

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
Instituto de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia

Natália Alves Souza Carvalhais

**AVALIAÇÃO DA POTÊNCIA NEUTRALIZANTE DE ANTIVENENOS  
LOXOSCÉLICOS ATRAVÉS DO USO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES DO  
VENENO DE *Loxosceles sp* E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL IMUNOPROTETOR  
DE UMA PROTEÍNA QUIMÉRICA MULTIEPITÓPICA**

Belo Horizonte  
2018

Natália Alves Souza Carvalhais

**AVALIAÇÃO DA POTÊNCIA NEUTRALIZANTE DE ANTIVENENOS LOXOSCÉLICOS  
ATRAVÉS DO USO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES DO VENENO DE *Loxosceles sp*  
E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL IMUNOPROTETOR DE UMA PROTEÍNA QUIMÉRICA  
MULTIEPITÓPICA**

**Versão final**

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

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Liza Figueiredo Felicori Vilela

Coorientadores: Dr.<sup>a</sup>. Camila Dias Lopes  
Prof. Dr. Carlos Delfin Chavez Olortegui

Belo Horizonte  
2018

043

Carvalhois, Natália Alves Souza.

Avaliação do potencial neutralizante de antivenenos loxoscélicos através do uso de proteínas recombinantes do veneno de *Loxosceles* sp e avaliação do potencial imunoprotetor induzido por uma proteína quimérica multiepitópica derivada deste veneno [manuscrito] / Natália Alves Souza Carvalhois. – 2018.

72 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Liza Figueiredo Felicori Vilela. Coorientadores: Dr.<sup>a</sup>. Camila Dias Lopes; Prof. Dr. Carlos Delfin Chavez Olortegui.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia.

1. Bioquímica e imunologia. 2. Venenos de Aranha. 3. Antivenenos. 4. Proteínas Recombinantes. I. Vilela, Liza Figueiredo Felicori. II. Lopes, Camila Dias. III. Olórtegui, Carlos Delfin Chávez. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. V. Título.

CDU: 577.1



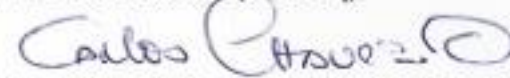
**ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE NATÁLIA ALVES SOUZA CARVALHAIS.** Aos três dias do mês de abril de 2018 às 09:00 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da dissertação de Mestrado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "Avaliação do potencial neutralizante de antivenenos loxoscelicos através do uso de proteínas recombinantes do veneno de *Loxosceles* sp e avaliação do potencial imunoprotetor induzido por uma proteína quimérica multiepitópica derivada deste veneno", requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia, área de concentração: Bioquímica. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Prof. Liza Figueiredo Felicori Vilela, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dra. Maria Elena de Lima Perez Garcia (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dra. Tatiani Uceli Maioli (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Carlos Delfin Chavez Olortegui - Coorientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dra. Camila Dias Lopes - Coorientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dra. Liza Figueiredo Felicori Vilela - Orientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada:

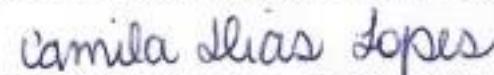
- APROVADA  
 REPROVADA

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 03 de abril de 2018.

  
 Dra. Maria Elena de Lima Perez Garcia (UFMG)

  
 Dra. Tatiani Uceli Maioli (UFMG)

  
 Dr. Carlos Delfin Chavez Olortegui - Coorientador (UFMG)

  
 Dra. Camila Dias Lopes - Coorientadora (UFMG)

  
 Dra. Liza Figueiredo Felicori Vilela - Orientadora (UFMG)

  
 Prof. Liza Figueiredo Vilela  
 Coordenadora do Curso de Pós-Graduação  
 em Bioquímica e Imunologia  
 03/04/2018

## Agradecimentos

A **Deus** pela oportunidade de mergulhar na ciência da vida.

À minha família pelo o suporte em todos os aspectos. Ao meu querido **Túlio**, pelo amor incondicional e paciência eterna. Ao meu pai **Marcos**, pelo ombro amigo e ouvido incansável. À **Bella** e **Dani** pelos conselhos. Às minhas pequenas **Gabi**, **Bia** e **Alice** por tantas vezes me alegrarem e acalmarem. À minha mãe **Marluce**, **Fábio**, tia **Marilza** e vovó **Maria** por me sempre me ouvirem e por tornar minha caminhada mais leve.

Ao programa de **Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia**, pela oportunidade de fazer parte do mesmo.

À coordenação do programa de pós-graduação em Bioquímica e Imunologia pela excelente gestão, e por fazerem de tudo para a melhoria e excelência do curso. Em especial agradeço à **Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Lêda Vieira** pela prontidão em me ajudar quando mais precisei.

À **Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Liza Felicori** pela brilhante orientação ainda que parcialmente à distância. Em momento algum você deixou a desejar. Agradeço também por confiar a mim uma parte deste projeto incrível que visa melhorias nos tratamentos de acidentes com veneno. Foi um prazer participar da construção de um futuro melhor. Finalmente, agradeço pelas discussões sobre o desenvolvimento deste trabalho. Elas fizeram de mim uma pessoa mais crítica e uma cientista melhor.

Ao **Prof. Dr. Carlos Chaves** que aceitou fazer parte desta jornada com sua co-orientação. não somente na discussão do projeto, mas também abrindo as portas do Labimqp para diversos experimentos. Agradeço também a seus alunos por toda a ajuda.

À **Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Camila Lopes** por ter me orientado em diversos momentos durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Ronaldo Nagem** pela receptividade em seu laboratório, e pelas contribuições com a parte estrutural deste trabalho.

À **Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Marília Martins** e sua aluna **Valquíria** por toda a ajuda no que tangeu ao cuidado com os animais. Aprendi muito com vocês.

À **Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Larissa Alvarenga**, ao **Prof. Dr. João Minozzo** e a equipe do CPPI por toda a ajuda na obtenção de material, sem os quais este trabalho não seria possível.

Ao **Orlando** e **Alexandre**, da secretaria da pós-graduação por sempre serem atenciosos, todo o auxílio com as burocracias da pós. Vocês certamente tornaram esta jornada um pouco mais leve.

Aos **técnicos do ICB** por me auxiliarem sempre que necessário, em especial ao **Jamil** e a **Luciana**.

Ao **grupo de Biologia Computacional** pelo convívio leve, pelos bons papos, por toda ajuda e pelas discussões científicas durante esta jornada. Em especial agradeço à **Camila Franco** e **Taciana** que me receberam no laboratório com muito carinho e dispostas a ajudar a todo o momento. À **Michele** pelas muitas discussões e ensinamentos. Ao **Ítalo, Deia e Naiá** por todas as contribuições para este trabalho. E aos Professores **Dr. Lucas Bleicher**, **Dr.<sup>a</sup> Rafaela Salgado** e **Dr. Carlos Salas**.

Aos **membros da banca** por se disporem a avaliar e contribuir para a melhoria deste trabalho.

Às agências de fomento: **CAPES, CNPq** e **FAPEMIG**.

A todos que contribuíram de alguma forma para que este trabalho fosse realizado.

## Resumo

Acidentes com animais peçonhentos são um problema de saúde de pública no Brasil, sendo a aranha-marrom a segunda maior causadora de tais acidentes. O envenenamento acidental causado pela picada da aranha marrom gera efeitos dermonecróticos que podem ser seguidos de manifestações sistêmicas. Ainda que estas manifestações sistêmicas ocorram em uma parcela pequena dos casos, esta pode ser fatal. A produção de antivenenos para o tratamento de tais acidentes é dependente de uma variedade de experimentos animais, desde a extração do veneno das aranhas, à produção do antiveneno em cavalos, e até à avaliação *in vivo* do potencial neutralizante destes antivenenos, que é feita em coelhos. O presente trabalho apresenta tentativas de minimizar e otimizar experimentos com animais na produção de antivenenos com duas abordagens. A primeira se baseia na construção e produção de uma proteína quimérica, a Lil, contendo epitopos imunodominantes, previamente mapeados, da principal proteína do veneno de *Loxosceles*, a Esfingomielinase D. A proteína quimérica Lil contém epitopos encontrados nas Esfingomielinases D das três principais espécies brasileiras. Esta proteína se mostrou capaz de produzir anticorpos com o potencial de neutralizar parcialmente os efeitos tóxicos do veneno de *Loxosceles intermedia*, em um modelo animal. Por esta razão, de modo a reduzir o uso de aranhas e otimizar a vida útil dos cavalos produtores de antiveneno, a proteína Lil se mostrou um candidato promissor para uso em processos de imunização. A segunda abordagem foi a elaboração de um teste *in vitro* para a discriminação de soros com alto e baixo potencial neutralizante. A Smase I de *Loxosceles laeta* se mostrou capaz de discriminar a potência neutralizante dos soros de alta e baixa potência avaliados, em um teste de ELISA. Então, é sugerida a utilização deste teste como uma alternativa aos protocolos *in vivo* que utilizam coelhos.

Palavras-chave: Loxoscelismo, Antivenenos, Potência Neutralizante

## Abstract

Accidents with venomous animals represent a health issue in Brazil, and the brown spider's accidents are pointed out as the second most frequent ones. The accidental envenomation by brown spiders (*Loxosceles sp.*) cause a strong local dermonecrotic effect which can be followed by systemic manifestations, and even though the systemic loxoscelism occurs in a small portion of the cases, it can be fatal. The production of antivenoms for the treatments of such accidents relies on a variety of animal experiments, from the spider venom extraction to the production of antivenom in horses and its *in vivo* neutralizing potency evaluation, which is performed in rabbits. In the present work, there is an attempt to reduce and optimize animal experiments with two different approaches. The first approach relies in the construction and production of a chimeric protein, named Lil, containing immunodominant epitopes that were previously mapped from the main protein of the *Loxosceles* venom, the Sphingomyelinase D. The Lil protein contains epitopes from Sphingomyelinases D of the three main species found in Brazil. The Lil protein was found capable of inducing antibodies with the potential to partially neutralize the toxic effects of *Loxosceles intermedia* venom in an animal model. Therefore, in order to reduce spider usage and to provide a less harmful life to the horses used for immunization we suggest the Lil protein as a potential candidate to replace the venom usage in the antivenom production protocols. The second approach was to elaborate an *in vitro* test for the distinction of high and low potency sera. The *Loxosceles laeta* Smase I was able to correctly diagnose the neutralizing potency of the evaluated sera, in an ELISA test. Thus, we suggest the use of such test as means to discriminate the neutralizing potency of the antiloxosceles sera as an alternative to the *in vivo* protocols relying on rabbits.

Keywords: Loxoscelism, Antivenoms, Neutralizing potency



## Lista de Figuras

Figura 1: Mapa do Brasil mostrando valores absolutos de acidentes com aranha marrom em cada estado .....	16
Figura 2: Morfologia da aranha marrom .....	18
Figura 3: Superfície da SMase D I de <i>L. laeta</i> e da SMase D II de <i>L. intermedia</i> , representando o tamanho da cavidade do sitio catalítico.....	20
Figura 4: Lesões características do Loxoscelismo.....	21
Figura 5: Gene da proteína quimérica Lil .....	29
Figura 6 Identificação dos epitopos para a construção da proteína quimérica Lill nas estruturas das Smases D.....	41
Figura 7: Alinhamento das sequências das Smases D de <i>Loxosceles</i> .....	43
Figura 8: Purificação da proteína quimérica Lil.....	45
Figura 9 : Purificação das Smases D recombinantes.....	46
Figura 10: Atividade Esfingomielinásica das proteínas recombinantes Smase I de <i>L. laeta</i> e LiD1.....	48
Figura 11: Reatividade de diferentes soros contra as proteínas recombinantes Lil, Smase I de <i>L. laeta</i> e LiD1.....	48
Figura 12: Reatividade dos soros de coelho produzidos contra as proteínas recombinantes Lil, Smase I de <i>L. laeta</i> e LiD1.....	50
Figura 13: Reatividade dos soros de coelho produzidos, contra os venenos de <i>Loxosceles</i> .....	51
Figura 14: Atividade esfingomielinásica em função da concentração do veneno de <i>L. intermedia</i> .....	52
Figura 15: Neutralização <i>in vitro</i> da atividade Smase do veneno de <i>L. intermedia</i> após pré-incubação com os soros produzidos.....	53
Figura 16: Desafio de animais vacinados.....	54
Figura 17: Neutralização <i>in vivo</i> dos efeitos tóxicos de 2DMN do veneno de <i>Loxosceles intermedia</i> após 48h de desafio.....	54
Figura 18: Neutralização <i>ex vivo</i> dos efeitos tóxicos de 2DMN do veneno de <i>Loxosceles intermedia</i> após 48h de desafio.....	55
Figura 19: Reatividade do soros antiloxoscelicos produzidos pelo CPPI de alta e baixa potência .....	57

Figura 20: EC50 da concentração dos soros antiloxoscelicos frente a Smase I de <i>L. laeta</i> , 1XX1. ....	59
Figura 21: Neutralização <i>in vitro</i> da atividade Smase do veneno de <i>L. intermedia</i> pelos diversos soros não discriminados (alta e baixa potência) produzidos contra os três venenos de importância médica de <i>Loxosceles</i> pelo CPPI em cavalos .....	60

## Lista de Tabelas

Tabela 1: Casos de acidentes com animais peçonhentos no Brasil .....	15
Tabela 2: Recomendações para o tratamento do loxoscelismo pelo Ministério da Saúde.....	22
Tabela 3: Lista de Soros Antiloxoscelicos de diferentes potências.....	37
Tabela 4: Composição de Aminoácidos pelo PROTPARAM.....	41
Tabela 5: Informações sobre a proteína pelo PROTPARAM .....	42
Tabela 6: Comparação dos resultados observados frente a literatura.....	65

## Lista de Abreviaturas e Siglas

1XX1	SMase D do veneno de <i>L. laeta</i>
3RLH	SMase D do veneno de <i>L. intermedia</i>
BCA	ácido bicinconínico
C-	Soro de baixa potência conhecida
C+	Soro de alta potência conhecida
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CPPI	Centro de Pesquisa e Produção de Imunobiológicos
Da	Dalton
DMN	Dosagem Mínima Necrosante
	Concentração necessária para que 50% do efeito máximo seja obtido
EC50	
	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay - Ensaio
ELISA	imunoenzimático
g	grama
h	horas
HPR	Peroxidase de raiz-forte
IgG	Imunoglobulina G
kDa	quilodaltons
kV	quilovolt
L	Litro
LiD1	Toxina dermonecrótica de <i>L. intermedia</i>
	Anticorpo monoclonal produzido contra a proteína LiD1 de
LiD1mAb16	<i>L. intermedia</i>
	Anticorpo monoclonal produzido contra o veneno de <i>L.</i>
LimAb7	<i>intermedia</i>
M	Molar - m/L
mAU	Mili unidades de absorção
mg	miligrama
mL	mililitro
mM	milimolar

MoALg1	Anticorpo monoclonal produzido contra o veneno de <i>L. gaucho</i>
ms	milissegundos
N	Normalidade - equivalentes g de soluto em 1L
nm	nanômetro
NMBE	Natural History Museum of Bern
OD	Densidade óptica
OMS	Organização Mundial da Saúde
p	Valor P
pb	Pares de base
PBS	Tampão Fosfato Salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDB	Protein Data Bank
PI	Ponto isoelétrico
PPM	Padrão de Peso Molecular
rCpLi	Proteína quimérica contendo epitopos da proteína LiD1 de <i>L. intermedia</i>
rCpLi2	Proteína quimérica contendo epitopos des proteínas do veneno de <i>L. intermedia</i>
RFU	Unidade Relativa de Fluorescência
rLiD1	Toxina dermonecrótica recombinante de <i>L. intermedia</i>
SAA	Soro Antiaracnídico
SALox	Soro Antiloxoscelico
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS
SDS-PAGE	Dodecil sulfato de sódio
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
Smase D	Esfingomielinase D
U/mL	Unidades/mililitro
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
WHO	World Health Organization

## Sumário

Introdução.....	15
1. Animais Peçonhentos.....	15
2. <i>Aranha marrom</i> .....	17
2.1. O veneno .....	18
2.2. Smases D .....	19
3. O Loxoscelismo .....	20
3.1. Clínica .....	20
3.2. Tratamento.....	21
4. Antivenenos.....	22
4.1. Produção de antivenenos.....	23
4.1.1. Proteínas Recombinantes.....	24
4.2. Avaliação da Potência Neutralizante de antivenenos .....	25
Objetivos .....	27
1. Objetivo geral .....	27
2. Objetivos específicos .....	27
Metodologia .....	28
1. Obtenção de proteínas recombinantes .....	28
1.1. Obtenção Smases de <i>L. intermedia</i> e <i>L. laeta</i> .....	28
1.2. Construção da Proteína Quimérica Lil .....	28
1.3. Análises <i>in silico</i> da Proteína Quimérica Lil.....	29
1.5. PCR de Colônia .....	30
1.6. Extração de DNA.....	31
1.7. Sequenciamento.....	31
1.8. Expressão de Proteínas Recombinantes .....	31
1.9. Purificação de Proteínas .....	31
1.10. Estimativa Proteica .....	32
1.11. Eletroforese em Gel de SDS .....	32
1.12. Ensaio Imunoenzimático (ELISA).....	33
1.13. Ensaio de Atividade Esfingomielinásica.....	34
2. Avaliação do potencial imunogênico da proteína Lil .....	34
2.1. Animais .....	34
2.2. Imunização.....	35
2.3. Obtenção de Soro .....	35

2.4.	Ensaio Imunoenzimáticos (ELISA).....	35
2.5.	Desafio de dermonecrose <i>in vivo</i> .....	36
2.6.	Desafio de dermonecrose <i>ex vivo</i> .....	36
2.7.	Ensaio de Neutralização da Atividade Esfingomielinásica .....	36
3.	Distinção da Potência Neutralizante de Diferentes Soros .....	36
3.1.	Soros.....	36
3.2.	Ensaio Imunoenzimático (ELISA) .....	38
3.3.	Análise Estatística .....	38
3.4.	Ensaio de Inibição da Atividade Esfingomielinásica .....	38
	Resultados.....	40
1.	Obtenção de proteínas recombinantes .....	40
1.1.	Construção e Análise <i>in silico</i> da proteína quimérica Lil.....	40
1.2.	Expressão e Purificação.....	44
1.3.	Teste funcional das proteínas recombinantes.....	47
2.	Avaliação do potencial imunogênico .....	49
2.1.	Antigenicidade.....	49
2.2.	Inibição de atividade esfingomielinásica.....	52
2.3.	Inibição do efeito dermonecrótico, hemorrágico e edematogênico <i>in vivo</i> 53	
2.4.	Inibição do efeito dermonecrótico, hemorrágico e edematogênico <i>ex vivo</i> 55	
3.	Distinção da Potência Neutralizante de Soros Antiloxoscélicos.....	56
3.1.	Ensaio imunoenzimáticos (ELISA) .....	56
3.2.	Inibição de atividade esfingomielinásica.....	59
	Discussão .....	61
	Conclusões .....	69
	Perspectivas .....	70
	Referências.....	71

## Introdução

### 1. Animais Peçonhentos

Animais peçonhentos são animais conhecidos por serem produtores de veneno e possuírem alguma adaptação morfológica que permite a inoculação deste veneno em sua presa ou predador. A importância desses animais revolve no potencial de causar acidentes que estes possuem. Tais acidentes podem ser graves com chance inclusive de levar suas vítimas a óbito (Ministério da Saúde, 2018). Dentre os animais peçonhentos registrados no SINAN (Sistema de Informação de Agravos de Notificação) em 2016, estão serpentes, escorpiões, aranhas, lagartas e abelhas. É importante ressaltar que, os dados disponibilizados pelo SINAN de 2014 a 2016 foram atualizados em Janeiro de 2018 e estão sujeitos à revisão. As aranhas são as segundas maiores responsáveis pelo número de acidentes no Brasil (17%), atrás apenas de escorpiões (Tabela 1).

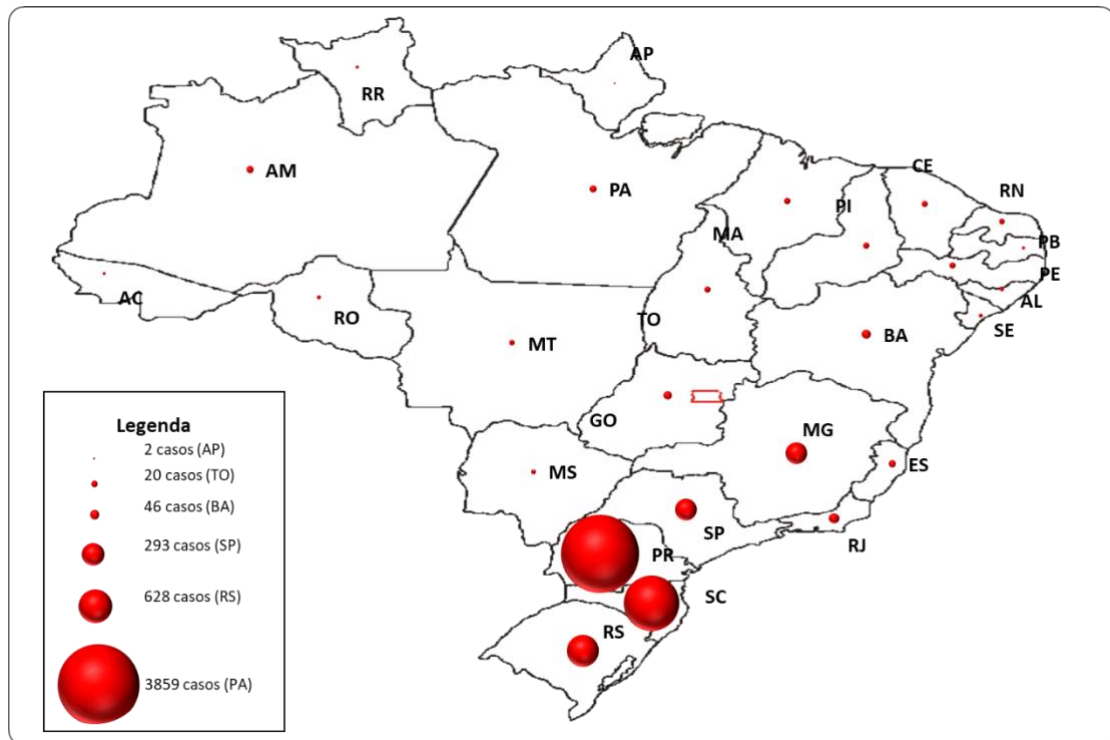
**Tabela 1: Casos de acidentes com animais peçonhentos no Brasil nos últimos 4 anos.**

	2013	2014	2015	2016
<b>Serpente</b>	28.431	27.183	18.741	26.295
<b>Aranha</b>	29.988	27.103	19.495	28.758
<b>Escorpião</b>	79.705	88.246	50.246	90.922
<b>Lagarta</b>	3.755	3.529	2.556	3.771
<b>Abelha</b>	10.864	14.173	8.929	11.982
<b>Outros</b>	10.112	10.979	7.016	7.188
<b>Total</b>	162.855	171.213	106.983	168.916

As aranhas que possuem interesse médico no Brasil são as pertencentes aos gêneros *Loxosceles* (aranha marrom ou aranha violino), *Phoneutria* (aranha armadeira) e *Latrodectus* (viúva negra). A aranha marrom possui destaque dentre as



aranhas de importância médica, principalmente pelo número de acidentes envolvendo as mesmas. Somente em 2016 foram registrados 7.370 casos (35% dos acidentes com aranha) envolvendo *Loxosceles* no Brasil, e destes, a maior parte (86%) ocorreu na região Sul do país (Figura 1) (Ministério da Saúde, 2016).



