

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

**Tamara Gabriela Fernandes Costa**

***USO DE UMA QUIMERA MULTIEPITÓPICA (rMEPLox) NA PRODUÇÃO DE  
ANTICORPOS MONOCLONAIS CONTRA VENENOS DE ARANHAS DO  
GÊNERO *Loxosceles* spp.***

Belo Horizonte

2022

**Tamara Gabriela Fernandes Costa**

***USO DE UMA QUIMERA MULTIEPITÓPICA (rMEPLox) NA PRODUÇÃO DE  
ANTICORPOS MONOCLONAIS CONTRA VENENOS DE ARANHAS DO  
GÊNERO *Loxosceles* spp.***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como pré-requisito para obtenção do título de Doutora em Bioquímica.

**Orientador: Carlos Delfin Chávez Olórtegui**

Belo Horizonte

2022

043

Costa, Tamara Gabriela Fernandes.

Uso de uma quimera multiepitópica (rMEPLox) na produção de anticorpos monoclonais contra venenos de aranhas do gênero *Loxosceles* spp. [manuscrito] / Tamara Gabriela Fernandes Costa. – 2022.

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

Orientador: Carlos Delfin Chávez Olórtegui.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Departamento de Bioquímica e Imunologia.

1. Bioquímica e imunologia. 2. Venenos de Aranha. 3. *Loxosceles*. 4. Metaloproteases. 5. Anticorpos Monoclonais. 6. Proteínas Recombinantes. I. Olórtegui, Carlos Delfin Chávez. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 577.1



Universidade Federal de Minas Gerais  
 Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG  
 Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha  
 31270-901 – Belo Horizonte – MG  
 e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615



**ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE TAMARA GABRIELA FERNANDES COSTA.** Aos vinte e três dias do mês de março de 2022 às 09:00 horas, reuniu-se de forma “on line” pela plataforma “Zoom”, no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da tese de Doutorado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "Uso de uma quimera multiepitópica (rMEPLox) na produção de anticorpos monoclonais contra venenos de aranhas do gênero *Loxosceles Spp*", requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências: Bioquímica. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Carlos Delfin Chávez Olórtégui, 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. Marcela Nunes de Melo Braga (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Flávio de Almeida Amaral (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dra. Juliana de Moura (Universidade Federal do Paraná), aprovada; Dr. Marcelo de Oliveira Santos (Universidade Federal de Juiz de Fora), aprovada; Dr. Carlos Delfin Chávez Olórtégui - Orientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada:

APROVADA

REPROVADA

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 23 de março de 2022.

Dra. Marcella Nunes de Melo Braga (UFMG)

Dr. Flávio de Almeida Amaral (UFMG)

Dra. Juliana de Moura (Universidade Federal do Paraná)

Dr. Marcelo de Oliveira Santos (Universidade Federal de Juiz de Fora)

Dr. Carlos Delfin Chávez Olórtégui - Orientador (UFMG)

ESTE TRABALHO FOI REALIZADO:

No Laboratório de Imunoquímica de Proteínas, do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG);

E, CONTOU COM O APOIO FINANCEIRO DE:

Departamento de Bioquímica e Imunologia- ICB- UFMG, CAPES, CNPq e FAPEMIG.

## **DEDICATÓRIA**

*A todos que contribuíram com esse trabalho e aos que sempre me apoiaram e estiveram comigo durante essa jornada.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço em primeiro lugar a Deus, por me conceder saúde, perseverança e por iluminar meus caminhos permitindo que eu chegasse até aqui.

À Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) por toda a estrutura e conhecimento fornecido para que esse trabalho fosse realizado.

Ao Departamento de Bioquímica e Imunologia da UFMG, em especial aos professores que tanto contribuíram para obtenção do título de Doutora por proporcionarem tanto conhecimento.

Ao Professor Dr. Carlos Chávez Olortegui por ter me aberto as portas do Laboratório de Imunoquímica de proteínas e ter permitido que fizesse parte da sua equipe me presenteando com esse projeto que amo. Obrigada por estar sempre disposto a ensinar. Com toda certeza, ter você como orientador me fez crescer como pessoa e profissional. Aprendi muito com você e sou eternamente grata por tudo.

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

À Universidade Federal do Paraná (UFPR) por toda a estrutura para a realização de parte desse trabalho.

À Dr. Larissa Alvarenga por ter me acolhido em seu laboratório, Limq, e ter me ensinado a técnica de produção de anticorpos monoclonais. Você foi essencial em minha formação.

À Dr. Clara Guerra por todos os conselhos e colaborações. Você tem toda minha admiração.

Aos amigos do Laboratório de Imunoquímica de proteínas por terem me acolhido e por todo o aprendizado e pelas amizades conquistadas, Raissa, Letícia, Sabrina, Priscila, Sílvio, Rafael, Fernanda, Stephanie, Carol, Dênis, Andressa e Patrícia. Em especial à Thamyres que além de ter se tornado tão amiga é minha dupla científica, quantos experimentos realizamos juntas! Obrigada por estarem sempre dispostos a ajudar e ensinar. Obrigada por todas as correções.

Ao Team Lox, Dr. Sabrina, Ms. Christina e Ms. Rafael por terem produzido à rMEPLox utilizada nesse trabalho.

Aos amigos do Limq, que me receberam tão bem em minha estadia por Curitiba. Em especial à Alessandra Becker, a qual é uma pessoa excepcional e me transmitiu tanto conhecimento, e à Isabella Jiacomini por toda ajuda e companheirismo.

Agracedimento especial ao meu grupo Desabafo, meus amigos tão amados, sem vocês tudo teria sido diferente. Obrigada pelo apoio emocional.

Às minhas Salopes, vivemos ainda vamos viver momentos muito especiais. Amo vocês!

Às minhas amigas Fernanda e Christina, vou levar vocês comigo sempre! Foi muito especial o tempo que convivemos juntas durante essa fase.

Aos meus amigos de Bases Moleculares I e II por todo apoio, parceria e pelos momentos de diversão.

Aos laboratórios e parceiros do ICB, em especial Jamil, por toda a ajuda e por terem cedido equipamentos para a realização desse trabalho.

Ao Caio pela compreensão, paciência e por me dar certeza de que sempre estaria comigo me apoiando. Obrigada pela amizade, carinho, amor e compreensão e por não me deixar desistir, amo muito você!

Aos meus pais João Bosco e Lurdinha e ao meu irmão João Pedro por sempre acreditarem em mim, e por me mostrarem que dificuldades fazem parte de qualquer caminhada, mas que com determinação nós conseguimos conquistar o que almejamos. Vocês sempre estiveram comigo e nunca me faltou amor, ajuda, carinho e confiança. Amo muito vocês, Deus não poderia ter me dado uma família melhor!

Aos meus amados amigos de longa data e às amigadas que conquistei durante a minha trajetória, em especial a Reysla, minha irmã do coração, meu muito obrigada! Os estudos, momentos de descontração, conversas e risadas foram essenciais e tornou tudo mais fácil e feliz.

Aos membros da banca examinadora, por terem aceitado o convite para contribuir com esta tese.

E a todos que de alguma forma contribuíram para este trabalho.

## RESUMO

O Loxoscelismo é um sério problema de saúde pública na América do Sul. No Brasil três espécies são responsáveis pelos maiores números de casos notificados: *Loxocles intermedia*, *Loxosceles laeta* e *Loxoscele gaucho*. O tratamento para esses acidentes se baseia na administração de antivenenos produzidos em animais de grande porte através da imunização com o veneno bruto de *Loxosceles*. Entretanto, existem alguns problemas relacionados à produção de antivenenos como o alto número de animais utilizados e a toxicidade que o veneno causa aos animais produtores. Neste contexto, uma alternativa para melhorar a produção dos antivenenos é o desenvolvimento de anticorpos monoclonais que sejam capazes de neutralizar os efeitos tóxicos dos componentes dos venenos dessas aranhas. Nesse trabalho, uma proteína quimérica multiepitópica (rMEPLox), previamente produzida por nosso grupo, composta por epítomos derivados das principais famílias de toxinas do veneno de *Loxosceles* (fosfolipase, metaloprotease e hialuronidase), foi utilizada como antígeno para produzir anticorpos monoclonais (mAbs). O anticorpo monoclonal anti-rMEPLox selecionado (Lox-mAb3) reconhece metaloproteases do veneno de *L. intermedia*, as quais possuem cerca de 20 kDa, e apresentam reatividade cruzada com metaloproteases dos venenos de outras espécies de *Loxosceles*, *L. laeta* brasileira e peruana e *L. gaucho* através de imunoensaios. A sequência reconhecida por Lox-mAb3 (<sub>184</sub>ENNTRTIGPFDYDSIMLYGAY<sub>205</sub>) corresponde à região C-terminal da metaloprotease do tipo Astacina 1 e a sequência de aminoácidos IGPFDYDSI, conservada entre as sequências homologas de metaloproteases, é importante no reconhecimento do anticorpo. Lox-mAb3 neutraliza, *in vitro*, a atividade fibrinogenolítica das metaloproteases do veneno de *L. intermedia*, o que poderia reduzir os distúrbios hemorrágicos causados pelo envenenamento por *Loxosceles*. Outros mAbs foram produzidos utilizando rMEPLox como antígeno, porém suas capacidades de reconhecimento se limitam apenas a proteína multiepitópica, não reconhecendo o veneno de *Loxosceles*. Nossos resultados demonstram, pela primeira vez, o uso de uma proteína multiepitópica não tóxica na produção de anticorpos monoclonais neutralizantes contra metaloproteases de veneno loxoscélico de importância médica, podendo contribuir no melhoramento da produção de antivenenos terapêuticos contra o loxoscelismo.

**Palavras-chave:** Veneno da aranha *Loxosceles*; Metaloprotease; Anticorpo monoclonal; Proteína recombinante multiepitópica.

## ABSTRACT

Loxoscelism is a serious health issue in the South America. In Brazil three species are involved in the highest notified cases: *Loxocoles intermedia*, *Loxosceles laeta* and *Loxosceles gaucho*. The treatment for these accidents is based on the administration of antivenom produced in animals immunized with *Loxosceles* crude venom. However, there are some issues related to antivenom production, such as the high number of animals used and the toxicity that the crude venom can cause to producer animals. An alternative approach to improve antivenom production is monoclonal antibodies development (mAbs) against spider venoms components, able to neutralize its toxic effects. In this work, a previously produced non-toxic multiepitopic chimeric protein (rMEPLox), composed of epitopes derived from the main toxin families (sphingomyelinase-D, metalloproteases, and hyaluronidases) of *Loxosceles* spider venoms, was used as antigen to produce monoclonal antibodies. A selected anti-rMEPLox mAb (Lox-mAb3) reacted with 20 kDa metalloprotease from *L. intermedia* venom and showed cross-reactivity with metalloproteases from Brazilian and Peruvian *Loxosceles laeta* and *Loxosceles gaucho* venoms in immunoassays. The sequence recognized by Lox-mAb3 (<sub>184</sub>ENNTRTIGPFDYDSIMLYGAY<sub>205</sub>) corresponds to the C-terminal region of Astacin-like metalloprotease 1 and the amino acid sequence IGPFDYDSI, conserved among the homologs metalloproteases sequences, is important for antibody recognition. Lox-mAb3 neutralizes the fibrinogenolytic activity caused by metalloprotease from *L. intermedia* spider venom *in vitro*, which may lead to a decrease in hemorrhagic disturbances caused by *Loxosceles* envenomation. Other mAbs were produced using rMEPLox as antigen, however, although they recognize rMEPLox they did not recognize *Loxosceles* venom. Our results show, for the first time, the use of a non-toxic multiepitopic protein for the production of neutralizing monoclonal antibody against a metalloprotease of the medically important *Loxosceles* venoms. These results contribute for the improvement of therapeutic antivenom production against loxoscelism.

**Keywords:** *Loxosceles* spider venoms; Metalloprotease; Monoclonal antibodies; Multiepitopic recombinant protein.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Araneísmo no Brasil.....	19
Figura 2: Distribuição das espécies de <i>Loxosceles</i> na América do Sul .....	20
Figura 3: Distribuição geográfica dos casos de <i>Loxoscelismo</i> no Brasil em 2019. . . . .	21
Figura 4: Características morfológicas das aranhas <i>Loxosceles</i> .....	22
Figura 5: Proporções relativas de cada grupo de toxina sobre o total de transcritos codificadores de toxinas. ....	23
Figura 6: Curso clínico do <i>loxoscelismo</i> cutâneo.....	27
Figura 7: <i>Loxoscelismo</i> sistêmico. ....	28
Figura 8: Localização dos epítomos selecionados em seus respectivos modelos tridimensionais.....	31
Figura 9: Estrutura do anticorpo. ....	33
Figura 10: Imunorreatividade dos soros de animais imunizados com rMEPLox. ....	48
Figura 11: Imunorreatividade dos sobrenadantes celulares dos hibridomas contra rMEPLox.....	49
Figura 12: Imunorreatividade dos sobrenadantes celulares dos clones contra rMEPLox. ....	50
Figura 13: Imunorreatividade dos sobrenadantes dos subclones contra rMEPLox e o veneno de <i>L. intermedia</i> um mês após a clonagem. ....	50
Figura 14: Caracterização do Lox-mAb3 após o processo de purificação. ....	51
Figura 15: Isotipagem do anticorpo monoclonal Lox-mAb3. ....	52
Figura 16: Imunorreatividade do Lox-mAb3. ....	53
Figura 17: Imunorreatividade do Lox-mAb3 por Western Blot.....	54
Figura 18: Western Blot bidimensional. ....	55
Figura 19: Reatividade cruzada do Lox-mAb3. ....	56
Figura 20: Imunorreatividade entre Lox-mAb3 e venenos de aranhas e serpentes.. ..	57
Figura 21: Mapeamento de epítomos da LALP1 reconhecidos pelo Lox-mAb3 pelo método de SPOT.. ..	59
Figura 22: Alinhamento entre metaloproteases de venenos de <i>Loxosceles</i> . ....	60
Figura 23: AlaninaScan. ....	61
Figura 24: Neutralização de atividade fibrinogenolítica. ....	62
Figura 25: Reatividade dos anticorpos monoclonais contra o veneno de <i>L. intermedia</i> ..	63

Figura 26: Imunorreatividade dos soros anti-rMEPLox contra a proteína recombinante de <i>Loxosceles</i> . .....	64
Figura 27: Mapeamento de epítomos da rMEPLox reconhecidos pelos soros imunes pelo método de SPOT. ....	66
Figura 28: Imunorreatividade dos sobrenadantes celulares do hibridoma 5G5 e dos clones contra rMEPLox. ....	67
Figura 29: Imunorreatividade dos sobrenadantes celulares 5G5H8, 5G5B2 e 5G5B11. ....	68
Figura 30: Imunorreatividade dos sobrenadantes dos subclones contra rMEPLox e o veneno de <i>L. intermedia</i> . ....	68
Figura 31: Imunorreatividade dos mAbs 5G5H8 e 5G5B11 por Western Blot. . ....	70
Figura 32: Imunorreatividade dos mAbs 5G5H8 e 5G5B11 por Western Blot. . ....	71
Figura 33: Mapeamento de epítomos da rMEPLox por SPOT. ....	72

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BCIP	<i>5-bromo-4-cloro-3-indolyl-phosphate</i>
BSA	Soro albumina bovina
CBS	Tampão Citrato Salina
CCDA	Citotoxicidade mediada por células dependentes de anticorpos
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono
CN	Controle Negativo
CP	Controle Positivo
CPPI	Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos
CR	Codições redutoras
CRISP	Proteína Secretora Rica em Cisteína
DAB	Diaminobenzidina
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMF	DimetilFormamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTT	Ditiotreitol
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
F(ab') <sub>2</sub>	Fragmento de de ligação ao antígeno
Fg	Fibrinogênio
FUNED	Fundação Ezequiel Dias
HAT	Hipoxantina, Aminopterina e Timidina
HCl	Ácido Clorídrico
HRP	Horseradish peroxidase
HT	Hipoxantina e Timidina
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
Ig	Imunoglobulina
kDa	Quilodaltons
LALPs	Metaloproteases do tipo astacina
LiD	Toxina dermonecrótica de <i>Loxosceles intermedia</i>
mAb	<i>Monoclonal Antibody</i> – Anticorpo Monoclonal
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de Magnésio
MTT	<i>(3-(4,5-Dimthylthiazol-2-yl)-2</i>

µg	Micrograma
µL	Microlitro
M	Molar
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MM	Massa molecular
NaCl	Cloreto de Sódio
ng	Nanogramas
nm	Nanômetro
OPD	Ortofenilenodiamina
PBS	Tampão Fosfato Salino
pH	Potencial Hidrogeniônico
PI	Pré-Imune
rCpLi	Proteína quimera recombinante de <i>Loxosceles intermedia</i>
rLALP1	Metaloprotease recombinante do Tipo Astacina
rLiD1	Toxina dermonocrótica recombinante de <i>Loxosceles intermedia</i>
rLiHYAL	Hialuronidase recombinante de <i>Loxosceles intermedia</i>
rMEPLox	Proteína recombinante multiepitópica loxoscélica
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS
SFB	Soro Fetal Bovino
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
Smase D	Esfingomielinase D
SR	Condições não redutoras- Sem redução
TCTP	Proteína Tumoral Controlada pela Tradução
TMED	N,N,N',N'-Tetrametil-1,2-diaminometano
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	18
1.1 ACIDENTES POR ANIMAIS PEÇONHENTOS .....	18
1.2 ARANHAS DO GÊNERO <i>Loxosceles</i> .....	21
1.3 COMPOSIÇÃO DO VENENO DE <i>Loxosceles</i> .....	22
1.4 LOXOSCELISMO .....	26
1.5 DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO.....	28
1.5.1 SOROTERAPIA.....	29
1.5.2 ABORDAGENS ALTERNATIVAS PARA A PRODUÇÃO DE ANTIVENENOS .....	30
1.5.3 ANTICORPOS MONOCLONAIS .....	32
2. JUSTIFICATIVA.....	35
3. OBJETIVOS .....	37
3.1 OBJETIVO GERAL.....	37
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	37
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	38
4.1 ANIMAIS, VENENOS E PROTEÍNAS RECOMBINANTES .....	38
4.2 DOSAGEM DE PROTEÍNA.....	38
4.3 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS .....	38
4.3.1 IMUNIZAÇÃO DE CAMUNDONGOS .....	38
4.3.2 REATIVIDADE DOS SOROS IMUNES CONTRA rMEPLox POR ELISA .....	39
4.3.3 CULTIVO DE CÉLULAS DE MIELOMA DE CAMUNDONGO (SP2/0).....	39
4.3.4 OBTENÇÃO DOS HIBRIDOMAS .....	39
4.3.5 SELEÇÃO E CLONAGEM DOS HIBRIDOMAS.....	40
4.4 PURIFICAÇÃO DOS ANTICORPOS MONOCLONAIS .....	41
4.4.1 SDS-PAGE.....	41

4.4.2 ELISA .....	41
4.5 ISOTIPAGEM DOS ANTICORPOS MONOCLONAIS .....	41
4.6 IMUNORREATIVIDADE E REATIVIDADE CRUZADA .....	42
4.6.1 ELISA .....	42
4.6.2 WESTERN BLOT .....	42
4.7 ELETROFORESE BIDIMENSIONAL .....	44
4.7.1 MIGRAÇÃO EM PRIMEIRA DIMENSÃO – ISOELETROFOCALIZAÇÃO (IEF) .....	44
4.7.2 SEGUNDA DIMENSÃO – SDS-PAGE E <i>WESTERN BLOT</i> .....	45
4.8 MAPEAMENTO DE EPÍTOPOS PELO MÉTODO DE SPOT .....	45
4.9 ALANINA SCAN .....	46
4.10 ANÁLISES <i>IN SILICO</i> .....	46
4.10.1 LOCALIZAÇÃO DO EPÍTOPO NA ESTRUTURA 3D DE LALP1 .....	46
4.10.2 ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS HOMOLOGAS DE LOXOSCELES SP. ....	47
4.11 NEUTRALIZAÇÃO DA ATIVIDADE FIBRINOGENOLÍTICA .....	47
5. RESULTADOS.....	48
5.1 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS .....	48
5.2 CLONAGEM DOS HIBRIDOMAS SELECIONADOS .....	49
5.3 ISOTIPAGEM DO LOX-MAB3 .....	51
5.4 IMUNOCARACTERIZAÇÃO DO LOX-MAB3 .....	52
5.5 AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE CRUZADA DO LOX-MAB3 .....	55
5.6 MAPEAMENTO DOS EPÍTOPOS RECONHECIDOS PELO LOX-MAB3 .....	57
5.7 POTENCIAL NEUTRALIZANTE DE <i>Lox-mAb-3</i> .....	61
5.8 CARACTERIZAÇÃO DOS DEMAIS ANTICORPOS MONOCLONAIS .....	62
5.9 PRODUÇÃO DE NOVOS ANTICORPOS MONOCLONAIS .....	63

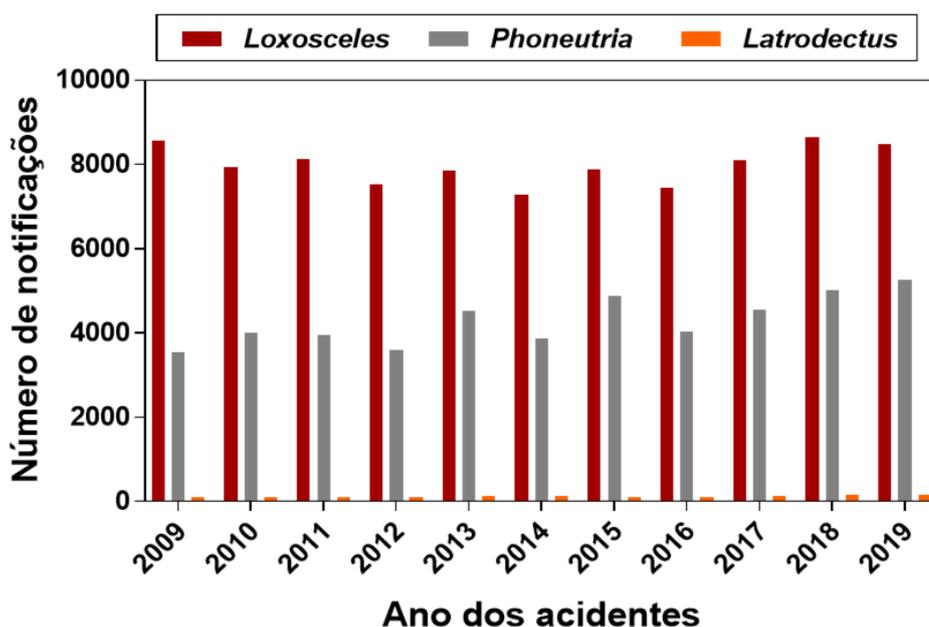
5.9 IMUNORREATIVIDADE DOS mAbs CONTRA AS PROTEÍNAS DO VENENO DE <i>L. intermedia</i> .....	67
5.10. REATIVIDADE DOS mAbs 5G5H8 E 5G5B11 CONTRA rMEPLox POR SPOT .....	71
6. DISCUSSÃO .....	73
7. CONCLUSÕES .....	80
8. PERSPECTIVAS.....	81
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	82
10. ANEXOS.....	90

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 ACIDENTES POR ANIMAIS PEÇONHENTOS

Acidentes por animais peçonhentos são um sério problema de saúde pública no mundo. No Brasil, o número de notificações aumentou significativamente nos últimos dez anos, e por essa razão, esses acidentes entraram na lista nacional de doenças de notificação compulsória. Dentre os animais envolvidos, o maior número de notificações refere-se aos acidentes envolvendo escorpiões, aranhas e serpentes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020). As aranhas representam a segunda maior causa de acidentes notificados, com cerca de 38 mil envenenamentos. Dentre esses envenenamentos, cerca de 14 mil casos são associados a acidentes com aranhas dos gêneros *Loxosceles* (aranha marrom), *Phoneutria* (armadeira) e *Latrodectus* (viúva negra), sendo, por esta razão, considerados os três gêneros de maior importância médica no país (**Figura 1**). De acordo com o Ministério da Saúde, aproximadamente 8.000 casos reportados por ano são identificados como acidentes causados por *Loxosceles* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020). Em 2019, foram computados 8.391 acidentes envolvendo esta aranha (**Figura 1**), sendo que 13 destes casos resultaram em óbito (SINAN, 2021).

Poucos países possuem sistemas que colem, computem e quantifiquem os acidentes ocorridos com animais peçonhentos, e, portanto, acredita-se que o número de casos ao redor do mundo seja subestimado (LOPES *et al.*, 2020). Mesmo no Brasil, onde existe um sistema de coleta de dados eficiente, este número tende a não corresponder com a realidade, principalmente porque o gênero e a espécie envolvida nos acidentes não são identificados, ainda há falta de informação nos centros de saúde e a correta identificação da causa do acidente não ocorre. Muitas vezes o acidente loxoscélico é confundido com outras doenças, levando a não computação desses casos pelo Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN).



**Figura 1: Araneísmo no Brasil.** Número de casos de acidentes com aranhas dos gêneros *Loxosceles*, *Phoneutria* e *Latrodectus* notificados no Brasil entre os anos de 2009 a 2019. Adaptado. Ministério da Saúde/SVS - Sistema de Informação de Agravos de Notificação - SINAN Net.

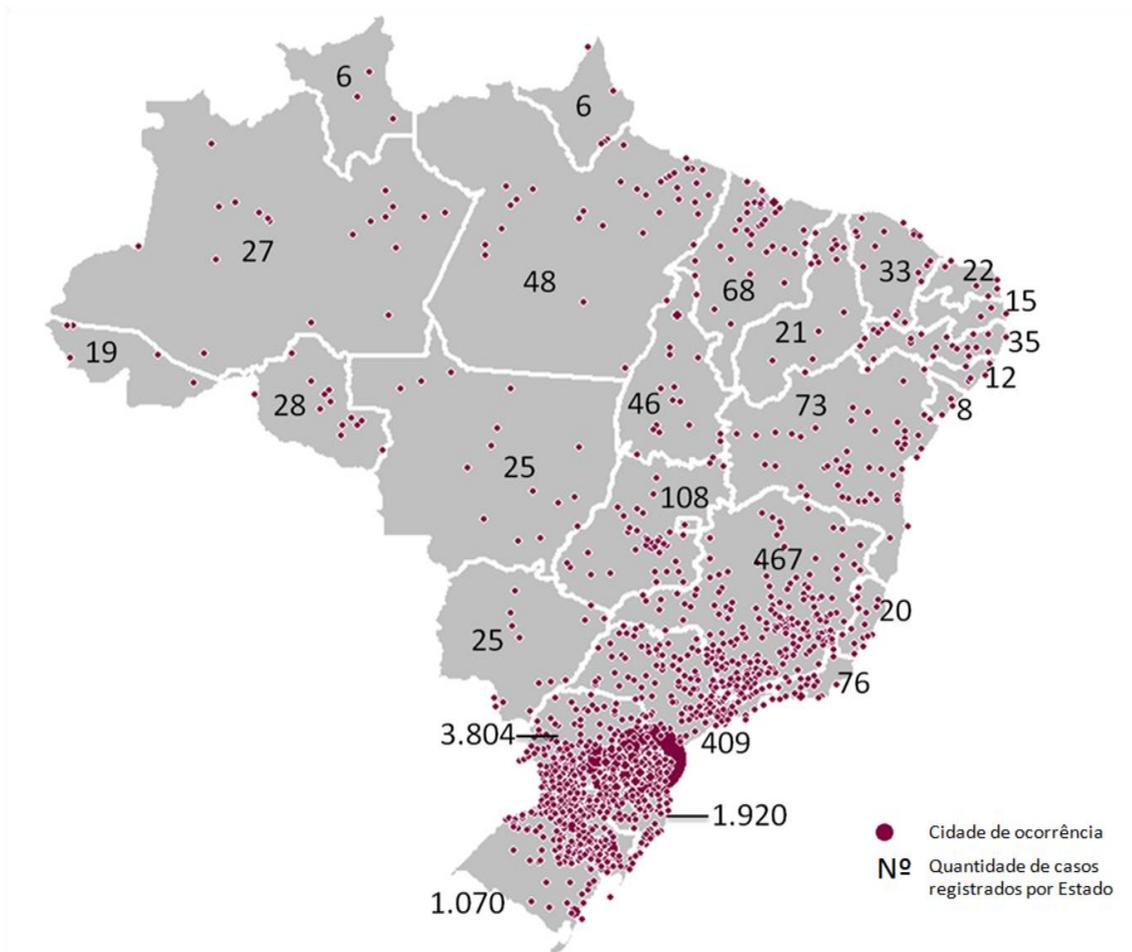
Diferentes espécies de *Loxosceles* já foram reportadas nas América do Sul, Norte e Central, bem como na Europa, África, Oceania e Ásia sendo predominantemente localizadas em regiões tropicais e temperadas. Por estarem extensivamente distribuídas em vários continentes, essas aranhas são responsáveis por casos de envenenamento em todo o mundo. Apesar da distribuição global dessas espécies, casos de envenenamento envolvendo *Loxosceles* são mais comumente reportados nas Américas (BUCH *et al.*, 2015; OLIVEIRAMENDES *et al.*, 2020).

Na América do Norte, *Loxosceles reclusa* e *Loxosceles deserta* são as espécies endêmicas e responsáveis pela maioria das mordidas documentadas. Na América do Sul, *L. laeta* é encontrada em quase todos os países (**Figura 2**) e é de grande importância médica principalmente no Brasil, Chile e Peru. Na Europa e na Ásia, o número de espécies reportadas ainda é limitado (OLIVEIRA-MENDES *et al.*, 2020).



**Figura 2:** Distribuição das espécies de *Loxosceles* na América do Sul (Oliveira-Mendes et al., 2020).

Cerca de 150 espécies de *Loxosceles* já foram encontradas pelo mundo (WORLD SPIDER CATALOG. VERSION 22.0, 2022), sendo 19 destas, encontradas em território brasileiro (**Figura 2**) (OLIVEIRA-MENDES *et al.*, 2020). No entanto, três espécies apresentam maior relevância médica no país por estarem associadas aos casos mais sérios de acidentes por aranhas, sendo elas: *L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta* (MALAQUE *et al.*, 2011; HARO *et al.*, 2012; BUCH *et al.*, 2015). A maioria dos acidentes notificados se concentram nas regiões Sudeste, e principalmente, Sul do país, com foco na cidade de Curitiba, Paraná (**Figura 3**).



**Figura 3:** Distribuição geográfica dos acidentes envolvendo *Loxosceles* no Brasil em 2019. Os círculos correspondem às cidades de ocorrência e os números à quantidade de casos notificados em cada Estado. Mapa gerado com dados do SINAN/ DataSUS, 2021.

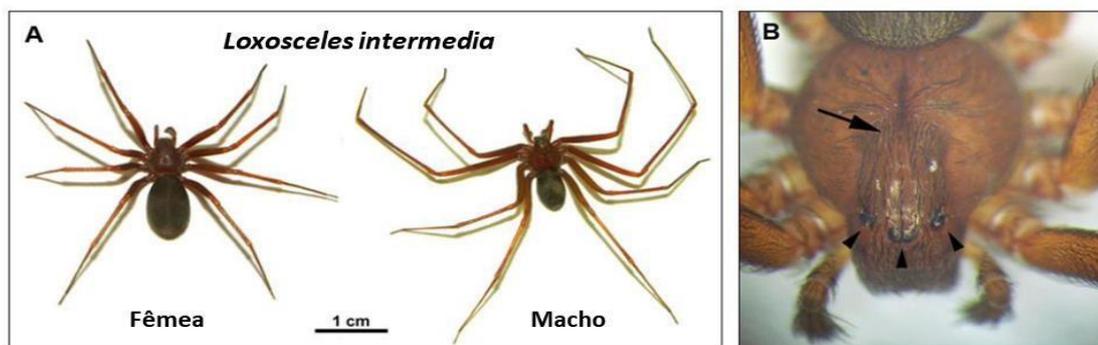
## 1.2 ARANHAS DO GÊNERO *Loxosceles*

As aranhas do gênero *Loxosceles* pertencem à família Sicariidae e são também conhecidas como aranhas marrons, devido a sua coloração, que pode variar entre castanho claro (*Loxosceles laeta*) e marrom escuro (*Loxosceles gaucho*) (DA SILVA *et al.*, 2004). O nome *Loxosceles* refere-se ao posicionamento das suas pernas (pernas inclinadas), e é pronunciado semelhante a isósceles, como um triângulo de “pernas” iguais (GREMSKI *et al.*, 2014).

As *Loxosceles* são pequenos aracnídeos, com cerca de 1 a 5 centímetros de comprimento, incluindo as pernas. Uma estrutura característica desse gênero é o cefalotórax que apresenta uma mancha que se assemelha a um violino, sendo esta característica responsável por também serem conhecidas como aranhas violino (FUTRELL, 1992). Apresentam dimorfismo sexual, sendo as fêmeas maiores que os machos. Possuem seis olhos dispostos em pares em um padrão de semicírculo em forma de U, sendo esse posicionamento ocular descrito como o melhor método de identificar aranhas marrons (Figura 4) (CHAIM *et al.*, 2011). As

aranhas desse gênero vivem em média 3 a 7 anos e atingem a maturidade sexual com 1 ano de idade (CHAIM *et al.*, 2011; DA SILVA *et al.*, 2004; FUTRELL 1992; ISBISTER AND FAN, 2011).

Essas aranhas alimentam-se principalmente de pequenos artrópodes como insetos, formigas e grilos, e vários aracnídeos, como escorpiões e outras aranhas. Na natureza, são encontradas sob rochas, troncos de árvores e restos vegetais. Elas constroem teias irregulares semelhantes a algodão. Não são agressivas, são mais ativas a noite e as áreas urbanas fornecem habitat adequados para aranhas marrons, uma vez que preferem áreas escuras e secas, como porões e garagens. De fato, também são muito bem adaptadas às residências humanas, o que explica a frequência das mordidas (HOGAN *et al.*, 2004; MALAQUE *et al.*, 2016; CHAIM *et al.*, 2011).



**Figura 4: Características morfológicas das aranhas *Loxosceles*.** A) Dimorfismo sexual de *Loxosceles intermedia* B) Seta indica o desenho em forma de violino na face dorsal do cefalotórax. As pontas de setas indicam os três pares de olhos arranjados em semicírculo. Adaptado de (CHAIM *et al.*, 2011).

