



Universidade Federal de Minas Gerais  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Bioquímica e Imunologia  
Disciplina de Biologia Molecular

Projeto de Pesquisa:

# **Comparação de isoformas presentes no veneno das espécies de *Loxosceles* de maior importância clínica no Brasil**

Ana Cláudia S. Raslan; Guilherme Henrique Fernandes; Marcus Thadeu Teixeira;  
Marina L. Pucci; Rafael Lucas M. Guedes; Rafael R. Ferrari

Belo Horizonte, 10 de dezembro de 2007

# SUMÁRIO

<b>1_ Introdução e Justificativas.....</b>	<b>3</b>
<b>2_ Objetivos.....</b>	<b>6</b>
2.1_ Objetivo geral.....	6
2.2_ Objetivos específicos.....	6
<b>3. Materiais e Métodos.....</b>	<b>6</b>
<b>4. Perspectivas.....</b>	<b>17</b>
<b>5. Cronograma.....</b>	<b>18</b>
<b>6. Orçamento.....</b>	<b>19</b>
<b>7. Referências Bibliográficas.....</b>	<b>20</b>

## 1.INTRODUÇÃO

*Loxosceles* spp. (Araneae, Sicariidae) são aranhas cosmopolitas encontradas em zonas temperadas e tropicais da América, Oceania, Ásia, África e Europa. (Kalapothakis et al., 2007). São conhecidas 100 espécies no mundo, sendo que 10 destas ocorrem em território brasileiro: *L. adelaida* Gertsch, *L. anomala* (Mello-Leitão), *L. gaucho* Gertsch, *L. hirsuta* Mello-Leitão, *L. immodesta* (Mello-Leitão), *L. intermedia* Mello-Leitão, *L. laeta* (Nicolet), *L. puortoi* Martins, Knysak & Bertani e *L. similis* Moenkhaus (Platnick, 2007). A importância médica das espécies de *Loxosceles* tem atraído a atenção de pesquisadores desde 1934, quando Machiavello demonstrou que a picada de *Loxosceles laeta* pode causar dermonecrose severa. Hoje se sabe também que o veneno pode ter efeito sistêmico, caracterizado pela hemólise intravascular associada à lesão cutânea (Barbaro & Cardoso, 2003).

*Loxosceles*, conhecidas popularmente como aranhas-marrom, apresentam hábito noturno e tecem uma teia característica, semelhante a um chumaço de algodão espalhado em uma superfície. Em ambientes naturais são encontradas em cavernas, frestas de cascas de árvores, frestas de rochas e cupinzeiros, onde se alimentam de insetos e outros aracnídeos (Gertsch, 1967). Estas aranhas apresentam elevada capacidade de adaptação a ambientes intra-domiciliares (Gertsch, 1967), onde procuram abrigo em frestas, atrás de quadros, dentro de armários (Machado et al. 2005), em sótãos, garagens, debaixo de escadas e entre telhas. Ações antrópicas que perturbam o habitat natural podem contribuir para intensificar a colonização de ambientes urbanos por aranhas-marrom. A abundância e riqueza de presas e ausência de predadores potenciais são fatores que também favorecem o crescimento de populações de *Loxosceles* em ambientes urbanos (Fischer et al., 2006).

No Brasil, o loxoscelismo (acidentes causados por picada de *Loxosceles* spp.) tem demonstrado ser um crescente problema de saúde pública devido ao grande número de acidentes, causados principalmente pelas espécies *L. gaucho*, *L. intermedia* e *L. laeta*. Esses acidentes ocorrem especialmente nos municípios de Curitiba (Ribbeiro et al., 1993; Fischer, 1994) e São Paulo (Málaque et al., 2002; Gonçalves-de-Andrade & Tambourgi, 2003) e no estado de Santa Catarina (Sezerino et al.; 1998). Somente no ano de 2004, foram relatados 3741 casos na região metropolitana da cidade de Curitiba, Estado do Paraná (Silvestre et al., 2005).

Em Minas Gerais há registros de ocorrência das espécies *L. similis*, *L. laeta* e *L. anomala* tanto em ambientes urbanos (Álvares et al.; 2004) quanto naturais (Machado et al., 2005). A espécie *L. similis* apresenta grande distribuição para o estado e ocorre freqüentemente em grutas nas redondezas de Belo Horizonte (Machado et al., 2005). Porém, recentemente, têm sido relatadas, inúmeras ocorrências de *L. similis* em áreas residenciais na região metropolitana da capital mineira (De Maria et al., comunicação pessoal). Este fato constitui um risco potencial para a população e para os órgãos estaduais de saúde. No período de janeiro de 2001 a março de 2004 foram registrados no SINAN (Sistema De Informação de Agravos Notificáveis) 110 casos suspeitos de loxoscelismo, ocorridos no interior do estado. Provavelmente, acidentes com aranhas-marrons são ainda mais freqüentes, mas não são devidamente diagnosticados e/ou registrados devido à falta de um teste diagnóstico específico, às dificuldades para o diagnóstico dos sinais clínicos e para captura e identificação do agente agressor (Machado et al., 2005).