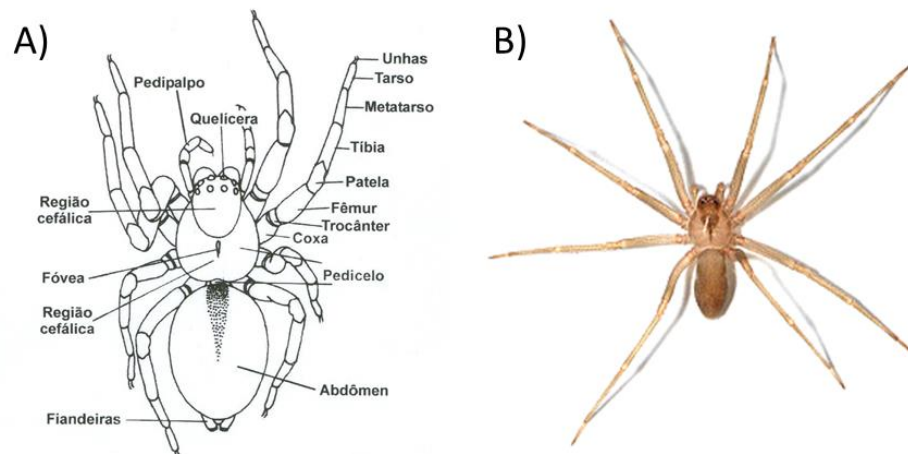
**Figura 1: Mapa do Brasil mostrando valores absolutos de acidentes com aranha marrom em cada estado, em 2016 (Ministério da Saúde, 2016).**

Acidentes causados por animais peçonhentos são em muitos casos subestimados e negligenciados. Ao apresentar tais acidentes como problemas de saúde pública negligenciados, a Organização Mundial de Saúde (OMS/WHO) em uma publicação de 2007, apontou duas causas principais para esta negligência, que seriam a falta de estatísticas adequadas sobre o impacto real que estes acidentes causam, e também ao pouco poder político que a maior parte dos acometidos possui, uma vez que estes acometidos são na maior parte dos casos crianças, e trabalhadores rurais (WHO, 2007). Implantado na década de 1990, o SINAN só incluiu acidentes com animais peçonhentos em 2010, e, embora este passo tenha sido importante para que acidentes com animais peçonhentos recebam mais atenção no Brasil, muito ainda deve ser feito para que este problema comece a ser solucionado, principalmente no que tange à prevenção e tratamento destes acidentes (WHO 2007, 2018).

## 2. *Aranha marrom*

Conhecidas popularmente como aranhas marrom ou aranhas violino, por possuírem coloração marrom e uma mancha escura no cefalotorax (Figura 2B) em forma de violino, as aranhas do gênero *Loxosceles* são classificadas como pertencentes ao filo *Artropoda*, subfilo *Chelicerata*, ordem *Araneae*, subordem *Araneomorpha*, família *Sicariidae*. Em geral o corpo das aranhas é dividido em cefalotórax e abdômen. O cefalotórax apresenta quatro pares de pernas, um par de pedipalpos e um par de quelíceras, anatomia utilizada para inoculação do veneno produzido em glândulas situadas na porção basal da quelícera (Brescovit *et al.*, 2002; Foelix, 1996)(Figura 2A). Ao todo no país já foram identificadas cerca de 13 espécies dentro do gênero *Loxosceles* (NMBE, 2018.), e destas, três apresentam maior importância médica por estarem envolvidas na maioria dos casos, que são *Loxosceles intermedia*, *Loxosceles gaucho* e *Loxosceles laeta*.

Estas aranhas possuem pequeno porte, tendo em média 3cm de perna a perna e podem viver de 3 a 7 anos, atingindo a maturidade sexual logo em seu primeiro ano de vida. As aranhas marrom possuem hábitos noturnos e em seu ambiente nativo se encontram em locais secos e com pouca luminosidade, como embaixo de pedras e em troncos de árvores (Sandidge & Hopwood, 2005). Com a urbanização de seus ambientes naturais, as aranhas são levadas a buscar abrigo e alimento nas cidades e por possuírem hábitos alimentares generalistas, elas possuem um alto potencial de dispersão. Tais aranhas não são agressivas e a maior parte dos acidentes ocorre quando a aranha é pressionada contra a pele da pessoa, no ato de se vestir ou calçar sapatos, por exemplo (Secretaria da Saúde - Paraná, 2018; Sezerino, 1998).



**Figura 2: Morfologia da aranha marrom. A) Organização anatômica externa de membros do clado Aranae. (Brescovit, 2002) B) Imagem por Joseph T. Lapp de uma aranha-marrom.**

### 2.1. O veneno

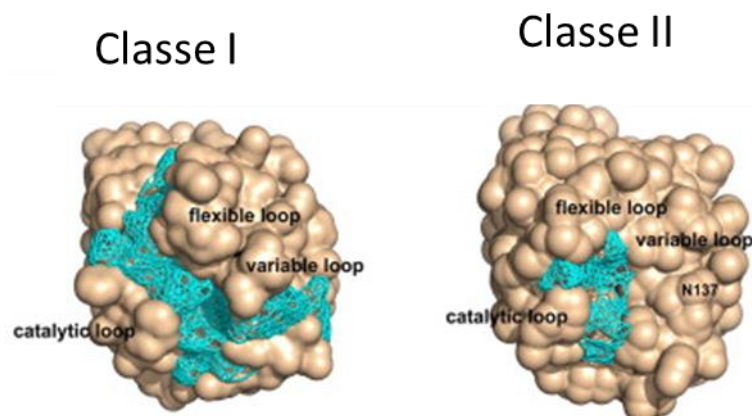
O veneno da aranha marrom é, assim como diversos venenos de origem animal, uma mistura complexa de moléculas capazes de interferir nas funções biológicas da presa na qual este é inoculado. Grande parte das toxinas já encontradas neste veneno são proteínas de baixa massa molecular (de 4 a 40kDa)(Chaves-Moreira *et al.*, 2017). Análises transcriptômicas e proteômicas da glândula de veneno de diferentes espécies de *Loxosceles* destacam as Esfingomielinases D (Smases D) como um dos componentes mais abundantes do veneno da aranha marrom (Gremski *et al.*, 2014; Trevisan-Silva *et al.*, 2017). Fernandes-Pedrosa *et al.*, 2008 fizeram a análise transcriptômica das glândulas de *L. laeta* e viram que proteínas associadas aos efeitos tóxicos do veneno eram 16,4% do total de transcritos. Destas, Smases D eram as proteínas mais abundantes, seguidas por proteínas similares à neurotoxinas, hialuronidases, metaloproteases, lipases, serinoproteases, lectinas do tipo C, inibidores enzimáticos, entre outros. É importante notar que neste estudo, 25% dos transcritos não puderam ser identificados com nenhuma molécula já descrita. Em 2010, Gremski *et al.*, analisando os transcritos de *L. intermedia*, observaram em maior abundância neurotoxinas, seguidas então pelas Smases D e metaloproteases do tipo astacina. Em análises proteômicas mais recentes, no veneno de *L. intermedia* foram encontradas proteínas housekeeping como a enzima convertora de angiotensina, proteína ribossomal 60S, o co-transportador de Na-Pi e a cadeia pesada de miosina. Além destas, foram identificadas representantes de todos os grupos de toxinas, ainda que em baixas quantidades (Trevisan-Silva *et al.*, 2017).

Considerando sua importância na instalação do quadro de envenenamento por *Loxosceles*, as Smases D são o grupo molecular melhor estudado.

## 2.2. Smases D

As Smases D (ou fosfolipases D, conforme o sugerido por Lee & Lynch, 2005) hidrolizam preferencialmente moléculas de esfingomiéline, maior constituinte da camada lipídica das membranas celulares eucarióticas, em ceramida-1-fosfato e colina, podendo também ter por substrato outros lipídios. Embora sua ação nos diferentes tecidos ainda esteja sendo estudada, é sabido que as Smases estão envolvidas em processos de agregação plaquetária, hemólise intravascular e dermonecrose, sinal característico do Loxoscelismo (Corrêa, Okamoto, Gonçalves-de-Andrade, van den Berg, & Tambourgi, 2016; Futrell, 1992; G Kurpiewski, Campbell, Forrester, & Barrett, 1981; Gretchen Kurpiewski, Forrester, Barrett, & Campbell, 1981)

Em 2005, Murakami e colaboradores resolveram a estrutura cristalográfica de uma isoforma de Smase I de *L. laeta* (pdb: 1XX1), mostrando que esta proteína se enovela formando um TIM barril ( $\alpha/\beta$ ) com inserções de folhas  $\beta$  e  $\alpha$  hélices (Murakami *et al.*, 2005). Em 2011, Giuseppe e colaboradores resolveram a estrutura da Smase D de *L. intermedia*, onde foi observada a presença de uma ponte dissulfeto adicional unindo os loops catalítico e flexível, o que possivelmente conferiria menor atividade tóxica em relação à Smase I de *L. laeta*, e com isto foi proposta uma classificação para as Smases D, onde as Smases do tipo I possuiriam uma cavidade catalítica maior, como a Smase I de *L. laeta*, enquanto as Smases do tipo II possuiriam uma cavidade catalítica menor, como a Smase D de *L. intermedia* (Figura 3)(Giuseppe *et al.*, 2011).



**Figura 3: Superfície da SMase D I de *L. laeta* e da SMase D II de *L. intermedia*, representando o tamanho da cavidade do sitio catalítico. Em bege a superfície das SMases D, em azul a cavidade do sitio catalítico. Adaptado de Giuseppe, 2011.**

As Smases D de *Loxosceles* isoladas do restante do veneno são capazes de causar os principais efeitos do envenenamento (Forrester *et al.*, 1978). E uma vez que estas enzimas possuem um papel tão importante no quadro de envenenamento, este é o grupo molecular melhor caracterizado, dentre as moléculas encontradas no veneno de *Loxosceles*. Estudos mostraram que anticorpos produzidos por pacientes acidentados com o veneno de *Loxosceles* reconheciam as Smases D do veneno, e estas moléculas foram apontadas como altamente imunogênicas (Barbaro *et al.*, 1992; Barbaro *et al.*, 1994)

Estas moléculas foram se destacando por apresentarem grande potencial no desenvolvimento de vacinas e de metodologias de diagnóstico do loxoscelismo (Araujo *et al.*, 2003; de Almeida *et al.*, 2008; L Felicori *et al.*, 2006; Ramada *et al.*, 2013). Estudos com Smases D recombinantes e peptídeos oriundos destas, mostraram que anticorpos produzidos contra estas moléculas foram capazes de proteger contra os sintomas clínicos do envenenamento causado por *Loxosceles* em coelhos (Dias-Lopes *et al.*, 2010; Liza Felicori *et al.*, 2009), camundongos (Felicori *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2016) e cavalos (Figueiredo *et al.*, 2014).

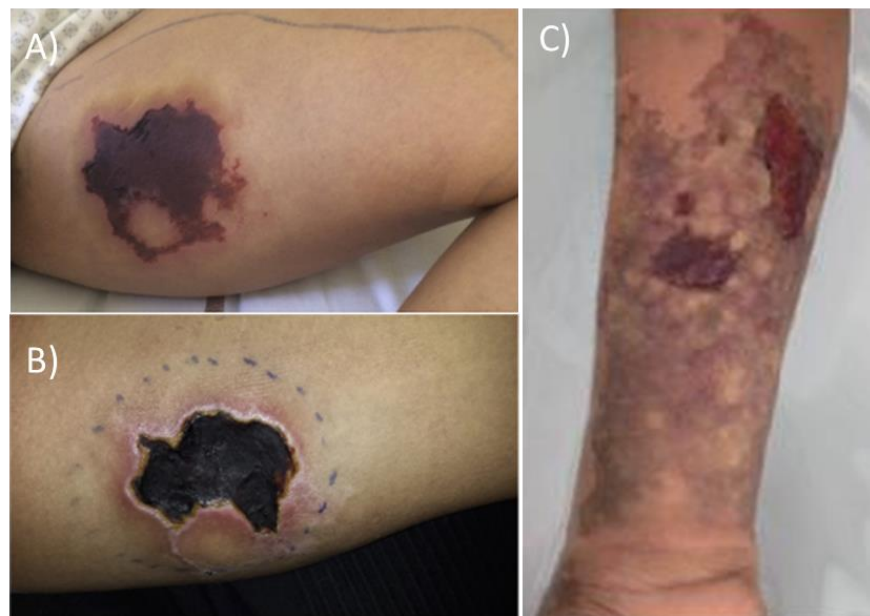
### **3. O Loxoscelismo**

#### **3.1. Clínica**

É chamado de loxoscelismo o quadro clínico resultante do envenenamento causado por acidentes com aranhas do gênero *Loxosceles*. O loxoscelismo pode apresentar duas formas clínicas a forma cutânea e viscerocutânea (Figura 4A e B). A forma cutânea, que é a mais comum (cerca de 90 %) e também a menos grave, é caracterizada por uma lesão dermonecrotica no local da picada que evolui de 8-24h após a picada para necrose e ulceração. Após cerca de uma semana do acidente, a necrose fica bem delimitada e ocorre a formação de uma escara que pode soltar e levar então semanas para cicatrização. Em alguns casos, intervenções cirúrgicas são necessárias para esta cicatrização. Nos primeiros dias após a picada, a forma cutânea pode estar associada também a sintomas sistêmicos inespecíficos como prurido e

erupção cutânea generalizados, dor de cabeça, náusea, vômito e febre baixa (Boissiere *et al.*, 2016; Isbister & Fan, 2011; Schenone *et al.*, 1989)

Em casos mais raros, pode haver o desenvolvimento do loxoscelismo víscero-cutâneo que envolve efeitos sistêmicos, dentre os quais se destacam distúrbios da hemostase e a falência renal aguda (Figura 4C). Esta forma é menos comum e é acompanhada por altas taxas de morbidade. A frequência desta forma varia de acordo com a espécie de *Loxosceles* envolvida no acidente. Os sintomas sistêmicos incluem febre, calafrios, vômito, náusea, erupções cutâneas, cefaléia e icterícia. (Futrell, 1992; Harz-Fresno, Manterola, Ruiz, & Abad, 2015; Hubbard & James, 2011; Isbister & Fan, 2011; Malaque *et al.*, 2011; Málaque *et al.*, 2002; Schenone *et al.*, 1989; Sezerino *et al.*, 1998.; Wright *et al.*, 1997).



**Figura 4:** Lesões características do Loxoscelismo. A e B) Loxoscelismo cutâneo 4 e 20 dias após o acidente com *Loxosceles*, respectivamente. Adaptado de Boissierre, 2016. C) Loxoscelismo víscero-cutâneo. Adaptado de Harz-Fresno, 2015.

### 3.2. Tratamento

Uma variedade de tratamentos para acidentes loxoscelicos vem sendo descritos na literatura. Os mais comuns dentre os tratamentos propostos incluem como tratamento genérico a utilização de antibióticos e antissépticos para não piorar o estado da lesão, tratamento com anti-histamínicos, corticoesteróides e analgésicos, e como tratamento específico é proposta a administração de antivenenos. De modo geral, a maioria dos tratamentos propostos têm sua eficácia em função do tempo

decorrido desde o acidente, e há poucos ensaios clínicos comprovando a eficácia destes. O Ministério da Saúde recomenda o uso de antivenenos quando há identificação de hemólise no quadro viscero-cutâneo, ou quando a forma cutânea é identificada nos primeiros dois dias após o acidente. O Ministério da Saúde recomenda uma quantidade específica de ampolas de soro antiveneno para casos moderados e graves, conforme mostra a Tabela 2.

**Tabela 2: Recomendações para o tratamento do loxoscelismo pelo Ministério da Saúde (Adaptado de Ministério da Saúde, 2013).**

Acidente	Soro	Gravidade	Nº de Ampolas
		Leve: aranha identificada, lesão incharacterística, ausência de comprometimento sistêmico.	0
Loxoscelismo	Antiloxoscelico (SALox) ou antiaracnídico (SAA)	Moderada: independentemente da identificação do agente, lesão sugestiva ou característica, manifestações sistêmicas inespecíficas (enxantem, febre), ausência de hemólise	5*
		Grave: lesão característica, manifestações clínicas e/ou evidências de hemólise intravascular	10*

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

#### 4. Antivenenos

Os antivenenos disponíveis para o tratamento do loxoscelismo no Brasil, são aqueles que utilizam anticorpos policlonais de cavalos hiperimunizados com os venenos. Os soros comerciais disponíveis para o tratamento do loxoscelismo são o soro antiaracnídico (SAA), produzido pelo Instituto Butantan, e o soro Antiloxoscelico (SALox) produzido pelo Centro de Produção e Pesquisa em Imunobiológicos do Estado do Paraná (CPPI). O SAA é produzido a partir de uma mistura dos venenos de *Loxosceles gaucho*, *Phoneutria nigriventer* e do escorpião *Tityus serrulatus*. O

SALox é produzido contra o veneno das três espécies de destaque médico no Brasil: *Loxosceles gaucho*, *intermedia* e *laeta*.

Ainda em estágio de pesquisas clínicas, temos também tentativas de tratamento a partir da utilização de anticorpos monoclonais, como o MoALg1, LimAb7 e LiD1mAb16. Estes apresentaram resultados satisfatórios no que tange à neutralização e reconhecimento do veneno. O MoALg1 neutraliza a atividade dermonecrótica do veneno de *L. gaucho*, enquanto o LimAb7 neutraliza a atividade do veneno de *L. Intermedia*. Finalmente o LiD1mAb16 foi capaz de reconhecer o veneno das 3 espécies de *Loxosceles* de importância médica no Brasil (Alvarenga et al., 2003; Dias-Lopes et al., 2014a; Guilherme, Fernandes, & Barbaro, 2001).

#### **4.1. Produção de antivenenos**

A hiperimunização dos cavalos é realizada através do inóculo de venenos totais. Contudo, uma vez que venenos são misturas complexas e as proporções de seus compostos podem variar entre indivíduos de uma mesma espécie, cada ciclo de imunização pode levar a uma resposta diferente, podendo resultar em um antiveneno sem características uniformes e com potencial neutralizante insatisfatório (W S Maria et al., 2005). As proteínas mais tóxicas não necessariamente serão as mais imunogênicas, e muitos dos compostos encontrados nos venenos não são necessários para a produção de um antiveneno com alto potencial neutralizante.

Embora a dosagem dos venenos inoculados nos cavalos não cause letalidade, os efeitos tóxicos são suficientes para reduzir não somente a qualidade de vida do animal, mas também seu tempo de vida. Além disso, a hiperimunização de um animal carece de grandes quantidades de veneno. Para a produção do soro, cada animal (cavalo) recebe cerca de 5-10 aplicações de 5 mg de veneno. Considerando que cada aranha libera, em média 50µg de veneno, são necessárias cerca de 1000 aranhas para a imunização completa de um único animal. Este fator é limitante para produção de soro, uma vez que as aranhas do gênero *Loxosceles* possuem pequenas glândulas de veneno com produção limitada (Duarte et al., 2015).

Desta forma, a produção de antivenenos é um fator limitante no que diz respeito ao tratamento do loxoscelismo.



#### 4.1.1. Proteínas Recombinantes

A utilização de proteínas quiméricas baseadas em Smases D para produção de soros anti loxoscélicos, tem trazido perspectivas animadoras. Araujo e colaboradores em 2003 e Felicori e colaboradores em 2006, utilizaram de Smases recombinantes para imunização de coelhos e observaram uma proteção da letalidade de entre 75% e 100% para até 2,5 DL50 em camundongos (Araujo *et al.*, 2003). Em seguida, o grupo procurou analisar a neutralização atividade dermonecrótica a partir de soros produzidos em coelhos e, embora a dermonecrose tenha sido neutralizada em 82%, a neutralização dos outros sintomas foi insatisfatória (Felicori *et al.*, 2006). Um dos questionamentos levantados a cerca destes trabalhos é principalmente relativo à toxicidade das Smases utilizadas neste processo de imunização, que possuem efeitos semelhantes aos do veneno completo.

