

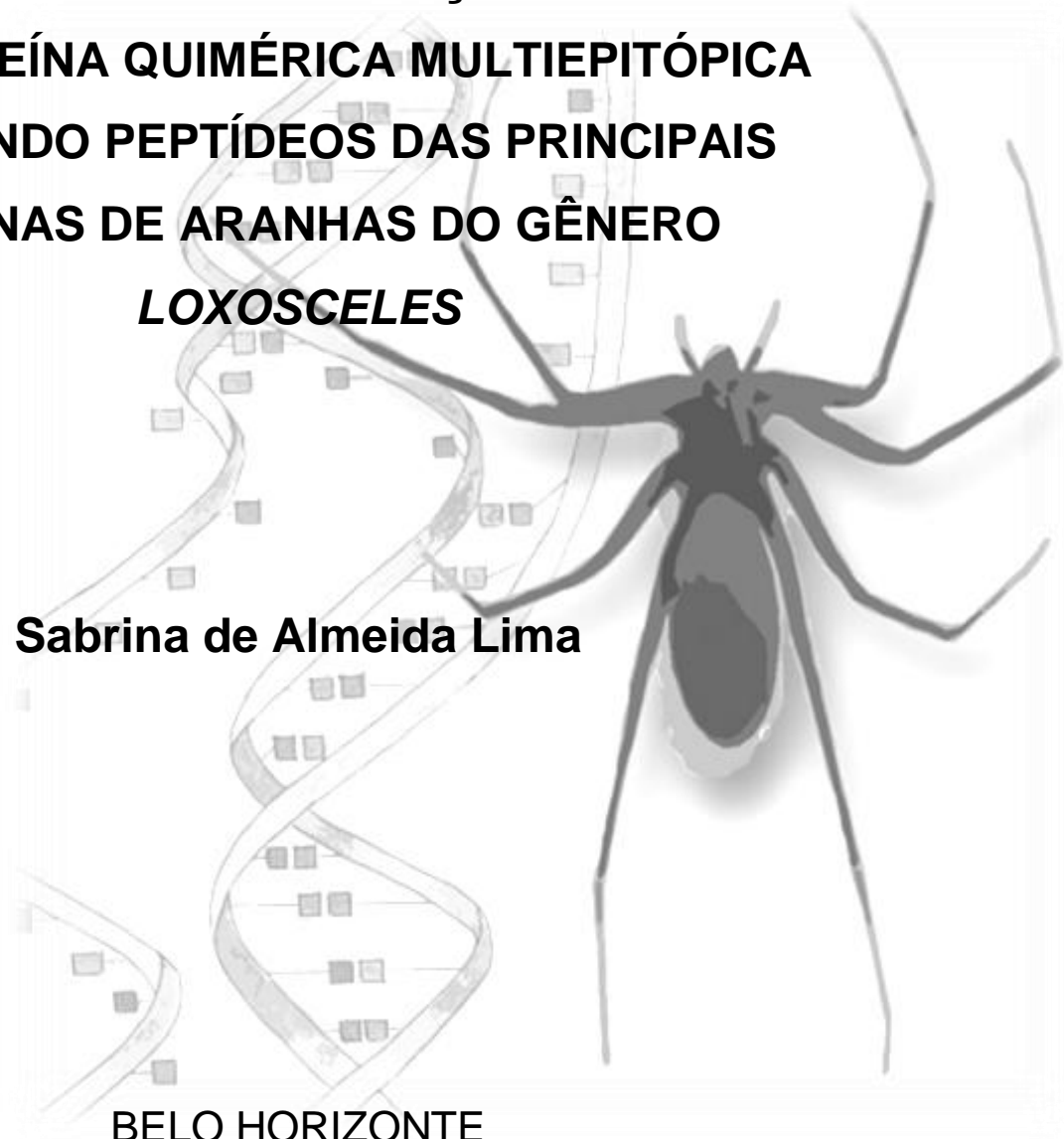
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL
DE PROTEÍNA QUIMÉRICA MULTIEPITÓPICA
CONTENDO PEPTÍDEOS DAS PRINCIPAIS
TOXINAS DE ARANHAS DO GÊNERO
*LOXOSCELES***

Sabrina de Almeida Lima

BELO HORIZONTE

2016



SABRINA DE ALMEIDA LIMA

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL
DE PROTEÍNA QUIMÉRICA MULTIEPITÓPICA
CONTENDO PEPTÍDEOS DAS PRINCIPAIS
TOXINAS DE ARANHAS DO GÊNERO
*LOXOSCELES***

Dissertação de mestrado apresentada ao Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção de título de mestre em Bioquímica e Imunologia.

Orientador: Carlos Chávez Olórtegui

Co-orientadora: Clara Guerra Duarte

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

BELO HORIZONTE – 2016

*“A mente que se abre a uma nova idéia
jamais volta ao seu tamanho original.”*

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Ao Departamento de Bioquímica e Imunologia – UFMG pela oportunidade que me foi dada;

Ao Professor Dr. Carlos Chávez, por ter me convidado para participar de sua equipe, pela confiança, pela orientação, pelo exemplo e por todo aprendizado;

À Dra. Clara Guerra, pela co-orientação, ajuda, disponibilidade, ensinamentos, empatia e pela oportunidade de trabalharmos juntas;

Ao Dr. Francisco Schneider, pelo incentivo, aprendizado, exemplo, conselhos e grande amizade;

Ao Dr. Ricardo Andrez pelos ensinamentos;

Ao Dr. Silvio Sanchez, pelos soros e proteínas utilizados no mapeamento de epitopos;

Ao Luis Felipe Minozzo e à Dra. Elizângela Almeida, pela ajuda com as purificações, disponibilidade e amizade;

À Dra. Thaís Mendes e à Daysiane Oliveira, por participação e ajuda na fase inicial do trabalho;

Às alunas de Iniciação Científica Giovana Ávila e Maria Luiza, pela colaboração neste trabalho;

A todos os colegas do Laboratório de Imunoquímica de Proteínas, sempre muito solícitos e companheiros: Letícia, Denis, Patrícia, Priscila, Stephanie, Fernanda, Luísa, Camila, Pricila, Fabiane, Andreza e Carol;

Aos membros do laboratório do professor Evanguedes, por partilhar material e equipamentos;

Ao Jamil, pela ajuda com alguns equipamentos de laboratório;

Às agências financiadoras CAPES, CNPq e FAPEMIG, pelo fomento;

Aos professores e colegas da disciplina de Bases Moleculares, pelo apoio e companheirismo;

Ao Daniel, por toda alegria que me dá suporte emocional, pelo apoio, incentivo, paciência e amor;

Aos familiares, por acreditarem em mim e me apoiarem;

Aos colegas da graduação, especialmente Ludmila e Iracema, pela grande amizade;

E a todos que de alguma forma contribuíram para a execução deste trabalho.

RESUMO

Aranhas do gênero *Loxosceles* spp apresentam nas suas glândulas de veneno alta expressão de toxinas pertencentes às famílias das esfingomielinases (Smases) e metaloproteases. Proteínas com atividade hialuronidásica também estão presentes no veneno loxoscélico e foram implicadas no espalhamento do veneno. Diversos estudos têm mostrado que anti-venenos contendo anticorpos dirigidos contra estas famílias de toxinas foram capazes de neutralizar *in vivo* e *in vitro* os efeitos tóxicos dos venenos loxoscélicos. Na atualidade, existe uma limitação na produção de antivenenos para fins terapêuticos, devido ao fato de que grandes quantidades de veneno bruto são necessárias para a imunização e testes de potência do antiveneno produzido e principalmente por que estes imunógenos são extremamente tóxicos para o animal produtor. No presente estudo, nós construímos, purificamos e caracterizamos imunologicamente uma proteína quimera recombinante contendo apenas epitopos de células B, lineares e/ou conformacionais previamente mapeados nas três principais classes de toxinas (SmasesD, metaloproteases e hialuronidase) presentes nos venenos das aranhas do gênero *Loxosceles* relevantes para o envenenamento humano. A proteína produzida mostrou-se não tóxica e induziu a produção de anticorpos com potencial neutralizante tanto *in vivo* quanto *in vitro*, sendo assim um potencial candidato para a substituição de veneno bruto no protocolo de produção de antivenenos.

ABSTRACT

Spiders from the genus *Loxosceles* spp show high expression of sphingomyelinases (Smases) and metalloproteinase within its venom glands. Indeed, Smases can reproduce the main symptoms of loxoscelism, whereas metalloproteinases may be involved in hemorrhagic activity. Proteins with hyaluronidasic activity are also present transcripts and are implied in venom spreading. Several studies have shown that antivenoms containing antibodies directed against these proteins are capable of neutralizing *in vivo* and *in vitro* the toxic effects of loxoscelic venoms. However, nowadays, antivenom production for therapeutic purposes is limited, due to the fact that great amounts of crude venom is required for immunization and potency tests and, above all, because this immunogen is extremely toxic for the producer animal. For this reason, there is great interest in evaluating possibilities to replace or reduce the amount of crude venom used in antivenom production. In the present study, we have constructed, purified and immunologically characterized a recombinant chimeric protein containing only linear and/or conformational B cell epitopes previously mapped on the three main classes of toxins (SmasesD, metalloproteases and hyaluronidase) present in loxoscelic venom, relevant for human envenomation. The protein produced proved to be non-toxic and induced the production of antibodies with neutralizing potential both *in vivo* and *in vitro*.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	ARANHAS.....	1
1.2	ARANHAS DO GÊNERO <i>LOXOSCELES</i>	2
1.3	LOXOSCELISMO.....	5
1.4	CARACTERIZAÇÃO DO VENENO LOXOSCÉLICO.....	7
1.5	DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO.....	9
1.6	METODOLOGIAS ALTERNATIVAS PARA A PRODUÇÃO DE ANTIVENENOS.....	11
1.7	PROTEÍNAS QUIMÉRICAS NA PRODUÇÃO DE SORO ANTI LOXOSCÉLICO.....	13
2	OBJETIVO.....	15
2.1	GERAL.....	15
2.2	ESPECÍFICOS.....	15
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
3.1	MAPEAMENTO DE EPITOPOS PELO METODO DE <i>SPOT</i>	16
3.1.1	Síntese de peptídeos na membrana de celulose pelo método de <i>SPOT</i>	16
3.1.2	Imunoensaios.....	17
3.1.3	Regeneração.....	17
3.2	PRODUÇÃO DA PROTEÍNA QUIMERA.....	18
3.2.1	Construção.....	18
3.2.2	Transformação.....	18
3.2.3	PCR de colônia.....	19
3.2.4	Expressão.....	19
3.2.5	Lise bacteriana.....	20
3.2.6	Purificação.....	21
3.2.7	Diálise e liofilização.....	21
3.2.8	Quantificação.....	21
3.3	CARACTERIZAÇÃO ANTIGÊNICA DA PROTEÍNA QUIMERA.....	22
3.4	PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS ANTI-rMEPLox.....	22
3.4.1	Animais.....	22

3.4.2	Imunização de coelhos.....	23
3.4.3	Purificação de IgG	23
3.5	CARACTERIZAÇÃO DOS ANTICORPOS ANTI-rMEPLox.....	23
3.6	ATIVIDADES BIOLÓGICAS E ENSAIOS DE NEUTRALIZAÇÃO.....	24
3.6.1	IN VITRO.....	24
3.6.2	IN VIVO.....	25
3.7	PRODUÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-rMEPLox EM CAMUNGONGOS	
	26	
4	RESULTADOS	27
4.1	MAPEAMENTO DE EPITOPOS	27
4.2	PRODUÇÃO DA PROTEÍNA QUIMERA (rMEPLox)	31
4.3	CARACTERIZAÇÃO DA rMEPLox.....	34
4.3.1	Caracterização imunogênica	35
4.3.2	Atividade hialuronidásica.....	36
4.4	CARACTERIZAÇÃO DOS ANTICORPOS ANTI-rMEPLox.....	37
4.4.1	Soro anti-rMEPLox frente a venenos	37
4.4.2	Reconhecimento de rMEPLox pelo soro anti-rMEPLox	39
4.4.3	Reconhecimento das proteínas do veneno de <i>I. intermedia</i> por anticorpos anti- rMEPLox em western blot	40
4.4.4	Identificação dos epitopos em membranas contendo peptídeos.....	40
4.5	PURIFICAÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS ANTI- rMEPLox ...	44
4.6	ATIVIDADES BIOLÓGICAS E ENSAIOS DE NEUTRALIZAÇÃO IN VITRO.....	46
4.6.1	Inibição da atividade fibrinogenolítica	46
4.6.2	Inibição da atividade gelatinolítica/colagenásica	47
4.7	ENSAIO DE NEUTRALIZAÇÃO IN VIVO.....	48
4.7.1	Inibição da atividade dermonecrótica.....	48
4.8	PRODUÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-rMEPLox EM CAMUNDONGOS	
	50	
5	DISCUSSÃO.....	56
6	CONCLUSÕES.....	62

7	PERSPECTIVAS	63
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Morfologia externa das aranhas.....	1
FIGURA 2: Movimento das quelíceras.....	2
FIGURA 3: Distribuição mundial de espécies de <i>Loxosceles</i> de importância médica....	3
FIGURA 4: Distribuição geográfica dos casos de loxoscelismo no Brasil no ano de 2006.....	3
FIGURA 5: Características morfológicas das aranhas <i>Loxosceles</i>	4
FIGURA 6: Loxoscelismo cutâneo.....	6
FIGURA 7: Loxoscelismo víscero-cutâneo.....	6
FIGURA 8: Mapeamento de epitopos da LALP-1.....	28
FIGURA 9: Mapeamento de epitopos da LiHYAL.....	29
FIGURA 10: Localização dos epitopos selecionados em seus respectivos modelos tridimensionais.....	30
FIGURA 11: Sequência de aminoácidos e nucleotídeos da rMEPLox.....	31
FIGURA 12: Vetor de expressão pET26b (+) contendo a sequência da rMEPLox.....	32
FIGURA 13: PCR de colônias das bactérias transformadas.....	32
FIGURA 14: SDS-PAGE 15% de extrato protéico bacteriano antes e após indução...33	
FIGURA 15: SDS-PAGE 15% do lisado protéico bacteriano.....	33

FIGURA 16: Purificação em coluna HisTrap™ HP de extrato proteico bacteriano e caracterização da rMEPLox obtida.....	34
FIGURA 17: ELISA da rMEPLox frente a diferentes soros de coelho.....	35
FIGURA 18: Atividade hialuronidásica.....	36
FIGURA 19: Imunoensaios iniciais do soro produzido anti-rMEPLox frente a diferentes venenos loxoscélicos.....	37
FIGURA 20: ELISA do soro produzido anti-rMEPLox frente a diferentes venenos loxoscélicos.....	38
FIGURA 21: ELISA do soro produzido α rMEPLox frente a veneno de <i>Loxosceles similis</i>	39
FIGURA 22: Teste de reatividade das bandas correspondentes a rMEPLox.....	39
FIGURA 23: Reconhecimento do veneno de <i>L. intermedia</i>	40
FIGURA 24: Reconhecimento de epitopos de LiD pelo soro anti-rMEPLox.....	41
FIGURA 25: Reconhecimento de epitopos de LALP-1 pelo soro anti-rMEPLox.....	42
FIGURA 26: Reconhecimento de epitopos de LiHYAL pelo soro anti-rMEPLox.....	43
FIGURA 27: Controle negativo do ensaio de SPOT.....	44
FIGURA 28: SDS-PAGE 10% purificação IgG.....	45
FIGURA 29: ELISA de IgG policlonal rMEPLox frente a diferentes venenos loxoscélicos.....	45
FIGURA 30: Neutralização de atividade fibrinogenolítica.....	46

FIGURA 31: O soro anti-rCpLi não neutraliza atividade fibrinogenolítica.....	46
FIGURA 32: A proteína rMEPLox não apresenta atividade fibrinolítica.....	47
FIGURA 33: Atividade gelatinásica.....	48
FIGURA 34: Atividade dermonecrótica em coelho não imune.....	49
FIGURA 35: Neutralização de atividade dermonecrótica em coelho imunizado com veneno.....	49
FIGURA 36: Neutralização de atividade dermonecrótica em coelho imunizado com rMEPLox.....	50
FIGURA 37: ELISA do soro anti-rMEPLox produzido em camundongos frente a diferentes venenos loxoscélicos.....	51
FIGURA 38: ELISA titulação dos soros anti-rMEPLox produzidos em camundongos..	52
FIGURA 39: Reconhecimento de epitopos de LALP-1 pelo soro de camundongos anti-rMEPLox.....	53
FIGURA 40 Reconhecimento de epitopos de LiD pelo soro de camundongos anti-rMEPLox.....	54
FIGURA 41 Reconhecimento de epitopos de SmaseD de <i>L. laeta</i> pelo soro de camundongos anti-rMEPLox.....	55

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Distribuição dos tipos de acidentes com tipo de aranha causadora de acordo com a faixa etária de 2009 a 2013.....5

TABELA 2: Tratamento do loxoscelismo preconizado pelo Ministério da saúde.....10

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BSA	Soro albumina bovina
cDNA	DNA complementar
Da	Daltons
DMF	Dimetilformamida
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
Fmoc	9,fluorenylmethoxycarbonyl
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Performance
IgG	Imunoglobulina G
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
kDa	Quilodaltons
Kb	Quilobases
LALPs	Metaloproteases do tipo astacina
LiD	Toxina dermonecrótica de <i>Loxosceles intermedia</i>
LiV	Veneno de <i>Loxosceles intermedia</i>
O.D	Densidade óptica
Pb	Pares de base
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
rCpLi	Proteína quimera recombinante de <i>Loxosceles intermedia</i>
rMEPLox	Proteína recombinante multiepitópica loxoscélica
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS
SmaseD	Esfingomielinase D
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametil-1,2-diaminometano

1 INTRODUÇÃO

1.1 ARANHAS

As aranhas são artrópodes da classe dos aracnídeos. Sua ordem Araneae é a sétima mais numerosa em espécies de seres vivos na Terra, e um importante táxon para estudos da biodiversidade (Miller *et al.*, 2015). Esses animais se diferenciaram há mais de 300 milhões de anos e atualmente estão divididos em 114 famílias que possuem 3.988 gêneros, contendo aproximadamente 46.058 espécies (World Spider Catalog 2016).

Com ampla distribuição pelos continentes (exceto Antártida), as aranhas podem ser encontradas em praticamente todos os tipos de ambientes terrestres. São carnívoras, se alimentando de insetos e pequenos vertebrados e por isso possuem um importante papel no equilíbrio ecológico (Platnick, 2013). A grande maioria das aranhas não é agressiva e poucas espécies representam perigo aos humanos.

O corpo das aranhas é dividido em duas partes principais: o cefalotórax - com quatro pares de patas articuladas para locomoção, um par de pedipalpos e um par de quelíceras para captura de alimento, além de compor o sistema nervoso; e o abdome que é responsável principalmente por digestão, circulação, respiração, excreção, reprodução e possui de duas a oito fiandeiras para produção de teia (Foelix, 1996).

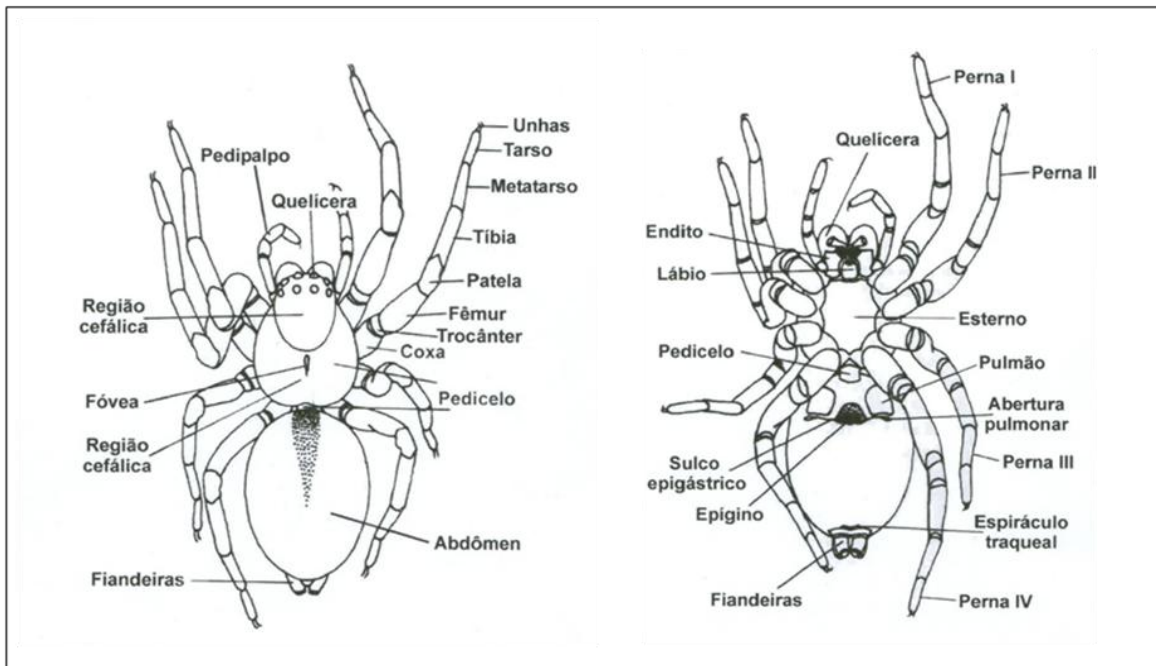


Figura 1: Morfologia externa das aranhas. Representação esquemática das estruturas e da divisão corporal do animal em vista dorsal (esquerdo) e ventral (direita). (Brescovi, Bonaldo & Rheins, 2002)

A ordem das aranhas pode ser subdividida de acordo com a disposição das quelíceras. As Orthognatha possuem quelíceras que se projetam para frente do cefalotórax, as presas posicionam-se para baixo e são normalmente conhecidas como “tarântulas”. Já as Araneomorphae possuem quelíceras que se movimentam lateralmente, como pinças. (Kaestner, 1969). Este último grupo possui os três gêneros de maior importância médica no Brasil: *Loxosceles* (aranha marrom), *Phoneutria* (armadeira) e *Lactrodectus* (viúva negra) (Vetter e Visscher, 1998).

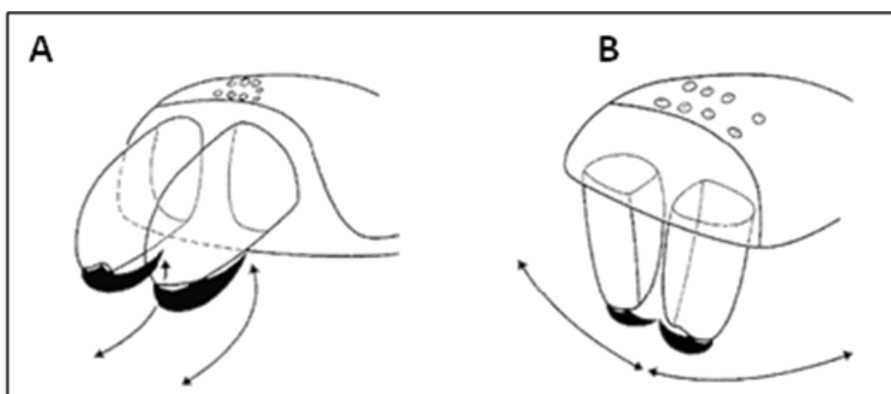


Figura 2: Movimento das quelíceras. Em (A) a representação do movimento de orthognatha e em (B) o movimento das araneomorphae. (Foelix, 1996).

ARANHAS DO GÊNERO *LOXOSCELES*

Devido a sua importância médica, as aranhas *Loxosceles* são foco de estudo deste trabalho. Elas são classificadas como pertencentes ao filo Artropoda, subfilo *Chelicerata*, ordem *Araneae*, subordem *Araneomorpha*, família *Sicariidae*, gênero *Loxosceles*. (Platnick, 2009). Elas apresentam ampla distribuição mundial, sendo encontradas na África, Europa, Américas e Oceania (ISBISTER e FAN, 2011).

No Brasil, já foram encontradas 10 espécies desses aracnídeos (TAMBOURGI *et al.*, 2010; PLATNICK, 2013). Destas, as que apresentam maior relevância para a saúde pública são *Loxosceles intermedia*, *Loxosceles gaucho*, *Loxosceles laeta* (HOGAN *et al.*, 2004). Mais recentemente, pode-se observar um grande aumento no número de casos envolvendo também *Loxosceles similis* (CHATZAKI *et al.*, 2012). O maior número de casos registrado no país se encontra na região Sul, atingindo cerca de 12,7/100.000 habitantes, num total de 91% de todos os casos registrados no Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

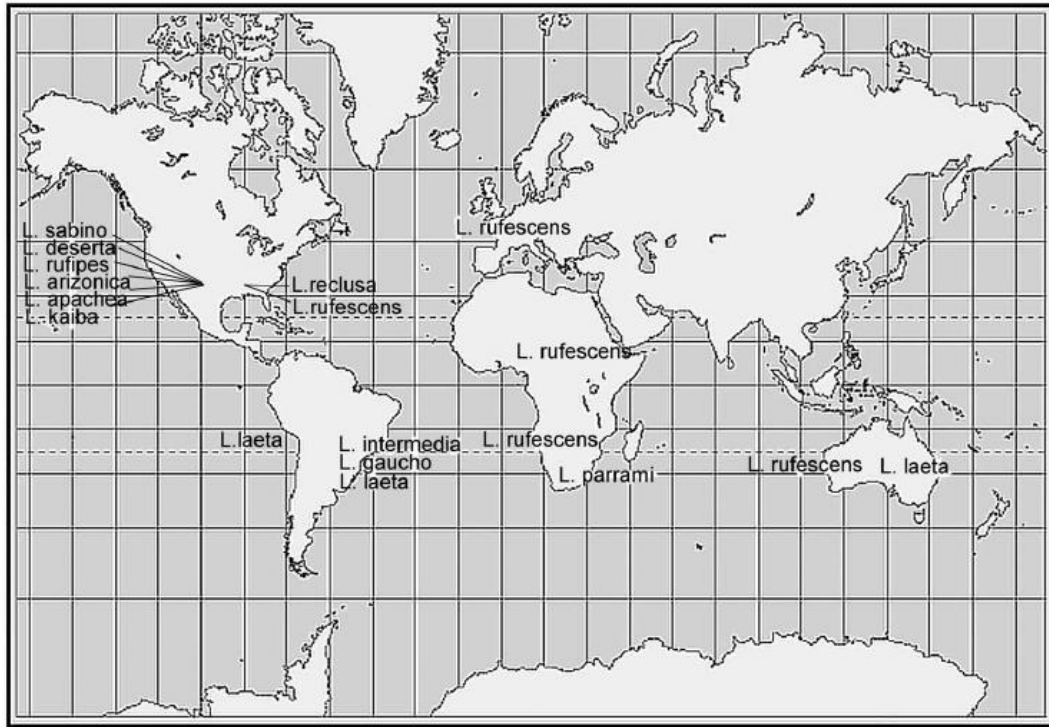


Figura 3: Distribuição mundial de espécies de *Loxosceles* de importância médica. (Hogan *et al.*, 2004)

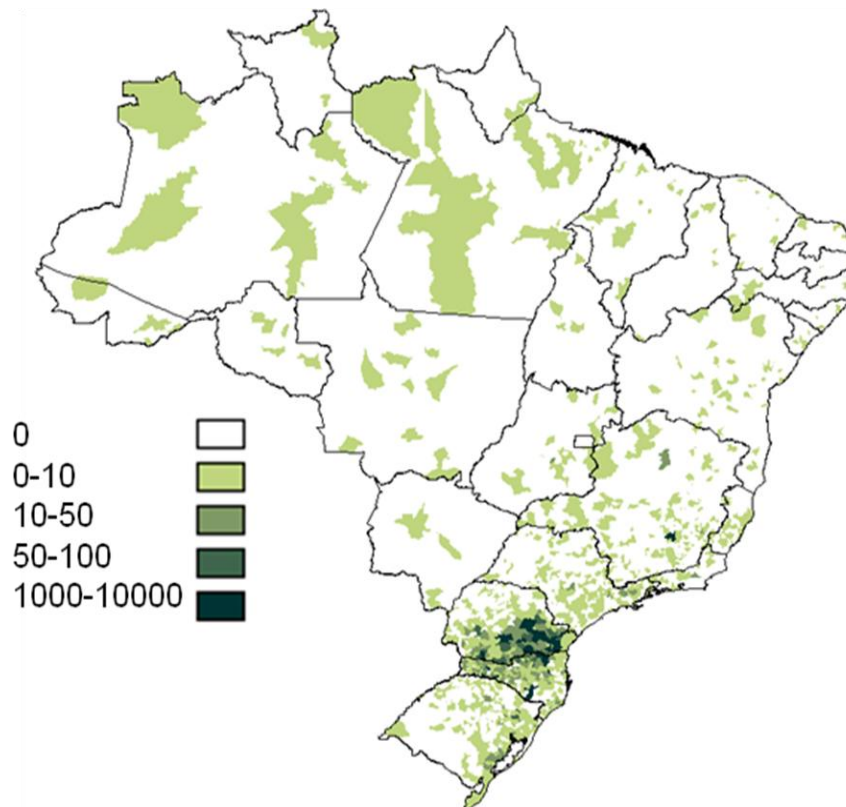


Figura 4: Distribuição geográfica dos casos de loxoscelismo no Brasil no ano de 2006. (Ministério da Saúde, 2006); (Wen, 2006).

As aranhas *Loxosceles* são conhecidas como aranhas marrom ou aranhas violino, por apresentarem uma coloração marrom e uma mancha escura no cefalotórax na forma deste instrumento. São aranhas de pequeno porte (2-3 cm de perna a perna) e apresentam seis olhos dispostos aos pares (VETTER, 1999). Podem viver de 3 a 7 anos, sendo que atingem maturidade sexual com um ano de idade (FISCHER, 1996). Possuem hábito noturno e no ambiente natural são encontradas, principalmente, em locais secos e escuros, como troncos de árvores, embaixo de pedras e em restos vegetais (SANDIDGE, HOPWOOD, 2005). Suas teias são irregulares e pegajosas, em forma de algodão. Com hábitos sedentários, elas preferem se alimentar de animais que estejam presos na teia. Não são agressivas e a maioria dos acidentes ocorre quando a aranha é pressionada contra a pele, como ao se vestir e durante o sono (SESA, 2004; SEZERINO, 1998).