A terapêutica do loxoscelismo ainda é controversa (Kalapothakis et al., 2002). O tratamento inespecífico envolve administração de corticosteróides e pode ser necessária a excisão cirúrgica das lesões neuróticas (Ribeiro et al.; 1993 apud Kalapothakis et al.; 2002). O tratamento específico consiste na utilização de soros, tradicionalmente produzido por imunização de

cavalo com veneno bruto. Entretanto, o uso de antiveneno na terapia não é muito eficiente no tratamento da atividade letal e dermonecrótica do veneno de *Loxosceles* (Braz et al.; 1999 apud Kalapothakis et al. 2002). Além disso, a imunização de animais com substâncias tóxicas oriundas do veneno bruto constitui um sério problema (Araújo et al.; 2003). Outra dificuldade encontrada para a produção de soro é a manutenção de grande quantidade de aranhas em cativeiro, uma vez que cada aranha produz apenas cerca de 30mg de veneno bruto por extração (Araújo et al.; 2003).

Um grupo de proteínas de 32-35 kDa com atividade esfingomielinásica, responsável pela dermonecrose a atividade letal, tem sido descrito como o principal componente tóxico do veneno de *Loxosceles* (Alvarenga et al.; 2003). Essas proteínas também demonstraram ter alta capacidade imunogênica (Bárbaro et al. 1994).

Tendo em vista que proteínas dermonecróticas são as principais causadoras da toxicidade do veneno de loxosceles, a produção de anticorpos contra essas proteínas pode ser de grande valor potencial para a soroterapia e para o uso em pesquisas (Kalapothakis et al. 2002). Proteínas recombinantes não são tóxicas e são boas candidatas para serem usadas para a produção de uma nova geração de anticorpos neutralizantes contra o veneno de *Loxosceles intermédia*, como demonstrado por Araújo et al. (2003)

Kalapothakis et al. (2007) já isolaram seqüências de cDNA codificantes para proteínas dermonecróticas presentes no veneno de *Loxosceles intermedia*. Porém, poucos estudos desse tipo foram feitos com as outras principais espécies causadoras de acidentes no Brasil, como *L.similis*, *L. gaucho* e *L. laeta*.

Estudos comparativos entre as isoformas presentes no veneno de diferentes espécies constitui uma ferramenta potencial para melhoria da soroterapia referente ao loxoscelismo.

## 2\_ OBJETIVOS

### 2.1\_ Objetivo geral

O projeto visa realizar um estudo comparativo entre as isoformas protéicas presentes no veneno de quatro espécies de *Loxosceles*, que são responsáveis pela maioria dos casos clínicos de loxoscelismo no Brasil: *Loxosceles intermedia*, *Loxosceles gaucho*, *Loxosceles laeta* e *Loxosceles similis*.

### 2.2\_ Objetivos específicos

- Construir uma biblioteca de cDNA da glândula de veneno de três espécies de *Loxosceles*: *Loxosceles gaucho*, *Loxosceles laeta* e *Loxosceles similis*;
- Sequenciar as isoformas presentes no veneno de cada espécie;
- Selecionar as proteínas mais imunoreativas para uma análise *a posteriori*;
- Apontar as isoformas mais conservadas entre as espécies através de softwares de bioinformática

## 3\_ MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1\_ Coleta das aranhas-marrom e extração do veneno

Para obtenção do veneno (fração total), exemplares de *L. similis*, *L. laeta* e *L. gaúcho* serão coletados manualmente com o auxílio de pinças e recipientes plásticos apropriados. *L. laeta* e *L. gaúcho* são consideradas espécies sinantrópicas, e por isso, deverão ser obtidas no interior de domicílios urbanos e não-urbanos. *L. similis* é predominante em ambientes naturais e é

considerada uma espécie não-sinantrópica (da Silva,2005). Exemplares dessa espécie deverão ser coletados em cavernas no município de Prudente de Moraes (Silvestre *et al.*, 2005). A identificação taxonômica deverá ser realizada mediante comparação com a descrição original das espécies.

O veneno será extraído a partir de uma estimulação elétrica aplicada sobre o cefalotórax das aranhas. O líquido será coletado com o auxílio de uma micropipeta e, posteriormente, deverá ser centrifugado, filtrado, liofilizado e armazenado sob uma temperatura de -20°C antes de ser utilizado (Siveira *et al.*, 2002).

### 3.2\_Obtenção dos anti-corpos

Os anticorpos serão obtidos através de soro de coelhos imunizados. Cada animal, após a extração de um pré-soro, receberá uma injeção intradérmica inicial de 20 mg do veneno completo das três espécies em adjuvante completo de Freund. Duas injeções subcutâneas posteriores de 20 mg em adjuvante incompleto de Freund serão aplicadas em intervalos de duas semanas. Um grupo controle receberá apenas adjuvante de Freund sob as mesmas condições. Amostras de sangue serão coletadas uma semana após a última injeção para obtenção do plasma hiperimune (Kalapothakis *et al.*, 2002; Silvestre *et al.*, 2005).

Soro dos coelhos inoculados com o veneno das aranhas será avaliado pelo teste indireto de ELISA com o intuito de se determinar a presença de anticorpos anti-*Loxosceles*. Placas de microindicação serão mantidas *overnight* a 5°C com 100 µL de uma solução a 5µg / mL de veneno em tampão 0,02 M de bicarbonato de sódio (pH 9,6) como descrito por Chávez-olórtegui *et al.*, 1991. A absorvância será medida a 492 nm. O plasma pré-imune será submetido ao referido teste sob as mesmas condições como controle (Kalapothakis *et al.* 2002).