Trabalhos utilizando peptídeos compostos por epitopos de Smases de *Loxosceles* se mostraram promissores, uma vez que estes apresentaram neutralização parcial dos sintomas de envenenamento (de Moura *et al.*, 2011; Dias-Lopes *et al.*, 2010; Felicori *et al.*, 2009). Estes dados serviram por base para os primeiros trabalhos com construções de proteínas quiméricas multiepítópicas para fins de imunoproteção. Mendes *et al.*, 2013 construíram uma proteína quimérica (rCpLi) contendo três epítopos da LiD1, principal proteína dermonecrótica do veneno de *L. intermedia*, e o soro produzido contra esta proteína foi capaz de inibir os principais efeitos biológicos causados por LiD1, com inibição de 95% da dermonecrose, 75% da hemorragia e 10% do edema, tais soros reconheceram dois dos venenos de importância médica, *L. intermedia* e *L. gaucho* (Mendes *et al.*, 2013). Na sequência, Figueiredo *et al.*, em 2014 utilizou a rCpLi substituindo parcialmente o veneno, na imunização de três cavalos. Esta metodologia resultou em anticorpos com a mesma reatividade em ELISA que o antiveneno tradicional, além de ter demonstrado um potencial neutralizante satisfatório dos venenos de *L. intermedia* e *L. laeta* (Figueiredo *et al.*, 2014).

Em 2011, de Moura e colaboradores sintetizaram um mimotopo (peptídeo mimético de um epitopo) que interage com o anticorpo monoclonal LiMab7, que neutraliza 100% dos efeitos tóxicos da LiD1. Este peptídeo foi usado como imunógenos em coelhos. Os anticorpos produzidos pelos animais foram capazes de

neutralizar parte dos efeitos biológicos causados pelo veneno de *L. intermedia* (85% da dermonecrose, 80% da hemorragia e somente 25% do edema).

Sendo assim, o presente trabalho almeja o desenvolvimento e a validação de uma proteína quimérica, a Lil, desenhada a partir de epitopos imunodominantes de Smases D (Felicori *et al.*, 2009; Oliveira *et al.*, 2016; Ramada *et al.*, 2013) de diferentes espécies de aranha-marrom, como imunógeno para a produção de anticorpos policlonais que neutralizem os efeitos dos venenos de *Loxosceles*.

#### **4.2. Avaliação da Potência Neutralizante de antivenenos**

Uma etapa fundamental no desenvolvimento de antivenenos é a de testes pré-clínicos (Theakston, Warrell, & Griffiths, 2003), nos quais tem-se utilizado métodos *in vivo* para a determinação do potencial neutralizante dos soros obtidos (Braz *et al.*, 1999). Tais metodologias utilizam coelhos como modelo animal, onde a neutralização da dermonecrose é observada. Anualmente são utilizados cerca de 400 coelhos exclusivamente para este fim, somente no Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos (CPPI). A atividade dermonecrótica de um veneno é determinada conforme o descrito por Furlanetto, e tem por definição a menor concentração veneno que induz uma área necrótica com 1cm de diâmetro quadrado, sendo expressa como a menor dose necrosante (MDN), enquanto o teste para potencial neutralizante da atividade dermonecrótica de um soro antiloxoscélico, conforme o também determinado por Furlanetto em 1961, é determinada como a menor diluição de um soro antiloxoscélico que neutraliza 100% dos efeitos de uma MDN (Furlanetto, 1961).

Ramada e colaboradores 2013 desenvolveram um teste baseado em peptídeos na tentativa de discriminar soros antiloxoscélicos com diferentes potenciais neutralizantes. O teste no formato de ELISA indireto utilizou por antígeno *pools* de venenos de três espécies de *Loxosceles*, o veneno de *L. intermedia* e também três diferentes epitopos sintéticos de Smases D do gênero, mapeados pela técnica SPOT síntese. Um dos peptídeos avaliados apresentou um potencial maior de discriminação entre os demais, contudo, a quantidade de soros avaliados foi insuficiente para avaliar a robustez do teste. Além disto, os valores de absorvância obtidos contra os peptídeos foram muito baixos (Abaixo de 1) e por esta razão, estes dados são questionáveis.

Com isto, permanece o desafio de desenvolvimento de um teste discriminante para o potencial de neutralização. Para tais fins uma proteína contendo epitopos imunodominantes não seria interessante apenas para a produção de antivenenos, mas também no desenvolvimento de um teste discriminatório para diferentes potenciais neutralizantes. Tendo em vista a necessidade de um teste que faça discriminação do potencial neutralizante de antivenenos loxoscelicos e o aparente sucesso dos testes preliminares utilizando o método de ELISA, este trabalho também visa o desenvolvimento de um ensaio *in vitro* baseado em ELISA para discriminação de soros antiloxoscelicos de alto e baixo potencial neutralizante, utilizando proteínas recombinantes como antígeno.

## Objetivos

### 1. Objetivo geral

Produção e caracterização de uma proteína quimérica contendo epítopos imunodominantes de Smases D, de diferentes espécies de *Loxosceles* e verificação de sua atividade imunoprotetora, bem como antigênica para um possível teste *in vitro* de discriminação de antivenenos com diferentes potenciais neutralizantes.

### 2. Objetivos específicos

- a) Produzir de forma recombinante duas Smases D representativa dos venenos das aranhas *Loxosceles intermedia* e *Loxosceles laeta*;
- b) Produzir uma proteína quimérica com epítopos provenientes das smases D das aranhas *Loxosceles intermedia* e *Loxosceles laeta*;
- c) Avaliar o potencial imunogênico da proteína quimérica como possível substituto do veneno completo para obtenção de soro neutralizante dos efeitos dos venenos de *Loxosceles* de importância médica;
- d) Avaliar o potencial discriminatório da proteína quimérica e outras proteínas recombinantes de smases D de *Loxosceles*, de soros de alto e baixo potencial neutralizante.

## Metodologia

### 1. Obtenção de proteínas recombinantes

#### 1.1. Obtenção Smases de *L. intermedia* e *L. laeta*

Para a obtenção das smases de *L. intermedia* e *L. laeta* de forma recombinante, células de *Escherichia coli* transformadas previamente com os plasmídios para expressão destas proteínas foram utilizados. Ambas as proteínas foram adquiridas em vetores PET28-tev, diferentemente do descrito originalmente (Fernandes Pedrosa *et al.*, 2002 para a Smase I de *L. laeta*; Kalapothakis *et al.*, 2002 para a LiD1). E então transformadas em *E. coli*, cepa BL21 DE3 para a expressão da Smase D de *L. intermedia* (LiD1), enquanto para a expressão da Smase I de *L. laeta* (código pdb: 1XX1), foi utilizada a cepa C43 (DE3). Em ambos os casos as células foram cultivadas em meio 2XYT atingiram a densidade óptica (OD) de 0,4 e então tiveram sua expressão induzida por 4h, sob agitação de 250rpm à 37°C, a partir da adição de 500µL de Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) 1M.

#### 1.2. Construção da Proteína Quimérica Lil

A proteína foi desenhada contendo quatro epitopos imunodominantes das Smases de *Loxosceles intermedia*, *Loxosceles laeta* e *Loxosceles gaucho*. Três dos epitopos utilizados foram selecionados através da técnica SPOT síntese nos trabalhos de Felicori, 2006, Ramada, 2013 e Oliveira 2016, o quarto epitopo é correspondente a um dos epitopos imunodominantes da Smase D de *Loxosceles intermedia*, em *Loxosceles laeta*. A sequência de nucleotídeos foi inserida no vetor PET28tev, entre os sítios de restrição NdeI e XhoI, e possui 333pb ( ).

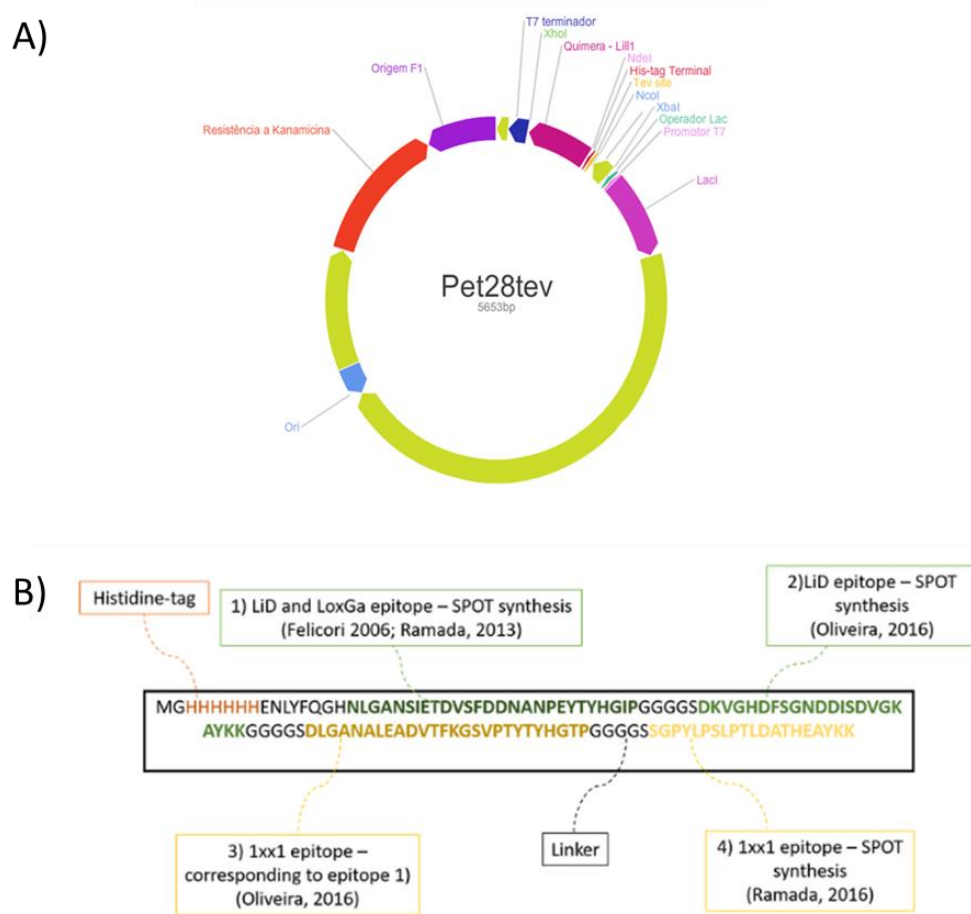


Figura 5: Gene da proteína quimérica Lil. A) Plasmídio PET28tev contendo a sequência da proteína Lil. B) Representação da sequência da proteína Lil com destaque para os epitopos imunodominantes selecionados (em tons de verde e amarelo), os linkers de glicina e serina (em preto), e cauda de histidina em (laranja).

### 1.3. Análises *in silico* da Proteína Quimérica Lil

A sequência da proteína, contendo a cauda de histidina foi avaliada pelo ExPASy ProtParam, de modo a se obter informações genéricas sobre a proteína, tais como tamanho, hidrofobicidade, etc. Os alinhamentos foram realizados com o auxílio da ferramenta ClustalW Ômega e as imagens geradas com o auxílio do JalView. Para o alinhamento de Smases, as sequências de Esfingomielinasas D de *Loxosceles* foram obtidas do banco de dados Uniprot utilizando-se o Uniref 90 tendo por palavras-chave os termos “Sphingomyelinase D” e “Phospholipase D”.

### 1.4. Transformação da Lil em *E. coli* BL21 e DH5 $\alpha$

Para este trabalho foram selecionadas as linhagens de *E. coli* BL21 e DH5 $\alpha$ . Os plasmídios foram transformados em células eletrocompetentes, sendo DH5 $\alpha$  para estoque de plasmídio, e a BL21 para expressão das proteínas. 50 $\mu$ L de células eletrocompetentes preparadas de acordo com o descrito por NEB, 2018 foram descongeladas em gelo e então 5ng de plasmídio foram adicionados. A mistura foi transferida para a cubeta de eletroporação e então submetida a um pulso de 2,5kV por 5ms. As células foram incubadas sob agitação em meio SOC à 37°C por 1h e então plaqueadas em LB ágar contendo o Canamicina 50mg/mL. As placas foram incubadas a 37°C overnight e então colônias foram selecionadas para verificação de presença do plasmídio contendo o gene de interesse.

### **1.5. PCR de Colônia**

Para identificação da sequência de interesse nas células transformadas foi realizada uma amplificação pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando um par de iniciadores para o Promotor e Terminador T7. As reações foram realizadas contendo 2  $\mu$ L de solução tampão 10x, (Tris-HCl 50mM pH 8,3, KCl 50mM), 2,0 $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> a 2mM, 1,0 $\mu$ L de dNTPs a 10mM, 1,4 unidades da enzima Taq DNA polimerase (Phoneutria), 15 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador e uma raspagem da colônia transformada em um volume final de 20 $\mu$ L que foi ajustado a partir da adição complementar de água ultrapura. A amplificação consistiu em 5 minutos à 96°C, e então 35 ciclos de 96°C por 45 segundos, seguido por 30 segundos à 50°C e 1 minuto à 72°C. Após o término dos ciclos as amostras foram submetidas à 72°C por 7 minutos.

Para analisar os produtos de PCR, 2 $\mu$ L de tampão de amostra (Tris 10mM, EDTA 10mM, azul de bromofenol 0,005% e glicerol 10) foram acrescentados a 10 $\mu$ L da amostra e em seguida submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2% em uma diferença de potencial de 110V e posteriormente corados em solução de Brometo de Etídio por 10 minutos. Um marcador de massa 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen) foi utilizado e a corrida realizada em tampão Tris EDTA (TAE) 1X. Para visualizar o resultado, o gel foi exposto à luz ultravioleta em um transluminador. As sequências alvo amplificadas deveriam apresentar de 500 (Para a Lil) a 800(Para as Smases) pb.

## 1.6. Extração de DNA

As células transformadas foram cultivadas overnight a 37°C sob agitação em volumes de 4-10mL. A extração dos plasmídios foi realizada com o auxílio do kit Nucleospin Plasmid Miniprep (Macherey & Nagel) de acordo com as recomendações do fabricante. Após a extração dos plasmídios, as amostras tiveram seu material quantificado por espectrofotometria no NanoDrop™ (Thermo Scientific).

## 1.7. Sequenciamento

Para o sequenciamento 100ng de DNA plasmidial foram misturados em 10pmol de cada iniciador separadamente, em um volume final de 7,5µL. Estas soluções foram enviadas à empresa Myleus, para sequenciamento de Sanger.

## 1.8. Expressão de Proteínas Recombinantes

Cada uma das três proteínas foi expressa em 1L de meio LB ágar contendo 1mL de Canamicina 50mg/mL. O meio 2XYT contendo as células e o antibiótico foi incubado sob agitação de 250 rpm até atingir a OD 0,4 quando então foram adicionados 500 µL de IPTG 1M para dar início à expressão. Alíquotas de células foram coletadas no tempo zero e após 4h de expressão. Após 4h de expressão os meios foram centrifugados à 4°C, 10000G por 10 minutos e os *pellets* congelados à -80°C.

## 1.9. Purificação de Proteínas

Os *pellets* foram ressuspensos em 40mL de Tampão A (Tris 50mM, NaCl 300mM, MgSO<sub>4</sub> 5mM, Imidazol 20mM, PMSF 1mM) e então tratados por choque térmico 3 vezes antes de serem sonificados. A sonificação foi feita com 3 ciclos contendo 30 segundos de pulso e 30 segundos de intervalo. As amostras foram então centrifugadas à 10000G, 4°C por 30 minutos. As frações solúveis e insolúveis foram separadas e submetidas à eletroforese em gel de SDS para conferência das proteínas nas frações solúveis, antes de serem submetidas à cromatografia.

A purificação de proteína da fração solúvel foi conduzida com o auxílio do AKTA Püre (GE Lifescience), onde foi feita cromatografia de afinidade com a coluna HiTrap HP 5mL (GE Lifescience), seguida pela Gel Filtração, com a coluna HiLoad Superdex



16 600 (GE Lifescience). Para a cromatografia de afinidade, a coluna foi equilibrada com Tampão de Equilíbrio (50mM Tris-HCl, 0,15 M NaCl, 20mM MgSO<sub>4</sub>, pH 7.2), a amostra foi aplicada e, em seguida, a coluna que foi lavada com 4 volumes de coluna de Tampão de Equilíbrio. As proteínas foram eluídas em um gradiente de Tampão de Eluição (50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 500mM Imidazol, 20 mM MgSO<sub>4</sub>, 1 mM PMSF, pH 7,5) a um fluxo de 2,5 mL/min. As frações contendo a proteína-his foram coletadas e para a troca de tampão, foram então submetidas à coluna de gel filtração HiLoad Superdex 16 600 e eluída em tampão de estoque (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 50 mM NaCl, 5 mM MgSO<sub>4</sub>, 1 mM PMSF). A absorbância das frações obtidas foi monitorada a 280 nm. As frações contendo proteína foram analisadas por SDS-PAGE para verificar sua massa e pureza.

#### **1.10. Estimativa Proteica**

Foi feita a estimativa da concentração de proteínas purificadas através do Kit Thermo Scientific™ Pierce™ BCA Protein Assay, que é uma formulação baseada em bicinconinico (BCA) para a detecção e quantificação de proteína total. O produto desta reação é formado pela quelação de duas moléculas de BCA com um íon cuproso e este complexo exibe então forte absorbância a 562nm, que é linear com o aumento de concentração proteica.

As recomendações do fabricante foram acatadas e então microplacas de 96 poços transparentes e de fundo chatas foram utilizadas. Nelas um reagente de trabalho foi misturado às amostras diluídas em água filtrada a 0,22mm e então incubados à 37°C ao abrigo de luz por 30 minutos. Foi então realizada a leitura da absorbância no comprimento de 562nm no equipamento Varioskan (Thermo Fisher Scientific).

#### **1.11. Eletroforese em Gel de SDS**

Para a avaliação do peso molecular das proteínas purificadas, foram utilizados géis de SDS-PAGE nas concentrações de 15% (Smases D) e 20% (Lil) de poliacrilamida e 10 % de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS). As amostras foram preparadas utilizando o tampão de amostra em condições redutoras (Tris-HCl 0,5 mol/l, pH 6.8, glicerol 10%, SDS 10% (m/v) e azul de bromofenol 0,1% (m/v), 5,0% β-mercapto-etanol) e fervidas por 10 minutos. As corridas de eletroforese foram realizadas utilizando o sistema eletroforese vertical (CVS10 OmniPage Cleaver Scientific Ltd) por 2 horas a 150V.

Para a visualização das bandas proteicas, o gel foi transferido para solução corante (50% metanol; 10% ácido acético e 0,1% do corante Azul de Coomassie brilhante R250 - Vetec®) onde corou *overnight*. Após a coloração do gel, a solução corante foi substituída pela solução descorante (30% etanol; 10% ácido acético) e o gel deixado sob agitação até obter a descoloração adequada para visualização dos perfis proteicos. Foi utilizado o padrão de peso molecular Precision Plus Protein™ Dual Color Standards da BioRad.

### **1.12. Ensaio Imunoenzimático (ELISA)**

Foi realizado um ELISA utilizando 0,5µg de cada proteína recombinante, como antígeno, de modo a verificar se as mesmas estariam sendo reconhecidas corretamente. As proteínas purificadas foram utilizadas como antígeno e então 0,5 µg destas foram incubados *overnight* à 4°C em Tampão de Sensibilização (Carbonato/Bicarbonato 100mM). Os poços foram lavados com um tampão de lavagem (PBS-tween 20 0,01%) e então bloqueados com 3% Leite em pó (Molico - Nestlé) em Tampão PBS 1x (Tampão fosfato-salino), por 1h à 37°C. Após o bloqueio, foram adicionados 100µL de soro antiloxoscelico de cavalos imunizados contra venenos totais das espécies de importância médica no Brasil (SALox) 1:10000, soros de camundongo anti-LiD1 (1:300000) que reconhecem os epitopos da proteína quimérica Lil, soros de coelho anti-rCpL1 e 2 (1:300) que possuem epitopos em comum com a proteína quimérica Lil, e por fim 0,1 µg do anticorpo monoclonal mAb16, produzido contra a LiD1. Os soros foram incubados por 1h a 37°C com o veneno, e então, após mais uma lavagem foram adicionados os devidos conjugados nas seguintes diluições: Conjugado anti-anticorpos de cavalo conjugado com a enzima peroxidase na diluição 1:6000, anti-anticorpos de camundongo conjugado com a enzima peroxidase na diluição 1:1000 e anti-anticorpos de coelho conjugado com a enzima peroxidase na diluição 1:5000. Todos os anticorpos foram diluídos em PBS-tween 0,5% com Caseína 0,1%. Os conjugados foram revelados em OPD 0,4mg/mL por 30 minutos ao abrigo de luz, então as reações foram interrompidas com 25µL de ácido sulfúrico 2N. Entre todas as etapas, as placas foram lavadas 3x com PBS-tween 0,01%.

### 1.13. Ensaio de Atividade Esfingomielinásica

Foi realizado um ensaio de atividade esfingomielinásica através do kit Amplex Red Sphingomyelinase Assay (Thermo Fischer Scientific). A atividade esfingomielinase é monitorada indiretamente utilizando 10-acetyl- 3,7-dihydroxyphenoxazine (Amplex® Red).

A atividade de esfingomielinase das proteínas recombinantes (5µg de LiD1 e Smase I de *L. laeta*) foi determinada com o auxílio do Amplex® Red sphingomyelinase assay kit, onde a atividade esfingomielinase é monitorada indiretamente utilizando o reagente 10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine (Amplex® Red), que é um fluoróforo sensível a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na presença de HPR (Peroxidase de raiz-forte, *A Armoracia rusticana*) de acordo com as recomendações do fabricante. Os ensaios foram realizados em microplaca de 96 poços pretas e de fundo chato e a fluorescência foi medida utilizando o equipamento Varioskan (Thermo Fishe Scientific). Em cada poço da microplaca foram adicionados 100 µL de amostra completada com tampão de reação (0,5M Tris-HCl, 50mM MgCl<sub>2</sub>, pH7,4) e mais 100 µL do tampão de trabalho (Amplex® Red 10mM, HPR 200U/mL, Colina Oxidase 20U/mL, Fosfatase Alcalina 400U/mL, Esfingomielina 5mM e q.s.p. tampão de reação). Em seguida, a placa foi incubada a 37°C durante 30 minutos ao abrigo de luz e logo após, foi realizada a leitura na faixa de comprimento de onda de 590/35 nm. Para excitação do fluoróforo foi utilizado o comprimento de onda de 530/25 nm. Neste o controle positivo utilizado foi o peróxido de hidrogênio (10µM).