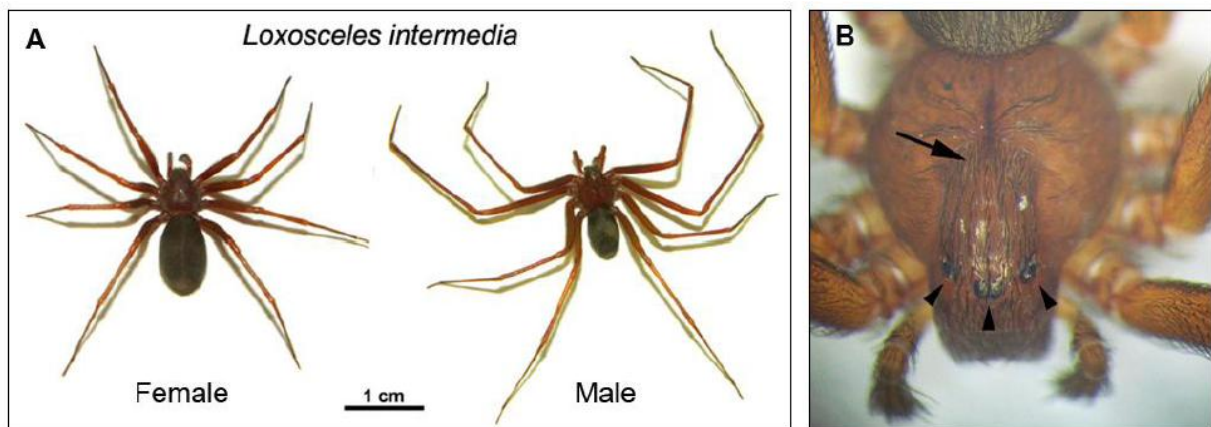


Figura 5: Características morfológicas das aranhas *Loxosceles*. A) Dimorfismo sexual de *Loxosceles intermedia* B) Seta indica o desenho em forma de violino na face dorsal do cefalotórax. As pontas de setas indicam os três pares de olhos arranjados em semi-circulo. Adaptado de (Chaim, 2011)

O crescimento urbano associado à destruição do habitat natural faz com que as aranhas busquem abrigo e alimento nas cidades. Com hábitos alimentares relativamente generalistas, elas alcançam uma alta capacidade de dispersão. Além disso, a urbanização ocasiona o desaparecimento de predadores naturais de aranhas, como anfíbios, répteis e aves. Tais fatores contribuem para o crescente índice de acidentes. Menos da metade do araneísmo no Brasil tem o gênero causador do envenenamento registrado. Dentre os gêneros registrados, *Loxosceles* é o que causa maior número de casos de acidentes (Tabela 1).

Faixa etária	<i>Phoneutria</i> nº de casos	<i>Loxosceles</i> nº de casos	<i>Latrodectus</i> nº de casos
<1	179	448	13
1-4	710	1.911	25
5-9	833	1.745	30
10-14	888	1.858	42
15-19	1.252	3.230	49
20-39	5.606	15.196	190
40-59	6.325	11.333	136
60-64	1.206	1.502	18
65-69	1.027	1.057	25
70-79	1.193	1.043	26
>80	305	294	6
Total	19.523	39.617	560
%	(32,8%)	(66,3%)	(0,9%)

Tabela 1: Distribuição dos tipos de acidentes com tipo de aranha causadora de acordo com a faixa etária de 2009 a 2013 (número total de casos) (Adaptado de A.M da Silva, Bernarde, and Abreu 2015)

1.2 LOXOSCELISMO

O quadro tóxico causado pela picada da aranha marrom é comumente denominado loxoscelismo e pode se apresentar em duas formas distintas: a cutânea e a viscero-cutânea. A forma mais comum e com menor gravidade é a cutânea, onde se observa inicialmente dor leve e eritema no local da picada. De 8 a 24 horas após a picada, ocorre evolução da lesão para necrose e ulceração extensa na pele, com áreas de equimose e isquemia. De três a sete dias após o acidente, a lesão se torna bem delimitada com a formação de uma escara que, ao se soltar, deixa uma úlcera de difícil cicatrização (ISBISTER e FAN, 2011).



Figura 6: Loxoscelismo cutâneo. Evolução de um paciente com quadro de loxoscelismo cutâneo, mostrando 36 horas (A), oito dias (B), e três meses (C) após a picada. O paciente foi tratado com medicamentos, soro antiveneno e foi submetido a cirurgias plásticas. (Cabrezito et al, 2009)

A forma viscero-cutânea é caracterizada por efeitos sistêmicos como febre, calafrios, vômitos, mal estar, fraqueza, icterícia e distúrbios da hemostase (FUTRELL, 1992; ISBISTER e FAN, 2011). É muito menos comum do que a forma cutânea, porém é mais grave e sua frequência varia de acordo com a espécie envolvida (MALAQUE *et al.*, 2002; ISBISTER e FAN, 2011). Os distúrbios hemostáticos são caracterizados por hemólise intravascular e coagulação intravascular disseminada. A insuficiência renal aguda também pode acontecer nesta forma do loxoscelismo (SCHENONE *et al.*, 1989; HOGAN *et al.*, 2004).



Figura 7: Loxoscelismo viscero-cutâneo. Evolução da urina de um paciente com loxoscelismo viscero-cutâneo. (Maguiña-Vargas, 2006)

1.3 CARACTERIZAÇÃO DO VENENO LOXOSCÉLICO

Os venenos são misturas complexas de moléculas capazes de interferir em diferentes funções biológicas na presa no qual é inoculado. A análise transcriptômica da glândula de veneno de aranhas *Loxosceles* revelou um panorama geral da composição destes venenos especificamente.

Em 2008, Fernandes-Pedrosa e colaboradores realizaram a análise dos transcritos das glândulas de *Loxosceles laeta*. Proteínas relacionadas com as funções tóxicas do veneno representam 16,4% do total de transcritos analisados e a família de moléculas mais abundante detectada foi a das esfingomielinases D (SmasesD). Outros transcritos desse estudo revelaram similaridade com neurotoxinas, hialuronidases, metaloproteases, lipases, serinoproteases, lectinas do tipo C, inibidores enzimáticos, cisteínopeptidases e outros. Além disso, 25% dos transcritos não puderam ser identificados com nenhuma molécula previamente descrita, indicando que ainda há muito a ser estudado no que diz respeito à variedade molecular destes venenos.

Em 2010, Gremski e colaboradores contribuíram mais para o conhecimento dos venenos loxoscélicos, analisando o transcriptoma de *L. intermedia*. Ao contrário do que foi observado para *L. laeta*, membros da família das neurotoxinas com atividade inseticida foram os transcritos mais frequentemente identificados nesse estudo, seguidos pelas SmasesD e por metaloproteases do tipo astacina. Porém, uma diversidade semelhante de famílias de moléculas foi encontrada nos transcritos da glândula de veneno de *L. intermedia*.

Devido a sua relevância para a instalação do quadro de envenenamento por *Loxosceles* em humanos, o grupo molecular melhor caracterizado neste veneno é o das SmasesD (ou fosfolipases D, conforme recomendado por Lee and Lynch, 2005). As SmasesD hidrolizam preferencialmente moléculas de esfingomielina, mas também possuem um amplo espectro de fosfolípidos como substrato. Estas toxinas possuem em torno de 32 kDa e apesar de não se saber completamente seu mecanismo de ação, alguns autores afirmam que a hidrólise de lípidos pode ativar vias de sinalização que causam efeitos deletérios nos tecidos (Chaim *et al.*, 2011). Já foi demonstrado que elas estão envolvidas em processos como agregação plaquetária, hemólise intravascular e dermonecrose, o sinal mais típico do envenenamento por aranhas marrom (KURPIEWSKI *et al.*, 1981^a; KURPIEWSKI *et al.*, 1981^b; FUTRELL, 1992). A injeção de apenas um tipo de molécula desta família é capaz de reproduzir grande parte dos sintomas causados pelo veneno total.

As metaloproteases são enzimas de atividade catalítica dependente de metal que possuem atividade proteolítica. As metaloproteases do tipo astacinas (LALPs - *Loxosceles astacin-like* proteases), com cerca de 29 kDa, são dependentes de zinco e também são expressas abundantemente nos venenos loxoscélicos, chegando a representar quase 10% dos transcritos identificados em *L. intermedia*. Além de uma possível função digestiva, a ação dessas enzimas na degradação de componentes de matriz extracelular como entactina, gelatina (colágeno desnaturado), e proteoglicano de heparan sulfato, sugere que elas também podem atuar no espalhamento do veneno. Além disso, já foi demonstrado que moléculas solúveis do plasma, como fibrinogênio e fibronectina, são alvos destas metaloproteases loxoscélicas. (FEITOSA *et al.*, 1998; GREMSKI *et al.*, 2010; da SILVEIRA *et al.*, 2002; SILVEIRA *et al.*, 2007; TREVISAN SILVA *et al.*, 2010).

Enzimas de aproximadamente 43 kDa, semelhantes à hialuronidase, já foram identificadas também em diversas espécies loxoscélicas, como *L. deserta*, *L. gaucho*, *L. intermedia* e *L. laeta*. Embora representem uma menor porcentagem na composição do veneno, a hialuronidase vem demonstrando um papel relevante no envenenamento por aracnídeos (HORTA *et al.*, 2014). Essas enzimas lisam o ácido hialurônico presente na matriz extracelular de vertebrados e infere-se que possuam um papel no aumento da difusão do veneno e espalhamento gravitacional das lesões (BARBARO *et al.*, 2005; da SILVEIRA, *et al.*, 2007; YOUNG e PINCUS, 2001). A caracterização de uma isoforma recombinante de hialuronidase do veneno de *L. intermedia* foi publicada. A pré incubação do veneno com esta hialuronidase recombinante resultou num aumento do efeito dermonecrótico do veneno, reforçando a idéia de que estas enzimas atuam como um fator de espalhamento (FERRER *et al.* 2013).

Além destas famílias de moléculas, com notável relevância para o estabelecimento do quadro de envenenamento observado em mamíferos, ainda há outros componentes importantes. Dentre eles, moléculas com atividade inseticida, que atuam em canais iônicos de insetos com grande especificidade (MATSUBARA *et al.* 2013). Esta família de toxinas, também conhecida como knottinas, é composta por pequenas moléculas proteicas (3-10 kDa), com um alto conteúdo de pontes dissulfeto, formando um arcabouço compacto (GRACY AND CHICHE 2011). Duas proteases que clivam ligações peptídicas foram identificadas no veneno das aranhas marrom, em baixas quantidades. Por possuírem um resíduo de serina no sítio catalítico, elas foram chamadas de serinoproteases. É muito provável que essas serinoproteases atuem complementando a atividade de outras proteases, como as metaloproteases. Alguns autores afirmam também que elas podem interagir com proteases que são liberadas pelo próprio tecido lesionado do corpo da presa (VEIGA *et al.* 2000).

Há uma notável diversidade molecular no arsenal de toxinas presentes no veneno de aranhas *Loxosceles*, porém, grande parte ainda não é bem conhecida. Esse conhecimento limitado é, em grande parte, devido à dificuldade em se obter quantidades de veneno suficiente para estudos detalhados, uma vez que as aranhas produzem apenas poucos microgramas de veneno (LUCAS, 1988; VAN MEETEREN *et al.*, 2004; PAULI *et al.*, 2009). Novas estratégias proteômicas de alta resolução têm auxiliado e podem ser fundamentais para se desvendar a complexidade dos venenos loxoscélicos.

1.4 DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO

Geralmente a picada de aranhas *Loxosceles* é indolor, o que faz com que o paciente só procure atendimento médico horas após o acidente, quando a situação já se agravou (FUTRELL, 1992). O diagnóstico de loxoscelismo é portanto difícil, e, além disso, a presença de lesões na pele não é um sintoma específico e pode ser característica de várias outras desordens que não a picada de aranhas do gênero *Loxosceles* (VETTER e SWANSON, 2007). Sendo assim, o ideal seria que o paciente levasse a aranha responsável pela picada para correta identificação, porém isso raramente ocorre. Os sinais e sintomas, os dados epidemiológicos e históricos são, portanto, a base para o diagnóstico do loxoscelismo (MÁLAQUE *et al.*, 2002).

Alguns pesquisadores vêm estudando e desenvolvendo métodos para o diagnóstico mais preciso do loxoscelismo. Imunoensaios para a detecção (GOMEZ *et al.*, 2002), identificação e quantificação do veneno em biópsia da lesão dermonecrotica (CARDOSO, *et al.*, 1990), em soros dos paciente (CHÁVEZ-OLÓRTEGUI *et al.*, 1998) e em pelos dos pacientes presentes na lesão (MILLER *et al.*, 2000) já foram testados. Porém, nenhum destes testes está disponível para uso, pois necessitam de uma maior correlação clínica e uma análise estatística mais elaborada (DA SILVA *et al.*, 2004).

Uma variedade de tratamentos para casos de envenenamento por aranhas *Loxosceles* tem sido descritos na literatura. As terapias mais utilizadas são o uso de antissépticos, antibióticos, anti-histamínicos, analgésicos, anti-inflamatórios esteroides, oxigenação hiperbárica, dapsona, procedimentos cirúrgicos e a administração de antivenenos (DA SILVA *et al.*, 2004; ISBISTER e FAN, 2011). Entretanto, há poucos ensaios clínicos que comprovam a eficácia de qualquer um desses tratamentos, sendo que a maioria deles depende do tempo decorrido do acidente até se procurar ajuda médica (ISBISTER e FAN, 2011).

De acordo com o Ministério da Saúde (2001), o uso de antivenenos no Brasil é indicado conforme a gravidade do caso. Recomenda-se seu uso quando há identificação de hemólise no quadro viscero-cutâneo ou quando a forma cutânea é identificada nas primeiras 72 horas. O consenso é que no paciente grave deve-se administrar 10 ampolas, no moderado 5 ampolas e no leve não se deve administrar o soro. O uso de antissépticos e permanganato de potássio pode ajudar na prevenção de infecções secundárias e na cicatrização (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001).

Tabela 2: Tratamento do loxoscelismo preconizado pelo Ministério da saúde (Ministério da Saúde, 2013)

Acidente	Soro	Gravidade	Nº de ampolas
Loxoscelismo	Antiloxoscélico (SALox) ou antiaracnídico (SAA)	Leve: aranha identificada, lesão incharacterística, ausência de comprometimento sistêmico	-
		Moderada: independentemente da identificação do agente, lesão sugestiva ou característica, manifestações sistêmicas inespecíficas (exantema, febre), ausência de hemólise	5*
		Grave: lesão característica, manifestações clínicas e/ou evidências laboratoriais de hemólise intravascular	10*

*Recomenda-se a associação com prednisona (adultos: 40mg/dia; crianças: 1mg/kg/dia) durante 5 dias.

No Brasil, os antivenenos disponíveis são aqueles que usam anticorpos isolados de soro de cavalos hiperimunizados com o veneno correlato. Esses soros comerciais antiaracnídico ou antiloxoscélico são produzidos respectivamente pelo Instituto Butantan e pelo CPPI (Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos do Estado do Paraná). O antiveneno produzido pelo Butantan é um soro anti-aracnídico, produzido a partir da mistura dos venenos das aranhas *Loxosceles gaucho* e *Phoneutria nigriventer* e dos escorpião *Tityus serrulatus*. Já o antiveneno do CPPI é antiloxoscélico, contendo anticorpos contra o veneno de *Loxosceles gaucho*, *Loxosceles intermedia* e *Loxosceles laeta* (HOGAN *et al.*, 2004).

A produção de antivenenos é realizada através da inoculação em cavalos dos venenos totais. Porém, como os venenos são uma mistura complexa de antígenos, nem todos esses são importantes para a produção de anticorpos neutralizantes. Além disso, nem sempre as proteínas mais tóxicas são as mais imunogênicas, o que levaria a produção de um antiveneno com uma capacidade menor de neutralizar os efeitos tóxicos do veneno. Ainda, cada ciclo de imunização leva a uma resposta diferente, nem sempre gerando um antiveneno com características uniformes e com a potência necessária para ser usado como imunobiológico (MARIA *et al.*, 2005).

Desta forma, a produção do antiveneno é um dos maiores problemas relacionados ao tratamento do loxoscelismo. A quantidade de veneno necessária para

a imunização em cavalos é grande e a quantidade fornecida por aranha a cada extração é muito pequena. Para a produção do soro, cada animal recebe de 5 a 10 aplicações com 5 mg de veneno. A forma mais utilizada de extração de veneno de aranhas marrom é o eletro choque e cada aranha libera cerca de 50 µg de veneno por extração. Sendo assim, para apenas um ciclo completo de imunização em um único cavalo são necessárias cerca de 1000 extrações de veneno. Com isso, esse processo é considerado trabalhoso e perigoso, exigindo a manutenção das aranhas e de profissionais treinados. Depois do período de imunização, um total de aproximadamente 16 litros de sangue é retirado de cada cavalo, obtêm-se o plasma, e as hemácias são devolvidas a seu sistema circulatório. Cerca de oito meses são gastos desde a extração do veneno até a produção do plasma. Além disso, o cavalo produtor do soro sofre os efeitos causados pelo envenenamento, apresentando uma saúde debilitada e uma expectativa de vida bastante reduzida.

A eficácia do tratamento com o antiveneno está relacionada com o tempo entre a picada e sua administração, a potência do antiveneno, a via em que ele é administrado, a dose e sua farmacocinética (GOMEZ & MILLER, 1999; GUILHERME et al, 2001; PAULI *et al.*, 2009; VÁZQUEZ, 2010). Outro ponto importante para a eficácia do tratamento é o desenvolvimento de reações anafiláticas devido à administração de proteínas heterólogas presentes nos soros de cavalo. De uma maneira geral, essas reações ocorrem em até 31,8% dos pacientes que recebem a soroterapia com os antivenenos produzido pelo Butantan, um percentual consideravelmente alto (PINHATI *et al.*, 1999; MÁLAQUE *et al.*, 2011).

1.5 METODOLOGIAS ALTERNATIVAS PARA A PRODUÇÃO DE ANTIVENENOS

Diante de todos esses problemas relacionados à produção e administração do soro, verificou-se a necessidade de aprimorar ou substituir as técnicas utilizadas na imunização. Diversos soros anti-loxoscélicos com capacidade neutralizante já foram produzidos usando diferentes isoformas de esfingomielinases D. Araujo e colaboradores (2003) produziram um soro a partir da imunização com uma proteína recombinante de SMase D que foi capaz de neutralizar as atividade dermonecrótica e letal em coelhos e camundongos (ARAUJO *et al.*, 2003). De Almeida e colaboradores (2008) também produziram um soro anti-loxoscélico neutralizante através da imunização de cavalos com uma mistura de três isoformas de SMase D

recombinantes. Esse soro teve uma capacidade neutralizante semelhante, ou melhor, quando comparado ao soro anti-aracnídico (DE ALMEIDA *et al.*, 2008).

Robert Bruce Merrifield ganhou o prêmio Nobel em 1984 pelo trabalho de síntese química de peptídeos em fase sólida que realizou em 1969. Em 1999, Reineke e colaboradores fizeram uma adaptação e criaram a técnica de *Spot-Síntese*, que sintetizava peptídeos que poderiam ser utilizados para mapear uma proteína e verificar quais de suas regiões seriam reativas a um anticorpo. Em 2002, Ronald Frank adaptou esta síntese para uma membrana de nitrocelulose, que servia de matriz aos peptídeos. Por este método, é possível testar quais peptídeos são reativos a um determinado anticorpo, e assim trabalhar com as regiões mais importantes de uma proteína para reconhecimento e até neutralização, no caso de toxinas.

O nosso grupo vem avaliando o uso de peptídeos selecionados através de mapeamentos utilizando o método de *SPOT* para imunização de animais e proteção contra os efeitos tóxicos gerados pelo veneno de aranhas *Loxosceles*. Felicori e colaboradores (2009) mapearam pela técnica de *SPOT* seis regiões antigênicas de uma isoforma de SMase D de *L. intermedia* (rLiD1), previamente produzida pelo nosso grupo na sua forma recombinante. Esta proteína apresentou efeitos biológicos similares aos causados pela proteína na sua forma nativa. Um peptídeo cópia de uma destas regiões mapeadas foi capaz de gerar anticorpos protetores da atividade dermonecrótica, hemorrágica e do edema provocado pela SMase D. A proteção conferida pelos peptídeos foi menor que a obtida pela imunização com a proteína, mas é possível que uma melhor neutralização seja alcançada com um aprimoramento deste peptídeo ou mesmo com a seleção de novos peptídeos imunogênicos para obtenção de uma mistura para imunização (FELICORI *et al.*, 2009).

Em outro estudo, rLiD1 foi utilizada como imunógeno para obter anticorpos anti-rLiD1 em camundongos BALB/c e que apresentaram atividade neutralizante dos efeitos letais do veneno de *L. intermedia*. O epitopo associado a estes anticorpos foi investigado através da técnica de *SPOT*. Uma região antigênica foi encontrada na porção N-terminal na toxina, correspondente a uma região da proteína conhecida por estar envolvida no sítio ativo (FELICORI *et al.*, 2006). Uma réplica sintética deste epitopo de 27 resíduos de aminoácidos foi posteriormente produzida e utilizada como imunógeno em camundongos e coelhos, com o intuito de acessar as propriedades neutralizantes dos anticorpos anti-peptídeos contra os efeitos tóxicos e letais de rLiD1 e do veneno. O processo de imunização induziu anticorpos que protegeram camundongos contra uma dose letal do veneno de *L. intermedia* e coelhos contra os efeitos dermonecróticos de rLiD1.

Previamente, nosso grupo produziu um anticorpo monoclonal, LimAb7, capaz de neutralizar a atividade dermonecrótica do veneno total de *L. intermedia* (ALVARENGA *et al.*, 2003). Ao se investigar as propriedades deste anticorpo monoclonal, foi observado que ele reconhece diversas isoformas na fração dermonecrótica do veneno, incluindo LiD1. A identificação do epítipo deste anticorpo neutralizante pode ajudar no desenho de imunógenos para produção de um soro terapêutico e também em abordagens vacinais. Através da técnica de *SPOT* não foi possível mapear o epítipo de LimAb7, porém ensaios de Phage Display levaram a identificação de quatro sequências de peptídeos que mimetizavam o epítipo de LimAb7 mas que, entretanto, não tinham nenhuma similaridade com a sequência de LiD1. Estes mimotopos e um modelo tridimensional de LiD1 foram usados para prever a suposta região do epítipo reconhecida pelo LimAb7. O mimotopo que foi capaz de interagir com LimAb7 (NCNKNDHLFACW) por *SPOT* e seu análogo (NSNKNDHLFASW) foram usados como imunógeno em coelhos. Os anticorpos resultantes foram capazes de neutralizar alguns dos efeitos biológicos induzidos pelo veneno total de *L. intermedia*, demonstrando proteção induzida por mimotopo contra o veneno de *L. intermedia*.

1.6 PROTEÍNAS QUIMÉRICAS NA PRODUÇÃO DE SORO ANTI LOXOSCÉLICO

Epítopos lineares e conformacionais mapeados a partir da proteína dermonecrótica recombinante (rLiD1) do veneno de *Loxosceles intermedia*, estudada pelo nosso grupo, se mostraram capazes de induzir a produção de anticorpos que neutralizassem de forma eficiente os efeitos tóxicos do veneno loxoscélico (FELICORI *et al.*, 2006 e 2009; DIAS-LOPES *et al.*, 2010; DE MOURA *et al.*, 2011). Esses resultados previamente obtidos sugeriram que esses imunógenos sintéticos e não tóxicos poderiam ser usados na produção de soro terapêutico ou em vacinação (DE MOURA *et al.*, 2011).

Apesar do sucesso inicial dessas estratégias descritas, os resultados poderiam ser melhorados, apresentando ao sistema imune de animais uma formulação contendo multiepítopos já previamente validados na forma de proteínas quiméricas, produzidas na forma sintética ou recombinante. Assim, Mendes e colaboradores em 2013 construíram por biologia molecular e expressaram uma proteína quimérica contendo três epítopos provenientes da sequência de LiD1. A proteína gerada se mostrou atóxica e reativa com soros direcionados contra cada um dos epítopos contidos na quimera por ELISA e *imunoblotting*. Esta quimera foi utilizada para imunizar coelhos e

foi capaz de gerar resposta humoral. Os anticorpos gerados foram capazes de reconhecer individualmente cada um dos epitopos que compõem a quimera. Pre-incubação de rLiD1 com anticorpos anti-quimera foi capaz de neutralizar as atividades dermonecróticas e hemorrágicas da proteína de maneira similar a neutralização exercida por anticorpos desenvolvidos contra a proteína total.

Dado o sucesso dessa estratégia, esta mesma proteína quimérica, contendo três epitopos de rLiD1, foi utilizada por Figueiredo e colaboradores em 2014 em estratégias de imunização de cavalos, utilizando-a sozinha ou em combinação com doses iniciais de veneno bruto. Tais estratégias foram comparadas com a metodologia tradicional de preparação de antiveneno, que utiliza uma mistura de venenos brutos de *L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta*. A metodologia que utilizou doses iniciais de veneno, seguida por imunizações com a quimera, gerou anticorpos com a mesma reatividade detectada por ELISA do antiveneno tradicional. Estudos *in vivo* demonstraram que este soro (produzido pela estratégia combinada de doses iniciais de veneno + quimera) foi capaz de neutralizar a atividade demonecrótica dos venenos loxoscélicos e alguns indivíduos imunizados geraram soros com potência que atende aos critérios de produção de imunobiológicos para uso terapêutico. Esses resultados foram bastante animadores, uma vez que se reduziu em 67% a quantidade de veneno bruto necessária para a produção de soros.

Tendo em vista os bons resultados do uso de proteínas quiméricas para a produção de soros capazes de neutralizar venenos loxoscélicos, este trabalho objetiva um aprimoramento desta abordagem. Foi proposto a inclusão de epitopos de outras toxinas na quimera, pertencentes a diferentes classes moleculares, visando melhor mimetizar os venenos inteiros loxoscélicos, aumentando o potencial neutralizante dos anticorpos gerados contra ela.

2 OBJETIVO

2.1 GERAL

Produzir e caracterizar uma proteína quimérica multiepitópica contendo peptídeos das proteínas Esfingomielinase-D, Metaloprotease e Hialuronidase, principais toxinas de aranhas do gênero *Loxosceles* e avaliar o potencial desta proteína quimérica para a produção de um soro neutralizante do veneno de aranhas do gênero *Loxosceles*.

2.2 ESPECÍFICOS

- Selecionar epitopos das principais classes de toxinas do veneno de *Loxosceles*, através da técnica de *SPOT* e de dados previamente publicados na literatura.
- Desenhar uma proteína recombinante que contenha os epitopos selecionados.
- Expressar e caracterizar imunoquimicamente a proteína recombinante produzida.
- Gerar anticorpos específicos contra a proteína recombinante, imunizando animais experimentais.
- Verificar o potencial neutralizante dos anticorpos desenvolvido em modelos *in vitro* e *in vivo*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MAPEAMENTO DE EPITOPOS PELO MÉTODO DE SPOT

3.1.1 Síntese de peptídeos na membrana de celulose pelo método de SPOT

Pentadeca-peptídeos sobrepostos por três resíduos cobrindo toda a sequência da hialuronidase de *L.intermedia* (HYAL_LOXIN, código R4J7Z9) e da metaloprotease do tipo astacina também de *L.intermedia* (VMPA_LOXIN, código A0FKN6) foram sintetizados utilizando o aparelho de síntese automática ResPep SL (IntavisAG, Bioanalytical Instruments, Alemanha) seguindo o protocolo descrito por Laune *et al.*, 2002. O robô é programado para a deposição de um volume de 0,6 µl de cada aminoácido, permitindo obter aproximadamente 50 nanomoles de peptídeo por ponto na membrana.

Inicialmente, a membrana de celulose foi transformada de modo a disponibilizar grupamentos amino para o acoplamento de aminoácidos, através da esterificação de uma Fluorenilmetiloxicarbonil (FMOC)-βAla-OH às funções hidroxila disponíveis na celulose. Além de tornar o suporte funcional, a adição de um grupamento entre o suporte e o peptídeo tem como objetivo afastar o peptídeo do suporte para garantir sua maior mobilidade e a manutenção da sua conformação.

A síntese dos peptídeos inicia-se sempre pelo C-terminal do último aminoácido das sequências estabelecidas para cada ponto. O grupamento protetor FMOC, que se encontra acoplado à função amina da βAla-OH, foi retirado pela adição de piperidina 20% em dimetilformamida (DMF). O grupo amino fica então disponível para reação com o primeiro aminoácido da sequência desejada a ser acoplado. Para a síntese dos peptídeos, foram utilizados aminoácidos contendo sua função amina protegida por um grupamento FMOC e com as diferentes cadeias laterais de cada aminoácido também bloqueadas devidamente por grupamentos químicos adequados. Ao serem acoplados, os aminoácidos tiveram sua função carboxila previamente ativada por DIPC/HOBT (diisopropilcarbodiimida / hidroxibenzotriazol). Estes ativadores propiciam um rendimento de ligação variando de 74-87% por ciclo. Os aminoácidos ativados foram então depositados em seus pontos específicos sobre a membrana. Para cada aminoácido, foram realizados dois ciclos de acoplamento.

Em um próximo ciclo, o grupo protetor FMOC do aminoácido recém-acoplado foi eliminado em meio básico pela piperidina a 20%. A membrana foi lavada com metanol e, após secagem desta, iniciado um novo ciclo de acoplamento com o

segundo aminoácido. Os ciclos se sucederam desta forma até completar a sequência do peptídeo desejado.

Ao final da síntese, os grupos laterais protetores dos aminoácidos foram retirados pelo tratamento da membrana com ácido trifluoroacético (TFA) associado a diclorometano e trietilsilano.

