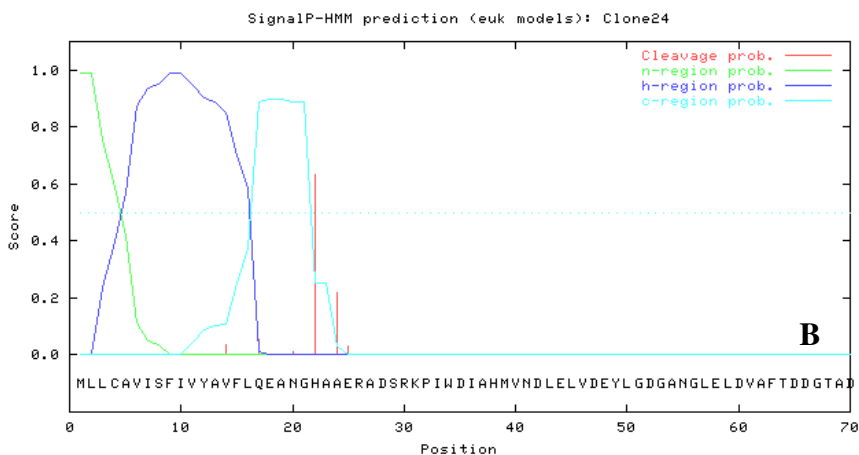
Most likely cleavage site between pos. 21 and 22: ANG-HA

Apêndice I – Predição de peptídeo sinal das proteínas relativas aos clones 20 e 24 realizada pelo o programa SignalP 3.0 - NN. Conforme a ilustração, as possíveis regiões de clivagem (vermelho) estão localizadas ente os aminoácidos 21 e 22 correspondentes aos aminoácidos glicina (G) e histidina (H).



Clone20

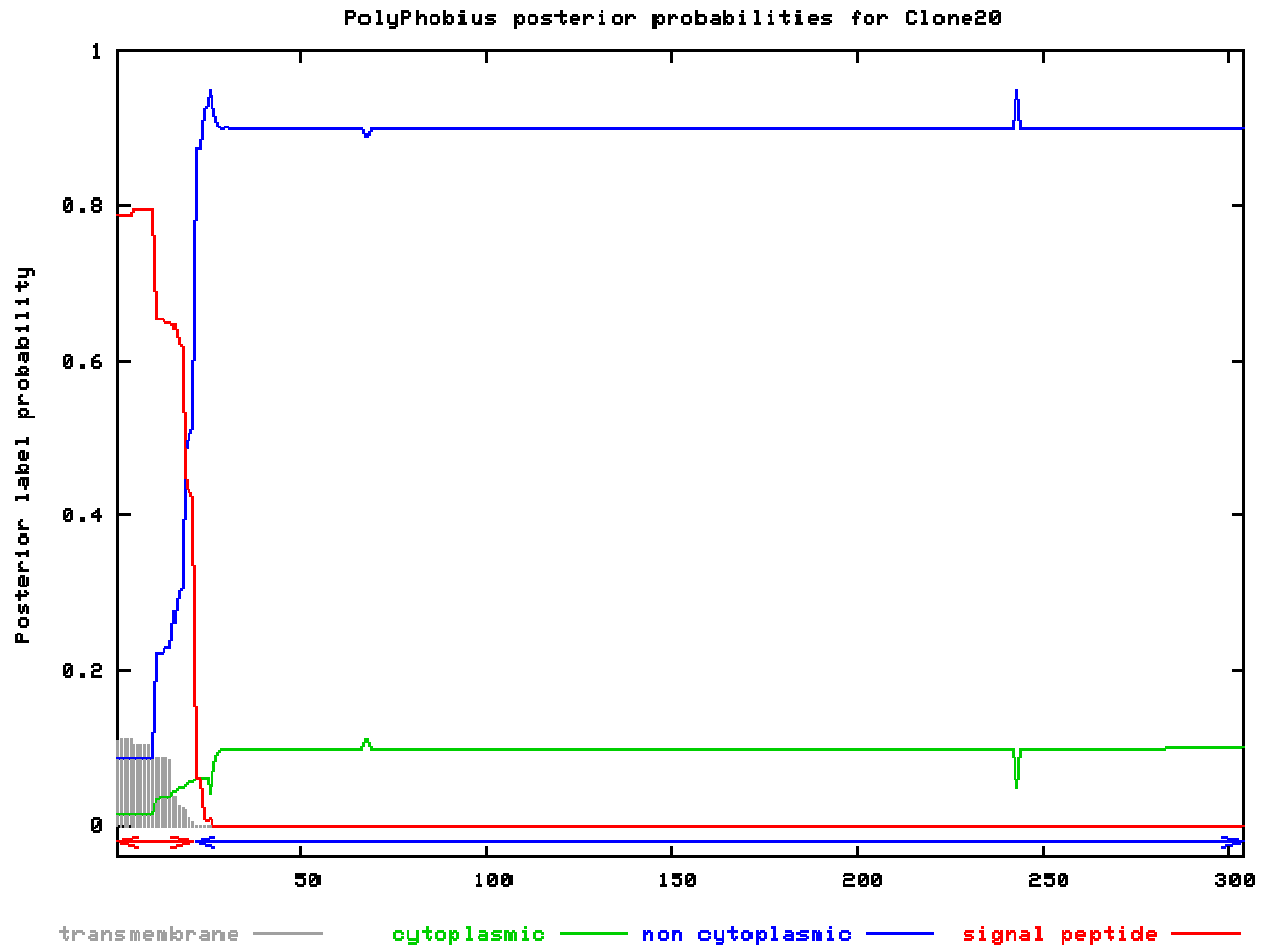
Prediction: Signal peptide
Signal peptide probability: 0.974
Signal anchor probability: 0.000
Max cleavage site probability: 0.752 between pos. 21 and 22



Clone24

Prediction: Signal peptide
Signal peptide probability: 0.989
Signal anchor probability: 0.000
Max cleavage site probability: 0.635 between pos. 21 and 22

Apêndice II – Predição de peptídeo sinal das proteínas relativas aos clones 20(A) e 24(B) realizada pelo programa SignalP 3.0-HMM. Conforme ilustração, é possível verificar a delimitação das três regiões (N, H e C) características da presença do peptídeo sinal, além da alta probabilidade de sua existência.