## 2. Avaliação do potencial imunogênico da proteína Lil

### 2.1. Animais

Ao todo foram utilizadas 10 coelhas fêmeas New Zealand de 2-3kgs, livres de patógenos, provenientes da Fazenda da Escola de Veterinária da UFMG. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as normas éticas estabelecidas, e o presente projeto foi aprovado pelo comitê de ética em experimentação animal da UFMG (CEUA), sob o protocolo 79/2017.

## 2.2. Imunização

Seis coelhos New Zealand foram imunizados. Dois animais foram imunizados apenas com 20mg de Hidróxido de Alumínio em tampão PBS 1x- animais Não Imunes - controles negativos da imunização. Dois animais foram imunizados com 10 µg de um Pool com os venenos de *L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta* (na mesma proporção de cada), em uma solução 20mg de Hidróxido de Alumínio em PBS 1x. Tais venenos foram disponibilizados pelo Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos (CPPI) do Estado do Paraná, Brasil. Os venenos foram obtidos por eletrochoque de 15V no cefalotórax das aranhas e em seguida, liofilizados e armazenados em criotubos de polipropileno de 1,5mL, a -80°C até a utilização. Finalmente, dois animais foram imunizados com 100 µg da proteína Lil, em uma solução 20mg de Hidróxido de Alumínio em PBS 1x. Foram feitas injeções subcutâneas (s.c.) de 100µL de cada solução nos dias 1, 15, 30, 37 e 44. Amostras de sangue foram coletadas três dias antes da primeira injeção, 6 dias após a terceira dose e 10 dias após a injeção final.

## 2.3. Obtenção de Soro

As amostras de sangue foram centrifugadas à 4°C com rotação de 1500rpm, por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e novamente centrifugado sob as mesmas condições. Após as centrifugações os sobrenadantes foram coletados e estocados à -20°C.

## 2.4. Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

Os ensaios imunoenzimáticos foram realizados com 0,5 µg de cada antígeno (Lil, LiD1 e a Smase I de *L. laeta* e de cada um dos três venenos de importância médica) incubado overnight à 4°C em Tampão de Sensibilização. Os procedimentos realizados foram descritos no item 1.12 desta seção com a diferença de que os soros utilizados foram os soros obtidos no processo de imunização (descritos nos itens 2.2 e 2.3 desta seção), dos animais 1, 2, 3, 4, 5 e 6, diluídos em Tampão de incubação. Foram feitas diluições seriadas indo de de 1:500 até 1:312500 respeitando uma razão de 1:5. O conjugado utilizado foi um conjugado anti-IgG de coelho em uma diluição de 1:5000.

## **2.5. Desafio de dermonecrose *in vivo***

Os animais imunizados foram submetidos ao desafio de dermonecrose 15 dias após a última dose. Foram inoculadas de forma Intradérmica no dorso de cada animal 2DMN de veneno de *L. intermedia*, em PBS com volume final de 200µL. As atividades do veneno: Edema, Hemorragia e Dermonecrose foram avaliadas nas 24, 48 e 72h subsequentes após a injeção do desafio. E as medidas das lesões foram realizadas com o auxílio de um paquímetro, e do software Image J.

## **2.6. Desafio de dermonecrose *ex vivo***

Para avaliação da proteção dos soros produzidos *ex vivo*, foi adaptado do protocolo descrito por Oliveira e colaboradores em 2016, onde quatro coelhos não imunes foram inoculados em seu dorso de forma intradérmica 100µL contendo 2DMN veneno de *L. intermedia* (4,8µg) previamente incubado por 1h sob agitação à 37°C com os diferentes soros de coelhos provenientes das imunizações, em PBS1x na diluição 1:5. As atividades do veneno: Edema, Hemorragia e Dermonecrose foram avaliadas 72h após a injeção do desafio. E as medidas das lesões foram realizadas com o auxílio de um paquímetro, e do software Image J.

## **2.7. Ensaio de Neutralização da Atividade Esfingomielinásica**

Foi realizado um ensaio de inibição da atividade esfingomielinásica conforme o descrito no item 1.13 deste documento. Em cada poço da microplaca foram adicionados 100 µL dos soros dos coelhos imunizados, diluídos em tampão de reação, nas diluições de 1:100, 1:500 e 1:2500 previamente incubados com 0,12 µg de veneno de *Loxosceles intermedia* por 1h sob agitação à 37°C, 100 µL do tampão de trabalho. Em seguida, a placa foi incubada a 37°C durante 30 minutos ao abrigo de luz e logo após, foi realizada a leitura na faixa de comprimento de onda de 590/35 nm.

## **3. Distinção da Potência Neutralizante de Diferentes Soros**

### **3.1. Soros**

Neste trabalho foram avaliados 40 soros antiloxoscelicos. Os soros avaliados foram os gentilmente cedidos pelo CPPI. Destes 40 soros, 8 tiveram sua potência determinada de acordo com a metodologia padrão, que é a de avaliação de

neutralização do veneno *ex vivo*, pelo CPPI. Os demais 32 soros não foram avaliados previamente a este estudo.

**Tabela 3: Lista de Soros Antiloxoscelicos de diferentes potências**

Potência Conhecida			Potência Desconhecida		
Número	Código do CPPI	Status	Número	Código do CPPI	Status
1	11	Baixa potência	1	13	Desconhecido
2	362	Baixa potência	2	19	Desconhecido
3	15	Alta potência	3	39	Desconhecido
4	21	Alta potência	4	160	Desconhecido
5	38	Alta potência	5	186	Desconhecido
6	39	Alta potência	6	405	Desconhecido
7	445	Alta potência	7	552	Desconhecido
8	407	Alta potência	8	589	Desconhecido
			9	21	Desconhecido
			10	154	Desconhecido
			11	683	Desconhecido
			12	615	Desconhecido
			13	1776	Desconhecido
			14	1070	Desconhecido
			15	1392	Desconhecido
			16	2396	Desconhecido
			17	2665	Desconhecido
			18	2371	Desconhecido
			19	3119	Desconhecido
			20	3715	Desconhecido
			21	4330	Desconhecido
			22	4921	Desconhecido
			23	4856	Desconhecido
			24	5668	Desconhecido
			25	6111	Desconhecido
			26	7814	Desconhecido
			27	7620	Desconhecido
			28	7908	Desconhecido
			29	8343	Desconhecido
			30	8510	Desconhecido
			31	8633	Desconhecido
			32	9906	Desconhecido

### 3.2. Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

Os ensaios imunoenzimáticos foram realizados com 0,5 µg de cada antígeno (Lil, LiD1 e a Smase I de *L. laeta* e um *pool* contendo os três venenos de importância médica) incubado overnight à 4°C em Tampão de Sensibilização. Os procedimentos realizados foram descritos no item 1.12 deste documento com a diferença de que os soros utilizados foram soros antiloxoscelicos de cavalo de diferentes potências, fornecidos pelo Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos (CPPI), diluídos em Tampão de incubação. Foram feitas diluições seriadas indo de de 1:20000 até 1:60000 em uma razão de 2x, para a escolha do melhor antígeno com os soros de potência conhecida, e 1:100 até 1:1680000 em uma razão de 4x para os soros de potência desconhecida. O conjugado utilizado foi um conjugado contra IgG de cavalo em diluição de 1:20000.

### 3.3. Análise Estatística

Para as análises de diferença estatística entre as amostras foi utilizando o teste ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni. A diferença estatística significativa foi classificada em (\*), para valores de  $P < 0,05$  e em (\*\*), para valores de  $P < 0,001$ .

O EC50, valor de concentração do soro em que é alcançada 50% da absorbância máxima, foi calculado após o tratamento dos dados, com a transformação dos valores de y em função de log (x), normalização dos valores de y, e *curve fitting* por regressão linear. Todas as análises estatísticas, e os gráficos gerados foram realizados com o auxílio do software Prisma Graphpad.

### 3.4. Ensaio de Inibição da Atividade Esfingomielinásica

Foi realizado um ensaio de inibição da atividade esfingomielinásica através do kit Amplex® Red sphingomyelinase assay kit (Thermo Fisher Scientific). Os ensaios foram realizados em microplaca de 96 poços pretas e de fundo chato e a fluorescência medida utilizando o equipamento Varioskan (Thermo Fisher Scientific). Em cada poço da microplaca foram adicionados 100 µL de soro diluído em tampão de reação (0,5M Tris-HCl, 50mM MgCl<sub>2</sub>, pH7,4), na diluição de 1:2500 previamente incubados com 0,6 µg de veneno de *Loxosceles intermedia* por 1h sob agitação à 37°C, 100 µL do tampão

de trabalho (Amplex® Red 10mM, HPR 200U/mL, Colina Oxidase 20U/mL, Fosfatase Alcalina 400U/mL, Esfingomielina 5mM e q.s.p. tampão de reação). Em seguida, a placa foi incubada a 37°C durante 30 minutos ao abrigo de luz e logo após, foi realizada a leitura na faixa de comprimento de onda de 590/35 nm.



## Resultados

### 1. Obtenção de proteínas recombinantes

#### 1.1. Construção e Análise *in silico* da proteína quimérica Lil

Visando a obtenção de uma proteína atóxica com potencial imunogênico, foi elaborada a proteína quimérica Lil. Esta proteína foi construída a partir da seleção de epitopos imunogênicos das Smases D do veneno de *Loxosceles intermedia* e *Loxosceles laeta*, previamente descritos neste documento, na seção de metodologia item 1.2. As regiões selecionadas para a construção da proteína são equivalentes entre as diferentes smases, conforme mostra a sobreposição (Figura 6). Considerando a sequência de aminoácidos da proteína proveniente da tradução do plasmídeo inserido, as análises *in silico* revelaram que após a expressão a sequência da proteína quimérica Lil conta com 126 aminoácidos e massa molecular de 13,15kDA, considerando a cauda de histidina e o sítio tev, e por fim ponto isoelétrico 5,5. De modo geral, a proteína possui carga negativa, o que facilita sua purificação em coluna de níquel. Além de ter sido classificada como estável esta proteína possui meia-vida em *Escherichia coli* superior à 10h, logo, este é um bom *chassi* de expressão (

Tabela 5). O aminoácido mais abundante na proteína Lil é a Glicina (23%), seguida então por Histidina e Asparagina (8,7%) e Serina (7,9%) (Tabela 4e

Tabela 5).

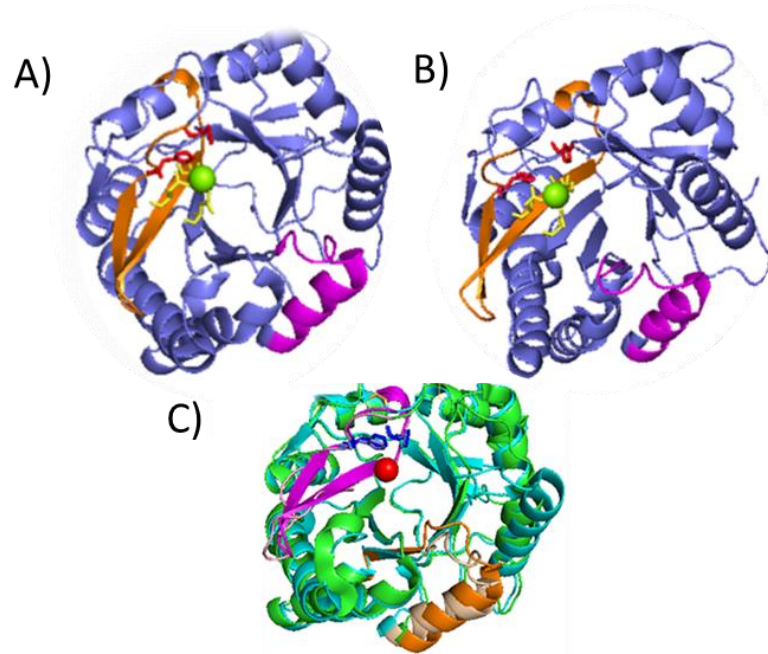


Figura 6 Identificação dos epitopos para a construção da proteína quimérica Lill nas estruturas das Smases D. A) Representação da estrutura da Smase I de *L. laeta* (PDB: 1XX1) com destaque no sítio ativo, contendo um íon magnésio (esfera em verde) coordenado por três aminoácidos (stics em amarelo), e duas histidinas do sítio catalítico (stics em vermelho). Os epitopos imunodominantes utilizados para a construção da proteína estão em destaque nas cores laranja e rosa. B) Smase D de *L. intermedia* (PDB: 3RLH) com destaque no sítio ativo, contendo um íon magnésio (esfera em verde) coordenado por três aminoácidos (stics em amarelo), e duas histidinas do sítio catalítico (stics em vermelho). Os epitopos imunodominantes estão em destaque nas cores laranja e rosa. C) Sobreposição das estruturas 1xx1 (azul água) e 3rlh (verde-limão), destaque no sítio ativo, contendo um íon magnésio (esfera em vermelha), e duas histidinas do sítio catalítico (stics em azul). Os epitopos imunodominantes estão em destaque nos tons de laranja e rosa.

Tabela 4: Composição de Aminoácidos pelo PROTPARAM

Composição de Aminácidos:			
Ala (A)	8	6.3%	Lys (K) 7 5.6%
Arg (R)	0	0.0%	Met (M) 1 0.8%
Asn (N)	7	5.6%	Phe (F) 4 3.2%
Asp (D)	11	8.7%	Pro (P) 7 5.6%
Cys (C)	0	0.0%	Ser (S) 10 7.9%
Gln (Q)	1	0.8%	Thr (T) 8 6.3%
Glu (E)	5	4.0%	Trp (W) 0 0.0%
Gly (G)	23	18.3%	Tyr (Y) 8 6.3%
His (H)	11	8.7%	Val (V) 5 4.0%
Ile (I)	3	2.4%	Pyl (O) 0 0.0%
Leu (L)	7	5.6%	Sec (U) 0 0.0%

**Tabela 5: Informações sobre a proteína pelo PROTPARAM**

---

**Massa molecular: 13155,02 kDA**

---

**PI teórico: 5,50****Resíduos carregados negativamente (Asp + Glu): 16****Resíduos carregados positivamente (Arg + Lys): 7****Fórmula: C575H839N163O193S1****Total de átomos: 1771****Meia-vida em *E. coli* : superior à 10h**

---

O alinhamento das Smases de *Loxosceles* mostrou que, nas sequências adicionadas à proteína Lil, existem alguns resíduos extremamente conservados (Figura 7). As regiões das Smases que constam na proteína foram delimitadas em preto e nestas foram observados os seguintes resíduos com conservação acima de 90%: Glicina 53, 75 e 192, Asparagina 55 e 198, Ácido glutâmico 58, Ácido aspártico 60 e 194, Fenilalanina 63 e 195, Histidina 74, Prolina 77 e Serina 196. Os primeiros dois epitopos da proteína Lil são mais conservados que os demais, sendo que o quarto epitopo da proteína é composto por uma inserção exclusiva de *Loxosceles laeta*, localizada entre a Tirosina 199 e a Treonina 205.

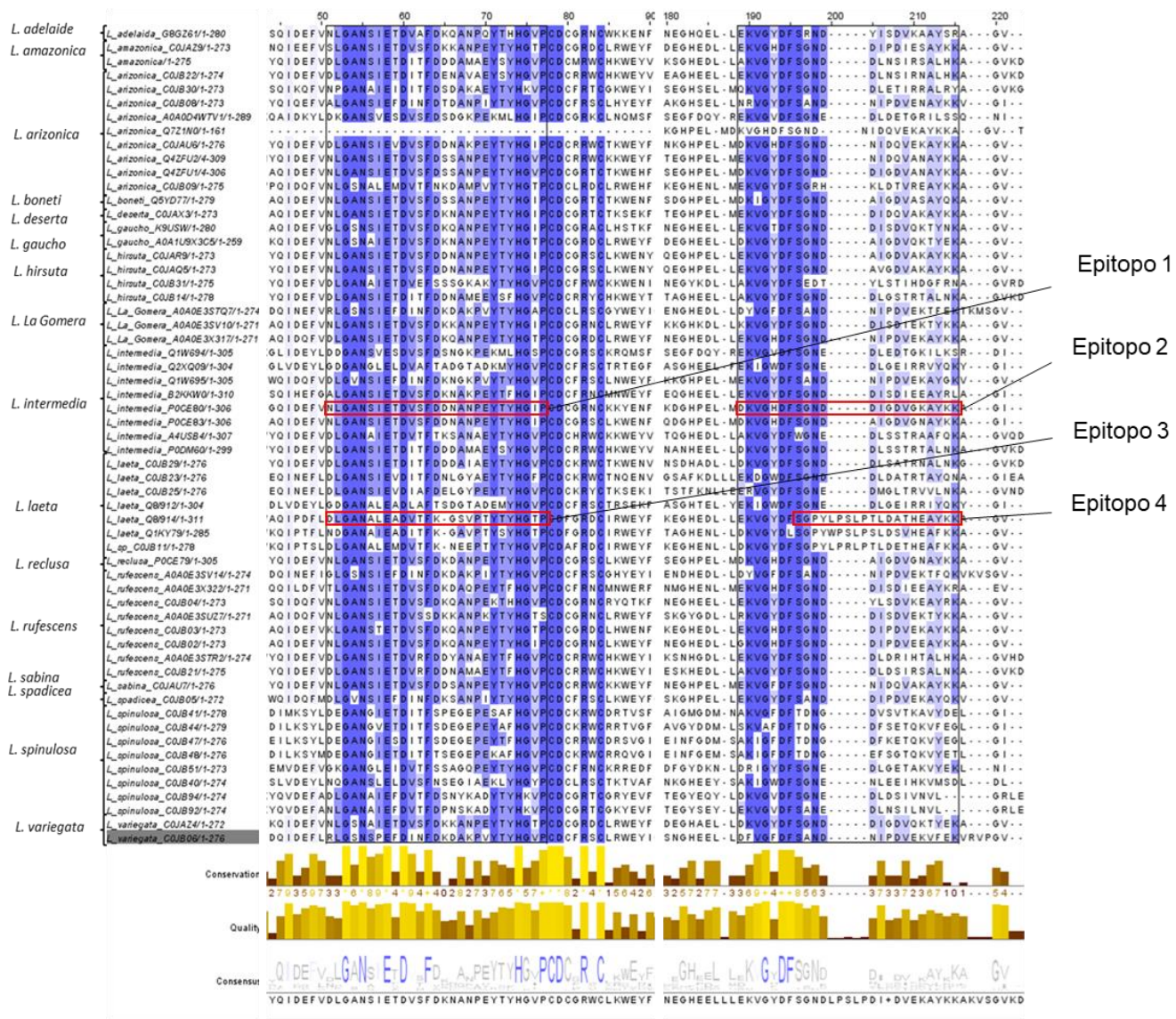
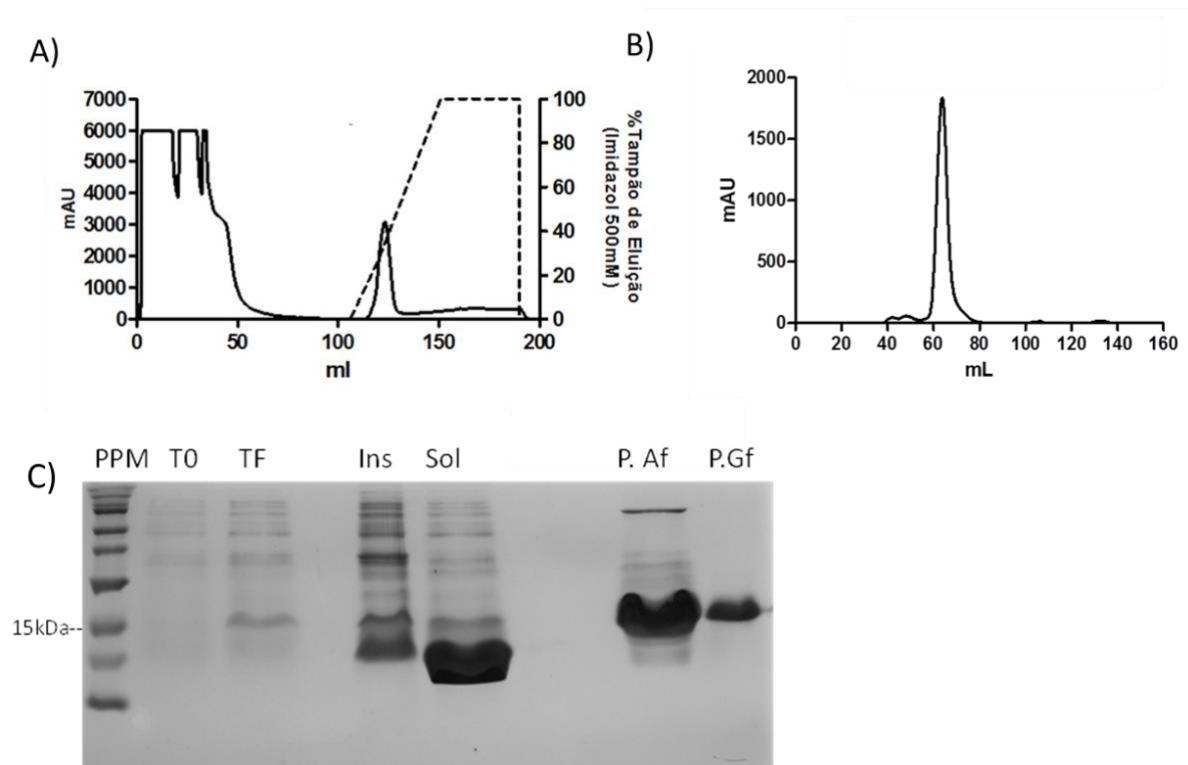