### 1.3 COMPOSIÇÃO DO VENENO DE *Loxosceles*

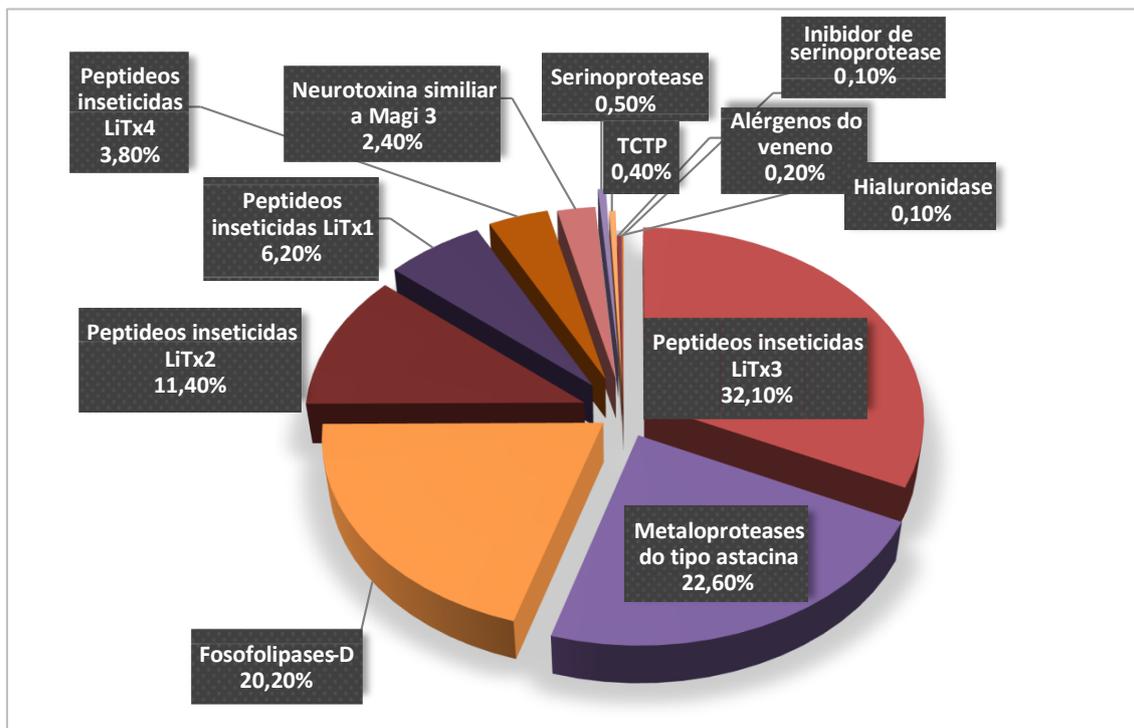
A gravidade dos acidentes se deve à composição do veneno, que ao ser inoculado pode promover alterações em várias funções biológicas na presa/pessoa envenenada. Diversos estudos realizados nos últimos 30 anos sobre os papéis estruturais e biológicos de diversos componentes do veneno mostraram a natureza complexa dessas secreções.

O veneno dessas aranhas é um fluido cristalino composto majoritariamente por uma mistura heterogênea de toxinas proteicas e pequenos peptídeos produzidos por um par de glândulas presente no cefalotórax do animal. O volume do veneno injetado durante uma mordida é cerca de 4  $\mu$ L, que contém entre 60 e 100  $\mu$ g de proteínas (SAMS *et al.*, 2001a; MORGON *et al.*, 2016; GREMSKI *et al.*, 2020). A quantidade e o conteúdo do veneno produzido dependem de vários fatores associados à amostra de aranha, incluindo espécie, tamanho, sexo, estado nutricional e idade (DE OLIVEIRA *et al.*, 2005). O perfil eletroforético do veneno de diferentes espécies desse gênero são semelhantes, podendo variar de 2 a 95 kDa,

sendo que a maioria dos componentes são toxinas de baixa massa molecular (2 a 40 kDa) (VEIGA *et al.*, 2000; GREMSKI *et al.*, 2014; MORGON *et al.*, 2016).

Análises transcriptômicas revelam que a glândula de veneno de *L. intermedia* é majoritariamente composta por peptídeos inseticidas (LiTx 1, 2, 3 e 4), o que é consistente com os hábitos alimentares dessas aranhas. Conhecidas como Knottinas, esses peptídeos são ricos em cisteína estabilizados por pontes dissulfeto e apresentam massa molecular em torno de 5.6 a 7.9 kDa. Atuam especificamente em canais iônicos ou receptores de membrana no sistema nervoso, paralisando a presa e levando-a a morte (GREMSKI *et al.*, 2010; GREMSKI *et al.*, 2021).

A proporção de transcritos que codificam fosfolipases e metaloproteases do tipo astacina são semelhantes, seguidos por toxinas com menor expressão, mas não menos importantes, como as hialuronidasas (**Figura 5**) (GREMSKI *et al.*, 2010).



**Figura 5:** Proporções relativas de cada grupo de toxina sobre o total de transcritos codificadores de toxinas. Fonte: Adaptado de GREMSKI *et al.*, (2010).

As fosfolipases do tipo D são as toxinas mais bem estudadas e caracterizadas dos venenos loxoscélicos. Esse fato se deve à sua importância no quadro clínico do envenenamento e por serem consideradas o principal componente tóxico do veneno (DA SILVA *et al.*, 2004). No entanto, tem sido sugerido que todas as manifestações clínicas do acidente loxoscélico são resultado da atividade sinérgica entre todos os componentes do veneno (CHAIM *et al.*, 2011).

Também conhecidas como Esfingomielinase D ou Smase D, essas enzimas catalisam a hidrólise de esfingomielina em ceramida e colina-1 fosfato, ou lisofosfatidilcolina em ácido lisofosfatídico. No entanto, outros fosfolipídeos podem atuar como substrato dessa enzima como Lisofosfatidilcolina, Lisofosfatidilserina e Lisofosfatidilinositol. Essa enzima possui a habilidade de clivar esses fosfolipídeos entre as ligações fosfato e porções hidrofílicas (TAMBOURGI *et al.*, 1998). O ácido lisofosfatídico induz respostas biológicas e patológicas como agregação plaquetária, hiperpermeabilidade endotelial e respostas próinflamatórias (VAN MEETEREN *et al.*, 2004). Essas toxinas também são responsáveis pela maioria dos efeitos locais e sistêmicos observados no envenenamento, apresentando um papel significativo na dermonecrose e hemólise observadas após o acidente, as quais são dependentes de produtos bioativos produzidos pelo metabolismo dos fosfolipídeos de membrana após atividade enzimática. São responsáveis também pela massiva resposta inflamatória, insuficiência renal aguda (a qual pode ser associada à hemólise) e trombocitopenia (FUTRELL, 1992; GREMSKI *et al.*, 2010; GREMSKI *et al.*, 2020).

As Fosfolipases D apresentam massa molecular em torno de 35 kDa, são altamente expressas nos venenos loxoscélicos e são encontradas em diferentes isoformas. Através de análise transcriptômica da glândula do veneno de *L. laeta* e *L. intermedia*, foi possível observar que cerca de 16,4% e 20,2%, respectivamente, dos transcritos analisados, correspondem a Smase D (FERNANDES-PEDROSA *et al.*, 2008; GREMSKI *et al.*, 2010).

Outra classe de enzimas importantes no quadro de envenenamento são as metaloproteases. Os membros dessa família são proteases multifuncionais caracterizadas por apresentarem uma sequência consenso de aminoácidos HEXXHXXGXXHE em seu sítio ativo, na qual está localizada o domínio de ligação ao zinco, e uma sequência MXY, denominada *Met-turn*, sendo ambos os elementos chave para a função dessas enzimas (BODE, 1993).

Gremski e colaboradores (2010) observaram que as metaloproteases compreendem mais de 22% dos transcritos analisados em veneno de *L. intermedia*. Essas moléculas, presentes nos venenos loxoscélicos, são homólogas às enzimas digestivas astacinas de lagostin *Astacus astacus* e por essa razão, são denominadas LALPs (*Loxosceles astacin-like proteinase*) (TREVISAN-SILVA *et al.* 2010). Três isoformas dessa enzima foram identificadas no veneno de *L. intermedia* (LALPs 1, 2 e 3), e de acordo com os dados publicados por Gremski e colaboradores (2010), essas enzimas são produzidas em diferentes proporções e apresentam funções diversas, sendo a LALP 2 a mais expressa. Outras duas enzimas apresentam sequências de aminoácidos diferentes no domínio de ligação ao zinco, quando comparado às três LALPs já identificadas, o que sugere a presença de mais duas isoformas dessa enzima no veneno de *L.*

*intermedia*. LALP 4 e LALP 5 foram identificadas nos venenos de *L. laeta* e *L. gauchoi*, respectivamente, demonstrando a importância dessa família de toxinas no veneno de *Loxosceles* (TREVISAN-SILVA *et al.*, 2013; GREMSKI *et al.*, 2014).

As LALPs de *L. intermedia* possuem um papel importante na patogênese dos acidentes envolvendo *Loxosceles*, como hemorragia no local da mordida, dificuldade na cicatrização das feridas e podem ainda tornar as estruturas dos tecidos mais permeáveis, facilitando a disseminação de outras toxinas nocivas pelo corpo das vítimas (DA SILVEIRA *et al.*, 2007).

Dois tipos de metaloproteases com especificidade de substrato distintas já foram descritas. Uma enzima com 20-28 kDa possui atividade fibrinogenolítica e fibronectinolítica, responsável pela hemorragia observada no local da mordida, vasodilatação, injúria na parede dos vasos sanguíneos e adesão e agregação plaquetária. A outra metaloprotease identificada, possui massa molecular de 32-35 kDa e apresenta atividade gelatinolítica (FEITOSA *et al.*, 1998; VEIGA *et al.*, 1999).

Outra proteína presente no veneno de *Loxosceles* com importante papel no quadro clínico do loxoscelismo são as hialuronidases. Essas toxinas possuem aproximadamente 43 kDa e pertencem a uma classe de enzimas que degradam o ácido hialurônico, principal componente da matriz extracelular de vertebrados (BERTONI *et al.*, 2007). Mesmo presentes em pequenas quantidades no veneno (menos de 1% dos transcritos), essas enzimas podem atuar como fatores de espalhamento, promovendo a difusão de outras toxinas e aumentando a lesão dermonecrótica (FUTRELL, 1992; DA SILVA *et al.*, 2004; FERRER *et al.*, 2013; De-BONA *et al.*, 2021). A caracterização de uma isorforma recombinante de hialuronidase, demonstrou que a pré-incubação dessa proteína com o veneno levou ao aumento do efeito dermonecrótico em coelhos, o que está de acordo com seu sugerido papel como fator de espalhamento (FERRER *et al.*, 2013; De-BONA *et al.*, 2021).

As serinoproteases possuem entre 85 a 95 kDa, são pouco expressas no veneno de *Loxosceles* e parecem estarem relacionadas à degradação de gelatina. Nenhum outro substrato foi identificado para essa protease até o momento. Existem poucos estudos sobre essa proteína e por essa razão seu papel no envenenamento ainda não está determinado (GREMSKI *et al.*, 2021).

Uma proteína tumoral controlada pela tradução (TCTP), com cerca de 22.3 kDa, também faz parte do veneno e atua como um fator de liberação de histamina dos mastócitos e contribui para a resposta alérgica e inflamatória do loxoscelismo, como eritema, edema, prurido e dor. Apresenta baixo nível de expressão no veneno de *Loxosceles* mas atua de forma sinérgica com as fosfolipases D na indução de edema após o envenenamento (GREMSKI *et al.*, 2021).

## 1.4 LOXOSCELISMO

As toxinas presentes no veneno das *Loxosceles* são altamente ativas contra tecidos de mamíferos podendo desencadear lesões e diferentes manifestações clínicas, as quais são chamadas de Loxoscelismo. Relata-se que a mordida dessas aranhas é indolor e por isso, na maioria das vezes, o paciente não percebe que foi mordido e só recorre ao médico quando se inicia a dor local. A dor, variando de leve a intensa, inicia-se entre 2 e 8 horas após a mordida e, provavelmente, é causada por isquemia secundária ao vasoespasmó (FUTRELL 1992; SWANSON AND VETTER 2006).

O loxoscelismo pode se apresentar em duas formas distintas: a cutânea e a sistêmica. A forma cutânea é a variante clínica mais frequente, na qual o paciente desenvolve uma lesão de pele com um curso relativamente lento, que pode progredir para necrose do tecido. Essas lesões começam a surgir entre 2 e 6 horas após o envenenamento, sendo esses danos caracterizados por edema e eritema no local da mordida, que muitas vezes é diagnosticado como reação alérgica ou infecção (MALAQUE *et al.*, 2016).

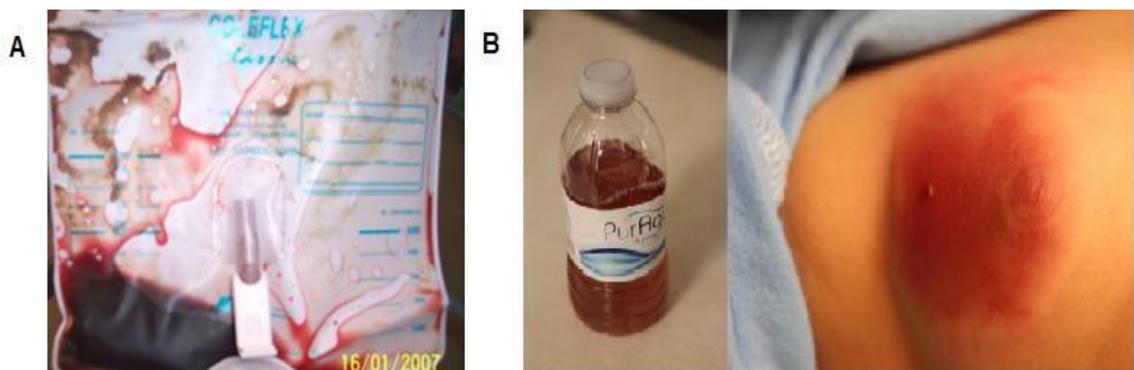
Cerca de 24 a 48 horas após o acidente há progressão dos sintomas para isquemia, equimose, lesão necrótica do tecido, com espalhamento gravitacional e após 3 a 7 dias ocorre formação de uma escara preta (FUTRELL, 1992; WILLIAMS *et al.*, 1995). Na **Figura 6**, observa-se a evolução da lesão após uma criança ter sido envenenada por aranha do gênero *Loxosceles*, em Santa Catarina, Brasil. Vinte e uma horas após o acidente há sinais vermelhos esbranquiçados no local da mordida, que evolui para bolhas hemorrágicas em 68 h. Noventa e seis horas após o envenenamento observa-se a área hiperêmica com hemorragia e com 7 dias houve o aparecimento de lesão necrótica, sendo necessário fazer enxerto no local (LOPES *et al.*, 2020). O tecido necrótico que se desprende posteriormente, deixa uma úlcera que pode levar semanas ou meses para cicatrizar, dependendo da profundidade e extensão da lesão (ISBISTER AND FAN, 2011).

A gravidade das lesões varia de acordo com cada paciente, uma vez que a imunidade, quantidade de veneno recebido e local onde o mesmo foi injetado, são fatores relevantes. Áreas com maior quantidade de tecido adiposo, como coxas, abdome e nádegas, geralmente resultam em piores lesões, devido à ação da fosfolipase sob os lipídeos presentes nessas regiões (FUTRELL, 1992).



**Figura 6: Curso clínico do loxoscelismo cutâneo.** (A) Área vermelho esbranquiçada 21 h após a mordida (B) Lesão com bolha hemorrágica 68h após a mordida (C) Extravasamento da hemorragia e área hiperêmica após 96 h (D) e (E) Lesão necrótica após 7 e 9 dias (F) Lesão local 30 dias após o acidente; sendo necessário cirúrgica e enxerto de pele (LOPES et al., 2020).

O loxoscelismo sistêmico é uma complicação menos frequente, porém mais grave, que ocorre em cerca de 13% dos casos. Usualmente afeta crianças e levam a manifestações como febre, náusea, vômito, fraqueza e desordens hematológicas como hemólise intravascular (**Figura 7A**), trombocitopenia e coagulação intravascular disseminada, provocada pela ação do veneno sobre o fibrinogênio e falência renal, que apesar de rara pode ser fatal (**Figura 7B**) (WILLIAMS *et al.*, 1995; DA SILVEIRA *et al.*, 2002; CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2017).



**Figura 7: Loxoscelismo sistêmico.** (A) Presença de hemoglobina na urina 36 h após o acidente, indicando ocorrência de hemólise (LOPES et al., 2020). (B) Esquerda: Garrafa cheia de urina produzida por paciente. A urina apresenta cor escura o que é indicativo de falência renal. À direita, local do envenenamento, mama direita (ROSEN et al., 2012). Figura adaptada.

## 1.5 DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO

O diagnóstico do loxoscelismo é difícil, não é rotineiro, geralmente presuntivo e é feito através de informações epidemiológicas e evolução do quadro clínico, uma vez que poucos pacientes trazem o agente biológico para sua identificação correta. Além da presença de lesão cutânea no local da mordida, a presença de manifestações sistêmicas no loxoscelismo, pode auxiliar no diagnóstico (MALAQUE *et al.*, 2011; CHAVESMOREIRA *et al.*, 2017).

Muitas doenças são erroneamente diagnosticadas como loxoscelismo. Infecção estafilocócica ou estreptocócica, herpes simples, herpes zoster, úlcera diabética, infecção fúngica, pioderma gangrenoso, papulose linfomatóide, queimadura química, carcinoma espinocelular, neoplasia, vasculite localizada e infecção por *Staphylococcus aureus* são alguns exemplos, o que dificulta ainda mais seu diagnóstico (SWANSON AND VETTER 2006). Dessa forma, sinais e sintomas, dados epidemiológicos e históricos além da identificação da aranha responsável pelo envenenamento são a base para o diagnóstico do loxoscelismo.

O atraso na busca de atendimento médico pelos pacientes (aproximadamente 24 horas após a mordida da aranha) pode contribuir ainda mais para a extensão do dano tecidual local, porque a necrose cutânea e os sintomas clínicos sistêmicos induzidos pelo veneno são irreversíveis e iniciam-se poucas horas após o envenenamento (DA SILVA *et al.*, 2004; HOGAN *et al.*, 2004). Notavelmente, o tipo e a eficácia do tratamento são influenciados pela quantidade de tempo entre a mordida da aranha e o diagnóstico (MALAQUE *et al.*, 2016).

Diferentes terapias são utilizadas pelo mundo, mas não há um consenso sobre o melhor tratamento. Em alguns países a terapia se baseia em corticosteróides, dapsona, antihistamínicos, antibióticos e excisão cirúrgica (SWANSON AND VETTER 2006). Outro tratamento disponível é o uso de antivenenos derivados de cavalos, que são empregados no Brasil, Argentina, México (usa-se F(ab')<sub>2</sub>) e Peru (anticorpos inteiros) (DA SILVA *et al.*, 2004; PAULI *et al.*, 2009; ISBISTER AND FAN 2011). No entanto, devido à falta de ensaios clínicos, as evidências para comprovar o uso de qualquer um desses métodos são escassas (MALAQUE *et al.*, 2016). O melhor tipo de terapia continua sendo debatido, porém um tratamento definitivo ainda não foi estabelecido.

### 1.5.1 SOROTERAPIA

No Brasil, antivenenos loxoscélicos têm sido produzidos desde os anos de 1960 (FURLANETTO, 1961). Atualmente o Ministério da Saúde disponibiliza dois tipos de antivenenos: o soro antiloxoscélico, produzido pelo Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos do Estado do Paraná (CPPI), que utiliza anticorpos contra os venenos de *L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta*, e o soro antiaracnídico produzido pelo Butantan, São Paulo, o qual possui anticorpos contra as aranhas *L. gaucho*, *Phoneutria nigriventer* e o escorpião *Tityus serrulatus* (PAULI *et al.*, 2006). Há dois outros centros produtores de soros antiloxoscélico na América: Instituto Nacional de Salud, em Lima, Peru, e Instituto Bioclon, no México (HOGAN *et al.*, 2004).

Os antivenenos são produzidos através da hiperimunização de cavalos (devido ao grande volume de sangue que pode ser coletado) com venenos brutos. Para as imunizá-los é necessário a extração de grande quantidade de veneno, um processo dispendioso, que requer mão de obra especializada e tem baixo rendimento, principalmente se tratando de veneno de aranhas (CALABRIA *et al.*, 2019).

Desde as últimas décadas do século de 19, a terapia contra acidentes loxoscélicos se baseia em utilizar imunoglobulinas presentes no plasma de cavalos imunizados, após seu processamento. Os antivenenos são administrados via endovenosa e a quantidade de ampolas a serem utilizadas varia de acordo com a gravidade clínica do envenenamento (loxoscelismo cutâneo) e é recomendado a todos os pacientes que apresentem a forma sistêmica (BRASIL, 2001). O objetivo da soroterapia é neutralizar a maior quantidade possível de veneno circulante, a fim de evitar complicações sistêmicas (HOGAN *et al.*, 2004). No entanto, além das imunoglobulinas dirigidas aos componentes do veneno, estão presentes no soro IgGs dirigidas a diferentes antígenos que o animal produtor tenha entrado em contato durante sua vida, como antígenos ambientais, microrganismos e parasitas. Como consequência, somente 30% de anticorpos são específicos para os componentes do veneno e estima-se que apenas 5% são neutralizantes (LAUSTSEN *et al.*, 2018). Esses antivenenos de origem animal apresentam desvantagens significativas devido à natureza heteróloga das proteínas que os compõem, as quais podem provocar reações adversas tanto precoce, como reações anafiláticas mediada por IgE ou, mais comumente, pela ativação do sistema de complemento, quando tardia. A grande quantidade de anticorpos antiveneno e anticorpos que produzimos frente às proteínas presentes no soro de cavalo podem formar complexos imunes que se depositam em tecidos alvos, como vasos sanguíneos, glomérulos e articulações. Como resultado da deposição desses

imunocomplexos, há o desencadeamento de inflamação e doença do soro (LAUSTSEN *et al.*, 2016; LAUSTSEN *et al.*, 2018).

Além das reações indesejáveis associadas à soroterapia, o uso de grandes quantidades de animais e venenos para a produção de antivenenos loxoscélicos (tanto em imunizações quanto em testes de potência pré-clínica) representam uma limitação na produção e uso desses anticorpos para fins terapêuticos. Outro fator relevante é o sofrimento que toxicidade dos imunógenos causam aos animais produtores (FIGUEIREDO *et al.*, 2014). Além disso, por nem sempre as proteínas mais tóxicas dos venenos serem as mais imunogênicas, pode-se gerar um antiveneno com baixa capacidade neutralizante (MARIA *et al.*, 2005).

### 1.5.2 ABORDAGENS ALTERNATIVAS PARA A PRODUÇÃO DE ANTIVENENOS

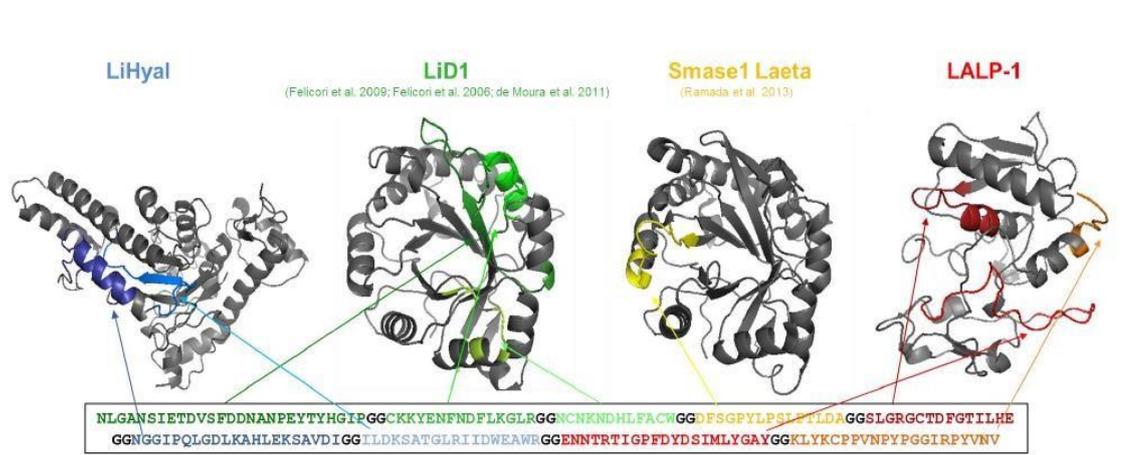
Diante das dificuldades inferidas pela produção e administração dos antivenenos, muitos pesquisadores têm buscado desenvolver novas terapias que visam melhorar a produção de anticorpos e reduzir o número e o sofrimento dos animais produtores.

Pensando nisso, nosso grupo de pesquisa vem, ao longo dos anos, estudando e avaliando o uso de novas técnicas para a produção de anticorpos neutralizantes. Felicori e colaboradores (2009) mapearam seis regiões antigênicas de uma isoforma recombinante de Smase D de *L. intermedia*, denominada rLiD1 (proteína dermonecrótica recombinante de *L. intermedia*), por meio da técnica de *SPOT*, e então os peptídeos referentes a essas regiões foram sintetizados e utilizados como imunógenos para produção de anticorpos em coelhos. Um desses peptídeos sintéticos foi capaz de induzir a produção de anticorpos que neutralizaram de forma parcial a dermonecrose mediada pela ação da Smase D (FELICORI *et al.* 2009). De fato, os anticorpos gerados contra a proteína inteira apresentaram maior potencial neutralizante da atividade dermonecrótica da Smase D. No entanto, é possível que um aprimoramento deste peptídeo ou a seleção de novos peptídeos imunogênicos utilizados em conjunto como imunógenos, poderiam gerar anticorpos com maior capacidade neutralizante.

Duarte e colaboradores (2014) imunizaram cavalos com rLiD1. Ao final das imunizações, anticorpos anti-rLiD1 foram obtidos e seu o potencial neutralizante foi avaliado. Os pesquisadores observaram que esses anticorpos foram capazes de neutralizar os efeitos dermonecróticos do veneno de *L. intermedia* e *L. laeta* (Peru) (DUARTE *et al.*, 2014). Em 2013 uma nova proteína recombinante foi construída por Mendes e colaboradores (2013), denominada Proteína Quimera Recombinante de *Loxosceles intermedia* (rCpLi), a qual contém três epítomos de Smase D (LiD1) (NLGANSIETDVSFDDNANPEYTYHGIP,

NCNKNDHLFACW e CKKYENFNDFLKGLR). Essa proteína quimérica apresenta a vantagem de possuir somente os epítomos mais imunogênicos presentes na fosfolipase D e, ao contrário de rLiD1, não possui atividade dermonecrótica. Isso a torna um melhor imunógeno por não apresentar toxicidade aos animais. Figueiredo e colaboradores (2014) utilizaram a rCpLi na imunização de cavalos (9 doses) no CPPI, combinado a 3 doses iniciais de uma mistura de venenos de *L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta*. Os anticorpos gerados a partir desse protocolo de imunização apresentaram a mesma reatividade quando comparado ao antiveneno tradicional e neutralizaram a atividade dermonecrótica dos venenos das espécies de *Loxosceles* de importância médica no Brasil. Essa estratégia de imunização reduziu em aproximadamente 67% a quantidade de veneno bruto de *Loxosceles spp.* em comparação com o protocolo de imunização tradicional, o que é promissor no desenvolvimento de antivenenos loxoscélicos, com uma consequente redução da devastação da fauna de aracnídeos.

Posteriormente, uma nova proteína recombinante foi desenvolvida a partir de rCpLi, com o objetivo de também direcionar a produção de anticorpos contra outras toxinas do veneno e não somente contra fosfolipase D. Assim, adicionou-se novos epítomos à sequência da rCpLi, dando origem à Proteína Recombinante Multiepitopica de *Loxosceles* (rMEPLox). Essa proteína contém um epítopo de Smase D de *L. laeta*, caracterizado por Remada *et al.* (2013), três epítomos lineares de LALP1 e dois de hialuronidase, além das três sequências de Smase D de *L. intermedia* já presentes na rCpLi (**Figura 8**). Devido à sua composição, o uso da rMEPLox como imunógeno é vantajoso em relação a rCpLi, uma vez que é possível produzir um soro com maior capacidade neutralizante das atividades das toxinas de maior importância médica.

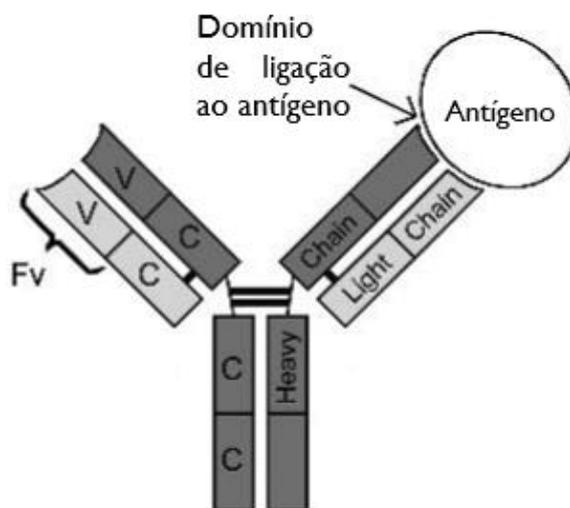


**Figura 8: Localização dos epítomos selecionados em seus respectivos modelos tridimensionais.** As estruturas 3D da LiHYAL, LiD1 e LALP-1. A sequência da rMEPLox está descrita abaixo das estruturas das proteínas. Os epítomos selecionados estão coloridos de acordo com a molécula a qual pertencem e foram conectados a localização espacial por setas. Os espaçadores de duas glicinas foram mostrados em preto na sequência (LIMA et al. 2018).

Lima e colaboradores (2018) demonstraram em ensaios de neutralização *in vivo* e *in vitro* que anticorpos anti-rMEPLox foram capazes de neutralizar a atividade de Smase D, hialuronidase e metaloprotease do veneno de *L. intermedia*. Além disso, essa proteína não apresenta atividade tóxica e pode ser produzida em larga escala, o que a torna um imunógeno interessante para a produção de antivenenos (LIMA *et al.* 2018). Técnicas biotecnológicas modernas para a geração, isolamento e produção de anticorpos monoclonais (mAbs) ou fragmentos de anticorpos também vem sendo aplicadas no desenvolvimento experimental de antivenenos contra picadas de animais peçonhentos (Laustsen *et al.*, 2016). Devido às vantagens que a rMEPLox apresenta, essa proteína foi escolhida no presente estudo para ser utilizada como imunógeno em camundongos Balb/c, para posterior produção de anticorpos monoclonais, com o objetivo de se desenvolver um antiveneno experimental.

### 1.5.3 ANTICORPOS MONOCLONAIS

Os anticorpos são proteínas que atuam como principais efetores do sistema imune adaptativo e tem sido extensivamente utilizados tanto no diagnóstico quanto tratamento de diversas doenças. Também chamados de imunoglobulinas (Ig), os anticorpos são produzidos por linfócitos B e possuem duas cópias idênticas de cadeia pesada (~55 kDa) e leve (~25 kDa) as quais são mantidas juntas por ligação de sulfeto. A molécula inteira possui cerca de 150 kDa. As cadeias leves e pesadas possuem regiões variáveis na porção amino terminal as quais se ligam à respectivos epítomos presentes no antígeno (**Figura 9**) (LIPMAN *et al.*, 2014). Nos mamíferos existem cinco classes de Ig: IgG, IgM, IgD, IgE e IgA, em alguns mamíferos IgG e IgA são ainda subdivididas em subclasses ou isotipos, devido a polimorfismos na região da cadeia pesada (ABBAS *et al.*; 2012).



**Figura 9: Estrutura do anticorpo.** A molécula estrutural básica de um anticorpo consiste em uma estrutura em forma de “Y” composta por duas cadeias pesadas e leves idênticas. Cada uma dessas cadeias contém regiões constantes (C) e regiões variáveis (V) ligadas por ligações dissulfeto. Os domínios de ligação ao antígeno residem nas regiões variáveis (LIPMAN et al, 2014).

Os anticorpos reconhecem regiões específicas de um antígeno chamadas epítopos, os quais podem ser lineares ou conformacionais. Epítopos lineares são formados por diversos resíduos de aminoácidos adjacentes. Em contraste, epítopos conformacionais são formados por resíduos de aminoácidos que não estão em uma sequência linear, porém passam a ser espacialmente justapostos quando a proteína assume sua conformação (ABBAS, 2012).

Os anticorpos atuam neutralizando o antígeno através da ligação da região variável ao epítipo, porém a região constante do mAb também medeia várias funções efetoras através da região Fc, incluindo citotoxicidade mediada por células dependentes de anticorpos (CCDA), ativação do complemento e opsonização, o que tornam os anticorpos excelentes no tratamento de diversas doenças (CHOW & CASADEVALL, 2012).

Como a maioria dos antígenos é altamente complexa, eles apresentam numerosos epítopos que são reconhecidos por um grande número de linfócitos. Cada linfócito é ativado para proliferar e se diferenciar em plasmócitos, e a resposta do anticorpo resultante é policlonal. Em contraste, os anticorpos monoclonais (mAbs) são anticorpos produzidos por um único clone de linfócito B. Os mAbs foram reconhecidos pela primeira vez em soros de pacientes com mieloma múltiplo em que a expansão clonal de células plasmáticas malignas produz altos níveis de um anticorpo idêntico resultando em uma gamopatia monoclonal. Em meados da década de 1970, Köhler e Milstein desenvolveram a técnica para gerar anticorpos monoclonais em

laboratório com uma especificidade desejada, pela qual receberam o prêmio Nobel (KÖHLER E MILSTEIN 1975) (LIPMAN *et al.*, 2014).

A publicação Köhler e Milstein (1975) sobre a produção de anticorpos monoclonais murinos pela tecnologia de hibridoma, teve um profundo impacto na medicina, uma vez que os mAbs podem ser usados para fins diagnósticos e terapêuticos. A tecnologia consiste na criação de linhagens celulares híbridas (hibridomas), ao fundir uma célula B secretora de anticorpos específica com uma célula de linhagem tumoral imortalizada (mieloma). Os hibridomas de interesse são selecionados e posteriormente clonados (KÖHLER; MILSTEIN, 1975). Os clones resultantes são imortais e produzirão o mesmo anticorpo com especificidade definida.

São chamados de monoclonais porque as células que o secretam são derivadas de um único clone que produzem e secretam imunoglobulinas idênticas. Ao contrário dos anticorpos policlonais, a vantagem em se utilizar mAbs é que em termos de reprodutibilidade e atividade específica, essa tecnologia atende ao desafio de que 100% de IgGs de um dado antiveneno serão terapêuticos, desde que sua seleção seja feita mediante sua capacidade neutralizante (ALVARENGA *et al.*, 2014). Essa característica seria de grande valia na produção de antivenenos, uma vez que a maior parte das imunoglobulinas presentes nos soros não são direcionadas às toxinas do veneno de interesse.

A desvantagem é que por serem de origem murina, os mAbs também podem desencadear reações adversas em humanos. No entanto, através de técnicas de engenharia genética, é possível criar anticorpos menos imunogênicos, como anticorpos monoclonais quiméricos e humanizados, o que diminuiria consideravelmente a ocorrência de efeitos indesejados (NISSIM AND CHERNAJOVSKY 2008; BUSS *et al.*, 2012).

O desenvolvimento de anticorpos monoclonais ou fragmentos de anticorpos têm sido aplicados no desenvolvimento experimental de antivenenos. Alguns mAbs contra proteínas do veneno de *Loxosceles* foram previamente descritos, como o MoALg<sub>1</sub>, desenvolvido por Guilherme e colaboradores (2001). Esse anticorpo reconhece Smase D de *L. gaúcho* e foi capaz de neutralizar 90% da atividade dermonecrótica do veneno. Nosso grupo de trabalho também produziu dois anticorpos monoclonais, LimAb7 e LiD1mAb16, utilizando como imunógeno o veneno de *L. intermedia* e a proteína recombinante rLiD1, respectivamente. O LimAb7 foi o primeiro anticorpo monoclonal neutralizante contra *L. intermedia* reportado, e é capaz de neutralizar a atividade dermonecrótica *in vivo* mediada por Smase D (ALVARENGA *et al.*, 2003). O LiD1mAb16 reconhece os venenos de *L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta*, mas apresenta inibição parcial dos efeitos tóxicos (DIAS-LOPES *et al.*, 2014). Até o momento foram produzidos anticorpos monoclonais direcionados somente à Smase D. É importante

ressaltar que apesar da importância dessa proteína no envenenamento por *Loxosceles*, essa toxina não é a única responsável pelas manifestações clínicas do loxoscelismo, o que torna relevante o desenvolvimento de anticorpos monoclonais direcionados a outros componentes tóxicos presentes no veneno.