3.1.2 Imunoensaios

Para a avaliação da reatividade de anticorpos frente à membrana de *SPOT*, soros anti-hialuronidase e anti-metaloprotease de *L.intermedia*, gentilmente cedidos pelo Prof. Silvio Sanchez Veiga, da UFPR foram utilizados. A imunodeteção consiste de duas etapas: a detecção na membrana e sua regeneração. A metodologia empregada foi proposta por Laune, (2002) com algumas modificações.

As membranas de *SPOT* foram lavadas em solução fosfato salina (PBS) pH 7,4 e depois bloqueadas com PBS 3% BSA e 0,1% de Tween overnight. Posteriormente, a membrana foi novamente lavada e incubada com o soro de interesse por 120 minutos

A ligação de anticorpos foi detectada pelo uso de anticorpos anti-coelho secundários ligados a fosfatase (Diluição 1:2.000/SIGMA), incubados com a membrana após três lavagens de 10 minutos em PBS e tween 0,1%. As regiões reativas da membrana foram visualizadas após a adição do substrato BCIP-MTT em 0,4% de MgCl₂ em tampão citrato salina (CBS) pH 7.0, que forma precipitados azulados sobre os *spots* contendo peptídeos reconhecidos por anticorpos dos soros testados. A solução permaneceu em contato com a membrana por 30 minutos, sob agitação. As membranas foram escaneadas para posterior análise utilizando o *software* ImageJ.

3.1.3 Regeneração

Para reutilizações posteriores, a membrana foi submetida a um tratamento de regeneração, metanol para remover os complexos moleculares precipitadas sobre os peptídeos. O tratamento é feito por sucessivas lavagens de 10 minutos, três vezes com dimetilformamida (DMF), três vezes com reagente A (uréia 8M, 1% de SDS, 0.1% de 2-mercaptoetanol), três vezes com reagente B (etanol/água/ácido acético nas proporções 50:40:10 vol/vol/vol), e uma última lavagem com metanol ou etanol, para secagem da membrana.

3.2 PRODUÇÃO DA PROTEÍNA QUIMERA

3.2.1 Construção

A proteína quimera foi construída acrescentando-se os novos epitopos selecionados por SPOT para a LALP-1 e hialuronidase de *L.intermedia* (LiHYAL) à proteína rCpLi previamente produzida por (MENDES *et al.*, 2013), que contem três epitopos neutralizantes da rLiD1 (KALAPOTHAKIS *et al.*, 2002): dois epitopos contínuos NLGANSIETDVSFDDNANPEYTYHGIP (peptídeo 27) (DIAS-LOPES *et al.*, 2010) e SKKYENFNDFLKGRL (peptídeo 15) (FELICORI *et al.*, 2009) e um epitopo conformacional NCNKNDHLFACW (peptídeo 12) (DE MOURA *et al.*, 2011). Além disso, um epitopo proveniente da proteína Smase 1 de *Loxosceles laeta*, (DFSGPYLPSLPTLDA), foi mapeado em trabalho realizado por Ramada *et al.* 2013 como sendo um importante marcador de potência de soros anti-loxoscélicos. Além disso, a região deste peptídeo é altamente conservada para a espécie *L.laeta*, e corresponde a um loop variável cuja sequência difere daquelas das demais espécies.

O DNA foi sintetizado com a sequência de nucleotídeos dos epitopos usando dois códons de glicina como espaçadores entre cada sequência de epitopos. Nas extremidades 5' e 3' do DNA sintético foram adicionados sítios para enzimas de restrição NcoI e XhoI, respectivamente, para permitir subsequente clonagem. O DNA referente aos novos epitopos selecionados teve sua sequência otimizada foi sintetizado pela empresa GenScript e inserido pela mesma empresa no vetor de expressão pET 26b já contendo a sequência da rCpLi anteriormente produzida. O plasmídeo foi sequenciado para confirmação da inserção correta. A nova proteína recombinante produzida foi denominada rMEPLox.

3.2.2 Transformação

As sequências foram confirmadas por sequenciamento de Sanger, realizado no sequenciador ABI3130 Applied Biosystems, utilizando-se eletroforese capilar com polímero POP7 e o terminador fluorescente BigDye v3.1. Para a transformação foram utilizadas bactérias *Escherichia coli* BL21 (genótipo: lambda DE3 lysogen, F⁻, ompT, r_B⁻, m_B⁻). Para 50 µL de bactérias, foi adicionado 1 µL da reação de ligação do vetor pET-26b contendo a sequência codificante para a proteína quimera recombinante. As misturas resultantes foram gentilmente homogeneizadas e mantidas em gelo por 5 minutos. Em seguida, a mistura foi transferida para uma cubeta de eletroporação e

submetida a uma descarga elétrica em eletroporador. Após o eletrochoque, a mistura é transferida para um tubo contendo 700 µL de meio 2xYT e estes são mantidos a 37 °C por 1 hora em estufa de cultura ORION® 502 (FANEM). Alíquotas de 100 µL e 300 µL de cultura foram então plaqueadas em placas de Petri contendo 20 mL de meio seletivo Luria-Bertani sólido (LB; 15 g de extrato de levedura, 10 g de bacto-triptona, 10 g de NaCl e 15 g de ágar por litro de solução a pH 7,5) suplementado com o antibiótico de seleção canamicina a 50 mg mL⁻¹. As placas foram incubadas *overnight* a 37 °C.

3.2.3 PCR de colônia

Após o período de incubação, algumas colônias resistentes foram selecionadas e uma Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com o objetivo de confirmar a presença do inserto de interesse no plasmídeo bacteriano. Os clones selecionados foram isolados direto da placa (utilizando-se uma ponteira estéril) e inoculados em tubos contendo a mistura da PCR. A amplificação foi realizada utilizando os iniciadores *forward* (5'- ATG GGG AAT CTG GGC G- 3') e *reverse* (5'- CAC ATT GAC ATA CGG ACG).

Cada reação continha 200 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada iniciador, 1 U de Taq DNA polimerase (Phoneutria) em tampão de reação IB em um volume final de 10 µL. Foi também realizado um controle negativo (sem adição de DNA). As reações foram realizadas em termociclador PT-100 utilizando o programa:

- primeira desnaturação a 95 °C por 5 minutos e 30 ciclos de:
 - desnaturação a 95 °C por 1 minuto;
 - anelamento dos iniciadores a 55 °C por 1 minuto;
 - extensão a 72 °C por 1 minuto;
- extensão final a 72 °C por 10 minutos.

Após a PCR, os produtos foram avaliados através de eletroforese em gel de agarose 1 % em tampão TAE corado com brometo de etídio e o tamanho dos fragmentos gerados foi analisado por comparação com padrão de peso molecular.

3.2.4 Expressão

Duas colônias positivas foram selecionadas para um teste de expressão em pequena escala, realizado para verificar a adequada expressão da proteína recombinante rMEPLox. Após o teste, a colônia que apresentou a melhor eficiência foi

utilizada para a expressão da proteína em larga escala. Para isso, uma pré-cultura foi produzida com a inoculação do clone selecionado, retirado diretamente da placa de cultura, em 10 mL de meio 2xYT suplementado com 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de canamicina. A pré-cultura foi crescida por 16 horas a 37 °C sob agitação de 180 rpm e então inoculada em 1 L de meio 2xYT suplementado com canamicina. A cultura foi incubada a 37 °C sob agitação de 180 rpm com boa aeração e o crescimento das células foi controlado até uma DO600 de 0,4 nm. Neste momento, uma alíquota de 1 mL da cultura foi coletada para posterior verificação da expressão. A expressão foi então induzida com o acréscimo de IPTG em uma concentração final de 0,6 mM e prosseguida por 4 horas. Após este período, uma nova alíquota foi retirada. Essas alíquotas são utilizadas para análise da expressão em gel SDS-PAGE. Após o término do período de expressão, as células foram coletadas por centrifugação em centrífuga HERAEUS Multifuge X 3R (Thermo Scientific) a 4000 g, a 4 °C por 20 minutos e o sobrenadante foi descartado. O pellet obtido foi guardado em freezer -80 °C até a confirmação do resultado positivo da expressão.

As alíquotas para análise foram centrifugadas por 10 minutos a 10000 g e as células foram ressuspensas em tampão de amostra 2x (Tris HCl 100 mM pH 6,8, SDS 4 %, azul de bromofenol 0,2 %, glicerol 20 %) e então submetidas à eletroforese em SDS-PAGE 15 % em tampão Tris-glicina (25 mM TrisHCl pH 8,3, 250 mM glicina, 0,1 % SDS) a 200 V por 50 minutos. O gel foi corado por Coomassie Blue (0,25 % Coomassie blue R 250, 50 % metanol, 10 % ácido acético) em temperatura ambiente e lavado várias vezes com solução descorante (50 % metanol, 10 % ácido acético). As massas moleculares das proteínas de fusão foram confirmadas por comparação com padrões de peso molecular de proteínas (LMW – SDS Marker Kit - GE Healthcare).

3.2.5 Lise bacteriana

As células foram ressuspensas em 20 mL de tampão de coluna (50 mM Tris; 500 mM NaCl; 20 mM imidazol; 5 mM MgSO_4 ; pH 7,4) e receberam a adição de lizozima na concentração final de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Em seguida o extrato foi submetido a 3 ciclos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento a 37 °C em banho. Após isto, as bactérias foram sonicadas com 3 pulsos de 15 segundos cada, com potência de 30 % em sonificador (Fischer Scientific) para a liberação total das proteínas citoplasmáticas. A suspensão foi então centrifugada a 9000 g, 4 °C por 30 minutos. Uma análise em gel SDS-PAGE 15% foi feita para verificar se a proteína expressa se encontrava na porção solúvel ou na porção insolúvel do extrato.

3.2.6 Purificação

O pellet do extrato foi ressuspendido em tampão de ligação (8 M uréia; 50 mM Tris; 500 mM NaCl; 20 mM imidazol; 5 mM MgSO₄; pH 7,4) adicionado de solução de PMSF 10 mM. As purificações foram feitas em ÄKTAprime plus (GE Healthcare) e as frações purificadas foram analisadas por SDS-PAGE 15 %. A purificação da proteína recombinante rMEPLox foi feita por cromatografia de afinidade utilizando coluna HisTrap™ HP 1 mL (GE Healthcare). Após a passagem de todo o extrato na coluna, o mesmo tampão de coluna utilizado na etapa de lise é lentamente introduzido no sistema, retirando assim a uréia de toda a amostra antes da eluição. O tampão de eluição (20 mM fosfato de sódio; 500 mM NaCl; 500 mM imidazol; pH 7,4) foi aplicado na coluna para obtenção da proteína rMEPLox.

3.2.7 Diálise e liofilização

Para retirar o excesso de sais e de imidazol da proteína purificada, a solução resultante da purificação foi submetida à diálise com membrana de poro de 1000 daltons, contra 15 mM PBS. Em seguida, para uma maior concentração, a amostra foi liofilizada.

3.2.8 Quantificação

A proteína liofilizada foi reconstituída em solução salina 0,9%. A quantificação da proteína foi realizada baseada no método de Lowry, descrito por Oliver H. Lowry em 1951, utilizando uma curva padrão de BSA. As soluções do kit *DC Protein Assay-BIORAD* foram utilizadas e o ensaio foi feito em microplaca, em duplicatas. Alguns poços só receberam as soluções e nenhuma proteína, funcionando assim como branco para controle do ensaio. As absorbâncias das reações foram mensuradas em leitor de ELISA com filtro 655nm e os valores do branco foram descontados dos resultantes. Uma curva foi calculada a partir das concentrações do padrão de BSA.

3.3 CARACTERIZAÇÃO ANTIGÊNICA DA PROTEÍNA QUIMERA

A reatividade antigênica cruzada rMEPLox a diferentes anticorpos foi determinada pela técnica de ELISA e *Western Blot*. No ELISA, microplacas Corning de 96 poços (Becton Dickinson, França) foram sensibilizadas overnight a 4 °C com 100 µL de uma solução a 1µg/mL de rMEPLox em tampão bicarbonato de sódio 20 mM, pH 9,6. O ensaio foi realizado de acordo com o descrito por CHÁVEZ-OLÓRTEGUI *et al.* (1991). Os valores de absorvância foram determinados a 490 nm em espectrofotômetro Biorad 680. Todas as medidas foram feitas em replicatas e os resultados expressos como a média dos valores.

Para o *Western Blot*, amostras de rMEPLox foram solubilizadas em tampão de amostra com redução e aplicadas em um gel de eletroforese (SDS-PAGE) 15%, de acordo com LAEMMLI (1970). Após a eletroforese, os géis foram transferidos para membranas de nitrocelulose (TOWBIN *et al.*, 1979). Posteriormente, a membrana foi bloqueada durante 1 hora com PBS 0,3% (v/v) de Tween 20. Em seguida, as membranas foram incubadas durante 1 hora e meia com os anticorpos a serem analisados, diluídos em PBS contendo 0,05% (v/v) de Tween 20. A membrana de nitrocelulose foi então lavada e incubada por 1 hora com anticorpo marcado com peroxidase diluído 1:1000 em PBS –Tween 0,05%. Após três lavagens de 5 minutos com PBS-Tween 0,05% as membranas foram reveladas através da adição do substrato para peroxidase (Diaminobenzidina/Cloronaftol).

3.4 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS ANTI-rMEPLox

3.4.1 Animais

Foram utilizadas Coelhas fêmeas da raça New Zealand, na média de 2 kg de peso vivo. Os animais foram mantidos no Centro de Bioterismo, ICB-UFMG (Belo Horizonte, MG), e receberam água e alimentos sob condições ambientais controladas.

3.4.2 Imunização de coelhos

Para geração de anticorpos anti-rMEPLox em coelhos, foram montados três grupos, de dois animais cada, compostos por fêmeas da raça *New Zealand* com 8 semanas de idade e aproximadamente 2 kg. A proteína emulsificada em adjuvante Montanide foi injetada em um dos grupos. Após a coleta de soro pré-imune, cada animal recebeu uma dose subcutânea inicial de 50 µg de rMEPLox (1º dia). Coelhos do grupo controle negativo receberão apenas adjuvante e um grupo receberá uma mistura equivalente dos venenos de *L. gaucho*, *L. intermedia* e *L. laeta* (10 µg de cada), atuando como controle positivo. Três reforços similares ao inicial foram injetados nos coelhos nos 15º e 30º e 45º dias. Uma semana após a última injeção, os animais foram sangrados e as amostras de sangue colhidas para utilização do soro. A fim de estudar a estabilidade da resposta imune, novas amostras de sangue foram colhidas após três meses do último reforço. Após esta coleta, mais três doses foram dadas em nos 15º, 30º e 45º dias e novamente amostras de sangue foram colhidas.

3.4.3 Purificação de IgG

Os soros coletados dos coelhos após a última imunização com proteína quimérica foram precipitados em sulfato de amônio. Foi adicionado gota-a-gota, 1 mL de sulfato de amônio supersaturado em 1 mL de amostra de soro, sob agitação e temperatura de 4°C. As soluções permaneceram sob agitação à 4°C overnight. Após este período, as amostras são centrifugadas a 5000 RPM, a 4°C, por 30 minutos. O precipitado foi ressuspendido em PBS e as amostras dialisadas por 3 dias em PBS diluído dez vezes. Para um maior grau de pureza, as amostras foram purificadas com beads magnéticas de proteína A (IgG Magnetic Purification Kit – Lab on a bead), seguindo o manual do fabricante.

3.5 **CARACTERIZAÇÃO DOS ANTICORPOS ANTI-rMEPLox**

Os anticorpos produzidos contra a quimera foram caracterizados por ELISA e SPOT, conforme já descrito acima. Foi feito o teste de reconhecimento dos venenos inteiros e da própria quimera, para validar os anticorpos produzidos.

3.6 ATIVIDADES BIOLÓGICAS E ENSAIOS DE NEUTRALIZAÇÃO

3.6.1 IN VITRO

Para verificar se a proteína quimera produzida é capaz de exercer as atividades biológicas semelhantes às proteínas nativas das quais derivam as sequências utilizadas para compô-la, as atividades enzimáticas de Smase, metaloprotease e hialuronidase da rMEPLox foram testadas. Os mesmo ensaios foram realizados para analisar a capacidade dos anticorpos anti-rMEPLox de neutralizar tais atividades, presentes no veneno total, pré-incubando os anticorpos, em diferentes diluições, com a quantidade de veneno pré-estabelecida nos ensaios prévios.

3.6.1.1 Atividade fibrinogenolítica

Em 1998, Sanchez e colaboradores demonstraram a capacidade enzimática do veneno de *L. intermedia* em digerir fibrinogênio. Diante destes dados, foi feito um experimento para avaliar o potencial neutralizante que os anticorpos anti-quimera teriam para essa atividade fibrinogenolítica. Previamente, os anticorpos em diferentes concentrações, foram incubados com veneno de *L. intermedia* (3 µg) em PBS para um volume final de 50 µL por 1 hora a 37°C. Em seguida, foi adicionado a essa mistura, 50 µL de solução de fibrinogênio bovino a 2,5 mg/mL em tampão 25mM Tris-HCl (pH 7.4). Após 16 horas em estufa a 37°C, a reação foi parada. Uma alíquota de 50 µL de reação foi retirada e a ela foi adicionado o mesmo volume de uma solução desnaturante (10M urea, 4%β-mercaptoethanol, 4% SDS). A desnaturação durou mais 16 horas em temperatura ambiente e após este processo, uma alíquota de 15µL da solução final foi aplicada em gel SDS-PAGE 12% sob condições redutoras, para análise. A atividade biológica de rMEPLox sob o fibrinogênio também foi avaliada, com 3 µg de proteína na mesma solução de fibrinogênio.

3.6.1.2 Atividade gelatinásica

No mesmo trabalho em que avalia a atividade fibrinogenolítica, Sanchez (1998) mostrou que o veneno de *L. intermedia* possui atividade gelatinásica com zimograma. Nós utilizamos o kit EnzChek Gelatinase/Colagenase, para mensurar por fluorescência a capacidade do veneno de *L. intermedia* (μg) e da própria rMEPlox (μg) em degradar gelatina, e avaliamos a ação dos anticorpos anti-rMEPlox na atividade do veneno quando pré incubado por 1 hora a 37 °C. A metodologia utilizada foi a do manual do kit, que possui um controle de colagenase de *Clostridium histolyticum* para comparação.

3.6.1.3 Atividade hialuronidásica

Para quantificar a atividade da enzima hialuronidase, concentrações variantes de 40 μg a 0,3 μg do veneno de *L. intermedia* foram incubadas com 0,2 M tampão acetato, 15 M NaCl, pH 6 e ácido hialurônico (AH) 2,5 mg/mL em placa para microtitulação de 96 poços (Horta *et al.* 2014; com modificações). Uma curva com diferentes concentrações de AH foi usada como controle, correspondendo a valores de 100%, 75%, 50%, 25% e 0% de atividade de hialuronidase. A placa foi incubada por 37°C por 30 minutos. Posteriormente, 200 μL de brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) foram adicionados aos poços para precipitação do AH. A turbidez gerada foi mensurada a 405 nm. O valor de 50% de atividade hialuronidásica do veneno foi determinado. No mesmo ensaio, a atividade da proteína quimera foi também testada, com as mesmas concentrações de veneno.

3.6.2 IN VIVO

As atividades dermonecrótica, hemorrágica e de edema causadas pelo veneno total de *L. intermedia* foram determinadas de acordo com FURLANETTO *et al.* (1962). Após 90 dias da última dose de imunização, um coelho de cada grupo – vacinados e não imune, recebeu a injeção intradérmica de 10 μg de veneno (DMN – Dose Mínima Necrosante) no dorso. Os animais foram observados durante 72 horas. Após este período, foram feitos registros do local da injeção e amostras de sangue foram coletadas para análises clínicas.

3.7 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-rMEPLox EM CAMUNGONGOS

A proteína quimera (rMEPLox) produzida neste trabalho foi utilizada como imunógeno para produzir anticorpos em camundongos que serão utilizados na produção de anticorpos em hibridomas. O protocolo é o mesmo utilizado por Alvarenga e colaboradores em 2003, baseado na técnica de Tavares e colaboradores (1984). Inicialmente camundongos Balb-c receberam uma dose de 50 µg de rMEPLox emulsificada em adjuvante de Freund completo numa proporção de 1:1. Após 15 dias de intervalo, os camundongos receberam mais uma dose com 50 µg de quimera em 1:1 de adjuvante de Freund incompleto. Dez dias após a segunda dose, os animais receberam uma injeção intraperitoneal com 100 µg de rMEPLox emulsificada em adjuvante de Freund incompleto, na proporção de 1:1. O título do soro dos camundongos foi testado em ELISA, assim como o dos coelhos, em diluição seriada partindo de 1/100.

Imunoensaios (ELISA e *SPOT*) foram realizados com os soros obtidos dos camundongos imunizados com rMEPLox para caracterização e avaliação de reconhecimento dos epítopos, assim como foi feito com o soro produzido em coelhos.

4 RESULTADOS

4.1 MAPEAMENTO DE EPITOPOS

Visando mapear epítopos das proteínas metaloprotease do tipo astacina (VMPA_LOXIN, código A0FKN6) e hialuronidase (HYAL_LOXIN, código R4J7Z9) presentes no veneno de *L. intermedia*, as membranas contendo pentadecapeptídeos sobrepostos de três resíduos cobrindo toda a sequência primária destas proteínas foram testadas com os soros específicos gentilmente cedidos pelo Prof. Sílvio Sanches Veiga, da UFPR e com o antiveneno comercial produzido pelo CPPI. Devido a diferenças nos títulos dos soros, foram utilizadas diferentes diluições para melhor visualização dos *spots* reativos com cada soro. As imagens das membranas foram analisadas com o *software* ImageJ, que quantifica os *pixels* por área pré-determinada pelo usuário. Foram considerados como potenciais epítopos as regiões que obtiveram quantidade de *pixels* maior do que 60.000. Para a LALP-1, foram identificadas três regiões potencialmente antigênicas quando a membrana foi testada com o seu soro cognato. Destas três regiões, uma também foi altamente reconhecida pelo antiveneno do CPPI. O soro anti-hialuronidase não reagiu de maneira significativa com nenhum *spot* para a LALP-1, servindo como controle para as reações positivas detectados com o soro específico.

Para a hialuronidase, apenas uma região potencialmente antigênica foi identificada quando a membrana foi testada com o seu soro cognato. O antiveneno do CPPI não foi capaz de reconhecer nenhum *spot*, bem como o soro anti-LALP1, que serviu como controle para as reações positivas detectados com o soro específico. Para aumentar a representatividade desta enzima na construção da proteína químera proposta, foi voluntariamente selecionada uma região correspondente ao sítio ativo desta enzima. Esta região já foi previamente detectada em membrana de *SPOT*, e se mostrou importante para a neutralização da atividade hialuronidásica em trabalho prévio publicado sobre a hialuronidase presente no veneno do escorpião *Tityus serrulatus* (HORTA *et al.*, 2014).

A

Astacin-like metalloprotease toxin 1 (LALP-1 - UniProtKB - A0FKN6 (VMPA_LOXIN))

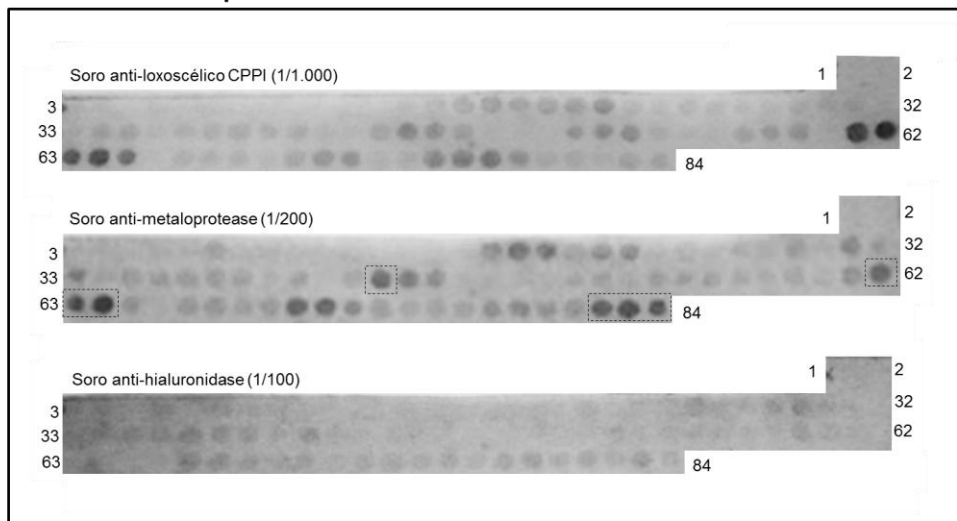
*MIKYIGVFAFLVGGFCHDFETVISNQDPIDVGMRLVEGDMFLFDDGPLFTERNAVKYDQQLWPNGEIVY
EISPLGRQYEQIIREAMRTYEDNTCIKFRRTNEADYVNIHVGDRCYSRVGKSFRRGGPQLSLGRGCT
DFGTILHELGHSGVDFDHEHSRADRDEFLLIHKENIKNGSEHNFDKLWENNTRTIGPFYDSIMLYGAYA
FSKDTRKFKTMEPVEPGLPMKSVIQGKLSYYDIVKVNKLYKCPPVNPYPGGIRPYVNV*

B

Spot #	Peptide	Spot #	Peptide	Spot #	Peptide	Spot #	Peptide
1	MIKYIGVFAFLVGGF	22	GEIVYEISPLGRQYE	43	QPLSLGRGCTDFGTI	64	IGPFYDSIMLYGAY
2	YIGVFAFLVGGFCHD	23	VYEISPLGRQYEQII	44	SLGRGCTDFGTILHE	65	FDYDSIMLYGAYAFS
3	VFAFLVGGFCHDFET	24	ISPLGRQYEQIIREA	45	RGCTDFGTILHELGH	66	DSIMLYGAYAFSKDT
4	FLVGGFCHDFETVIS	25	GLRQYEQIIREAMRT	46	TDFGTILHELGHSGV	67	MLYGAYAFSKDTRKF
5	GGFCHDFETVISNQD	26	QYEQIIREAMRTYED	47	GTILHELGHSGVDFH	68	GAYAFSKDTRKFKTM
6	CHDFETVISNQDPIDV	27	QIIREAMRTYEDNTC	48	LHELGHSGVDFDHEHS	69	AFSKDTRKFKTMEPV
7	FETVISNQDPIDVGM	28	REAMRTYEDNTCIKF	49	LGHSGVDFDHEHSRAD	70	KDTRKFKTMEPVEPG
8	VISNQDPIDVGMRLV	29	MRTYEDNTCIKFRRR	50	SVGDFDHEHSRADRDE	71	RKFKTMEPVEPGLPM
9	NQDPIDVGMRLVEGD	30	YEDNTCIKFRRTNE	51	FDHEHSRADRDEFLLI	72	KTMEPVEPGLPMKSV
10	PIVGMRLVEGDMFLF	31	NTCIKFRRTNEADY	52	EHSRADRDEFLLIHK	73	EPVEPGLPMKSVIQK
11	DGMRLVEGDMFLFDDG	32	IKFRRTNEADYVNI	53	RADRDEFLLIHKENI	74	EPGLPMKSVIQKGLK
12	RLVEGDMFLFDDGPLF	33	RRRTNEADYVNIHV	54	RDEFLLIHKENIKNG	75	LPMKSVIQKGLSYY
13	EGDMFLFDDGPLFTE	34	TNEADYVNIHVGDRC	55	FLIHKENIKNGSEH	76	KSVIQKGLSYYDIV
14	MLFDDGPLFTERNAV	35	ADYVNIHVGDRCYSR	56	IHKENIKNGSEHNFD	77	IQKGLSYYDIVKVN
15	DDGPLFTERNAVKYD	36	VNIHVGDRCYSRVGK	57	ENIKNGSEHNFDKLW	78	GKLSYYDIVKVNKLY
16	PLFTERNAVKYDQQL	37	HVGDRCSRVGKSF	58	KNGSEHNFDKLWENN	79	YYDIVKVNKLYKCP
17	TERNAVKYDQQLWPN	38	DRCSRVGKSFRRGGP	59	SEHNFDKLWENNTRT	80	DIVKVNKLYKCPPV
18	NAVKYDQQLWPNGEI	39	YSRVGKSFRRGGPQL	60	NFDKLWENNTRTIGP	81	KVNKLYKCPPVNPYP
19	KYDQQLWPNGEIVYE	40	VGKSFRRGGPQLSLG	61	KLWENNTRTIGPFYD	82	KLYKCPPVNPYPGGI
20	QQLWPNGEIVYEISP	41	SFRGGPQLSLGRGCT	62	ENNTRTIGPFYDYSI	83	KCPPVNPYPGGIRPY
21	WPNGEIVYEISPLGR	42	GGPQLSLGRGCTDF	63	TRTIGPFYDYSIMLY	84	PVNPYPGGIRPYVNV

C

Membrana Metaloprotease



D

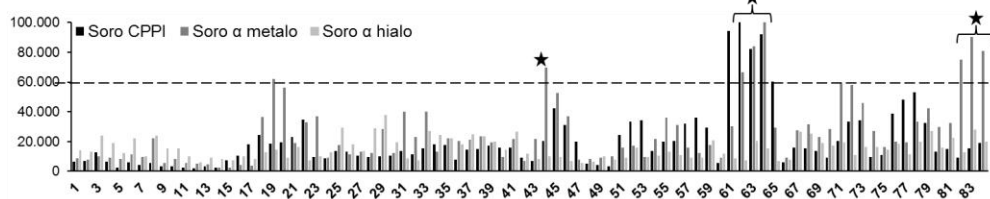


Figura 8: Mapeamento de epítopos da LALP-1. (A) Sequência primária da proteína LALP-1. A região predita como peptídeo sinal está em itálico. As regiões mapeadas pelo soro anti-LALP-1 estão destacadas em cinza. (B) Sequências dos pentadecapeptídeos correspondentes a cada SPOT sintetizado na membrana. As sequências mapeadas pelo soro anti-LALP-1 estão destacadas em cinza. (C) Membrana contendo peptídeos derivados da sequência primária de LALP-1 testada com os diferentes soros. Foi utilizado o anticorpo anti-IgG de coelho conjugado a fosfatase alcalina (1:2000) e o substrato MTT-BCIP para a revelação dos spots reativos. (D) Gráfico contendo a quantificação da coloração dos spots, medida pelo software ImageJ. Spots com reatividade acima de 60.000 pixels/área foram considerados como principais epítopos e estão assinalados com uma estrela.