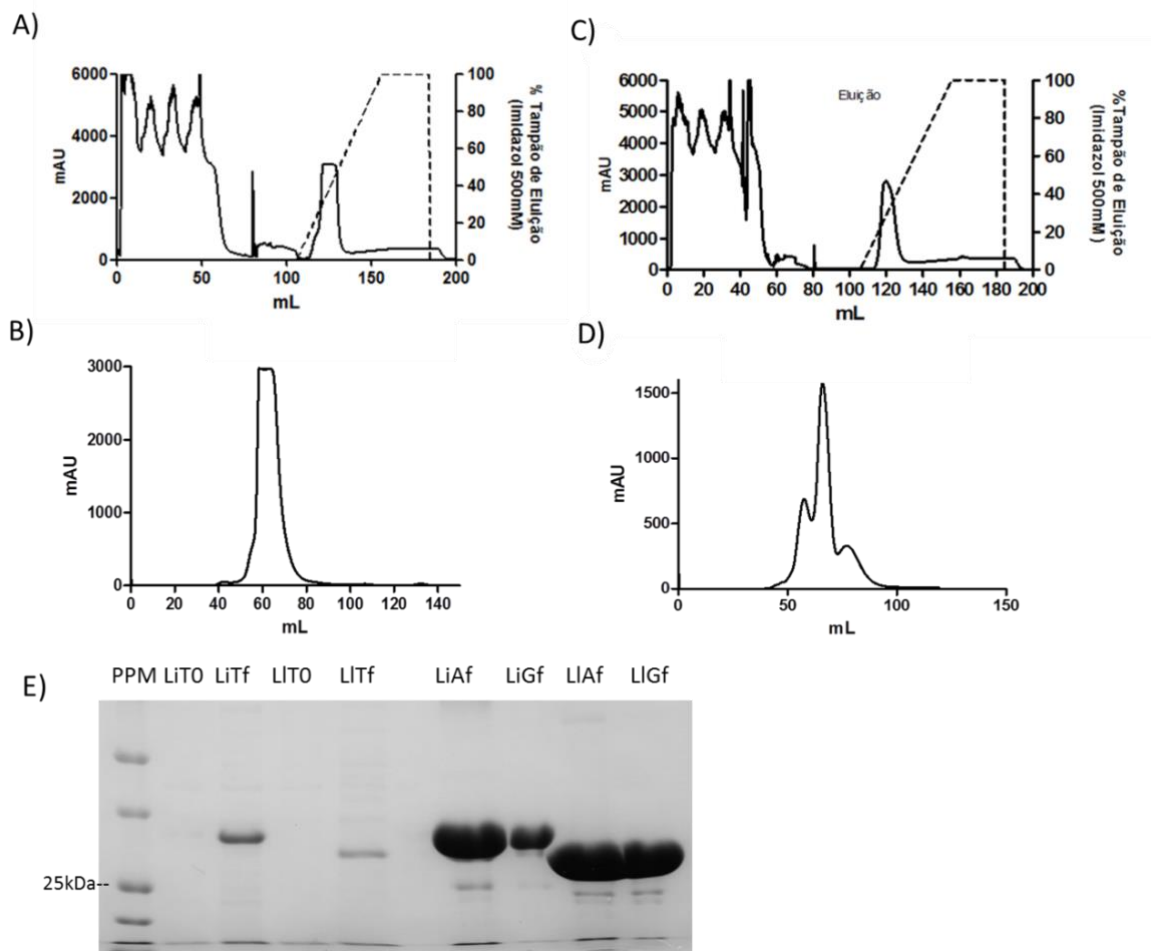
Figura 7: Alinhamento das seqüências das Smases D de *Loxosceles*. Destaque para os epitopos incluídos na proteína Lil (em vermelho). As 59 seqüências de Smases D foram obtidas no Uniprot com o filtro Uniref 90. Em tons de azul estão marcados os aminoácidos com acima de 90% de conservação dentre as seqüências avaliadas.

## 1.2. Expressão e Purificação

Para obtenção das proteínas LiD1, Smase I de *L. laeta* e Lil, células de *Escherichia coli* BL21 e C43 contendo os plasmídeos para expressão destas proteínas, tiveram sua expressão induzida. Proteínas no tamanho esperado, de ~35kDa para a LiD1 e para a Smase I de *L. laeta* e ~15kDa para a proteína Lil, foram expressas, conforme o observado com o surgimento das bandas após 4h de expressão (Figura 9E). A proteína Lil se apresenta na fração solúvel (Figura 8C) e após a purificação as bandas de tamanho esperado permanecem, sendo ~15kDa para a proteína Lil, ~35kDa para as Smases recombinantes, o que sugere que as proteínas foram expressas corretamente (Figura 8 Figura 9). As proteínas foram purificadas pela cromatografia de afinidade, conforme observado nos cromatogramas e géis (Figura 8Figura 9). Após a repurificação pela gel filtração as amostras apresentam um grau de pureza superior conforme o observado pela ausência de possíveis bandas contaminantes, no gel de SDS (Figura 8C). O cromatograma da Lil mostra que a proteína saiu no vazio da coluna, entre 60-80mL de eluição, o que seria esperado para uma proteína com um tamanho superior ao que a proteína possui 13kDa (Figura 8B). Este fato pode ser dar a uma possível formação de agregados que não foi investigada neste trabalho. A expressão da LiD1 apresentou um rendimento de 32mg/L, enquanto a expressão da Smase I de *L. laeta* 98mg/L e da proteína Lil 60mg/L.



**Figura 8: Purificação da proteína quimérica Lil.** A: Cromatograma de afinidade da Proteína Quimérica Lil. Foi medida a unidade de absorvância em mAU (280nm) em função do volume em mL que passou pela coluna. As frações referentes ao pico obtido nesta cromatografia foram coletadas e submetidas à gel filtração. B: Cromatograma da gel filtração da Proteína Quimérica Lil. Foi medida a unidade de absorvância em mAU (280nm) em função do volume em mL que passou pela coluna; C: Gel de SDS page das frações da expressão e purificação da proteína quimérica Lil (~15kDa). PPM: Padrão de peso molecular em kDa. T0: Tempo inicial de expressão; TF: Tempo final, após as 4h de indução da expressão; Ins: Fração insolúvel da expressão; Sol: Fração solúvel da expressão; P.Af: Fração obtida na cromatografia de afinidade; P.Gf: Fração obtida na cromatografia de gel filtração.



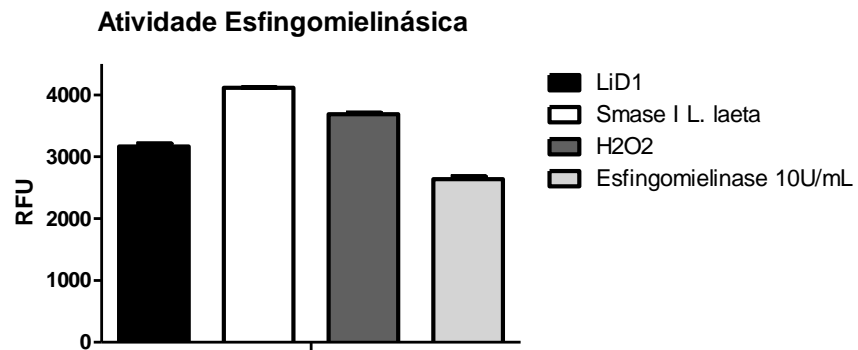
**Figura 9 : Purificação das Smases D recombinantes. Cromatograma de afinidade da LiD1 (C) e da Smase I de *L. laeta* (A). Foi medida a unidade de absorvância em mAU (280nm) em função do volume em mL que passou pela coluna. As frações referentes aos picos obtidos nesta cromatografia foram coletadas e submetidas à gel filtração. B: Cromatograma da gel filtração da LiD1 (D) e da Smase I de *L. laeta* (B). Foi medida a unidade de absorvância em mAU (280nm) em função do volume em mL que passou pela coluna; C: E) Gel de SDS page das frações da expressão e purificação das smases (~35kDa). PPM: Padrão de peso molecular em kDa. LiT0: Tempo inicial de expressão da LiD1; LIT0: Tempo inicial de expressão da Smase I de *L. laeta*; LiTf: Tempo final, após as 4h de indução da expressão da LiD1; LITf: Tempo final, após as 4h de indução da expressão da Smase I de *L. laeta*. LiAf: Fração obtida na cromatografia de afinidade da LiD1; LIAf: Fração obtida na cromatografia de afinidade da Smase I de *L. laeta*; LiGf: Fração obtida na cromatografia de gel filtração da LiD1. LiGf: Fração obtida na cromatografia de gel filtração da Smase I de *L. laeta*.**

### 1.3. Teste funcional das proteínas recombinantes

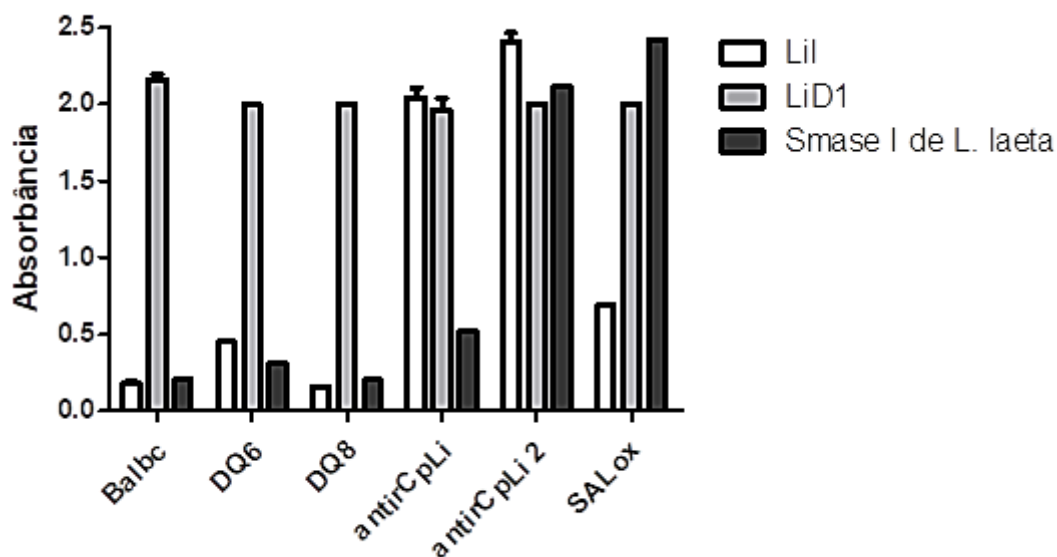
Para verificar se as proteínas expressas e purificadas eram funcionais, um teste de atividade esfingomielinásica foi realizado.

As Smases expressas apresentam atividade esfingomielinásica (5µg de proteína) conforme o demonstrado pela avaliação de atividade (Figura 10). Nota-se uma maior atividade da Smase I de *L. laeta* (25% a mais) quando comparada com a LiD1 (~3000 RFU). Os controles peróxido de hidrogênio e a esfingomielinase apresentaram leituras de 3500 e 3000RFU, respectivamente. Além disto, as smases purificadas foram reconhecidas por anticorpos policlonais que reconhecem smases, e os soros BalbC, DQ6, DQ8, produzidos em camundongos contra a LiD1, anticorpos policlonais produzidos contra epitopos específicos de smases do gênero *Loxosceles*, rCpLi e rCpLi2, além de terem sido reconhecidas pelo soro SALox (CPPI) (Figura 11:). A Lil por sua vez, também foi reconhecida por anticorpos policlonais produzidos contra outras proteínas quiméricas que contém epitopos em comum (rCpLi e rCpLi2) e também foi reconhecida pelo soro SALox (CPPI), em menor quantidade (OD: ~0,5). Estes imunoenaios tinham por objetivo avaliar se as proteínas expressas seriam reconhecidas por anticorpos produzidos contra o veneno, as smases e parte delas.





**Figura 10: Atividade Esfingomielinásica das proteínas recombinantes Smase I de *L. laeta* e LiD1. A atividade foi medida em RFU (Unidades relativas de fluorescência). Foram utilizados dois controles neste teste: o peróxido de hidrogênio e uma esfingomielinase proveniente do kit.**

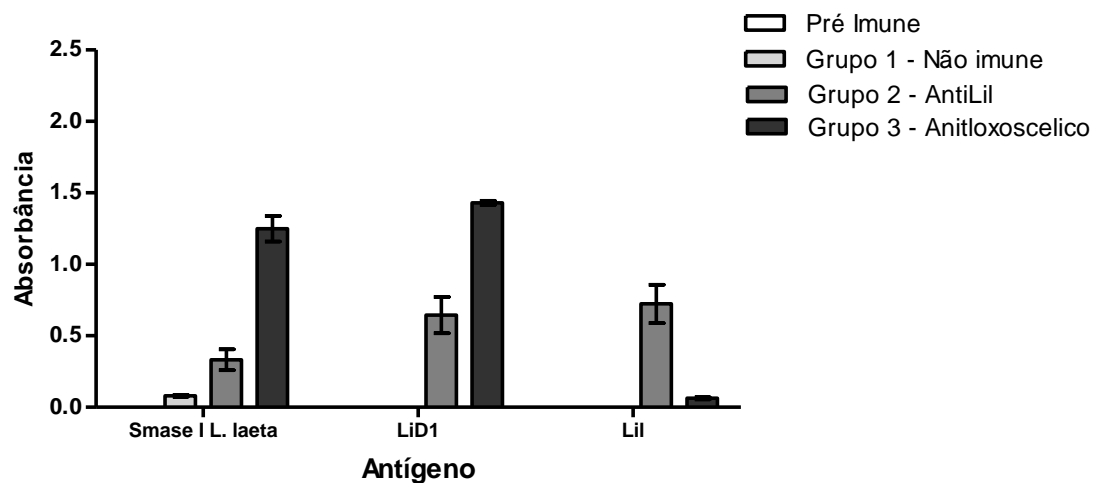


**Figura 11: Reatividade de diferentes soros contra as proteínas recombinantes Lil, Smase I de *L. laeta* e LiD1. Elisa tendo como antígenos 0,5ug de cada uma das proteínas expressas (Branco: Lil; Cinza claro: Smase I de *L. laeta*; Cinza escuro: LiD1) contra anticorpos policlonais produzidos contra a proteína Lid1(BalbC, DQ6 e DQ8) de *L. intermedia*; soro contra a proteínas quiméricas rCpLi (rCpLi) e rCpLi 2= (rCpLi 2) e o = soro antiloxoscelico contra o veneno total das espécies *L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta* (SALox).**

## 2. Avaliação do potencial imunogênico

### 2.1. Antigenicidade

A fim de avaliarmos o potencial da proteína Lil de induzir a produção de anticorpos neutralizantes, 3 grupos de coelhos foram utilizados. O grupo 1 foi composto pelos animais 1 e 2, enquanto o grupo 2, composto pelos animais 3 e 4 e o grupo 3 foi composto pelos animais 5 e 6. Os soros produzidos contra a proteína Lil e contra os venenos totais reconhecem as Smases D, LiD1 e Smase I de *L. laeta*, e também os venenos (*L. intermedia*, *L. laeta* e *L. gaucho*), enquanto os soros não imunes, não foram capazes de reconhecer estes mesmos antígenos (Figuras Figura 12 e Figura 13). Os soros antiloxoscelicos apresentam título alto (1,5 na diluição 1:12500) frente às smases, porém baixo (0,1 na diluição de 1:12500) frente à Lil, sendo que contra a Smase I de *L. laeta* há uma certa diferença no título dos soros dos animais 5 e 6 (1,0 a 1,5), que não é observada no experimento contra a LiD1 (Figura 12). Os soros antiLil apresentam OD de 0,5 para o animal 3 e 1,0 para o animal 4, contra os antígenos Lil e LiD1. Já frente à Smase I de *L. laeta* este título é menor, tendo OD de 0,2 e 0,5. Houve uma divergência nos títulos dentro do grupo antiLil, onde o soro do animal 3 respondeu cerca de 50% a menos que o soro do animal 4, frente a todos os antígenos nesta diluição de 1:12500 (Figura 12). Esta divergência se destaca também ao avaliarmos o título dos soros antiLil frente aos venenos totais das três espécies. O animal 3 respondeu pouco (OD 0,5 na diluição 1:500) aos venenos de *L. laeta* e *L. gaucho* (Figura 13). Ainda que com título baixo, os animais imunizados com a Lil reconheceram também a LiD1, a Smase I de *L. laeta*, e os venenos.



**Figura 12: Reatividade dos soros de coelho produzidos contra as proteínas recombinantes Lil, Smase I de *L. laeta* e LiD1. Soros antiloxoscelicos, antiLil, não imunes e pré imunes na diluição 1:12500, contra 0,5 µg de proteína. O conjugado contra IgG de coelho foi utilizado na diluição de 1:5000.**

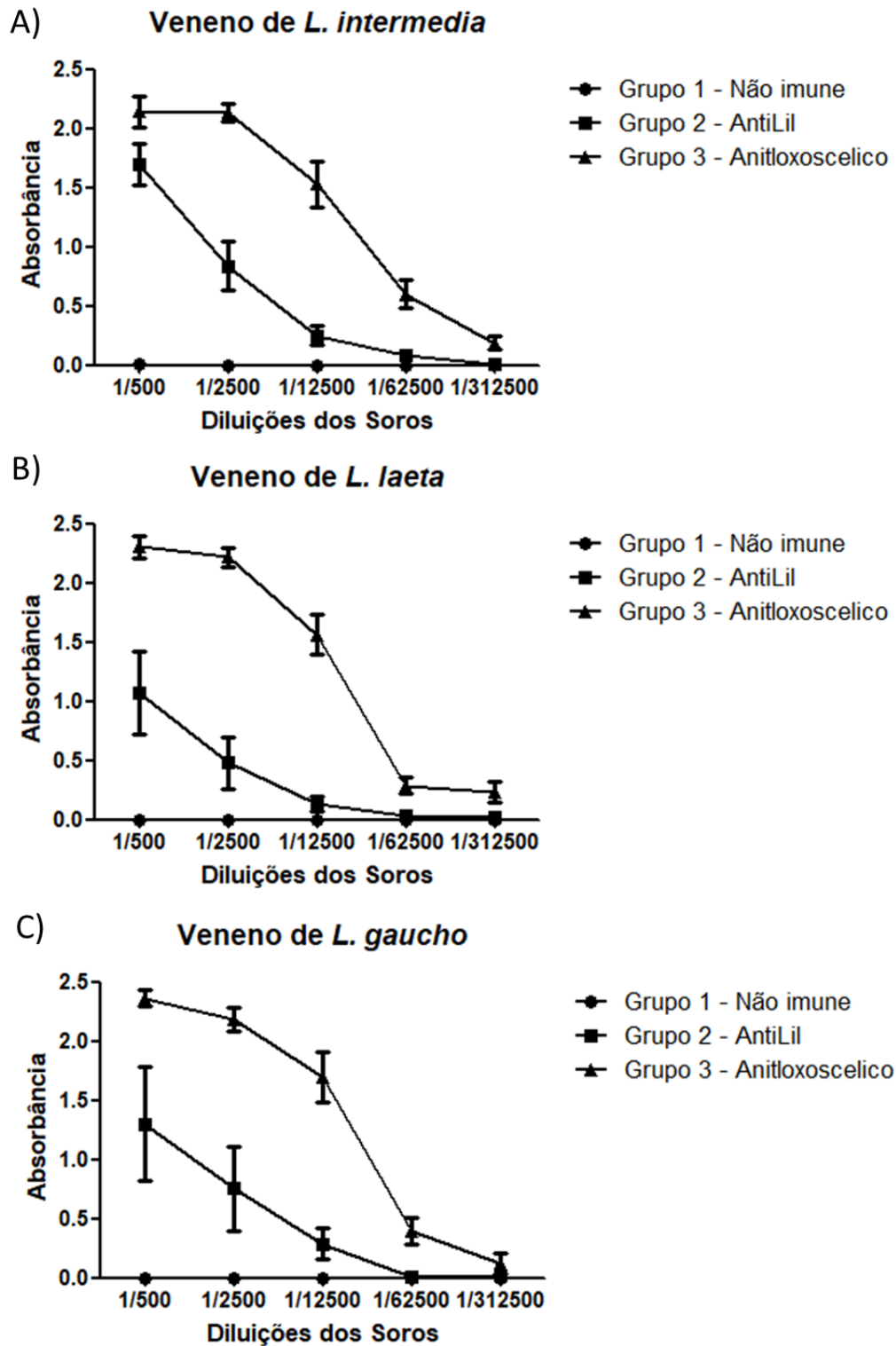


Figura 13: Reatividade dos soros de coelho produzidos, contra os venenos de *Loxosceles*. Foi uram utilizados 0,5  $\mu$ g de veneno de cada espécie de *Loxosceles*. Estes gráficos possuem os valores de absorbância obtida para cada diluição dos soros (De 1/500 a 1/312500). A) Antígeno: veneno *L. intermedia*. B) Antígeno: *L. laeta*. C) Antígeno: *L. gaucho*.

## 2.2 Inibição de atividade esfingomielinásica

Os soros provenientes dos coelhos imunizados com o pool de venenos, com a Lil ou apenas com o adjuvante tiveram seu potencial de inibição da atividade esfingomielinásica avaliado. A concentração de veneno a ser utilizada nos experimentos foi determinada a partir da avaliação da atividade esfingomielinásica em diversas concentrações de veneno de *L. intermedia*. A concentração de 0,12  $\mu\text{g}$  foi selecionada por possuir leitura fora do platô de concentração e com valor acima de 1000RFU (Figura 14). Os soros de animais não imunes, quando incubados com 0,12 $\mu\text{g}$  de veneno apresentaram alta atividade esfingomielinásica, o que indica que em nenhuma das diluições os soros não imunes foram capazes de neutralizar a atividade Smase do veneno. Os soros antiLil se comportaram de forma semelhante aos soros não imunes, enquanto os soros antiloxoscelicos reduziram a atividade Smase do veneno nas diluições de 100x e 500x (Figura 15).