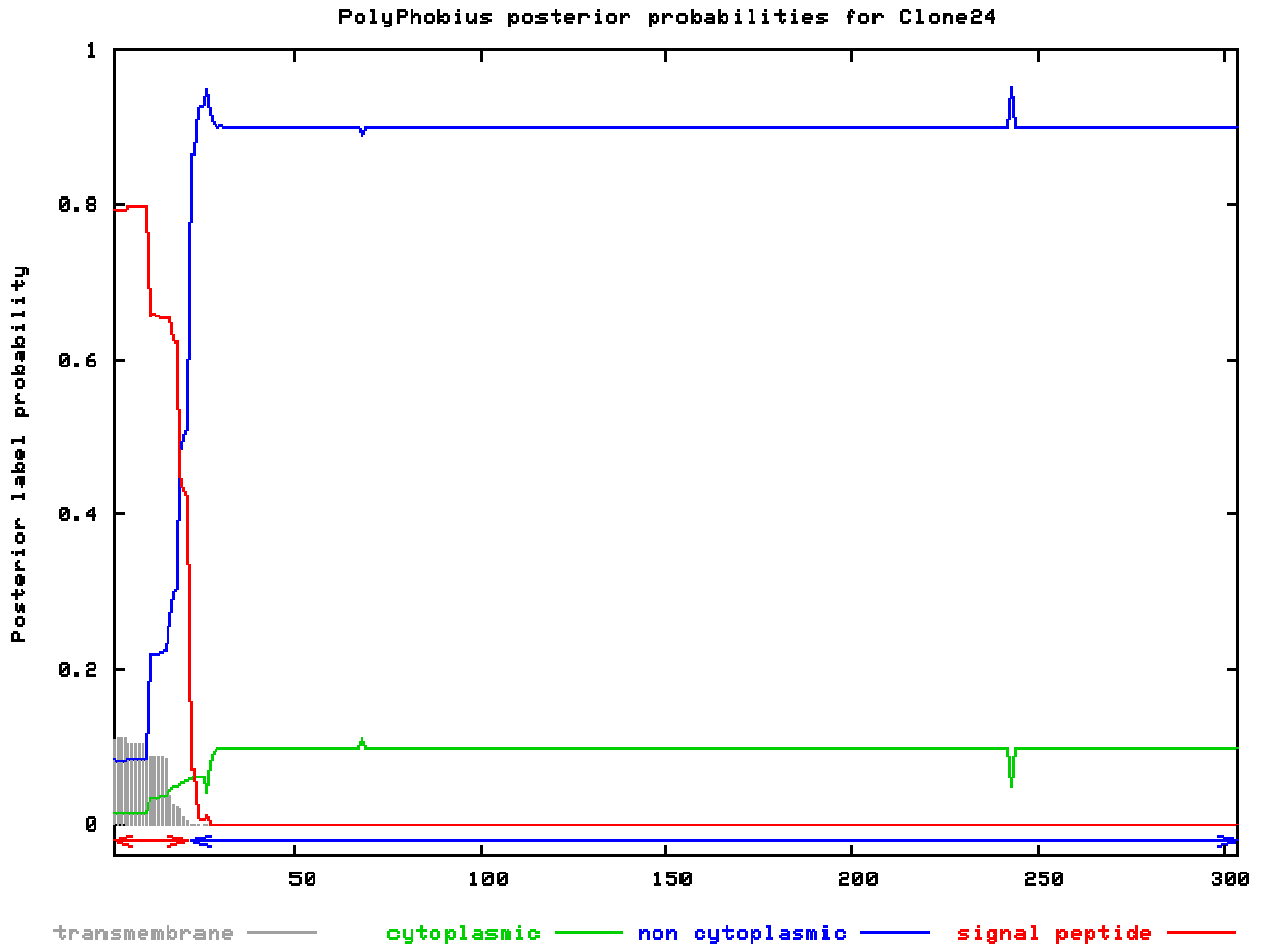


ID Clone20

FT SIGNAL 1 21
 FT DOMAIN 1 3 N-REGION.
 FT DOMAIN 4 16 H-REGION.
 FT DOMAIN 17 21 C-REGION.

FT DOMAIN 22 - 304 NON CYTOPLASMIC.

Apêndice III – Predição de peptídeo sinal da proteína relativa ao clone 20 realizada pelo programa Polyphobius. Conforme a ilustração, é possível prever que o peptídeo sinal corresponde à seqüência do aminoácido 1 ao 21 e a proteína madura à região polipeptídica que vai do aminoácido 22 ao 304.