Tendo como base a importância de se neutralizar as atividades tóxicas de outros componentes do veneno e reduzir o número e o sofrimento dos animais utilizados na produção de antivenenos, esse trabalho teve como objetivo produzir anticorpos monoclonais contra outras toxinas do veneno *Loxosceles* através da imunização de camundongo com uma proteína recombinante quimérica não tóxica.

## **2. JUSTIFICATIVA**

Acidentes por animais peçonhentos são um sério problema de saúde pública no mundo. No Brasil, devido ao alto número de notificações, esses acidentes entraram na lista nacional de doenças de notificação compulsória e dentre os animais envolvidos, o maior número de notificações refere a acidentes envolvendo serpentes, escorpiões e aranhas. De acordo com os dados fornecidos pelo SINAN, cerca de 38 mil acidentes causados por aranhas foram

notificados em 2019 no Brasil. Desses casos, 8.391 ocorreram por mordidas de aranhas do gênero *Loxosceles* e 13 óbitos foram declarados devido ao agravo da doença.

As aranhas *L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta* são as espécies de maior importância médica no Brasil. Os acidentes loxoscélicos ocorrem por meio da inoculação do veneno, o qual é uma mistura complexa de peptídeos e proteínas com atividades tóxicas ou não. As Smases D, metaloproteases e hialuronidasas possuem um importante papel no envenenamento humano, uma vez que são responsáveis pela maioria dos sintomas observados no Loxoscelismo, como dermonecrose e espalhamento da lesão, hemorragia, coagulação intravascular disseminada e, em casos mais graves, insuficiência renal. O tratamento mais eficaz para os envenenamentos consiste na administração de antivenenos, que são produzidos, geralmente em cavalos, utilizando venenos inteiros como imunógeno. Poucas melhorias na produção desses antivenenos ocorreram ao longo dos anos. Apesar de serem considerados eficientes, os antivenenos apresentam desvantagens importantes como o alto número de animais utilizados em sua produção e nos ensaios pré-clínicos, reações adversas precoces e tardias (devido à natureza heteróloga das proteínas que o compõem), além do fato que apenas cerca de 5% dos anticorpos gerados possuem potencial neutralizante.

Dessa forma, a tendência atual é a busca por inovações na produção desses soros, visando reduzir o sofrimento e o número de animais utilizados no processo. Neste contexto, nosso grupo de pesquisa construiu, purificou e caracterizou uma proteína recombinante (rMEPLox) não tóxica, contendo apenas epítomos de células B, lineares e/ou conformacionais previamente mapeados nas três principais classes de toxinas (Smase D, metaloproteases e hialuronidase) presentes nos venenos das aranhas do gênero *Loxosceles* relevantes para o envenenamento humano, o que melhora o direcionamento para produção de anticorpos neutralizantes. Com base nessa abordagem, o presente estudo busca a produção de anticorpos monoclonais, utilizando como imunógeno a proteína rMEPLox, com o objetivo de caracterizar os mAbs resultantes e avaliar seu potencial neutralizante em relação às atividades biológicas dos venenos loxoscélicos. Nesse sentido, essa abordagem poderá contribuir no desenvolvimento experimental de antivenenos de nova geração, reduzindo o número e o sofrimento dos animais, além de produzir anticorpos homogêneos e com especificidade definida, o que torna o uso desses mAbs seguro e vantajoso como terapia alternativa ao loxoscelismo.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Produzir e caracterizar anticorpos neutralizantes do veneno de aranhas *Loxosceles* por meio da imunização de animais com uma proteína recombinante.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Produzir anticorpos monoclonais através da técnica do hibridoma, imunizando camundongos Balb/c com a rMEPLox
- Purificar os anticorpos monoclonais obtidos;
- Realizar a isotipagem dos anticorpos monoclonais;
- Determinar a especificidade do anticorpo por meio de ensaios de ELISA e *Western blot*;
- Mapear os epítomos lineares reconhecidos pelo anticorpo escolhido através da técnica de *SPOT*;
- Avaliar o potencial neutralizante dos anticorpos monoclonais através de ensaio *in vitro*;
- Produzir outros monoclonais dirigidos a diferentes toxinas do veneno loxoscélico;

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 ANIMAIS, VENENOS E PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Camundongos Balb/c foram mantidos no Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e receberam água e comida *Ad libitum*. A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (UFMG) n° 45/2020.

Amostras de veneno de *L. intermedia*, *L. laeta* (Brasil) e de *L. gaucho* foram cedidas pelo Dr. João Carlos Minozzo do Centro de Pesquisa e Produção de Imunobiológicos do Paraná (CPPPI). Os venenos de *L. similis* e *P. nigriventer* foram fornecidos pelo Dr. Evanguedes Kalapothakis, da UFMG e o veneno de *L. laeta* (Peru), pelo Dr. Cesar Bonilla do Instituto Nacional de Saúde do Peru. Os venenos das serpentes *Lachesis muta muta* e *Crotalus durissus terrificus* foram fornecidos pela Fundação Ezequiel Dias (FUNED) e de *Bothrops atrox* cedido pelo Prof. Armando Yarlequé Chocas, da Universidade Nacional Mayor de San Marco (Peru). As proteínas recombinantes metaloprotease do tipo astacina (rLALP1) e hialuronidase (rLiHYAL) foram fornecidas pelo Dr. Sílvio Sanchez Veiga da Universidade Federal do Paraná, e a fosfolipase (rLiD1) cedida pelo Dr. Evanguedes Kalapothakis da UFMG. As amostras foram armazenadas a -20 ° C até seu uso.

### 4.2 DOSAGEM DE PROTEÍNA

A dosagem de proteína das amostras utilizadas no presente trabalho foi realizada de acordo com Lowry, utilizando albumina sérica bovina (BSA) como curva padrão (OLIVER H. LOWRY *et al.*, 1951).

### 4.3 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS

#### 4.3.1 IMUNIZAÇÃO DE CAMUNDONGOS

A proteína rMEPLox, utilizada como imunógeno para a produção dos anticorpos monoclonais, foi previamente produzida por nosso grupo de pesquisa (LIMA *et al.*, 2018). Após a coleta do soro pré-imune, cinco camundongos Balb/c fêmeas (6 semanas, 20g) foram imunizados, por via subcutânea, com uma emulsão preparada com 50 µg de rMEPLox diluídos em PBS e adjuvante completo de Freund, na proporção 1:1. A mesma dose foi administrada em adjuvante incompleto de Freund nas três injeções subsequentes, com intervalo de quinze dias entre as imunizações. Sete dias após a última dose de imunógeno, os camundongos tiveram o

sangue coletado e a reatividade dos soros imunes contra rMEPLox foi avaliada por ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA).

Outros cinco camundongos Balb/c foram imunizados com rMEPLox como descrito em Saavedra-Langer e colaboradores (2021). Após a coleta de soro pré-imune, todos os animais receberam uma injeção subcutânea inicial de 50 µg/animal de rMEPLox em adjuvante completo de Freund (SigmaAldrich). Uma dose igual de proteína foi administrada em  $(Al(OH)_3)$  em onze injeções subsequentes, com intervalo de 15 dias. A cada 4 doses os animais tiveram o sangue coletado e a reatividade dos soros foi avaliada por ELISA.

#### **4.3.2 REATIVIDADE DOS SOROS IMUNES CONTRA rMEPLox POR ELISA**

Após o término das imunizações, testou-se a reatividade do soro imune destes animais por ELISA, de acordo com Chávez-Olortegui *et al.* (1991). Para esse fim, placas de 96 poços foram incubadas, *overnight* entre 2 e 8 °C, com 0,5 µg/poço de rMEPLox em tampão bicarbonato de sódio 0,02 M pH 9,6. Após o bloqueio (2% de caseína em tampão fosfato salino - PBS) e lavagem (0,05% de Tween 20 em PBS), soros pré-imune (controle negativo) e imunes foram adicionados em diluição 1:200 e incubados durante 1h a 37 °C. As placas foram lavadas e incubadas com IgG anti-camundongo conjugada com peroxidase *horseradish* (HRP, Sigma-Aldrich) diluída 1:8000 ou 1:10000, durante 1h a 37 °C. Os valores de absorbância foram determinados a 490 nm.

Os camundongos cujo soro apresentou maiores valores de absorbância receberam uma dose reforço, via endovenosa, de 5 µg de rMEPLox diluídos em 50 µL de PBS e foram submetidos à fusão após 3 dias.

#### **4.3.3 CULTIVO DE CÉLULAS DE MIELOMA DE CAMUNDONGO (SP2/0)**

Células sp2/0 foram descongeladas e mantidas em estufa de 37 °C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 1% L-glutamina e 1% penicilina/estreptomicina, de forma a obter-se um número de células ideal para a fusão ( $1 \times 10^7$  células/mL).

#### **4.3.4 OBTENÇÃO DOS HIBRIDOMAS**

Três dias após a dose reforço, o animal que apresentou maior título de anticorpos no ELISA (Animal 1 foi selecionado na primeira produção de mAb e Animal 3 na segunda produção) foi eutanasiado e seu baço foi removido assepticamente. O órgão foi transferido para

uma placa de Petri estéril contendo 5 mL de meio DMEM e cortado em pequenos pedaços, que foram então macerados sobre uma *cell strainer* estéril. O material foi passado novamente por uma *cell strainer* e lavado duas vezes com DMEM, utilizando-se uma centrífuga refrigerada, a 180 g, 4°C por 10 minutos. As células de mieloma, repicadas 24 horas antes, foram lavadas conforme descrito anteriormente, diluídas a  $1 \times 10^7$  /mL, misturadas a todas as células obtidas com a maceração do baço e centrifugadas a 180 g e 4°C por 10 minutos.

Ao sedimento adicionou-se, lentamente, 1 mL de uma solução de polietilenoglicol (PEG) 1500 a 50% (p/v) em DMEM pré-aquecido a 37°C, agitando-se lentamente o tubo por alguns minutos. Após 1 minuto de repouso foram adicionados 20 mL de DMEM divididos em quatro intervalos de 5 minutos agitando-se lentamente. As células foram centrifugadas a 4°C, 800 rpm por 10 minutos e ao precipitado foram adicionados 200 mL de meio seletivo DMEM suplementado com 20% SFB, contendo HAT (Hipoxantina, Aminopterina e Timidina).

A suspensão final foi distribuída em cinco placas de 96 poços (Sarstedt) (200 µL/poço) que foram levadas à estufa a 37°C e atmosfera de CO<sub>2</sub> a 5%. Com o objetivo de verificar quais poços continham hibridomas que secretavam anticorpos, foi realizado o primeiro *screening* quinze dias após fusão. Para isso, placas de 96 poços foram sensibilizadas com rMEPLox (1 µg/poço), e a reatividade dos sobrenadantes celulares de todos os poços (50 µL) foram testados por ELISA. IgG anti-camundongo conjugada à HRP (Sigma-Aldrich), (diluição 1:4000 ou 1:10000), foi utilizada. As placas foram lidas a 490 nm como descrito por Chávez-Olortegui *et al.* (1991).

#### **4.3.5 SELEÇÃO E CLONAGEM DOS HIBRIDOMAS**

As células provenientes dos poços que apresentaram reatividade por ELISA foram contadas e diluídas (1 célula a cada 100 µL) em meio DMEM-HT (Hipoxantina, Timidina) suplementado com 20% de SFB. As células foram distribuídas (100 µL/poço) em cinco placas de cultura celular de 96 poços contendo macrófagos intraperitoneais de camundongos não imunizados. Quinze dias após a clonagem, uma nova seleção por ELISA foi realizada, utilizando-se placas de 96 poços sensibilizadas com rMEPLox (1 µg/poço). O segundo *screening* foi realizado nas mesmas condições do primeiro. Os clones com maior reatividade foram expandidos para garrafas de cultivo celular, a fim de se obter um maior volume de sobrenadante celular para posterior purificação dos anticorpos e caracterização dos mesmos.

#### 4.4 PURIFICAÇÃO DOS ANTICORPOS MONOCLONAIS

Após expansão dos clones, escolheu-se caracterizar o clone 4F5B6, Lox-mAb3, por apresentar, dentre os outros 11 anticorpos selecionados, maior reatividade no ELISA contra rMEPLox e veneno de *L. intermedia* um mês após a fusão. Dessa forma, os demais clones foram congelados em soro fetal bovino contendo 10% de Dimetilsulfóxido (DMSO).

Após obtenção de quantidade significativa de sobrenadante celular (300 mL), foi realizada a purificação dos anticorpos utilizando uma coluna de afinidade de 5 mL contendo proteína G-sepharose (GE Healthcare) em ÄKTA prime plus (GE Healthcare), de acordo com as especificações do fabricante.

##### 4.4.1 SDS-PAGE

Após a purificação, 10 µg de Lox-mAb3 foi submetida à eletroforese, de acordo com o método proposto por Laemmli (1970). Foi utilizado um gel de separação a 10% e um gel de concentração a 4% e a corrida foi realizada a 120V. Como padrão utilizou-se marcador de massa molecular de proteínas da BioRad. O gel foi corado utilizando coomassie Blue.

##### 4.4.2 ELISA

A reatividade do Lox-mAb3 após a purificação foi testada por ELISA de acordo com Chávez-Olortegui *et al.* (1991). Placas de 96 poços foram sensibilizadas com 0,5 µg/poço de rMEPLox e o anticorpo monoclonal foi diluído de forma seriada (0,45 µg a 0,0035 µg). IgG pré-imune (0,45 µg/poço) foi utilizada como controle negativo. IgG anti-camundongo conjugado à HRP (Sigma-Aldrich), diluído 1:8000, foi utilizado como anticorpo secundário. Os valores de absorbância foram determinados a 490 nm.

#### 4.5 ISOTIPAGEM DOS ANTICORPOS MONOCLONAIS

A isotipagem do anticorpo Lox-mAb3, foi realizada utilizando a IsoStrip (Roche), seguindo o protocolo de acordo com as instruções do fabricante. Assim, 1 µg/mL de amostra foi diluída em PBS-1 % BSA e 150 µL dessa solução foram adicionados a um tubo de desenvolvimento por 30 segundos com rápida agitação em vórtex e em seguida a *strip* foi inserida. Após 5 minutos os resultados puderam ser interpretados com o aparecimento de uma banda azul na seção da *strip* contendo o isotipo de IgG ao qual o anticorpo pertence.

## 4.6 IMUNORREATIVIDADE E REATIVIDADE CRUZADA

### 4.6.1 ELISA

Ensaio de imunorreatividade também foram realizados conforme descrito por Chávez-Olortegui *et al.* (1991). A fim de determinar qual proteína presente no veneno de *L. intermedia* o Lox-mAb3 reconhece, placas de 96 poços foram sensibilizadas com 0,5 µg/poço das proteínas recombinantes rMEPLox (controle positivo), rLALP1, rLID1 ou rLiHYAL. Após o bloqueio e lavagem, 0,45 µg de Lox-mAb3 ou IgG pré-imune (controle negativo) foram adicionados e incubados por 1 h a 37° C. IgG anti-camundongo conjugado à HRP (Sigma-Aldrich) (diluição 1:8000) foi utilizado como anticorpo secundário. Os valores de absorbância foram determinados a 490 nm.

Posteriormente, com o objetivo de avaliar a reatividade cruzada de Lox-mAb3 com outros antígenos loxoscélicos, placas de 96 poços foram sensibilizadas com 0,5 µg/poço de rMEPLox (controle positivo) e venenos de *L. intermedia*, *L. gaucho*, *L. laeta* (Brasil) ou *L. laeta* (Peru). Após bloqueio e lavagem, 0,45 µg de Lox-mAb3 ou IgG pré-imune (controle negativo) foram adicionados e incubados por 1 h a 37°C. IgG anti-camundongo conjugado à HRP (Sigma-Aldrich) (diluição 1:8000) foi utilizado como anticorpo secundário. Os valores de absorbância foram determinados a 490 nm.

Para determinar a reatividade dos mAbs 5G5H8, 5G5B2 e 5G5B11 (produzidos na tentativa de desenvolver mAbs contra hialuronidase) contra o veneno de *L. intermedia*, 100 µL dos sobrenadantes celulares dos clones foram utilizados como anticorpo primário. Soro de animal imune a *L. intermedia* na diluição 1/100 foi utilizado como controle positivo e sobrenadante de SP2/0 (100 µL) foi utilizado como controle negativo. IgG anti-camundongo conjugado à HRP (Sigma-Aldrich) (diluição 1:10000) foi utilizado como anticorpo secundário. Os valores de absorbância foram determinados a 490 nm.

### 4.6.2 WESTERN BLOT

Com o intuito de confirmar os resultados obtidos por ELISA e avaliar a massa molecular da proteína reconhecida pelo anticorpo monoclonal, um *immunoblotting* foi realizado de acordo com Laemmli (1970). Foram aplicados 5 µg de veneno de *L. intermedia* (em condições não redutoras) em um gel de poliacrilamida 12,5 %. A corrida foi realizada a 120 V. Como padrão utilizou-se marcador de massa molecular de proteínas (ThermoFisher Scientific).

Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose que, em seguida, foi bloqueada durante 1 hora com PBS-Tween 20, 0,3% (v/v) em temperatura ambiente. Após a lavagem (PBS-Tween 20 0,05 %), a membrana foi incubada com 0,5 µg/mL de Lox-mAb3 em PBS-Tween 20 0,05 % por 1 h em temperatura ambiente. O anticorpo monoclonal não relacionado, mAb4B6E6, contra *Bothrops jararaca*, foi utilizado como controle negativo na mesma concentração e soro anti-loxoscélico (CPPI) diluído 1:1000 foi utilizado como controle positivo. Após o período de incubação a membrana foi novamente lavada, e em seguida incubada por 1h em temperatura ambiente com IgG anti-camundongo conjugado à HRP (Sigma-Aldrich) na diluição de 1:8000 ou IgG anti-cavalo conjugado à HRP (Sigma-Aldrich) na diluição de 1/50000 diluídos em PBS-Tween 20 0,05 %. Após lavagens a reação foi desenvolvida com uma solução de PBS contendo 0,025% de 4-cloro 1-naftol diluído em 1 ml de metanol, 0,05% de diaminobenzidina (DAB) em presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0,04 % (v/v).

A fim de avaliar a reatividade cruzada do anticorpo Lox-mAb3 frente a diferentes venenos de aranhas (*L. gauchoi*, *L. laeta* (Brasil), *L. laeta* (Peru), *L. similis*, *P. nigriventer*) e serpentes (*Bothrops atox*, *Crotalus durissus* e *Lachesis muta*), um novo *immunoblotting* foi realizado. Para isso, 5 µg de cada antígeno (em tampão de amostra não redutor) foram submetidos a SDS-PAGE 12,5%. A corrida foi realizada nas mesmas condições descritas anteriormente.

Após a transferência e bloqueio, a membrana foi incubada com 0,5 µg/mL do LoxmAb3 em PBS-Tween 20 0,05 % por 1h em temperatura ambiente. O ensaio foi conduzido como descrito previamente.

Para avaliar a reatividade dos anticorpos monoclonais, desenvolvidos na primeira tentativa de produzir de mAbs, 1G6A8, 1G6A10, 4F5B2, 4F5G4, 2E5D12, 3B9D3, 4F5D6, 4F5B6, 2E5D8, 2F1B2, 2F1B6, 5G5H8 e 5G5B11 contra o veneno de *L. intermedia*, um novo *Western blot* foi realizado. Foram aplicados 5 µg de veneno de *L. intermedia* (em condições não redutoras) em um gel de poliacrilamida 12,5 %. A corrida foi realizada nas mesmas condições descritas anteriormente. Após a transferência e bloqueio, a membrana foi incubada com 5 mL de cada sobrenadante celular, soro anti-loxoscélico do CPPI na diluição 1:1000, como controle positivo e sobrenadante celular de SP2/0 (5 mL) ou mAB não relacionado mAb4B6E6 (1 µg/ mL), como controle negativo. Como anticorpo secundário foram utilizados IgG anti-camundongo conjugado à HRP (Sigma-Aldrich) na diluição de 1:8000 ou 1:10000 ou IgG anti-cavalo conjugado à HRP (Sigma-Aldrich) na diluição de 1:50000, ambos diluídos em PBS-Tween 20 0,05 %. O ensaio foi conduzido como descrito previamente.

A reatividade dos sobrenadantes celulares 5G5H8 ou 5G5B11 (5 mL) foi avaliada por *Western blot* contra rMEPLox (15 µg), veneno de *L. intermedia* (15 µg), rLALP1 (15 µg) e rLiD1 (15 µg) sob condições não redutoras em gel 12,5%. Após a transferência e bloqueio, a membrana foi incubada com 5 mL de cada sobrenadante celular. Como anticorpo secundário foi utilizado IgG anti-camundongo conjugado à HRP (Sigma-Aldrich) na diluição de 1:10000 diluído em PBS-Tween 20 0,05 %. O ensaio foi conduzido como descrito previamente.

## 4.7 ELETROFORESE BIDIMENSIONAL

### 4.7.1 MIGRAÇÃO EM PRIMEIRA DIMENSÃO – ISOELETROFOCALIZAÇÃO (IEF)

Esta primeira fase foi realizada sobre gel com gradiente de pH imobilizados sobre *strip Immobiline DryStrips Gels* (GE Healthcare) de 7 cm de tamanho, com o intervalo de pH determinado não linear (3-10) utilizando-se o aparelho IPGphor (GE Healthcare) que permite a aplicação de alta voltagem.

No primeiro dia, 50 µg de veneno de *L. intermedia* foram precipitados *overnight* em 3 volumes de acetona, a -20 °C. No segundo dia, a amostra foi centrifugada a 10000xg por 20 min, o sobrenadante foi descartado e o *pellet*, após secagem, foi ressuspenso com 250 µL de tampão de reidratação contendo 7M ureia, 2M tiourea, 2% CHAPS, 0,5% de anfólitos livres (IPG buffer, pH 3-10) e 0,002% de azul de bromofenol.

A amostra em tampão foi disposta em uma canaleta da bandeja de reidratação (IPGbox). A *strip* foi colocada sobre a amostra e incubada por 16 horas a temperatura ambiente e protegida da luz. Ao final da reidratação, a *strip* foi removida da bandeja, posicionada no equipamento Ettan IPGphor (GE Healthcare) e coberta com solução de óleo mineral para a focalização. Em seguida, a focalização isoeétrica (IEF) foi realizada com a seguinte programação: 1ª etapa: 100 V (1 hora); 2ª etapa: 200 V (1 hora); 3ª etapa: 500V (1 hora) com aumento gradual da voltagem; 4ª etapa: 1000 V (1 hora) com aumento gradual da voltagem; 5ª etapa: 3500 V (3:30 horas); 6ª etapa: 500 V (30 minutos) a 20 °C com corrente máxima de 50mA/fita.

Ao término da focalização isoeétrica, imediatamente antes da segunda dimensão, a *strip* com as proteínas eletrofocalizadas foi submetida a uma etapa de equilíbrio. No primeiro passo, a *strip* foi transferida e imersa no tampão de equilíbrio composto de 750 mM Tris-HCl pH 8,8, 6 M de ureia, 30 % glicerol (v/v), 2 % SDS (m/v) e 0,002 % de azul de bromofenol (m/v) contendo 10 mg/mL de DTT por 15 minutos sob leve agitação. No segundo passo, adicionou-se iodoacetamida (25 mg/mL) ao tampão de equilíbrio, o qual oferece proteção as proteínas

contra a reoxidação. A *strip* foi novamente imersa e mantida sob agitação por mais 15 minutos, e então lavadas em tampão Tris-glicina por 5 minutos.

#### 4.7.2 SEGUNDA DIMENSÃO – SDS-PAGE E WESTERN BLOT

A segunda dimensão e o *immunoblotting* foram realizados conforme descrito no item 4.6.2.

#### 4.8 MAPEAMENTO DE EPÍTOPOS PELO MÉTODO DE SPOT

Com o objetivo de mapear os epítopos lineares reconhecidos pelo Lox-mAb3 na metaloprotease do tipo astacina de *L. intermedia*, pentadecapeptídeos sobrepostos por três resíduos de aminoácidos cobrindo toda a sequência da metaloprotease LALP1 (VMPA\_LOXIN, código A0FKN6) foram previamente sintetizados em uma membrana de celulose através da técnica de *SPOT* síntese. Um aparelho de síntese automática ResPep SL (IntavisAG, Bioanalytical Instruments, Alemanha) foi utilizado na síntese seguindo o protocolo descrito por Laune *et al.* (2002).

Para realizar o imunoensaio, a membrana de *SPOT* foi lavada com PBS pH 7.4 e depois bloqueadas com PBS 3% BSA, 5 % sacarose e 0,1% de Tween 20 *overnight*. Posteriormente, a membrana foi novamente lavada e incubada com Lox-mAb3 (1 µg/mL) em tampão de bloqueio por 90 minutos em temperatura ambiente sob agitação.

A ligação de anticorpos foi detectada através da incubação da membrana com IgG anti-camundongo conjugado à fosfatase (Sigma-Aldrich) na diluição de 1:2000, por 1h em temperatura ambiente. Após três lavagens de 10 minutos em PBS e 0,1% de Tween 20, a membrana foi incubada com o substrato BCIP-MTT em 0,4% de MgCl<sub>2</sub> em tampão citrato salina (CBS) pH 7.0 e as regiões reativas da membrana foram visualizadas através do surgimento de precipitados azulados sobre os *SPOTs* contendo peptídeos reconhecidos. A solução permaneceu em contato com a membrana por 30 minutos, sob agitação. A membrana foi digitalizada e a reatividade dos *SPOTs* foi analisada quantificando os *pixels* por meio do *software* Image J.

Após sua utilização, a membrana foi regenerada para que se possa utilizá-la novamente. A regeneração foi iniciada com lavagem utilizando metanol para remover os complexos moleculares precipitados sobre os peptídeos. O tratamento é feito por sucessivas lavagens de 10 minutos, três vezes com dimetilformamida (DMF), três vezes com reagente A (uréia 8M, 1% de SDS, 0,1% de 2-mercaptoetanol), três vezes com reagente B (etanol/água/ácido acético

nas proporções 50:40:10 - vol/vol/vol), e uma última lavagem com metanol ou etanol, para secagem da membrana.

Com o objetivo de mapear os epítomos reconhecidos por 4F5B2, 4F5D6 e 4F5G4 um novo ensaio de *SPOT* foi realizado, utilizando 5 mL dos sobrenadantes celulares de cada clone. O ensaio foi feito sob as mesmas condições do ensaio realizado com Lox-mAb3.

Foi realizado também um ensaio de *SPOT* para avaliar qual epítomo na membrana de LALP1 os anticorpos 5G5H8 e 5G5B11 reconheciam. O ensaio foi feito sob as mesmas condições do ensaio realizado com Lox-mAb3.

Para avaliar se os soros dos animais imunizados com 12 doses de rMEPLox eram capazes de reconhecer os epítomos de hialuronidase, um novo *SPOT* foi feito. Assim, uma membrana de celulose contendo 57 pentadecapeptídeos sobrepostos por 3 resíduos de aminoácidos cobrindo a sequência primária da rMEPLox foi construída, como descrito por Lima et al. 2018, com o objetivo de mapear epítomos de células B lineares. O soro do Animal 1 na diluição de 1:400 foi utilizado e as demais etapas seguiram conforme descrito acima.

#### **4.9 ALANINA SCAN**

A sequência reconhecida pelo Lox-mAb3 na membrana de metaloprotease de *L. intermédia* através do ensaio de *SPOT* (ENNTRTIGPFDYDSIMLYGAY), e 22 análogos de alanina desse epítomo, foram sintetizados. Cada aminoácido foi substituído por uma alanina, um de cada vez, com o objetivo de avaliar a contribuição de cada um deles no reconhecimento da metaloprotease pelo anticorpo monoclonal. O aminoácido glicina foi utilizado para avaliar a contribuição da alanina presente no epítomo.

A construção da membrana foi realizada utilizando o aparelho de síntese automática ResPep SL (IntavisAG, Bioanalytical Instruments, Alemanha) de acordo com o protocolo descrito por Laune *et al.* (2002).

O imunoensaio foi realizado como descrito na seção 4.8.

#### **4.10 ANÁLISES *IN SILICO***

##### **4.10.1 LOCALIZAÇÃO DO EPÍTOPO NA ESTRUTURA 3D DE LALP1**

A localização do epítomo reconhecido pelo Lox-mAb3 foi analisado na estrutura tridimensional de LALP1, disponível no *Swiss Model* (código: A0FKN6, VMPA\_LOXIN). O epítomo identificado foi visualizado utilizando o programa PyMol (*The PyMol Molecular Graphics System*, Versão 2.0 Schrodinger, LLC – <https://pymol.org/2/>).

#### 4.10.2 ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS HOMOLOGAS DE LOXOSCELES SP.

Para analisar se a sequência reconhecida pelo Lox-mAb3 na metaloprotease de *L. intermedia* é conservada em metaloproteases de outras espécies de *Loxosceles sp.* Foi realizado um múltiplo alinhamento de sequências utilizando o *software* Clustal Ômega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). As sequências utilizadas estão disponíveis no Uniprot (<http://www.uniprot.org/uniprot/>): *L. intermedia* LALP1 (A0FKN6), LALP2 (C9D7R2), LALP3 (C9D7R3); *L. laeta* (Brasil) LALP4 (P0DM61); *L. gaucho* (P0DM62) e *L. laeta* (Peru) LALP-LP1 a 8.

#### 4.11 NEUTRALIZAÇÃO DA ATIVIDADE FIBRINOGENOLÍTICA

A habilidade de neutralizar a atividade fibrinogenolítica da metaloprotease do veneno de *L. intermedia* pelo Lox-mAb3 foi avaliada. A proteólise do fibrinogênio foi realizada como descrito por Bello *et al.* (2006), com modificações.

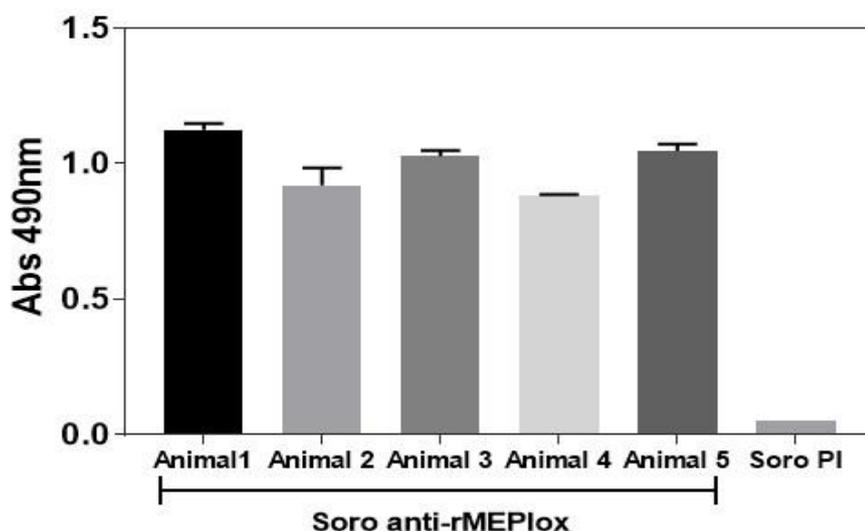
Primeiramente, 3 µg de veneno de *L. intermedia*, em volume final de 50 µL de PBS, foram incubados, por 1h a 37°C, com diferentes concentrações do Lox-mAb3 (5, 25, 50 e 100 µg). Em seguida, adicionou-se 20 µL de solução de fibrinogênio humano a 2,5 mg/mL em tampão Tris-HCl (25 mM Tris, 0,15 M NaCl, pH 7.4), e essa solução permaneceu a 37°C por 16h. Após esse intervalo, uma alíquota de 50 µL foi retirada e a ela adicionado 50 µL de solução desnaturante (10 M uréia, 4 % β-mercaptoethanol, 4% SDS) por 18 h em temperatura ambiente. Foi retirado 20 µL dessa solução final a qual foi analisada em SDS-PAGE 10% sob condições redutoras. O gel foi corado com *Coomassie blue*.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS

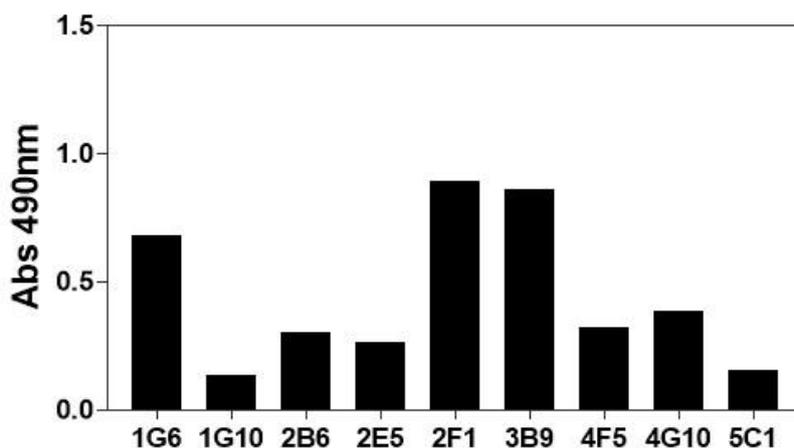
Para a produção dos anticorpos monoclonais, cinco camundongos Balb/c receberam como imunógeno, via subcutânea, 50  $\mu$ g da proteína rMEPLox. Sete dias após a quarta dose, uma amostra de sangue de cada camundongo foi retirada e a reatividade dos soros desses animais contra rMEPLox foi avaliada por ELISA indireto.

Todos os cinco animais imunizados produziram anticorpos contra rMEPLox e o soro do camundongo 1 apresentou maior reatividade frente a essa proteína. Não houve reatividade entre o soro pré-imune, utilizado como controle negativo, e a rMEPLox, demonstrando que o reconhecimento observado entre os soros imunes é específico (**Figura 10**).



**Figura 10: Imunorreatividade dos soros de animais imunizados com rMEPLox.** Placa de microtitulação foi sensibilizada com 0,5 $\mu$ g/poço de rMEPLox. Soro pré-imune (PI), utilizado como controle negativo, e soros anti-rMEPLox de cinco camundongos, diluídos 1:200, foram testados. IgG anti-camundongo (diluição 1:8000) conjugada a HRP foi utilizada como anticorpo secundário. Os valores representam a média das duplicatas. A absorbância das amostras foi determinada a 490 nm.

Como o Animal 1 apresentou maior reatividade, ele foi selecionado para dar continuidade ao processo de produção de anticorpos monoclonais. Sendo assim, este animal recebeu uma dose reforço de 5  $\mu$ g de rMEPLox, via endovenosa. Após três dias, as células do baço do camundongo 1 foram retiradas, fusionadas às células de mieloma (sp2/0) e distribuídas em 5 placas de cultivo celular de 96 poços. Os hibridomas ficaram incubados em estufa de CO<sub>2</sub> a 5% por 15 dias, quando parte do sobrenadante celular foi retirado (50  $\mu$ L) para a realização do primeiro *screening*. Nove poços contendo hibridomas estavam secretando anticorpos, uma vez que apresentaram reatividade contra rMEPLox por ELISA (**Figura 11**).