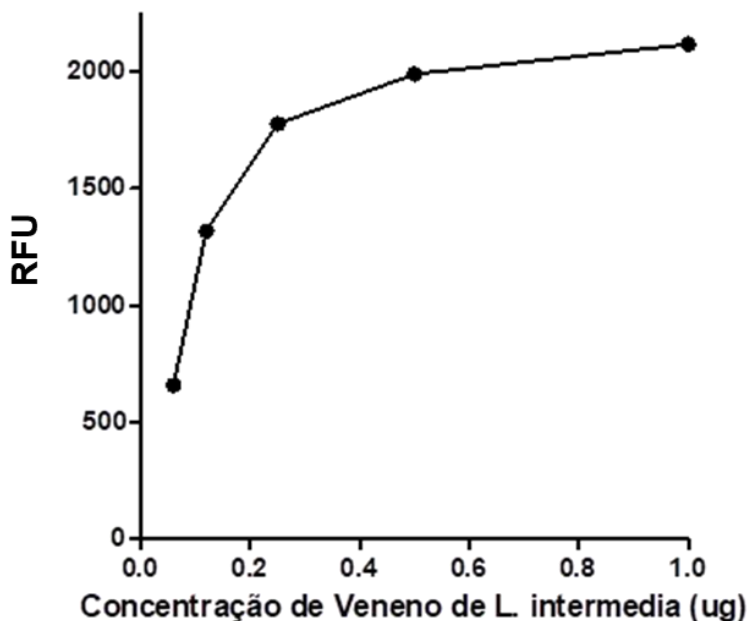


Figura 14: Atividade esfingomielinásica em função da concentração do veneno de *L. intermedia*. Foi feita uma diluição seriada com razão de 1:2 indo de 1  $\mu\text{g}$  até 0,6  $\mu\text{g}$ .

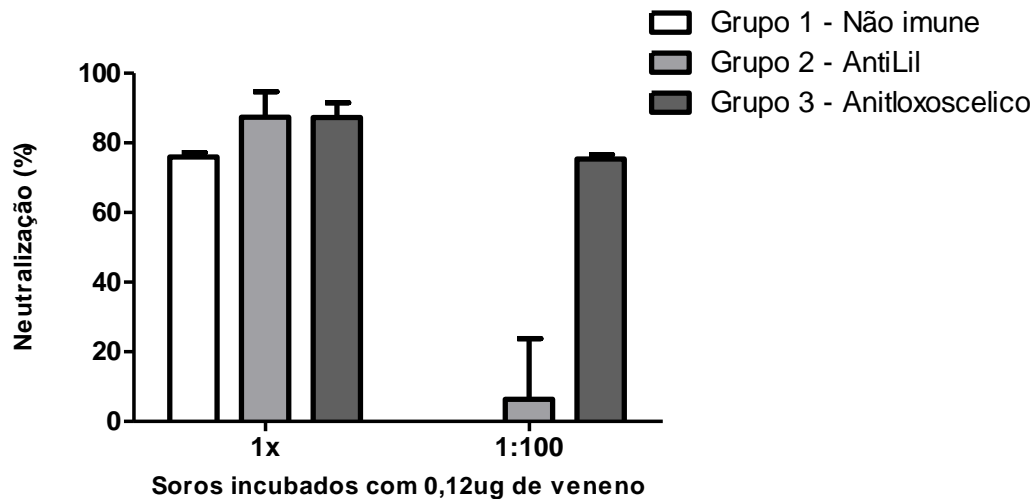


Figura 15: Neutralização *in vitro* da atividade Smase do veneno de *L. intermedia* após pré-incubação com os soros produzidos.

### 2.3 Inibição do efeito dermonecrótico, hemorrágico e edematogênico *in vivo*

De modo a avaliar o potencial neutralizante dos anticorpos produzidos em coelhos, os 3 grupos de animais foram desafiados com 2DMN de veneno de *L. intermedia*. Os coelhos imunizados apenas com o adjuvante, ao serem desafiados com 2DMN do veneno de *Loxosceles intermedia* apresentaram lesões características do loxoscelismo, enquanto os coelhos imunizados com o veneno, ao serem desafiados não apresentaram lesões semelhantes (Figura 16).

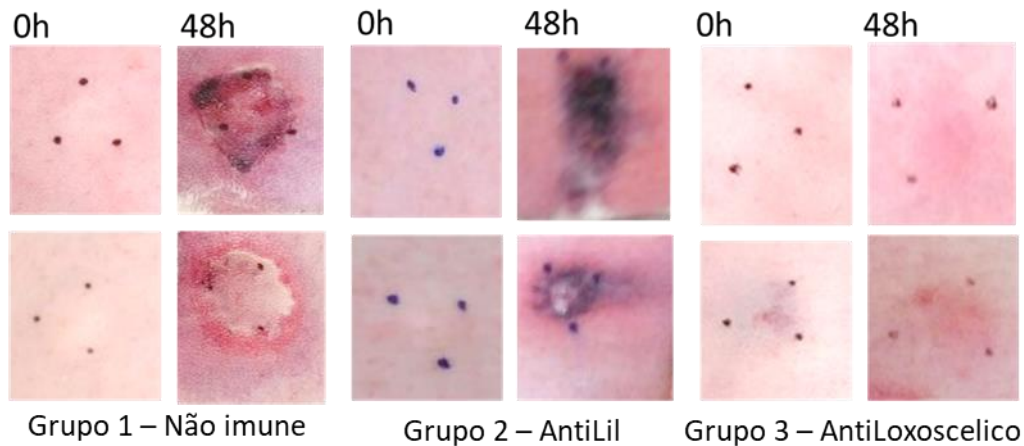


Figura 16: Desafio de animais vacinados. 0h: Tempo zero do desafio; 48h: 48h após o inóculo de 2DMN do veneno de *L. intermedia*. Grupo 1 - Animais não imunizados: 1 e 2; Grupo 2 - Animais imunizados com 100 µg de Lil: 3 e 4; Grupo 3 - Animais imunizados com 10 µg de venenos das três espécies de *Loxosceles* de importância médica no Brasil.

O grupo antiLil apresentou neutralização parcial dos efeitos tóxicos do veneno avaliados: 50% do edema, 30% de hemorragia e 10% de dermonecrose, enquanto o grupo antiloxoscelico apresentou redução de 60% de edema, 90% de hemorragia 100% de dermonecrose (Figura 17).

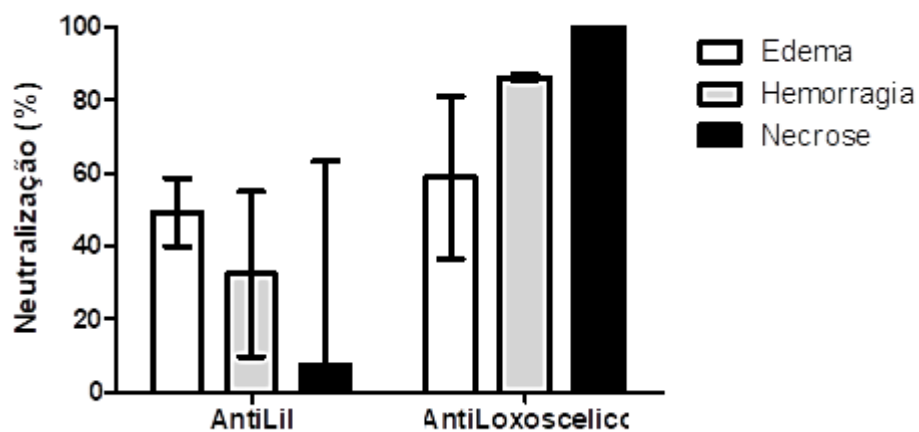


Figura 17: Neutralização *in vivo* dos efeitos tóxicos de 2DMN do veneno de *Loxosceles intermedia* após 48h de desafio. Foi avaliado o percentual de neutralização dos sintomas tóxicos do veneno, que são Edema, Hemorragia e Dermonecrose. Este experimento foi feito em duplicata.

## 2.4 Inibição do efeito dermonecrótico, hemorrágico e edematogênico *ex vivo*

Buscando avaliar o potencial neutralizante dos soros produzidos pelos imunógenos utilizados, foi feito um desafio *ex vivo*, isto é, foi feita uma incubação dos soros de coelho obtidos pela imunização, com o veneno de *L. intermedia* fora do organismo, e então estes venenos pré-incubados foram inoculados em outro animal. Três animais foram desafiados com 2DMN de veneno de *L. intermedia* pré-incubadas com os seis soros obtidos previamente, não imunes (1 e 2), antiLil (3 e 4) e antiloxoscelicos (5 e 6). Ao todo para cada grupo, não imune, antiLil e antiloxoscelico, foram realizados seis pontos de teste. O grupo antiLil apresentou neutralização parcial de todos os efeitos tóxicos do veneno avaliados, de 40% do edema, 38% de hemorragia e 37% de dermonecrose, enquanto o grupo antiloxoscelico apresentou redução de 58% de edema, e 90% de hemorragia e 88% de dermonecrose (Figura 18).

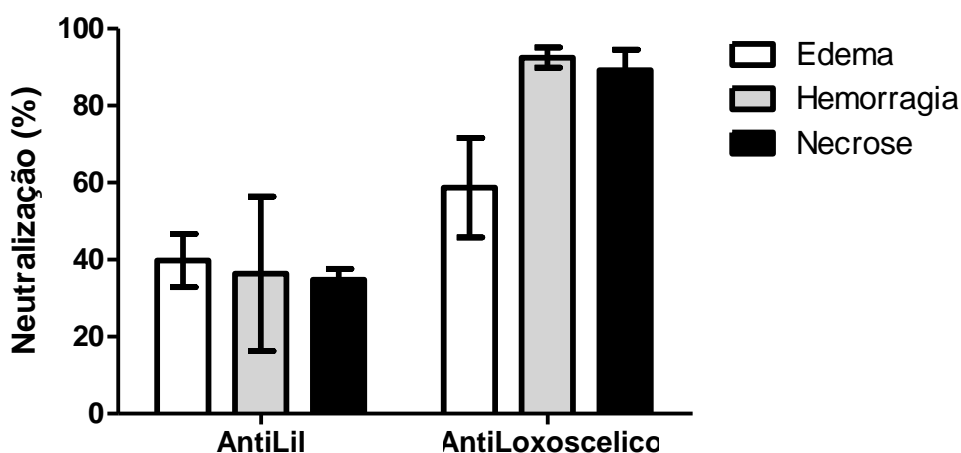


Figura 18: Neutralização *ex vivo* dos efeitos tóxicos de 2DMN do veneno de *Loxosceles intermedia* após 48h de desafio. Foi avaliado o percentual de neutralização dos sintomas tóxicos do veneno, que são Edema, Hemorragia e Dermonecrose. Este experimento foi feito em sextuplicata.

De modo geral, as três proteínas foram expressas com sucesso. A proteína quimérica Lil foi capaz de induzir a produção anticorpos em coelhos e estes anticorpos foram capazes de reconhecer os venenos de *L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. Laeta*. Além disso, estes anticorpos também foram capazes de neutralizar parcialmente a ação tóxica do veneno de *L. Intermedia* em ensaios *in vivo* e *ex vivo*.



### 3. Distinção da Potência Neutralizante de Soros Antiloxoscélicos

#### 3.1. Ensaio imunoenzimático (ELISA)

Visando avaliar o potencial das proteínas Lil, LiD1 e Smase I de *L. laeta*, como possíveis antígenos para a discriminação de soros com diferentes potências. E considerando que o título de anticorpos produzidos contra um antígeno pode estar relacionado ao potencial de neutralização destes anticorpos policlonais, foram feitos ELISAS para identificar quais soros possuíam maior e menor título contra o veneno total, a proteína Lil e as Smases D purificadas, LiD1 e Smase I de *L. laeta*.

Os soros antiloxoscélicos de cavalos hiperimunizados, cedidos pelo CPPI (Tabela 3), foram testados contra quatro antígenos: um pool com os venenos de *L. intermedia*, *L. laeta* e *L. gaucho*, a LiD1, a Smase I de *L. laeta* e a proteína Lil. Os soros apresentaram reatividade mesmo quando diluídos 160000 vezes (Figura 19), sendo que a OD variou de 1,2 até 2,8 para o pool de venenos, de 1,0 até 3,0 para a LiD, e 0,9 até 2,9 para a Smase I de *L. laeta*. Contudo, a diferença estatística entre os soros de alta potência (3-8) e os soros de baixa potência (1 e 2) não foi observada em nenhuma diluição de alguns soros nos testes contra o Pool de Venenos e a LiD1 (Figura 19 A e B). Comparando-se a reatividade dos soros hiperimunes com os diferentes antígenos, percebemos que estes anticorpos apresentam baixa reatividade contra a proteína Lil (OD variando entre 0,2 e 1,2). Pudemos observar também que em nenhuma das diluições testadas o antígeno foi capaz de discriminar todos os soros de alta potência, dos de baixa potência já conhecidos (Soros 1 e 2) (Figura 19 C). Já estes mesmos soros, quando reagidos com a proteína Smase I de *L. laeta*, diluídos 20000 e 40000 vezes apresentam diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre todos os soros de alta potencia conhecida (Soros 3, 4, 5, 6, 7 e 8), e os de baixo potencial (Soros 1 e 2) (Figura 19 D). Estes dados apresentam a Smase I de *L. laeta*, como um antígeno interessante para discriminação de soros com diferentes potências neutralizantes.

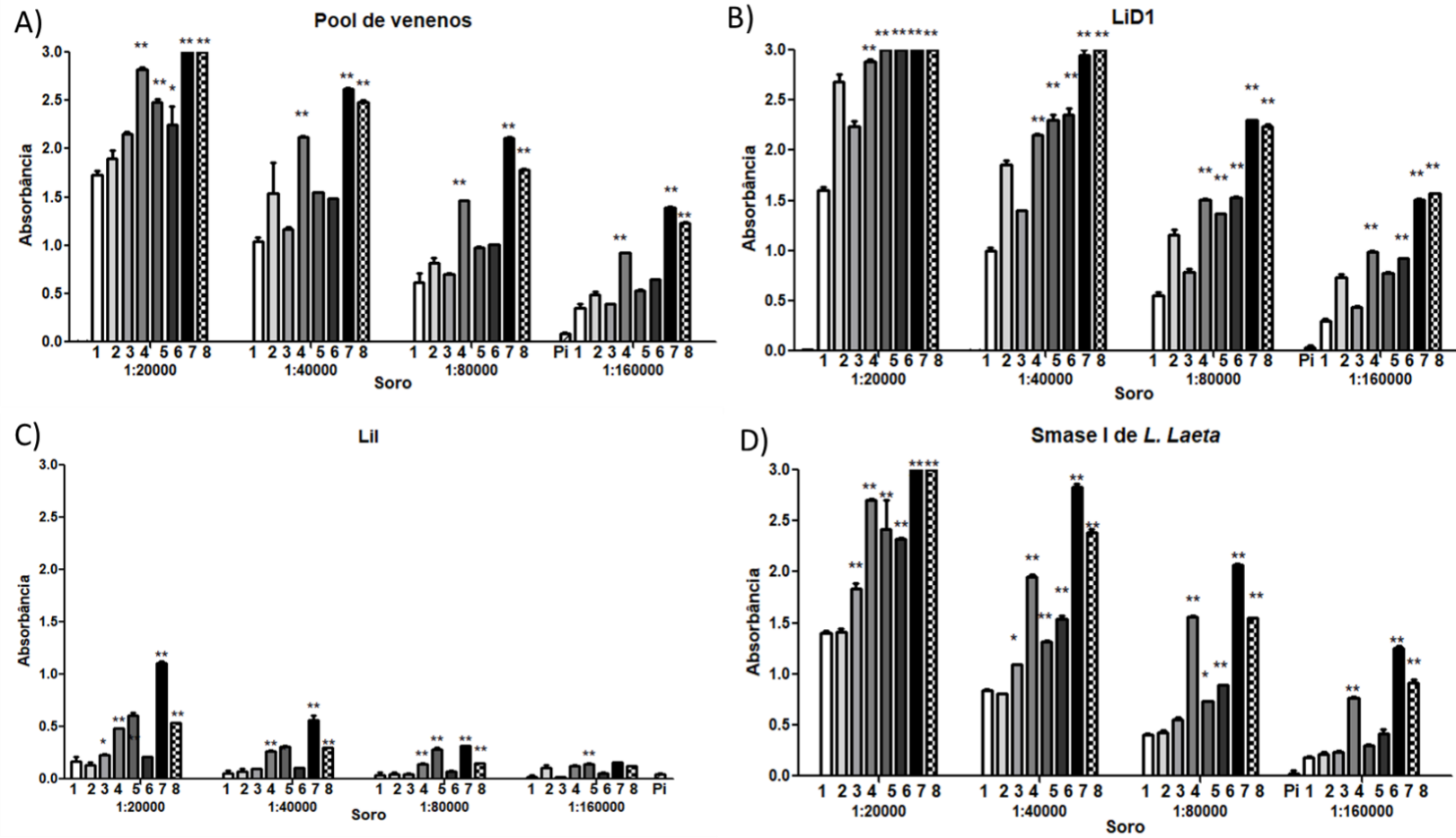
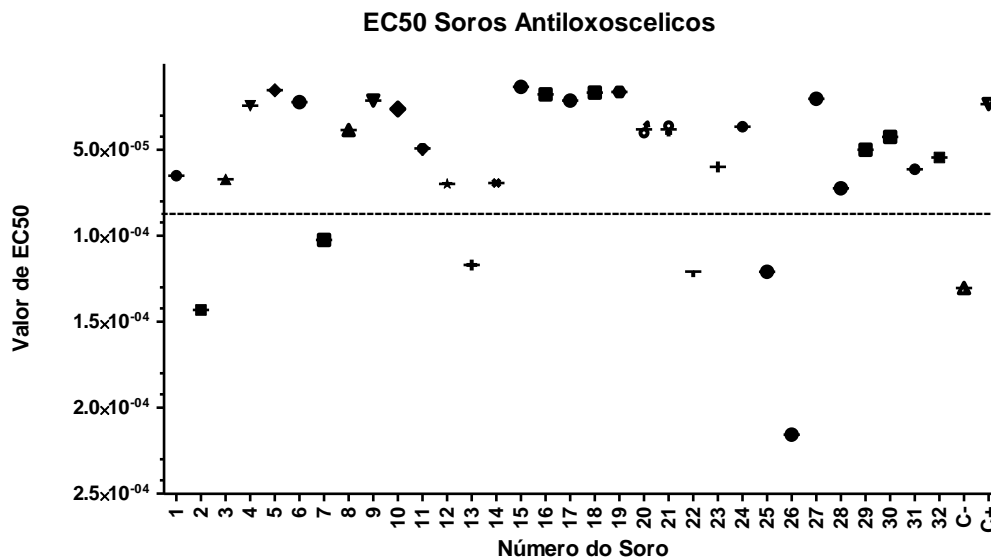


Figura 19: Reatividade do soros antioxoscelicos produzidos pelo CPPI de alta e baixa potência contra 0,5 µg de um pool de venenos (A), da LiD1 (B) da Lil (C) e da Smase I de *L. laeta* (D). O conjugado contra IgG de cavalo foi utilizado na diluição 1:6000. \*= Diferença estatística entre o soro em questão e os soros de baixa potência (1 e 2) com  $P < 0,05$ ; \*\*= Diferença estatística entre o soro em questão e os soros de baixa potência (1 e 2) com  $P < 0,001$ .

Uma vez que a Smase I de *L. laeta* se mostrou um antígeno promissor, a mesma foi utilizada para discriminar a potência de 32 soros com potencial neutralizando indeterminado (Tabela 3). Neste experimento os soros foram diluídos 400 vezes e a partir disto 6 outras diluições seguindo a razão 1:4 foram utilizadas.

Após o tratamento estatístico, os soros apresentaram curvas sigmóides conforme o necessário para obtenção de valores de EC50 confiáveis, uma vez que a obtenção de platôs em ambos extremos, do mais concentrado ao mais diluído, é essencial para a obtenção destes valores confiáveis. Quando estes platôs são obtidos, a curva obtida possui comportamento sigmóide. Os valores de EC50, isto é, a concentração de soro que atinge metade da OD máxima encontrada neste experimento, foram plotados com uma inversão no eixo y e um *cutoff* foi traçado considerando o 3x desvio padrão do EC50 do soro C-, controle de soro de baixa potência. Considerando este *cutoff*, os soros 2, 7, 13, 22, 25 e 26 teriam potencial neutralizante baixos enquanto os soros 1, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 23, 24, 27, 28, 29, 30, 31 e 32 seriam soros de alta potência, por estarem plotados acima do *cutoff* estabelecido (Figura 20).



**Figura 20:** EC50 da concentração dos soros antiloxoscelicos frente a Smase I de *L. laeta*, 1XX1. Soro C+: controle de alto potencial neutralizante. Soro C-: controle de baixo potencial neutralizante. O *Cutoff* foi estabelecido considerando-se 3x o desvio padrão do EC50 do soro C-. Considerando o *cutoff* os soros de baixa potência seriam os soros 2, 7, 13, 22, 25 e 26, por estarem plotados abaixo do *cutoff*, enquanto os soros 1, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 23, 24, 27, 28, 29, 30, 31 e 32 seriam soros de alta potência por estarem plotados acima deste *cutoff*.