A

LiHYAL (UniProtKB - R4J7Z9 (HYAL_LOXIN))

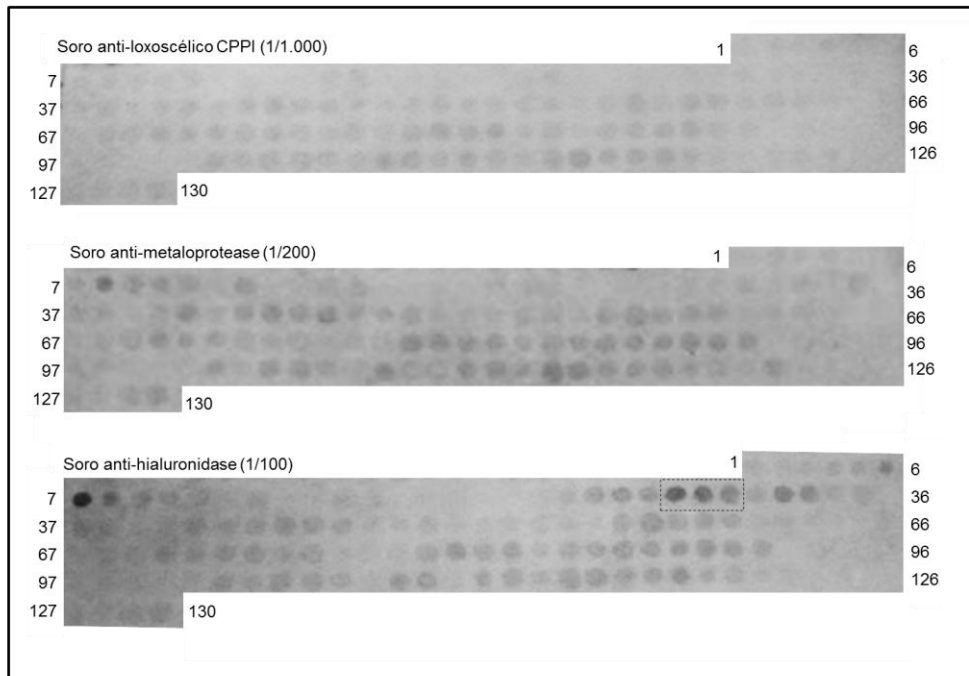
MQTILVLTFLSAWFLAVGFDVFWNVPSQQCKKYGMKFVPLLEQYSILVNKEDNFKGDKITIFYESQLG
 LYPHIGANDESNGGIPQLGDLKAHLEKSAVDIRRDILDKSAATGLRRIIDWEAWRPIWEFNWSSLRKYQD
 KMKKVVRRQFNPTAHESTVAKLAHNEWENSSKSWMLSTLQLGKQLRPNVWCYLLFPDCYNYDGNS
 VQEFQCSEAIRKGNDRLLKWLWEESTAVCPSTIYKEGQLTNYTLQKRIWFNGLRQALRVAQPKARIYP
 YINYSIKPGMMVPEVEFWRLIAQIASLGMGDGAVIWGSSASVSGSKNHCAQLMKYIADVLGPATLRIKENV
 ARCSKQACSGRGRCTWPKDTSVIAWKFLVEKEDYDFYLGDIIECKVEGYEGRYCEQKTK

B

Spot #	Peptide	Spot #	Peptide	Spot #	Peptide	Spot #	Peptide
1	MQTILVLTFLSAWF	34	VDIRRDILDKSATGL	67	YDGNVQEFQCSEAI	100	SLGMDGAVIWGSSAS
2	ILVLTFLSAWFLAV	35	RRDILDKSATGLRII	68	NSVQEFQCSEAIRKG	101	MDGAVIWGSSASVGS
3	LTTFLSAWFLAVGFD	36	ILDKSATGLRIIDWE	69	QEFQCSEAIRKGNDR	102	AVIWGSSASVSGSKNH
4	FLSAWFLAVGFDVFW	37	KSATGLRIIDWEAWR	70	QCSEAIRKGNDRLLKWL	103	WGSSASVSGSKNHCAQ
5	AWFLAVGFDVFWNV	38	TGLRIIDWEAWRPIW	71	EAIRKGNDRLLKWLWE	104	SASVSGSKNHCAQLMK
6	LAVGFDVFWNVPSQQ	39	RIIDWEAWRPIWEFN	72	RKGNDRLLKWLWEEST	105	VGSKNHCAQLMKYIA
7	GFDVFWNVPSQQCKK	40	DWEAWRPIWEFNWSS	73	NDRLKWLWEESTAVC	106	KNHCAQLMKYIADVL
8	VFWNVPSQQCKKYGM	41	AWRPIWEFNWSSLRK	74	LKWLWEESTAVCPSTI	107	CAQLMKYIADVLGPA
9	NVPSQQCKKYGMKFV	42	PIWEFNWSSLRKYQD	75	LWEESTAVCPSTIYIK	108	LMKYIADVLGPATLR
10	SQQCKKYGMKFVPLL	43	EFNWSSLRKYQDKMK	76	ESTAVCPSTIYIKEGQ	109	YIADVLGPATLRIKE
11	CKKYGMKFVPLLEQY	44	WSSLRKYQDKMKV	77	AVCPSTIYIKEGQLTN	110	DVLGPATLRIKENVA
12	YGMKFVPLLEQYSIL	45	LRKYQDKMKVVRQF	78	PSIYIKEGQLTNYTL	111	GPATLRIKENVARCS
13	KFVPLLEQYSILVNK	46	YQDKMKVVRQFNPT	79	YIKEGQLTNYTLQKR	112	TLRIKENVARCSKQA
14	PLLEQYSILVNKEDN	47	KMKKVVRRQFNPTAHE	80	EGQLTNYTLQKRIWF	113	IKENVARCSKQACSG
15	EQYSILVNKEDNFKG	48	KVVRQFNPTAHESTV	81	LTNYTLQKRIWFNGLR	114	NVARCSKQACSGRGR
16	SILVNKEDNFKGDKI	49	RQFNPTAHESTVAKL	82	YTLQKRIWFNGLRQL	115	RCSKQACSGRGRCTW
17	VNKNEDNFKGDKITIF	50	NPTAHESTVAKLAHN	83	QKRIWFNGLRQAL	116	KQACSGRGRCTWPKD
18	EDNFKGDKITIFYES	51	AHESTVAKLAHNEWE	84	IWFNGLRQALRVA	117	CSGRGRCTWPKDTSV
19	FKGDKITIFYESQLG	52	STVAKLAHNEWENSS	85	TNGLRQALRVAQPK	118	RGRTWPKDTSVIAW
20	DKITIFYESQLGLYP	53	AKLAHNEWENSSKSW	86	RLQALRVAQPKARI	119	CTWPKDTSVIAWKFL
21	TIFYESQLGLYPHIG	54	AHNEWENSSKSWMLS	87	EALRVAQPKARIYPY	120	PKDTSVIAWKFLVEK
22	YESQLGLYPHIGAND	55	EWENSSKSWMLSTLQ	88	RVAQPKARIYPYINY	121	TSVIAWKFLVEKEDY
23	QLGLYPHIGANDESF	56	NSSKSWMLSTLQLGK	89	QPKARIYPYINYSIK	122	IAWKFLVEKEDYDFY
24	LYPHIGANDESNFGG	57	KSWMLSTLQLGKQLR	90	ARIYPYINYSIKPGM	123	KFLVEKEDYDFYLG
25	HIGANDESNGGIPLQ	58	MLSTLQLGKQLRPNV	91	YPYINYSIKPGMMV	124	VEKEDYDFYLGDIIE
26	ANDESNGGIPLQGD	59	TLQLGKQLRPNVWC	92	INYSIKPGMMVPEVE	125	EDYDFYLGDIIECKV
27	ESNNGIPLQGLDKA	60	LGKQLRPNVWCYLL	93	SIKPGMMVPEVEFWR	126	DFYLGDIIECKVEGY
28	NGGIPQLGDLKAHLE	61	QLRPNVWCYLLFPD	94	PGMMVPEVEFWRLIA	127	LGDIIECKVEGYEGR
29	IPQLGDLKAHLEKSA	62	PNSVWCYLLFPDCYN	95	MVPEVEFWRLIAQIA	128	IECKVEGYEGRYCE
30	LGDLKAHLEKSAVDI	63	VWCYLLFPDCYNYDG	96	EVEFWRLIAQIASLG	129	KVEGYEGRYCEQKT
31	LKAHLEKSAVDIRRD	64	YLLFPDCYNYDGNSV	97	FWRLIAQIASLGMGD	130	CVEGYEGRYCEQKTK
32	HLEKSAVDIRRDILD	65	FPDCYNYDGNSVQEF	98	LIAQIASLGMGDGAVI		
33	KSAVDIRRDILDKSA	66	CYNYDGNSVQEFQCS	99	QIASLGMGDGAVIWS		

C

Membrana Hialuronidase



D

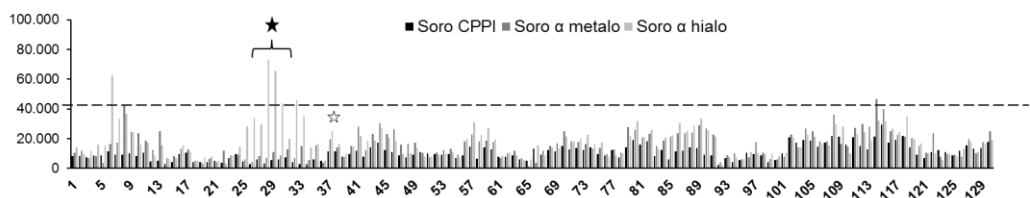


Figura 9: Mapeamento de epitopos da LiHYAL. (A) Sequência primária da proteína LiHYAL. A região predita como peptídeo sinal está em itálico. As regiões mapeadas pelo soro anti-LiHYAL estão destacadas em cinza. (B) Sequências dos pentadecapeptídeos correspondentes a cada *SPOT* sintetizado na membrana. As sequências mapeadas pelo soro anti-LiHYAL estão destacadas em cinza. (C) Membrana contendo peptídeos derivados da sequência primária de LiHYAL testada com os diferentes soros. Foi utilizado o anticorpo anti-IgG de coelho conjugado a fosfatase alcalina (1:2000) e o substrato MTT-BCIP para a revelação dos *spots* reativos. (D) Gráfico contendo a quantificação da coloração dos *spots*, medida pelo *software* ImageJ. *Spots* com reatividade acima de 60.000 pixels/área foram considerados como principais epitopos e estão assinalados com uma estrela preta. A região do sítio ativo, selecionada para aumentar a representatividade da proteína na quimera a ser construída está assinalada com uma estrela branca.

De posse das sequências potencialmente epitópicas para a LALP-1 e LiHYAL, estas foram adicionadas à sequência já estabelecida da rCpLi (MENDES *et al.*, 2013). Além delas, foi adicionada uma sequência epitópica previamente mapeada por (RAMADA *et al.*, 2013) na Smase 1 de *L. laeta*. Para localizar estruturalmente as regiões selecionadas para compor a proteína quimera recombinante rMEPLox, os modelos tridimensionais das proteínas LiHYAL, LiD1 e LALP-1 foram obtidas por modelagem de homologia utilizando o programa ITASSER (ZHANG, 2008). A estrutura da Smase 1 de *L. laeta* já foi resolvida e seu arquivo pdb utilizado (1XX1).

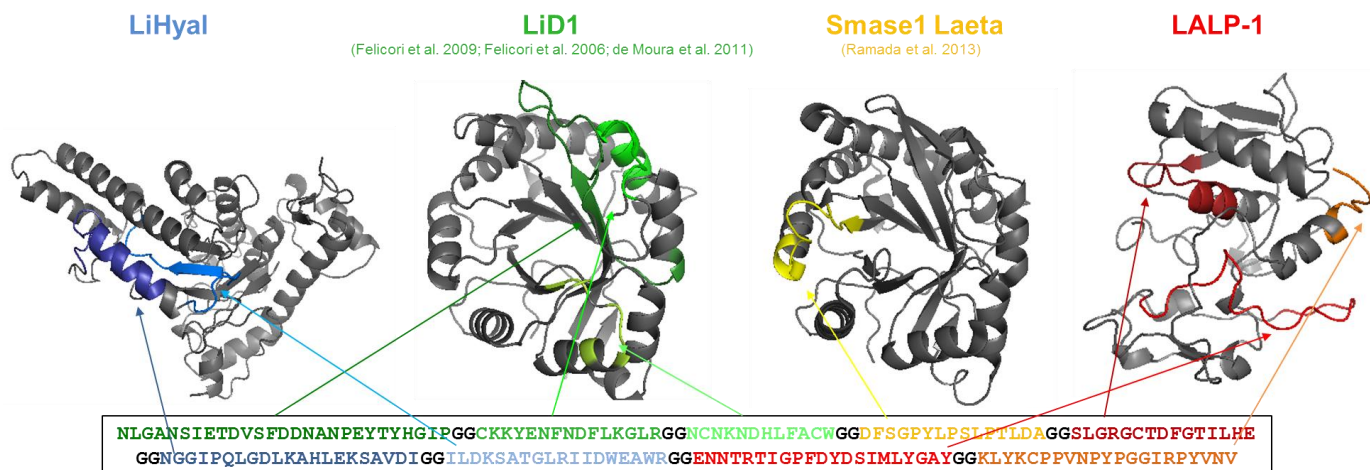


Figura 10: Localização dos epitopos selecionados em seus respectivos modelos tridimensionais. As estruturas 3D da LiHYAL, LiD1 e LALP-1 foram obtidas por homologia utilizando o programa ITASSER. A estrutura resolvida da Smase 1 de *L. laeta* (PDB: 1xx1) foi utilizada. Os modelos foram visualizados e as sequências escolhidas ressaltadas utilizando o PyMOL. A sequência da rMEPLox está descrita abaixo. Os epitopos selecionados estão coloridos de acordo com a molécula a qual pertencem e foram conectados a localização espacial por setas. Os espaçadores de duas glicinas foram mostrados em preto na sequência.

4.2 PRODUÇÃO DA PROTEÍNA QUIMERA (rMEPLox)

Os epitopos selecionados para compor a rMEPLox foram agregados a sequência da rCpLi, utilizando dois códons de glicina para fazer a conexão. Foi realizada a otimização de parâmetros pela GeneScript, utilizando o algoritmo OptimumGene que leva em consideração o códon-usage para *E.coli*, conteúdo GC, estrutura secundária do mRNA, dentre outros, chegando-se a sequência de nucleotídeos descrita abaixo na figura 11.

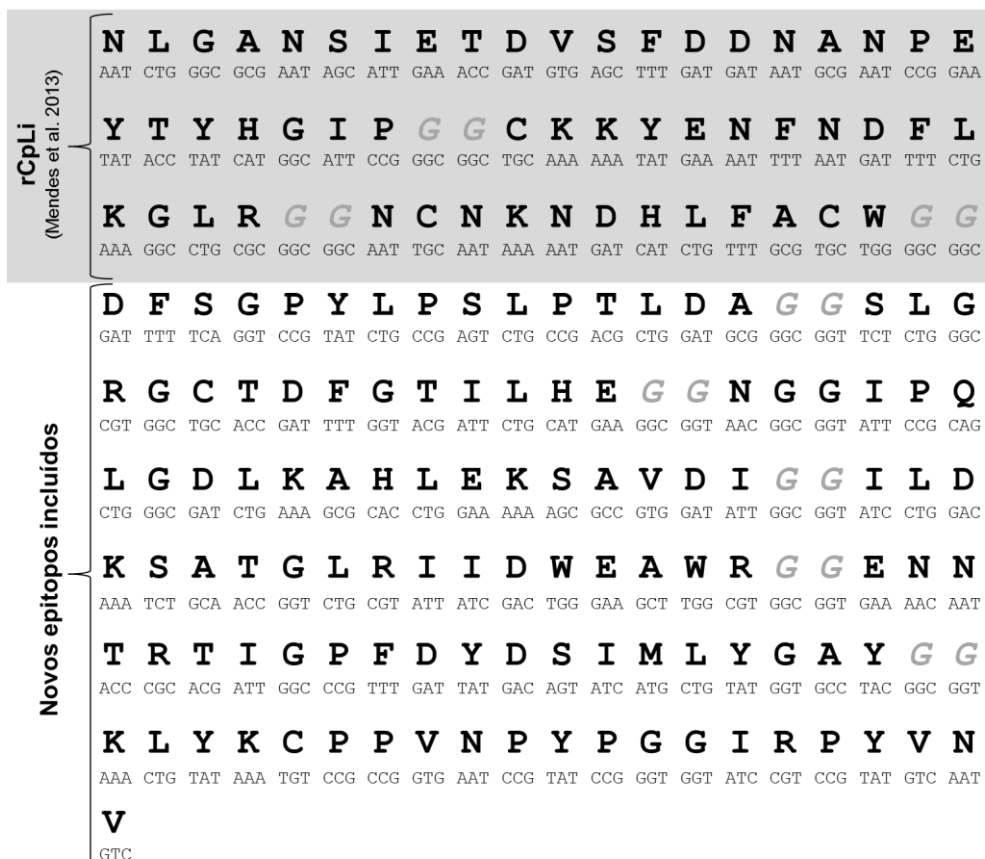


Figura 11: Sequência de aminoácidos e nucleotídeos da rMEPLox. A sequência original da rCpLi está ressaltada em cinza. As duas glicinas utilizadas como espaçadores entre os epitopos estão em cinza e itálico. Os códons utilizados foram otimizados pelo algoritmo OptimumGene, utilizado pela GeneScript.

A nova sequência contendo os novos epitopos mapeados para a LiHYAL, LALP-1 e Smase 1 de *L. laeta* foram clonadas no vetor pET 26b(+) já contendo a sequência da rCpLi previamente construída, contendo cauda de histidina e sequência sinalizadora para expressão no periplasma (pelB leader). O mapa do vetor de expressão produzido pelo programa Gene Design pode ser visualizado abaixo na figura 12. A construção totalizou 5751 pb.

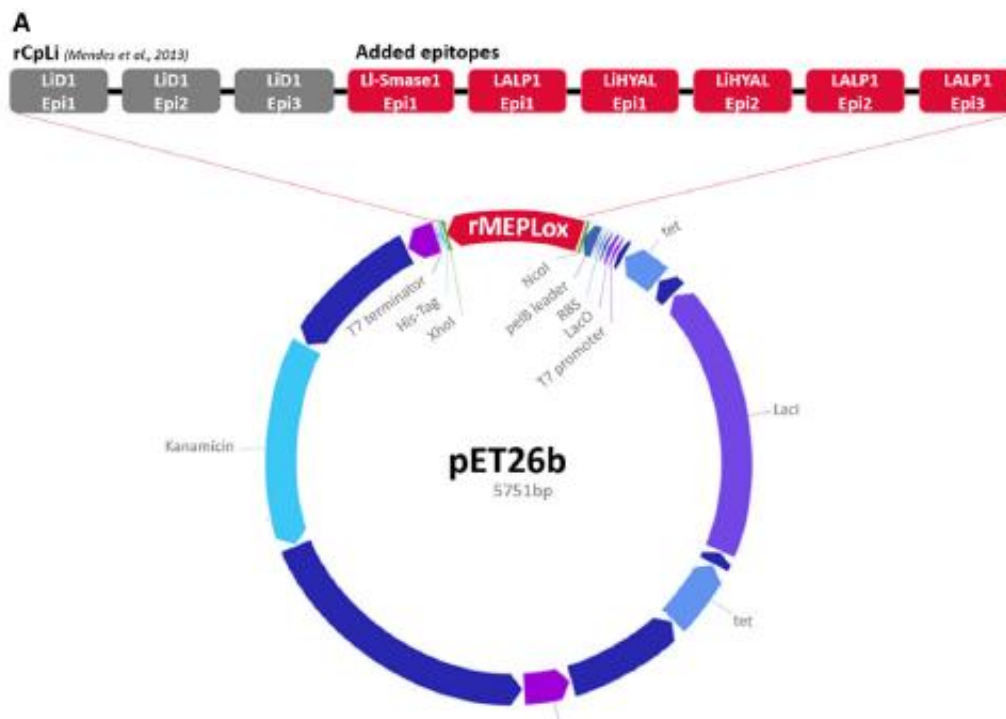


Figura 12: Vetor de expressão pET26b (+) contendo a sequência da rMEPlox. A sequência original da rCpLi está ressaltada em rosa claro e a nova sequência acrescentada em rosa escuro.

Após a transformação das bactérias BL21, uma PCR de colônia foi realizada para verificar quais colônias apresentavam o plasmídeo com o fragmento de interesse. Das colônias testadas, foram selecionados quatro clones positivos que apresentavam bandas na altura esperada em gel de agarose (Fig 13).

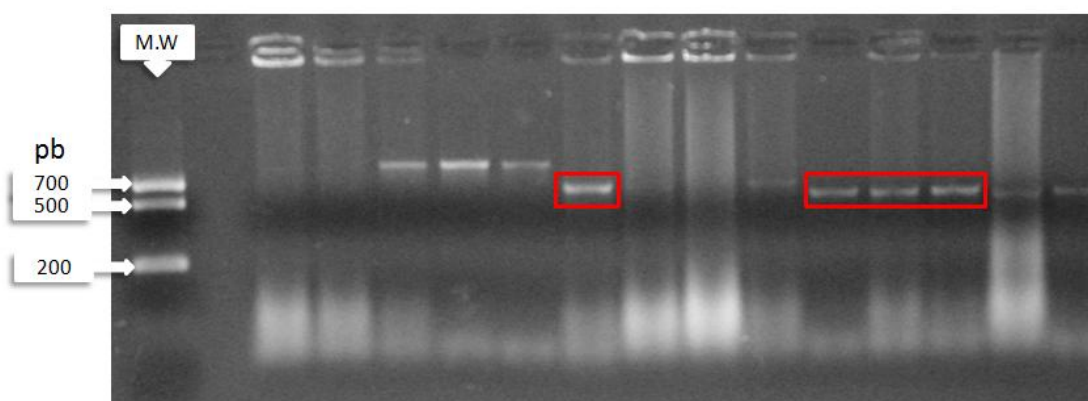


Figura 13: PCR de colônias das bactérias transformadas. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. M.W: marcador de massa molecular. Nos quadrantes vermelhos, fragmentos de interesse com aproximadamente 543 pb.

A proteína construída rMEPLox possui massa predita de 19.39 kDa e possui ponto isoelétrico predito de 5.10, segundo avaliação utilizando a ferramenta Prot-Param do portal ExPASy. Um dos clones positivos foi utilizado para produção de pré-inóculo e inóculo. Em seguida, a cultura foi induzida a expressão utilizando IPTG. Após 4 horas de indução, foi possível visualizar em SDS-PAGE o aumento de duas bandas protéicas, entre 24 e 17 kDa, compatíveis com a massa esperada para a rMEPLox (Fig. 14).

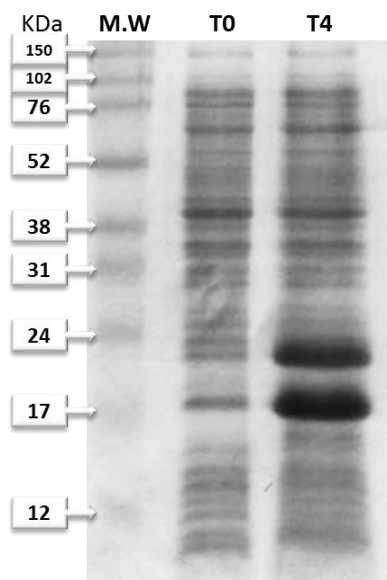


Figura 14: SDS-PAGE 15% de extrato protéico bacteriano antes e após indução. Na primeira linha do gel (M.W) está o marcador de massa molecular. Na segunda (T0) se encontra o lisado bacteriano antes da indução com IPTG e na terceira linha (T4) o lisado após 4 horas de indução.

Após a lise bacteriana, a maior concentração da proteína de interesse se encontrava na porção sólida do extrato (Fig. 15), indicando comportamento insolúvel da rMEPLox. Por este motivo, esta porção foi solubilizada em tampão de ligação com acréscimo de uréia como já descrito.

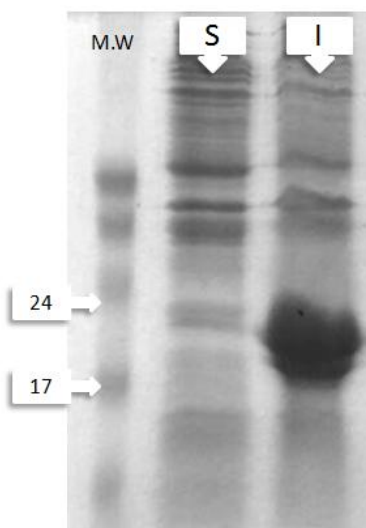


Figura 15: SDS-PAGE 15% do lisado protéico bacteriano. Na primeira linha do gel (M.W) está o marcador de massa molecular. Na segunda (S) uma amostra do extrato solúvel e na terceira linha (I), uma amostra do extrato sólido do lisado, porção insolúvel.

O extrato bacteriano obtido foi então purificado utilizando coluna HisTrap™ HP (GE Healthcare), segundo metodologia acima, obtendo-se o seguinte cromatograma (Fig. 16A). Através do SDS-PAGE das frações obtidas da purificação, pode-se perceber a eliminação da maioria das proteínas não relacionadas, obtendo-se apenas as bandas provenientes da indução da expressão (Fig. 16B).

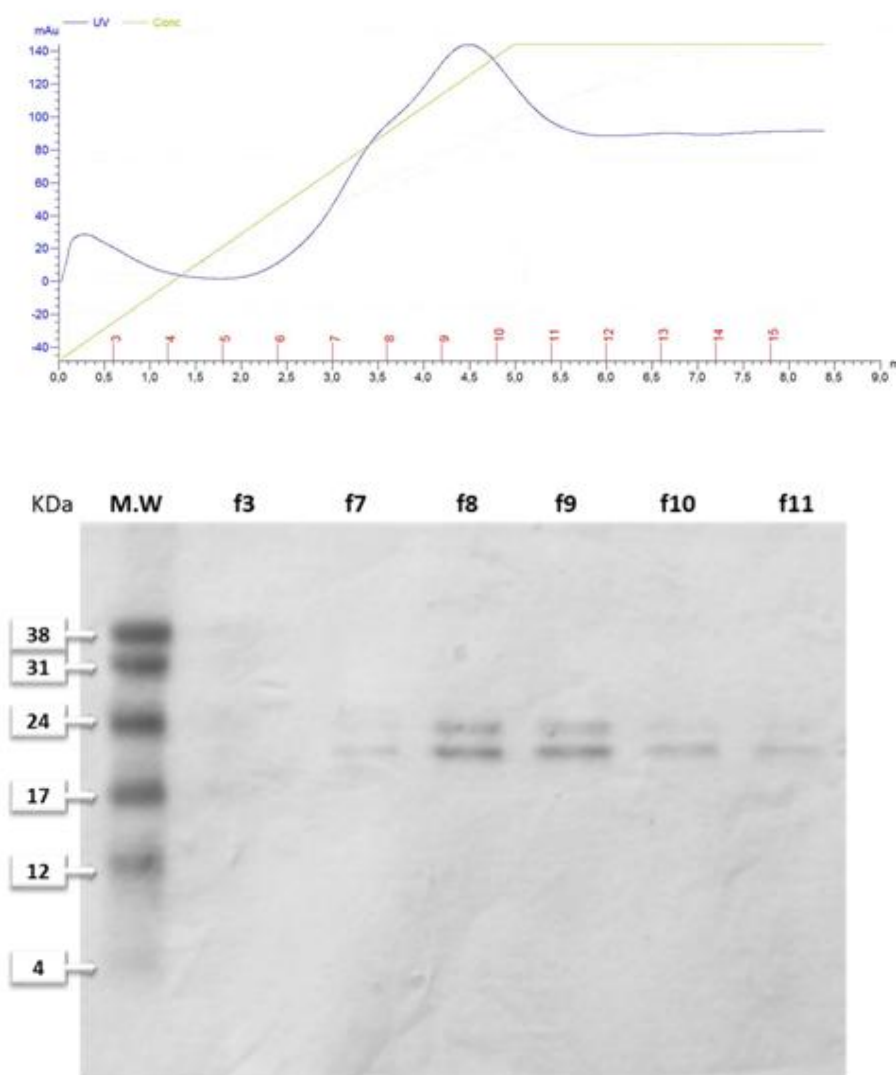


Figura 16: Purificação em coluna HisTrap™ HP de extrato proteico bacteriano e caracterização da rMEPlox obtida. (A) Cromatograma da purificação em coluna HisTrap™ HP de extrato proteico bacteriano. Em azul, a absorvância a 280nm e em verde o gradiente de tampão com imidazol. (B) SDS-PAGE 15% das frações obtidas da purificação. Na primeira canaleta, encontram-se os marcadores de massa molecular e nas demais canaletas as frações correspondentes.

4.3 CARACTERIZAÇÃO DA rMEPlox

4.3.1 Caracterização imunogênica

Para verificar a antigenicidade da rMEPLox produzida, foi realizado um ensaio de ELISA na qual a proteína foi adsorvida a uma placa de 96 poços e sua reatividade foi testada com diferentes soros de coelho específicos para o veneno total de *L. intermedia* (α LiV), para a LiHYAL (α Hyalo), para a proteína dermonecrótica rLiD1 (α rLiD1), para a LALP-1 (α LALP) e para a rCpLi previamente produzida (α rCpLi). Todos os soros foram testados na diluição de 1/100, incubados com anti-IgG de coelho ligado a peroxidase e revelados com OPD.