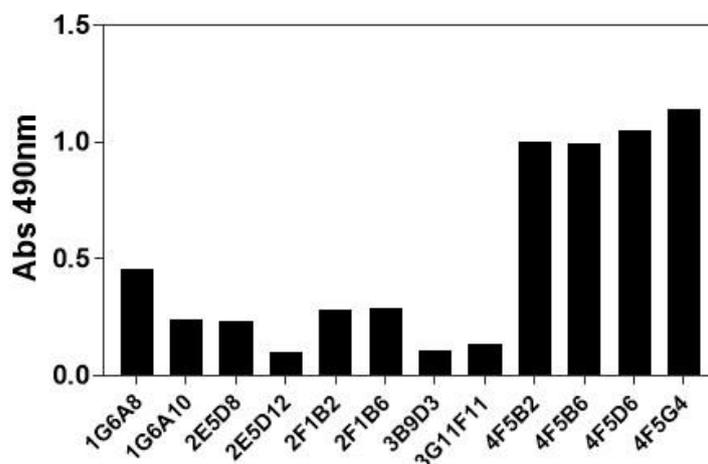


**Figura 11: Imunoreatividade dos sobrenadantes celulares dos hibridomas contra rMEPLox.** Placas de microtitulação foram sensibilizadas com 1µg/poço de rMEPLox. Os sobrenadantes celulares dos hibridomas (50 µL) foram usados como anticorpo primário. IgG anti-camundongo conjugado a HRP (diluição 1:4000) foi utilizada como anticorpo secundário. A absorbância das amostras foi determinada a 490 nm.

## 5.2 CLONAGEM DOS HIBRIDOMAS SELECIONADOS

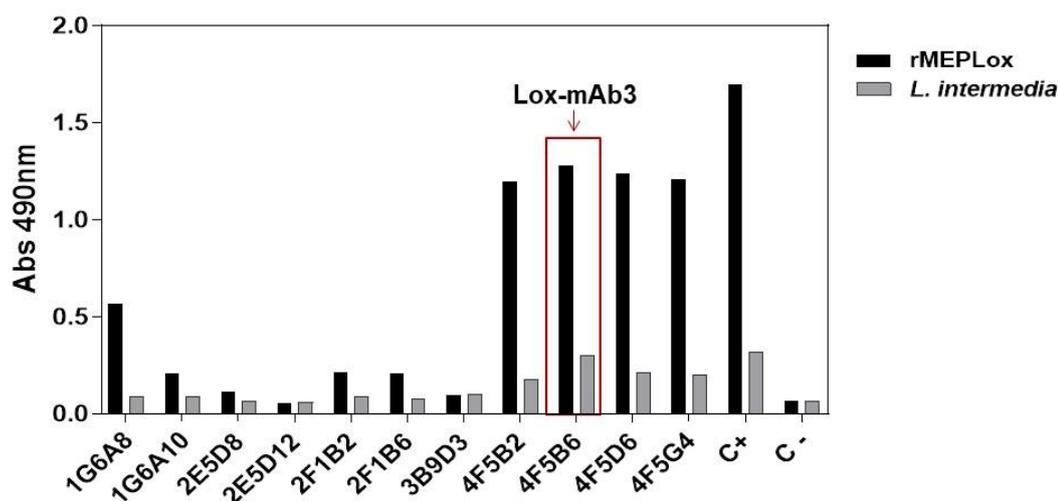
Os nove poços mais reativos (1G6, 1G10, 2B6, 2E5, 2F1, 3B9, 4F5, 4G10 e 5C1) foram então submetidos a uma diluição limitante, de forma que houvesse 1 célula por poço em volume de 100 µL/poço. As células diluídas foram distribuídas em 48 poços (100 µL) de uma placa de cultivo celular de 96 poços e mantidas em estufa de CO<sub>2</sub> a 5 % por quinze dias e em seguida, os sobrenadantes celulares foram coletados para realização de um novo *screening* (realizado da mesma forma que o primeiro). No entanto, antes da retirada dos sobrenadantes celulares, cada um dos poços foi observado e os que apresentavam somente uma colônia de células foram marcados, uma vez que, ao se retirar o sobrenadante as colônias poderiam se soltar dos poços. A presença de uma única colônia por poço indica que, se essas células são produtoras de anticorpos, os mesmos são monoclonais.

Como pode ser observado na **Figura 12**, doze clones apresentaram reatividade frente a rMEPLox no segundo *screening*. Os clones foram nomeados de acordo com o local da placa do qual foram derivados. Tendo mAb4F5B6 como exemplo, o respectivo clone foi derivado de um hibridoma que se localizava na placa 4, no poço F5, originando o nome 4F5. Posteriormente o hibridoma 4F5 foi clonado, e o clone selecionado se localizava no poço B6 da placa, por isso o nome 4F5B6.



**Figura 12: Imunorreatividade dos sobrenadantes celulares dos clones contra rMEPLox.** Placa de microtitulação foi sensibilizada com 1µg/poço de rMEPLox. Os sobrenadantes celulares dos hibridomas (50 µL) foram usados como anticorpo primário. IgG anti-camundongo conjugado a HRP (diluição 1:4000) foi utilizada como anticorpo secundário. A absorbância das amostras foi determinada a 490 nm.

A produção de anticorpos foi monitorada por ELISA indireto em um período de um mês. Dentre os anticorpos monoclonais anti-rMEPLox obtidos, optou-se por dar seguimento à caracterização do mAb4F5B6, uma vez que, quando comparado aos demais, esse anticorpo apresentou reatividade semelhante ao controle positivo no ELISA, frente ao veneno de *L. intermedia* um mês após a clonagem (**Figura 13**). Esse anticorpo foi então nomeado como Lox-mAb3 (o número 3 foi utilizado pois este é o terceiro anticorpo monoclonal contra *Loxosceles* produzido por nosso grupo de pesquisa).

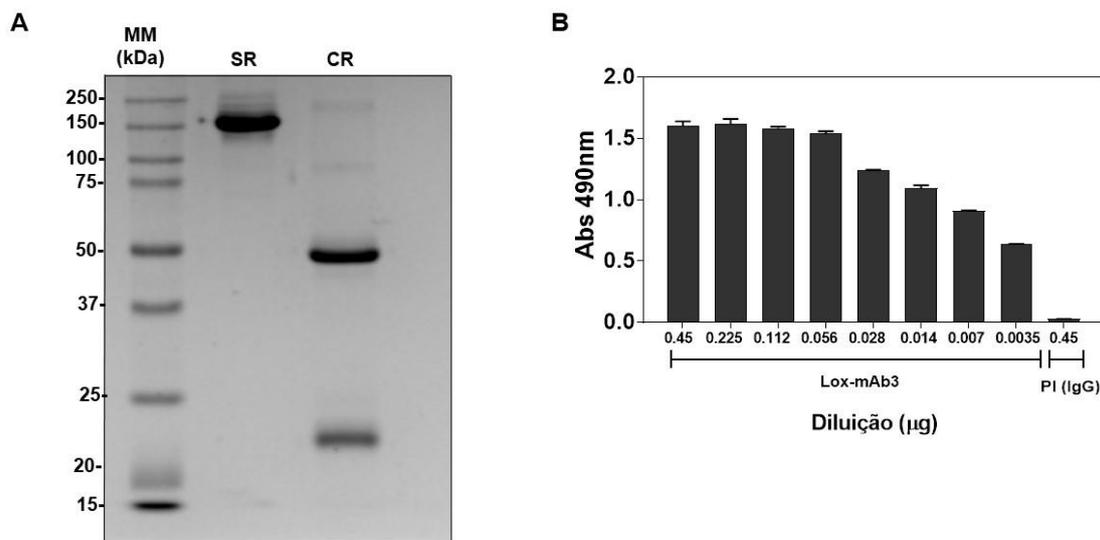


**Figura 13: Imunorreatividade dos sobrenadantes dos subclones contra rMEPLox e o veneno de *L. intermedia* um mês após a clonagem.** Placa de microtitulação foi sensibilizada com 1µg/poço de rMEPLox e veneno de *L. intermedia*. Sobrenadante celular dos clones (50 µL) foi utilizado como anticorpo primário. Soro anti-rMEPLox do camundongo 1 diluído 1:100 foi utilizado como controle positivo e sobrenadante celular de SP2/0 foi usado como controle negativo (50 µL). IgG anti-camundongo conjugado a HRP (diluição 1:4000) foi utilizada como anticorpo secundário. A absorbância das amostras foi determinada a 490 nm.

Dessa forma, as células produtoras de Lox-mAb3 foram expandidas para placas de 24 poços, e posteriormente para garrafas T-25 e T-75. O sobrenadante celular foi recolhido periodicamente e congelado para posterior purificação do anticorpo monoclonal em coluna de proteína G (*GE Healthcare*).

Após a purificação dos anticorpos, um SDS-PAGE 10% foi realizado (**Figura 14A**). É possível observar, em condições não redutoras, a presença de uma banda na faixa de 150 kDa, o que é condizente com a massa molecular de uma IgG inteira. Em condições redutoras observa-se a presença de suas bandas, uma de 50 kDa e outra de aproximadamente 25 kDa, referente às cadeias pesadas e leves de IgG, respectivamente (*ABBAS et al., 2012*).

Posteriormente, avaliamos se o reconhecimento do Lox-mAb3 frente ao antígeno foi afetado pela etapa de purificação e, portanto, um ELISA foi realizado. Foi possível observar que o anticorpo mantém sua reatividade contra rMEPLox após a purificação mesmo na menor concentração do anticorpo utilizada (3,5 ng/poço) (**Figura 14B**).

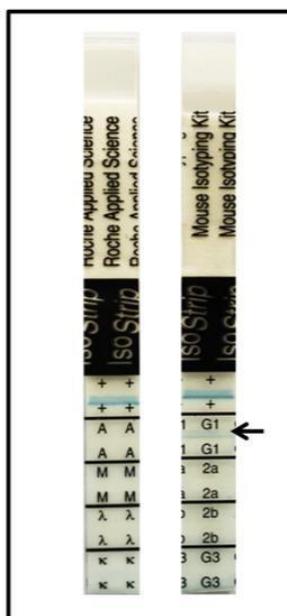


**Figura 14: Caracterização do Lox-mAb3 após o processo de purificação.** **A)** a massa molecular da amostra purificada (10 µg) foi analisada por SDS-PAGE (10%) em condições não redutoras (SR) e redutoras (CR). A corrida foi realizada em 110 V e o gel corado com coomassie Blue. **B)** A reatividade do anticorpo pós purificação foi avaliada por ELISA. Placas de 96 poços foram sensibilizadas com rMEPLox (0,5 µg/poço). Lox-mAb3 foi diluído de forma seriada (0,45 µg até 3,5 ng). IgG pré-imune (0,45 µg) foi utilizada como controle negativo. IgG anti-camundongo conjugada à HRP (diluição 1:8000) foi utilizada como anticorpo secundário. A absorbância das amostras foi determinada a 490 nm.

### 5.3 ISOTIPAGEM DO LOX-MAB3

Em seguida, foi realizado a isotipagem do anticorpo, para verificar a qual classe de imunoglobulinas o mesmo pertence. A técnica faz uso de uma membrana (demonstrada na foto

frente e verso) que possui bandas imobilizadas de anticorpos anti-camundongo correspondente a cada um dos isotipos comuns de anticorpos de camundongo (IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgM e IgA) e para as cadeias leve Kappa e Lambda. Ambos os lados da tira também possuem uma banda de controle positivo (+), o que indica que as esferas revestidas com anticorpo percorreram a tira. O anticorpo monoclonal foi adicionado no tubo de desenvolvimento contém grânulos de látex ligados à anticorpos anti-Kappa e Lambda de camundongos, que reagem com qualquer mAb independente do seu isotipo. O anticorpo percorreu pela membrana até encontrar seu isotipo e formar uma banda azul. Observamos, pelo surgimento da marca azul, que o Lox-mAb3 pertence ao isotipo IgG1 (**Figura 15**).



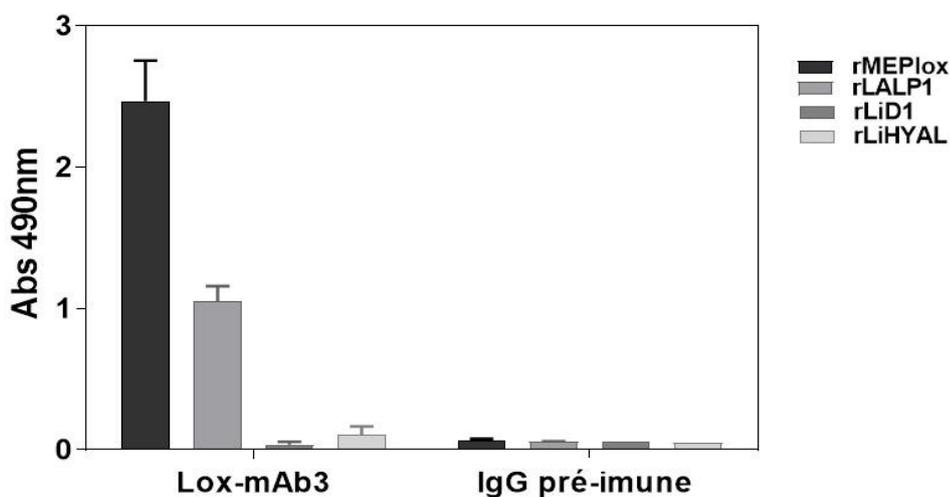
**Figura 15: Isotipagem do anticorpo monoclonal Lox-mAb3.** O ensaio foi realizado de acordo com as instruções do fabricante (Roche). A amostra (1 µg/mL) foi diluída em PBS-1 % BSA e 150 µL dessa solução foi usada. O resultado foi visualizado através do surgimento de uma banda azul.

#### 5.4 IMUNOCARACTERIZAÇÃO DO LOX-MAB3

A fim de determinar qual proteína do veneno de *L. intermedia* o anticorpo monoclonal reconhece, um ELISA foi realizado. Placas de microtitulação foram sensibilizadas com rMEPLox, utilizada como controle positivo, ou com as proteínas recombinantes referentes as principais toxinas envolvidas nos sintomas clínicos observados no loxoscelismo: rLALP1 (metaloprotease), rLiD (smase D) ou rLiHYAL (hialuronidase).

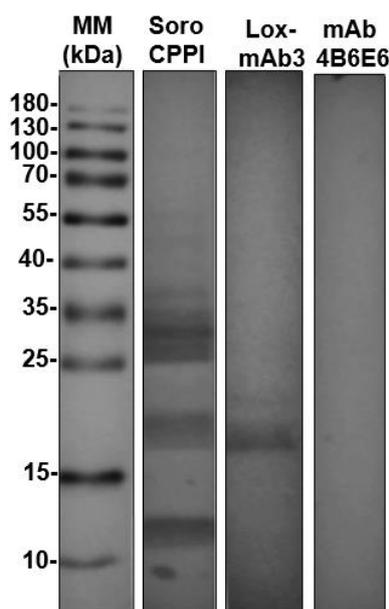
De acordo com os dados apresentados na **Figura 16**, pode-se observar que o mAb reconhece rLALP1 mas não reconhece rLiD ou rLiHYAL. Não houve reatividade entre IgG

pré-imune e essas proteínas, o que indica que o Lox-mAb3 tem especificidade por metaloproteases presentes no veneno de *L. intermedia*.



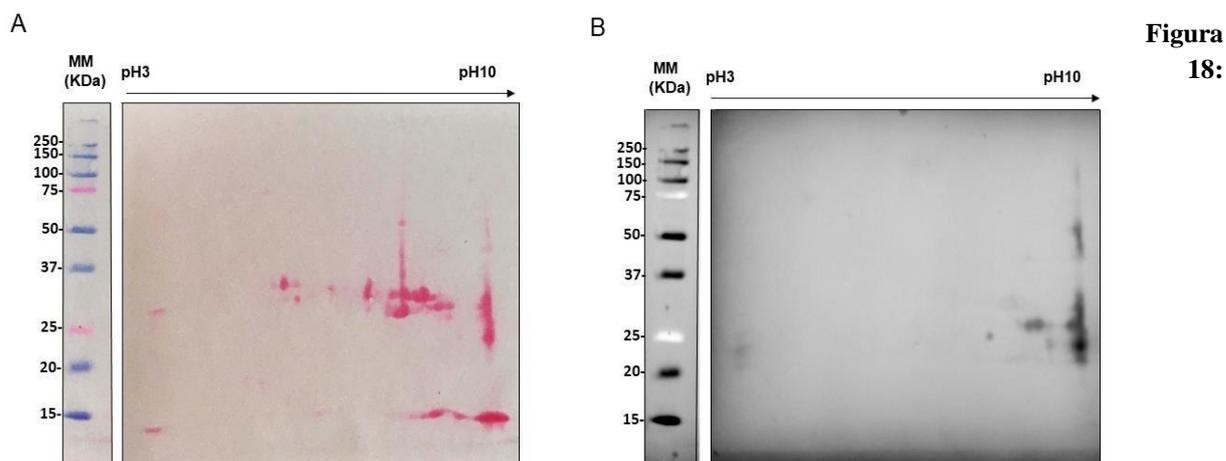
**Figura 16: Imunorreatividade do Lox-mAb3.** Placas de microtitulação foram sensibilizadas com 0,5µg/poço de rMEPlox (controle positivo), rLALP1, rLiD ou rLiHYAL. IgG pré-imune (controle negativo) e Lox-mAb3 (0,45 µg) foram testados. IgG anti-camundongo conjugado a HRP (diluição 1:8000) foi utilizado como anticorpo secundário. A absorbância das amostras foi determinada a 490 nm.

Com o intuito de identificar a massa molecular da proteína reconhecida pelo LoxmAb3, um *Western Blot* foi realizado com veneno de *L. intermedia* e o anticorpo monoclonal. De acordo com a **Figura 17**, esse anticorpo identifica somente uma banda com mobilidade eletroforética de aproximadamente 20 kDa. O soro anti-loxoscélico proveniente do CPPI, utilizado como controle positivo, reconhece diferentes proteínas do veneno e o anticorpo monoclonal mAb4B6E6 (não relacionado), utilizado como controle negativo, não reconhece nenhuma proteína presente no veneno de *L. intermedia*, como já esperado.



**Figura 17: Imunorreatividade do Lox-mAb3 por Western Blot.** Veneno de *L. intermedia* (5 $\mu$ g) foi submetido a SDS-PAGE 12,5% em condições não redutoras. As proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose a qual foi incubada com (1) Soro comercial anti-loxoscélico do CPPI, utilizado como controle positivo (1:1000), (2) Lox-mAb3 (0,5  $\mu$ g/mL), (3) mAb4B6E6 (anticorpo não relacionado) (0,5  $\mu$ g/mL), utilizado como controle negativo. A ligação do anticorpo foi detectada pela incubação da membrana com IgG anti-camundongo conjugada à HRP (diluição 1:8000). A membrana foi revelada utilizando DAB e Cloronaftol.

O perfil eletroforético do veneno de *L. intermedia* também foi analisado por *Western Blot* em duas dimensões. Utilizamos, na primeira dimensão, o sistema IPG SDS-PAGE (strip de 7 cm com pH variando entre 3–10 de forma não linear), para que as proteínas sejam separadas conforme seu ponto isoelétrico. Na a segunda dimensão, as proteínas foram separadas conforme sua massa molecular em SDS-PAGE-12%. De acordo com a **Figura 18** pode-se observar que o Lox-mAb3 reconhece proteínas de caráter catiônico, em torno de 20-25 kDa, o que corrobora o resultado obtido no *Western Blot* de uma dimensão.



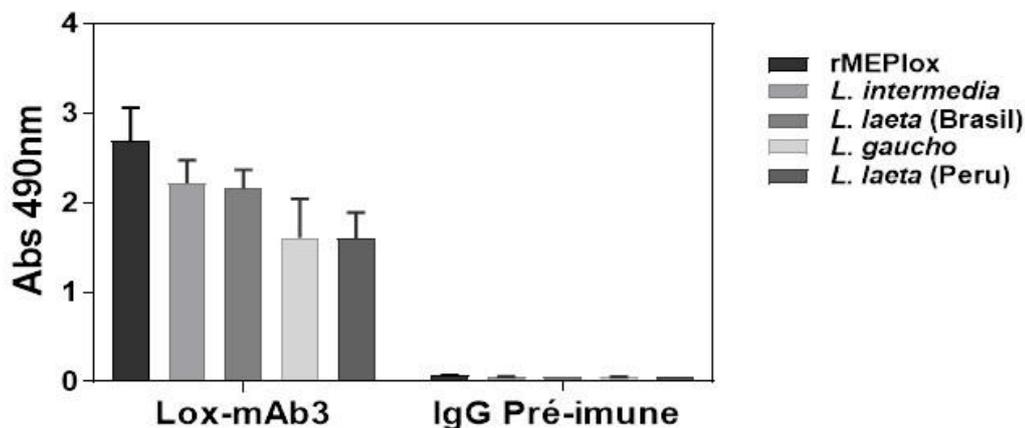
**Figura 18:**

**Western Blot bidimensional.** Na primeira dimensão, as proteínas do veneno de *L. intermedia* (50 µg) foram separadas quanto ao seu ponto isoelétrico em strip de 7cm, pH 3 a 10, não linear. Na segunda dimensão, as proteínas foram separadas quanto a sua massa, utilizando um gel de poliacrilamida 12%, em condições redutoras. Em **A**) membrana corada com ponsseou após a transferência e em **B**) *Western blot* revelado por DAB e Cloronaftol. Foi utilizado 0,5 µg/mL de Lox-mAb3 como anticorpo primário. IgG anti-camundongo conjugada à HRP (diluição 1:8000) foi utilizada como anticorpo secundário.

Feitosa e colaboradores (1998) descreveram metaloproteases com massa molecular e especificidade de substratos diferentes: (i) metaloproteases que degradam gelatina, com 32-35 kDa, (ii) e proteases que degradam gelatina, mas que possuem maior afinidade em degradar fibrinogênio e fibronectina, com cerca de 20-28 kDa. De acordo com o resultado obtido no *Western blot*, acredita-se que a proteína reconhecida pelo anticorpo monoclonal possua atividade fibronectinolítica e fibrinogenolítica, que provavelmente está associada à hemorragia no local da mordida, em alguns casos na hemorragia sistêmica e na coagulação intravascular disseminada (Feitosa *et al.*, 1998).

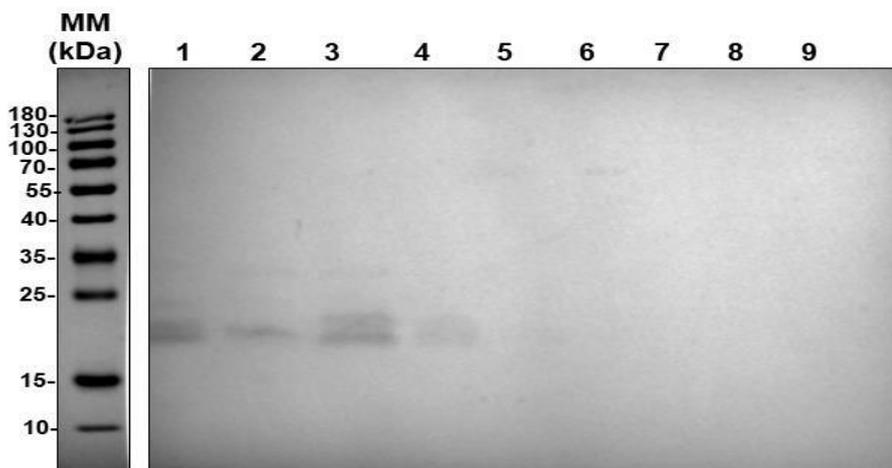
### 5.5 AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE CRUZADA DO LOX-MAB3

A reatividade do Lox-mAb3 contra rMEPLox (controle positivo) e os venenos de *L. intermedia*, *L. laeta* (Brasil), *L. gaucho* e *L. laeta* (Peru) foi determinada por ELISA (**figura 19**). Os resultados mostram que o anticorpo monoclonal possui reatividade cruzada com todos os venenos de *Loxosceles* testados, mas não se observou reatividade entre a IgG pré-imune e esses venenos.



**Figura 19: Reatividade cruzada do Lox-mAb3.** Placa de microtitulação foi sensibilizada com 0,5µg/poço dos venenos de *L. intermedia*, *L. laeta* (Brasil), *L. gaucho*, *L. laeta* (Peru) ou rMEPlox, utilizada como controle positivo. O anticorpo e a IgG pré imune (controle negativo) foram utilizados na concentração de 0,45 µg/poço. IgG anti-camundongo conjugada à HRP (diluição 1:8000) foi utilizada como anticorpo secundário. A absorbância das amostras foi determinada a 490 nm.

Posteriormente, esse reconhecimento foi avaliado por *Western blot*. Em adição aos quatro venenos previamente analisados por ELISA, os venenos das aranhas *L. similis* e *P. nigriventer* e os venenos das serpentes *B. atrox*, *C. durissus* e *L. muta muta* também foram testados (**Figura 20**). O Lox-mAb3 reconheceu a maioria dos venenos loxoscélicos (*L. intermedia*, *L. laeta* (Brasil), *L. gaucho* e *L. laeta* (Peru)), entretanto não houve reconhecimento entre o anticorpo e os venenos das aranhas *L. similis* e *P. nigriventer* e os venenos das serpentes *B. atrox*, *C. durissus* e *L. muta muta*, o que já era esperado, uma vez que se tratam de venenos de gêneros diferentes, com exceção ao veneno de *L. similis*.



**Figura 20: Imunorreatividade entre Lox-mAb3 e venenos de aranhas e serpentes.** Lox-mAb3 na concentração de 0,5  $\mu\text{g/mL}$  foi utilizado contra os venenos de (1) *L. intermedia*, (2) *L. gaucho*, (3) *L. laeta* (Brasil), (4) *L. laeta* (Peru), (5) *L. similis*, (6) *P. nigriventer*, (7) *B. atrox*, (8) *C. durissus* e (9) *L. muta muta*. Veneno de *L. intermedia* foi utilizado como controle positivo. A ligação do anticorpo foi detectada pela incubação da membrana com IgG anti-camundongo conjugada à HRP (diluição 1:8000). A membrana foi revelada utilizando DAB e Cloronaftol.

Através das análises do *Western blot* foi possível observar que as proteínas reconhecidas possuem cerca de 20 kDa, o que corresponde ao tamanho de algumas metaloproteases. Esse resultado indica que essas proteínas provavelmente possuem epítomos em comum, ao contrário das metaloproteases do veneno de *L. similis*, uma vez que não foi observado reconhecimento do anticorpo pelo antígeno. A reatividade cruzada observada pode ser vantajosa caso o Lox-mAb3 apresente potencial neutralizante, o que aumenta a possibilidade desse anticorpo neutralizar a atividade de metaloproteases de outros venenos de aranhas do gênero *Loxosceles*.

## 5.6 MAPEAMENTO DOS EPÍTOMOS RECONHECIDOS PELO LOX-MAB3

Posteriormente, prosseguiu-se com o mapeamento dos epítomos lineares da metaloprotease reconhecidos pelo Lox-mAb3, através da técnica de SPOT síntese. Para isso, pentadecapeptídeos sobrepostos por três resíduos cobrindo toda a sequência primária da metaloprotease (LALP1) de *L. intermedia* foram sintetizados em uma membrana de celulose (**Figura 21A e 21B**). O padrão de ligação do Lox-mAb3 (1  $\mu\text{g/mL}$ ) à membrana, mostra o forte reconhecimento de três peptídeos (62, 63 e 64) (**Figura 21C**), localizados na região C terminal da metaloprotease, os quais possuem, respectivamente, as seguintes sequências: ENNTRTIGPFDYDSI, TRTIGPFDYDSIMLY, IGPFDYDSIMLYGAY, (destacadas em vermelho na **Figura 21B**). Os peptídeos reativos exibem uma sequência de 9 aminoácidos em comum ( $_{190}\text{IGPFDYDSI}_{198}$ ), mostrada em vermelho na **Figura 21C**.

Para visualizar a posição dos epítomos na metaloprotease determinados experimentalmente, o modelo tridimensional de LALP1 foi utilizado. O epítomo encontrado

(destacado em vermelho) é localizado próximo à região *Met-turn* (destacada em verde) (**Figura 21C e 21D**). Essa região é um elemento chave na função dessas proteínas, uma vez que a Metionina forma uma base hidrofóbica para o átomo de zinco no sítio catalítico da enzima (Bode, 1993).

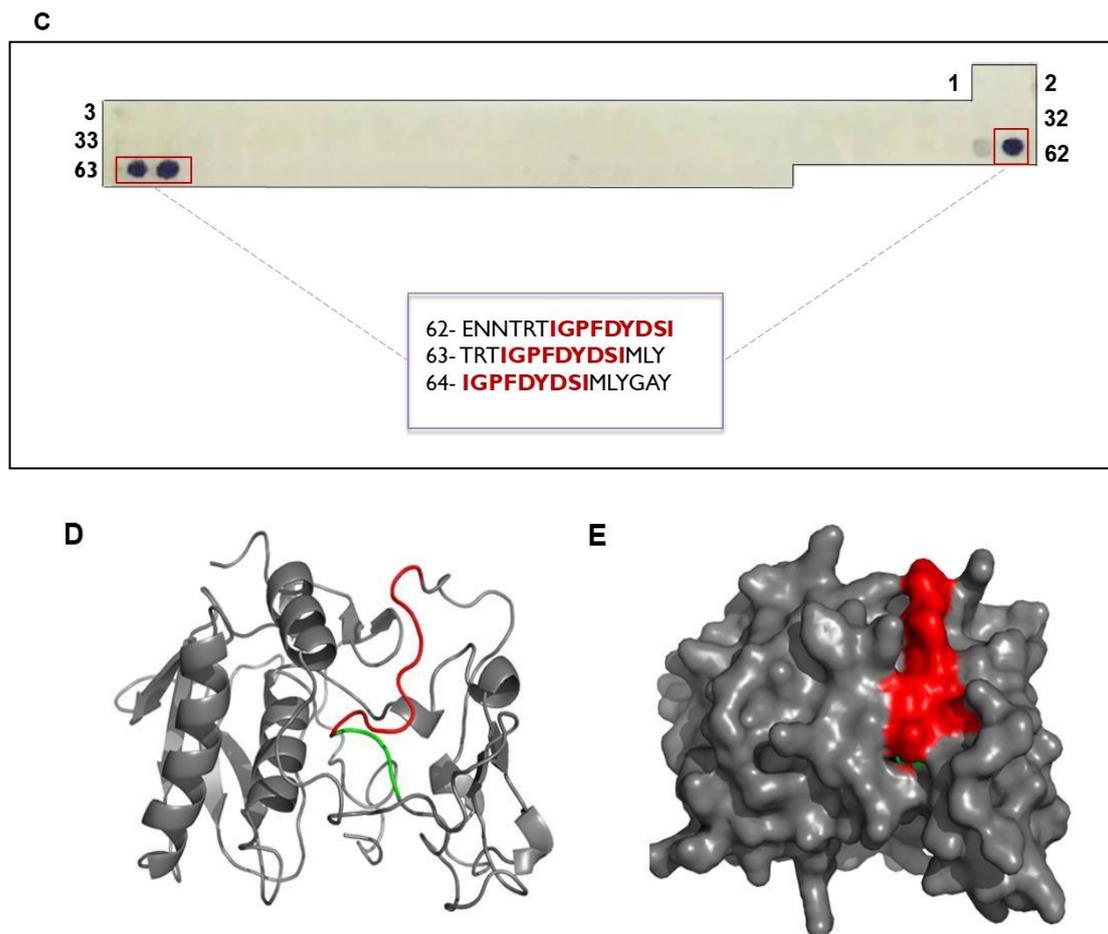
## A

## Metaloprotease do tipo astacina 1 (LALP1- UniProt KB - A0FKN6|(VMPA\_LOXIN)

```
MIKYIGVFAFLVGGFCHDFETVISNQDPIVDGMRLVEGDMLFDDGPLFTERNAVKYDQQLW
PNGEIVYEISPLRQYEQIIREAMRTYEDNTCIKFRRTNEADYVNIHVGDRCYSRVGKSF
RGGPQPLSLGRGCTDFGTILHELGH SVGFDHEHSRADRDEFLIIHKENIKNGSEHNFDKL
WENNTRTIGPFDYDSIMLYGAYAFSKDTRKFKTMEPVEPGLPMKSVIQKGKLSYYDIVKVN
KLYKCPPVNPYPGGIRPYVNV
```

## B

Spot	Peptídeo	Spot	Peptídeo	Spot	Peptídeo
1	MIKYIGVFAFLVGGF	33	RRRTNEADYVNIHVG	65	FDYDSIMLYGAYAFS
2	YIGVFAFLVGGFCHD	34	TNEADYVNIHVGDRC	66	DSIMLYGAYAFSKDT
3	VFAFLVGGFCHDFET	35	ADYVNIHVGDRCYSR	67	MLYGAYAFSKDTRKF
4	FLVGGFCHDFETVIS	36	VNIHVGDRCYSRVGK	68	GAYAFSKDTRKFKTM
5	GGFCHDFETVISNQD	37	HVGDRCYSRVGKSFR	69	AFSKDTRKFKTMEPV
6	CHDFETVISNQDPIV	38	DCYSRVGKSFRGGP	70	KDTRKFKTMEPVEPG
7	FETVISNQDPIVDGM	39	YSRVGKSFRGGPQPL	71	RKFKTMEPVEPGLPM
8	VISNQDPIVDGMRLV	40	VGKSFRGGPQPLSLG	72	KTMEPVEPGLPMKSV
9	NQDPIVDGMRLVEGD	41	SFRGGPQPLSLGRGC	73	EPVEPGLPMKSVIQK
10	PIVDGMRLVEGDMLF	42	GGPQPLSLGRGCTDF	74	EPGLPMKSVIQKGKL
11	DGMRLVEGDMLFDDG	43	QPLSLGRGCTDFGTI	75	LPMKSVIQKGKLSYY
12	RLVEGDMLFDDGPLF	44	SLGRGCTDFGTILHE	76	KSVIQKGKLSYYDIV
13	EGDMLFDDGPLFTER	45	RGCTDFGTILHELGH	77	IQKGKLSYYDIVKVN
14	MLFDDGPLFTERNAV	46	TDFGTILHELGH SVG	78	GKLSYYDIVKVNKLY
15	DDGPLFTERNAVKYD	47	GTILHELGH SVGFDH	79	SYYDIVKVNKLYKCP
16	PLFTERNAVKYDQQL	48	LHELGH SVGFDHEHS	89	DIVKVNKLYKCPPVN
27	TERNAVKYDQQLWPN	49	LGH SVGFDHEHSRAD	81	KVNKLYKCPPVNPYP
28	NAVKYDQQLWPNGEI	50	SVGFDHEHSRADRDE	82	KLYKCPPVNPYPGGI
29	KYDQQLWPNGEIVYE	51	FDHEHSRADRDEFLI	83	KCPPVNPYPGGIRPY
20	QQLWPNGEIVYEISP	52	EHSRADRDEFLIIHK	84	PVNPYPGGIRPYVNV
21	WPNGEIVYEISPLR	53	RADRDEFLIIHKENI		
22	GEIVYEISPLRQYE	54	RDEFLIIHKENIKNG		
23	VYEISPLRQYEQII	55	FLIIHKENIKNGSEH		
24	ISPLRQYEQIIREA	56	IHKENIKNGSEHNFD		
25	GLRQYEQIIREAMRT	57	ENIKNGSEHNFDKLW		
26	QYEQIIREAMRTYED	58	KNGSEHNFDKLWENN		
27	QIIREAMRTYEDNTC	59	SEHNFDKLWENNTRT		
28	REAMRTYEDNTCIKF	60	NFDKLWENNTRTIGP		
29	MRTYEDNTCIKFRRR	61	KLWENNTRTIGPFDY		
30	YEDNTCIKFRRTNE	62	<b>ENNTRTIGPFDYDSI</b>		
31	NTCIKFRRTNEADY	63	<b>TRTIGPFDYDSIMLY</b>		
32	IKFRRTNEADYVNI	64	<b>IGPFDYDSIMLYGAY</b>		



**Figura 21: Mapeamento de epítomos da LALP1 reconhecidos pelo Lox-mAb3 pelo método de SPOT.** A) Sequência primária da proteína LALP1. B) Lista dos peptídeos derivados da sequência primária da LALP-1, de acordo com o número dos spots. C) Membrana de celulose contendo a sobreposição de peptídeos derivados da sequência de LALP-1, incubada com Lox-mAb3 (1µg/mL). Após a incubação com anticorpo secundário marcado com fosfatase alcalina anti-camundongo, foi adicionado substrato MTT-BCIP revelando precipitados azul escuro nos spots reativos na membrana. Os peptídeos reativos exibem uma sequência de 9 aminoácidos em comum destacada em vermelho. D) e E) Modelo de homologia de LALP-1 gerado pelo software PyMol, com a sequência da proteína reconhecida pelo anticorpo destacada em vermelho e a sequência Met-turn destacada em verde.