### 3.2. Inibição de atividade esfingomielinásica

Sabendo que as Smases D possuem um papel fundamental na atividade biológica dos venenos de *Loxosceles*, os soros antiloxoscelicos tiveram seu potencial de inibição da atividade esfingomielinásica avaliado. 12 soros representantes dos 32 soros antiloxoscelicos avaliados, foram selecionados de acordo com o a altura em que estes soros se encontravam na Figura 20, os soros selecionados foram os soros 3, 5, 8, 10, 12, 15, 16, 17, 21, 23, 27, 29 e 31. Todos estes representantes dos estratos acima do *cutoff* apresentaram percentual de inibição alto, isto é, superior ao percentual de neutralização do C- que é o soro de baixa potência conhecida e igual ou superior ao percentual do C+, controle positivo de soro de alta potência. Todos os soros encontrados abaixo do *cutoff* (Soros 2, 7, 13, 22, 25 e 26) tiveram seu potencial de inibição da atividade Smase avaliado e quatro destes (Soros 2, 13, 22 e 26) de fato inibiram a atividade smase menos (57%-70%), quando comparados com os soros acima do *cutoff*, que inibiram de 85-100%. Os soros 7 e 25 apresentaram alto percentual de neutralização, carecendo de mais testes confirmatórios para terem seu status, se potência alta ou baixa, confirmado (Figura 21).

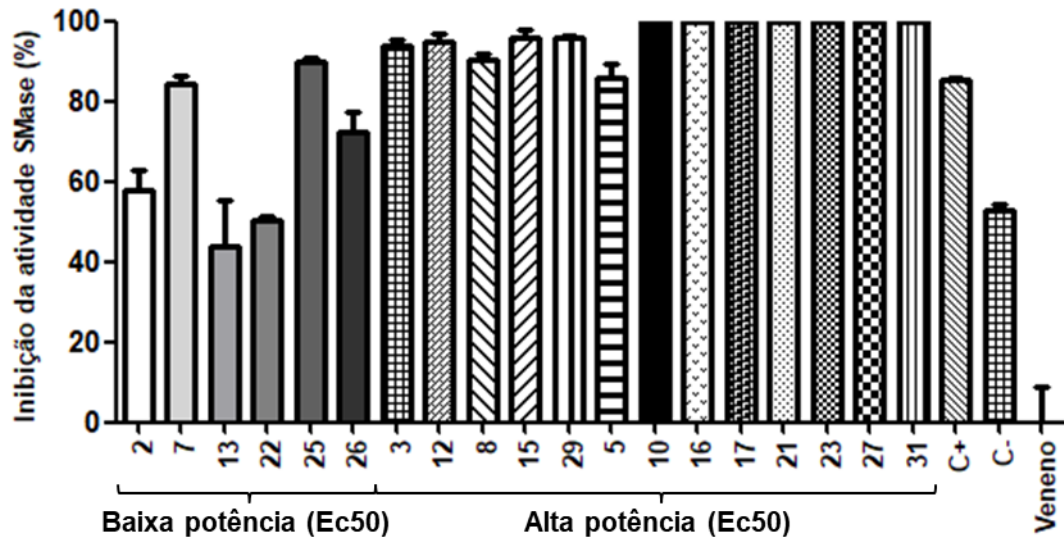


Figura 21: Neutralização *in vitro* da atividade Smase do veneno de *L. intermedia* pelos diversos soros não discriminados (alta e baixa potência) produzidos contra os três venenos de importância médica de *Loxosceles* pelo CPPI em cavalos. Análise do percentual de neutralização da atividade Smase do veneno de *L. intermedia* de soros representativos dos estratos acima do *cutoff* (Figura 30), que são os soros 3, 5, 8, 12, 15 e 29, e de todos os soros abaixo do *cutoff* (Soros 2, 7, 13, 22, 25, 26). C+: Controle de soro de alta potência. C-: Controle de soro de baixa potência. Veneno: 0,12 $\mu$ g do veneno de *L. intermedia*.

Os venenos totais de *Loxosceles*, a LiD1 e a proteína Lil não foram bons antígenos para discriminar o potencial neutralizante de antivenenos loxoscelicos, contudo, a Smase I de *Loxosceles laeta* apresentou grande potencial como antígeno para a discriminação de soros com diferentes potências neutralizantes.

## Discussão

O loxoscelismo possui relevância no âmbito médico e também econômico e, a produção de antivenenos loxoscelicos carece de otimizações para atender à demanda atual, uma vez que tais acidentes têm sido os segundos mais frequentes no Brasil, aquém apenas de acidentes com escorpiões (Ministério da Saúde, 2017).

A produção heteróloga de proteínas e peptídeos oriundos de venenos tem se mostrado uma alternativa promissora à utilização dos venenos totais, uma vez que a obtenção destes apresenta diversos gargalos, como a obtenção dos animais e seu manuseio, por exemplo. Proteínas quiméricas têm sido utilizadas em tentativas vacinais (Hora, 2006; Mendes *et al.*, 2013; Saljoughian *et al.*, 2013). Proteínas recombinantes têm sido amplamente utilizadas, não somente para fins vacinais, mas também para diversos fins diagnósticos (Faria *et al.*, 2015; Kotresha & Noordin, 2010; Ramos, Valmonte, & de Guia, 2007). O presente trabalho visou a produção de proteínas recombinantes para dois fins, o primeiro foi a utilização de uma proteína quimérica, a Lil, como imunógeno para a produção de soros capazes de neutralizar os efeitos tóxicos do veneno de *Loxosceles* e, o segundo foi para a determinação do potencial neutralizante de antivenenos loxoscélicos.

A expressão de proteínas recombinantes em *Escherichia coli* é amplamente utilizada, uma vez que esta é bem padronizada como sistema de expressão e apresenta um baixo custo, em relação às demais metodologias de obtenção de proteínas recombinantes (Sahdev, Khattar, & Saini, 2007). Algumas cepas de *E. coli* possuem características que favorecem a expressão de proteínas heterólogas, como por exemplo a cepa BL21, que é deficiente na produção das proteases Lon e Ompt, resistente ao fago T1 e capaz de manter estáveis os plasmídios de expressão. A obtenção de proteínas na fração solúvel é desejável, uma vez que a purificação de proteínas da fração insolúvel é seguida de um processo de renaturação, que, em muitos casos leva à perda da função proteica (Jia & Jeon, 2016). Trabalhos envolvendo a expressão de outras proteínas recombinantes do veneno de *Loxosceles* também fizeram uso de *E. coli* para esta produção e obtiveram bom rendimento (Chaim *et al.*, 2006; da Silveira *et*

*al.*, 2007; Felicori *et al.*, 2006; Mendes *et al.*, 2013). Por estas razões, neste trabalho a *Escherichia coli* cepa BL21 foi escolhida como *chassi* de expressão da proteína Lil, e a fração solúvel escolhida para a purificação, embora bandas sugestivas da presença da proteína tenham sido encontradas em ambas frações (Figura 8).

Conforme o previsto pelas análises *in silico* (

Tabela 5 e Tabela 4), que indicaram boa estabilidade da proteína em *E. coli*, a proteína Lil foi expressa e purificada com sucesso neste *chassi*. A alta quantidade de glicina observada na proteína é dada em função dos linkers que foram adicionados para unir sequências oriundas de Smases, e por se tratar de um aminoácido muito flexível, ela propicia a exposição linear das sequências de interesse. A alta quantidade de histidina, por sua vez é dada em função da cauda de histidina adicionada, que propiciou a purificação desta proteína em coluna de níquel. A Asparagina, por sua vez, é um aminoácido polar não carregado, que pode contribuir para a solubilidade da proteína, o que provavelmente facilitou a purificação, uma vez que é desejável que a proteína a ser purificada encontrasse na porção solúvel. A purificação da Lil apresentou um rendimento de aproximadamente 60mg após a purificação da fração solúvel de 1L de expressão. O tamanho pequeno da proteína, e sua carga total negativa, contribuíram para sua grande quantidade na fração solúvel. As demais proteínas recombinantes, LiD1 e Smase I de *L. Laeta* também foram expressas e purificadas (Figura 9) com rendimento superior ao descrito na literatura (Fernandes Pedrosa *et al.*, 2002; Kalapothakis *et al.*, 2002). O método de dupla purificação se mostrou eficaz para a obtenção de proteína pura, com atividade e em grande quantidade para as três proteínas avaliadas: a proteína Lil, a LiD1 e a Smase I de *L. laeta*. As Smases recombinantes apresentaram atividade Smase (Figura 10), sendo que a Smase I de *L. laeta* apresentou maior atividade (4000 RFU) que a LiD1 (3000 RFU) . Isto pode se dar ao fato de a Smase de *L. laeta* ser uma Smase de Classe I, com maior cavidade catalítica, enquanto a LiD é uma Smase de Classe II e possui cavidade catalítica menor (de Giuseppe *et al.*, 2011). Estes dados também concordam com o já descrito na literatura sobre o veneno de *L. laeta* ser mais tóxico que o veneno de *L. intermedia* (de Oliveira *et al.*, 2005). O fato de as Smases recombinantes possuírem atividade Smase D

sugere o enovelamento correto destas proteínas, no processo de expressão. Além disso, os imunoenaios mostraram que os diversos anticorpos produzidos contra peptídeos da LiD1 reconhecem as Smases recombinantes, e também a proteína Lil. Estes dados nos permitem afirmar que os métodos utilizados permitiram a expressão bem sucedida das três proteínas.

A obtenção da proteína Lil permitiu seu uso como imunógeno em coelhos e então os soros provenientes deste processo foram avaliados. Ao avaliar os títulos dos soros produzidos a partir da imunização com somente o adjuvante (Grupo 1), adjuvante (Hidróxido de alumínio) e proteína Lil (Grupo 2) e adjuvante e veneno das três espécies de *Loxosceles* (Grupo 3), contra as proteínas recombinantes, Lil, LiD1 e Smase I de *L. laeta*, nota-se um baixo título do grupo 3 contra a Lil. Este dado não foge o esperado, uma vez que a proteína quimérica Lil representa apenas uma pequena porção do veneno completo. Além disso, por ser composta de apenas epitopos lineares, a proteína Lil não será reconhecida por anticorpos que reconhecem epitopos conformacionais, que representam uma fração significativa dos antivenenos loxoscélicos. Resultados semelhantes foram observados em trabalhos onde peptídeos e proteínas quiméricas foram utilizados (Dias-Lopes *et al.*, 2010; Mendes *et al.*, 2013). Também é possível observar que, embora o soro antiLil tenha reconhecido a LiL (Com OD de 0,5 a 1,0 na diluição de 1:12500), a leitura não foi tão alta quanto a leitura do soro antiloxoscelico contra o veneno de *L. intermedia* (2,0 na diluição de 1:12500). Estes dados sugerem que talvez uma maior quantidade de doses de imunização seja desejável para a otimização do protocolo, podendo resultar em uma melhor qualidade do soro antiLil. É importante destacar que dentro do grupo 2 houve um grande desvio-padrão (50%) frente a todos os antígenos (Figura 12Figura 13). Este dado reflete a realidade dos processos de imunização, onde cada animal irá responder de uma forma diferente e por esta razão, processos de hiperimunização são necessários para a obtenção de soros mais uniformes. Os soros produzidos pelos grupos 1 e 3 responderam conforme o esperado, por se tratarem de grupos controle, nos imunoenaios contra todos os antígenos. O soro do grupo 1, não imune, não apresentou título significativo contra as proteínas recombinantes ou contra os venenos de *Loxosceles*. O soro do grupo 3 apresentou título alto (OD de 1,5 a 2,0) contra as Smases



recombinantes, LiD1 e Smase I de *L. laeta* (Figura 12) e também contra os três venenos (Figura 13). Nota-se também neste grupo um desvio-padrão significativo na reatividade dos soros frente aos diversos antígenos. Este dado corrobora com o supramencionado acerca da necessidade de otimização do protocolo com uma maior quantidade de doses para a obtenção de soros que se comportem de modo semelhante.

Os soros produzidos pelos grupos imunes 2 e 3 apresentaram reatividade contra os venenos das três espécies de importância médica, *L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta*. Este resultado confirma o potencial antigênico e imunogênico da Lil. Contudo, é importante destacar a diferença dos títulos entre os grupos 2 e 3, que pode ser explicada pelo fato de a proteína Lil, como vacina, representar apenas uma pequena parte das proteínas encontrados nos três venenos juntos. Idealmente, em um processo de hiperimunização, os soros não apresentariam divergências tão grandes entre os grupos 2 e 3. É importante destacar que para a imunização foram utilizados apenas dois coelhos para cada grupo, e que para fins de validação da proteína como imunógeno, um número maior de animais deverá ser utilizado. Um dado curioso observado foi que, embora os epitopos da LiD1 encontrados na Lil estejam presentes também na Smase D de *L. Gaucho*, os soros do grupo 2 apresentam divergências em seus títulos contra os venenos da *L. intermedia* (OD 0,5 – 1,4) e *L. gaucho* (OD 0,2 e 0,5), em especial o soro do animal 3.

Os ensaios de neutralização da atividade Smase *in vitro* (Figura 15) sugerem que, embora os soros produzidos pelo grupo antiLil possuam reatividade contra o veneno de *L. intermedia*, estes anticorpos policlonais não foram capazes de neutralizar a atividade Smase deste veneno, como foi observado pela semelhança da atividade Smase com os soros do grupo 1, o grupo não imune, enquanto na diluição de 1:100, os soros antiloxoscelicos neutralizaram quase 100% da atividade Smase.

Para verificar a proteção dos soros antiquiméricos contra os efeitos do veneno de *L. Intermedia*, os animais vacinados foram então desafiados com 2DMN deste veneno. Foi observada uma proteção contra os efeitos tóxicos do veneno de *L. intermedia* de 50% para o edema, 36% para a hemorragia e 10%

para a dermonecrose, com alto desvio padrão (Figura 17). A proteção contra os efeitos tóxicos foi inferior à conferida pela vacinação com os venenos loxoscelicos o que vai de encontro com trabalhos anteriores, onde verificaram que a resposta imune à imunização com peptídios e moléculas não ativas é inferior à conferida por proteínas com atividade tóxica, e pelos venenos (Dias-Lopes *et al.*, 2010; Liza Felicori *et al.*, 2009)(Tabela 6).

Os resultados do teste *in vivo* se mostraram promissores, uma vez que um dos dois animais do grupo 2 respondeu bem. Assim, foi realizado um desafio *ex vivo*, onde soros de cada grupo experimental foram testados em seis pontos diferentes cada, dois por animal. Foi observada uma proteção parcial contra os efeitos tóxicos do veneno de *L. intermedia*, conferida pelos os soros antiquiméricos. Esta proteção foi de 40% para o edema, 38% para hemorragia e 37% para a dermonecrose (Figura 18) (Tabela 6).

**Tabela 6: Comparação dos resultados observados frente a literatura.**

Imunógeno	Desafio	Percentual de Neutralização (%)			Referência
		Dermonecrose	Hemorragia	Edema	
LiD1	2DMN de LiD1	100	100	70	Felicori, 2009
Pep 15	2DMN de LiD1	80	40	40	Felicori, 2009
Pep 27	2DMN de LiD1	70	60	0	Dias-Lopes 2010
rCpLi	1DMN de LiD1	95	75	10	Mendes, 2013
Lil	2DMN de Veneno de <i>L. intermedia</i>	37	38	40	Este trabalho

Proteínas recombinantes vêm sendo amplamente utilizadas, não apenas para fins vacinais, mas também como antígenos para diversos testes diagnósticos (Faria *et al.*, 2015; Kotresha & Noordin, 2010; Ramos, Valmonte, & de Guia, 2007). A proposta da utilização de um ensaio imunoenzimático tendo como antígenos Smases e seus derivados para um teste discriminatório do potencial neutralizante de antivenenos loxoscelicos é fundamentado na importância do papel que as Smases desempenham na atividade do veneno, e diversos trabalhos mostraram que a neutralização das Smases em muitos casos

é determinante na neutralização dos efeitos do veneno total (Alvarenga *et al.*, 2003; Dias-Lopes *et al.*, 2014b; Guilherme *et al.*, 2001).

No trabalho de Theakston e colaboradores, foi desenvolvido um método *in vitro* para a avaliação de antivenenos de cobra, este método foi baseado em ELISA (Theakston, Jane Lloyd-Jones, & Reid, 1977). Barbosa e colaboradores observaram uma alta correlação entre a potência de antivenenos crotálicos e sua reatividade em ELISA contra o veneno total (Barbosa, *et al.*, 1995). Contudo, esta correlação foi baixa para os antivenenos Botrópicos. Maria e colaboradores utilizaram então a fração tóxica do veneno de *Bothrops jararaca* para um ELISA e observaram uma melhor correlação entre a reatividade de antivenenos botrópicos e sua potência neutralizante (Maria *et al.*, 1998). Estes trabalhos serviram como base para tentativas de determinação *in vitro* da potência neutralizante de outros antivenenos. Em 2005, Maria e colaboradores observaram uma correlação linear entre a potência de antivenenos do escorpião *Tityus serrulatus* e sua reatividade em um ELISA contra uma mistura de peptídeos das toxinas deste veneno (Maria *et al.*, 2005). Finalmente, em 2015, Ramada e colaboradores sugerem a utilização de peptídeos sintéticos como possíveis antígenos para a discriminação do potencial neutralizante de antivenenos loxoscélicos. Neste trabalho foi observado que venenos loxoscélicos totais não foram suficientes como antígenos para fazer a discriminação. Foi também observado que a LiD1 não foi um bom antígeno para fazer esta discriminação do potencial neutralizante. Contudo, o trabalho sugeriu a utilização de um peptídeo proveniente da Smase I de *L. Laeta* para este fim, apresentando resultados promissores.

No presente trabalho, os mesmos soros utilizados por Ramada em 2013 foram avaliados frente a um pool com os venenos totais das três espécies de *Loxosceles* de importância médica, e frente às proteínas LiD1, Smase I de *L. Laeta* e a proteína Lil. Assim como observado por Ramada e colaboradores, os venenos totais não se mostraram bons antígenos para a discriminação do potencial neutralizante, uma vez estes possuem diversas proteínas e peptídeos que, se inibidos por anticorpos não alteram significativamente na atividade do veneno total. De semelhante modo, a LiD1 como antígeno não foi capaz de

discriminar todos os soros de alta potência conhecida, dos soros de baixa potência (Figura 19). Estes resultados corroboram com o observado por Ramada *et al.*, 2015. A proteína Lil apresentou densidade óptica muito baixa, em relação às demais proteínas, e devido a isso ela pode não ser capaz de discriminar os soros de baixa potência dos soros de alta potência (Figura 19). Esta baixa leitura frente a peptídeos também foi observado por Ramada e colaboradores em 2015.

A Smase I de *L. laeta* como antígeno no teste discriminatório de potências de soros foi capaz de discriminar com alto grau de confiança (Valor  $P < 0,001$ ) os dois soros de baixa potência, dos demais soros de potência alta já conhecidos, nas diluições mais concentradas de 1:20000 e 1:40000 (Figura 19). Por esta razão, o antígeno Smase I de *L. laeta* foi utilizado em um teste de discriminação do potencial neutralizante de 32 soros produzidos pelo CPPI, cujo potencial não foi avaliado por testes *in vivo*. O antígeno selecionado para o teste de discriminação do potencial neutralizante foi a Smase I do veneno de *L. laeta*. O veneno de *L. Laeta* possui atividades biológicas como hemólise e dermonecrose mais potentes em relação ao veneno de *L. Intermedia* (de Oliveira *et al.*, 2005) e análises transcriptômicas mostraram que o veneno de *L. laeta* tem por moléculas mais abundantes, Smases D. Além disto, a Smase I de *L. laeta* é a mais imunogênica dentre as smases conhecidas oriundas das três espécies de impotância médica no Brasil (Guilherme *et al.*, 2001). Estes dados, em concordância com os dados obtidos neste estudo sugerem que soros antiloxoscelicos com maior potencial de se ligarem e neutralizarem a Smase I de *L. laeta* possuem potência mais alta, em relação aos demais. E por esta razão, a avaliação do título de um soro frente esta smase pode estar relacionada ao potencial neutralizante deste soro.

De modo a se obter dados mais confiáveis, foram obtidas leituras de absorvância em sete concentrações de soro diferentes e então o EC50, concentração de soro necessária para que metade da absorvância máxima seja obtida, de cada soro foi calculado. Um *cutoff* foi traçado tomando por base o desvio padrão do EC50 do soro C- cuja baixa potência já era conhecida. Seis dos soros tiveram valores de EC50 que foram plotados abaixo do *cutoff*, e estes seriam os soros de baixa potência e destes, dois destes foram plotados abaixo

do soro C-. Os soros que foram plotados acima do *cutoff* seriam os soros de alta potência (Figura 20). Os testes de neutralização da atividade smase do veneno de *L. intermedia*, após a incubação com soros que possivelmente teriam potência alta e baixa revelaram que, acima do *cutoff* os soros provavelmente seriam de alta potência de fato, uma vez que uma amostragem homogênea destes soros neutralizou em quase 100% a atividade do veneno. De semelhante modo, todos os soros que seriam de baixa potência e estavam abaixo do C- não neutralizaram *in vitro* a atividade smase do veneno. Alguns dos soros próximos ao *cutoff* estabelecido neutralizaram a atividade smase do veneno, estes foram os soros 7 e 25, enquanto outros não (Figura 21). Acredita-se que uma vez que uma maior quantidade de soros controles de baixo potencial neutralizante for incluída neste teste, permitindo a determinação de um *cutoff* mais preciso, será possível fazer a discriminação dos soros de alta e baixa potência com acurácia satisfatória.

Estes dados sugerem que a utilização do ELISA proposto possui grande potencial para fazer a triagem de soros com alto potencial neutralizante, e se aliado a outro teste, como o de neutralização da atividade smase do veneno *in vitro*, pode substituir os testes feitos em animais. A utilização das metodologias propostas neste trabalho para discriminação da potência dos soros pode substituir a utilização de animais, o que é extremamente desejável, uma vez que para a manutenção e realização de testes em coelhos é necessária uma estrutura apropriada com grande espaço físico e uma equipe com diversos funcionários capacitados. Com estes testes, não apenas seriam poupadas centenas de animais, mas também todos os custos envolvidos na manutenção destes, tempo para obtenção de resultados, uma vez que é possível realizar ambos os testes no mesmo dia, e a equipe envolvida, uma vez que uma pessoa sozinha é capaz de realizar os testes.