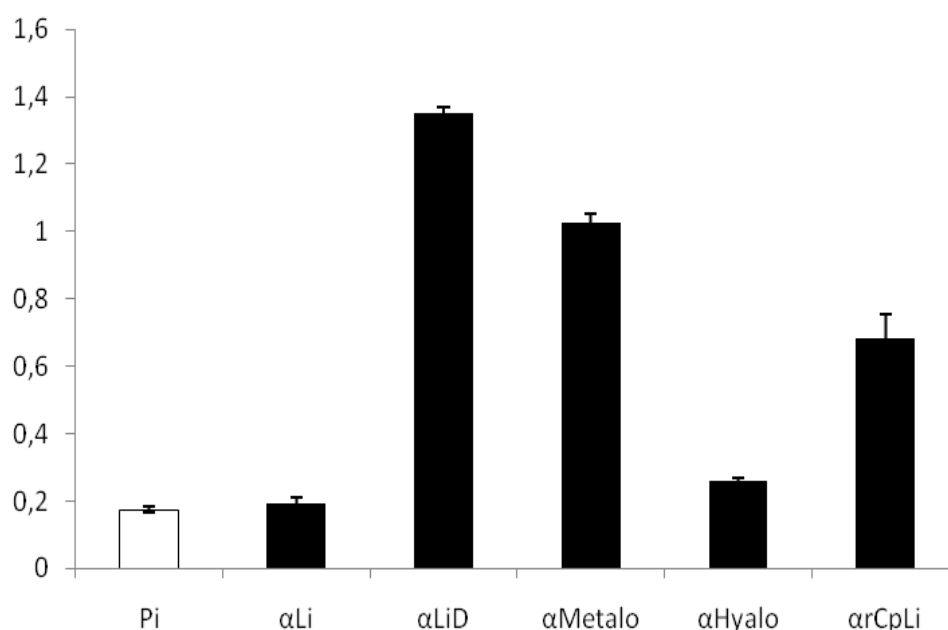
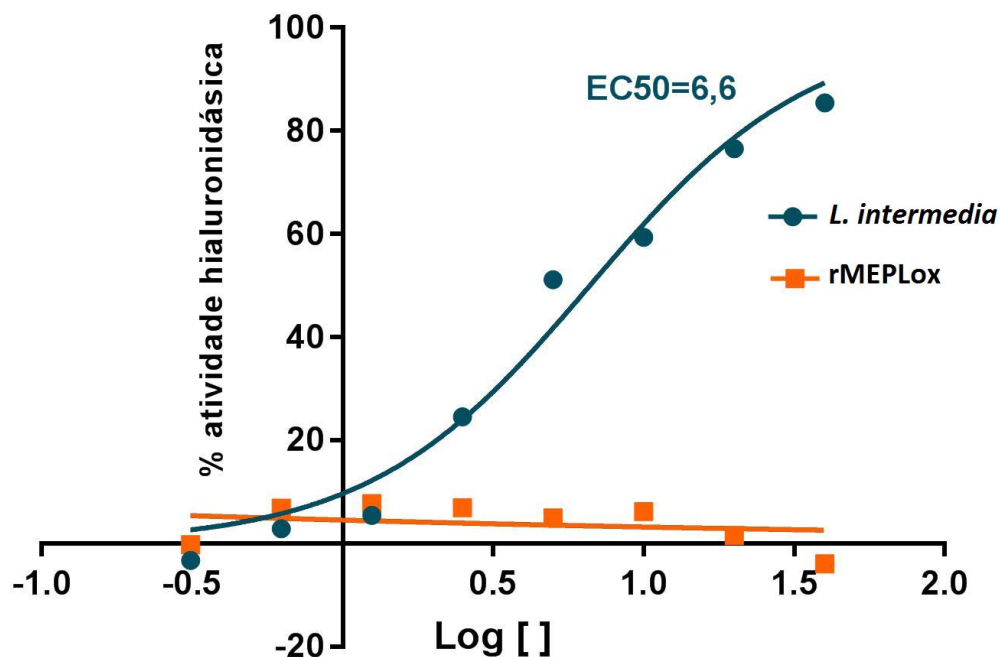


Figura 17: ELISA da rMEPLox frente a diferentes soros de coelho. A placa foi sensibilizada com uma solução de 10 μ g/ml de rMEPLox e testada com os soros (PI=pre-imune, α LiV =anti veneno total de *L. intermedia*, α Hyalo = anti hialuronidase de *L. intermedia*, α rLiD1 = anti proteína dermonecrótica rLiD1, α LALP = anti- metaloprotease de *L. intermedia* e α rCpLi = anti proteína quimérica produzida anteriormente) na diluição 1/100 (eixo x), revelados com anticorpo anti-IgG de coelho 1/5000 e OPD SigmaFast. O ensaio foi realizado em triplicata. No eixo y, estão os valores da absorbância a 490 nm.

4.3.2 Atividade hialuronidásica



A atividade da hialuronidase foi calculada pela quantidade de veneno necessária para degradar 50% do ácido hialurônico presente na solução (EC_{50}). A figura mostra que são necessários aproximadamente 6,6 μg de veneno de *L. intermedia* para degradar 50% do ácido hialurônico disponível. A proteína químera rMEPLox não apresentou atividade hialuronidásica nas concentrações equivalentes ao veneno.

Figura 18: Ensaio de atividade hialuronidásica. Atividade representada em porcentagem de ácido hialurônico hidrolisado. Em azul, a curva de atividade do veneno de *L. intermedia* e em laranja a atividade da proteína rMEPLox. O ensaio foi realizado em duplicatas.

4.4 CARACTERIZAÇÃO DOS ANTICORPOS ANTI-rMEPLox

4.4.1 Soro anti-rMEPLox frente a venenos

Para verificar a eficiência da imunização com a proteína quimera rMEPLox, os coelhos imunizados foram sangrados após a 4ª dose de imunização e o soro obtido desta sangria foi testado por ELISA frente aos venenos de *L. gaucho*, *L. intermedia* e *L. laeta*. Os soros controle foram produzidos a partir da imunização com apenas adjuvante (C-) e a partir da imunização com mistura dos três venenos citados (α *Loxosceles* – C+). Os soros foram testados na diluição de 1/200 e o anticorpo anti-IgG de coelho – peroxidase na diluição 1/5000. Foram utilizados dois coelhos por grupo e os resultados mostrados na Figura 19A são uma média da reatividade dos dois soros. Decorridos 90 dias da 4ª dose, uma nova sangria foi feita e o mesmo imunoenensaio foi realizado (Fig. 19B).

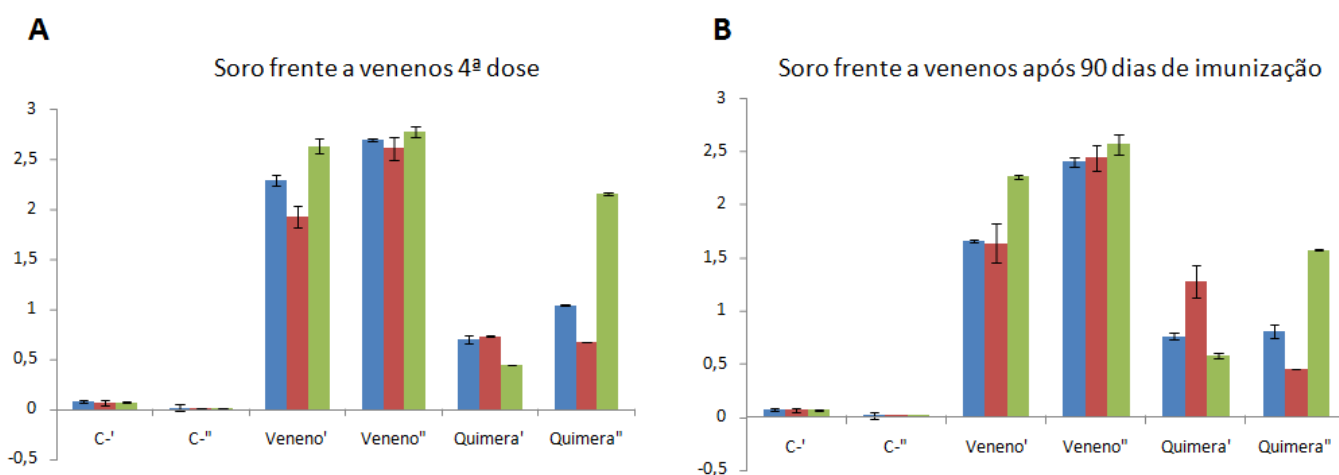


Figura 19: Imunoensaios iniciais do soro produzido anti-rMEPLox frente a diferentes venenos loxoscélicos. ELISA. À esquerda, dados obtidos com quatro doses de antígeno. À direita, dados da reatividade após três meses de imunização com quatro doses. A placa foi sensibilizada com uma solução de 10µg/ml de cada veneno e os soros testados na diluição 1/200, revelados com anticorpo anti-IgG de coelho 1/5000 e OPD SigmaFast. No eixo x, C-' e C-'' são coelhos que receberam apenas PBS e adjuvante, Veneno' e Veneno'' são os coelhos imunizados com pool de venenos e Quimera' e Quimera'' os coelhos que receberam injeções de rMEPLox. O ensaio foi realizado em duplicata. Em azul, sensibilização com veneno de *L. intermedia*, em vermelho *L. gaucho* e em verde *L. laeta*. No eixo y, os valores de absorbância obtidos em comprimento de onda de 490 nm.

Após a pausa de três meses, novos resultados de ELISA foram obtidos (Fig. 20). O ensaio foi realizado como os anteriores, porém com soros na diluição de 1/400. O reconhecimento do veneno de *Loxosceles similis* também foi testado, contra um pool de soro anti-rMEPLox, em diluição seriada, partindo de 1/400.

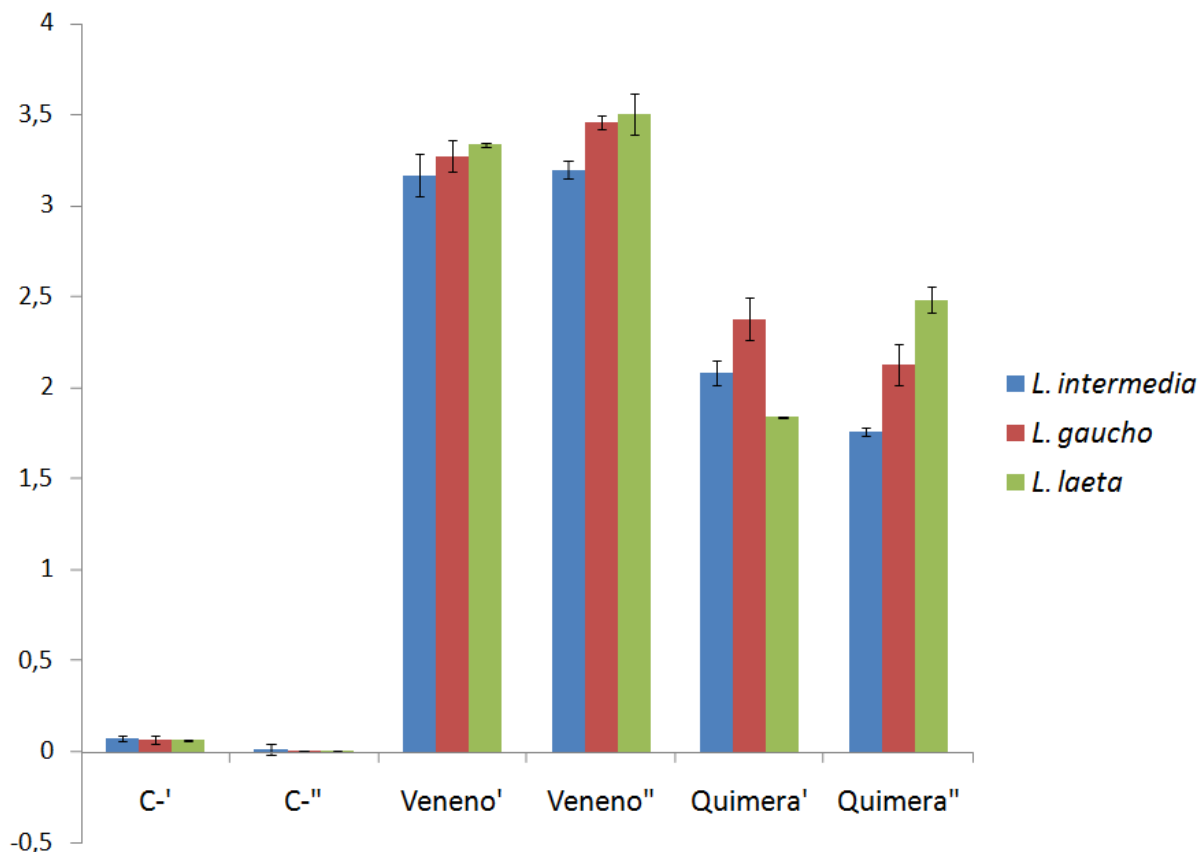


Figura 20: ELISA do soro produzido anti-rMEPLox frente a diferentes venenos loxoscélicos. A placa foi sensibilizada com uma solução de 10µg/ml de cada veneno e os soros testados na diluição 1/400, revelados com anticorpo anti-IgG de coelho 1/5000 e OPD SigmaFast. No eixo x, C-' e C-'' são coelhos que receberam apenas PBS e adjuvante, Veneno' e Veneno'' são os coelhos imunizados com pool de venenos e Quimera' e Quimera'' os coelhos que receberam injeções de rMEPLox. O ensaio foi realizado em triplicata. Em azul, sensibilização com veneno de *L. intermedia*, em vermelho *L. gaucho* e em verde *L. laeta*. No eixo y, os valores de absorbância obtidos em comprimento de onda de 490 nm.

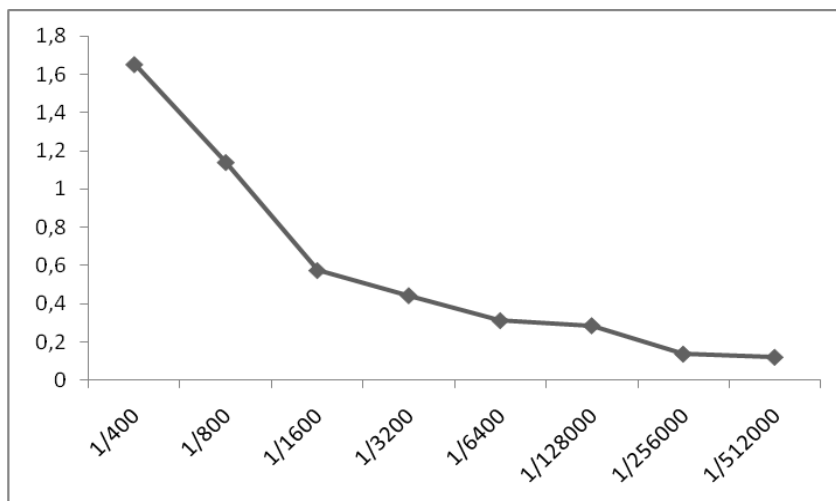


Figura 21: ELISA do soro produzido anti-rMEPLox frente a veneno de *Loxosceles similis*. A placa foi sensibilizada com uma solução de 10 µg/ml de veneno. Um pool com soro dos dois coelhos anti-rMEPLox foi testado em diluição seriada, partindo de 1/400 (eixo x). A revelação foi feita com anticorpo anti-IgG de coelho 1/5000 e OPD SigmaFast. O ensaio foi realizado em triplicata. No eixo y, os valores de absorvância obtidos em comprimento de onda de 490 nm.

4.4.2 Reconhecimento de rMEPLox pelo soro anti-rMEPLox

Um ensaio de *Western Blot* em que a membrana de nitrocelulose continha a proteína rMEPLox demonstrou que as bandas resultantes da purificação apresentam a reatividade esperada frente ao soro anti-quimera produzido neste trabalho.

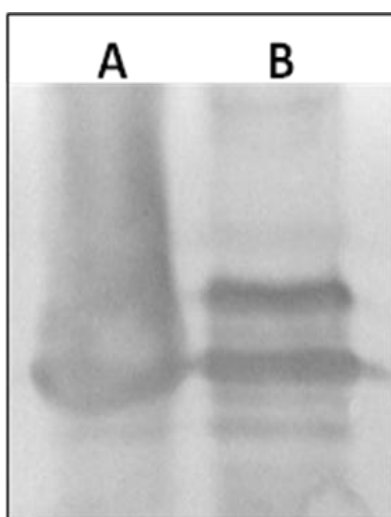


Figura 22: Reconhecimento de rMEPLox por *Western Blot*. *Western Blot* do soro produzido anti-rMEPLox, na diluição de 1/1000, frente a rMEPLox (7,5 µg). Em (A) a proteína não foi submetida a condições redutoras e em (B) recebeu tampão de amostra com redução e foi submetida a banho a 100 °C por 5 minutos.

4.4.3 Reconhecimento das proteínas do veneno de *L. intermedia* por anticorpos anti- rMEPLox em western blot

O veneno de *L. intermedia* (10 µg) foi submetido a um gel SDS-PAGE em condições não redutoras. As proteínas do gel foram transferidas para membranda de nitrocelulose e a reatividade dos soros foi analisada em *Western Blot*. Como podemos ver na Figura 23, o soro anti-rMEPLox foi capaz de reconhecer algumas bandas do veneno de *L. intermedia*. Já o soro não imune não reagiu com nenhuma banda quando repetido o experimento (não mostrado).

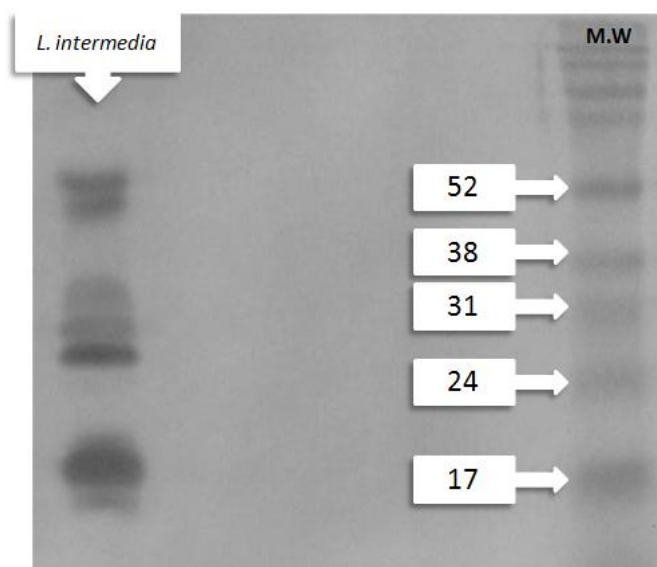
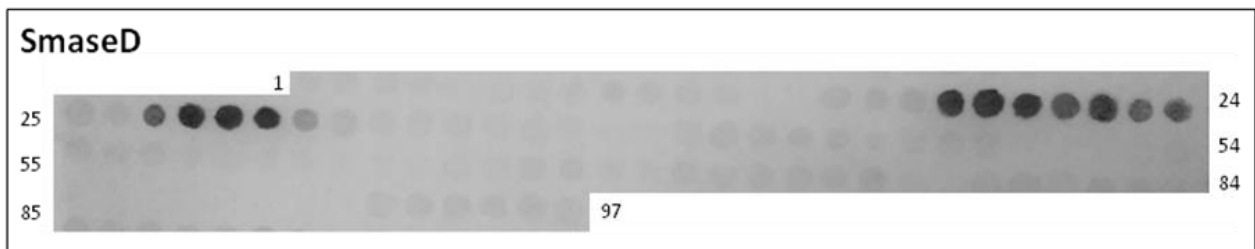


Figura 23: Reconhecimento do veneno de *L. intermedia*. *Western Blot* do soro produzido anti-rMEPLox, na diluição de 1/1000, frente a veneno (10 µg). À direita, as bandas de proteína do veneno que foram reconhecidas. À esquerda, um marcador de massa molecular.

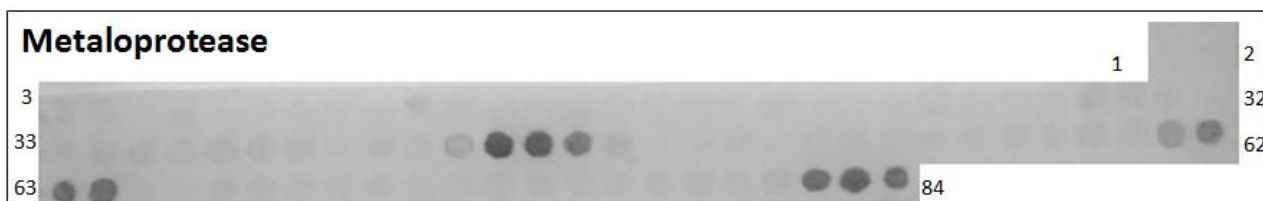
4.4.4 Identificação dos epitopos em membranas contendo peptídeos

O soro anti-quimera produzido pelos coelhos, na diluição de 1/1000, foi capaz de reconhecer os epitopos das principais toxinas de *L. intermedia*. Duas regiões mostraram-se reativas na membrana de SmaseD (Fig. 24), três regiões antigênicas foram identificadas na membrana de metaloprotease (Fig. 25) e uma região foi identificada na membrana de hialuronidase (Fig. 26). Como controle deste experimento, o mesmo ensaio foi realizado com soro de coelhos que receberam apenas adjuvante de PBS nos ciclos de imunização e o soro não imune não foi capaz de reconhecer nenhuma região das proteínas testadas (Fig. 27).



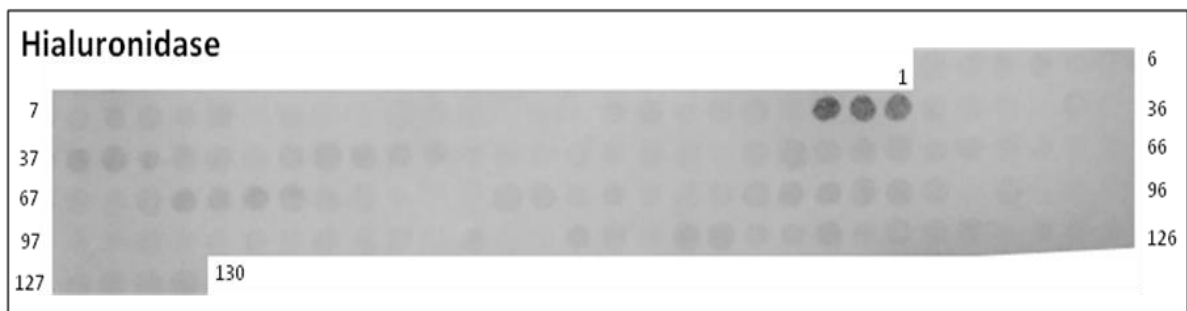
Spot #	Peptide	Spot #	Peptide	Spot #	Peptide	Spot #	Peptide
1	MLPYIVLVLCWSVL	26	IPDCGRNCKKYENF	51	GGRAYIVLSIPDLNH	76	RGLSRVNAAVANRDS
2	YIVLVLCWSVLSQA	27	DCGRNCKKYENFNDF	52	AYIVLSIPDLNHYPL	77	SRVNAAVANRDSANG
3	LVLGCWSVLSQAAQT	28	RNCKKYENFNDFLKG	53	VLSIPDLNHYPLIKG	78	NAAVANRDSANGFIN
4	GCWSVLSQAAQTDEE	29	KKYENFNDFLKLRS	54	IPDLNHYPLIKGFKD	79	VANRDSANGFINVKVY
5	SVLSQAAQTDEERA	30	ENFNDFLKLRSATT	55	LNHYPLIKGFKDQLT	80	RDSANGFINKVVYWT
6	SQAAQTDEERAGNR	31	NDFLKLRSATT PGN	56	YPLIKGFKDQLT KDG	81	ANGFINKVVYWTVDK
7	AQTDEERAGNR RPI	32	LKGLRSATT PGN SKY	57	IKGFKDQLT KDGHPE	82	FINKVVYWTVDKRST
8	DDEERAGNR RPIWIM	33	LRSATTPGNSKYQEK	58	FKDQLT KDGHPELME	83	KVVYWTVDKRSTTRD
9	ERAGNR RPIWIMGHM	34	ATTPGNSKYQEKLVL	59	QTKDGHPELMEKVG	84	YWTVDKRSTTRDALD
10	GNRR RPIWIMGHMVNA	35	PGNSKYQEKLVLVVF	60	KDGHPELMEKVGHDF	85	VDKRSTTRDALDAGV
11	RPIWIMGHMVNAIGQ	36	SKYQEKLVLVVFDLK	61	HPELMEKVGHDFSGN	86	RSTTRDALDAGVDGI
12	WIMGHMVNAIGQIDE	37	QEKLVLVVFDLKTGS	62	LMEKVGHDFSGNDDI	87	TRDALDAGVDGIMTN
13	GHMVNAIGQIDEFVN	38	LVLVFDLKTGSLYD	63	KVGHDFSGNDDIGDV	88	ALDAGVDGIMTNPDP
14	VNAIGQIDEFVN LGA	39	VVFDLKTGSLYD NQA	64	HDFSGNDDIGDVGKA	89	AGVDGIMTNPDPVIT
15	IGQIDEFVN LGANSI	40	DLKTGSLYD NQANDA	65	SGNDDIGDVGKAYKK	90	DGIMTNPDPVITDVL
16	IDEFVN LGANSIETD	41	TGSLYD NQANDAGKK	66	DDIGDVGKAYKKAGI	91	MTNPDPVITDVLNEA
17	FVN LGANSIETDV SF	42	LYD NQANDAGKKLAK	67	GDVGKAYKKAGITGH	92	YDPVITDVLNEAAYK
18	LGANSIETDV SFDDN	43	NQANDAGKKLAKNLL	68	GKAYKKAGITGHIWQ	93	VITDVLNEAAYKKKF
19	NSIETDV SFDDNANP	44	NDAGKKLAKNLLQHY	69	YKAGITGHIWQSDG	94	DVLNEAAYKKKFRVA
20	ETDV SFDDNANPEYT	45	GKKLAKNLLQHYWNN	70	AGITGHIWQSDGITN	95	NEAAYKKKFRVATYD
21	VSFDDNANPEYTYHG	46	LAKNLLQHYWNNGN	71	TGHIWQSDGITNCLP	96	AYKKKFRVATYDDNP
22	DDNANPEYTYHGIPC	47	NLLQHYWNNGNNGGR	72	IWQSDGITNCLPRGL	97	KKFRVATYDDNPWVT
23	ANPEYTYHGIPDCG	48	QHYWNNGNNGGRAYI	73	SDGITNCLPRGLSRV	98	RVATYDDNPWVTFKK
24	EYTYHGIPDCGRNC	49	WNNGNNGGRAYIVLS	74	ITNCLPRGLSRVNAA		
25	YHGIPDCGRNCKKY	50	GNNNGRAYIVLSIPD	75	CLPRGLSRVNAAVAN		

Figura 24: Reconhecimento de epitopos de LiD pelo soro anti-rMEPLox. Membrana contendo peptídeos derivados da sequência primária de LiD, testada com soro anti-rMEPLox. Foi utilizado o anticorpo anti-IgG de coelho conjugado a fosfatase alcalina (1:3000) e o substrato MTT-BCIP para a revelação dos spots reativos. Abaixo, as sequências dos pentadecapeptídeos correspondentes aos spots mais reativos, destacados em cinza.



Spot #	Peptide	Spot #	Peptide	Spot #	Peptide	Spot #	Peptide
1	MIKYIGVFAFLVGGF	22	GEIVYEISPLRQYE	43	QPLSLGRGCTDFGTI	64	IGPFDYDSIMLYGAY
2	YIGVFAFLVGGFCHD	23	VYEISPLRQYEQII	44	SLGRGCTDFGTILHE	65	FDYDSIMLYGAYAFS
3	VFAFLVGGFCHDFET	24	ISPLRQYEQIIREA	45	RGCTDFGTILHELGH	66	DSIMLYGAYAFSKDT
4	FLVGGFCHDFETVIS	25	GLRQYEQIIREAMRT	46	TDFGTILHELGHSVG	67	MLYGAYAFSKDTRKF
5	GGFCHDFETVISNQD	26	QYEQIIREAMRTYED	47	GTILHELGHSVGFDH	68	GAYAFSKDTRKFKTM
6	CHDFETVISNQDPIV	27	QIIREAMRTYEDNTC	48	LHELGHSVGFDHEHS	69	AFSKDTRKFKTMEPV
7	FETVISNQDPIVDGM	28	REAMRTYEDNTCIKF	49	LGHSVGFDEHSRAD	70	KDTRKFKTMEPVEPG
8	VISNQDPIVDGMRLV	29	MRTYEDNTCIKFRRR	50	SVGFDHEHSRADRDE	71	RKFKTMEPVEPGLPM
9	NQDPIVDGMRLVEGD	30	YEDNTCIKFRRTNE	51	FDHEHSRADRDEFLI	72	KTMEPVEPGLPMKSV
10	PIVDGMRLVEGDMLF	31	NTCIKFRRTNEADY	52	EHSRADRDEFLLIHK	73	EPVEPGLPMKSVIQK
11	DGMRLVEGDMLFDDG	32	IKFRRTNEADYVNI	53	RADRDEFLLIHKENI	74	EPGLPMKSVIQKGKL
12	RLVEGDMLFDDGPLF	33	RRRTNEADYVNIHVG	54	RDEFLLIHKENIKNG	75	LPMKSVIQKGKLSYY
13	EGDMLFDDGPLFTER	34	TNEADYVNIHVGDRC	55	FLIIHKENIKNGSEH	76	KSVIQKGKLSYYDIV
14	MLFDDGPLFTERNAV	35	ADYVNIHVGDRCYSR	56	IHKENIKNGSEHNFD	77	IQKGKLSYYDIVKVN
15	DDGPLFTERNAVKYD	36	VNIHVGDRCYSRVGK	57	ENIKNGSEHNFDKLW	78	GKLSYYDIVKVNKLY
16	PLFTERNAVKYDQQL	37	HVGDRCYSRVGKSFR	58	KNGSEHNFDKLWENN	79	SYDIVKVNKLYKCP
17	TERNAVKYDQQLWPN	38	DRCYSRVGKSFRGGP	59	SEHNFDKLWENNTRT	80	DIVKVNKLYKCPPVN
18	NAVKYDQQLWPNGEI	39	YSRVGKSFRGGPQPL	60	NFDKLWENNTRTIGP	81	KVNKLYKCPPVNPYP
19	KYDQQLWPNGEIVYE	40	VGKSFRGGPQPLSLG	61	KLWENNTRTIGPFDY	82	KLYKCPPVNPYPGGI
20	QQLWPNGEIVYEISF	41	SFRGGPQPLSLGRGC	62	ENNTRTIGPFDYDSI	83	KCPPVNPYPGGIRPY
21	WPNGEIVYEISPLR	42	GGPQPLSLGRGCTDF	63	TRTIGPFDYDSIMLY	84	PVNPYPGGIRPYVNV

Figura 25: Reconhecimento de epitopos de LALP-1 pelo soro anti-rMEPlox. Membrana contendo peptídeos derivados da sequência primária de LALP-1, testada com soro anti-rMEPlox. Foi utilizado o anticorpo anti-IgG de coelho conjugado a fosfatase alcalina (1:3000) e o substrato MTT-BCIP para a revelação dos spots reativos. Abaixo, as sequências dos pentadeca-peptídeos correspondentes aos spots mais reativos, destacados em cinza.