A partir da localização do epítipo na estrutura tridimensional da LALP1 (**Figura 21E**), podemos observar que a região reconhecida pelo Lox-mAb3 se encontra na superfície da metaloprotease, o que poderia favorecer a ligação do anticorpo à proteína pela sua acessibilidade.

O alinhamento entre metaloproteases do veneno das *Loxosceles* que apresentaram reatividade cruzada por ELISA e *Western blot* foi realizado, a fim de avaliar a conservação da sequência reconhecida pelo Lox-mAb3. Para o alinhamento foram utilizadas as sequências de

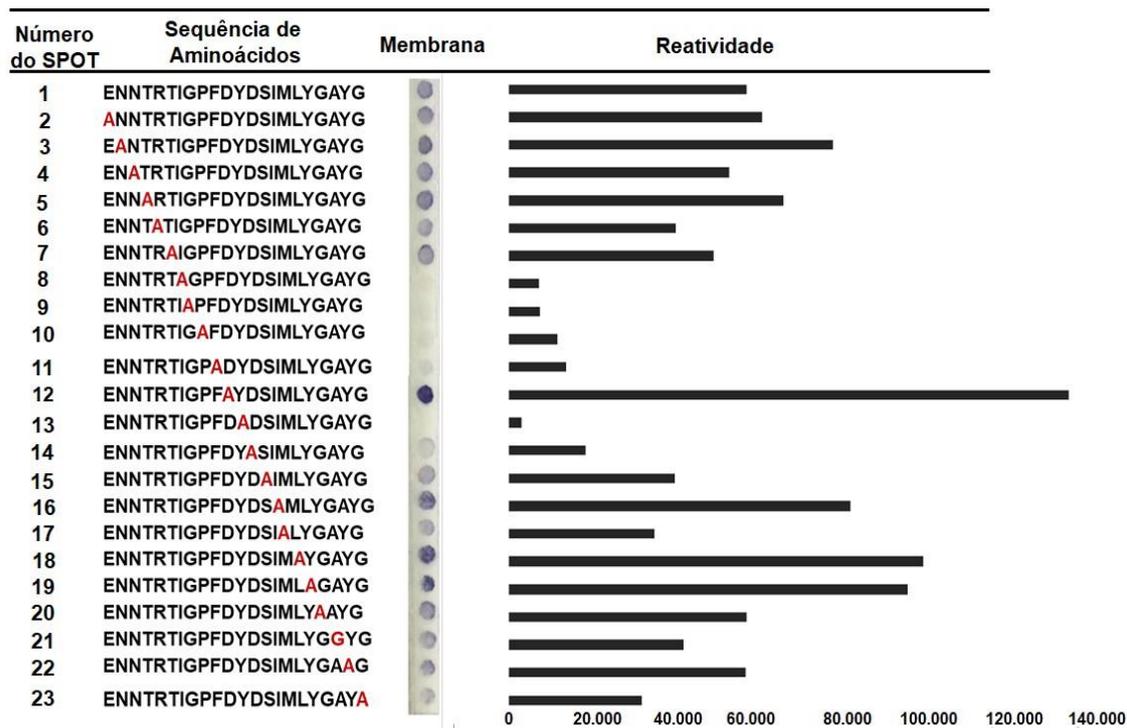
LALP1, LALP2, LALP3 (*L. intermedia*), LALP4 (*L. laeta* Brasil), LALP5 (*L. gaucho*) e as LALPs LP1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 (*L. laeta* Peru) (**Figura 22**).

Podemos observar que a sequência reconhecida pelo anticorpo, <sup>190</sup>IGPFDYDSI<sup>198</sup>, destacada em vermelho, com exceção da Pro<sup>192</sup>, é bem conservada entre as diferentes sequências analisadas, o que poderia explicar a reatividade cruzada observada previamente (**Figuras 19 e 20**). Esta sequência está localizada próximo a região Met-*tur*, em verde, que também é bem conservada entre as metaloproteases. O alinhamento completo encontra-se na sessão Anexos.

Espécie	Toxina	Sequência
<i>L. intermedia</i>	LALP1	179 FDKLWENNRTRIGPFDYDSIMLYGAYAFSKDTRKFKTMEPVEPGLPMKSVIQKGKLSYYD 238
<i>L. intermedia</i>	LALP2	180 YRKTPSYMTRVIGPFDYDSIMLYGETAGSRDPMHLKSMEANKPGVTLISSRYKDRLTDL 239
<i>L. intermedia</i>	LALP3	170 YEKRFENNRTRVIGPFDYDSIMLYGETDARKSGS--VTMKVKKPGATLVNASLKHELTALD 227
<i>L. Laeta</i> (Brasil)	LALP4	82 FEKLWENKTRTIGDFDYDSIMLYGLLCLFKGSV----- 114
<i>L. gaucho</i>	LALP5	128 FEKLLESKTRTIGPFDYDSIMLYGSYAFSRDTEAVENHGTRRTRTPYEICHSKRKAELL- 186
<i>L. laeta</i> (Peru)	LALP-LP3	171 FDKLWENNRTRIGNFDYDSIMLY----- 193
<i>L. laeta</i> (Peru)	LALP-LP1	166 FKKKLENETRTIGDFDYDSIMLYG----- 189
<i>L. laeta</i> (Peru)	LALP-LP8	158 FKKKLENETRTIGYFDYDSIMLYGPFYAF----- 185
<i>L. laeta</i> (Peru)	LALP-LP7	166 FKKKLENETRTIGDFDYDSIMLYGPFYAFSKD----- 196
<i>L. laeta</i> (Peru)	LALP-LP2	161 FKKKLENETRTIGDFDYDSIMLYG----- 184
<i>L. laeta</i> (Peru)	LALP-LP4	160 FKKKLENETRTIGDFDYDSIMLYGPFYAFSR----- 189
<i>L. laeta</i> (Peru)	LALP-LP5	160 FKKKLENETRTIGDFDYDSIMLYGPFYASSK----- 189
<i>L. laeta</i> (Peru)	LALP-LP6	158 FKKKLENETRTIGDFDYDSIMLYGPFYAFSKD----- 188

**Figura 22: Alinhamento entre metaloproteases de venenos de Loxosceles.** Alinhamento entre metaloproteases LALP1, LALP2, LALP3 (*L. intermedia*), LALP4 (*L. laeta*), LALP5 (*L. gaucho*) e as LALPs LP1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 (*L. laeta* Peru) foi realizado utilizando o programa Clustal Ômega. A sequência reconhecida pelo anticorpo monoclonal está destacada em vermelho, e a região Met-*tur* em verde.

A fim de identificar os resíduos de aminoácidos críticos no epítipo de LALP 1, reconhecido pelo Lox-mAb3, uma série de análogos de alanina do peptídeo (ENNRTRIGPFDYDSIMLYGAY) foi sintetizada e analisada através da técnica de SPOT (**Figura 23**). Os resultados revelam que alguns resíduos do peptídeo não podem ser substituídos sem que haja uma drástica redução na reatividade com o anticorpo, é o caso de: Ile<sup>190</sup>, Gly<sup>191</sup>, Pro<sup>192</sup>, Phe<sup>193</sup>, Tyr<sup>195</sup>, Asp<sup>196</sup>. Entretanto a substituição de Asp<sup>194</sup> promove um aumento no reconhecimento do anticorpo.

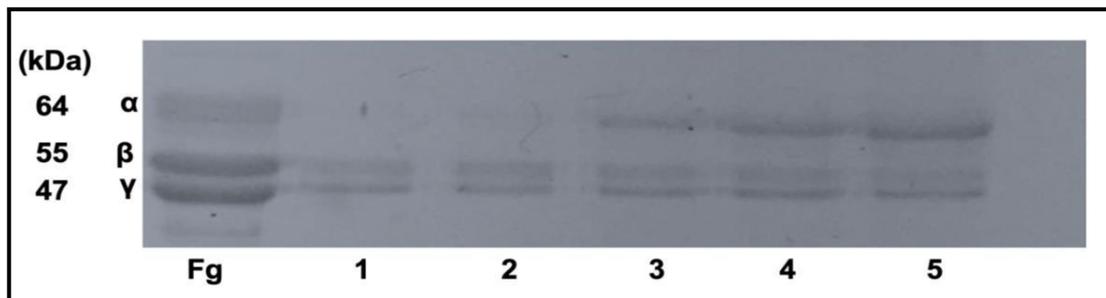


**Figura 23: AlaninaScan.** Uma série de análogos de alanina do peptídeo reconhecido pelo anticorpo monoclonal foi preparada por Spot síntese. A reatividade dos spots foi testada utilizando 1 µg/mL do Lox-mAb3. O peptídeo de referência está na posição 1 e cada ponto adicional corresponde a um análogo de alanina. Cada barra representa a intensidade da ligação de Lox-mAb3 com o peptídeo de referência (primeira barra) ou com os peptídeos análogos no qual o resíduo indicado foi substituído por alanina (destacado em vermelho).

### 5.7 POTENCIAL NEUTRALIZANTE DE Lox-mAb-3

Os resultados observados nos ensaios de *Western blot* mostraram que o Lox-mAb3 reconhece uma proteína de 20 kDa, o que pode corresponder a metaloproteases que possuem fibronectina e fibrinogênio como substratos (Feitosa *et al.*, 1998). Dessa forma, a neutralização da atividade fibrinogenolítica dessas metaloproteases foi avaliada. Para isso, utilizou-se fibrinogênio humano (Fg), o qual possui três subunidades A $\alpha$ , B $\beta$  e  $\gamma$ .

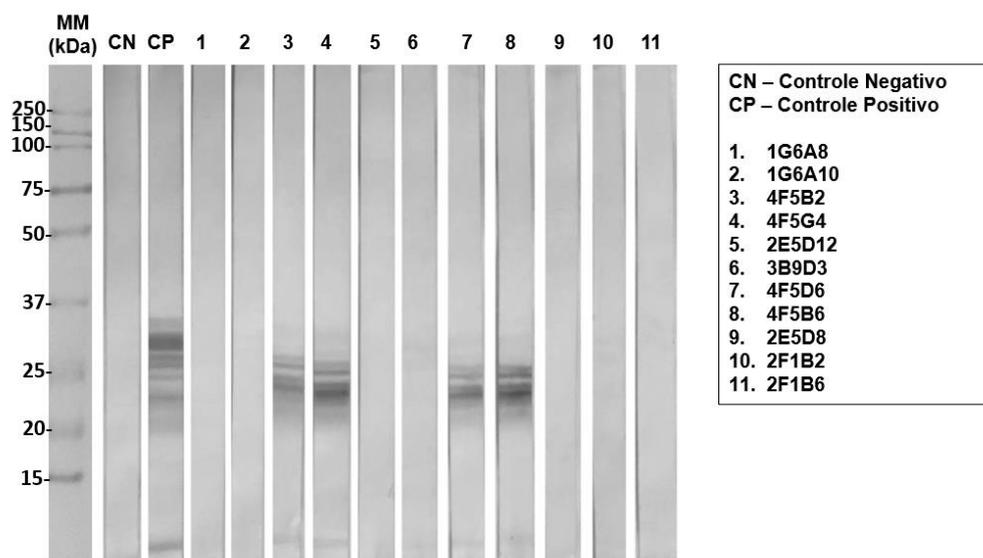
O veneno de *L. intermedia* (3µg) foi capaz de degradar a cadeia A $\alpha$  do fibrinogênio (linha 1). No entanto, a prevenção da digestão da cadeia alfa pode ser observada quando o veneno de *L. intermedia* (3µg) foi pré-incubado, por 1 h, com 25, 50 e 100 µg de Lox-mAb3 (linhas 3, 4 e 5) (**Figura 24**). De modo contrário, 10 µg de anticorpo monoclonal não foi capaz de neutralizar a degradação do fibrinogênio (linha 2). Esse resultado demonstra o potencial neutralizante do anticorpo sobre a atividade fibrinogenolítica da metaloprotease presente no veneno de *L. intermedia*.



**Figura 24: Neutralização de atividade fibrinogenolítica.** SDS-PAGE 10% em condições redutoras foi realizado. As cadeias  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  do fibrinogênio estão indicadas no quadro à esquerda. A linha (Fg) apresenta fibrinogênio sem tratamento (controle negativo), enquanto a linha (1) mostra a degradação da cadeia alfa quando o fibrinogênio é tratado com 3  $\mu\text{g}$  de veneno de *L. intermedia* por 16h (controle positivo). Nas linhas seguintes, o veneno foi pré incubado com concentrações de 10  $\mu\text{g}$  (linha 2), 25  $\mu\text{g}$  (linha 3), 50  $\mu\text{g}$  (linha 4) e 100  $\mu\text{g}$  (linha 5) Lox-mAb3.

## 5.8 CARACTERIZAÇÃO DOS DEMAIS ANTICORPOS MONOCLONAIS

Com o objetivo de caracterizar os demais anticorpos monoclonais obtidos e confirmar o resultado do ELISA (**Figura 13**), no qual alguns dos monoclonais obtidos não reconheciam o veneno de *L. intermedia*, foi realizado um *Western blot* para avaliar a reatividade dos sobrenadantes celulares (5 mL) contra o veneno de *L. intermedia*. Pode-se concluir que apenas os monoclonais provenientes do hibridoma 4F5 (4F5B2, 4F5B6, 4F5D6 e 4F5G4) são capazes de reconhecer o veneno de *L. intermedia* (**Figura 25**). Existe a possibilidade que os clones que somente reconhecem rMEPLox reagem contra a cauda de histidina que essa proteína possui, utilizada em sua purificação.



**Figura 25: Reatividade dos anticorpos monoclonais contra o veneno de *L. intermedia*.** Os sobrenadantes dos anticorpos monoclonais (5 mL) (1) 1G6A8, (2) 1G6A10, (3) 4F5B2, (4) 4F5G4, (5) 2E5D12, (6) 3B9D3, (7) 4F5D6, (8) 4F5B6, (9) 2E5D8, (10) 2F1B2 e (11) 2F1B6 foram utilizados contra o veneno de *L. intermedia* (5 µg). Foram utilizados soro anti-loxocelico (CPPI) como controle positivo (diluição 1:1000) e sobrenadante celular de SP2/0 (5 mL) como controle negativo. A ligação do anticorpo foi detectada pela incubação da membrana com IgG anti-camundongo conjugada à HRP (diluição 1:10000) e IgG anti-cavalo conjugada à HRP (diluição 1:50000). A membrana foi revelada utilizando DAB e Cloronaftol.

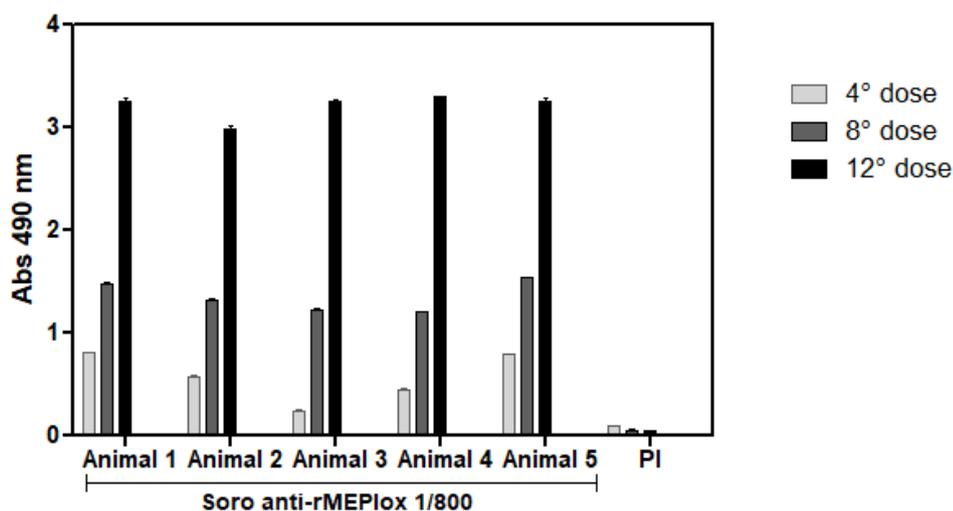
Além do Lox-mAb3, apenas três clones reconheceram o veneno de *L. intermedia* e esses clones são provenientes do mesmo hibridoma (4F5). Por isso, ensaios de *SPOT* foram realizados para avaliar se os mAbs 4F5B2, 4F5D6 e 4F5G4 reconheciam epítomos diferentes do epítomo reconhecido por Lox-mAb3. Foi possível observar que todos os três anticorpos monoclonais reconhecem o mesmo epítomo na metaloprotease do veneno de *L. intermedia*, (dados não mostrados), representado por três spots (62, 63 e 64), os quais possuem as sequências ENNTRTIGPFDYDSI, TRTIGPFDYDSIMLY, IGPFDYDSIMLYGAY, respectivamente. A reatividade na membrana se deu de forma bastante semelhante entre os anticorpos monoclonais testados quando comparados a Lox-mAb3, sugerindo que podem se tratar de um mesmo anticorpo, uma vez que foram originados das mesmas células mãe.

## 5.9 PRODUÇÃO DE NOVOS ANTICORPOS MONOCLONAIS

Uma vez que nosso grupo de pesquisa previamente produziu mAbs contra fosfolipase D e no presente trabalho foi produzido um anticorpo monoclonal contra metaloproteases, buscou-se, em continuidade ao trabalho, produzir anticorpos monoclonais contra hialuronidases do veneno de *L. intermedia*, visando produzir um *pool* de anticorpos monoclonais contra as principais proteínas de importância médica.

Dessa forma, cinco camundongos Balb/c receberam como imunógeno, via subcutânea, 50 µg da proteína rMEPLox. Esses animais foram hiperimunizados, recebendo 12 doses dessa proteína a cada 15 dias para estimular a produção de anticorpos contra hialuronidase. Sete dias após a quarta, oitava e décima-segunda doses, uma amostra de sangue de cada camundongo foi retirada e a reatividade dos soros desses animais contra rMEPLox foi avaliada por ELISA indireto (**Figura 26**).

Todos os cinco animais imunizados produziram anticorpos contra rMEPLox e pode-se observar que a reatividade aumentou à medida em que se aumentava a quantidade de imunizações (**Figura 26**). Com exceção do Animal 2, todos os outros animais apresentaram valores de reatividades similares frente a rMEPLox e soro pré-imune não reagiu a essa proteína, demonstrando especificidade da reação.



**Figura 26: Imunorreatividade dos soros anti-rMEPLox contra a proteína recombinante de *Loxosceles*.** Placa de microtitulação foi sensibilizada com 0,5µg/poço de rMEPLox. Soro pré-imune (PI), utilizado como controle negativo, e soros anti-rMEPLox de cinco camundongos (diluição 1:800) foram testados. IgG anti-camundongo (diluição 1:10000) conjugada a HRP foi utilizada como anticorpo secundário. Os valores representam a média das duplicatas. A absorbância das amostras foi determinada a 490 nm.

Posteriormente, realizou-se ensaios de SPOT, a fim de avaliar a reatividade dos soros imunes dos Animais 1, 3 e 4 frente aos epítomos que compõem a rMEPLox (**Figura 27 B**). O SPOT foi feito com os soros desses animais porque apresentaram melhor reatividade por ELISA contra a rMEPLox. Para isso, 57 peptídeos sobrepostos por 3 resíduos de aminoácidos foram previamente preparados (**Figura 27A**) cobrindo a sequência completa de aminoácidos da rMEPLox.

A **Figura 27 B** mostra o padrão de ligação dos soros anti-rMEPLox dos camundongos 1, 3 e 4, que apresentaram títulos de soro mais elevados aos peptídeos ligados à membrana. Os

nove epítomos presentes na composição de rMEPLox foram reconhecidos por soros imunes de camundongos, seis deles tiveram sua sequência completamente reconhecida, Li Smase Epi 1 (DFSGPYLPSLPTLDA), LALP1 Epi 1 (SLGRGCTDFGILHE), LALP1 Epi2 (ENNTRTIGPFDYDSIMLYGAY), LALP1 Epi 3 (KLYKCPPVNPYPGGIRPYVNV), LID Epi 1(NLGANSIETDVSFDDNANPEYTYHGIP) e LID Epi2 (CKKYENFNDFLKGRL). Os outros epítomos foram parcialmente reconhecidos: LID Epi 3 (NCNKDHLFACW) Li Hyal Epi1 (NGGIPQLGDLKAHLEKSAVDI) e Li Hyal Epi 2 (ILDKSATGLRIIDWEAWR). Os aminoácidos não reconhecidos pelos soros imunes estão destacados em negrito. Em contraste, apenas o soro imune do camundongo 3 reconhece o epítomo LiHyal Epi1.

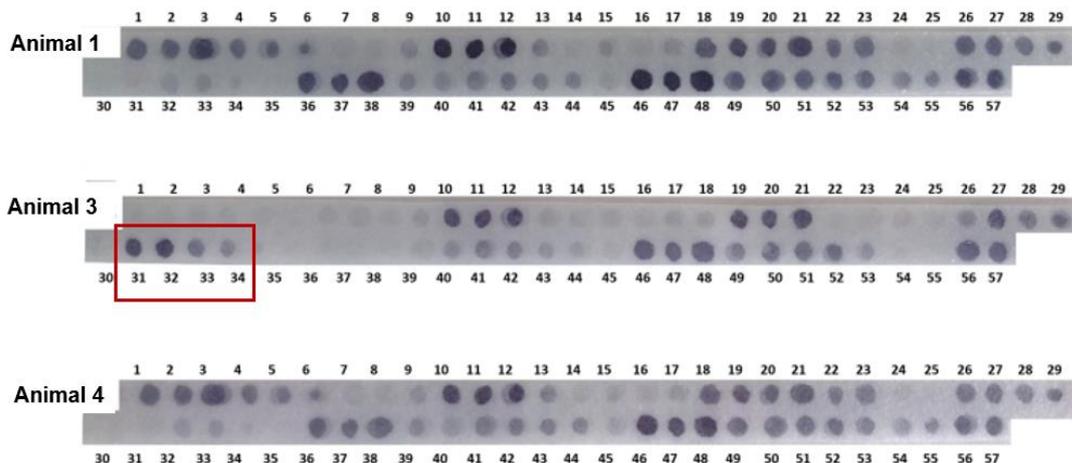
Dessa forma, pode-se observar que a reatividade dos soros foi semelhante, porém o camundongo 3 apresentou reconhecimento frente aos epítomos de hialuronidase (epítomos 31, 32, 33, 34, destacados em vermelho) (NGGIPQLGDLKAHLEKSAVDI), os quais não foram reconhecidos pelos soros 1 e 4. Por essa razão, o Animal 3 foi selecionado para produzir anticorpos monoclonais. Sendo assim, em seguida esse animal recebeu uma dose reforço de 5 µg de rMEPLox, via endovenosa.

## A



Spot	Peptídeo	Spot	Peptídeo	Spot	Peptídeo
1	N-L-G-A-N-S-I-E-T-D-V-S-F-D-D	20	W-G-G-D-F-S-G-P-Y-L-P-S-L-P-T	39	I-G-G-I-L-D-K-S-A-T-G-L-R-I-I
2	A-N-S-I-E-T-D-V-S-F-D-D-N-A-N	21	D-F-S-G-P-Y-L-P-S-L-P-T-L-D-A	40	I-L-D-K-S-A-T-G-L-R-I-I-D-W-E
3	I-E-T-D-V-S-F-D-D-N-A-N-P-E-Y	22	G-P-Y-L-P-S-L-P-T-L-D-A-G-G-S	41	K-S-A-T-G-L-R-I-I-D-W-E-A-W-R
4	D-V-S-F-D-D-N-A-N-P-E-Y-T-H-Y	23	L-P-S-L-P-T-L-D-A-G-G-S-L-G-R	42	T-G-L-R-I-I-D-W-E-A-W-R-G-G-E
5	F-D-D-N-A-N-P-E-Y-T-H-Y-G-I-P	24	L-P-T-L-D-A-G-G-S-L-G-R-G-C-T	43	R-I-I-D-W-E-A-W-R-G-G-E-N-N-T
6	N-A-N-P-E-Y-T-H-Y-G-I-P-G-G-C	25	L-D-A-G-G-S-L-G-R-G-C-T-D-F-G	44	D-W-E-A-W-R-G-G-E-N-N-T-R-T-I
7	P-E-Y-T-H-Y-G-I-P-G-G-C-K-K-Y	26	G-G-S-L-G-R-G-C-T-D-F-G-T-I-L	45	A-W-R-G-G-E-N-N-T-R-T-I-G-P-F
8	T-H-Y-G-I-P-G-G-C-K-K-Y-E-N-F	27	L-G-R-G-C-T-D-F-G-T-I-L-H-E-G	46	G-G-E-N-N-T-R-T-I-G-P-F-D-Y-D
9	G-I-P-G-G-C-K-K-Y-E-N-F-N-D-F	28	G-C-T-D-F-G-T-I-L-H-E-G-G-N-G	47	N-N-T-R-T-I-G-P-F-D-Y-D-S-I-M
10	G-G-C-K-K-Y-E-N-F-N-D-F-L-K-G	29	D-F-G-T-I-L-H-E-G-G-N-G-G-I-P	48	R-T-I-G-P-F-D-Y-D-S-I-M-L-Y-G
11	K-K-Y-E-N-F-N-D-F-L-K-G-L-R-G	30	T-I-L-H-E-G-G-N-G-G-I-P-Q-L-G	49	G-P-F-D-Y-D-S-I-M-L-Y-G-A-Y-G
12	E-N-F-N-D-F-L-K-G-L-R-G-G-N-C	31	<b>H-E-G-G-N-G-G-I-P-Q-L-G-D-L-K</b>	50	D-Y-D-S-I-M-L-Y-G-A-Y-G-G-K-L
13	N-D-F-L-K-G-L-R-G-G-N-C-N-K-N	32	<b>G-N-G-G-I-P-Q-L-G-D-L-K-A-H-L</b>	51	S-I-M-L-Y-G-A-Y-G-G-K-L-Y-K-C
14	L-K-G-L-R-G-G-N-C-N-K-N-D-H-L	33	<b>G-I-P-Q-L-G-D-L-K-A-H-L-E-K-S</b>	52	L-Y-G-A-Y-G-G-K-L-Y-K-C-P-P-V
15	L-R-G-G-N-C-N-K-N-D-H-L-F-A-C	34	<b>Q-L-G-D-L-K-A-H-L-E-K-S-A-V-D</b>	53	A-Y-G-G-K-L-Y-K-C-P-P-V-N-P-Y
16	G-N-C-N-K-N-D-H-L-F-A-C-W-G-G	35	D-L-K-A-H-L-E-K-S-A-V-D-I-G-G	54	G-K-L-Y-K-C-P-P-V-N-P-Y-P-G-G
17	N-K-N-D-H-L-F-A-C-W-G-G-D-F-S	36	A-H-L-E-K-S-A-V-D-I-G-G-I-L-D	55	Y-K-C-P-P-V-N-P-Y-P-G-G-I-R-P
18	D-H-L-F-A-C-W-G-G-D-F-S-G-P-Y	37	E-K-S-A-V-D-I-G-G-I-L-D-K-S-A	56	P-P-V-N-P-Y-P-G-G-I-R-P-Y-V-N
19	F-A-C-W-G-G-D-F-S-G-P-Y-L-P-S	38	A-V-D-I-G-G-I-L-D-K-S-A-T-G-L	57	P-V-N-P-Y-P-G-G-I-R-P-Y-V-N-V

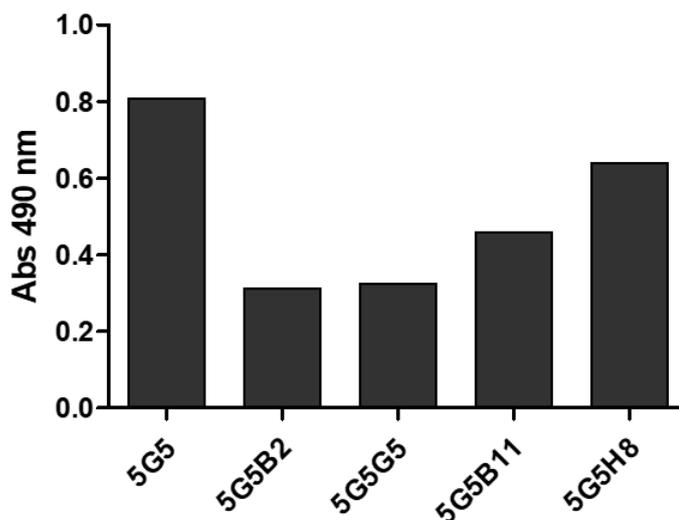
B



**Figura 27: Mapeamento de epítomos da rMEPLox reconhecidos pelos soros imunes pelo método de SPOT.** A) Lista dos peptídeos presentes na composição da rMEPLox, de acordo com o número dos spots. B) Membrana de celulose contendo a sobreposição de peptídeos derivados da sequência de rMEPLox, incubada com soros dos animais imunes (diluídos 1:400). Após a incubação com anticorpo secundário anti-camundongo, marcado com fosfatase alcalina, foi adicionado substrato MTT-BCIP revelando precipitados azul escuro nos spots reativos na membrana. Os peptídeos de hialuronidase reconhecidos pelo soro do animal 3 estão destacado em vermelho.

Três dias após a dose reforço, as células do baço do camundongo 3 foram retiradas e fusionadas às células de mieloma (sp2/0) e distribuídas em 5 placas de cultivo celular de 96 poços. Os hibridomas ficaram incubados em estufa de CO<sub>2</sub> a 5% por 15 dias, quando parte do sobrenadante celular foi retirado (50 µL) para a realização do primeiro *screening*. Apenas um poço contendo hibridomas que estavam secretando anticorpos contra a rMEPLox (poço 5G5) foi obtido, uma vez que apenas ele apresentou reatividade contra a proteína por ELISA.

Posteriormente, as células do poço 5G5 foram subclonadas por meio de diluição limitante de forma que houvesse apenas 1 célula por poço. Sete dias após a subclonagem os poços contendo apenas uma colônia foram marcados, e após mais sete dias, os sobrenadantes coletados e um novo ELISA foi performado contra rMEPLox. Foram obtidos quatro clones secretores de anticorpos anti-rMEPLox (5G5B2, 5G5G5, 5G5B11 e 5G5H8) no qual o anticorpo 5G5H8 apresentou maior reatividade frente a rMEPLox (**Figura 28**).

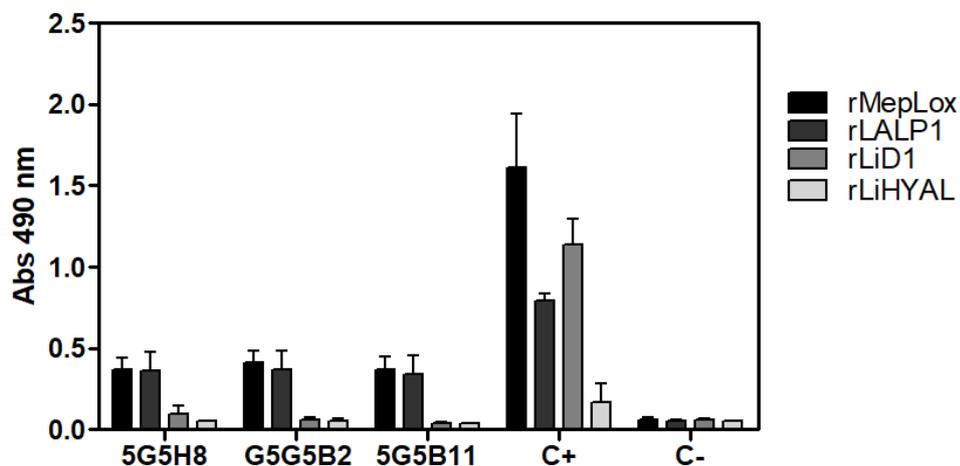


**Figura 28: Imunorreatividade dos sobrenadantes celulares do hibridoma 5G5 e dos clones contra rMEPLox.** Placa de microtitulação foi sensibilizada com 1µg/poço de rMEPLox. Os sobrenadantes celulares dos hibridomas (50 µL) foram usados como anticorpo primário. IgG anti-camundongo conjugado a HRP (diluição 1:10000) foi utilizada como anticorpo secundário. A absorbância das amostras foi determinada a 490 nm.

### 5.9 IMUNORREATIVIDADE DOS mAbs CONTRA ÀS PROTEÍNAS DO VENENO DE *L. intermedia*.

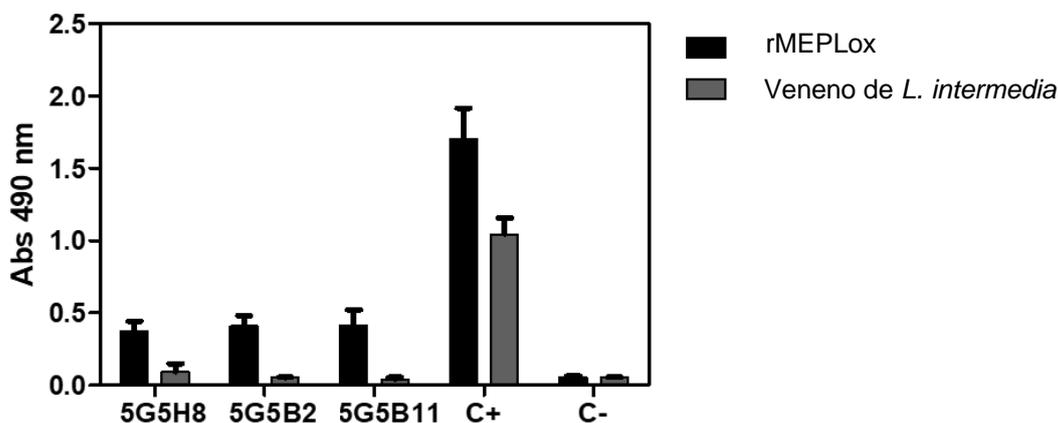
A reatividade dos sobrenadantes celulares dos clones 5G5B2, 5G5B11 e 5G5H8 (100 uL) foi avaliada por ELISA contra as proteínas recombinantes rLALP1, rLID1 e rLiHYAL. A viabilidade celular do clone 5G5G5 foi prejudicada, uma vez que essas células não foram capazes de expandidas em cultura. Por esse motivo não foi possível analisar a reatividade deste clone.