### 3.3\_ Extração do mRNA total das glândulas de veneno

Glândulas de veneno de 20 aranhas (de cada uma das espécies) deverão ser removidas dois dias após a extração do veneno, pulverizadas com um pilão em gelo seco e lisadas na presença de guanidínio tiocinato (Chirgwin *et al.*, 1979).

A extração de mRNA total será realizada através de um protocolo de isolamento de tecidos sólidos. Em um tubo estéril de 50mL em banho de gelo por cinco minutos deverá ser pipetado 12mL de tampão denaturante pré resfriado a 4°C para um grama de tecido. A amostra deverá ser homogeneizada primeiramente com um bastão de vidro estéril e posteriormente por inversão. Em seguida, deverá ser adicionado 1,2mL de Acetato de Sódio 2M pH 4,0 e agitar por inversão. Em cada tubo adicionar 12mL de Fenol-Clorofórmio a 4°C, homogeneizar novamente por inversão, vortexar por 10 segundos e deixar em banho de gelo por 15 minutos. Depois, transferir a mistura a outro tubo com 50mL e centrifugar a 10000rpm por 20 minutos. Por fim, remover cuidadosamente a fase superior da solução e transferi-la para outro tubo de 50mL.

A precipitação do RNA extraído deverá ser iniciada por adição de Isopropanol a 4°C na proporção 1:1 (v/v). A amostra deverá ser incubada a -20°C *overnight*. O próximo passo é centrifugar a 10000rpm por 15 minutos, remover o sobrenadante e ressuspender o *pellet* em 10mL de Etanol 75% gelado. Em seguida, secar os tubos invertidos sobre papel absorvente em fluxo laminar por no máximo 10 minutos. O material deverá ser ressuspendido em Acetato de Sódio 0,25M, pH 5 e 2,5 volumes de Etanol absoluto. Uma vez que seja necessário conservar o mRNA por um período longo, as amostras deverão ser armazenadas a -70°C.

### 3.4\_ Construção da biblioteca de cDNA.

#### 3.4.1\_ Transcrição reversa e clonagem em plasmídeo

A produção de moléculas de cDNA será efetuada a partir de 5µg de mRNA da glândula de veneno das aranhas (Kit ZAP-cDNA Synthesis). Para cada tubo, a reação deverá ocorrer na presença de 2,5µL de dNTP's, 5µL de tampão(5x) e 2µL de primer Oligo-dT. Primeiramente os tubos deverão ser aquecidos a 70°C por 5 minutos e resfriados em seguida a 0°C por mais 5 minutos. Em seguida, deverá ser acrescentado 1µL de transcriptase reversa e os tubos mantidos em temperatura ambiente por 5 minutos. Após esse período, os tubos deverão ser incubados, primeiro a 37°C por 60 minutos, depois 90°C por 5 minutos e, finalmente, a 0°C por mais 5 minutos. Por fim, 175µL de água Milli-Q estéril deverão ser adicionados em cada tubo.

A clonagem será realizada utilizando-se o plasmídeo pMYB5. Esse plasmídeo contém um gene que confere resistência à ampicilina, uma origem de replicação e um sítio múltiplo de clonagem. O promotor e o operador serão os mesmos do *operon Lac* bacteriano. Inserido no sítio de clonagem estará o gene que codifica a β-Galactosidade.

Os fragmentos de cDNA deverão ser digeridos com a enzima de restrição *ECOR1*, assim como os plasmídeos. Isso irá criar extremidades adesivas em cada molécula, possibilitando a fusão das mesmas. A clonagem deverá ser realizada na proporção de 1/1 (vetor/inserto). Posteriormente, as soluções deverão ser incubadas a 10°C.

#### 3.4.2\_ Preparação de bactérias competentes e transformação de *E.coli*

Com o intuito de aumentar a eficiência de transformação, a cepa ER2566 de *E. coli* que receberá os plasmídeos será quimicamente estimulada com cloreto de cálcio. É essencial frisar que todo procedimento deverá ser realizado em banho de gelo. A primeira etapa consistirá em semear as bactérias em meio LB sólido e incubar por aproximadamente 20 horas. Uma colônia deverá ser isolada e colocada para crescer em 3mL de meio LB por

aproximadamente 24 horas. Após esse período, deve-se transferir 1ml do meio rico em bactérias em 100ml de meio LB. Incubar a cultura por aproximadamente 3 horas à 37°C sob forte agitação (300 ciclos/minutos). O volume deverá ser transferido para dois tubos de 50mL, mantendo-os em gelo por 15 minutos. Posteriormente, as células deverão ser centrifugadas a 4000rpm por 10 minutos, o sobrenadante descartado e os tubos contendo os *pellets* invertidos por aproximadamente 1 minuto. A próxima etapa baseia-se em ressuspender o *pellet* em 10mL de solução gelada de CaCl<sub>2</sub> (0,1M) em banho de gelo, descartar o sobrenadante e inverter os tubos contendo os *pellets* por 1 minuto. Por fim, os *pellets* deverão ser ressuspensos em 2mL de solução de CaCl<sub>2</sub> (0,1M) + 15% de glicerol. As quantidades obtidas deverão ser congeladas rapidamente em nitrogênio líquido.