Spot#	Peptide	Spot#	Peptide	Spot#	Peptide	Spot#	Peptide
1	MQTILVLTTFLSAWF	34	VDIRRDILDKSATGL	67	YDGNVQEFQCSEAI	100	SLGMDGAVIWGSSAS
2	ILVLTTFLSAWFLAV	35	RRDILDKSATGLRII	68	NSVQEFQCSEAIRKG	101	MDGAVIWGSSASVGS
3	LTTFLSAWFLAVGFD	36	ILDKSATGLRIIDWE	69	QEFQCSEAIRKGNDR	102	AVIWGSSASVGSFNH
4	FLSAWFLAVGFDVFW	37	KSATGLRIIDWEAWR	70	QCSEAIRKGNDRLKW	103	WGSSASVGSKNHCAQ
5	AWFLAVGFDVFWNVP	38	TGLRIIDWEAWRPIW	71	EAIRKGNDRLKWLWE	104	SASVGSFNHCAQLMK
6	LAVGFDVFWNVPSSQ	39	RIIDWEAWRPIWEFN	72	RKGNDRLKWLWEEST	105	VGSKNHCAQLMKYIA
7	GFDVFWNVPSSQCCK	40	DWEAWRPIWEFNWSS	73	NDRLKWLWEESTAVC	106	RNHCAQLMKYIADVL
8	VFWNVPSSQCCKRYGM	41	AWRPIWEFNWSSLRK	74	LKWLWEESTAVCPSI	107	CAQLMKYIADVLGPA
9	NVPSSQCCKRYGMKFKV	42	PIWEFNWSSLRKYQD	75	LWEESTAVCPSIYIK	108	LMKYIADVLGDPATLR
10	BQCCKRYGMKRFVPLL	43	EFNWSSLRKYQDKMK	76	ESTAVCPSIYIREGQ	109	YIADVLGDPATLRIKE
11	CKRYGMKRFVPLLEQY	44	WSSLRKYQDKMKVV	77	AVCPSIYIREGQLTN	110	DVLGDPATLRIKENVA
12	YGMKRFVPLLEQYSIL	45	LRKYQDKMKVVVRQF	78	PSIYIREGQLTNYTL	111	GPATLRIKENVARCS
13	KRFVPLLEQYSILVNK	46	YQDKMKVVVRQFNPT	79	YIREGQLTNYTLQKR	112	TLRIKENVARCSKQA
14	PLLEQYSILVNKEDN	47	KMKVVVRQFNPTAHE	80	EGQLTNYTLQKRIWF	113	IKENVARCSKQACSG
15	EQYSILVNKEDNFKG	48	KVVVRQFNPTAHESTV	81	LTNYTLQKRIWFTNG	114	NVARCSKQACSGRGR
16	SILVNKEDNFKGDKI	49	RQFNPTAHESTVAKL	82	YTLQKRIWFTNGRLQ	115	RCSKQACSGRGRCTW
17	VNKEDNFKGDKRITIF	50	NPTAHESTVAKLAHN	83	QKRIWFTNGRLQEAL	116	KQACSGRGRCTWPKD
18	EDNFKGDKRITIFYES	51	AHESTVAKLAHNEW	84	IWFTNGRLQEALRVA	117	CSGRGRCTWPKDTSV
19	FKGDKRITIFYESQLG	52	STVAKLAHNEWENSS	85	TNGRLQEALRVAQPK	118	GRCTWPKDTSVIAW
20	DKRITIFYESQLGLYP	53	AKLAHNEWENSSKSW	86	RLQEALRVAQPKARI	119	CTWPKDTSVIAWKFL
21	RITIFYESQLGLYPHIG	54	AHNEWENSSKSWMLS	87	EALRVAQPKARIYPY	120	PKDTSVIAWKFLVEK
22	YESQLGLYPHIGAND	55	ENSWENSSKSWMLSTLQ	88	RVAQPKARIYPYINY	121	TSVIAWKFLVEREDY
23	QLGLYPHIGANDES	56	NSKSWMLSTLQLGK	89	QPKARIYPYINYSIK	122	IWKFLVEREDYDFY
24	LYPHIGANDESFN	57	KSWMMLSTLQLGKQLR	90	ARIYPYINYSIKPGM	123	KFLVEREDYDFYLG
25	HIGANDESFN	58	MLSTLQLGKQLRPNS	91	YPYINYSIKPGMVP	124	VEREDYDFYLGDI
26	ANDESFN	59	TLQLGKQLRPNSVVC	92	INYSIKPGMVP	125	EDYDFYLGDI
27	ESFN	60	LGRQLRPNSVVCYYL	93	SIKPGMVP	126	DFYLGDI
28	NGGIPQLGDLKAHLE	61	QLRPNSVVCYYLFPD	94	PGMVP	127	LDIECKVEGVEGR
29	IPQLGDLKAHLEKSA	62	PNSVVCYYLFPDCYN	95	MVPEVEFWRLIAQIA	128	IECKVEGVEGRYCE
30	LGDLKAHLEKSAVDI	63	VVCYYLFPDCYNYDG	96	EVEFWRLIAQIASLG	129	KVEGVEGRYCEQRT
31	LKAHLEKSAVDIRRD	64	YYLFPDCYNYDGNV	97	FWRLIAQIASLGMDG	130	VEGVEGRYCEQRTK
32	HLEKSAVDIRRDILD	65	FPDCYNYDGNVQEF	98	LIAQIASLGMDGAVI		
33	KSVDIRRDILDKSA	66	CYNYDGNVQEFQCS	99	QIASLGMDGAVIWGS		

Figura 26: Reconhecimento de epitopos de LiHYAL pelo soro anti-rMEPLox. Membrana contendo peptídeos derivados da sequência primária de LiHYAL, testada com soro anti-rMEPLox. Foi utilizado o anticorpo anti-IgG de coelho conjugado a fosfatase alcalina (1:3000) e o substrato MTT-BCIP para a revelação dos spots reativos. Abaixo, as sequências dos pentadeca-peptídeos correspondentes aos spots mais reativos, destacados em cinza.

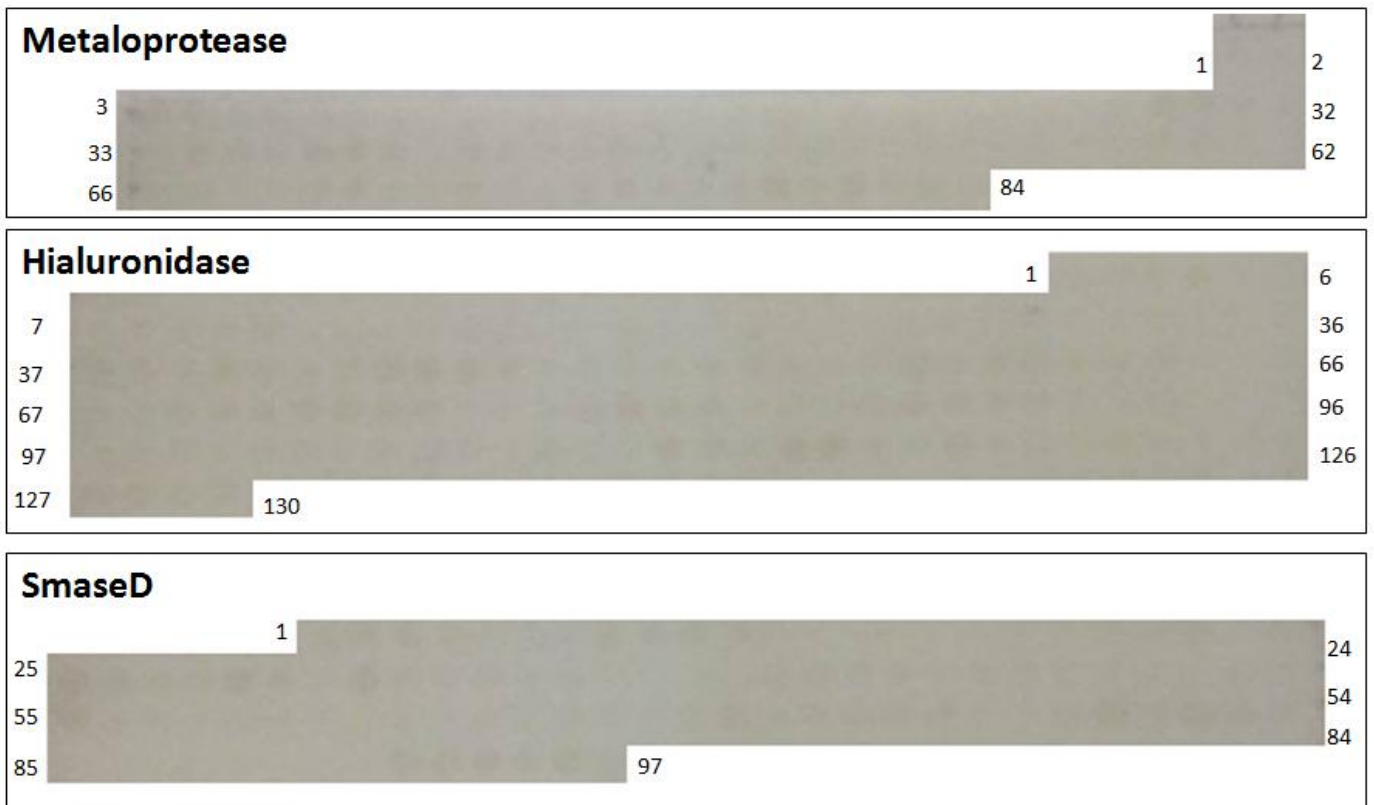


Figura 27: Controle negativo do ensaio de SPOT. Membranas contendo peptídeos derivados das seqüências primárias de LALP-1, LiHYAL e LiD, testadas com soro de coelhos não imunes. Foi utilizado o anticorpo anti-IgG de coelho conjugado a fosfatase alcalina (1:3000) e o substrato MTT-BCIP para a revelação dos spots reativos.

4.5 PURIFICAÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS ANTI- rMEPLox

Um pool com soros anti-rMEPLox foi feito para a precipitação e purificação das IgGs. Num gel SDS-PAGE, foram analisadas alíquotas da amostra do soro antes e depois da purificação (Fig. 28).

Um ELISA similar aos anteriores foi realizado para analisar a reatividade da amostra de IgG purificada e como podemos ver na Figura 29, houve reconhecimento de todos os venenos testados e a uma concentração de 2 µg IgG a resposta é bastante satisfatória.

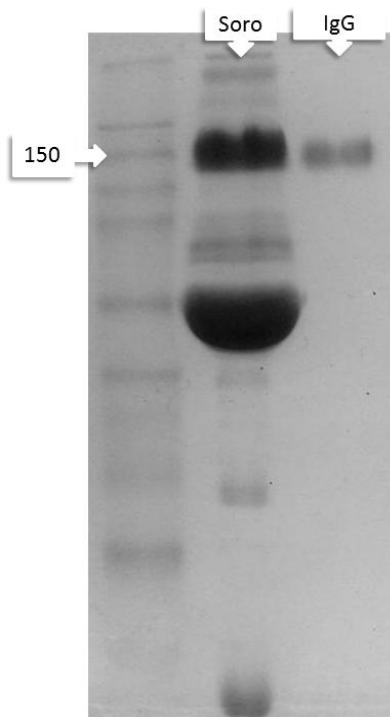


Figura 28: SDS-PAGE 10% purificação IgG. Na primeira linha do gel (M.W) está o marcador de massa molecular. Na segunda (Soro) uma amostra do soro bruto extraído e na terceira linha (IgG), uma amostra da purificação de IgG.

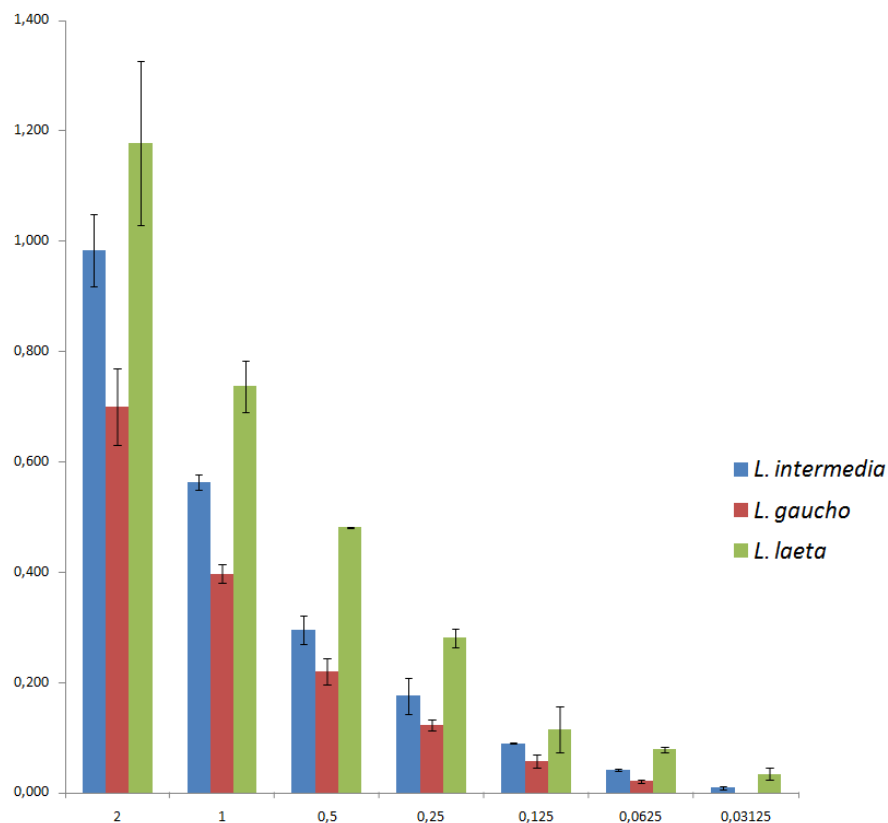


Fig 29: ELISA de IgG policlonal rMEPLox frente a diferentes venenos loxoscélicos. A placa foi sensibilizada com uma solução de 10 µg/mL de cada veneno e o IgG policlonal testado em concentrações que variam de 2 µg a 0,031 µg (eixo x), revelados com anticorpo anti-IgG de coelho 1/5000 e OPD SigmaFast. O ensaio foi realizado em duplicata. Em azul, sensibilização com veneno de *L. intermedia*, em vermelho *L. gaucho* e em verde *L. laeta*. No eixo y, os valores de absorbância obtidos em comprimento de onda de 490 nm.

4.6 ATIVIDADES BIOLÓGICAS E ENSAIOS DE NEUTRALIZAÇÃO *IN VITRO*

4.6.1 Inibição da atividade fibrinogenolítica

O fibrinogênio bovino, assim como o humano, é composto por três subunidades, $A\alpha$, $B\beta$ e γ . Os dados da Figura 30 mostram que veneno de *L. intermedia* é capaz de quebrar a subunidade $A\alpha$, e que o mesmo, quando pré incubado com IgG anti-rMEPLox em concentrações acima de 40 μg , não possui atividade fibrinogenolítica sob nenhuma subunidade.

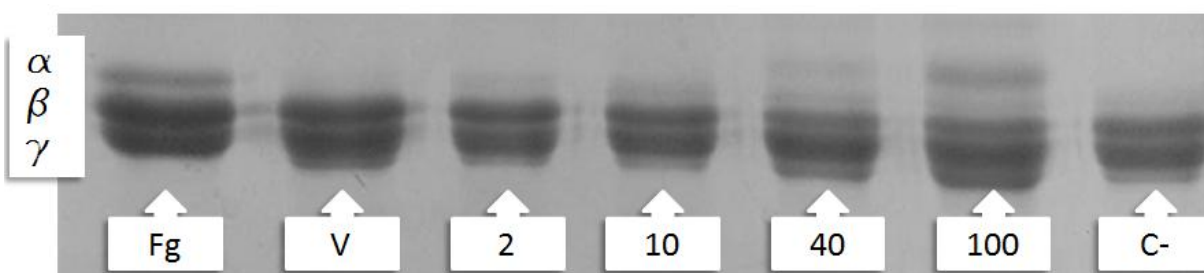


Figura 30: Neutralização de atividade fibrinogenolítica. SDS-PAGE 10% em condições redutoras. As cadeias $A\alpha$, $B\beta$ e γ do fibrinogênio estão indicadas no quadro à esquerda. A linha (Fg) apresenta um controle positivo com fibrinogênio sem tratamento enquanto a linha (V) mostra a degradação da cadeia alfa quando o fibrinogênio é tratado com 3 μg de veneno de *L. intermedia* por 16h. Nas linhas seguintes, o veneno foi pré incubado com concentrações de 2 μg , 10 μg , 40 μg e 100 μg de IgG anti-rMEPLox. Um controle negativo (C-) foi feito com veneno pré incubado com IgG de coelhos que receberam apenas PBS e adjuvantes nas imunizações.

Nós repetimos este ensaio com o soro anti-rCpLi para comparar sua capacidade neutralizante com a que obtivemos com o soro anti-rMEPLox. Foi observado que concentrações de 40 μg e 100 μg de IgG anti-rCpLi não foram capazes de neutralizar a lise do fibrinogênio causada pelo veneno de *L. intermedia*.

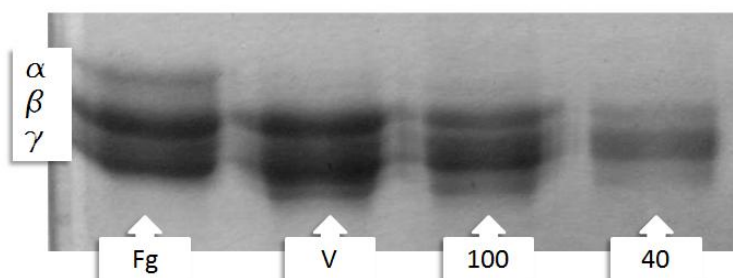


Figura 31: O soro anti-rCpLi não neutraliza atividade fibrinogenolítica. SDS-PAGE 10% em condições redutoras. Cadeias $A\alpha$, $B\beta$ e γ do fibrinogênio estão indicadas no quadro à esquerda. (Fg) apresenta um controle positivo com fibrinogênio sem tratamento. (V) mostra a degradação da cadeia alfa

quando o fibrinogênio é tratado com 3 µg de veneno de *L. intermedia* por 16h. Nas linhas seguintes, o veneno foi pré incubado com concentrações 100 µg e 40 µg de IgG anti-rMEPLox.

Em outro experimento, deste mesmo ensaio, foi possível analisar que a proteína quimera rMEPLox não possui atividade fibrinogenolítica, como demonstrado na figura 32.

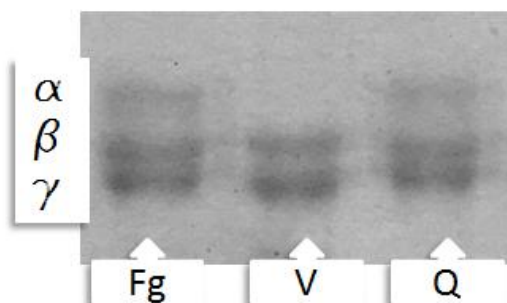


Figura 32: A proteína rMEPLox não apresenta atividade fibrinolítica. SDS-PAGE 10% em condições redutoras. As cadeias α , β e γ do fibrinogênio estão indicadas no quadro à esquerda. A linha (Fg) apresenta um controle positivo com fibrinogênio sem tratamento. Nas linhas seguintes, o fibrinogênio foi tratado com 3 µg de veneno de *L. intermedia* (V) e com rMEPLox na mesma concentração (Q), por 16h a 37 °C.

4.6.2 Inibição da atividade gelatinolítica/colagenásica

Os resultados obtidos com o ensaio realizado com o kit *EnzChek Gelatinase/Colagenase* mostram que a proteína rMEPLox não possui atividade de gelatinase e que a pré incubação do veneno de *L. intermedia* (3 µg) com 50 µg de IgG policlonal anti-rMEPLox foi capaz de reduzir em mais de 40% de sua atividade gelatinásica. O soro anti-rCpLi não foi capaz de neutralizar a atividade nas mesmas condições.

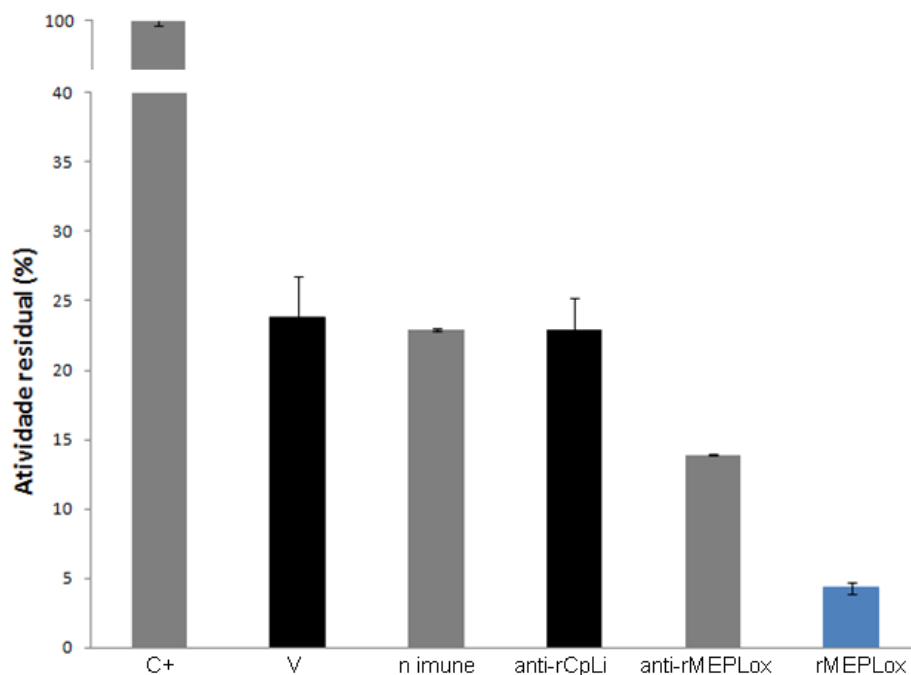


Figura 33: Ensaio de atividade gelatinásica. O gráfico mostra os valores residuais de atividade com base nos valores da fluorescência detectada. A gelatina do kit foi incubada com coagenase de *C. histolyticum* (C+), com 3 µg de veneno de *L. intermedia* (V), com a mesma concentração de veneno previamente incubado com 50 µg de IgG de coelho não imune (n imune), 50 µg de IgG anti-rCpLi, 50 µg de IgG anti-rMEPLox e com 12 µg de rMEPLox em temperatura ambiente por 19 horas.

4.7 ENSAIO DE NEUTRALIZAÇÃO *IN VIVO*

4.7.1 Inibição da atividade dermonecrótica

A atividade dermonecrótica foi avaliada em coelho não imunizado. O dorso do animal recebeu uma injeção intradérmica de 10 µg de veneno de *L. intermedia*. A Figura 34 mostra a evolução da lesão deste animal, observada por 72 horas. Simultaneamente a este ensaio, a habilidade dos anticorpos anti-rMEPLox de neutralizar a atividade dermonecrótica do veneno de *L. intermedia* foi avaliada em coelhos vacinados. Na Figura 35 vemos fotos do coelho imunizado com pool de venenos, após 6, 24 e 72 horas de injeção intradérmica de 10 µg de veneno de *L. intermedia*. O mesmo é apresentado na Figura 36, com o coelho vacinado com rMEPLox. O coelho não vacinado apresentou uma área de dermonecrose, mensurada em 11,55 cm² pelo programa ImageJ. Os coelhos vacinados não apresentaram sintomas de dermonecrose visíveis.

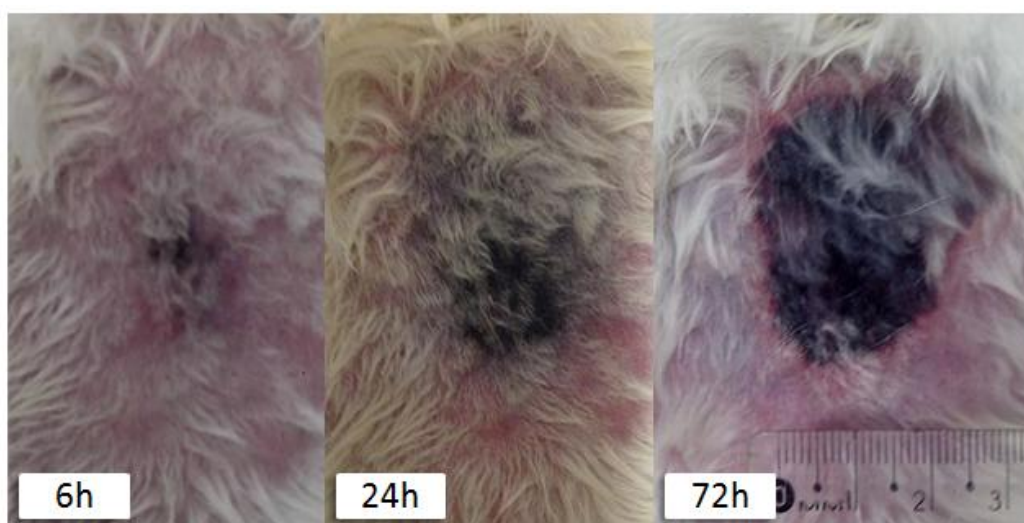


Figura 34: Atividade dermonecrótica em coelho não imune. Evolução da dermonecrose em dorso de coelho não imune devido à injeção intradérmica de 10 µg de veneno de *Loxosceles intermedia*. Registros de 6, 24 e 72 horas.

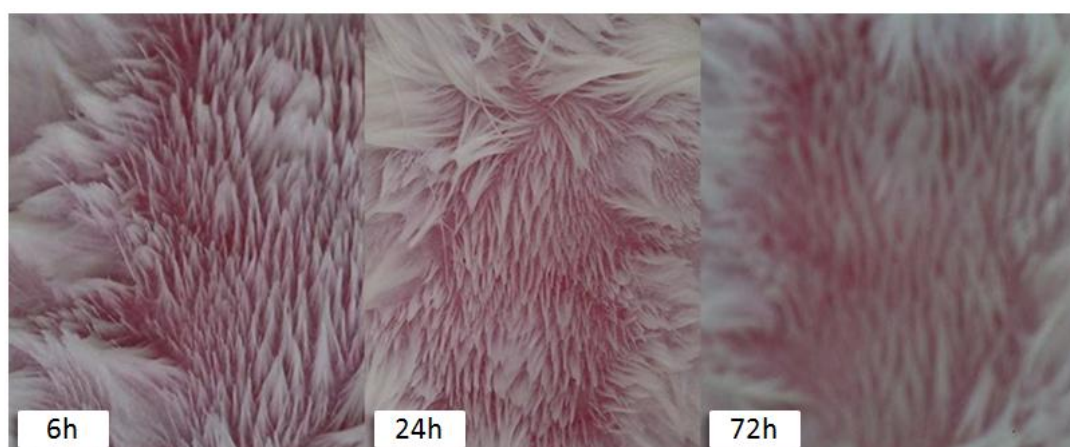


Figura 35: Neutralização de atividade dermonecrótica em coelho imunizado com veneno. Reação do animal com 6, 24 e 72h após injeção intradérmica de 10 µg de veneno de *L. intermedia*.

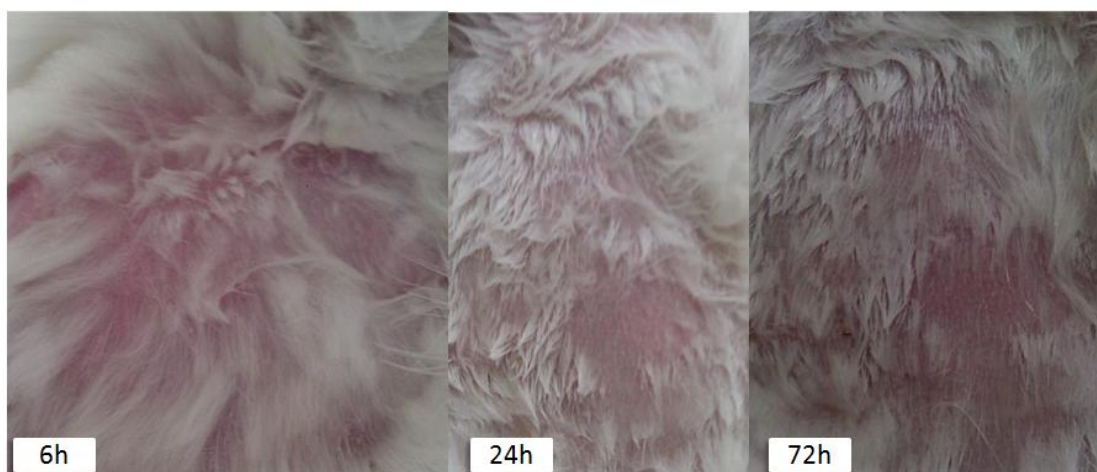


Figura 36: Neutralização de atividade dermonecrotica em coelho imunizado com rMEPLox. Registros de 6, 24 e 72 horas após injeção intradérmica de 10 de veneno de *L. intermedia*.