Observou-se que os clones secretavam anticorpos que reconheciam rLALP1 (**Figura 29**), da mesma forma que Lox-mAb3, mas não reconheciam fosfolipase D ou hialuronidase. Como esperado, o controle negativo (sobrenadante celular da SP2/0) não reconheceu nenhuma das proteínas testadas.



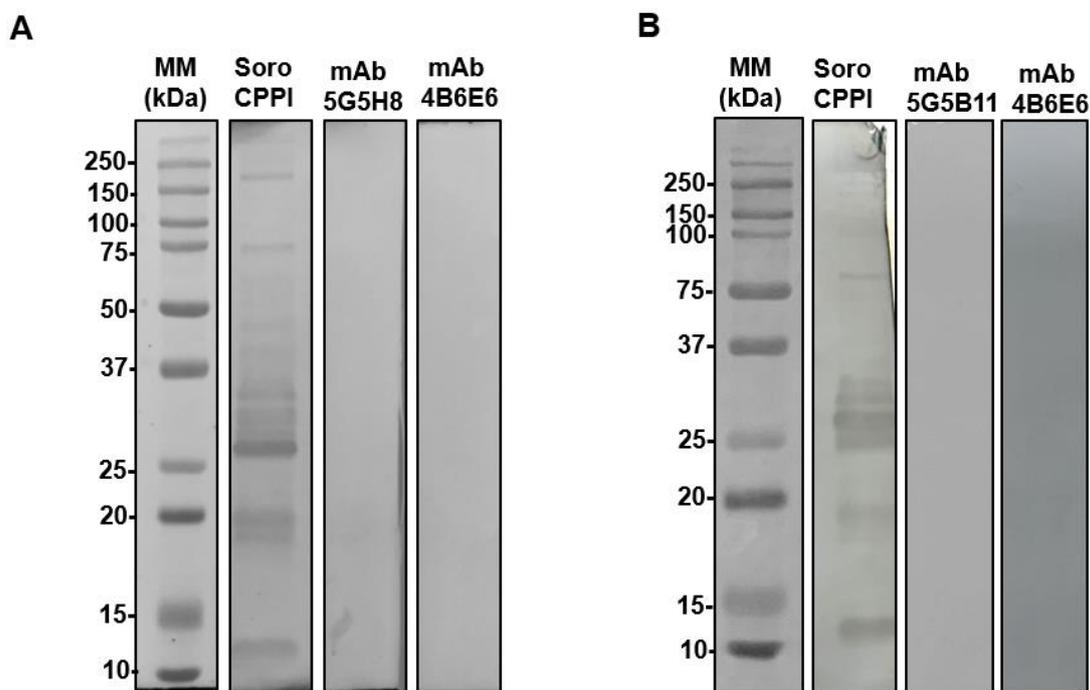
**Figura 29: Imunorreatividade dos sobrenadantes celulares 5G5H8, 5G5B2 e 5G5B11.** Placas de microtitulação foram sensibilizadas com 0,5µg/poço de rMEPLox (controle positivo), rLALP1, rLiD1 ou rLiHYAL. Sobrenadante celular da SP2/0 (100 µL) e soro anti-rMEPLox (diluição 1:100) foram usados como controle negativo e positivo, respectivamente. IgG anti-camundongo conjugado a HRP (diluição 1:10000) foi utilizado como anticorpo secundário. A absorbância das amostras foi determinada a 490 nm.

Posteriormente, a reatividade dos anticorpos monoclonais contra o veneno de *L. intermedia* foi avaliada por ELISA. Observou-se que, assim como os clones 1G6A8, 1G6A10, 2E5D8, 2E5D12, 3B9D3, 2F1B2 e 2F1B6 (obtidos na primeira produção de anticorpos monoclonais), os clones 5G5H8, 5G5B2 e 5G5B11 reconhecem a rMEPLox, mas não reconhecem o veneno de *L. intermedia* (Figuras 13 e 30).



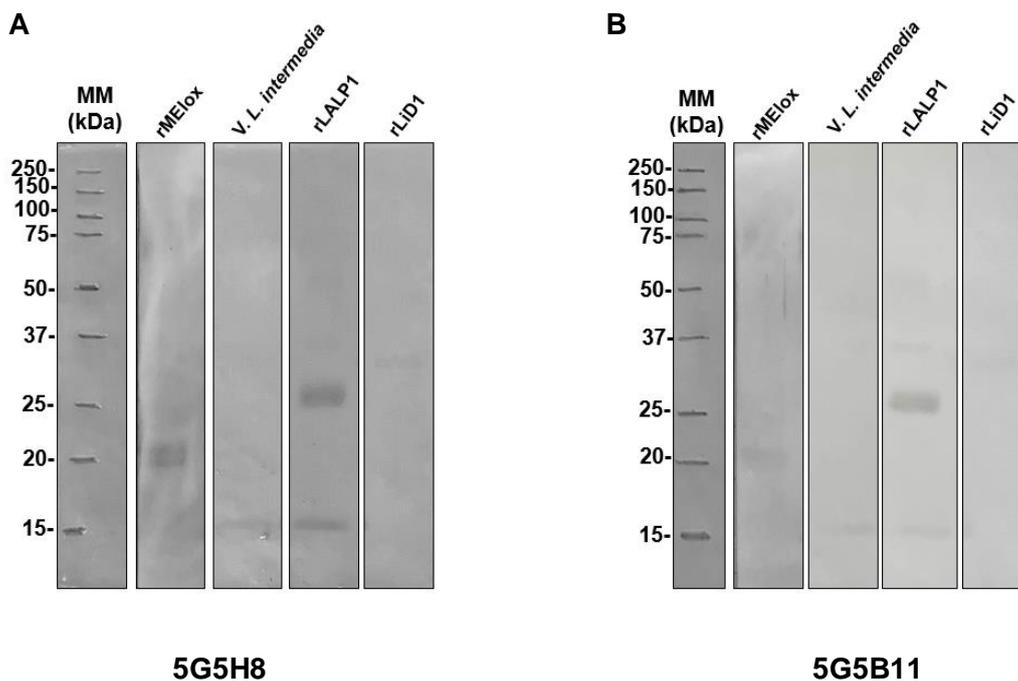
**Figura 30: Imunorreatividade dos sobrenadantes dos subclones contra rMEPLox e o veneno de *L. intermedia*.** Placa de microtitulação foi sensibilizada com 1µg/poço de rMEPLox e veneno de *L. intermedia*. Sobrenadante celular dos clones (100 µL) foi utilizado como anticorpo primário. Soro anti-rMEPLox do camundongo 3 diluído 1:100 foi utilizado como controle positivo e sobrenadante celular de SP2/0 foi usado como controle negativo (100 µL). IgG anti-camundongo conjugado a HRP (diluição 1:10000) foi utilizada como anticorpo secundário. A absorbância das amostras foi determinada a 490 nm.

Para confirmar o resultado obtido por ELISA, veneno de *L. intermedia* (5 µg) foi transferido para membrana de nitrocelulose e, após o bloqueio, incubado com sobrenadantes celulares (5 mL) dos mAbs 5G5H8 e 5G5B11. Não foi possível observar reconhecimento do veneno por esses anticorpos monoclonais, assim como observado no ELISA. De forma contrária, o soro do CPPI foi capaz de reconhecer diferentes proteínas do veneno. Também não foi observado reatividade entre o monoclonal mAb4B6E6 e o veneno, como já esperado (**Figura 31**). A reatividade do mAb 5G5B2 contra o veneno de *L. intermedia* não foi analisada por *Western blot* porque o mesmo parou de secretar anticorpos.



**Figura 31: Imunorreatividade dos mAbs 5G5H8 e 5G5B11 por Western Blot.** Veneno de *L. intermedia* (5 $\mu$ g) foi submetido a SDS-PAGE 12,5% em condições não redutoras. As proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose, a qual foi incubada com Soro comercial anti-loxoscélico do CPPI (controle positivo), na diluição 1:1000 ou sobrenadante celular de (A) 5G5H8, (B) 5G5B11 (5 mL) ou mAb4B6E6 (controle negativo) (0,5  $\mu$ g/mL). A ligação do anticorpo foi detectada pela incubação da membrana com IgG anti-camundongo conjugada à HRP (diluição 1:10000). A membrana foi revelada utilizando DAB e Cloronaftol.

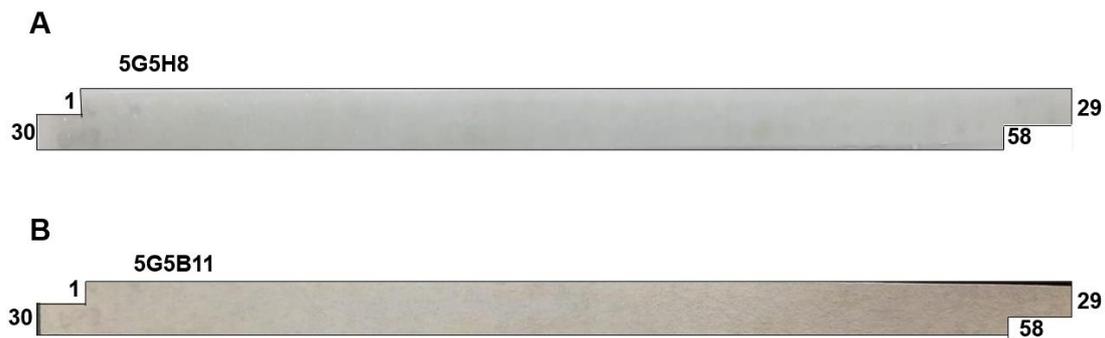
Posteriormente, avaliou-se a reatividade dos sobrenadantes celulares 5G5H8 e 5G5B11 contra rMEPLox, veneno de *L. intermedia*, rLALP1 ou rLiD1, sob condições redutoras, utilizando maiores concentrações das amostras (15  $\mu$ g) (Figura 32). Mesmo submetendo o veneno de *L. intermedia* a condições redutoras, na qual o epítomos estão mais expostos, os clones não foram capazes de reconhecê-lo. Esperava-se que com uma maior exposição dos epítomos os anticorpos monoclonais fossem capazes de reconhecer o veneno de *L. intermedia*. Da mesma forma, também não reagiram contra a fosfolipase recombinante rLiD1. Entretanto, mAb 5G5H8 e 5G5B11 foram capazes de reconhecer rMEPLox, como esperado, e a metaloprotease recombinante rLALP1.



**Figura 32: Imunorreatividade dos mAbs 5G5H8 e 5G5B11 por Western Blot.** rMEPLox, veneno de *L. intermedia*, rLALP1 e rLiD1 (15  $\mu$ g) foram submetidos a SDS-PAGE 12,5% em condições redutoras. As proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose, a qual foi incubada com (A) sobrenadante do clone 5G5H8 (5mL) ou (B) sobrenadante do clone 5G5B11 (5 mL). A ligação do anticorpo foi visualizada pela incubação da membrana com IgG anti-camundongo conjugada à HRP (diluição 1:10000). A membrana foi revelada utilizando DAB e Cloronaftol.

### 5.10. REATIVIDADE DOS mAbs 5G5H8 E 5G5B11 CONTRA rMEPLox POR SPOT

Em seguida, a fim de compreender o motivo dos mAbs 5G5H8 e 5G5B11 reconhecerem metaloprotease, mas não o veneno de *L. intermedia*, a técnica de SPOT foi realizada utilizando a membrana que contém a sequência completa da rMEPLox, a fim de avaliar qual epítipo presente na rMEPLox era reconhecido na estrutura da metaloprotease. Entretanto, não pudemos observar nenhum padrão de reconhecimento entre os sobrenadantes celulares dos anticorpos monoclonais 5G5H8 e 5G5B11 e a rMEPLox, indicando que os anticorpos reconhecem algum epítipo conformacional presente na estrutura da rMEPLox, o qual não está presente em proteínas do veneno, mas que provavelmente está presente na metaloprotease recombinante quando ela assume sua conformação (**Figura 33**).



**Figura 33: Mapeamento de epítomos da rMEPLox por SPOT.** Reatividade do mAbs A) 5G5H8 e B) 5G5B11 contra epítomos lineares na membrana da rMEPLox. Membrana de celulose contendo a sobreposição de peptídeos derivados da sequência de rMEPLox foi incubada com 5mL de cada anticorpo monoclonal. Após a incubação com anticorpo secundário anti-camundongo, marcado com fosfatase alcalina, foi adicionado substrato MTT-BCIP. Não foi observado padrão de reconhecimento entres os mAbs e os epítomos presentes na membrana.

## 6. DISCUSSÃO

Acidentes causados por mordidas de aranhas marrom, nomeado Loxoscelismo, são reportados em todo o mundo e constituem um problema de saúde pública em diferentes países, incluindo o Brasil. O loxoscelismo pode se apresentar sob duas formas: Loxoscelismo cutâneo ou sistêmico, sendo este último caracterizado por manifestações clínicas significativas, que podem evoluir para insuficiência renal aguda e morte em casos mais graves (MALAQUE *et al.*, 2016; CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2017).

O tratamento mais eficaz para o loxoscelismo se baseia na utilização de antiveneno, o qual apresenta grande potencial se administrado nas primeiras horas após o envenenamento (PAULI *et al.*, 2006; MALAQUE *et al.*, 2016). Entretanto, existem alguns problemas relacionados ao uso e produção dos antivenenos (reações adversas, alto número de animais utilizados na produção dos soros, composição heteróloga dos componentes do antiveneno, entre outros), e praticamente nenhuma melhoria tem sido feita ao longo dos anos no processo de desenvolvimento dos soros (HOGAN *et al.*, 2004; LAUSTSEN *et al.*, 2018; FIGUEIREDO *et al.*, 2014). Esses problemas limitam o uso desses anticorpos na terapia do loxoscelismo, tornando-se necessário o desenvolvimento de novas estratégias experimentais na produção de antivenenos.

Por essa razão, buscou-se nesse trabalho desenvolver anticorpos monoclonais que possam ser aplicados no tratamento do loxoscelismo. Nosso grupo de pesquisa previamente produziu anticorpos monoclonais neutralizantes contra fosfolipase-D de *L. intermedia* (ALVARENGA *et al.*, 2003; DIAS-LOPES *et al.*, 2014). Atualmente, o presente trabalho buscou desenvolver anticorpos monoclonais contra metaloproteases e hialuronidases presentes no veneno de *Loxosceles*, a fim de, posteriormente, estabelecer um tratamento experimental utilizando um *pool* de mAbs, uma vez que os sintomas clínicos do envenenamento são resultado da ação sinérgica dessas toxinas.

Para isso, uma proteína recombinante multiepitópica (rMEPLox) constituída de epítomos de células B derivados das três principais famílias de toxinas presentes no veneno de *Loxosceles* (fosfolipase D, metaloprotease e hialuronidase) foi utilizada como imunógeno para produzir anticorpos monoclonais. Assim, camundongos Balb/c receberam quatro doses de rMEPLox e todos apresentaram anticorpos contra essa proteína por ELISA ao fim do ciclo de imunização (**Figura 10**). O Animal 1 apresentou reatividade mais desejável contra rMEPLox e por isso suas células B foram fusionadas às células de mieloma gerando 9 poços contendo hibridomas secretores de anticorpos no primeiro *screening* (**Figura 11**). Posteriormente, essas

células foram subclonadas por meio de diluição limitante, resultando no segundo *screening* 12 anticorpos monoclonais anti-rMEPLox (**Figura 12**). Entretanto, somente os mAbs 4F5B2, 4F5B6 (Lox-mAb3), 4F5D6 e 4F5G4 reconheceram o veneno de *L. intermedia* por ELISA e *Western Blot* (**Figura 13 e 25**). O anticorpo 4F5B6 apresentou uma reatividade comparável ao soro policlonal anti-rMEPLox (controle positivo) contra o veneno de *L. intermedia* no ELISA (**Figura 13**) e, por essa razão, foi escolhido para ser caracterizado e passou a ser chamado de Lox-mAb3. Esse anticorpo foi purificado e demonstrou possuir reatividade por ELISA contra rMEPLox após essa etapa (**Figura 14**).

Lox-mAb3 reconhece metaloprotease do veneno de *L. intermedia* por ELISA, mas não reconhece fosfolipase-D ou hialuronidase (**Figura 16**). Por *Western blot*, observamos que esse anticorpo é reativo contra proteínas de aproximadamente 20 kDa presentes no veneno de *L. intermedia* (**Figura 17**). Feitosa e colaboradores (FEITOSA *et al.*, 1998) descreveram metaloproteases com diferentes tamanhos e afinidades por substratos distintas: (i) metaloproteases com capacidade de degradar gelatina com cerca de 32-35 kDa e (ii) metaloproteases que possuem afinidade por gelatina, mas apresentam maior especificidade por fibrinogênio e fibronectina, além de possuírem mobilidade eletroforética de 20-28 kDa. Nossos dados sugerem que Lox-mAb3 reconhece metaloproteases com atividade fibrino e fibronectinolítica, uma vez que o anticorpo reconhece proteínas com cerca de 20 kDa.

Lox-mAb3 também reconhece metaloproteases presentes em venenos de outras espécies de *Loxosceles*: *L. laeta* (Brasil), *L. gaúcho* e *L. laeta* (Peru) (**Figuras 19 e 20**). Os dados obtidos por Trevisan-Silva e colaboradores (2010) corroboram com os achados desse trabalho, uma vez que demonstraram que anticorpos policlonais anti-LALP1 foram capazes de reconhecer metaloproteases dos venenos de *L. intermedia*, *L. laeta* (Brasil) e *L. gaúcho*, o que indica que as metaloproteases presentes nesses venenos são conservadas entre si (TREVISAN-SILVA *et al.*, 2010). Observaram também, que soros anti-*L. intermedia*, anti-*L. laeta* e anti-*L. gaucho* tinham um padrão de reconhecimento de LALP-1 muito semelhante. Dias-Lopes *et al.*, 2014 demonstraram que LiD1mAb-16 reconhece fosfolipases-D de outras espécies de *Loxosceles*. Guilherme *et al.*; 2001 relatou a reatividade cruzada entre MoALg1 e os venenos de *L. gaucho* e *L. intermedia*, o que reforça a ideia de que os componentes dos venenos loxoscélicos são bem similares dentro do gênero dessas aranhas, o que poderia explicar a reatividade cruzada dos anticorpos. Por outro lado, Lox-mAb3 não reconheceu metaloproteases de diferentes gêneros de serpentes (*Bothrops*, *Crotalus*, *Lachesis* e *Micrurus*), reforçando que esse reconhecimento é específico ao gênero *Loxosceles*. Guilherme *et al.*, 2001 observaram que o perfil eletroforético dos venenos de *L. intermedia*, *L. laeta* e *L. gaucho* são similares entre si, mas diferem dos perfis

de outros venenos como *L. muta*, *C. durissus terrificus*, *B. jararaca*, *T. serrulatus* e *P. nigriventer*.

Apesar dos venenos de espécies de *Bothrops* e *Lachesis* apresentarem grandes quantidades de metaloproteases em sua composição (HATAKEYAMA *et al.*, 2020; Pla *et al.*, 2013), essas proteínas pertencem a uma família distinta de metazincinas, as adamalysinas II (W. STOCKER *et al.*, 1995), as quais são diferentes das metaloproteases do tipo astacina presente nos venenos loxoscélicos. Além do fato das metaloproteases serem de famílias diferentes nos venenos de serpentes e aranhas, os gêneros de serpentes *Micrurus* e *Crotalus* possuem menos de 1% do conteúdo do veneno referente à metaloproteases (SANZ ET AL., 2019; TASIMA *et al.*, 2020), o que reforça o não reconhecimento entre Lox-mAb3 e esses venenos.

Lox-mAb3 também não reconhece o veneno da aranha *P. nigriventer*. Até o momento as metaloproteases presentes nesse veneno são pouco descritas, mas sabe-se que há três classes diferentes dessas proteases (reprolisinas, neprolisinas e astacinas), as quais representam cerca de 5% do conteúdo do veneno (DINIZ *et al.*, 2017). A falta de reconhecimento entre Lox-mAb3 e o veneno de *P. nigriventer* pode ser devido à baixa concentração de metaloproteases do tipo astacina em sua composição, ou talvez, essas proteases dos venenos de *Phoneutria* e *Loxosceles* não compartilham o epítipo reconhecido por Lox-mAb3.

A observação de que este anticorpo monoclonal polivalente reconhece uma metaloprotease de diferentes espécies de *Loxosceles*, somada ao fato de Lox-mAb3 pertence à subclasse IgG1, sugere seu potencial para o tratamento de acidentes causados por aranhas do gênero *Loxosceles*. Guilherme e colaboradores (2001) também relataram que os quatro anticorpos monoclonais desenvolvidos contra a fosfolipase-D pertenciam a classe IgG1. Do ponto de vista terapêutico, a IgG1 é frequentemente o isotipo preferível no desenvolvimento de drogas, devido à sua alta capacidade de provocar função efetora e por exibir alta estabilidade. A IgG3 exibe função efetora semelhante à IgG1, mas raramente é usada no desenvolvimento de medicamentos devido à sua meia-vida sérica curta e sua instabilidade. Já a IgG2 e IgG4 apresentam função efetora reduzida (Buss *et al.*, 2012).

Posteriormente, o epítipo reconhecido por Lox-mAb3 foi mapeado através da sua ligação à peptídeos imobilizados em membrana de celulose cobrindo a sequência de LALP1 do veneno *L. intemedia*. Os resultados mostram que Lox-mAb3 reconhece fortemente três SPOTs (62, 63 e 64) que corresponde à sequência C-terminal de LALP1 (<sub>184</sub>ENNTRTIGPFDYDSIMLYGAY<sub>205</sub>) (**Figura 22A, 22B e 22C**). Todos os peptídeos reativos compartilham uma sequência contendo nove resíduos de aminoácidos

<sup>190</sup>IGPFDYDSI<sup>198</sup> em comum. É relevante notar que esta sequência (<sup>190</sup>IGPFDYDSI<sup>198</sup>) está localizada perto de um importante resíduo de metionina conservado dentro de uma região Met-turn (MXY) da metaloprotease, cujo resíduo de tirosina pode estar envolvido na ligação do substrato. Dia-Lopes *et al.*, 2014 também mapearam epítomos lineares (contendo 6 resíduos de aminoácidos) reconhecidos pelo LiD1mAb16 através da técnica de SPOT e demonstraram que essa técnica é eficaz no mapeamento de alguns antígenos.

Em seguida, mapeou-se os resíduos críticos envolvidos na interação do anticorpo Lox-mAb3 e a metaloprotease através de ensaio de alanina *scan*. Os resultados obtidos mostram que os resíduos de aminoácidos <sup>190</sup>GPFDYDS<sup>197</sup> presentes da sequência do peptídeo <sup>184</sup>ENNTRTIGPFDYDSIMLYGAY<sup>205</sup> são importantes para a ligação de Lox-mAb3 (**Figura 24**). Todos esses aminoácidos, com exceção do Pro192, são estritamente conservados entre as sequências de metaloproteases de *L. intermedia*, *L. gaúcho* e *L. laeta* (Brasil e Peru) (**Figura 23**), o que explica a reatividade cruzada deste anticorpo com várias isoformas de metaloprotease (**Figuras 20 e 21**). O resíduo de Pro192 é conservado em 31% das sequências analisadas. Com base no modelo 3D de LALP1, (UniProtKB-A0FKN6) (VMPA\_LOXIN) foi demonstrado que a sequência <sup>190</sup>IGPFDYDS<sup>197</sup> é exposta na superfície da proteína, o que favorece a ligação de Lox-mAb3 ao seu substrato (**Figura 22D e 22E**). A ligação de Lox-mAb3 na metaloprotease pode gerar um impedimento estérico, dificultando a ligação do substrato na proteína.

Uma vez que os resultados obtidos por ELISA e Western blot demonstraram que Lox-mAb3 reconhece metaloproteases com cerca de 20 kDa, foi realizado o ensaio de neutralização *in vitro*, no qual avaliamos a capacidade do anticorpo monoclonal neutralizar a atividade fibrinogenolítica, visto que metaloproteases com essa massa molecular possuem capacidade de degradar a cadeia alfa do fibrinogênio (FEITOSA *et al.*, 1998). Dessa forma, a neutralização da atividade fibrinogenolítica de metaloproteases do veneno de *L. intermedia* foi avaliada. A clivagem da fibronectina e do fibrinogênio por metaloproteases tem papel importante na patogênese do loxoscelismo, como hemorragia no local da mordida, dificuldade de cicatrização de feridas e pode também aumentar a permeabilidade das estruturas dos tecidos, facilitando a disseminação de outras toxinas por todo o corpo da vítima (GOMIS-RÜTH *et al.*, 2012)(DA SILVEIRA *et al.*, 2007). O anticorpo monoclonal gerado neste estudo foi capaz de neutralizar a atividade fibrinogenolítica causada pela ação da metaloprotease. O veneno de *L. intermedia* (3 µg) degradou a cadeia α do fibrinogênio (**Figura 24**). No entanto, a pré-incubação do veneno com Lox-mAb3 (25, 50 e 100µg) mostrou uma redução na degradação da cadeia α, sugerindo que o uso da quimera recombinante como imunógeno na geração de anticorpos monoclonais induziu a produção de um anticorpo capaz de neutralizar a atividade fibrinogenolítica da

metaloprotease. Portanto, sugere-se que a utilização desse anticorpo na terapia contra o loxoscelismo poderia levar a uma diminuição nos distúrbios hemorrágicos causados pelo veneno de *Loxosceles*.

Khanongnoi *et al.*, 2018 demonstraram que fragmentos variáveis de anticorpos humanos de cadeia simples (HuscFvs) são capazes de neutralizar a atividade fibrinogenolítica de uma metaloprotease presente no veneno da serpente *Naja kaouthia*, mencionando o potencial terapêutico de anticorpos capazes de neutralizar a atividade metaloproteásica e os efeitos hemorrágicos dessas proteínas. Schneider *et al.*, 2016 utilizaram epítomos mapeados por SPOT para gerar anticorpos policlonais contra a metaloprotease Atoxilisina-1 do veneno da serpente *Bothrops atrox*. O anticorpo produzido foi capaz de neutralizar a atividade fibrinogenolítica *in vitro* dessa proteína, além de neutralizar a atividade hemorrágica *in vivo*. De forma semelhante, Souza *et al.*, 2020 demonstraram que fragmentos de anticorpos direcionados à metaloproteases do veneno da serpente *Bothrops pauloensis* foram capazes de neutralizar a atividade fibrinogenolítica do veneno total e de metaloproteases purificadas, assim como a atividade hemorrágica do veneno *in vivo*, corroborando os indícios de que anticorpos que neutralizam a degradação do fibrinogênio podem ter potencial terapêutico contra hemorragias desencadeadas por animais peçonhentos.

Anticorpos policlonais, previamente produzidos utilizando rMEPLox como imunógeno em coelhos, também foram capazes de neutralizar a fibrinogenólise induzida por *L. intermedia* (Lima *et al.*, 2018). No entanto, essa neutralização foi observada apenas em altas concentrações de anticorpos, como 100µg. Diferente do que foi observado para Lox-mAb3, que foi capaz de prevenir a degradação do fibrinogênio em concentrações mais baixas (25µg) (**Figura 24**). Um provável motivo para a necessidade de maiores concentrações de anticorpos policlonais para neutralizar as atividades das toxinas, seria a presença, nos antivenenos, de um grande número de IgGs que não são direcionados às toxinas do veneno, mas a outros antígenos com os quais o animal imunizado entrou em contato durante sua vida. Os anticorpos monoclonais, por sua vez, apresentam um único isotipo, especificidade definida e todos os anticorpos selecionados têm capacidade neutralizante (LAUSTSEN *et al.*, 2018; ALVARENGA *et al.*, 2014). Portanto, um *pool* de anticorpos monoclonais direcionados às diferentes toxinas do veneno que são clinicamente importantes pode ser vantajoso para a melhora no tratamento dos envenenamentos.

Dessa forma, tentou-se produzir anticorpos monoclonais contra hialuronidases do veneno de *Loxosceles*. Essas proteínas, apesar de pouco expressas no veneno, apresentam relevante importância na clínica do loxoscelismo por degradarem ácido hialurônico, principal

componente da matrix extracelular. Hialuronidases no veneno de *Loxosceles* têm sido sugeridas como fatores de disseminação que aumentam a difusão de outras toxinas e no espalhamento gravitacional da dermonecrose, sendo sua neutralização uma importante estratégia na redução dos danos causados pelo envenenamento (DA SILVEIRA *et al.*, 2007; FERRER *et al.*, 2013).

Lima *et al.*, 2018 observaram que um soro anti-hialuronidase reconhece fracamente os epítomos lineares presentes na hialuronidase, sugerindo que essa proteína possui epítomos lineares pouco imunogênicos. Portanto, para se produzir os anticorpos monoclonais contra hialuronidases, camundongos Balb-C foram hiperimunizados com 12 doses de rMEPLox, a fim de gerar uma maior resposta imunológica nesses animais contra os epítomos dessa proteína. Através de ensaio de ELISA (**Figura 26**) observamos que todos os animais estavam secretando anticorpos contra a proteína rMEPLox de forma similar, com valores de absorvância próximos de 3 após as 12 doses da proteína. Para saber qual dos animais seria utilizado na produção de mAbs, ensaios de *SPOT* foram realizados utilizando os soros imunes desses camundongos, e pôde-se observar que o Animal 3 reconhecia os spots 31, 32, 33 e 34 na membrana de rMEPLox, os quais são referentes ao epítomo de hialuronidase (**Figura 27**). Dessa forma, as células do baço do Animal 3 foram utilizadas na produção de mAbs. Foi obtido apenas um hibridoma secretor de anticorpos contra rMEPLox, 5G5, o qual foi clonado gerando 4 clones secretores de anticorpos, 5G5H8, 5G5B2, 5G5B11 e 5G5G5 (**Figura 28**). Desses hibridomas, dois não puderam ser expandidos para posterior caracterização (5G5B2 e 5G5G5). Já os clones 5G5H8 e 5G5B12 foram expandidos e os sobrenadantes celulares coletados.

Por meio de ensaios imunológicos (ELISA e *Western blot*) pudemos observar que esses anticorpos reconhecem rMEPLox mas não o veneno de *L. intermedia* (**Figuras 30, 31 e 32**). Curiosamente, os anticorpos 5G5H8 e 5G5B11 reconhecem a metaloprotease recombinante, e não reconhecem fosfolipase D (rLiD1) ou hialuronidases recombinantes (rLiHYAL). Dessa forma, precisa-se investigar melhor o motivo pelo qual esse monoclonais reconhecem metaloprotease, mas não o veneno inteiro de *L. intermedia*. Em um primeiro momento, acreditava-se que esses anticorpos estariam reconhecendo a cauda de histidina, utilizada para purificar as proteínas recombinantes. Porém, não se observou reatividade com a rLiD1 que também possui a calda de histidina em sua estrutura, descartando essa possibilidade. Entretanto, a rMEPLox e a metaloprotease recombinante podem assumir uma conformação que expõe epítomos conformacionais semelhantes, uma vez que através da técnica de *SPOT* os mAbs 5G5H8 e 5G5B11 não reconhecem epítomos lineares na rMEPLox (**Figura 33**).

Sendo assim, esses anticorpos não reconhecem o veneno e, portanto, não são úteis no tratamento do loxoscelismo. Por esse motivo, novos anticorpos monoclonais que reconheçam

hialuronidases ainda necessitam ser desenvolvidos, e a próxima etapa desse trabalho será produzi-los através de uma nova abordagem de imunização, utilizando epítomos de hialuronidase previamente mapeados por Lima *et al.*, (2018).

Em suma, durante este trabalho um anticorpo monoclonal (Lox-mAb3) que reconhece metaloproteases responsáveis pelos distúrbios hemorrágicos do Loxoscelismo foi produzido. Esse anticorpo possui potencial neutralizante, uma vez que preveniu a degradação da cadeia alfa do fibrinogênio. Também foi possível reduzir o número de animais utilizados na produção de antivenenos, já que não foi necessário o uso de cavalos e aranhas para produzir os anticorpos monoclonais. Outro fato relevante é que diminuímos a toxicidade causada aos animais, visto que a rMEPLox não é tóxica, além de mais uma vez não ser necessária a utilização de animais para a produção de Lox-mAb3, pois o mesmo é agora produzido em cultura celular.

## 7. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram, pela primeira vez, o uso de uma quimera recombinante multiepitopica, composta por epítomos derivados das três principais famílias de toxinas presentes no veneno de aranhas *Loxosceles*, na produção de anticorpos monoclonais. O anticorpo gerado reconhece metaloproteases, de aproximadamente 20 kDa, dos venenos de espécies de *Loxosceles* de importância médica e é capaz de neutralizar a atividade fibrinogenolítica dessa toxina presente no veneno. Esses resultados abrem possibilidades para a potencial utilização do Lox-mAb3, em conjunto com os mAbs previamente produzidos contra a esfingomielinase-D, para melhorar os antivenenos terapêuticos contra o loxoscelismo, cobrindo a neutralização das principais proteínas responsáveis pelas manifestações clínicas.

Alguns dos dados demonstrados neste trabalho foram compilados e publicados na revista *International Journal of Biological Macromolecules*. Além deste, um outro artigo foi publicado em colaboração, na mesma revista, no qual otimizamos as condições de produção da rMEPLox, produzindo-a em maiores quantidades e agora na fração solúvel, o que facilita sua purificação. Ambos os trabalhos estão disponíveis na sessão Anexos. A otimização da produção da rMEPLox e um trabalho sobre a composição imunogênica de um epítomo da proteína L-aminoácido Oxidase de *B. atrox* geraram depósitos de patente, que também estão disponíveis na sessão anexos.

## 8. PERSPECTIVAS

Nosso grupo de pesquisa já caracterizou dois mAbs contra fosfolipase D que neutralizam a atividade dermonecrótica do veneno de *Loxosceles*. O próximo passo é produzir um anticorpo monoclonal capaz de neutralizar a atividade da hialuronidase e assim produzir um *pool* de anticorpos que neutralizem as principais toxinas envolvidas nas manifestações clínicas do loxoscelismo.

Além disso, almeja-se delinear um ensaio *in vivo*, no qual avaliaremos o potencial neutralizante de Lox-mAb3 sozinho e em conjunto com os demais mAbs gerados contra toxinas loxoscélicas. A humanização dos anticorpos e seu sequenciamento também são perspectivas desse trabalho.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. H. I. V. *Imunologia celular e molecular*. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

ALVARENGA, L. M.; MARTINS, M. S.; MOURA, J. F.; et al. Production of monoclonal antibodies capable of neutralizing dermonecrotic activity of *Loxosceles intermedia* spider venom and their use in a specific immunometric assay. **Toxicon**, v. 42, n. 7, p. 725–731, 2003.

ALVARENGA, L. M.; ZAHID, M.; DI TOMMASO, A.; et al. Engineering Venom's toxinneutralizing antibody fragments and its therapeutic potential. **Toxins**, v. 6, n. 8, p. 2541–2567, 2014.

BELLO, C. A.; HERMOGENES, A. L. N.; MAGALHAES, A.; VEIGA, S. S.; GREMSKI, L. H. Isolation and biochemical characterization of a fibrinolytic proteinase from *Bothrops leucurus* (white-tailed jararaca) snake venom. **Biochimie**, v. 88, p. 189–200, 2006.