## Conclusões

- i. As proteínas Lil, LiD1 e Smase I de *L. laeta* foram obtidas com sucesso;
- ii. A proteína quimérica Lil foi capaz de induzir a produção anticorpos em coelhos e estes anticorpos produzidos foram capazes de reconhecer os venenos de *L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. Laeta*;
- iii. Os anticorpos produzidos contra a proteína Lil também se mostraram capazes de neutralizar parcialmente a ação tóxica do veneno de *L. Intermedia* em ensaios *in vivo* e *ex vivo*;
- iv. Os venenos totais de *Loxosceles*, a LiD1 e a Lil não foram bons antígenos para discriminar o potencial neutralizante de antivenenos loxoscelicos.
- v. A Smase I de *Loxosceles laeta* apresentou grande potencial como antígeno para a discriminação de soros com diferentes potenciais neutralizantes.
- vi. O teste de discriminação de potências neutralizantes do veneno Loxoscelico utilizando ELISA tendo por antígeno a Smase I de *L. laeta* apresentou resultados que foram confirmados pelo teste *in vitro* de neutralização da atividade Smase dos soros de potência desconhecida.

## Perspectivas

- i. Avaliar a neutralização dos soros produzidos contra a proteína quimérica, dos efeitos letais dos venenos de *Loxosceles*.
- ii. Realizar a hiperimunização de coelhos com a proteína quimera e avaliar então sua proteção contra os efeitos tóxicos e letais de *Loxosceles*.
- iii. Purificar anticorpos policlonais de soros com diferentes potências que se ligam à Smase I de *L. laeta* e verificar sua neutralização dos efeitos do veneno de *Loxosceles in vivo*.
- iv. Determinar sensibilidade e especificidade dos testes de discriminação do potencial neutralizante *in vitro*, a partir de amostras cuja potência tenha sido determinada por experimentos *in vivo*.

## Referências

- Alvarenga, L. M., Martins, M. S., Moura, J. F., Kalapothakis, E., Oliveira, J. C., Mangili, O. C., Chávez-Olórtegui, C. (2003). Production of monoclonal antibodies capable of neutralizing dermonecrotic activity of *Loxosceles intermedia* spider venom and their use in a specific immunometric assay. *Toxicon : Official Journal of the International Society on Toxinology*, 42(7), 725–731. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14757202>
- Araujo, S. C., Castanheira, P., Alvarenga, L. M., Mangili, O. C., Kalapothakis, E., & Chávez-Olórtegui, C. (2003). Protection against dermonecrotic and lethal activities of *Loxosceles intermedia* spider venom by immunization with a fused recombinant protein. *Toxicon : Official Journal of the International Society on Toxinology*, 41(3), 261–267. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12565747>
- Barbaro, K. C., Cardoso, J. L., Eickstedt, V. R., & Mota, I. (1992). IgG antibodies to *Loxosceles* sp. spider venom in human envenoming. *Toxicon : Official Journal of the International Society on Toxinology*, 30(9), 1117–1121. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1440649>
- Barbaro, K. C., Eickstedt, V. R., & Mota, I. (1994). Antigenic cross-reactivity of venoms from medically important *Loxosceles* (Araneae) species in Brazil. *Toxicon : Official Journal of the International Society on Toxinology*, 32(1), 113–120. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9237343>
- Barbosa CF, Rodrigues RJ, Olortegui CC, Sanchez EF, H. L. (1995). Determination of the neutralizing potency of horse antivenom against bothropic and crotalic venoms by indirect enzyme immunoassay. - PubMed - NCBI. *Braz J Med Biol Res.*, 28(1995), 1077–1080. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/m/pubmed/8634680/>
- Boissiere, F., Masson, R., Fluieraru, S., Vitse, J., Dessena, L., Lefevre, M., Herlin, C. (2016). Le loxoscelisme cutané, à propos d'une observation exceptionnelle de 9 cas consécutifs. *Annales de Chirurgie Plastique et Esthétique*. <https://doi.org/10.1016/j.anplas.2016.08.005>
- Braz, A., Minozzo, J., Abreu, J. C., Gubert, I. C., & Chávez-Olórtegui, C. (1999). Development and evaluation of the neutralizing capacity of horse antivenom against the Brazilian spider *Loxosceles intermedia*. *Toxicon : Official Journal of the International Society on Toxinology*, 37(9), 1323–1328. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10400292>
- Brescovit, A. D., Bonaldo, A. B., Bertani, R. & Rheims, C. A. (2002). Amazonian Arachnida and Myriapoda - Keys for the identification to classes, orders, families, some genera, and lists of know species. *Pensoft*, p.303-343. Retrieved from [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_nlinks&ref=000088&pid=S0073-4721200800010001300004&lng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=000088&pid=S0073-4721200800010001300004&lng=pt)
- Chaim, O. M., Sade, Y. B., da Silveira, R. B., Toma, L., Kalapothakis, E., Chávez-Olórtegui, C., Sanches Veiga, S. (2006). Brown spider dermonecrotic toxin directly induces nephrotoxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 211(1), 64–77. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2005.05.015>
- Chaves-Moreira, D., Senff-Ribeiro, A., Martins Wille, A. C., Gremski, L. H., Chaim, O. M., & Sanches Veiga, S. (n.d.). Highlights in the knowledge of brown spider toxins. <https://doi.org/10.1186/s40409-017-0097-8>
- Corrêa, M. A., Okamoto, C. K., Gonçalves-de-Andrade, R. M., van den Berg, C. W., & Tambourgi, D. V. (2016). Sphingomyelinase D from *Loxosceles laeta* Venom Induces the Expression of MMP7 in Human Keratinocytes: Contribution to Dermonecrosis. *PloS One*,



11(4), e0153090. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153090>

- da Silveira, R. B., Wille, A. C. M., Chaim, O. M., Appel, M. H., Silva, D. T., Franco, C. R. C., ... Veiga, S. S. (2007). Identification, cloning, expression and functional characterization of an astacin-like metalloprotease toxin from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. *Biochemical Journal*, 406(2), 355–363. <https://doi.org/10.1042/BJ20070363>
- de Almeida, D. M., Fernandes-Pedrosa, M. de F., de Andrade, R. M. G., Marcelino, J. R., Gondo-Higashi, H., de Azevedo, I. de L. M. J., ... Tambourgi, D. V. (2008). A new anti-loxoscelic serum produced against recombinant sphingomyelinase D: results of preclinical trials. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 79(3), 463–470. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18784245>
- de Giuseppe, P. O., Ullah, A., Silva, D. T., Gremski, L. H., Wille, A. C. M., Chaves Moreira, D., Arni, R. K. (2011). Structure of a novel class II phospholipase D: catalytic cleft is modified by a disulphide bridge. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 409(4), 622–627. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.05.053>
- de Moura, J., Felicori, L., Moreau, V., Guimarães, G., Dias-Lopes, C., Molina, L., ... Chávez-Olórtegui, C. (2011). Protection against the toxic effects of *Loxosceles intermedia* spider venom elicited by mimotope peptides. *Vaccine*, 29(45), 7992–8001. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.08.065>
- de Oliveira, K. C., Gonçalves de Andrade, R. M., Piazza, R. M. F., Ferreira, J. M. C., van den Berg, C. W., & Tambourgi, D. V. (2005). Variations in *Loxosceles* spider venom composition and toxicity contribute to the severity of envenomation. *Toxicon*, 45(4), 421–429. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2004.08.022>
- Dias-Lopes, C., Felicori, L., Rubrecht, L., Cobo, S., Molina, L., Nguyen, C., Chávez-Olórtegui, C. (2014a). Generation and molecular characterization of a monoclonal antibody reactive with conserved epitope in sphingomyelinases D from *Loxosceles* spider venoms. *Vaccine*, 32(18), 2086–2092. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.02.012>
- Dias-Lopes, C., Guimarães, G., Felicori, L., Fernandes, P., Emery, L., Kalapothakis, E., ... Chávez-Olórtegui, C. (2010). A protective immune response against lethal, dermonecrotic and hemorrhagic effects of *Loxosceles intermedia* venom elicited by a 27-residue peptide. *Toxicon*, 55(2–3), 481–487. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.09.019>
- Duarte, C. G., Bonilla, C., Guimarães, G., Machado de Avila, R. A., Mendes, T. M., Silva, W., ... Chávez-Olórtegui, C. (2015). Anti-loxoscelic horse serum produced against a recombinant dermonecrotic protein of Brazilian *Loxosceles intermedia* spider neutralize lethal effects of *Loxosceles laeta* venom from Peru. *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*, 93, 37–40. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.10.023>
- Faria, A. R., de Castro Veloso, L., Coura-Vital, W., Reis, A. B., Damasceno, L. M., Gazzinelli, R. T., & Andrade, H. M. (2015). Novel Recombinant Multiepitope Proteins for the Diagnosis of Asymptomatic *Leishmania infantum*-Infected Dogs. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(1), e3429. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003429>
- Felicori, L., Araujo, S. C., Machado de Ávila, R. A., Sanchez, E. F., Granier, C., Kalapothakis, E., & Chávez-Olórtegui, C. (2006). Functional characterization and epitope analysis of a recombinant dermonecrotic protein from *Loxosceles intermedia* spider. *Toxicon*, 48(5), 509–519. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.06.019>
- Felicori, L., Fernandes, P. B., Giusta, M. S., Duarte, C. G., Kalapothakis, E., Nguyen, C., ... Chávez-Olórtegui, C. (2009). An in vivo protective response against toxic effects of the dermonecrotic protein from *Loxosceles intermedia* spider venom elicited by synthetic epitopes. *Vaccine*, 27(31), 4201–4208. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.04.038>
- Fernandes-Pedrosa, M. de F., Junqueira-de-Azevedo, I. de L. M., Gonçalves-de-Andrade, R.

- M., Kobashi, L. S., Almeida, D. D., Ho, P. L., & Tambourgi, D. V. (2008). Transcriptome analysis of *Loxosceles laeta* (Araneae, Sicariidae) spider venomous gland using expressed sequence tags. *BMC Genomics*, 9, 279. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-279>
- Fernandes Pedrosa, M. de F., Junqueira de Azevedo, I. de L. M., Gonçalves-de-Andrade, R. M., van den Berg, C. W., Ramos, C. R. R., Ho, P. L., & Tambourgi, D. V. (2002). Molecular cloning and expression of a functional dermonecrotic and haemolytic factor from *Loxosceles laeta* venom. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 298(5), 638–645. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12419302>
- Figueiredo, L. F. M., Dias-Lopes, C., Alvarenga, L. M., Mendes, T. M., Machado-de-Ávila, R. A., McCormack, J., ... Chávez-Olórtegui, C. (2014). Innovative immunization protocols using chimeric recombinant protein for the production of polyspecific loxoscelic antivenom in horses. *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*, 86, 59–67. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.05.007>
- Foelix, R. F. (1996). *Biology of spiders*. Oxford University Press. Retrieved from [https://books.google.com.br/books/about/Biology\\_of\\_Spiders.html?id=XUgyqxNKhyAC&redir\\_esc=y](https://books.google.com.br/books/about/Biology_of_Spiders.html?id=XUgyqxNKhyAC&redir_esc=y)
- Forrester, L. J., Barrett, J. T., & Campbell, B. J. (1978). Red blood cell lysis induced by the venom of the brown recluse spider: The role of sphingomyelinase D. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 187(2), 355–365. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(78\)90046-2](https://doi.org/10.1016/0003-9861(78)90046-2)
- Futrell, J. M. (1992). Loxoscelism. *The American Journal of the Medical Sciences*, 304(4), 261–267. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1415323>
- Gremski, L. H., da Silveira, R. B., Chaim, O. M., Probst, C. M., Ferrer, V. P., Nowatzki, J., ... Veiga, S. S. (2010). A novel expression profile of the *Loxosceles intermedia* spider venomous gland revealed by transcriptome analysis. *Molecular BioSystems*, 6(12), 2403. <https://doi.org/10.1039/c004118a>
- Gremski, L. H., Trevisan-Silva, D., Ferrer, V. P., Matsubara, F. H., Meissner, G. O., Wille, A. C. M., ... Veiga, S. S. (2014). Recent advances in the understanding of brown spider venoms: From the biology of spiders to the molecular mechanisms of toxins. *Toxicon*, 83, 91–120. <https://doi.org/10.1016/J.TOXICON.2014.02.023>
- Guilherme, P., Fernandes, I., & Barbaro, K. C. (2001). 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: Official Journal of the International Society on Toxinology*, 39(9), 1333–1342. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11384721>
- Harz-Fresno, I., Manterola, P., Ruíz, M., & Abad, C. (2015). Loxoscelismo cutáneo visceral: actualización en el manejo a propósito de un caso. *Revista Chilena de Infectología*, 32(2), 230–233. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182015000300014>
- Hora, V. P. (2006). *Construção e avaliação da rLTB/SM14: uma quimera recombinante candidata a uma vacina contra esquistossomose e fasciolose*. Universidade Federal de Pelotas. Retrieved from [http://bdtd.ibict.br/vufind/Record/UFPL\\_9b42fbe7a61b77a00fec5822f9c1c761](http://bdtd.ibict.br/vufind/Record/UFPL_9b42fbe7a61b77a00fec5822f9c1c761)
- Hubbard, J. J., & James, L. P. (2011). Complications and Outcomes of Brown Recluse Spider Bites in Children. *Clinical Pediatrics*, 50(3), 252–258. <https://doi.org/10.1177/0009922810388510>
- Isbister, G. K., & Fan, H. W. (2011). Spider bite. *The Lancet*, 378(9808), 2039–2047. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)62230-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)62230-1)

- Jia, B., & Jeon, C. O. (2016). High-throughput recombinant protein expression in *Escherichia coli*: current status and future perspectives. *Open Biology*, 6(8).  
<https://doi.org/10.1098/rsob.160196>
- Kalapothakis, E., Araujo, S. C., de Castro, C. S., Mendes, T. M., Gomez, M. V., Mangili, O. C., Chávez-Olórtegui, C. (2002). Molecular cloning, expression and immunological properties of LiD1, a protein from the dermonecrotic family of *Loxosceles intermedia* spider venom. *Toxicon : Official Journal of the International Society on Toxinology*, 40(12), 1691–1699.  
 Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12457881>
- Kotresha, D., & Noordin, R. (2010). Recombinant proteins in the diagnosis of toxoplasmosis. *APMIS*, 118(8), no-no. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2010.02629.x>
- Kurpiewski, G., Campbell, B. J., Forrester, L. J., & Barrett, J. T. (1981). Alternate complement pathway activation by recluse spider venom. *International Journal of Tissue Reactions*, 3(1), 39–45. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7287056>
- Kurpiewski, G., Forrester, L. J., Barrett, J. T., & Campbell, B. J. (1981). Platelet aggregation and sphingomyelinase D activity of a purified toxin from the venom of *loxosceles reclusa*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 678(3), 467–476.  
[https://doi.org/10.1016/0304-4165\(81\)90128-8](https://doi.org/10.1016/0304-4165(81)90128-8)
- Lee, S., & Lynch, K. R. (2005). Brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*) venom phospholipase D (PLD) generates lysophosphatidic acid (LPA). *Biochemical Journal*, 391(2), 317–323. <https://doi.org/10.1042/BJ20050043>
- Málaque, C. M. S., Castro-Valencia, J. E., Cardoso, J. L. C., França, F. O. de S., Barbaro, K. C., & Hui, W. F. (2002). Clinical and epidemiological features of definitive and presumed loxoscelism in São Paulo, Brazil. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 44(3), 139–143. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652002000300005>
- Malaque, C. M. S., Santoro, M. L., Cardoso, J. L. C., Conde, M. R., Novaes, C. T. G., Risk, J. Y., ... Fan, H. W. (2011). Clinical picture and laboratorial evaluation in human loxoscelism. *Toxicon*, 58(8), 664–671. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.09.011>
- Maria, W. S., Cambuy, M. O., Costa, J. O., Velarde, D. T., & Chávez-Olórtegui, C. (1998). Neutralizing potency of horse antiothropic antivenom. Correlation between in vivo and in vitro methods. *Toxicon*, 36(10), 1433–1439. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(98\)00077-4](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(98)00077-4)
- Maria, W. S., Velarde, D. T., Alvarenga, L. M., Nguyen, C., Villard, S., Granier, C., & Chávez-Olórtegui, C. (2005). Localization of epitopes in the toxins of *Tityus serrulatus* scorpions and neutralizing potential of therapeutic antivenoms. *Toxicon : Official Journal of the International Society on Toxinology*, 46(2), 210–217.  
<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.03.024>
- Mendes, T. M., Oliveira, D., Figueiredo, L. F. M., Machado-de-Avila, R. A., Duarte, C. G., Dias-Lopes, C., ... Chávez-Olórtegui, C. (2013). 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), 2749–2755.  
<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.03.048>
- Ministério da Saúde. (n.d.). SINAN: ACIDENTE POR ANIMAIS PEÇONHENTOS - Notificações registradas no Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Brasil. Retrieved March 5, 2018, from <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinannet/cnv/animaisbr.def>
- Murakami, M. T., Fernandes-Pedrosa, M. F., Tambourgi, D. V., & Arni, R. K. (2005). Structural Basis for Metal Ion Coordination and the Catalytic Mechanism of Sphingomyelinases D. *Journal of Biological Chemistry*, 280(14), 13658–13664.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M412437200>

- NEB, N. E. B. (2018). Making your own electrocompetent cells. Retrieved March 12, 2018, from <https://www.neb.com/protocols/2012/06/21/making-your-own-electrocompetent-cells>
- NMBE - World Spider Catalog. (2018). Retrieved March 5, 2018, from <https://wsc.nmbe.ch/genus/3087>
- Oliveira, C. F. B., Vilela, A., Coura, L. A. M., Rodrigues, F. T. G., Nagem, R. A. P., Chávez-Olortegui, C., ... Felicori, L. F. (2016). Protective antibodies against a sphingomyelinase D from *Loxosceles intermedia* spider venom elicited in mice with different genetic background. *Vaccine*, *34*(33), 3828–3834. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.05.039>
- R.S. Furlanetto. (1961). *Estudos sobre a preparação do soro antiloxoscélico. Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil* .
- Ramada, J. S., Becker-Finco, A., Minozzo, J. C., Felicori, L. F., Machado de Avila, R. A., Molina, F., ... Alvarenga, L. M. (2013). Synthetic peptides for in vitro evaluation of the neutralizing potency of *Loxosceles* antivenoms. *Toxicon : Official Journal of the International Society on Toxinology*, *73*, 47–55. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.07.007>
- Ramos, J. D. A., Valmonte, G. R., & de Guia, R. M. (2007). Recombinant proteins and peptides as diagnostic and therapeutic reagents for arthropod allergies. *Protein and Peptide Letters*, *14*(10), 992–1002. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18220997>
- Sahdev, S., Khattar, S. K., & Saini, K. S. (2007). Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies. *Molecular and Cellular Biochemistry*, *307*(1–2), 249–264. <https://doi.org/10.1007/s11010-007-9603-6>
- Saljoughian, N., Taheri, T., Zahedifard, F., Taslimi, Y., Doustdari, F., Bolhassani, A., ... Rafati, S. (2013). Development of Novel Prime-Boost Strategies Based on a Tri-Gene Fusion Recombinant *L. tarentolae* Vaccine against Experimental Murine Visceral Leishmaniasis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *7*(4), e2174. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002174>
- Sandidge, J. S., & Hopwood, J. L. (2009). *Brown Recluse Spiders: A Review of Biology, Life History and Pest Management. Transactions of the Kansas Academy of Science (1903-)* (Vol. 108). Kansas Academy of Science. <https://doi.org/10.2307/20058665>
- Schenone, H., Saavedra, T., Rojas, A., & Villarroel, F. (1989). Loxoscelismo en Chile: estudios epidemiológicos, clínicos y experimentales. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, *31*(6), 403–415. <https://doi.org/10.1590/S0036-46651989000600007>
- Secretaria da Saúde - Paraná. (n.d.). Aranha-Marrom. Retrieved March 5, 2018, from <http://www.saude.pr.gov.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=357>
- Sezerino, U. M., Zannin, M., Coelho, L. K., Gonçalves Júnior, J., Grando, M., Mattosinho, S. G., ... Fan, H. W. (n.d.). A clinical and epidemiological study of *Loxosceles* spider envenoming in Santa Catarina, Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, *92*(5), 546–548. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9861376>
- Theakston, R. D. ., Jane Lloyd-Jones, M., & Reid, H. . (1977). MICRO-ELISA FOR DETECTING AND ASSAYING SNAKE VENOM AND VENOM-ANTIBODY. *The Lancet*, *310*(8039), 639–641. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(77\)92502-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(77)92502-8)
- Theakston, R. D. G., Warrell, D. A., & Griffiths, E. (2003). Report of a WHO workshop on the standardization and control of antivenoms. *Toxicon : Official Journal of the International Society on Toxinology*, *41*(5), 541–557. Retrieved from

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12676433>

Trevisan-Silva, D., Bednaski, A. V., Fischer, J. S. G., Veiga, S. S., Bandeira, N., Guthals, A., ... Carvalho, P. C. (2017). Data Descriptor: A multi-protease, multi-dissociation, bottom-up-to-top-down proteomic view of the *Loxosceles intermedia* venom Background & Summary. <https://doi.org/10.1038/sdata.2017.90>

WHO | What is snakebite envenoming? (2017). *WHO*. Retrieved from <http://www.who.int/snakebites/disease/en/>

WHO | A neglected public health issue. Report of a Consultative Meeting. (2007). *World Health Organization*. Retrieved from [http://www.who.int/bloodproducts/animal\\_sera/Rabies.pdf](http://www.who.int/bloodproducts/animal_sera/Rabies.pdf)

Wright, S., Wrenn, K., ... L. M.-A. of emergency, & 1997, undefined. (1997). Clinical presentation and outcome of brown recluse spider bite. *Annals of Emergency*. Retrieved from [https://www.annemergmed.com/article/S0196-0644\(97\)70106-9/fulltext](https://www.annemergmed.com/article/S0196-0644(97)70106-9/fulltext)