4.8 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-rMEPLox EM CAMUNDONGOS

Um ciclo de imunização composto por três doses de rCpLi foi realizado com 10 camundongos, conforme protocolo já especificado. Outro grupo com a mesma quantidade de animais recebeu injeção de PBS e adjuvante durante o ciclo. Após a terceira dose de imunização com rMEPLox, microplacas foram sensibilizadas com venenos de *L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta* e os soros dos camundongos que receberam injeções de quimera, e de camundongos não imunes tiveram sua reatividade testada em ELISA. Como resultado, os camundongos não imunes não apresentaram reatividade significativa e dos camundongos que receberam a rMEPLox, quatro apresentaram leve resposta e dois se mostraram fortemente reativos (Fig. 37).

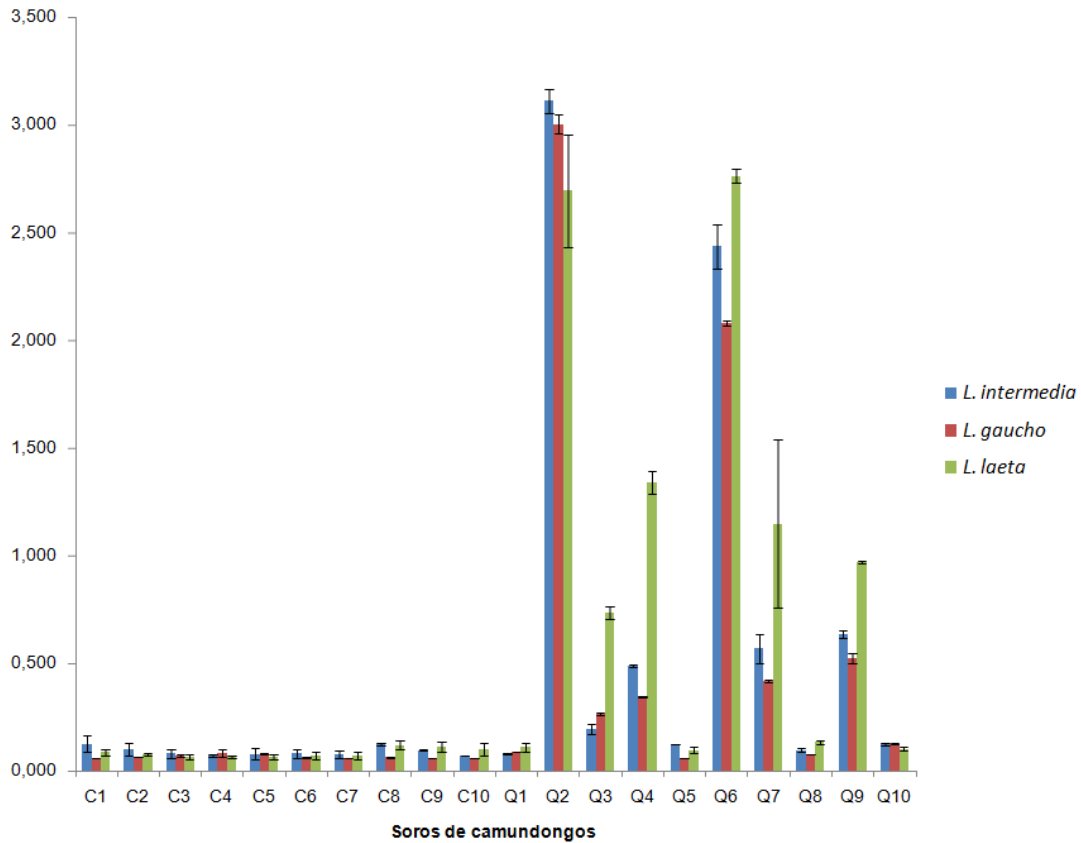


Figura 37: ELISA do soro anti-rMEPLox produzido em camundongos frente a diferentes venenos loxoscélicos. A placa foi sensibilizada com uma solução de 8 µg/ml de cada veneno e os soros testados na diluição 1/500, revelados com anticorpo anti-IgG de coelho 1/5000 e OPD SigmaFast. O ensaio foi realizado em duplicata. Os camundongos controle, que receberam injeções de apenas PBS e adjuvante, são representados pela letra C, já os que receberam a quimera, pela letra Q (eixo x). Em azul, sensibilização com veneno de *L. intermedia*, em vermelho *L. gaucho* e em verde *L. Laeta*. No eixo y, os valores de absorbância obtidos em comprimento de onda de 490 nm.

Os dois camundongos mais reativos aos venenos foram selecionados para a produção dos anticorpos em hibridomas. Eles tiveram seu soro titulado em ELISA contra veneno de *L. intermedia* (Fig. 38).

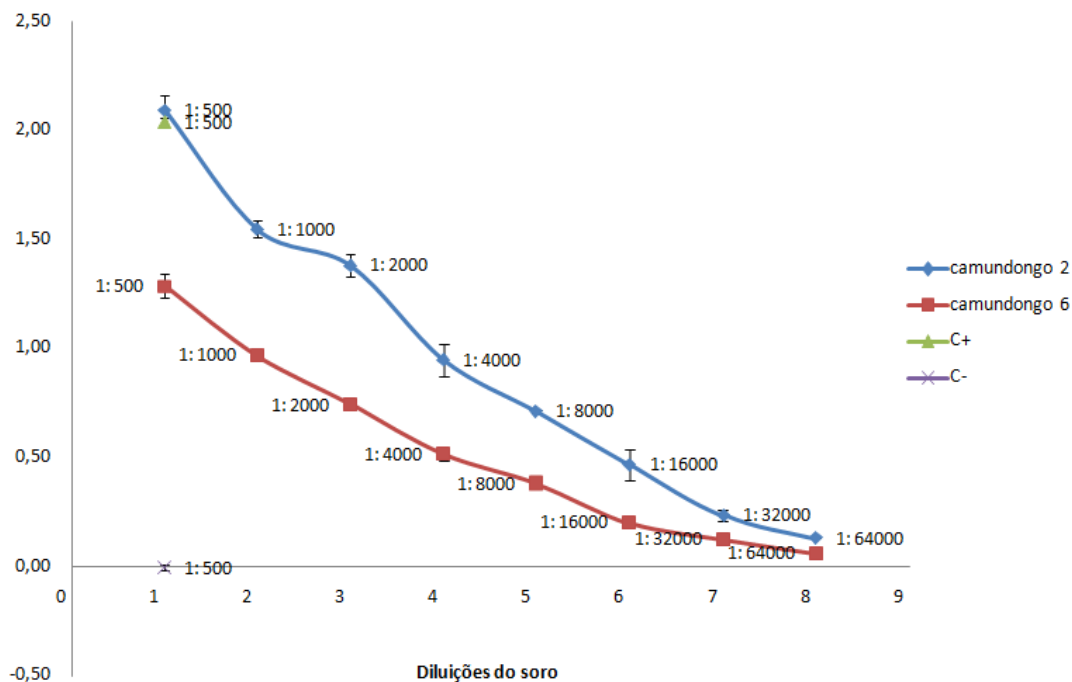
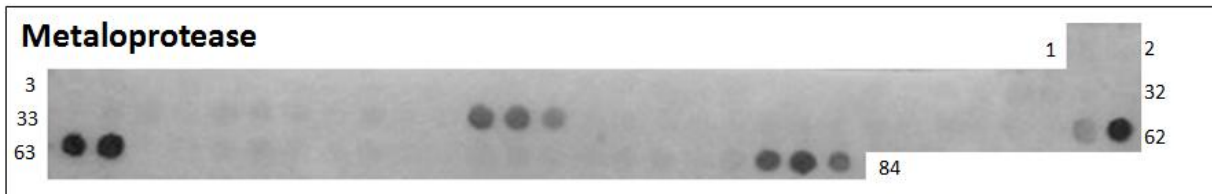


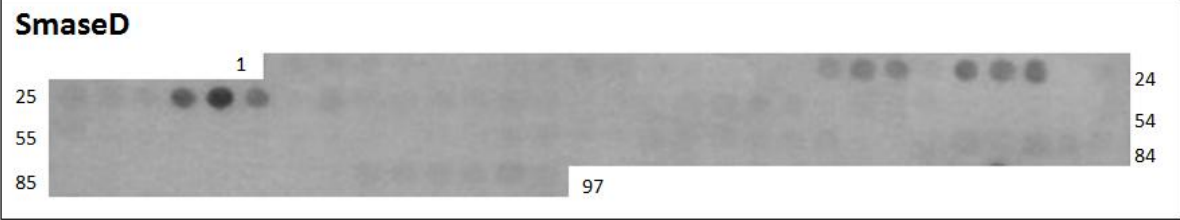
Figura 38: ELISA titulação dos soros anti-rMEPLox produzidos em camundongos. A placa foi sensibilizada com uma solução de 8 µg/ml de veneno de *L. interme* e os soros testados na diluição 1/500, revelados com anticorpo anti-IgG de coelho 1/5000 e OPD SigmaFast. O ensaio foi realizado em duplicata. Os camundongos controle, que receberam injeções de apenas PBS e adjuvante, são representados pela letra C, já os que receberam a quimera, pela letra Q. Em azul, sensibilização com veneno de *L. intermedia*, em vermelho *L. gaucho* e em verde *L. laeta*.

Um pool com os dois soros dos camundongos mais reativos foi feito para testar o reconhecimento dos epitopos das toxinas loxoscélicas por *SPOT*, na diluição de 1/1000. O soro foi capaz de reconhecer alguns epitopos de toxinas loxoscélicas. Assim, como com soro de coelho, três regiões antigênicas foram identificadas na membrana de metaloprotease (Fig. 39) e duas regiões mostraram-se reativas na membrana de SmaseD (Fig. 40). Mas o mesmo não acontece com a membrana de hialuronidase, pois não houve reação em nenhuma região (não mostrado). Diferentemente do soro dos coelhos, o anti-rMEPLox produzido em camundongos é capaz de identificar um epitopo na membrana de *L. laeta* (Fig. 41). Quando realizado este ensaio com o soro de camundongos não imune, não há regiões reativas para nenhuma das toxinas testadas (não mostrado).



Spot #	Peptide	Spot #	Peptide	Spot #	Peptide	Spot #	Peptide
1	MIKYIGVFVAFVLVGGF	22	GEIVYEI SPGLRQYE	43	QPLSLGRGCTDFGTI	64	IGPFDDYDSIMLYGAY
2	YIGVFVAFVLVGGFCHD	23	VYEI SPGLRQYEQII	44	SLGRGCTDFGTILHE	65	FDYDSIMLYGAYAFS
3	VFAFLVGGFCHDFET	24	ISPGLRQYEQIIREA	45	RGCTDFGTILHELGH	66	DSIMLYGAYAFSKDT
4	FLVGGFCHDFETVIS	25	GLRQYEQI IREAMRT	46	TDFGTILHELGHSVG	67	MLYGAYAFSKDTRKF
5	GGFCHDFETVISNQD	26	QYEQI IREAMRTYED	47	GTILHELGHSVGFDH	68	GAYAFSKDTRKFKTM
6	CHDFETVISNQDPIV	27	QI IREAMRTYEDNTC	48	LHELGHVSVGFDEHS	69	AFSKDTRKFKTMEPV
7	FETVISNQDPIVDGM	28	REAMRTYEDNTCIKF	49	LGHSVGFDEHSRAD	70	KDTRKFKTMEPVEPG
8	VISNQDPIVDGMRLV	29	MRTYEDNTCIKFRRR	50	SVGFDEHSRADRDE	71	RFKFKTMEPVEPGLPM
9	NQDPIVDGMRLVEGD	30	YEDNTCIKFRRTNE	51	FDHEHSRADRDEFLLI	72	KTMEPVEPGLPMKSV
10	PIVDGMRLVEGDMLF	31	NTCIKFRRTNEADY	52	EHSRADRDEFLLIHK	73	EPVEPGLPMKSVIQK
11	DGMRLVEGDMLFDDG	32	IKFRRTNEADYVNI	53	RADRDEFLLIHKENI	74	EPGLPMKSVIQKGKL
12	RLVEGDMLFDDGPLF	33	RRRTNEADYVNIHVG	54	RDEFLLIHKENIKNG	75	LPMKSVIQKGKLSYY
13	EGDMLFDDGPLFTER	34	TNEADYVNIHVGDRC	55	FLIIHKENIKNGSEH	76	KSVIQKGKLSYYDIV
14	MLFDDGPLFTERNAV	35	ADYVNIHVGDRCYSR	56	IHKENIKNGSEHNFD	77	IQKGKLSYYDIVKVN
15	DDGPLFTERNAVKYD	36	VNIHVGDRCYSRVKG	57	ENIKNGSEHNFDKLW	78	GKLSYYDIVKVNKLY
16	PLFTERNAVKYDQQL	37	HVGDRCYSRVKGKFR	58	KNGSEHNFDKLWENN	79	SYDIVKVNKLYKCP
17	TERNAVKYDQQLWPN	38	DRCYSRVGKSRGGP	59	SEHNFDKLWENNTRT	80	DIVKVNKLYKCPPVN
18	NAVKYDQQLWPNGEI	39	YSRVGKSRGGPQPL	60	NFDKLWENNTRTIGP	81	KVNKLYKCPPVNPYP
19	KYDQQLWPNGEIVYE	40	VGKSRGGPQPLSLG	61	KLWENNTRTIGPFDY	82	KLYKCPPVNPYPGGI
20	QQLWPNGEIVYEISP	41	SFRGGPQPLSLGRGC	62	ENNTRTIGPFDYDSI	83	KCPPVNPYPGGIRPY
21	WPNGEIVYEISPGLR	42	GGPQPLSLGRGCTDF	63	TRTIGPFDYDSIMLY	84	PVNPYPGGIRPYVNV

Figura 39: Reconhecimento de epítomos de LALP-1 pelo soro de camundongos anti-rMEPLox. Membrana contendo peptídeos derivados da sequência primária de LALP-1, testada com soro anti-rMEPLox. Foi utilizado o anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado a fosfatase alcalina (1:3000) e o substrato MTT-BCIP para a revelação dos spots reativos. Abaixo, as sequências dos pentadecapeptídeos correspondentes aos spots mais reativos, destacados em cinza.



Spot#	Peptide	Spot#	Peptide	Spot#	Peptide	Spot#	Peptide
1	MLPYIVLVLGCVSVL	26	IPDCGRNCKKYENF	51	GGRAYIVLSIPDLNH	76	RGLSRVNAAVANRDS
2	YIVLVLGCVSVLSQA	27	DCGRNCKKYENFNDF	52	AYIVLSIPDLNHYPL	77	SRVNAAVANRDSANG
3	LVLGCVSVLSQAAQT	28	RNCKKYENFNDFLKG	53	VLSIPDLNHYPLIKG	78	NAAVANRDSANGFIN
4	GCWSVLSQAAQTDE	29	KKYENFNDFLKLGRS	54	IPDLNHYPLIKGFKD	79	VANRDSANGFINVKY
5	SVLSQAAQTDEERA	30	ENFNDFLKLGRSATT	55	LNHYPLIKGFKDQLT	80	RDSANGFINVKVYWT
6	SQAAQTDEERAGNR	31	NDFLKLGRSATTPGN	56	YPLIKGFKDQLTKDG	81	ANGFINVKVYWTVDK
7	AQTDEERAGNRRPI	32	LKLGRSATTPGNSKY	57	IKGFKDQLTKDGHPE	82	FINKVYWTVDKRST
8	DDEERAGNRRPIWIM	33	LSATTTPGNSKYQEK	58	FKDQLTKDGHPELME	83	KVYWTVDKRSTTRD
9	ERAGNRRPIWIMGHM	34	ATTPGNSKYQEKLVL	59	QLTKDGHPELMEKVG	84	YWTVDKRSTTRDALD
10	GNRRPIWIMGHMVNA	35	PGNSKYQEKLVLVVF	60	KDGHPELMEKVGHDF	85	VDKRSTTRDALDAGV
11	RPIWIMGHMVNAIGQ	36	SKYQEKLVLVVFDLK	61	HPELMEKVGHDFSGN	86	RSTTRDALDAGVDGI
12	WIMGHMVNAIGQIDE	37	QEKLVLVVFDLKTGS	62	LMEKVGHDFSGNDDI	87	TRDALDAGVDGIMTN
13	GHMVNAIGQIDEFVN	38	LVLVVFDLKTGSLYD	63	KVGHDFSGNDDIGDV	88	ALDAGVDGIMTNYPD
14	VNAIGQIDEFVNLGA	39	VVFDLKTGSLYDNOA	64	HDFSGNDDIGDVGKA	89	AGVDGIMTNYPDVIT
15	IGQIDEFVNLGANSI	40	DLKTGSLYDNOANDA	65	SGNDDIGDVGKAYKK	90	DGIMTNYPDVITDVL
16	IDEFVNLGANSIETD	41	TGSLYDNOANDAGKK	66	DDIGDVGKAYKKAGI	91	MTNYPDVITDVLNEA
17	FVNLGANSIETDVSF	42	LYDNOANDAGKKLAK	67	GDVGKAYKKAGITGH	92	YPDVITDVLNEAAYK
18	LGANSIETDVSFDDN	43	NQANDAGKKLAKNLL	68	GKAYKKAGITGHIWQ	93	VITDVLNEAAYKKKF
19	NSIETDVSFDDNANP	44	NDAGKKLAKNLLQHY	69	YKKAGITGHIWQSDG	94	DVLNEAAYKKKFRVA
20	ETDVSFDDNANPEYT	45	GKKLAKNLLQHYWNN	70	AGITGHIWQSDGITN	95	NEAAYKKKFRVATYD
21	VSFDDNANPEYTYHG	46	LAKNLLQHYWNNNGN	71	TGHIWQSDGITNCLP	96	AYKKKFRVATYDDNP
22	DDNANPEYTYHGIPC	47	NLLQHYWNNNGNGGR	72	IWQSDGITNCLPRGL	97	KKFRVATYDDNPVWT
23	ANPEYTYHGIPDCG	48	QHYWNNNGNGGRAYI	73	SDGITNCLPRGLSRV	98	RVATYDDNPVWTFKK
24	EYTYHGIPDCGRNC	49	WNNNGNGGRAYIVLS	74	ITNCLPRGLSRVNAA		
25	YHGIPDCGRNCKKY	50	GNNNGGRAYIVLSIPD	75	CLPRGLSRVNAAVAN		

Figura 40: Reconhecimento de epitopos de LiD pelo soro de camundongos anti-rMEP Lox. Membrana contendo peptídeos derivados da sequência primária de LiD, testada com soro anti-rMEP Lox. Foi utilizado o anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado a fosfatase alcalina (1:3000) e o substrato MTT-BCIP para a revelação dos spots reativos. Abaixo, as sequências dos pentadecapeptídeos correspondentes aos spots mais reativos, destacados em cinza.

SmaseD Laeta



Spot #	Peptide	Spot #	Peptide	Spot #	Peptide	Spot #	Peptide
1	ADNRRPIWNLGHMVN	24	LREYTPGNSKYREK	47	YEFIRTFKEVLKTAG	70	ARLKEI IKS R D S E N G
2	RRPIWNLGHMVNAVK	25	YTPGNSKYREK FIL	48	IRTFKEVLKTAGHEN	71	KEI I K S R D S E N G F I S
3	IWNLGHMVNAVKQIP	26	PGNSKYREK FILFVL	49	FKEVLKTAGHENLLD	72	I K S R D S E N G F I S K V Y
4	LGHMVNAVKQIPTFL	27	SKYREK FILFVLDLK	50	VLKTAGHENLLDKVG	73	R D S E N G F I S K V Y Y W S
5	MVNAVKQIPTFLNDG	28	REK FILFVLDLKTGS	51	TAGHENLLDKVGYDL	74	E N G F I S K V Y Y W S V D K
6	AVKQIPTFLNDGANA	29	FILFVLDLKTGSLNN	52	HENLLDKVGYDLSGP	75	F I S K V Y Y W S V D K Y S T
7	QIPTFLNDGANAI EA	30	FVLDLKTGSLNNEHV	53	LLDKVGYDLSGPYWP	76	K V Y Y W S V D K Y S T T R T
8	TFLNDGANAI EADIT	31	DLKTGSLNNEV RKA	54	KVGYDLSGPYWPSLP	77	Y W S V D K Y S T T R T A L D
9	NDGANAI EADIT FKG	32	TGSLNNEV R K A G E N	55	YDLSGPYWPSLPSLD	78	V D K Y S T T R T A L D V G V
10	ANAI EADIT FKGAVP	33	LNNNEV R K A G E N V A K	56	SGPYWPSLPSLDSVH	79	Y S T T R T A L D V G V D G I
11	EADIT FKGAVPTYS	34	HEV R K A G E N V A K G L L	57	YWPSLPSLDSVHEAF	80	T R T A L D V G V D G I M T N
12	DIT FKGAVPTYSYHG	35	R K A G E N V A K G L L E N Y	58	SLPSLDSVHEAFKKA	81	A L D V G V D G I M T N Y P Y
13	FKGAVPTYSYHGTPC	36	GENVAKGLENYWNN	59	SLDSVHEAFKAGVD	82	V G V D G I M T N Y P Y V I I
14	AVPTYSYHGTPCDFG	37	VAKGLENYWNNNGN	60	SVHEAFKAGVDGHV	83	D G I M T N Y P Y V I I D V L
15	TYSYHGTPCDFGRDC	38	G L L E N Y W N N G N N G G R	61	EAFKAGVDGHVWLS	84	M T N Y P Y V I I D V L N E N
16	YHGTPCDFGRDCIRW	39	E N Y W N N G N N G G R A Y V	62	KKAGVDGHVWLS DGL	85	Y P Y V I I D V L N E N G Y K
17	TPCDFGRDCIRWEYF	40	W N N G N N G G R A Y V V L S	63	GVDGHVWLS DGLTNW	86	V I I D V L N E N G Y K D K Y
18	DFGRDCIRWEYFDVF	41	G N N G G R A Y V V L S L P D	64	GHVWLS DGLTNWAKL	87	D V L N E N G Y K D K Y R L A
19	RDCIRWEYFDVFLRT	42	G G R A Y V V L S L P D I A H	65	WLS DGLTNWAKLGDM	88	N E N G Y K D K Y R L A T Y D
20	IRWEYFDVFLRTLRE	43	A Y V V L S L P D I A H Y E F	66	DGLTNWAKLGDMARL	89	G Y K D K Y R L A T Y D D N P
21	EYFDVFLRTLREYTT	44	V L S L P D I A H Y E F I R T	67	TN W A K L G D M A R L K E I	90	D K Y R L A T Y D D N P W E T
22	DVFLRTLREYTT PGN	45	L P D I A H Y E F I R T F K E	68	A K L G D M A R L K E I I K S	91	R L A T Y D D N P W E T F K N
23	LRTLREYTPGNSKY	46	I A H Y E F I R T F K E V L K	69	G D M A R L K E I I K S R D S		

Figura 41: Reconhecimento de epitopos de SmaseD de *L. laeta* pelo soro de camundongos anti-rMEPLox. Membrana contendo peptídeos derivados da sequência primária de esfingomielinase D de *Loxosceles laeta*, testada com soro anti-rMEPLox. Foi utilizado o anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado a fosfatase alcalina (1:3000) e o substrato MTT-BCIP para a revelação dos spots reativos. Abaixo, as sequências dos pentadecapeptídeos correspondentes aos spots mais reativos, destacados em cinza.

5 DISCUSSÃO

Os acidentes com aranhas *Loxosceles* são a terceira maior causa de acidentes envolvendo animais peçonhentos (Pauli *et al.* 2006). O loxoscelismo representa importância médica e econômica, pois além dos casos de morte, existem os de morbidade, em que o acidentado pode ser afastado do mercado de trabalho pelas sequelas do quadro.

A vacinologia estrutural é um ramo da biologia emergindo como uma plataforma promissora para a identificação de antígenos protetores eficazes. Esta tecnologia decorre da observação de que os epitopos que induzem respostas imunitárias protetoras estão restritos a domínios específicos dentro de uma proteína imunogênica. Assim, uma vez que os domínios são identificados e expressos numa forma recombinante, podem ser utilizados como potentes imunógenos desprovidos de outras regiões que são irrelevantes do ponto de vista da vacina, ou ainda, de um soro. Uma das vantagens de trabalhar com domínios de proteínas é que eles são estruturalmente ordenados, e podem ser manipulados *in vitro*, permitindo a construção de proteínas de fusão sintéticas hospedando dois ou mais domínios imunogênicos.

Desde que o mapeamento de epitopos conformacionais e lineares foi utilizado para construir a rLiD1 por Kalapothakis e colaboradores em 2002, e que esta mostrou capacidade neutralizante da atividade dermonecrótica do veneno loxoscélico, nosso grupo tem buscado a síntese de imunógenos não tóxicos que também inibam a dermonecrose e que sejam ainda capazes de neutralizar outras atividades do veneno. Em 2011 J. de Moura e colaboradores conseguiram neutralizar *in vivo* alguns dos efeitos biológicos do veneno de *L. intermedia* com anticorpos gerados com peptídeos de mimotopos de SmaseD. Dois anos depois, Ramada e colaboradores também fizeram o uso de outros peptídeos de SmaseD para neutralizar algumas atividades do veneno *in vitro*.

Proteínas quiméricas recombinantes têm sido usadas em estudos de vacinas contra parasitas, como *Schistosoma* spp (Hora, 2006) e *Leishmania* spp (Saljoughian *et al.* 2013), por exemplo. Apesar destes trabalhos mencionarem a baixa imunogenicidade de proteínas recombinantes, a primeira quimera de epitopos loxoscélicos produzida por nosso grupo, rCpLi, demonstrou reatividade maior em ELISA frente a rLiD, quando comparada ao soro anti-loxoscélico e foi capaz de neutralizar os venenos de *L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta in vivo* (Figueiredo *et al.* 2014). Os dados deste trabalho mostram que a engenharia de proteínas é uma forte candidata para o desenvolvimento de soros e vacinas que podem ajudar no problema

do loxoscelismo.

Como o veneno possui outras atividades importantes além da dermonecrose, surgiu a necessidade de criar uma proteína recombinante capaz de neutralizar todas as atividades do veneno importantes ao loxoscelismo. Em nossos resultados, os ensaios com membranas de *SPOT* contendo peptídeos mostraram-se promissores para o mapeamento de epitopos, com os soros anti-hialuronidase e anti-metaloprotease sendo peças-chaves para determinar as sequências adicionais importantes para o reconhecimento e composição da quimera proposta.

A expressão de proteínas recombinantes em *Escherichia coli* é bem caracterizada e é o sistema de expressão heteróloga mais utilizado devido à sua praticidade e baixos custos (Sahdev *et al.*, 2008). A cepa eletrocompetente BL21 de *E. coli* foi selecionada para este trabalho por ser deficiente na produção de suas proteases naturais e por manter estáveis os plasmídios de expressão. Além disso, outros trabalhos que produziram toxinas recombinantes de *Loxosceles intermedia* (Chávez *et al.* 2006; Chaim *et al.*, 2007; Da Silveira *et al.* 2007; Mendes *et al.* 2013) obtiveram uma alta eficiência com a mesma.

A obtenção de proteínas na forma solúvel é um desafio enfrentado por quem trabalha com expressão de recombinantes. Não diferente, a produção desta proteína quimera ganha certo grau de dificuldade por ela se encontrar disponível na porção insolúvel do lisado bacteriano, precisando então ser solubilizada em uréia para a purificação e depois passar por processos de remoção de uréia. Como demonstrado, duas bandas de massa bastante próximas foram obtidas da purificação. A presença destas duas bandas pode ser devida ao processamento diferencial da sequência sinal para expressão no periplasma. Na situação esperada, a sequência sinal pelB leader levaria a proteína expressa ao espaço periplasmático, onde se localiza peptidase específica que clivaria tal sequência. Possivelmente por falha neste transporte, parte da proteína expressa pode ter ficado retida no citoplasma, não sofrendo o processamento esperado. A sequência sinal (MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA) apresenta massa molecular de 2228.7 Da, de modo que a rMEPLox não processada apresentaria massa de 21.6 kDa, sendo compatível com o que foi observado no gel. Mais tardiamente, ambas as bandas se mostraram igualmente reativas num ensaio de *Western Blot* (Fig. 21), como esperado para rMEPLox.

Os imunoenaios iniciais mostram que a rMEPLox não foi fortemente reconhecida pelos soros α LiV, o que era de se esperar, pois a proteína produzida representa uma porção muito pequena do veneno inteiro. No entanto, ela se mostrou especificamente reconhecida pelos soros α LiD1, α LALP, α Hyalo e α LiD1 demonstrando que a proteína compartilha epitopos com as proteínas que deram

origem aos referidos soros.

Inicialmente, os soros produzidos em coelhos com as primeiras doses de rMEPLox mostraram-se capazes de reconhecer todos os venenos testados denotando a eficácia da proteína quimera em estimular resposta imune humoral direcionada para o veneno loxoscélico. Além disso, a imunização mostrou um potencial papel protetor, pois após o período de três meses os coelhos ainda produziam anticorpos reativos. Os indivíduos do grupo não respondiam da mesma forma, mas essa diferença foi atenuada e a reatividade melhorada após o novo ciclo de imunizações. A escolha dos venenos dos ensaios está relacionada com a importância médica brasileira, já que *L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta* são as espécies mais notificadas em acidentes. Um ensaio com veneno de *L. similis* também foi realizado, pois o número de casos de acidentes envolvendo esta espécie vem crescendo no país, e os resultados mostram que o soro anti-rMEPLox é capaz de reconhecer este veneno.

Nós demonstramos por *Western Blot* que o soro anti-rMEPLox reconhece algumas bandas do veneno de *L. intermedia*. Foram identificados componentes do veneno com massas moleculares que corresponderiam às toxinas Hialuronidase (43 kDa), SmaseD (32-35 kDa) e Metaloprotease (29 kDa).