A transformação deverá ser efetuada com 1μL para cada 200μL de células competentes. Após serem retiradas do nitrogênio líquido, as bactérias deverão permanecer por 25 minutos em banho de gelo. Após esse período, elas deverão ficar 2 minutos em banho a 42°C, e, imediatamente após, deverão ser transferidas para o gelo, permanecendo por mais 2 minutos. Em cada tubo, deverão ser adicionados 800μL de meio LB a 37°C e deixar sob agitação por aproximadamente 1 hora. Por fim, 200μL de bactéria deverão ser plaqueadas em LB-ágar, contendo ampicilina e X-Gal/IPTG. As placas deverão permanecer *overnight* a 37°C sem agitação.

As colônias que sofreram o inserto correto vão apresentar coloração branca, e as colônias azuis devem ser descartadas. Cada colônia branca deverá ser pescada e transferida individualmente para um tubo contendo meio LB a 37°C. Esses tubos deverão ser agitados por 1 hora. Para que as colônias possam ser acondicionadas, 850μL de meio LB rico em bactérias deverão ser mantidos junto com 150μL de glicerol 15%. Esse procedimento deverá ser realizado em duplicata, sendo que um dos tubos será armazenado a -20°C e outro a -80°C.

### 3.5\_ Purificação das proteínas expressas

As proteínas sintetizadas a partir da expressão dos cDNAs de cada espécie, inseridos nas colônias bacterianas, serão purificadas de acordo com o

manual do kit IMPACT T7 (Intein Mediated Purification with an Affinity Chitin-binding Tag) System (BioLabs®). A inserção das proteínas alvo serão feitas em uma MCS (multiple cloning site) do vetor pTYB para criar uma fusão entre o C-terminal da sequência alvo com N-terminal da sequência codificante de inteína. Esse complexo, também estará ligado na mesma ORF (open reading frame) do complexo CBD (chitin binding domain), o domínio de ligação a quitina.

A proteína alvo é obtida a partir de um único passo em uma coluna de quitina, onde um lisado de cada colônia é passado, o complexo proteico fica aderido a coluna enquanto o restante dos componentes da cultura são eliminados. Para separar a proteína alvo do complexo, adiciona-se a coluna de quitina o reagente DTT (1,4-dithiothreitol) e incubando a 4°C por cerca de 10 horas. A ligação da proteína alvo com a inteína é quebrada, obtendo-se no produto eluído final apenas a proteína alvo, enquanto o restante do complexo permanece aderido à coluna.

### *3.6\_Screening da biblioteca de cDNA*

Pretendemos proceder o screening das bibliotecas de cDNA de cada uma das três espécies de aranha, utilizando a técnica de ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) do tipo sanduíche [Kalapothakis et al., 2002], para identificação de proteínas imunogênicas. Os clones positivos serão selecionados para posterior sequenciamento.

A técnica de ELISA do tipo sanduíche consistirá em: fixar os anticorpos isolados pelo processo já descrito anteriormente nos poços (well) de uma placa de poliestireno; em seguida, adicionar um antígeno apenas em cada well, isolado seguindo a técnica de purificação de proteínas também descrita anteriormente. As proteínas se ligarão aos seus respectivos anticorpos. Será então adicionado os mesmos anticorpos do primeiro passo, mas agora ligados à uma peroxidase; um substrato para a enzima é adicionado, ocorre a catálise de uma reação, com mudança de cor. Essa mudança será proporcional a quantidade de anticorpos específicos presentes na amostra. A leitura da absorbância em um espectrofotômetro indicará os wells que contêm os antígenos que mais resposta imune induzem no sistema imunológico do cobaia

utilizado. Dessa forma, seremos capazes de selecionar os clones capazes de produzir tais proteínas e sequencia-los.

Para o método de ELISA sanduíche, imunoglobulinas de cada espécie serão conjugados com peroxidase HRP (horseradish peroxidase), de acordo com o método de Nakane e Kawoi(1974), e armazenados a  $-20^{\circ}\text{C}$ [Alvarenga et al., 2003].

O procedimento [Kalapothakis et al., 2002] será feito da seguinte forma:

- Em cada poço da placa de ELISA, adiciona-se 100 $\mu\text{l}$  de solução 10 $\mu\text{g/ml}$  de imunoglobulinas em tampão carbonato e incuba-se por 8-12hs.
- Lava-se 3 vezes com PBS/Tween.
- Adiciona-se 200 $\mu\text{l}$  de solução bloqueadora em cada poço e incuba-se por 1h.
- Lava-se 3 vezes com PBS/Tween.
- Adiciona-se 100 $\mu\text{l}$  em cada poço, de solução contendo uma das proteínas purificadas constituintes do veneno, diluídas em solução bloqueadora, e incuba-se por 1h a  $37^{\circ}\text{C}$ .
- Lava-se a placa 3 vezes com PBS/Tween.
- Adiciona-se a cada poço 100 $\mu\text{l}$  de imunoglobulinas referentes a cada espécie, conjugados com peroxidase e diluídos em solução bloqueadora (1:1000). Incuba-se por 1h a  $37^{\circ}\text{C}$ .
- Lava-se 6 vezes com PBS/Tween.

Cada poço é completado com solução substrato e 11  $\mu\text{l}$  de 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$  por 11 ml de solução substrato e incuba-se por 20min a  $25^{\circ}\text{C}$ .