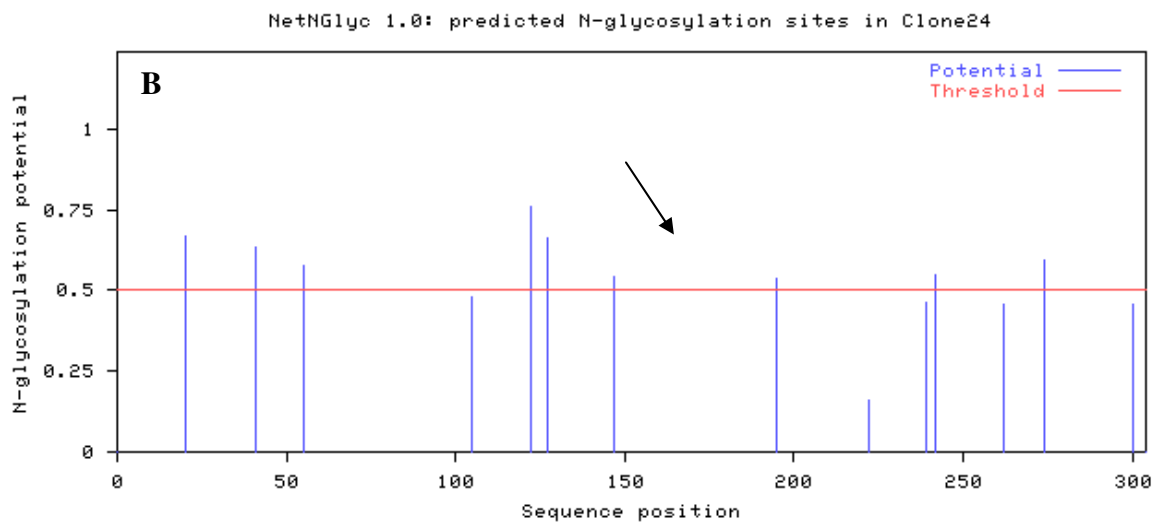
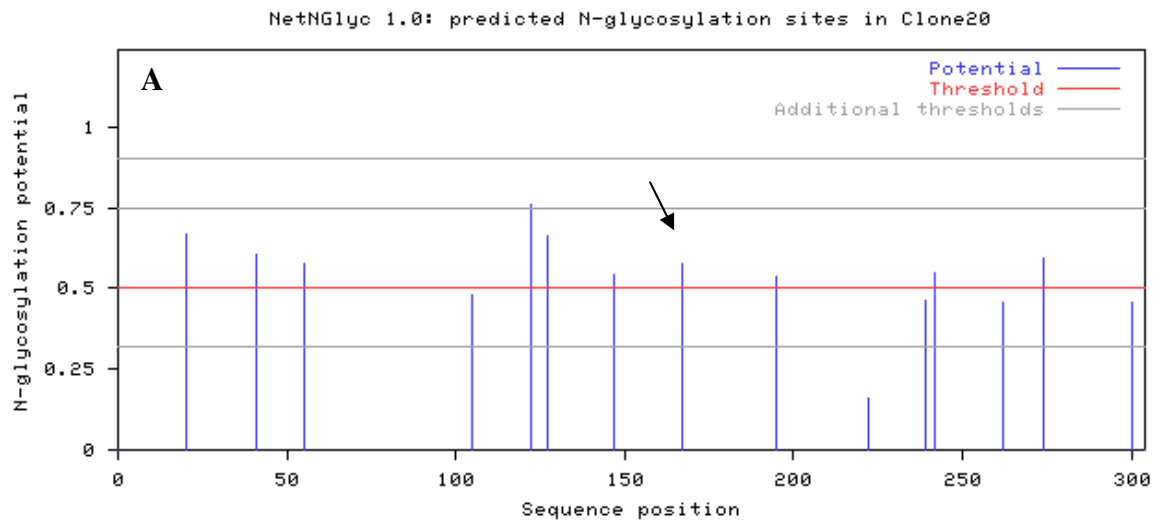


ID Clone24

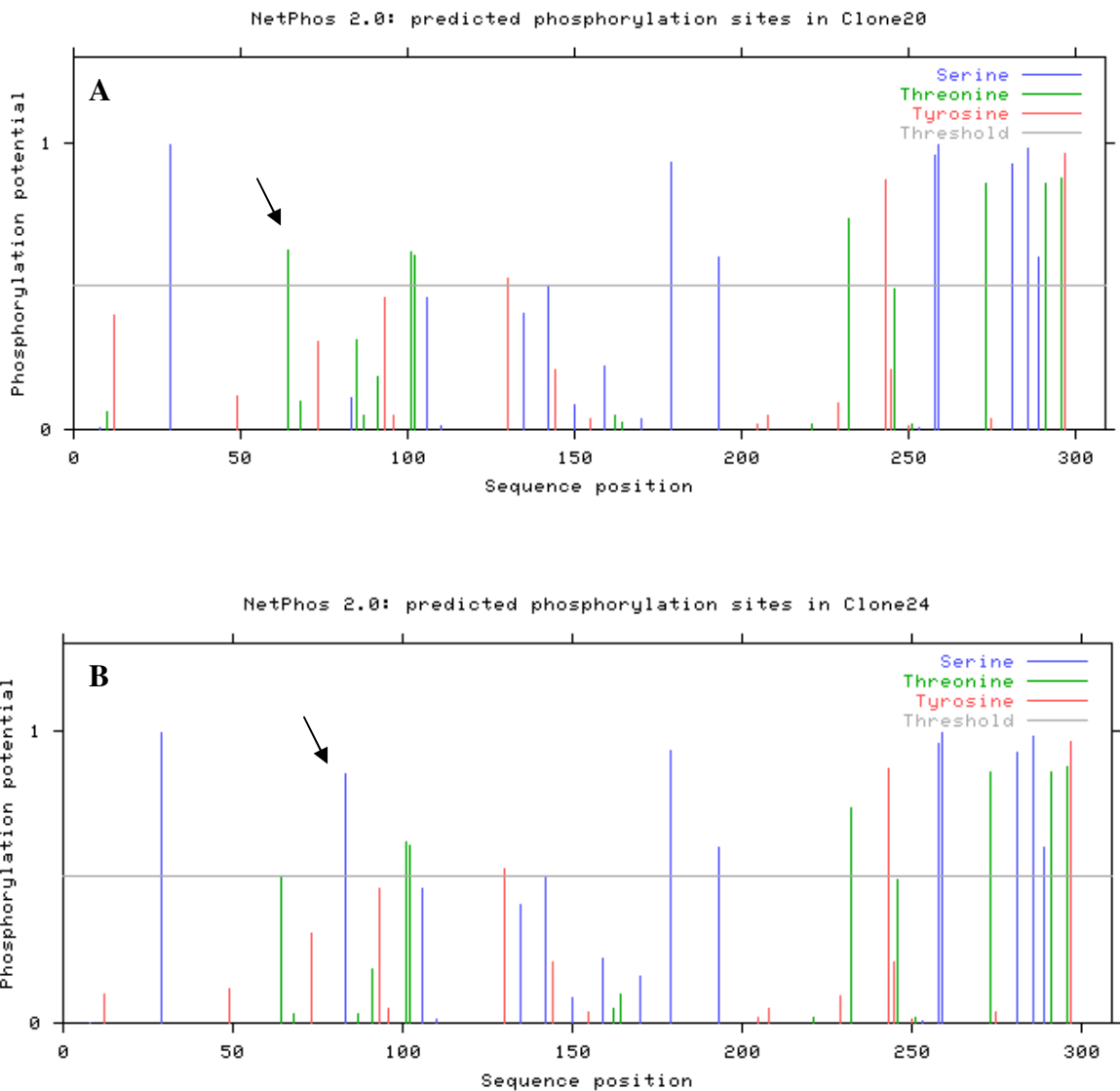
FT SIGNAL 1 21
 FT DOMAIN 1 2 N-REGION.
 FT DOMAIN 3 15 H-REGION.
 FT DOMAIN 16 21 C-REGION.