BERTONI, R.; MEIRI, O.; CARLOS, O.; et al. Hyaluronidases in *Loxosceles intermedia* (Brown spider) venom are endo- b -N-acetyl- D -hexosaminidases hydrolases. **Toxicon**, v. 49, p. 758–768, 2007.

BODE, W. Astacins, serralysins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the. **FEBS**, v. 331, n. 1, p. 134–140, 1993.

DE-BONA, E.; CHAVES-MOREIRA, D.; BATISTA, T. B. D.; JUSTA, H. C. DA, ROSSI, G. R.; ANTUNES, B. C.; MATSUBARA, F. H.; MINOZZO, J. C.; WILLE, A. C. M.; VEIGA, S. S.; SENFF-RIBEIRO, A.; GREMSKI, L. H. Production of a novel recombinant brown spider hyaluronidase in baculovirus-infected insect cells. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 146, 2021.

BUCH, D. R.; SOUZA, F. N.; MEISSNER, G. O.; et al. Brown spider (*Loxosceles* genus) venom toxins: Evaluation of biological conservation by immune cross-reactivity. **Toxicon**, v. 108, p. 154–166, 2015.

BUSS, N. A. P. S.; HENDERSON, S. J.; MCFARLANE, M.; SHENTON, J. M.; DE HAAN, L. Monoclonal antibody therapeutics: History and future. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 12, n. 5, p. 615–622, 2012.

CALABRIA, P. A. L.; SHIMOKAVA-FALCAO, L. H. A. L.; COLOMBINI, M.; et al. Design and production of a recombinant hybrid toxin to raise protective antibodies against *Loxosceles* spider venom. **Toxins**, v. 11, n. 2, p. 1–21, 2019.

CHAVES-MOREIRA, D.; MATSUBARA, F. H.; SCHEMCZSSEN-GRAEFF, Z.; et al. Brown spider (*Loxosceles*) venom toxins as potential biotools for the development of novel therapeutics. **Toxins**, v. 11, n. 6, 2019.

CHÁVEZ-OLORTEGUI, C.; AMARAL, D.A.; ROCHAT, H.; DINIZ, C., GRANIER, C. In vivo protection against scorpion toxins by liposomal immunization. **Vaccine**, v. 9, n. 12, p. 907–10, 1991.

CHOW, S. K., & CASADEVALL, A. Monoclonal antibodies and toxins--a perspective on function and isotype. **In Toxins**, Vol. 4, Issue 6, pp. 430–454, 2012.

DIAS-LOPES, C.; FELICORI, L.; RUBRECHT, L.; et al. Generation and molecular characterization of a monoclonal antibody reactive with conserved epitope in sphingomyelinases D from *Loxosceles* spider venoms. **Vaccine**, v. 32, n. 18, p. 2086–2092, 2014.

DINIZ, M. R. V.; PAIVA, A. L. B.; GUERRA-DUARTE, C.; NISHIYAMA, M. Y.; MUDADU, M. A.; OLIVEIRA, U.; BORGES, M. H.; YATES, J. R.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L. An overview of *Phoneutria nigriventer* spider venom using combined transcriptomic and proteomic approaches. *Plos One*, v.13, n. 8, 2018.

DUARTE, C. G.; BONILLA, C.; GUIMARAES, G.; et al. 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**, p. 1–4, 2014.

FELICORI, L.; FERNANDES, P. B.; GIUSTA, M. S.; et al. An in vivo protective response against toxic effects of the dermonecrotic protein from *Loxosceles intermedia* spider venom elicited by synthetic epitopes. **Vaccine**, v. 27, p. 4201–4208, 2009.

FERRER, P.; MARI, T. L. DE; GREMSKI, L. H.; et al. A Novel Hyaluronidase from Brown Spider (*Loxosceles intermedia*) Venom (Dietrich's Hyaluronidase): From Cloning to Functional Characterization. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 5, 2013.

FIGUEIREDO, F. M.; DIAS-LOPES, C.; ALVARENGA, L. M.; et al. Innovative immunization protocols using chimeric recombinant protein for the production of polyspecific *Loxoscelic* antivenom in horses. **Toxicon**, v. 86, p. 59–67, 2014.

FUTRELL, J. M. Loxoscelism. **The American Journal of the Medical Sciences**, p. 261–267, 1992.

GREMSKI, L. H.; TREVISAN-SILVA, D.; FERRER, V. P.; et al. Recent advances in the understanding of brown spider venoms: From the biology of spiders to the molecular mechanisms of toxins. **Toxicon**, v. 83, p. 91–120, 2014.

GREMSKI, L. H.; JUSTA, H. C.; SILVA, T. P.; POLLI, N. L. C.; ANTUNES, B. C.; MINOZZO, J. C.; WILLE, N. C. M.; SENFF-RIBEIRO, A.; ARNI, R. K.; VEIGA, S. S. Forty Years of the Description of Brown Spider Venom Phospholipases-D. **Toxins**. V.12, 2020.

GREMSKI, L. H., MATSUBARA, F. H., POLLI, N. L. C., ANTUNES, B. C., SCHLUGA, P. H. DE C., JUSTA, H. C. DA, MINOZZO, J. C., WILLE, A. C. M., SENFF-RIBEIRO, A., & VEIGA, S. S. Prospective Use of Brown Spider Venom Toxins as Therapeutic and Biotechnological Inputs. In **Frontiers in Molecular Biosciences** V. 8, 2021.

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

GOMIS-RÜTH, F.X., TRILLO-MUYO S., STÖCKER W. Functional and structural insights into astacin metallopeptidases, **Biol. Chem**, v. 393, p. 1027–1041, 2012.

HATAKEYAMA, D. M.; TASIMA, L. J.; BRAVO-TOBAR, C. A.; SERINO-SILVA, C.; TASHIMA, A. K.; RODRIGUES, C. F. B.; AGUIAR, W. S.; GALIZIO, N. C.; LIMA, E. O. V.; KAVAZOI, V. K.; GUTIERREZ-MARÍN, J. D.; DE FARIAS, I. B.; SANT'ANNA, S. S.; GREGO, K. F.; MORAIS-ZANI, K.; TANAKA-AZEVEDO, A. M. Venom complexity of *Bothrops atrox* (common lancehead) siblings. **Journal of Venomous Animals and toxins including tropical diseases**, p 1-17, 2020.

HOGAN, C. J.; BARBARO, K. C.; WINKEL, K. Loxoscelism: Old obstacles, new directions. **Annals of Emergency Medicine**, v. 44, n. 6, p. 608–624, 2004.

ISBISTER, G. K.; FAN, H. W. Spider bite. **The Lancet**, p. 2039–2047, 2011

KÖHLER G.; MILSTEIN C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, v. 256, 1975.

KHANONGNOI, J.; PHANTHONG, S.; REAMTONG O.; TUNGTRONCHITR, A., CHAICUMPA, W.; SOOKRUNG, N.; Human Monoclonal scFvs that Neutralize Fibrinolytic Activity of Kaouthiagin, a Zinc-Metalloproteinase in Cobra (*Naja kaouthia*) Venom. **Toxins**, v. 10, n.509, 2018.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970.

LAUSTSEN, A. H.; MARÍA GUTIÉRREZ, J.; KNUDSEN, C.; et al. Pros and cons of different therapeutic antibody formats for recombinant antivenom development. **Toxicon**, v.

146, p. 151–175, 2018. LAUSTSEN, A. H.; SOLÀ, M.; JAPPE, E. C.; et al.

Biotechnological Trends in Spider and Scorpion Antivenom Development, 2016.

LIMA, S. DE A.; GUERRA-DUARTE, C.; COSTAL-OLIVEIRA, F.; et al. Recombinant protein containing B-cell epitopes of different *Loxosceles* spider toxins generates neutralizing antibodies in immunized rabbits. **Frontiers in Immunology**, v. 9, 2018.

LIPMAN, N. S.; JACKSON, L. R.; TRUDEL, L. J.; WEIS-GARCIA, F. Monoclonal Versus Polyclonal Antibodies: Distinguishing Characteristics, Applications, and Information Resources. **ILAR Journal**, p. 258-268, 2014.

LOPES, P. H.; SQUAIELLA-BAPTISTÃO, C. C.; MARQUES, M. O. T.; TAMBOURGI, D. V. Clinical aspects, diagnosis and management of *Loxosceles* spider envenomation: literature and case review. **Archives of Toxicology**, v. 94, n. 5, p. 1461–1477, 2020.

MARIA, W. S.; VELARDE, D. T.; ALVARENGA, L. M.; NGUYEN, C.; VILLARD, S. Localization of epitopes in the toxins of *Tityus serrulatus* scorpions and neutralizing potential of therapeutic antivenoms. **Toxicon**, v. 46, p. 210–217, 2005.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia de vigilância em saúde 3ª edição**. 2019.

MORGON, A. M.; BELISARIO-FERRARI, M. R.; TREVISAN-SILVA, D.; et al. Expression and immunological cross-reactivity of LALP3, a novel astacin-like metalloprotease from brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. **Biochimie**, v. 128–129, p. 8–19, 2016.

NISSIM, A.; CHERNAJOVSKY, Y. Historical development of monoclonal antibody therapeutics. **Handbook of Experimental Pharmacology**. v. 181, p.3–18, 2008.

OLIVEIRA-MENDES, B. B. R. DE; CHATZAKI, M.; SALES-MEDINA, D. F.; et al. From taxonomy to molecular characterization of brown spider venom: An overview focused on *Loxosceles similis*. **Toxicon**, v. 173, n. October 2019, p. 5–19, 2020.

DE OLIVEIRA, K. C.; GONÇALVES DE ANDRADE, R. M.; PIAZZA, R. M. F.; et al. Variations in *Loxosceles* spider venom composition and toxicity contribute to the severity of envenomation. **Toxicon**, v. 45, n. 4, p. 421–429, 2005.

OLIVER H. LOWRY; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265–275, 1951.

PAULI, I.; MINOZZO, J. C.; HENRIQUE DA SILVA, P.; CHAIM, O. M.; VEIGA, S. S. Analysis of therapeutic benefits of antivenin at different time intervals after experimental envenomation in rabbits by venom of the brown spider (*Loxosceles intermedia*). **Toxicon**, v. 53, n. 6, p. 660–671, 2009.

PAULI, I.; PUKA, J.; CRISTINA, I. The efficacy of antivenom in loxoscelism treatment. **Toxicon**, v. 48, p. 123–137, 2006.

PLA, D.; SANZ, L.; MOLINA-SÁNCHEZ, P.; ZORITA, V.; MADRIGAL, M.; FLORES-DÍAZ, M., ALAPE-GIRÓN, A.; NÚÑEZE, V.; ANDRÉS F.; GUTIÉRREZ, J. M.; CALVETE, J. J. Snake venomomics of *Lachesis muta rhombeata* and genus-wide antivenomics assessment of the paraspecific immunoreactivity of two antivenoms evidence the high compositional and immunological conservation across *Lachesis*. **Journal of Proteomics**, v. 89, p. 112- 123, 2013.

ROSEN, J. L.; DUMITRU, J. K.; LANGLEY, E. W.; MEADE OLIVIER, C. A.; Emergency Department Death From Systemic Loxoscelism. **Annals of Emergency Medicine**. V. 60, p 439-441, 2012.

DA SILVA, P. H.; DA SILVEIRA, R. B.; HELENA APPEL, M.; et al. Brown spiders and loxoscelism. **Toxicon**, v. 44, n. 7, p. 693–709, 2004.

DA SILVEIRA R.B., WILLE A.C.M., CHAIM O.M., APPEL M.H., SILVA D.T., FRANCO C.R.C., TOMA L., MANGILI O.C., GREMSKI W., DIETRICH C.P., NADER H.B., VEIGA S.S. Identification, cloning, expression and functional characterization of an astacin-likemetalloprotease toxin from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom, **Biochem.J.** v. 406, p. 355–363, 2007.

DA SILVEIRA R. B., CHAIM O.M., MANGILI O. C., GREMSKI W., DIETRICH C.P., NADER H.B., VEIGA S.S. Hyaluronidases in *Loxosceles intermedia* (Brown spider) venom are endo-b-N-acetyl-D-hexosaminidases hydrolases, **Toxicon**. V 49, 758-768, 2007.

SANZ, L.; DE FREITAS-LIMA, L. N.; QUESADA-BERNAT, S.; VIVIANE K. GRAÇA-DE-SOUZA, V. K.; SOARES, A. M.; CALDERÓN, L. A.; CALVETE, J. J.; CALDEIRA, C. A. S. Comparative venomomics of Brazilian coral snakes: *Micrurus frontalis*, *Micrurus spixii spixii*, and *Micrurus surinamensis*, **Toxicon**, v.166, p. 39-45, 2019.

SCHNEIDER, F.S.; DE ALMEIDA LIMA, S.; REIS DE ÁVILAA, G.; CASTRO, K.L.; GUERRA-DUARTEA, C.; SANCHEZ, E.F.; NGUYEN, C.; GRANIER C.; MOLINA F.; CHÁVEZ-OLORTEGUI C. Identification of protective B-cell epitopes of Atroxlysin-I: A metalloproteinase from *Bothrops atrox* snake venom, **Vaccine**, v. 34, p. 1680-1687, 2016.

STOCKER, W.; GRAMS, F.; BAUMANN, U.; REINEMER, P.; GOMIS-RUTH, F. X.; MCKAY, D. B.; BODE, W. The metzincins -Topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralysins, and matrixins (collagenases) define a superfamily of zinc-peptidases. **Protein Science**, v.4, p.823-840, 1995.

SWANSON, D. L.; VETTER, R. S. Loxoscelism. **Clinics in Dermatology**, v. 24, p. 213– 221, 2006.

TREVISAN-SILVA, D.; BEDNASKI, A. V.; GREMSKI, L. H.; et al. Differential metalloprotease content and activity of three *Loxosceles* spider venoms revealed using twodimensional electrophoresis approaches. **Toxicon**, v. 76, p. 11–22, 2013.

TREVISAN-SILVA, D.; GREMSKI, L. H.; CHAIM, O. M.; DA SILVEIRA, R. B.; MEISSNER, G. O.; MANGILI, C. O.; BARBARO, K. C; GREMSKI, W., VEIGA, S. S.; SENFF-RIBEIRO, A. Astacin-like metalloproteases are a gene family of toxins present in the venom of different species of the brown spider (genus *Loxosceles*). **Biochimie**, v. 92, p. 21-32, 2010.

TASIMA, L. J.; HATAKEYAMA, D. M.; SERINO-SILVA, C.; RODRIGUES, C. F. B.; DE LIMA, E. O. V.; SANT'ANNA, S. S.; GREGO, K. F.; MORAIS-ZANI, K.; SANZ, L.; CALVETE, J. J.; TANAKA-AZEVEDO, A. M, Comparative proteomic profiling and functional characterization of venom pooled from captive *Crotalus durissus terrificus* specimens and the Brazilian crotalic reference venom. **Toxicon**, 2020.

WORLD SPIDER CATALOG. VERSION 22.0 (2021). World Spider Catalog. Version 22.0.  
Nat. Hist. Mus. Bern

## 10. ANEXOS

**Anexo 1:** Alinhamento completo das sequências de metaloproteases das espécies de *L. intermedia*, *L. laeta* (Brasil), *L. gauch*o e *L. laeta* (Peru). Em vermelho a sequência reconhecida por Lox-mAb3 e em verde a região conservada Met-turn.

**Anexo 2:** Artigo publicado em 2020, intitulado: “Engineered antigen containing epitopes from *Loxosceles* spp. Spider toxins induces a monoclonal antibody (Lox-mAb3) against astacin-like metalloproteases”

**Tamara G.F. Costa**, Fernanda Costal-Oliveira, Thamyres C.S. de Assis, Sabrina A. Lima, Christina A. Martins, Alessandra B. Finco, Sílvia S. Veiga, Vanete T. Soccol, Ricardo A. Machado-de-Ávila, Luís F.M. Figueiredo, João C. Minozzo, Evanguedes Kalapothakis, Clara Guerra-Duarte, Larissa M. Alvarenga, Carlos Chávez-Olórtegui.

**Anexo 3:** Artigo publicado em 2021, intitulado: “A prokaryote system optimization for rMEPLox expression: A promising non-toxic antigen for *Loxosceles* antivenom production.” Rafael Saavedra-Langer, **Tamara G.F. Costa**, Sabrina A. Lima, Fernanda Costal-Oliveira, Christina A. Martins, Ricardo A. Machado-de-Ávila, João C. Minozzo, Vanete T. Soccol, Clara Guerra-Duarte, Evanguedes Kalapothakis, Carlos Chávez Olórtegui.

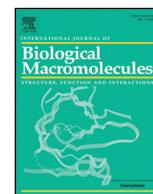
**Anexo 4:** Patente de invenção gerada em 2021-COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA CONTRA A ATIVIDADE NECRÓTICA LOCAL DE VENENOS OFÍDICOS E USOS. Número do Processo: BR 10 2021 026051 3

**Anexo 5:** Patente de invenção gerada em 2022 -PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE PROTEÍNA RECOMBINANTE MULTIEPÍTOPO DE LOXOSCELES E USO. Número do Processo: BR 10 2022 002686 6

Anexo 1:

LALP1	MIKYIGVFAFLVGGFCHDFET--VISNQDPIVDGMRLVEGDMLFDDGPFLETERNAVKYDQ	58
LALP2	MI PDVGFVLVLLT GALFCIKAAPATTDVDPTEGRIVMEGDI LIREEQ-LTERNAI ALEN	59
LALP3	-MTTMSFFT VLSVAVCLC-----IEAGVEGSRLNGRDMLMQEESPLMERNA LKYDS	50
LALP4	-----	0
LALP5	-----NAVKYDQ	7
LALP-LP3	MIKYIGILAFVLVGGFCLDFET--VISTQDPIVDGMRLVEGDMLLDDEP-FTERNAVKYDE	57
LALP-LP1	MIKYIGILAFVLVGGFCLDFET--VISTQDPIVDGMRLVEGDMLFDDEP-FTERNAVKYDQ	57
LALP-LP8	MIKYIGILAFVLVGGFCLDFET--VISTQDPIVDGMRLVEGDMLLDDEP-FTERNAVKYDQ	57
LALP-LP7	MIKYIGILAFVLVGGFCLDFET--VISTQDPIVDGMRLVEGDMLLDDEP-FTERNAVKNW	57
LALP-LP2	MIKYIGILAFVLVGGFCLDFET--VISTQDPIVDGMRLVEGDMLLDDEP-FTERNAVKYDQ	57
LALP-LP4	MIKYIGILAFVLVGGFCLDFET--VISTQDPIVDGMRLVEGDMLLDDEP-FTERNAVKNW	57
LALP-LP5	MIKYIGILAFVLVGGFCLDFET--VISTQDPIVDGMRLVEGDMLLDDEP-FTERNAVKNW	57
LALP-LP6	MIKYIGILAFVLVGGFCLDFET--VISTQDPIVDGMRLVEGDMLLDDEP-FTERNAVKNW	57
LALP1	QLWPNGEIVYEI SPGLRQYEQII REAMRTYEDNTCIKFRRRINEADYVNIHVGDRCYSRV	118
LALP2	MRWPDATI VYKLTGWYALF PGDIKKAMRHI EENTCIKFKARSNEEGYVKIYKGEKESCF A	119
LALP3	RLWPDGVVIYEFT-SLRFYRKLIRVMQH IADNTCITFKERTNEKGYVNIYNGKLF TCF A	109
LALP4	-----RET NENDYVDI HKGDKCYSRV	21
LALP5	QLWPNGEIIYEI SPGLRQYEQI LEAMRSYEDTTCIKFRRRFDEDDYVNIHVGDKCYSRV	67
LALP-LP3	QLWPNGEIVYEI SQALRPFKQRI REAMRSYEDTTCIE-----KDYVNIHVGDRCYSRV	110
LALP-LP1	QLWPNGVI IYKI SQALRQYAQRI REAMKSNE DENDY-----VDIHRGPKCYSRV	106
LALP-LP8	QLWPNGVVYIEI SQALRPFKQRI REAMRSVD-----IHRGPKCYSRV	99
LALP-LP7	QLWPNGEIVYEI SQALRPFKQRI REAMRSYEDTTCI-----KFRHRGPKCYSRV	106
LALP-LP2	QLWPNGVVYIEI SQS LRPFKQRI REAMRSYEDI-----HKGDKCYSRV	100
LALP-LP4	QLWPNGEIVYEI SQALRPFKQRI REAMRSYED-----HKGDKCYSRV	99
LALP-LP5	QLWPNGEIVYEI SQALRPFKQRI REAMRSYED-----HKGDKCYSRV	99
LALP-LP6	QLWPNGEIVYEI SQALRPFKQRI REAMRSYE-----KGDKCYSRV	97
LALP1	GKSFRRGGPQLSLGRGCTDFGTILHELGH SVGFDHEHSRADRDEFLIIHKENIKNGSEHN	178
LALP2	DIGYFASEQRLSLGSGCKIFGRILHEMGHTI GLFHEHTRPDRDNYITVHEDNIRPGSKRN	179
LALP3	DMGYYPFKQRLSLGLGCRSFGAIIHELGHVGLYHEQQR PDRDDYVIVYKDNIQTGALRD	169
LALP4	GKSFNGGPQLSLGKGCDFGTILHELGH SVGFNHEHSRSDRDEYLIIVHKNVLSGYERD	81
LALP5	GKSFRRGGPQLSLGNGCTDFGTILHELGH SVGFDHEHSRTDRDEYLI IHERNIKNGSEHN	127
LALP-LP3	GKSFNGGEQPLSLATGCTEFGTILHELGH SVGFDHEHSRSDRDEYLI IHNENVVATKEHN	170
LALP-LP1	GKS-KGGPQLSLGKGCDFGTILHELGH SVGF SHEHSRIDRDEFLIVHKNILNGSQHD	165
LALP-LP8	GKS-KGGPQLSLGKGCDFGTILHELGH SVGF SHEHSRIDRDEFLIVHKNILNGS-PD	157
LALP-LP7	GKS-KGGPQLSLGKGCDFGTILHELGH SVGF SHEHSRIDRDEFLIVHKNILNGSQHD	165
LALP-LP2	GKSFQGGPQLSLGKGCDFGTILHELGH SVGF SHEHSRVDRDEFLIVHEENILNGSQHD	160
LALP-LP4	GKSFQGGPQLSLGKGCDFGTILHELGH SVGF SHEHSRVDRDEFLIVHEENILNGSQHD	159
LALP-LP5	GKSFQGGPQLSLGKGCDFGTILHELGH SVGF SHEHSRVDRDEFLIVHEENILNGSQHD	159
LALP-LP6	GKSFQGGPQLSLGKGCDFGTILHELGH SVGF SHEHSRVDRDEFLIVHEENILNGSQHD	157
. . . * * * * . * * : * * * * : * * : * * : * * * * : : : * :		
LALP1	FDKLWENNRTRIGFDYDSIMLNGAYAFSKDTRKFKTMEFVEPGLPMKSVIQKGLSYDD	238
LALP2	YRKTPSYMRTRVIGFDYDSIMLNGETAGSRDFMHLKSM EANKPGVTLI SSRYKDRLTDLD	239
LALP3	YEKR FENNRTRVIGFDYDSIMLNGETDARKSGS--VTMKVKKPGATLVNASLKH ELTALD	227
LALP4	FEKLWENKTRTIGFDYDSIMLNGLLCLCFKGSV-----	114
LALP5	FEKLESKTRTIGFDYDSIMLNGSYAFSRDTEAVENHGTRRTRTPYEICHSKRKAELL-	186
LALP-LP3	FDKLWENNRTRIGFDYDSIMLNG-----	193
LALP-LP1	FKKKLENE TRTIGFDYDSIMLNG-----	189
LALP-LP8	FKKKLENE TRTIGFDYDSIMLNGPYAF-----	185
LALP-LP7	FKKKLENE TRTIGFDYDSIMLNGPYAFSKD-----	196
LALP-LP2	FKKKLENE TRTIGFDYDSIMLNG-----	184
LALP-LP4	FKKKLENE TRTIGFDYDSIMLNGPYAFSR-----	189
LALP-LP5	FKKKLENE TRTIGFDYDSIMLNGPYASSK-----	189
LALP-LP6	FKKKLENE TRTIGFDYDSIMLNGPYAFSKD-----	188
: * . * * * * * * * * * *		
LALP1	IVKVNKLYKCPPVNPYPGGIRPYVNV	264
LALP2	IKKIINTLYNCPGKEKFS-----	256
LALP3	IKKIINTLYNCPGKDKF-----	243
LALP4	-----	114
LALP5	-----	186
LALP-LP3	-----	193
LALP-LP1	-----	189
LALP-LP8	-----	185
LALP-LP7	-----	196
LALP-LP2	-----	184
LALP-LP4	-----	189
LALP-LP5	-----	189
LALP-LP6	-----	188

Anexo 2:



## Engineered antigen containing epitopes from *Loxosceles* spp. spider toxins induces a monoclonal antibody (Lox-mAb3) against astacin-like metalloproteases

Tamara G.F. Costa <sup>a</sup>, Fernanda Costal-Oliveira <sup>a</sup>, Thamyres C.S. de Assis <sup>a</sup>, Sabrina A. Lima <sup>a</sup>, Christina A. Martins <sup>a</sup>, Alessandra B. Finco <sup>b</sup>, Sílvio S. Veiga <sup>b</sup>, Vanete T. Soccol <sup>b</sup>, Ricardo A. Machado-de-Ávila <sup>c</sup>, Luís F.M. Figueiredo <sup>d</sup>, João C. Minozzo <sup>e</sup>, Evanguedes Kalapothakis <sup>a</sup>, Clara Guerra-Duarte <sup>f</sup>, Larissa M. Alvarenga <sup>b</sup>, Carlos Chávez-Olórtegui <sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Bioquímica e Imunologia and Genética, Ecologia e Evolução, Instituto Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

<sup>b</sup> Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, PR, Brazil

<sup>c</sup> Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC), Criciúma, SC, Brazil.

<sup>d</sup> Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Toledo, PR, Brazil

<sup>e</sup> Centro de Pesquisa e Produção de Imunobiológicos (CPPI), Curitiba, PR, Brazil

<sup>f</sup> Centro de Pesquisa e Desenvolvimento, Fundação Ezequiel Dias, 30510-010 Belo Horizonte, MG, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 17 May 2020

Received in revised form 17 June 2020

Accepted 18 June 2020

Available online 20 June 2020

#### Keywords:

Monoclonal antibodies

Metalloprotease

*Loxosceles* spider venoms

Multiepitopic recombinant protein

### ABSTRACT

Loxoscelism pose a health issue in the South America. The treatment for these accidents is based on the administration of antivenom produced in animals immunized with *Loxosceles* venom. In this work, a previously produced non-toxic multiepitopic chimeric protein (rMEPlox), composed of epitopes derived from the main toxins families (sphingomyelinase-D, metalloproteases, and hyaluronidases) of *Loxosceles* spider venoms, was used as antigen to produce monoclonal antibodies (mAbs). A selected anti-rMEPlox mAb (Lox-mAb3) reacted with metalloprotease from *L. intermedia* venom and showed cross-reactivity with metalloproteases from Brazilian and Peruvian *Loxosceles laeta* and *Loxosceles gaucho* venoms in immunoassays. The sequence recognized by Lox-mAb3 (<sub>184</sub>ENNTRTIGPFDYDSIMLYGAY<sub>205</sub>) corresponds to the C-terminal region of Astacin-like metalloprotease 1 and the amino acid sequence IGPFDYDSI, conserved among the homologs metalloproteases sequences, is important for antibody recognition. Lox-mAb3 neutralizes the fibrinolytic activity caused by metalloprotease from *L. intermedia* spider venom *in vitro*, which may lead to a decrease in hemorrhagic disturbances caused by *Loxosceles* envenomation. Our results show, for the first time, the use of a non-toxic multiepitopic protein for the production of a neutralizing monoclonal antibody against a metalloprotease of medically important *Loxosceles* venoms. These results contribute for the production improvement of therapeutic antivenom against loxoscelism.

© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Loxoscelism is the most important clinical syndrome resulting from *Loxosceles* spp. spider bite and can be observed as two well-defined clinical variants: (i) the cutaneous form, which manifests as pain and erythema that can develop into a necrotic ulcer; and (ii) the systemic loxoscelism, which is characterised by intravascular haemolysis and, occasionally, renal failure [1–4].

*Loxosceles* spp. venom contains several toxins, including alkaline phosphatases, hyaluronidases, metalloproteases, phospholipases D (also named sphingomyelinases), and neurotoxic peptides [5,6]. Among these venom proteins, sphingomyelinases family members, known as dermonecrotic toxins, hyaluronidases and metalloproteases are the most studied components as they are the major toxic proteins, and play an essential role in the loxoscelism pathogenesis [7–11]. Metalloproteases of *Loxosceles* venoms are zinc-dependent endopeptidases that hydrolyze fibronectin, fibrinogen and denatured type I collagen [7,12,13]. These proteases were considered highly expressed toxins in the *L. intermedia* venom glands, reaching about 25% of Expressed Sequence Tags (ESTs) [6].

Serum therapy is the recommended treatment for *Loxosceles* spiders envenoming [14,15]. The traditional horse antivenom production using

\* Corresponding author at: Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Antônio Carlos, 6627 Belo Horizonte, Brazil.

E-mail address: [olortegi@icb.ufmg.br](mailto:olortegi@icb.ufmg.br) (C. Chávez-Olórtegui).

venoms as immunogen is efficient, specially when initiated in time, however, it presents some issues related to the obtaining of venom necessary amount to perform the immunization program and pre-clinical tests of neutralizing potency [16]. Another important consideration is the toxic effect that crude venom exerts in the producer animal, commonly leading to the development of ulcers and abscesses, compromising the animal's well-being [17].

In this sense, alternative approaches for improving anti-loxoscelic antivenom production are necessary. The use of recombinant toxins [17–20] or synthetic peptides mimicking toxins mapped epitopes [21–24], have been proposed as innovations. A multi-epitopic chimeric recombinant protein (rMEPLox) containing B-cell epitopes of sphingomyelinase-D, hyaluronidase, and astacin-like metalloprotease toxins from *Loxosceles* venoms was previously produced by our group and used as antigen in rabbits' immunization. Sphingomyelinase-D and metalloprotease are responsible for inducing inflammatory response, erythema, dermonecrosis, hemorrhage, thrombocytopenia, hemolysis, disseminated intravascular coagulation, and renal failure, whilst hyaluronidase acts as spreading factor in loxoscelism [1,8,9,11,14]. The anti-rMEPLox polyclonal antibodies generated promoted protection in immunized rabbits against dermonecrosis mediated by sphingomyelinase-D activity. Furthermore, the incubation of *L. intermedia* venom with anti-rMEPLox polyclonal antibodies demonstrated the neutralization of metalloprotease and hyaluronidase *in vitro* activities [24].

These results opened the possibility of using this engineered non-toxic chimeric protein as antigen in order to obtain monoclonal antibodies (mAbs) against *Loxosceles* spider venoms. This approach results in animal suffering reduction, since *in vitro* hybridomas capable of continuously secrete the antibodies can be obtained. Furthermore, as rMEPLox has only the immunogenic epitopes of the main toxins, the produced antibodies may have greater specificity when compared to polyclonal antibodies.

In the present work, mAbs were produced by mice immunization with rMEPLox, since this protein has previously demonstrated ability to generate neutralizing polyclonal antibodies. The mAbs were screened by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) using *L. intermedia* venom or recombinant proteins (rMEPLox, phospholipase-D, hyaluronidase and astacin-like metalloprotease) as antigens coated into microtiter plates. One clone (Lox-mAb3), out of twelve anti-rMEPLox hybridomas, was reactive with metalloproteases from the tested *Loxosceles* venoms. The results of immuno assays with cellulose-bound peptides revealed that the Lox-mAb3 recognizes a highly conserved amino acid sequence of metalloproteases toxins. The pre-incubation of *L. intermedia* venom with this mAb, prevented the *in vitro* fibrinolytic activity induced by the crude *L. intermedia* venom, which suggests that Lox-mAb3 may be used for therapeutic serum development.

## 2. Material and methods

### 2.1. Animals, venoms and recombinant proteins

Animals were maintained at the Centro de Bioterismo of the Instituto de Ciências Biológicas of the Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Brazil, and received water and food under controlled environmental conditions. The investigation was performed in accordance to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health (NIH Publication N° 85-23, revised 1996) (A5452-01) and was approved by local authorities (45/2020 – Comitê de Ética em Experimentação Animal – UFMG).

*L. intermedia*, *Loxosceles laeta*, and *Loxosceles gaucho* venoms samples were provided by Dr. João Carlos Minozzo from Centro de Pesquisa e Produção de Imunobiológicos of Paraná State (CPPI). *Loxosceles similis* and *Phoneutria nigriventer* venoms were provided by Dr. Evanguedes Kalapothakis from UFMG and *L. laeta* (Peru) venom by Dr. Cesar Bonilla

from Instituto Nacional de Salud of Peru. *Lachesis muta muta* and *Crotalus durissus terrificus* snake venoms were provided by Fundação Ezequiel Dias (FUNED), located in Belo Horizonte, Brazil. *Bothrops atrox* snake venom was provided by Prof. Armando Yarlequé Chocas from Universidade Nacional Mayor de San Marco (Peru).

Astacin-like metalloprotease 1 (rLALP1) and hyaluronidase (rLiHYAL) recombinant proteins were provided by Dr. Sílvia Sanchez Veiga from Universidade Federal do Paraná, Brazil, and recombinant phospholipase D (rLiD1) was provided by Dr. Evanguedes Kalapothakis from UFMG, Brazil. The samples were stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until its use and protein concentration was measured by Lowry [25].

### 2.2. Monoclonal antibody production

Five female BALB/c mice (4–6 weeks old), received rMEPLox as immunogen (previously produced and purified according to [24]). After pre-immune (PI) sera collection, all animals received an initial subcutaneous (s.c.) injection of 50  $\mu\text{g}$ /animal of rMEPLox in Freund's complete adjuvant (Sigma). The same dose was administered in Freund's incomplete adjuvant (Sigma) at three subsequent injections, with 15 day-intervals. One week after the last immunization mice were bled, and immune sera reactivity against rMEPLox was tested by ELISA. For this, microtiter plates (Costar) were coated overnight at  $4^{\circ}\text{C}$  with 100  $\mu\text{L}$  of a 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  solution of rMEPLox in 0.02 M sodium bicarbonate buffer, pH 9.6. After blocking [2% casein in phosphate buffer saline (PBS)] and washing (0.01% Tween 20-PBS), sera from pre-immune and immune mice were added (dilution 1/200) and incubated for 1 h at  $37^{\circ}\text{C}$ . After washed, plates were incubated with anti-mouse IgG conjugated with peroxidase horseradish (HRP, Sigma-Aldrich) diluted 1/8000, for 1 h at  $37^{\circ}\text{C}$ .