- Adiciona-se a cada poço 20 $\mu\text{l}$  de solução de pausa da reação.

As soluções utilizadas no procedimento são descritas abaixo (BioLegend):

- Tampão carbonato: 8.4 g  $\text{NaHCO}_3$ , 3.56 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , ddH $_2\text{O}$  até 1.0L, pH=9.5
- PBS/Tween: 0,5ml de Tween-20 em 1L PBS(80.0 g  $\text{NaCl}$ ,14.4 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 2.4 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2.0g  $\text{KCl}$ , ddH $_2\text{O}$  até 10 L, pH =7.2 alcançado com HCl)
- Solução bloqueadora: 1% BSA em PBS

- Solução substrato: 150 mg 2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid), 500 ml de 0.1M ácido cítrico, pH= 4.35 alcançado com NaOH
- Solução de pausa: 50 ml dimethylformamide (DMF) em 50 ml dH<sub>2</sub>O, 20g SDS (sodium dodecyl sulfate)

Segue-se então espectrofotometria, para selecionar os clones que demonstraram maior intensidade de reação, e que, portanto, codificam para as proteínas mais imunogênicas. A técnica é realizada em um espectrofotômetro, calibrado para 492 nm.

### *3.7\_Obtenção dos plasmídeos*

Para cada espécie, os plasmídeos recombinantes dos clones selecionados serão extraídos através da técnica de Mini-Prep.

A técnica de Mini-Prep será realizada da seguinte maneira:

- Acrescentar 1,5 ml de cultura do pré-inóculo no microtubo 1,5 ml;
- Centrifugar 30 segundos a 14.000 rpm (microcentrífuga) e remover o sobrenadante;
- Ressuspender o pellet em 100µl de Solução I e vortexar vigorosamente;
- Incubar no máximo 10 minutos no gelo (geralmente são suficiente 2 minutos );
- Acrescentar 200 µl de Solução II (preparada na hora do uso);
- Misturar no vortex e incubar 5 minutos no gelo;
- Acrescentar 150 µl de Solução III e incubar 20 minutos no gelo;
- Centrifugar 5 minutos a 14.000 rpm;
- Transferir o sobrenadante para um novo tubo e no fluxo da sala de pesagem (Lab. 203) acrescentar fenol:clorofórmio (1:1) - 225µl de fenol:225µl de clorofórmio;
- Centrifugar 5 minutos a 12.000 rpm;
- Transferir o sobrenadante para um novo tubo;

- Precipitar o DNA com 1 ml de etanol absoluto gelado mais 40µl de acetato de sódio 3M;
- Incubar por 30 minutos no congelador – 70 °C ou por 2 hora no congelador – 20 °C;
- Centrifugar por 20 minutos a 12.000 rpm na centrífuga a 4 °C;
- Desprezar o sobrenadante e lavar o pellet com 1 ml de etanol 70%;
- Centrifugar por 5 minutos a 12.000 rpm na centrífuga a 4 °C;
- Remover o sobrenadante e deixar secando o pellet;
- Acrescentar 37 µl de TE pH 8,0 mais 3 µl RNase 10mg/ml;
- Incubar por 30 minutos a 37 °C.

As soluções utilizadas são:

- Solução I: 50 mM glucose, 25 mM Tris HCl pH 8.0, 10 mM EDTA pH

8.0

Autoclavar 15 minutos, manter solução a 4 °C.

- Solução II: NaOH 0,2N , SDS 1%

- Solução III: Acetato de Potássio 5 M, Ácido Acético Glacial, H<sub>2</sub>O

Estocar a 4 °C.

### *3.8\_Amplificação dos cDNAs contidos nos plasmídeos*

Para amplificar os cDNAs contidos nos plasmídeos extraídos anteriormente, será utilizada a técnica de PCR (polymerase chain reaction), utilizando os primers provenientes do kit IMPACT T7 system(BioLabs®). Os demais reagentes necessários à reação (kit PCR Reagent System, Invitrogen®) são:

- Tampão de PCR contendo MgCl<sub>2</sub>
- Mix de dNTP
- Taq DNA polimerase

O procedimento da técnica de PCR (polymerase chain reaction) consiste em:

- Realizar uma diluição a partir de um eppendorf contendo a extração plasmidial total, de onde é retirado 2 µl e, em tubo separado, acrescenta-se 98 µl de água deslizada (1:50). A solução deve ser homogeneizada.

- Da solução obtida, 2  $\mu$ l são acrescentados em um terceiro tubo eppendorf de 0,5 ml, onde já se encontram Taq polimerase, tampão contendo MgCl<sub>2</sub>, dNTPs, ambos os primers e água completando um volume total de 20  $\mu$ l.

A solução obtida deve ser colocada em um termociclador, e o procedimento se como descrito a seguir:

- Início 94°C por 4 min.
- Desnaturação a 94°C por 1 min.
- Amplificação (anelamento dos primers) 55°C por 1 min 30
- Polimerização 72°C por 2 min
- Repetição do segundo passo, 29 vezes
- Extensão final 72°C por 5 a 10 min

As condições descritas acima podem ser alteradas para otimização do PCR, caso necessário.