FT DOMAIN 22 - 304 NON CYTOPLASMIC.

Apêndice IV – Predição de peptídeo sinal da proteína relativa ao clone 24 realizada pelo programa Polyphobius. Conforme a ilustração, é possível prever que o peptídeo sinal corresponde à seqüência do aminoácido 1 ao 21 e a proteína madura à região polipeptídica que vai do aminoácido 22 ao 304.



Apêndice V – Possíveis sítios de N-glicosilação das proteínas relativas aos clones 20 (A) e 24 (B). As asparaginas com algum potencial de estarem glicosiladas apresentam escore acima de 0,5. O aminoácido localizado na posição 167 da proteína do clone 20, uma asparagina (N₁₆₇), é substituída por um ácido aspártico (D₁₆₇) no clone 24 havendo, dessa forma, a diferença de um sítio de N-glicosilação, evidenciado pela seta.



Apêndice VI – Possíveis sítios de fosforilação das proteínas relativas aos clones 20 (A) e 24 (B). Os possíveis aminoácidos passíveis de serem fosforilados, segundo os algoritmos, estão representados por traços azuis (Serina - S), verdes (Treonina - T) e vermelho (Tirosina - Y) concentrados principalmente na região C-terminal da proteína. Dois resíduos que diferem quanto à probabilidade de serem fosforilados são T₆₄ e S₈₃ evidenciados pela seta.

↓

```

L.arizonica2 -----VRATEKFAPYFFCHPLQSAETDVAERA-NKRPIWIMGHMVNANY 44
L.arizonica1 -MSHSSTALLHPYVAARATEKFAPYFFCHPLQSAETDVAERA-NKRPIWIMGHMVNANY 58
L.arizonica3 -----VRATEKFASMYFFCHSPQSAETDVAERG-NKRPPWIMGHMVNAIA 44
L.boneti1 -----A-NKRPAWIMGHMVNAIA 17
L.reclusa1 -----A-NKRPAWIMGHMVNAVA 17
L.reclusa_prec -----MLLYVTLILGCWSAFSESAETDVAERA-NKRPIWIMGHMVNAIY 43
L.reclusa2 -----A-NKRPAWIMGHMVNAIY 17
L.intermediaP1 MAAAGIRF-----IMLPYIVLVLCGWSVLSQAAQTDDDEERAGNRRPIWIMGHMVNAIG 53
L.intermedia_LiD1 -----ARVVLGCWSVLSQAAQTDDDEERAGNRRPIWIMGHMVNAIG 40
L.similis -----AGNRRPIWIMGHMVNAIG 18
L.intermediaP2 MAAAGIRFGLDLSLIMLPYIALILVCWSVLSQAAQTDDVEGRADKRRPIWIMGHMVNAIA 60
L.laetaH17 -----MYAHLALILGCWTVVLQGAETDVGERRADNRRPIWNLAHMVNAVA 44
L.laetaH13 -----MYVHLALILGCWTVILQGAETDVGERRADKRRPIWNLGHMVNAVK 44
Clone20 -----MLLPAVISFIVYAVFLQEAANGHAAERADSRKPIWDIAHVMNDLG 44
Clone24 -----MLLCAVISFIVYAVFLQEAANGHAAERADSRKPIWDIAHVMNDLE 44
L.boneti3 -----RPKPIWDVAHVMNDLE 16
L.laetaH10 -----MLLSAVISFIGFAAFLQEAANGHVVERADSRKPIWDIAHVMNDLD 44
: * * : . ****
    
```