Os epitopos das principais toxinas do veneno foram fortemente reconhecidos pelo soro anti-rMEPLox produzido em coelhos, no ensaio de *SPOT*, confirmando o sucesso da produção da quimera proposta. O soro produzido apresenta inclusive, reatividade maior que os inicialmente testados para o mapeamento, mostrando uma alta especificidade. As três regiões antigênicas reconhecidas para LALP-1 correspondem aos três epitopos resultantes do mapeamento. Dos dois epitopos de LiHYAL selecionados para a quimera, um só foi reconhecido na membrana, já que o segundo não foi selecionado com base em antigenicidade, e sim pelo potencial neutralizante. Na membrana de LiD, duas regiões reativas correspondem a dois epitopos mapeados por *spot*. O terceiro epitopo de LiD não apresenta reatividade na membrana pois é um epitopo conformacional que foi mapeado por *Phage Display*. Nenhum epitopo foi identificado por este soro na membrana de SmaseD de *Loxosceles laeta*. É provável que isso se deva pelo fato de que o epitopo de SmaseD de *L. laeta* proposto foi mapeado por Ramada e colaboradores em 2013 utilizando soro de cavalos hiperimunes, ou seja, é natural que soros produzidos em outros modelos animais não atuem exatamente da mesma forma.

O ELISA de IgG policlonal frente aos venenos mostrou que há uma alta resposta para o veneno de *L. laeta*, informação contundente com a encontrada em outros trabalhos (Barbaro *et al.* 2001) que mostram uma maior imunogenicidade para este veneno. A resposta para *L. intermedia* também foi alta, fato esperado, uma vez

que a maioria dos epitopos que compõem a rMEPLox são derivados de toxinas presentes no veneno desta espécie.

Os ensaios *in vitro* por nós propostos analisaram as atividades fibrinogenolítica, hialuronidásica e gelatinolítica tanto do veneno, quanto da proteína expressa. A capacidade de neutralização destas atividades pelo soro produzido também foi avaliada. Em relação à rMEPLox, os resultados mostram que, como não apresentou nenhuma das atividades citadas, a rMEPLox é talvez mais adequada a ser utilizada como imunógeno, uma vez que, não possui atividades enzimáticas que poderiam reproduzir os efeitos deletérios do veneno causados aos animais.

As hialuronidases consomem o ácido hialurônico que compõe a matriz extracelular e os tecidos conjuntivos, favorecendo a difusão do veneno pelos demais tecidos. Na concentração de 6,6 µg, o veneno de *L. intermedia* apresenta 50% de atividade hialuronidásica. Por ser um experimento que mensura turbidez, e as próprias amostras de IgG - tanto dos coelhos imunes, quanto dos não imunes - apresentarem um valor de absorvância alto, mesmo purificadas, não é possível realizar ensaios de neutralização por esta técnica. Sendo assim, consideramos como experimentos de neutralização *in vitro* apenas os ensaios que avaliam emissão de fluorescência ou aqueles demonstrados em gel SDS-PAGE.

O veneno de *L. intermedia* atua como α -fibrinogenase, clivando a cadeia A α do fibrinogênio, colaborando para falhas na hemostase, contribuindo para o agravamento do loxoscelismo. Quando o veneno é incubado com anti-rMEPLox em concentrações acima de 40 µg, é possível notar que a hidrólise da cadeia alfa não ocorre completamente (as cadeias A α , B β e γ estão presentes no SDS-PAGE após incubação de 16h com o complexo veneno-anti-rMEPLox) sugerindo uma possível proteção dos anticorpos anti-rMEPLox. Já o soro anti-rCpLi não demonstrou capacidade de neutralizar a fibrogenólise, uma vez que mesmo com a pré-incubação de 100 µg de anticorpo, o veneno foi capaz de lisar a cadeia A α do fibrinogênio.

A matriz extracelular serve como um suporte que estabiliza as estruturas teciduais e também exerce influência no desenvolvimento, migração, proliferação, formato e metabolismo das células que estão em contato com ela. Como demonstrado *in vitro*, o veneno de *L. intermedia* consome o colágeno desnaturado (gelatina), que também é componente da matriz extracelular. Os anticorpos anti-rMEPLox, na concentração de 50 µg, reduziram a atividade gelatinásica do veneno em 41,66%, o que ajudaria a manter a integridade dos tecidos da vítima, provavelmente atenuando os sintomas hemorrágicos e necrosantes do loxoscelismo. Nas mesmas condições e concentração, os anticorpos anti-rCpLi não inibiram a atividade gelatinásica do veneno de *L. intermedia*.

Os resultados dos ensaios de atividade fibrinogenolítica e gelatinásica denotam uma diferença nos soros anti-rCpLi e anti-rMEPLox. As metaloproteases estão envolvidas nestas atividades, sendo assim, era esperado que apenas a rMEPLox gerasse anticorpos inibidores delas, pois contém três epitopos de LALP-1. Isso indica benefícios da inclusão destes epitopos na sequência da proteína ao caráter neutralizante do soro.

A principal característica do veneno das aranhas marrom é a atividade dermonecrótica. Noventa dias após a última dose do segundo ciclo de imunização, os coelhos foram submetidos a um ensaio de atividade dermonecrótica. O coelho não imune apresentou uma forte necrose na pele, característica do loxoscelismo cutâneo e o coelho vacinado com a proteína rMEPLox apresentou apenas uma vermelhidão no local, resposta muito parecida à que tivemos com o coelho vacinado com pool de venenos. Este resultado mostra que a proteína quimera por nós proposta, tem característica protetora quando utilizada como vacina. Após as 72 horas de observação, amostras de sangue dos animais foram recolhidas para análises clínicas na Escola de Veterinária – UFMG. Esta análise está em andamento.

Todos os resultados foram comparados com os obtidos em ensaios com soro de animais não imunes, aquele grupo de coelhos que receberam injeções de adjuvante com apenas PBS. Esta comparação foi importante para que pudéssemos afirmar que nossa proteína quimera foi responsável por produzir anticorpos específicos e protetores e que um simples soro de coelho não teria estas mesmas características.

Juntos, estes dados mostram que o soro proposto por este trabalho é uma alternativa viável às já existentes, com vantagens a respeito de uma imunização não tóxica, mais barata e com menor uso de animais. Diante destes bons resultados obtidos, nossa proposta foi produzir anticorpos anti-rMEPLox por hibridomas.

A produção de anti-venenos a partir de animais imunizados tem sido alvo de discussão de muitos trabalhos. Desde meados dos anos 90, alguns autores têm demonstrado um grande interesse em extinguir ou diminuir o uso de animais na produção industrial de anticorpos. Tal preocupação é reflexo dos altos custos e do sofrimento e exploração animal no processo de imunização (White, 2001; Meyer, 2003) e foi aos poucos tornando-se tendência mundial com o surgimento de um programa denominado 3 Rs (Reduction, Refinement, Replacement), proposto por Willian Russell e Rex Burchque em 1959. Estes autores discutem a importância de além de diminuir o número de animais para a pesquisa, contribuir para o bem-estar animal minimizando dor e desconforto, e incentivam a criação e uso de ensaios *in vitro*.

Na produção de anticorpos pela técnica de fusão celular, os anticorpos de

interesse, que são produzidos por um único clone de linfócito B, são secretados continuamente por células imortalizadas. Apesar de não ser uma técnica barata, seu uso é justificável uma vez que permite excluir toda a etapa de imunização para a obtenção de anticorpos, anulando o uso de animais e os gastos excessivos que são gerados na técnica tradicional de produção de anticorpos policlonais. Outra vantagem diz respeito aos hibridomas, uma vez que eles podem ser facilmente congelados, estocados e descongelados vários anos depois sem alterações das suas características; enquanto que anticorpos policlonais são inconstantes, no sentido de que as características dos anticorpos purificados refletem o exato momento no qual o sangue foi retirado do animal.

Nossos resultados iniciais da produção de anti-rMEPLox em camundongos mostram que, assim como os produzidos em coelho, os anticorpos dos camundongos reconhecem todos os venenos testados e também reconhecem epitopos do mapeamento de *SPOT*. Os epitopos reconhecidos na membrana de LiD e de metaloprotease coincidem com aqueles reconhecidos pelos soros de coelho. Já na de hialuronidase não houve reatividade, o que poderia ser explicado por estes epitopos terem sido selecionados com soro de coelho e com base na região de sítio ativo, como já explicado. Surpreendentemente o soro de camundongos foi capaz de identificar o epitopo de Smase D de *L. laeta*, mesmo este tendo sido mapeado com soro de cavalo. É importante ressaltar que os controles negativos de todos estes imunoenaios, realizados com soro de camundongos não imune, não apresentam reação, ressaltando mais uma vez a especificidade do soro anti-rMEPLox. Estes resultados indicam a viabilidade da produção de anticorpos anti-rMEPLox em hibridomas.

Os resultados encontrados neste trabalho apontam a rMEPLox como forte candidata na produção de anticorpos para uso clínico e também como vacina. Pela primeira vez, uma proteína contendo epitopos de várias toxinas diferentes foi utilizada para produzir um soro antiloxoscélico. Os anticorpos anti-rMEPLox produzidos por hibridomas certamente serão muito importantes frente ao loxoscelismo, abrindo um novo panorama na pesquisa em busca de um tratamento mais específico e principalmente diminuindo o uso de animais no processo de produção.

6 CONCLUSÕES

- i. A técnica de *SPOT* foi eficiente para mapear epítopos de toxinas loxoscélicas;
- ii. A proteína rMEPLox foi capaz de induzir a produção de anticorpos anti-rMEPLox em coelhos e camundongos;
- iii. Os anticorpos anti-rMEPLox reconhecem em ELISA os venenos de *L. intermedia*, *L. gaucho*, *L. laeta* e *L. similis*;
- iv. Os anticorpos anti-rMEPLox reconhecem epítopos das principais toxinas loxoscélicas: esfingomielinase-D, metaloprotease e hialuronidase pela técnica de *SPOT*.
- v. A proteína rMEPLox não apresentou atividades tóxicas nem letais;
- vi. Os anticorpos anti-rMEPLox diminuíram significativamente a ação do veneno de *L. intermedia* em ensaios *in vitro*;
- vii. A rMEPLox conferiu proteção à dermonecrose a um animal vacinado;

7 PERSPECTIVAS

- Analisar a alteração de parâmetros bioquímicos das amostras de sangue dos coelhos utilizados em ensaios deste trabalho;
- Verificar alternativas de sistemas de produção em larga escala da proteína rMEPLox;
- Caracterização da estrutura da proteína rMEPLox;
- Produzir soro anti-rMEPLox para uso terapêutico em cavalos;
- Conclusão da produção dos anticorpos anti-rMEPLox em hibridomas, assim como todos os testes para comprovar seu poder neutralizante;
- Uma vez que obtivermos sucesso com os anticorpos produzidos em hibridomas, a proposta é o uso destes anticorpos em testes para sua aprovação em uso clínico e produção em larga escala;

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVARENGA, L. M.; MARTINS, M. S.; de 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**, v. 42, n. 7, p. 725-731, 2003.
- ARAUJO, S. C.; CASTANHEIRA, P.; ALVARENGA, L.M.; MANGILI, O.C.; KALAPOTHAKIS, E.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. Protection against dermonecrotic and lethal activities of *Loxosceles intermedia* spider venom by immunization with a fused recombinant protein. **Toxicon** , v. 41, n. 3, p. 261-7, 2003.
- BARBARO, K. C.; KNYSAK, I; MARTINS, R.; HOGAN, C.; K., WINKEL. Enzymatic characterization, antigenic cross-reactivity and neutralization of dermonecrotic activity of five *Loxosceles* spider venoms of medical importance in the Americas. **Toxicon**, v. 45, n. 5, p. 489-499, 2005.
- BRESCOVIT, A. D., BONALDO, A. B., BERTANI, R. & RHEIMS, C. A., 2002. 4.3 Araneae. In: Amazonian Arachnida and Myriapoda. Identification keys to all classes, orders, families, some genera, and lists of known terrestrial species. Adis, J. (org.). Pensoft Publisher, Sofia, Moscow,. p. 303-343.
- CARDOSO, J.L.; WEN, F.H.; FRANÇA, F.O.; WARRELL, D.A.; THEAKSTON, R.D. Detection by enzyme immunoassay of *Loxosceles gaucho* venom in necrotic skin lesions caused by spider bites in Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 84, n. 4, p. 608-9, 1990.
- CHAVEZ-OLORTEGUI, C.; AMARAL, D.A.; ROCHAT, H.; DINIZ, C., GRANIER, C. In vivo protection against scorpion toxins by liposomal immunization. **Vaccine**, v. 9, n. 12, p. 907-10, 1991.
- 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**, v. 36, n. 4, 1998.

- CHATZAKI M, HORTA CC, ALMEIDA MO, PEREIRA NB, MENDES TM, DIAS-LOPES C, GUIMARÃES G, MORO L, CHÁVEZ-OLÓRTEGUI C, HORTA MC, KALAPOTHAKIS E. Cutaneous loxoscelism caused by *Loxosceles similis* venom and neutralization capacity of its specific antivenom. **Toxicon**, Jul;60(1):21-30, 2012.
- DA SILVA, P. H. ; DA SILVEIRA, R.B.; APPEL, M.H.; MANGILI, O.C.; GREMSKI, W.; VEIGA, S.S. Brown spiders and loxoscelism. **Toxicon**, v. 44, n. 7, p. 693-709, 2004.
- DA SILVEIRA, R. B.; dos SANTOS FILHO, J. F.; MANGILI, O. C.; VEIGA, S. S.; GREMSKI, W.; NADER, H. B.; DIETRICH, C. P. Identification of proteases in the extract of venom glands from brown spiders. **Toxicon**, v. 40, p. 815-822, 2002.
- DA SILVEIRA RB, WILLE AC, CHAIM OM, APPEL MH, SILVA DT, FRANCO CR, TOMA L, MANGILI OC, GREMSKI W, DIETRICH CP, NADER HB, VEIGA SS. Identification, cloning, expression and functional characterization of an astacin-like metalloprotease toxin from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. **Biochem J**. Sep 1;406(2):355-63. 2007
- DE MOURA, J.; FELICORI, L.; MOREAU, V.; GUIMARÃES, G.; DIAS-LOPES, C.; MOLINA, L.; ALVARENGA, L. M.; FERNANDES, P.; FRÉZARD, F.; RIBEIRO, R. R.; FLEURY, C.; NGUYEN, C.; MOLINA, F.; GRANIER, C.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. Protection against the toxic effects of *Loxosceles intermedia* spider venom elicited by mimotope peptides. **Vaccine**, v. 29, n. 45, p. 7992-8001, 2011.
- DE ALMEIDA, D. M.; FERNANDES-PEDROSA, M. F.; GONÇALVES-DE-ANDRADE, R. M.; MARCELINO, J. R.; GONDO-HIGASHI, H.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L. M.; LEE HO, P.; VAN DEN BERG, C.; TAMBOURGI, D. V. A New Anti-Loxoscelic Serum Produced Against Recombinant Sphingomyelinase D: Result of Preclinical Trials. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 79, n. 3, p. 463-470, 2008.

- DIAS-LOPES, C.; GUIMARÃES, G.; FELICORI, L. FERNANDES, P.; EMERY, L.; KALAPOTHAKIS, E.; NGUYEN, C.; MOLINA, F.; GRANIER, C.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. A protective immune response against lethal, dermonecrotic and hemorrhagic effects of *Loxosceles intermedia* venom elicited by a 27-residue peptide. **Toxicon**, v. 55, n. 2-3 p. 481-487, 2010.
- FEITOSA, L.; GREMSKI, W.; VEIGA, S. S.; ELIAS, M. C. Q. B.; GRANER, E.; MANGILI, O. C.; BRENTANI, R. R. Detection and characterization of metalloproteinases with gelatinolytic, fibronectinolytic and fibrinogenolytic activities in brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. **Toxicon**, v. 36, n. 7, p. 1039-1051, 1998.
- FELICORI, L.; ARAUJO, S. C.; MACHADO DE ÁVILA, R. A.; SANCHEZ, E. F.; GRANIER, C.; KALAPOTHAKIS, E.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. Functional characterization and epitope analysis of a recombinant dermonecrotic protein from *Loxosceles intermedia* spider. **Toxicon**, v. 48, p. 509-519, 2006.
- FELICORI, L.; FERNANDES, P. B.; GIUSTA, M. S.; DUARTE, C. G.; KALAPOTHAKIS, E.; NGUYEN, C.; MOLINA, F.; GRANIER, C.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. An in vivo protective response against toxic effects of the dermonecrotic protein from *Loxosceles intermedia* spider venom elicited by synthetic epitopes. **Vaccine**, v. 27, n. 31, p. 4201-8, 2009.
- FERNANDES-PEDROSA, M. D. F.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I.L.M.; GONÇALVES-DE-ANDRADE, RM.; KOBASHI, L.S.; ALMEIDA, D.D.; HO, P.L.; TAMBOURGI, D.V.. Transcriptome analysis of *Loxosceles laeta* (Araneae, Sicariidae) spider venomous gland using expressed sequence tags. **BMC Genomics**, v. 9, p. 279, 2008.
- FERRER, V.P.; DE MARI, T.L.; GREMSKI, L.H.; TREVISAN-SILVA, D.; DA SILVEIRA, R.B. A Novel Hyaluronidase from Brown Spider (*Loxosceles intermedia*) Venom (Dietrich's Hyaluronidase): From Cloning to Functional Characterization. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 5, : e2206, 2013.
- FIGUEIREDO LF, DIAS-LOPES C, ALVARENGA LM, MENDES TM, MACHADO-DE-ÁVILA RA, MCCORMACK J, MINOZZO JC, KALAPOTHAKIS E, CHÁVEZ-OLÓRTEGUI C. Innovative immunization protocols using chimeric recombinant

protein for the production of polyspecific loxoscelic antivenom in horses. **Toxicon**. Aug;86:59-67. 2014

FURLANETTO, W.B.R.S.; Rosa, R.R.; Saliba, F.; Navas, J. Observação dos efeitos do veneno loxoscélico e avaliação da sua atividade. **Ciência Cultura**, v. 14, p. 242, 1992.

FUTRELL, J. M. Loxoscelism. **Americal Journal of the Medical Sciences**, v. 304, n. 4, p. 261-267, 1992.

GOMEZ, H. e MILLER, M. Intradermal Anti-Loxosceles Fab Fragments Attenuate Dermonecrotic Arachnidism. **Academic Emergency medicine**, v. 6, n. 12, p. 1195-1202, 1999.

GOMEZ, H. F; KRYWKO, D. M. e STOECKER, W. V. A new assay for the detection of *Loxosceles* species (brown recluse) spider venom. **Annals of Emergency Medicine**, v. 39, n. 5, p. 469-74, 2002.

GRACY, J AND CHICHE, L. Structure and Modeling of Knottins, a Promising Molecular Scaffold for Drug Discovery. **Current Pharmaceutical Design** 17(38): 4337–50. 2011.

GREMSKI, L.H., DA SILVEIRA, R.B., CHAIM, O.M., PROBST, C.M., FERRER, V.P., NOWATZKI, J., WEINSCHUTZ, H.C., MADEIRA, H.M., GREMSKI, W., NADER, H.B., SENFF-RIBEIRO, A., AND VEIGA, S.S. A Novel Expression Profile of the *Loxosceles intermedia* Spider Venomous Gland Revealed by Transcriptome Analysis. **Molecular bioSystems**, 6(12): 2403–16. 2010.

GUILHERME, P.; FERNANDES, I.; BARBARO, K. C. Neutralization of dermonecrotic and lethal activities and differences among 32-35 kDa toxins of medically important *Loxosceles* spider venoms in Brazil revealed by monoclonal antibodies. **Toxicon**, v. 39, n. 9, p. 1333-1342, 2001.

GUIMARÃES, G., DIAS-LOPES, C., DUARTE, C. G., FELICORI, L., MACHADO DE AVILA, R. A, FIGUEIREDO, L. F. M., ... CHÁVEZ-OLORTEGUI, C. Biochemical and immunological characteristics of Peruvian *Loxosceles laeta* spider venom: neutralization of its toxic effects by anti-loxoscelic antivenoms. **Toxicon** 70, 90–7.

2013

- HOGAN, C. J.; BARBARO, K. C. e WINKEL, K. Loxoscelism: old obstacles, new directions. **Annals of Emergency Medicine**, v. 44, n. 6, p. 608-624, 2004.
- HORA, VANUSA POUSADA DA. CONSTRUCTION AND EVALUATION OF RLTB/SM14: A recombinant chimera candidate vaccine against schistosomiasis and fascioliasis. 2006. 81 f. dissertação (mestrado em biotecnologia) - universidade federal de pelotas, pelotas, 2006.
- HORTA CC, MAGALHÃES BDE F, OLIVEIRA-MENDES BB, DO CARMO AO, DUARTE CG, FELICORI LF, MACHADO-DE-ÁVILA RA, CHÁVEZ-OLÓRTEGUI C, KALAPOTHAKIS E. Molecular, immunological, and biological characterization of *Tityus serrulatus* venom hyaluronidase: new insights into its role in envenomation. **PLoS Negl Trop Dis**. Feb 13;8(2):e2693. 2014
- ISBISTER, G. K.; FAN, H. W. Spider bite. **Lancet**, v. 378, n. 9808, p. 2039-47, 2011.
- KALAPOTHAKIS, E.; ARAUJO, S. C.; CASTRO, C. S.; MENDES, T. M.; GOMEZ, M. V.; MANGILI, O. C.; GUBERT, I. C.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. Molecular cloning, expression and immunological properties of LiD1, a protein from the dermonecrotic family of *Loxosceles intermedia* spider venom. **Toxicon**, v. 40, n. 12, p. 1691-9, 2002.
- KAESTNER, A. Lehrbuch der Speziellen Zoologie, 3. Aufl., bd. I: Wirbellose. **Fischer Stuttgart** 1969.
- KURPIEWSKI G, CAMPBELL BJ, FORRESTER LJ, BARRETT JT. Alternate complement pathway activation by recluse spider venom. **Int J Tissue React**. Mar;3(1):39-45. 1981
- KURPIEWSKI G, FORRESTER LJ, BARRETT JT, CAMPBELL BJ. Platelet aggregation and sphingomyelinase D activity of a purified toxin from the venom of *Loxosceles reclusa*. **Biochim Biophys Acta**. Dec 18;678(3):467-76. 1981
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-5, 1970.

- LAUNE L, MOLINA F, FERRIERES G, VLLARD S, BÉS 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. **Jornal of Immunol. Method**; 267:53-70. (2002).
- LEE S, LYNCH KR . Brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*) venom phospholipase D (PLD) generates lysophosphatidic acid (LPA). **Biochem J.** Oct 15;391(Pt 2):317-23. 2005
- LUCAS S. Spiders in Brazil. **Toxicon**.;26(9):759-72.1988
- MÁLAQUE, J. E.; CASTRO-VALENCIA, J.E.; CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, F.O.S.; BARBARO, K.C.; FAN, H.W. Clinical and epidemiological features of definitive and presumed loxoscelism in São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina tropical**, v. 44, n. 3, p. 139-143, 2002.
- MÁLAQUE, C.M.S.; SANTORO, M.L.; CARDOSO, J.L.; CONDE, M.R.; NOVAES, C.T.; RISK, J.Y.; FRANÇA, F.O.; DE MEDEIROS, C.R.; FAN, H.W. Clinical picture and laboratorial evaluation in human loxoscelism. **Toxicon** , v. 58, n. 8, p. 664-71, 2011.
- MARIA, W. S.; VELARDE, D.T.; ALVARENGA, L.M.; NGUYEN, C.; VILLARD, S.; GRANIER, C.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. Localization of epitopes in the toxins of *Tityus serrulatus* scorpions and neutralizing potential of therapeutic antivenoms. **Toxicon** , v. 46, n. 2, p. 210-7, 2005.
- MATSUBARA, F.H, GREMSKI, L.H., MEISSNER, G.O., LOPES, E.S.C., GREMSKI, W., SENFF-RIBEIRO, A., CHAIM, O.M., AND VEIGA, S.S. A Novel ICK Peptide from the *Loxosceles intermedia* (brown Spider) Venom Gland: Cloning, Heterologous Expression and Immunological Cross-Reactivity Approaches. **Toxicon** 71: 147–58. 2013
- MENDES, T. M., OLIVEIRA, D., FIGUEIREDO, L. F. M., MACHADO-DE-AVILA, R. A, DUARTE, C. G., DIAS-LOPES, C., ... CHÁVEZ-OLORTEGUI, C. Generation and characterization of a recombinant chimeric protein (rCpLi) consisting of B-cell epitopes of a dermonecrotic protein from *Loxosceles intermedia* spider venom.

Vaccine, 31(25), 2749–55. 2013

MEYER, O. Testing and assessment strategies, including alternative and new approaches. **Toxicol. Letters**, v. 140- 141, p. 21-30, 2003.

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. **American Journal of Emergency Medicine**, v. 18, p. 626-628, 2000.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. 2 Ed. Brasília, DF: Fundação nacional de Saúde, 2001.

PAULI I, MINOZZO JC, DA SILVA PH, CHAIM OM, VEIGA SS. Analysis of therapeutic benefits of antivenin at different time intervals after experimental envenomation in rabbits by venom of the brown spider (*Loxosceles intermedia*). **Toxicon**. May;53(6):660-71. 2009

PINHATI H.M.S. et al. Reações adversas precoces ao soro anti-aracnídico em pacientes picados por *Loxosceles*, Phoneutria e escorpião. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** , v. 32, p. 497-498, 1999.

PLATNICK, N. I. The world spider catalog, version 13.5. Disponível em: <<http://research.amnh.org/iz/spiders/catalog>>. Acesso em: 21 de agosto 2016.

QUEIROZ GP, PESSOA LA, PORTARO FC, FURTADO MDE F, TAMBOURGI DV. Interspecific variation in venom composition and toxicity of Brazilian snakes from Bothrops genus. **Toxicon**. Dec 15;52(8):842-51. . 2008

RAMADA, J. S., BECKER-FINCO, A., MINOZZO, J. C., FELICORI, L. F., MACHADO DE AVILA, R. A., MOLINA, F., ... ALVARENGA, L. M. Synthetic peptides for in vitro evaluation of the neutralizing potency of *Loxosceles* antivenoms. **Toxicon**. 73C, 47–55, 2013

RUSSEL, W. M. S.; BURCH, R. L. The principles of humane experimental technique. London: Universities Federation for Animal Welfare (UFAW), 1992. ISBN: 0900767782. Special Edition. Disponível em: . Acesso em: 14 setembro 2016.

- SAHDEV, S.; KHATTAR, S. K.; SAINI, K. S. Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies. **Mol Cell Biochem**, v. 307, n. 1-2, p. 249-64, Jan 2008.
- SALJOUGHIAN N, TAHERI T, ZAHEDIFARD F, TASLIMI Y, DOUSTDARI F, BOLHASSANI A, *et al.* Development of novel prime-boost strategies Duarte MC *et al.* - New candidate vaccines for visceral leishmaniasis 406 based on a tri-gene fusion recombinant *L. tarentolae* vaccine against experimental murine visceral leishmaniasis. **PLoS Negl Trop Dis** 2013; 7: e2174.
- SANDIDGE, J. S.; HOPWOOD, J. L. Brown recluse spiders : A review of biology, life history and pest management. **Transaction of the Kansas Academy of Science**, v. 108, n. 3/4, p. 99-108, 2005.
- SCHENONE, H.; SAAVEDRA, T.; ROJAS, A.; VILLARROEL, F. Loxoscelismo em Chile: Estudios epidemiológicos, clínicos y experimentales. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 31, n. 6, p. 403-415, 1989.
- 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 21 set. 2013.
- SEZERINO, U.; ZANNIN, M. A clinical and epidemiological study of *Loxosceles* spider envenoming in Santa Catarina, Brazil. **Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene**, n. 92, p. 546-548, 1998.
- TAMBOURGI, D. V.; GONÇALVES-DE-ANDRADE, R. M.; VAN DEN BERG, C. W. Loxoscelism: From basic research to the proposal of new therapies. **Toxicon**, v. 56, n. 7, p. 1113-9, 2010
- TOWBIN, H.; STAEGELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy Sciences USA**, v. 76, n. 9, p. 4350-4, 1979.

- TREVISAN-SILVA, D. Astacin-like metalloproteases are a gene family of toxins present in the venom of different species of the brown spider (genus *Loxosceles*). **Biochimie**, v. 92, n. 1, p. 21-32, 2010.
- VAN MEETEREN LA, FREDERIKS F, GIEPMANS BN, PEDROSA MF, BILLINGTON SJ, JOST BH, TAMBOURGI DV, MOOLENAAR WH. Spider and bacterial sphingomyelinases D target cellular lysophosphatidic acid receptors by hydrolyzing lysophosphatidylcholine. **J Biol Chem** Mar 19;279(12):10833-6. 2004
- VÁZQUEZ, H. Pharmacokinetics in rabbits and anti-sphingomyelinase D neutralizing power of Fab, F(ab')(2), IgG and IgG(T) fragments from hyper immune equine plasma. **International Immunopharmacology**, v. 10, n. 4, p. 447-54, 2010.
- VEIGA SS, DA SILVEIRA RB, DREYFUS JL, HAOACH J, PEREIRA AM, MANGILI OC, GREMSKI W. Identification of high molecular weight serine-proteases in *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. **Toxicon**. Jun;38(6):825-39. 2000
- VETTER, R.S., VISSCHER P.K. Bites and stings of medically important venomous arthropods. **Int J Dermatol** v. 37, n. 7, p. 481-496, 1998.
- VETTER, R. Identifying and misidentifying the brown recluse spider. **Dermatology Online Journal**, 1999.
- VETTER, R.S.; SWANSON, D.L. Of spider and zebras: Publication of inadequately documented loxoscelismo case reports. **Journal of American Academy of Dermatology**, v. 56, p. 1063-4, 2007.
- WHITE, W. J. The use of laboratory animals in toxicologic research. In: HAYES, A. W. **Principles and methods of toxicology**. 4.ed. London: Taylor & Francis, 2001. cap. 16, p. 773-818.
- WORLD SPIDER CATALOG 2016. World spider catalog, version 16. acessado em 06 de setembro de 2016. **Natural History Museum Bern**. disponível em: <http://wsc.nmbe.ch>

YOUNG AR, PINCUS SJ. Comparison of enzymatic activity from three species of necrotising arachnids in Australia: *Loxosceles rufescens*, *Badumna insignis* and *Lampona cylindrata*. **Toxicon**. Feb-Mar;39(2-3):391-400. 2001

ZHANG, Y. . I-TASSER server for protein 3D structure prediction. **BMC Bioinformatics**, 9(40), 1–8. 2008