### *3.9\_Purificação dos produtos obtidos na PCR*

Para purificar o produto obtido na PCR, ou seja, remover primers, dNTP's, tampão e a taq DNA polimerase, obtendo assim somente as seqüências de cDNA amplificadas, pretendemos realizar a técnica de PEG (PolyEthylene Glycol), que deverá se proceder da seguinte maneira:

- Adiciona-se 50  $\mu$ L da solução PEG para um tubo eppendorf 0.5 mL. Transfere-se o produto da PCR para o mesmo tubo e homogeneíza com a pipeta.
- Incuba-se a 37°C por 15 min.
- Etanol 80% é colocado em gelo.
- PCR + PEG é centrifugado em alta velocidade (~15,000 x g) por 15 min. (temperature ambiente)
- Usando uma pipeta, o supernatante deve ser descartado.
- 125  $\mu$ L do Etanol 80% resfriado é acrescentado ao tubo e centrifuga por 1min. Usando uma pipeta, o supernatante é descartado.
- O passo acima é repetido.

- O Etanol deve ser evaporado numa estufa por 5-10 min, a 37°C.
- O produto de PCR é dissolvido em 25 µL de solução TLE, com auxílio de uma pipeta.

As soluções utilizadas na técnica de PEG são:

- 20% PEG, 2.5 M NaCl. Para 50mL, adiciona-se a solução a 50 mL de: 10g PolyEthylene Glycol 8000, 7.3 g NaCl, ddH<sub>2</sub>O até 45 mL. Mistura-se. A solução então é incubada a 37°C e então adiciona-se dH<sub>2</sub>O até 50 mL.

- 50mL de Etanol 80%.

- TLE = 10 mM Tris, 0.1 mM EDTA

### *3.10\_ Eletroforese em gel de agarose*

A eletroforese em gel de agarose será utilizada em diferentes etapas do projeto, como para verificação dos resultados da extração plasmidial, da amplificação do PCR e por fim, da purificação pela técnica do PEG.

Para isso, cerca de 2-4 µL da solução obtida dos três processos acima deve ser corrida num gel de agarose por cerca de 20 min, junto a um tampão de amostra (Gel Loading Dye, Blue (6X), 6-8 µL.

O gel de agarose deve ser de 1% (1 grama de agarose para 100 ml de água). O gel estará completamente imerso em tampão TAE (Tris-Acetato EDTA)1% em uma cuba ligada à uma diferença de potencial relativa a 100 volts.

### *3.11\_ Sequenciamento*

Os plasmídeos recombinantes, de cada espécie, serão seqüenciados em um seqüenciador automático MegaBACE usando o Kit DYEnamic ET dye terminator (Amersham) [Silvestre et al., 2005]. O sequenciamento será realizado nas duas fitas. As seqüências nucleotídicas serão analisadas utilizando os programas Phred, Phrap e Consed e serão depositadas num banco de dados (GenBank), como seqüências ESTs (expressed sequence tags).

### 3.12\_ Homologia entre as seqüências de aminoácidos das espécies de *Loxosceles*

As seqüências codificadoras do veneno de *L. similis*, de *L. gaucho*, de *L. laeta* e de *L. intermedia* (para esta espécie, as seqüências codificadoras do veneno já estão depositadas em banco de dados) serão utilizadas para verificação do grau de homologia entre as proteínas componentes do veneno.

Para isto, será utilizado o programa GeneDoc, que converte as seqüências nucleotídicas em seqüências de aminoácidos, dando assim as proteínas componentes do veneno, selecionadas por seu grau de imunoreatividade. A análise de similaridade entre as seqüências de aminoácidos das 4 espécies de *Loxosceles* será feita através do programa MEGA 4.0 software [Kalapothakis et al., 2007], que ira gerar um dendograma através do método de neighbor-joinnig. Como as proteínas dermonecróticas de *L. intermedia* já são conhecidas será possível inferir, a partir do dendograma, quais são as proteínas das outras três *Loxosceles sp.* com maior homologia e, portanto, mesma função esperada.

## 4. PERSPECTIVAS

Após serem selecionadas as isoformas mais conservadas dentro das quatro espécies de maior importância clínica na Brasil, o teste em cobaias vivas poderá mostrar o efeito farmacológico de tais proteínas sobre o animal, em comparação com o veneno todo.

Posteriormente poderão ser criados soros com cada isoforma, assim como soros com combinações de proteínas recombinates, que deverão ser testados e comparados com o soro tradicional, para verificar a ação destes sobre a dermonecrose e mostrar qual soro é mais eficiente.

O estudo das isoformas das proteínas do veneno de *Loxosceles sp.* poderá propiciar um soro mais eficiente, que funcione igualmente para as quatro espécies mencionadas, que exija um menor sacrifício de cobaias durante a produção do mesmo e que, principalmente, resulte em um melhor resultado no tratamento de acidentes com picada de aranhas-marrom.