↓ ↓ ↓

```

L.arizonica2 QIDFVNLGANSIETDVSFDSSANPEYTYHGVPCCRRWCKKWEYFNNFLKALRKATTPG 104
L.arizonica1 QIDFVNLGANSIETDVSFDSSANPEYTYHGVPCCRGWCKKWEYFNNFLKALRKATTPG 118
L.arizonica3 QIDFVNLGANSIETDVSFDSSANPEYTYHGVPCCGRTCTKWEHFNEFLKGLRKATTPG 104
L.boneti1 QIDFVNLGANSIETDVSFDSSANPEYTYHGIPCCGRTCTKWEHFNDLVGLRKATTPD 77
L.reclusa1 QIDFVNLGANSIETDVSFDKNNANPEYTYHGIPCCGRTCTKWEHFNDLVGLRKATTPG 77
L.reclusa_prec QIDFVNLGANSIETDVSFDKDNANPEYTYHGVPCCGGRSCLKWEYFSDFLKGLRKATTPG 103
L.reclusa2 QIDFVNLGANSIETDVSFDKDNANPEYTYHGVPCCGGRSCLKWEYFSDFLKGLRKATTPG 77
L.intermediaP1 QIDFVNLGANSIETDVSFDNANPEYTYHGIPCCGRNCKKYENFNDFLGLRSATTPG 113
L.intermedia_LiD1 QIDFVNLGANSIETDVSFDNANPEYTYHGIPCCGRNCKKYENFNDFLGLRSATTPG 100
L.similis QIDFVNLGANSIETDVSFDNANPEYTYHGIPCCGRNCKKYENFNDFLGLRSATTPG 78
L.intermediaP2 QIDFVNLGANSIETDVSFDNANPEYTYHGIPCCGGRSCLKWENFNDFLGLRSATTPG 120
L.laetaH17 QIPDFLDLGANALEADVTFKG-SVPTYTYHGTPCDFGRDCIRWEYFNVFLKTLREYTPG 103
L.laetaH13 QIPDFLDLGANALEADITFKG-AVPTYSYHGTPCDFGRDCIRWEYFNVFLQTLRDYTPG 103
Clone20 LVDEYLGDGANGLELDVAFVADGTADKMYHGVPCCFRSCTRTEGFTKYMDYIRQLTTPG 104
Clone24 LVDEYLGDGANGLELDVAFVDDGTADKMYHGVPCCFRSCTRTEGFTKYMDYIRQLTTPG 104
L.boneti3 LVDEYLGDGANGLELDVAFSDDGTAEKMYHGVPCCFRSCTRTEFTKYMDYIRELTPG 76
L.laetaH10 LVDEYLGDGANALEADLAFVSDGTADKMYHGVPCCFRSCTRSEKFTKYMDYIRRLTTPG 104
: :. :. ***.: * :. : * . . *** ** * : * * : : * ***.
    
```

↓ ↓

```

L.arizonica2 DSKYHEKLVLVVFDLKTGSLYDNQAYDAGKKLAKNLLQHYWNNGNNGGRAYIVLSIPNLA 164
L.arizonica1 DSKYHEKLVLVVFDLKTGSLYDNQAYDAGKKLAKNLLQHYWNNGNNGGRAYIVLSIPNLA 178
L.arizonica3 DSKYHEKLVLVVFDLKTGRLYDNQASDAGKKLAKSLLQNYWNNGNNGGRAYIVLSIPNLA 164
L.boneti1 DSNYHEKLVLVVFDLKTGSLYDNQAYDAGKKLAKSILQHYWNNGNNGGRAYIVLSIPNLA 137
L.reclusa1 DSKYHEKLVLVVFDLKTGSLYDNQAYDAGKKLAKNLLQHYWNNGNNGGRAYIVLSIPNLA 137
L.reclusa_prec DSKYHAKLVLVVFDLKTGSLYDNQAYDAGKKLAKNLLKHYWNNGNNGGRAYIVLSIPDLN 163
L.reclusa2 DSKYHAKLVLVVFDLKTGSLYDNQAYDAGKKLAKNLLKHYWNNGNNGGRAYIVLSIPDLN 137
L.intermediaP1 NSKYQEKLVLVVFDLKTGSLYDNQANDAGKKLAKNLLQHYWNNGNNGGRAYIVLSIPDLN 173
L.intermedia_LiD1 NSKYQEKLVLVVFDLKTGSLYDNQANDAGKKLAKNLLQHYWNNGNNGGRAYIVLSIPDLN 160
L.similis NSKYQEKLVLVVFDLKTGSLYDNQANDAGKKLAKNLLQHYWNNGNNGGRAYIVLSIPDLN 138
L.intermediaP2 NAKYQAKLILVVFDLKTGSLYDNQANEAGKKLAKNLLKHYWNNGNNGGRAYIVLSIPDLN 180
L.laetaH17 NAKYRDGFIILVFDLKTGSLSDNQVRPAGENVAKELLQNYWNNGNNGGRAYVVLSPDIDG 163
L.laetaH13 NSKYEEKFIFVLDLKTGSLNNEVRKAGENIAKGLLKNYWNNGNNGGRAYVVLSPDIA 163
Clone20 NSKFKSQLILLIMDLKLNGLIPEPNVAYAAGKVAEKLLSGYWQNGKSGARAYIVLSLETIT 164
Clone24 NSKFKSQLILLIMDLKLNGLIPEPNVAYAAGKVAEKLLSGYWQNGKSGARAYIVLSLETIT 164
L.boneti3 NSKFNNNLLILLIMDLKLNGLIPEPNVAYAAGKVAEKLLSSYWQNGESGARAYIVLSLETIT 136
L.laetaH10 SSNFRPQMLLLIIDLKLGKIEPNVAYAAGKSTAKKLLSSYWQDGKSGARAYIVLSLETIT 164
.: : : : * : : : * * : : . * * . * : * * : : * * * : * * : :
    
```

```

L.arizonica2      HYKLITGFKETLKTEGHPELMEKVGYDFSG-----NDNIDQVANAYKKAGVTGHVWQSDG 219
L.arizonica1      HYKLITGFKETLKTEGHPELMEKVGYDFSG-----NDNIDQVANAYKKAGVTGHVWQSDG 233
L.arizonica3      HYKLIAGFKEALTSEGHPELMDKVGYDFSG-----NDDIGDVANAYKKAGVTGHVWQSDG 219
L.boneti1         HYKLITGFKETLTSDGHPELMDKIGYDFSG-----NDAIGDVASAYQKAGVTGHVWQSDG 192
L.reclusa1        HYKLITGFKETLTSEGHPELMEKVGYDFSG-----NDDIDKVGNAVYKNAAGVTGHVWQSDG 192
L.reclusa_prec    HYKLITGFKETLKSEGHPELMDKVGHDVDFSG-----NDAIGDVGNAYKKAGVTGHVWQSDG 218
L.reclusa2        HYKLITGFKETLKSEGHPELMDKVGHDVDFSG-----NDAIGDVGNAYKKAGVTGHVWQSDG 192
L.intermediaP1    HYPLIKGFKDQLTKDGHPELMEKVGHDVDFSG-----NDDIGDVGKAYKKAGITGHIWQSDG 228
L.intermedia_LiD1 HYPLIKGFKDQLTKDGHPELMDKVGHDVDFSG-----NDDISDVGKAYKKAGITGHIWQSDG 215
L.similis         HYPLIKGFKDQLTKDGHPELMDKVGHDVDFSG-----NDDIGDVGKAYKKAGITGHIWQSDG 193
L.intermediaP2    HYPLIKGFKDQLTKDGHPELMDKVGHDVDFSG-----NDAIGDVGNAYKKAGITGHIWQSDG 235
L.laetaH17        HYEFVRFKQEVLLKKEGHEDLLEKVGYDFSGPYLPSLPTLDA THEAYKKAGVDGHIWLSDG 223
L.laetaH13        HYEFIRRFKQEVLLKAE GHEHLLDKVGYDLSGPLYLPSLSDSVHEAFRKAAGVDGHIWLSDG 223
Clone20          RPNFISGFRDAIKASGHEELFEKIGWDFSG-----NEDLGEIRRVYQKYGI EDHIWQGDG 219
Clone24          RPDFISGFRDAIKASGHEELFEKIGWDFSG-----NEDLGEIRRVYQKYGI EDHIWQGDG 219
L.boneti3         RPEFINGFRDAIKASGHEELFEKIGWDFSG-----NEDLGDIRRVYQKYGI EDHIWQGDG 191
L.laetaH10        RQDFISGFKDAIDASGHTLELYEKIGWDFSG-----NEDLGEIRRVYQKYGI DDHIWQGDG 219
:  ::  *::  :  .**  :*  :**  *::**  *::**  :  :  :  :  *  :  *  :**  .**

```



```

L.arizonica2      ITNCVASFIRGLDRACKAVKNR-DSSNGYINKVYYWTVDKYATTREAFDVGDMITNYP 278
L.arizonica1      ITNCL---LRGLDRVKAVANR-DSSNGYINKVYYWTVDKRQSTKNALDAGVDGIMPNY 289
L.arizonica3      ITNCL---LRGLDRVKAVANR-DSSNGYINKVYYWTVDKRQSTRDALDAGVDGIMTNY 275
L.boneti1         ITNCL---LRGLSRVREAVANR-DSSNGYINKVYYWTVDKRASTRDALDAGVDGIMTNY 248
L.reclusa1        ITNCL---LRGLSRVKEAVKNR-DSSNGFINKVYFWTVDKRASTRDALDAGVDGIMTNY 248
L.reclusa_prec    ITNCL---LRGLSRVKEAVKNR-DSSNGFINKVYFWTVDKRATREALDAGVDGIMTNY 274
L.reclusa2        ITNCL---LRGLSRVKEAVKNR-DSSNGFINKVYFWTVDKRATREALDAGVDGIMTNY 248
L.intermediaP1    ITNCL---PRGLSRVNAAVANR-DSANGFINKVYFWTVDKRSTTRDALDAGVDGIMTNY 284
L.intermedia_LiD1 ITNCL---PRGLSRVNAAVANR-DSANGFINKVYFWTVDKRSTTRDALDAGVDGIMTNY 271
L.similis         ITNCL---PRGLSRVNAAVANR-DSANGFINKVYFWTVDKRSTTRDALDAGVDGIMTNY 249
L.intermediaP2    ITNCL---LRGLDRVQATANR-DSANGFINKVYFWTVDKRATREALDAGVDGIMTNY 291
L.laetaH17        LTNFSP--LGDMLRLEKAIKSR-DSANGFINKIYYWSVDKVVSTTKAALDVGVDGIMTNY 280
L.laetaH13        LTNWAP--LGDMLRLEKIVERR-DSANGFINKVYWSVDKYSTTRTALDVGVDGIMTNFP 280
Clone20          ITNCLP---RGDYRLTEAMKKKNDPNKYTLKVYTW SIDKESSIRNALRLGVDVMTNYP 276
Clone24          ITNCLP---RGDYRLTEAMKKKNDPNKYTLKVYTW SIDKESSIRNALRLGVDVMTNYP 276
L.boneti3         ITNCLP---RGDYRLTEAMKKKNDPDYKYTEKVYTW SIDKESSIRNALRLGVDVMTNYP 248
L.laetaH10        ITNCWV---RDDRLEKAIKKNPNKYTKKVYTW SIDKNASIRNALRLGVDVIMTNY 276
:**  .  *  :  *  :  **  *::**  :  :  *  :  *  :**  .**  .**