## 5. CRONOGRAMA

<b>Metodologias / Meses</b>	Coleta de aranhas	Extração do veneno e produção do soro	Obtenção do mRNA e transcrição reversa	Clonagem, seleção das colônias e screening	Mini-Prep e sequenciamento	Análise dos dados
<b>Janeiro/08</b>	.....					
<b>Fevereiro/08</b>	.....					
<b>Março/08</b>	.....					
<b>Abril/08</b>		.....				
<b>Mai/08</b>		.....				
<b>Junho/08</b>		.....				
<b>Julho/08</b>			.....			
<b>Agosto/08</b>			.....			
<b>Setembro/08</b>			.....			
<b>Outubro/08</b>			.....			
<b>Novembro/08</b>				.....		
<b>Dezembro/08</b>				.....		
<b>Janeiro/09</b>				.....		
<b>Fevereiro/09</b>				.....		
<b>Março/09</b>				.....		
<b>Abril/09</b>					.....	
<b>Mai/09</b>					.....	
<b>Junho/09</b>					.....	
<b>Julho/09</b>					.....	
<b>Agosto/09</b>					.....	
<b>Setembro/09</b>						.....
<b>Outubro/09</b>						.....
<b>Novembro/09</b>						.....
<b>Dezembro/09</b>						.....

## 6. ORÇAMENTO

<b>Produto</b>	<b>Fornecedor</b>	<b>Quantidade</b>	<b>Valor total</b>
Agarose (250g)	Sigma	1 unid.	<b>R\$ 2.284,94</b>
Alimentação (viagem)	A decidir	80 unid.	<b>R\$800,00</b>
Avidin-HRP (Avidin-Horseradish Peroxidase)	Sigma	3 unid.	<b>R\$ 594,00</b>
Bastão de vidro	Sos Laboratório	2 unid.	<b>R\$ 5,52</b>
Cloreto de Cálcio	Sos Laboratório	1000g	<b>R\$26,26</b>
Coelhos + manutenção	Biotério/USP	15 unid.	<b>RS1.500,00</b>
DMF (N,N-Dimethylformamide) 250mL	Sigma	1 unid.	<b>R\$ 87,48</b>
DyEnamic ET Dye terminator Kit MEGABace	Amersham	1 unid.	<b>R\$ 4.093,00</b>
ELISA Coating Buffer (5X)	BioLegend	1 unid.	<b>R\$ 27,00</b>
ELISA Wash Buffer (20X)	BioLegend	3 unid.	<b>R\$ 648,00</b>
Etanol absoluto 600mL	P&L Dtr.	10 unid.	<b>RS50,00</b>
FideliTaq PCR Master Mix Plus (100 reactions)	Amersham	4 unid.	<b>R\$ 2.084,00</b>
Gasolina	Petrobrás	150 Lts	<b>RS360,00</b>
Gelo seco			
Glicerol 15%	Sos Laboratório	1000mL	<b>R\$19,23</b>
Greiner high and medium binding 96 well plates	Sigma	3 unid.	<b>R\$ 1.371,00</b>
Greiner polystyrene 96 well plates v-bottom, sterile	Sigma	1 unid.	<b>R\$ 1.066,58</b>
Hospedagem	A decidir	40 unid.	<b>R\$1600,00</b>
Isopropanol	Sos Laboratório	1000mL	<b>R\$ 12,08</b>
Kit IMPACT T7 System	BioLabs	3 unid.	<b>R\$ 1.917,00</b>
Kit ZAP-cDNA Synthesis	SuperScript	2 unid.	<b>R\$1.244,00</b>
Lanterna de cabeça	Casa do pescador	5 unid.	<b>R\$250,00</b>
Latex Gloves, PF- medium, Inc. 1000	Santa Cruz Biotechnology	3 cx	<b>R\$285,00</b>
Meio LB líq. + Ampicilina + X-Gal	Phoneutria	25 placas	<b>R\$380,00</b>
Meio LB líquido	Phoneutria	2000ml	<b>R\$500,00</b>
Meio LB sólido	Phoneutria	50 placas	<b>R\$250,00</b>
Micropipeta 2µL	Sos Laboratório	1 unid.	<b>R\$ 85,80</b>
Papel absorvente	P&L Dtr.	2 cx	<b>R\$24,00</b>
Pilha	Duracel	100 unid.	<b>R\$200,00</b>
Pinça	Casa do pescador	10 unid.	<b>R\$105,60</b>

Polyethylene Glycol 8000	Sigma	1 unid.	<b>R\$ 164,18</b>
Ponteiras 0-200	Sos Laboratório	1000 unid.	<b>R\$19,40</b>
Ponteiras 200- 1000		1000 unid.	<b>R\$19,40</b>
Ponteiras 1000-2000		1000 unid.	<b>R\$7,35</b>
Quick mRNA isolation Kit	Stratagene	4 unid.	<b>R\$2.865,00</b>
Recipientes de plástico	P&L Dtr.	500 unid.	<b>R\$380,00</b>
SDS (sodium dodecyl sulfate)100g	Amersham	1 unid.	<b>R\$ 235,20</b>
Sephaglas FlexiPrep™ Kit	Amersham	2 unid.	<b>R\$ 2.416,00</b>
Seringa descartável estéril – 01 mL – com agulha;	Injex	480 unid.	<b>R\$225,00</b>
Bicarbonato de sódio	Sos Laboratório	500g	<b>R\$5,47</b>
2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)diammonium salt (100g)	Sigma	1 unid.	<b>R\$155,00</b>
<b>TOTAL.....</b>			<b>R\$ 28.362,49</b>

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alvarenga, L.M., Martins, M.S., Moura, J.F., Kalapothakis, E., Oliveira, J.C., Mangili, O.C., Granier, C., Chavez-Olortegui, C., 2003. Production of monoclonal antibodies capable of neutralizing dermonecrotic activity of *Loxosceles intermedia* spider venom and their use in a specific immunometric assay. **Toxicon** **42** (7), 725–731

Álvares, E. S. S.; Rodrigues, T. & De Maria, M. 2004. On *Loxosceles anomala* (Mello-Leitão) (Araneae: Sicariidae). **Revista Ibérica de Aracnologia**, **10**: 293-295.