```

```

L.arizonica2      DVIANVLNESAYKGFRLATYDDNPWETFKN 309
L.arizonica1      DVIAVLPNESAYKAKFRIASYDDNPWETFKN 320
L.arizonica3      DVIAVLPNESAYKAKFRIASYDDNPWETFKN 306
L.boneti1         DVIAVLPNESAYSAKFRIATYDDNPWETFKN 279
L.reclusa1        DVIAVLPNESAYKANFRIATYDDNPWETFKN 279
L.reclusa_prec    DVITDVLNESAYKAKFRIATYDDNPWETFKN 305
L.reclusa2        DVITDVLNESAYKAKFRIATYDDNPWETFKN 279
L.intermediaP1    DVITDVLNEAAYKKKFRVATYDDNPWVTFKK 315
L.intermedia_LiD1 DVITDVLNEAAYKKKFRVATYDDNPWVTFKK 302
L.similis         DVITDVLNEAAYKKKFRVATYDDNPWVTFKK 280
L.intermediaP2    DVITDVLNESAYKNKFRVASYEDNPWETFKK 322
L.laetaH17        NVLIGVLKESGYNDKYRLATYDDNPWETFKN 311
L.laetaH13        YVIDVLNENGYKDKYRLATYDDNPWETFKK 311
Clone20          ARVKSILRESEFSGTHRMATYDDNPWQK--- 304
Clone24          ARVKSILRESEFSGTHRMATYDDNPWQK--- 304
L.boneti3         ARVKSILNESEFSSTHRMATYEDNPWQK--- 276
L.laetaH10        EDVKDILQSEFSGYLRMATYDDNPWVK--- 304
:  :  *  :  :  **  *::**  .

```

Apêndice VII - Alinhamento múltiplo das seqüências correspondentes às isoformas de SmasesD. *L. arizonica* 1 (AF512953), 2 (AY699703), 3 (AY699704); *L. boneti* 1 (AY559844), 3 (AY559845); *L. intermedia* clone 20, clone24, LiD1 (AY340702), P1 (AY304471) e P2 (AY304472); *L. laeta* H10 (AY093601), H13 (AY093600) e H17 (AY093599); *L. reclusa_prec* (AY862486), *L. reclusa* 1 (AY559846), 2 (AY559847); *L. similis* (AY929305). Verifica-se o alto grau de conservação das quatro cisteínas (cinza), com exceção de duas potêinas do veneno de *L. laeta* H17 e H13, e dos resíduos envolvidos na catálise e na coordenação do metal (Murakami *et al.*, 2005) evidenciados pelas setas. Os asteriscos evidenciam os aminoácidos conservados. As proteínas cujos nomes estão sublinhados são aquelas com comprovada atividade esfingomielinásica e hemolítica (Fernandes-Pedrosa *et al.*, 2002; Ramos-Cerrillo *et al.*, 2004; Tambourg *et al.*, 2004).

ANEXOS

GenBank – Clones 20 e 24

[DQ388596](#). *Loxosceles interm...*[gi:88660605]

LOCUS DQ388596 1106 bp mRNA linear INV
27-FEB-2006

DEFINITION *Loxosceles intermedia* dermonecrotic protein-like I mRNA, complete

cds.

ACCESSION DQ388596

VERSION DQ388596.1 GI:88660605

KEYWORDS .

SOURCE *Loxosceles intermedia*

ORGANISM [Loxosceles intermedia](#)
Eukaryota; Metazoa; Arthropoda; Chelicerata; Arachnida; Araneae;

Araneomorphae; Haplogynae; Sicariidae; *Loxosceles*.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1106)

AUTHORS de Moura, J.F., Kalapothakis, E. and Chavez-Olortegui, C.

TITLE Molecular cloning and systematic screening of cDNA encoding for three toxins from *Loxosceles intermedia* venom gland

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 1106)

AUTHORS de Moura, J.F., Kalapothakis, E. and Chavez-Olortegui, C.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (05-FEB-2006) Immunology-Biochemistry and General Biology, UFMG, Av Antonio Carlos 6627, Belo Horizonte, MG 31270-901, Brazil

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..1106
/organism="Loxosceles intermedia"
/mol_type="mRNA"
/db_xref="taxon:58218"
/tissue_type="venom gland"

[CDS](#) 14..928
/note="D1 isoform I"
/codon_start=1
/product="dermonecrotic protein-like I"
/protein_id="ABD48088.1"
/db_xref="GI:88660606"

/translation="MLLPAVISFTVYAVFLQEANGHAAERADSRKPIWDIAHMVNDLG
LVDEYLGDGANGLELDVAFTADGTADKMYHGVPDCFRSCTRTEGFTKYMDYIRQLT
PGNSKFKSQLILLIMDLKLNIEPNVAYAAGKSVAEKLLSGYWQNGKSGARAYIVLSL
ETITRPNFISGFRDAIKASGHEELFEKIGWDFSGNEDLGEIRRVYQKYGIEDHIWQGD
GITNCLPRGDYRLTEAMKKKNDPNYKYTLKVYTWSIDKESSIRNALRLGVDVMTNYP
ARVKSILRESEFSGTHRMATYDDNPWQK"