Araújo. S. C.; Castanheira. P.; Alvarenga. L. M.; Mangili. O.C.; Kalapothakis. E.; Chavez-Olortegui. C. Protection against dermonecrotic and lethal activities of *Loxosceles intermedia* spider venom by immunization with a fused recombinant protein. **Toxicon** **41** (2003) 261–267

Barbaro, K.C., Eickstedt, V.R.D., Mota, I., 1994. Antigenic crossreactivity of venoms from medically important *Loxosceles* (Araneae ) species, in Brazil. **Toxicon** **32**, 113 120.

Barbaro, K. C., Cardoso, j. L. C. 2003. Mecanismo de ação de loxosceles e aspectos clínicos do loxoscelismo. In: Caroso et al., editors. **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes.**

São Paulo: Sarvier, 160-174.

Chirgwin, J.M., Przybyla, A.E., MacDonald, R.J., Rutter, W.J., 1979. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. **Biochemistry** **18**, 5294–5299.

Da-Silva, E.M., Fischer, M. L. 2005. Distribuição das espécies do gênero *Loxosceles* Heineken & Lowe, 1835 (Araneae; Sicariidae) no Estado do Paraná. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** **38**(4):331-335.

Fischer, M.L. 1994. Levantamento das espécies do gênero *Loxosceles* Heineken & Lowe, 1832 no município de Curitiba, Paraná, Brasil. **Estudos de Biologia** **38**:65-86

Fischer, I. F., Vasconcellos-Neto, j., Neto, I. G. S. 2006. The prey and predators of *Loxosceles intermedia* Mello-Leitão 1934 (Araneae, Sicariidae). **The journal of arachnology** **34**:485-488

Gertsch, W. J. 1967. The spider genus *Loxosceles* in South America (Araneae, Scytodidae). **Bulletin of American Museum of Natural History**, **136**: 117-174.

Gonçalves-De-Andrade, R. M & Tambourgi, D. V. 2003. First record on *Loxosceles laeta* (Nicolet, 1849) (Araneae, Sicariidae) in the West Zone of São Paulo City, São Paulo, Brasil, and considerations regarding its geographic distribution. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, **36**: 425-426.

Kalapothakis, E., Araújo, S.C., De Castro, C.S., Mendes, T.M., Gomez, M.V., Mangili, O.C., Gubert, I.C., Chávez-Olórtegui, C., 2002. Molecular cloning, expression and immunological properties of LiD1, a protein from the dermonecrotic family of *Loxosceles intermedia* spider venom. **Toxicon** **40**, 1691–1699.

Machado, E.O., Alvares, E.S.S., De Maria, M., e Kalapothakis, E., 2005. Sobre a presença de três espécies de *Loxosceles* Heineken and Lowe (Araneae: Sicariidae) no município de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. **Lundiana** **2**(6)

Málaque, C. M. S.; Castro-Valência, J. E.; Cardoso, J. L. C.; França, F. O. S; Barbaro, K. C. & Fan, H. W. 2002. Clinical and epidemiological features of definitive and presumed loxoscelism in São Paulo, Brazil. **Revista do Insituto de Medicina Tropical de São Paulo**, **44**: 139-143.

Platnick, N. I. 2007. **The World Spider Catalog, Version 6.0**. American Museum of Natural History, New York. Disponível *on line* no endereço: <http://research.amnh.org/entomology/spiders/catalog/index.html>.

- Ribeiro, L.A.; Eickstedt, V. R. D.; Rúbio, G. B. S.; Konalsaisen, J. F.; Handar, Z.; Entres, M.; Campos, V. A. F. P. & Jorge, M. T. 1993. Epidemiologia do acidente por aranhas do gênero *Loxosceles* Heineken & Lowe no estado do Paraná, Brasil. **Memórias do Instituto Butantan**, **55**: 19-26.
- Sezerino, U. M.; Zannin, M.; Coelho, L. K.; Gonçalves-Junior, J.; Grando, M.; Mattosinho, S. G.; Cardoso, J. L. C.; Von Eickstedt, V. R.; França, F. O. S.; Barbaro, K. C. & Fan, H. W. 1998. A clinical and epidemiological study of *Loxosceles* spider envenoming in Santa Catarina, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, **92**: 546-548.
- Silveira, R. B, Filho, J. S. F., Mangili, O. C., Veiga, S. S., Gremsky, W., Nader, H. B, Dietrich, K. P. V. 2002. Identification of proteases in of extract of venom glands from brown spiders. **Toxicon** **40**
- Silvestre, F.G., de Castro, C.S., Moura, J.F., Giusta, M.S., de Maria, M., Alvares, E .S.S., Lobato, F.C.F., Assis, R.A., Goncalves, L.A., Chavez-Olortegui, C., Kalapothakis, E., 2005. Characterization of the venom from Brazilian brown spider *Loxosceles similis* Moenkhaus, 1898 (Araneae, Sicariidae). **Toxicon** **46** (8), 927–936.