ORIGIN

1 ggcacgagtc accatgttgc tccccgctgt catatccttt accgtatatg ctgtcttcc
61 ccaggaagct aatggcctg ctgcagaaag ggctgacagc cggaaagccaa tttgggta
121 agcgcacatg gtaaacgac ttgggctggt ggacgaatat ttaggtgatg gcgcgaacg
181 ccttgagtta gacgtagctt ttacagctga tgggactgct gataagatgt atcacggag
241 accatgtgac tgtttcagaa gctgtacgcg aacagagggga ttcaccaagt acatggact
301 tatacgtcaa ctaacgacac caggcaacag caagttcaaa agtcaactta tattgta
361 aatggacctg aaactgaatg gcatcgaacc gaatgttgcg tatgcggcag gaaaaagc
421 tgcggagaaa cttttgagcg gctactggca gaacggaaaa agtggagcta ggcata
481 agtactttcc ctggaaacca tcaccggacc aaatttcata agtggtttca gagatg
541 taaagcgagt ggacacgagg agttattcga aaaaataggt tgggatttct ctggca
601 ggacttgggc gagatccgca gagttacca gaaatacgg atcgaggatc acatttgg
661 aggcgacggt atcaccaact gtttgccacg aggggactat cgtctgacag aagc
tatgaa


```

721 aaagaaaaac gatcccaact acaaatacac tttaaaagtc tacacctgga gcattgacaa
781 agagtcttct atccgaaatg cactaagact tggcgtagat gctgtaatga ctaattatcc
841 agcccgtaga aaaagcatct tgagagagag tgaattctct ggcacacaca ggaaggcaac
901 ttacgatgat aatccctggc agaagtaaaa tctgtgcacc aaaatgactg actgcaagaa
961 atttttcaaa gccgatgtat taaagaaata atatagagct cagccttatg ttcttcgtta
1021 tttttctttc gccatacatc caaacatcca atcaacacag aaagcggata ataaagatat
1081 cattttgttt tacttcaaaa aaaaaa

```

[DQ388597](#). *Loxosceles interm...*[gi:88660607]

LOCUS DQ388597 1013 bp mRNA linear INV 27-FEB-2006

DEFINITION *Loxosceles intermedia* dermonecrotic protein-like II mRNA, complete cds.

ACCESSION DQ388597

VERSION DQ388597.1 GI:88660607

KEYWORDS .

SOURCE *Loxosceles intermedia*
ORGANISM [Loxosceles intermedia](#)
Eukaryota; Metazoa; Arthropoda; Chelicerata; Arachnida; Araneae;
Araneomorphae; Haplogynae; Sicariidae; *Loxosceles*.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1013)
AUTHORS de Moura, J.F., Kalapothakis, E. and Chavez-Olortegui, C.
TITLE Molecular cloning and systematic screening of cDNA encoding for three toxins from *Loxosceles intermedia* venom gland
JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 1013)
AUTHORS de Moura, J.F., Kalapothakis, E. and Chavez-Olortegui, C.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (05-FEB-2006) Immunology-Biochemistry and General Biology, UFMG, Av Antonio Carlos 6627, Belo Horizonte, MG 31270-901, Brazil

FEATURES Location/Qualifiers
source 1..1013
/organism="Loxosceles intermedia"
/mol_type="mRNA"
/db_xref="taxon:[58218](#)"
/tissue_type="venom gland"
[CDS](#) 13..927
/note="D1 isoform II"
/codon_start=1
/product="dermonecrotic protein-like II"
/protein_id="[ABD48089.1](#)"
/db_xref="GI:88660608"

```

/translation="MLLCAVISFIVYAVFLQEANGHAAERADSRKPIWDIAHMVNDLE
LVDEYLGDGANGLELDVAFTDDGTADKMYHGVPCDCFRSCKRTEGFTKYMDYIRQLTT
PGNSKFKSQLILLIMDLKLNIEPNVAYAAGKSVAEKLLSGYWQNGKSGARAYIVLSL
ETITRPFISGFRDAIKASGHEELFEKIGWDFSGNEDLGEIRRVYQKYGIEDHIWQGD
GITNCLPRGDYRLTEAMKKNDPNYKYTLKVYTWSIDKESSIRNALRLGVDVMTNYP
ARVKSILRESEFSGTHRMATYDDNPWQK"

```

ORIGIN

```

1 ggcacgagca ccatgttgct ctgcgctgct atatccttta tcgtatatgc tgtcttctc
61 caggaagcta atgggcatgc tgcagaaagg gctgacagtc ggaagccaat ttgggata
121 gcgcacatgg taaacgatct tgagctggtg gacgaatatt tagtgatgg cgcgaacggc
181 cttgagttag acgtagcttt tacagatgat gggactgctg ataagatgta tcacggagta
241 ccctgtgact gtttcagaag ctgtaagcga acagagggat tcaccaagta catggactat
301 atacgtcaac taacgacacc aggcaacagc aagttcaaaa gtcaacttat atgttaata
361 atggacctga aactgaatgg catcgaaccg aatgttgctg atgcggcagg aaaagcgtt
421 gcggaaaaac ttttgagcgg ctactggcag aacggaaaaa gtggagcgag ggcataata

```

```
481 gtactttccc tggagacat caccgacca gatttcataa gcggtttcag agatgcgatt
541 aaagcagtg gacacgagga gttattcgaa aaaatagggt gggatttctc tggcaacgag
601 gacttgggcy agatccgcag agtgtaccag aaatcggaa tcgaggatca catttgcaa
661 ggcgacggta tcaccaattg ttgcccacga ggggactatc gtctgacaga agctatgaaa
721 aagaaaaacg atcccaacta caaatacact ttaaagtct acacctggag cattgacaaa
781 gagtcttcta tccgaaatgc actaagactt ggcgtagatg ctgtaatgac taattatcca
841 gcacgtgtaa aaagcatctt gagagagagt gaattctctg gcacacacag gatggcaaca
901 tacgatgata atccctggca gaagtaaaat ctgtgcacca aaatgactga ctgcaaggaa
961 tttttcaaag ctgatgtatt aaagaataa tatagagctc aaaaaaaaaa aaa
```