One mouse was chosen to receive an intravenous booster injection of rMEPLox (5  $\mu\text{g}$  in 50  $\mu\text{L}$  of PBS). After three days, the spleen was removed and macerated to release splenocytes that were then fused with Sp2/0 myeloma cells (ATCC), using polyethylene glycol (PEG). The resulting hybridomas were cultivated for fifteen days in selective Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) 20% fetal bovine serum (FBS), containing Hypoxanthine, Aminopterin and Thymidine (HAT). Then, supernatants from hybridomas were screened by indirect ELISA using rMEPLox as antigen. ELISA plates (Costar) were coated overnight at  $4^{\circ}\text{C}$  with 100  $\mu\text{L}$  of a 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  solution of rMEPLox in 0.02 M sodium bicarbonate buffer, pH 9.6. After blocking (2% casein in PBS) and washing (0.01% Tween 20-PBS), supernatants hybridomas (50  $\mu\text{L}$ ) were added to the wells and incubated for 1 h at  $37^{\circ}\text{C}$ . Plates were washed and incubated with anti-mouse IgG conjugated with HRP (Sigma-Aldrich) diluted 1/4,000, for 1 h at  $37^{\circ}\text{C}$ . Absorbance was measured at 490 nm. A previously standardization was performed, and 1.0  $\mu\text{g}/\text{well}$  antigen concentration was chosen to realize the screening steps. Nine wells containing hybridomas were selected and cloned by limiting dilutions. For this, cells were diluted (1 cell/100  $\mu\text{L}$ ) in DMEM medium 20% FBS containing hypoxanthine and thymidine (HT) and distributed (100  $\mu\text{L}/\text{well}$ ) in 96 culture plates (Sarstedt). Fifteen days after cloning, a new screening was performed, following the same methodology described for the first one, and twelve anti-rMEPLox mAb-secreting clones were selected. All ELISA protocols were performed according to Chavez-Olortegui et al. [26].

The Lox-mAb3 was chosen for the large-scale production in cell culture and the immunoglobulins were purified in a single step by immunoaffinity chromatography using HiTrap Protein G Hp (GE Healthcare), according to the manufacturers instructions, and 10% SDS-PAGE was carried out following Laemmli [27], to verify mAb purity. Gel was run at 120 V for 1 h.

### 2.3. Monoclonal antibody isotyping

The monoclonal antibody isotyping was performed using the Roche branded IsoStrip kit, following the manufacturer's instructions. Briefly,

1 µg/mL of sample was diluted in PBS-BSA 1% and 150 µL of this solution were added to a development tube for 30 s with rapid vortexing. The strip was then inserted in the tube containing this solution and after 5 min incubation the results were interpreted by the presence of a blue band in the section of the strip containing the IgG isotype to which the antibody belongs.

#### 2.4. Indirect ELISA

ELISA tests were performed according to Chavez-Olortegui et al. [26]. To evaluate which protein present in *L. intermedia* venom is recognized by the Lox-mAb3, microtiter plates (Costar) were coated overnight at 4 °C with 100 µL/well of a 5 µg/mL solution of recombinant proteins: rMEPlox (positive control), rLALP1, rLID1 or rLiHYAL in 0.02 M sodium bicarbonate buffer, pH 9.6. After blocking (2% casein in PBS) and washing (0.01% Tween 20-PBS), 0.45 µg from Lox-mAb3 and pre-immune IgG (negative control) were added and incubated for 1 h at 37 °C. After washing, plates were incubated with anti-mouse IgG conjugated with HRP (Sigma-Aldrich) diluted 1/8000, for 1 h at 37 °C.

With the purpose of studying the cross-reactivity of Lox-mAb3 with other *Loxosceles* antigens, *L. intermedia*, *L. gaucho*, *L. laeta* (Brazil), *L. laeta* (Peru) venoms or rMEPlox (positive control), were coated overnight at 4 °C with 100 µL/well of a 5 µg/mL solution of each venom. Lox-mAb3 and pre-immune IgG (negative control), both 0.45 µg, were added and incubated for 1 h at 37 °C. Anti-mouse IgG conjugated with HRP (Sigma-Aldrich) diluted 1/8000 was used, for 1 h at 37 °C. Absorbance was measured at 490 nm. All measurements were performed in duplicate.

#### 2.5. Immunoblot analysis

In order to confirm the results obtained by ELISA, an immunoblotting assay was performed. *L. intermedia* venom (5 µg) and molecular weight markers (Sigma) were subjected to 12.5% SDS-PAGE following Laemmli protocol [25], and the gel was run at 120 V for 1 h. After electrophoresis, proteins were transferred to a 0.22 µm nitrocellulose membrane (Bio-Rad) for antibody recognition. Non-specific binding sites were blocked for 1 h in PBS containing 0.3% (v/v) Tween 20, and the blot was incubated with 0.5 µg/mL Lox-mAb3 for 1 h at room temperature. Non-related mAb was used as negative control in the same concentration and anti-loxoscelic serum diluted 1/1000 was used as positive control. The nitrocellulose membrane was then washed and incubated for 1 h at room temperature with anti-mouse IgG conjugated with HRP (Sigma-Aldrich) diluted 1/8000, in PBS containing 0.05% (v/v) Tween 20. After several washes, the reaction was developed by the addition of the peroxidase substrate (3 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) and chloronaftol).

With the purpose of studying the Lox-mAb3 cross-reactivity with other spiders and snakes antigens, venoms (5 µg) from *L. intermedia*, *L. gaucho*, *L. laeta* (Brazil), *L. laeta* (Peru), *Loxosceles similis*, *P. nigriventer* spiders, and *B. atrox*, *C. durissus* or *L. muta* snake, were subjected to 12.5% SDS-PAGE. After transferred and blocked, the membrane was incubated with 0.5 µg/mL of Lox-mAb3 for 1 h at room temperature. The assays were conducted as described previously.

#### 2.6. SPOT synthesis and immunoassay

Cellulose membrane containing 84 overlapping pentadecapeptide frameshifted by 3 residues covering the primary sequence of LALP1 protein (UniProt: A0FKN6) was prepared by SPOT synthesis aiming to map linear B-cell epitopes on metalloprotease (LALP1). For the Alanine Sacanning membrane synthesis, the peptide recognized by Lox-mAb3 in LALP1 sequence, ENNTRTIGFPDYDSIMLYGAY, and twenty-two of its alanine analogs (glycine was used to check the alanine contribution) were prepared, aiming to identify the amino acids responsible for Lox-mAb3 recognition. For both membranes, peptide synthesis was

performed using a Multiprep ResPep SL Automatic SPOT-synthesizer (IntavisAG, Bioanalytical Instruments, Germany), as previously described by Laune et al. [28].

For the immunodetection assays, the membranes were blocked overnight [PBS-bovine serum albumin (3%), sucrose (5%)]. Then, membranes were probed with Lox-mAb3 (1 µg/mL). Antibody binding was detected using goat anti-mouse IgG conjugated to alkaline phosphatase (Sigma, 1/2000) for 90 min, at 37 °C. After washing, the substrates 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (Sigma) and 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazolium bromide (Sigma) were added and a blue precipitate was formed on reactive peptides. The probed membranes were photographed and regenerated using dimethylformamide, then 1% SDS, 0.1% β-mercaptoethanol in 8 M urea, followed by ethanol/water/acetic acid (50,40,10 vol/vol/vol) and ethanol.

#### 2.7. Epitope localization in 3D LALP1 structure

The epitope location recognized by Lox-mAb3 was analyzed in the three-dimensional model of LALP1 structure, available in Swiss-Model (code: A0FKN6, VMPPA\_LOXIN). The identified epitope was visualized with Pymol (Molecular Graphics System, Version 2.0, Schrödinger, LLC). The sequence recognized by Lox-mAb3 is shown in red, and the met-turn amino acids are highlighted in green.

#### 2.8. Alignment of *Loxosceles* homolog sequences

In order to evaluate whether the sequence recognized by Lox-mAb3 by SPOT was conserved in LALPS from others *Loxosceles* species, a multiple alignment of sequences was carried out using clustal Omega software (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) using the metalloproteases sequences from available from the Uniprot (<http://www.uniprot.org/uniprot/>): *L. intermedia* LALP1 (A0FKN6), LALP2 (C9D7R2), LALP3 (C9D7R3); Brazilian *L. laeta* LALP4 (PODM61); *L. gaucho* (PODM62) and Peruvian *L. laeta* LALP-LP1 to 8.

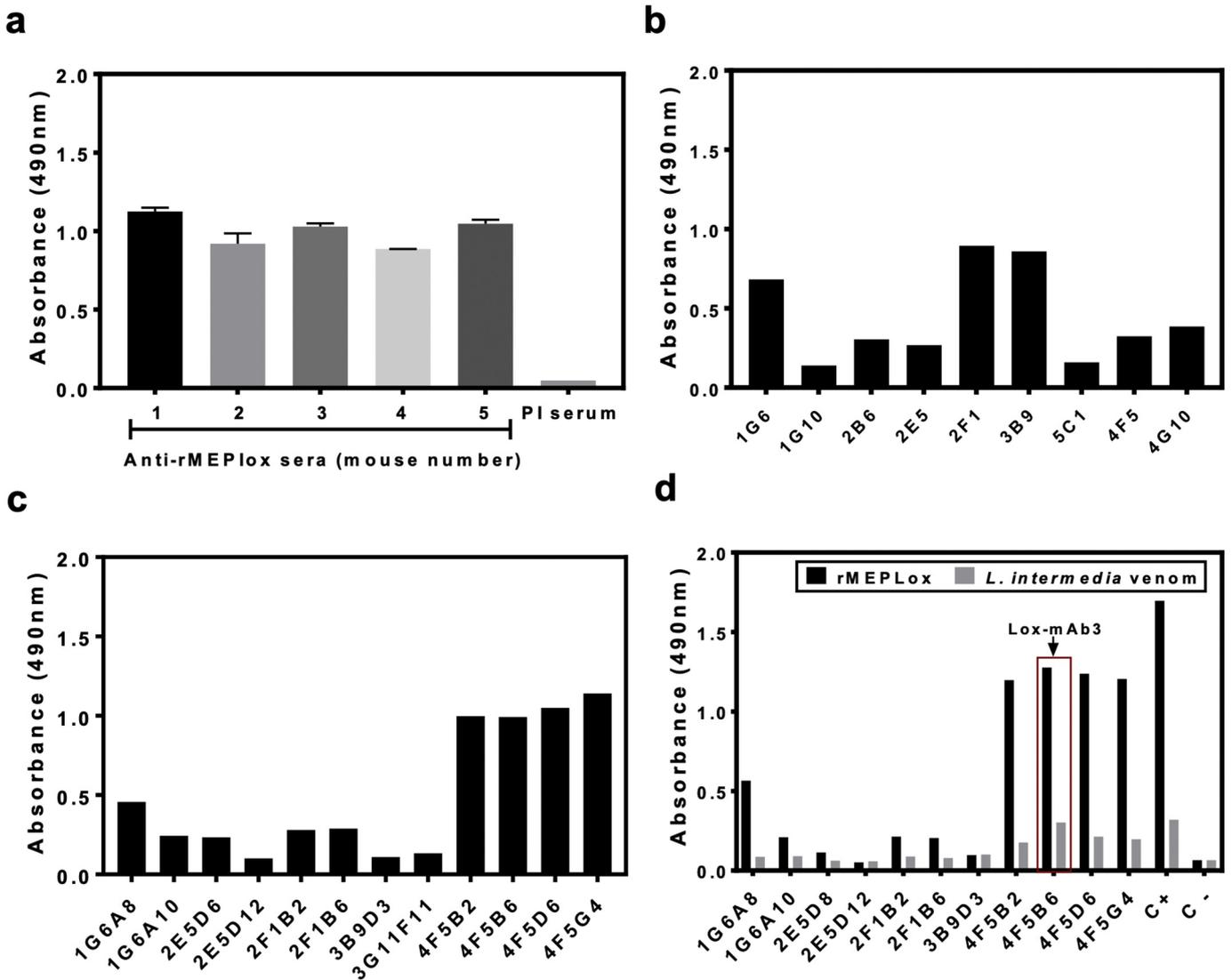
#### 2.9. In vitro neutralizing assay

The Lox-mAb3 ability to neutralize the metalloprotease activity from *L. intermedia* venom was tested, as described by Bello et al. [29]. Fibrinogen (Fg) was dissolved in Tris-HCl buffer (25 mM Tris, 0.15 M NaCl, pH 7.4) at a final concentration of 2.5 mg/mL. *L. intermedia* venom (3 µg) was incubated with Lox-mAb3 (5, 25, 50 and 100 µM) at a final volume of 50 µL for 1 h at 37 °C. After the incubation, 20 µL of Fg were added and the mixture was incubated for 16 h at 37 °C. After this interval, 50 µL aliquots were mixed with 50 µL of denaturing solution (10 M urea, 4% β-mercaptoethanol, 4% SDS) for 18 h. A 20 µL aliquot of the final solution was analyzed in 10% SDS-PAGE under reducing conditions and stained with Coomassie blue.

### 3. Results

#### 3.1. Production of mAbs anti-rMEPlox

To monoclonal antibodies production, five BALB/c mice were immunized with 50 µg of rMEPlox. Seven days after the fourth dose, mice were bled, and the sera were tested by ELISA. All immunized animals produced antibodies against rMEPlox in 1/200 serum dilution (Fig. 1a). However, mouse 1 presented the highest antibody titer and was chosen to proceed with the monoclonal antibodies production. Pre-immune serum was used as negative control and showed no immune reaction against rMEPlox, demonstrating that the recognition observed among immune sera is specific. Thus, mouse 1 splenocytes were fused with Sp2/0 myeloma cells and nine wells containing hybridomas secreting antibody were selected (Fig. 1b) and sub-cloned resulting in twelve monoclonal antibodies (Fig. 1c). All of the mAbs cell culture



**Fig. 1.** Monoclonal production and selection. a) Reactivity between mice serum and rMEPlox. ELISA plates were pre-coated with rMEPlox (0.5  $\mu\text{g}/\text{well}$ ). Anti-rMEPlox mice sera and pre-immune serum (used as negative control) were diluted 1/200. b) Reactivity between hybridomas supernatants and rMEPlox. ELISA plates were pre-coated with rMEPlox 1  $\mu\text{g}/\text{well}$  and cell supernatants (50  $\mu\text{L}$ ) were tested. c) Reactivity between clones supernatants and rMEPlox. ELISA plates were pre-coated with rMEPlox 1  $\mu\text{g}/\text{well}$  and cell supernatants (50  $\mu\text{L}$ ) were tested. d) Recognition of rMEPlox or *L. intermedia* venom by clones supernatants one month after cloning. ELISA plates were pre-coated with rMEPlox or *L. intermedia* venom (1  $\mu\text{g}/\text{well}$ ) and cell supernatants (50  $\mu\text{L}$ ) were assayed for reactivity against antigens. Anti-rMEPlox serum (diluted 1/100) and sp2/0 (50  $\mu\text{L}$ ) supernatant were used as positive (C+) and negative (C-) control respectively. mAb4F5B6 was the most reactive clone and was named as Lox-mAb3 (highlighted in red). For all assays, binding was visualized by incubation with peroxidase-coupled anti-mouse IgG [diluted 1/8000 (A) or diluted 1/4000 (B, C and D)] and by the further addition of *O*-phenylene diamine.

supernatants (50  $\mu\text{L}$ ) were reactive against rMEPlox, however, only 4F5B2, 4F5B6, 4F5D6 and 4F5G4 mAbs reacted with *L. intermedia* venom antigens. The mAb4F5B6, named Lox-mAb3, was chosen to the characterization steps for presenting similar recognition to the anti-rMEPlox serum, used as positive control, against *L. intermedia* venom by ELISA, one month after the fusion. (Fig. 1d). Therefore, this mAb was expanded and the cell supernatant was purified in protein G column (GE healthcare). After purification, 10% SDS PAGE was performed (Fig. 2a). It is possible to observe only a 150 kDa band, which is the molecular mass of the whole IgG (non reducing condition), and 50 kDa and 25 kDa bands (reducing condition) corresponding to the IgG heavy and light chain, respectively. This outcome shows the Lox-mAb3 purity.

### 3.2. Lox-mAb3 isotyping

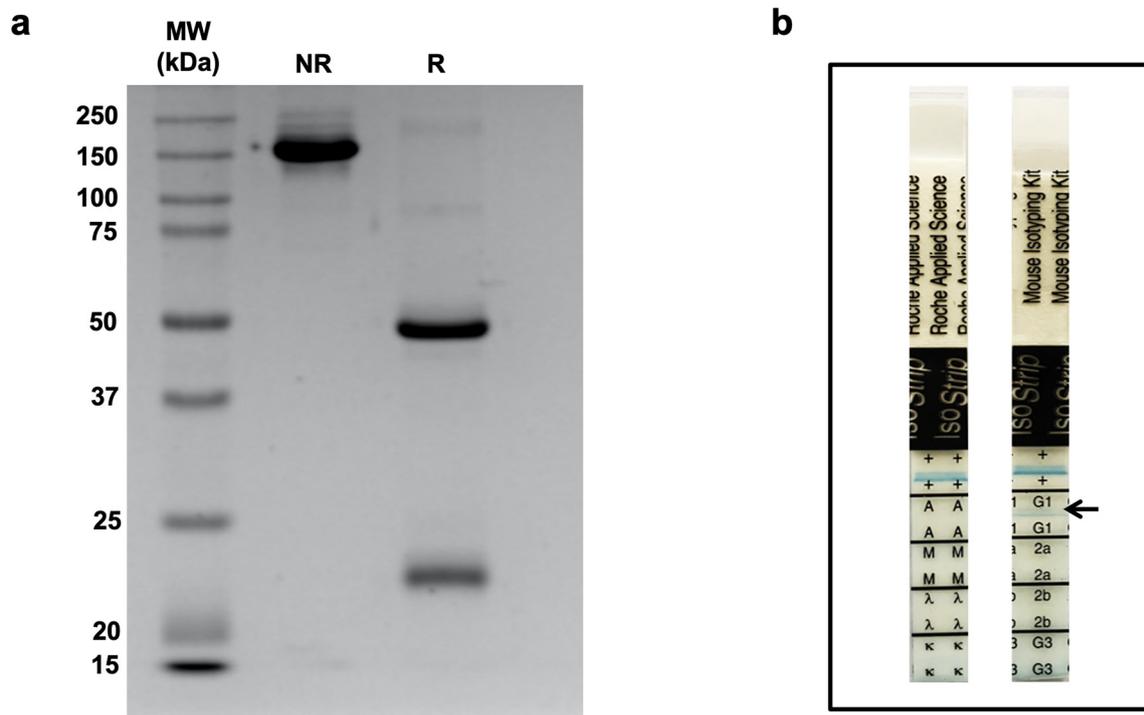
Since there are four IgG isotypes (IgG1, IgG2, IgG3 and IgG4), each one with distinct constant domains, the molecular characterization of Lox-mAb3 was initiated by its isotyping. This assay was performed

using an Isostrip kit (Roche) and the appearance of a blue band in IgG1 region, showed that Lox-mAb3 belongs to this subclass (Fig. 2b).

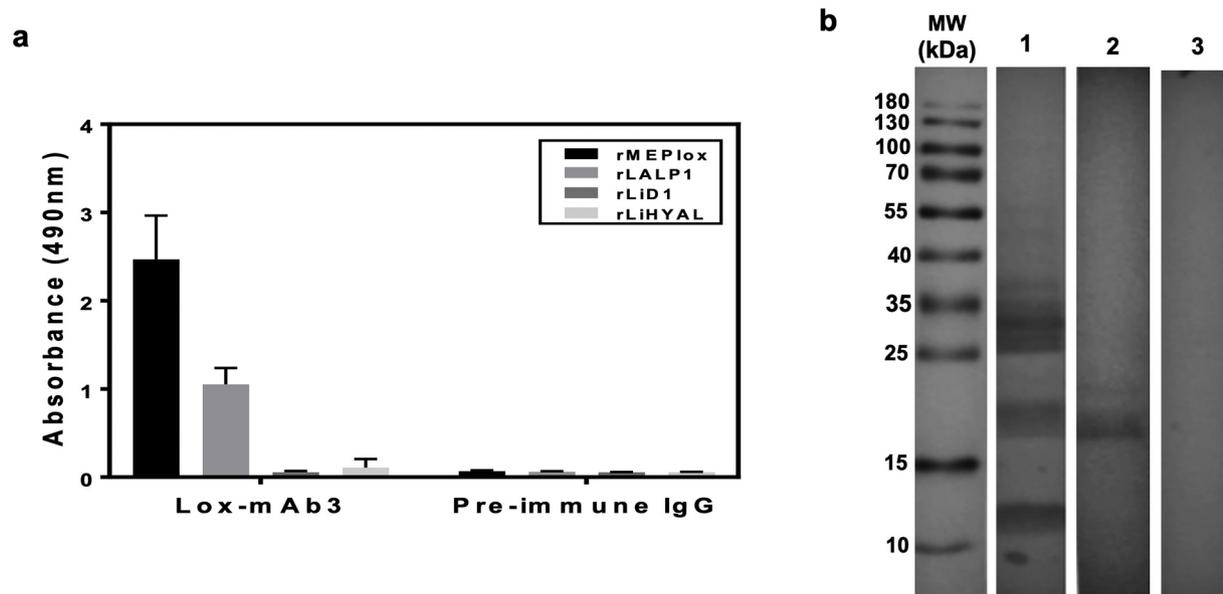
### 3.3. Immunocharacterization of Lox-mAb3

In order to investigate which *L. intermedia* venom protein is recognized by Lox-mAb3, this monoclonal was tested against rLALP1, rLiD1, rLiHYAL or rMEPlox which was used as positive control. Lox-mAb3 was able to recognize metalloprotease, however it did not recognize sphingomyelinase D and hyaluronidase. There was no reactivity among pre-immune IgG, used as negative control, and these proteins (Fig. 3a). These results show that Lox-mAb3 is specific for metalloproteases present in *L. intermedia* venom.

In order to identify the molecular mass of the protein recognized by Lox-mAb3, a Western blot was performed with *L. intermedia* venom and this monoclonal antibody. According to Fig. 3b, these antibodies identified only one band of approximately 20 kDa, which indicates that Lox-mAb3 recognizes metalloproteases that use fibrinogen and fibronectin



**Fig. 2.** Characterization of Lox-mAb3 SDS-PAGE and isotyping. a) Monoclonal antibody (10  $\mu$ g) was electrophoresed on 10% SDS polyacrylamide gel under non-reducing conditions (NR) and reduction conditions (R). Gel was stained with Coomassie blue. b) Lox-mAb3 isotyping was performed according to the manufacturer's instructions (Roche). Sample (1  $\mu$ g/mL) was diluted in PBS- BSA 1% and 150  $\mu$ L of this solution were used and after 5 min the results were visualized by the appearance of a blue band.

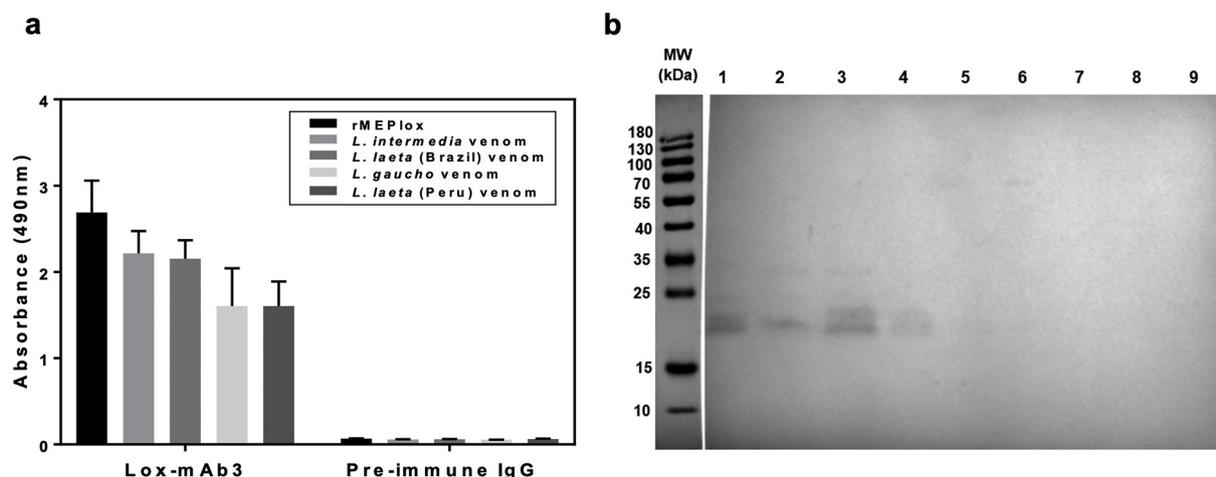


**Fig. 3.** Immune reactivity of Lox-mAb3. a) Immune reaction between Lox-mAb3 and *L. intermedia* venom proteins by ELISA. Plates were pre-coated (0.5  $\mu$ g/well) with rMEPlox, or *L. intermedia* proteins. Lox-mAb3 and pre-immune IgG (0.45  $\mu$ g/well) were tested. Binding was visualized by the incubation with HRP-coupled anti-mouse IgG (diluted 1/8000) with the further addition of *O*-phenylene diamine. b) Immune reaction between Lox-mAb3 and *L. intermedia* venom by Western blot. *L. intermedia* venom (5  $\mu$ g) were electrophoresed on 12.5% SDS-PAGE under non-reducing conditions, transferred to nitrocellulose paper and incubated with (1) anti-loxoscelic serum diluted 1/1000 (2) 0.5  $\mu$ g/mL of Lox-mAb3 and (3) 0.5  $\mu$ g/mL of non-related mAb. Binding was visualized by the incubation with HRP-coupled anti-mouse IgG (diluted 1/8000) and the reaction was detected using 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) and chloronaftol.

as substrate. The anti-loxoscelic serum from CPPI, used as positive control, reacted with different proteins and a non-related monoclonal antibody, used as negative control, did not recognize any protein that composes the *L. intermedia* venom.

#### 3.4. Lox-mAb3 cross-reactivity

Lox-mAb3 reactivity against rMEPlox (control), *L. intermedia*, *L. gauchoi*, *L. laeta* (Brazil), *L. laeta* (Peru) brown spider venoms was



**Fig. 4.** Cross-reactivity between Lox-mAb3 and venoms from other species of spiders and snakes. a) ELISA plates were precoated with of 0.5 µg/well of rMEPlax (positive control), crude venoms from *L. intermedia*, *L. laeta* (Brazil), *L. gaucho* or *L. laeta* (Peru) spiders. Lox-mAb3 and pre-immune IgG (0.45 µg/well) (negative control) were tested. Binding was visualized by incubation with peroxidase-coupled anti-mouse IgG (diluted 1/8000) and by the further addition of *O*-phenylene diamine. b) Venoms (5 µg) from *L. intermedia* (line 1), *L. gaucho* (line 2), *L. laeta* Brazil (line 3), *L. laeta* Peru (line 4), *L. similis* (line 5), *P. nigriventer* (line 6), *B. atrox* (line 7), *C. durissus* (line 8) and *L. muta* (line 9) were electrophoresed on 12.5% polyacrylamide SDS-PAGE under non-reducing conditions, transferred to nitrocellulose paper and incubated with 0.5 µg/mL of Lox-mAb3. Binding was visualized by the incubation with peroxidase-coupled anti-mouse IgG (diluted 1/8000) and the reaction was detected using 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) and chloronaftol.

evaluated by ELISA (Fig. 4a). The results show that Lox-mAb3 cross-reacted with all *Loxosceles* venoms tested and this recognition was further evaluated by Western blot. In addition to the four venoms previously analyzed by ELISA, *L. similis* and *P. nigriventer* spider venoms, and *B. atrox*, *C. durissus* and *L. muta* snake venoms were also tested by Western blot (Fig. 4b). Lox-mAb3 reacted with most of the *Loxosceles* venoms (*L. intermedia*, *L. gaucho*, *L. laeta* (Brazil), *L. laeta* (Peru)). However, it did not recognize *L. similis*, *P. nigriventer* spider venoms and snake species venoms (*B. atrox*, *C. durissus* and *L. muta*). Through Western blot analysis, it was observed that Lox-mAb3 recognizes the same molecular weight range, approximately 20 kDa, in all the reactive venoms, which corresponds to the molecular weight of some metalloproteases. This result indicates that metalloproteases present in these venoms may possess a common epitope.

### 3.5. Identification of epitopes recognized by Lox-mAb3

We next mapped linear B-cell epitopes on metalloprotease (LALP1) recognized by Lox-mAb3 using SPOT method. A set of 84 overlapping peptides (15 residues, frameshifted by 3 residues) was prepared covering the primary sequence of LALP1 protein (Fig. 5a). The binding pattern of Lox-mAb3 (1 µg/mL) with overlapping peptides shows the strong recognition of three peptides in the C-terminal region (SPOTs 62, 63 and 64) (Fig. 5b). The amino acid sequences of reactive peptides, ENNTRTIGPFDYDSI, TRTIGPFDYDSIMLY, IGPFDYDSIMLYGAY, exhibit a common sequence that contains 9 amino acid residues ( $_{190}$ IGPFDYDSI $_{198}$ ) (Fig. 5c). To visualize the location of experimentally determined epitope, three-dimensional model of LALP1 was used (Fig. 5d). The epitope region found (shown in red) is located next to the met-turn (MLY) region (shown in green), which is a key element to metalloproteases function, since methionine forms a hydrophobic base for the zinc atom at the enzyme catalytic site [30]. From the location of the epitope in the three-dimensional structure of LALP1, it can be observed that the region recognized by Lox-mAb3 is found on the surface of the metalloprotease, which could favor the binding of the antibody to the protein due to its accessibility.

In order to identify whether this sequence is conserved between different species of *Loxosceles* spiders venoms, the multiple sequence alignment of metalloproteases present in the venoms from *L. intermedia* (LALP1, LALP2, LALP3), *L. laeta* Brazil (LALP4), *L. gaucho* (LALP5) and *L. laeta* Peru (LALPs LP1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8) was performed

(Fig. 6). The epitope  $_{190}$ IGPFDYDSI $_{198}$  identified by the SPOT assay, with Pro $_{192}$  exception, contains conserved residues in all analyzed sequences (shown in red), which may explain the cross reactivity observed by ELISA and Western blot. This epitope is close to an important and well conserved region in these enzymes, the Met-turn sequence (highlighted in green). The complete alignment is shown in the supplementary Fig. S1.

Aiming to identify the critical amino acid residues in the LALP1 epitope recognized by Lox-mAb3, a serie of alanine analogs of peptide ENNTRTIGPFDYDSIMLYGAY was prepared by SPOT synthesis. The results (Fig. 7) revealed that some residues in the peptide sequence could not be modified by alanine without a drastic decrease in the reactivity with the antibody: this is the case of Ile $_{190}$ , Gly $_{191}$ , Pro $_{192}$ , Phe $_{193}$ , Tyr $_{195}$ , Asp $_{196}$ . However, the Asp $_{194}$  replacement by alanine, promoted an increase in antibody recognition.

### 3.6. In vitro neutralization assay

Western blot analysis showed that Lox-mAb3 recognized a protein with 20 kDa electrophoretic mobility, which corresponds to metalloprotease that possess fibrinolytic and fibronectinolytic activities, as mentioned before [12]. Therefore, metalloprotease activity neutralization was evaluated using fibrinogen as substrate. *L. intermedia* venom (3 µg) was able to degrade alfa-chain of fibrinogen (line 1), however, the prevention of alfa-chain digestion can be observed when venom (3 µg) was pre incubated for 1 h with 25, 50 and 100 µg of mAb (lines 3, 4 and 5). Ten micrograms of mAb was not able to prevent fibrinogenolysis induced by the venom (line 2) (Fig. 8). This result demonstrates the neutralizing potential of Lox-mAb3 on the fibrinolytic activity of the venom metalloprotease.

## 4. Discussion

Accidents involving *Loxosceles* genus spiders is categorized as Loxoscelism. This condition is associated to significant clinical manifestations in human or even fatalities following the envenomation [11,31]. *Loxosceles* spider venom is composed of a heterogeneous mixture of toxins and small peptides responsible for local manifestations, as demonecrotic lesion with gravitation spreading of wound, edema, erythema and hemorrhage. In systemic level, venom toxins can cause symptoms such as fever, malaise, weakness, nausea and, in serious cases,

a

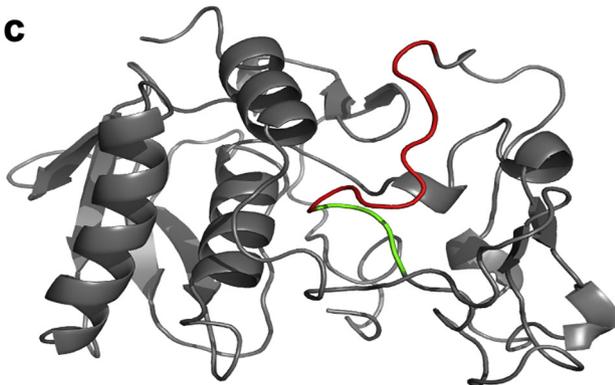
## SPOT Overlapping peptides sequences

1 MIKYIGVFAFLVGGF	22 GEIVYEISPLRQYE	43 QPLSLGRGCTDFGTI	64 IGPFDYDSIMLYGAY
2 YIGVFAFLVGGFCHD	23 VYEISPLRQYEQII	44 SLGRGCTDFGTILHE	65 FDYDSIMLYGAYAFS
3 VFAFLVGGFCHDFET	24 ISPLRQYEQIIREA	45 RGCTDFGTILHELGH	66 DSIMLYGAYAFSKDT
4 FLVGGFCHDFETVIS	25 GLRQYEQIIREAMRT	46 TDFGTILHELGH SVG	67 MLYGAYAFSKDTRKF
5 GGFCHDFETVISNQD	26 QYEQIIREAMRTYED	47 GTILHELGH SVGFDH	68 GAYAFSKDTRKFKTM
6 CHDFETVISNQDPV	27 QIIREAMRTYEDNTC	48 LHELGH SVGFDHEHS	69 AFSKDTRKFKTMEPV
7 FETVISNQDPV DGM	28 REAMRTYEDNTCIKF	49 LGH SVGFDHEHSRAD	70 KDTRKFKTMEPVEPG
8 VISNQDPV DGMRLV	29 MRTYEDNTCIKFRRR	50 SVGFDHEHSRADRDE	71 RKFKTMEPVEPGLPM
9 NQDPV DGMRLVEGD	30 YEDNTCIKFRRRTNE	51 FDHEHSRADRDEFLI	72 KTMEPVEPGLPMKSV
10 PVDGMRLVEGDMLF	31 NTCIKFRRRTNEADY	52 EHSRADRDEFLIIHK	73 EPVEPGLPMKSVIQK
11 DGMRLVEGDMLFDDG	32 IKFRRRTNEADYVNI	53 RADRDEFLIIHKENI	74 EPGLPMKSVIQKGLK
12 RLVEGDMLFDDGPLF	33 RRRRTNEADYVNIHVG	54 RDEFLIIHKENIKNG	75 LPMKSVIQKGLKSY
13 EGDMLFDDGPLF TER	34 TNEADYVNIHVGDR	55 FLIIHKENIKNGSEH	76 KSVIQKGLKSYD
14 MLFDDGPLF TERNAV	35 ADYVNIHVGDR	56 IHKNIKNGSEHNFD	77 IQKGLKSYDVKVN
15 DDGPLF TERNAV KYD	36 VNIHVGDR	57 ENIKNGSEHNFDKLW	78 GKLSYDVKVNKLY
16 PLF TERNAV KYDQQL	37 HVGDR	58 KNGSEHNFDKLWENN	79 SYDVKVNKLYKCP
27 TERNAV KYDQQLWPN	38 DRCYRVGK	59 SEHNFDKLWENNTRT	89 DIVKVNKLYKPPVN
28 NAVKYDQQLWPNGEI	39 YSRVGSFRGGPQPL	60 NFDKLWENNTRTIGP	81 KVNKLYKPPVNPYP
29 KYDQQLWPNGEIYVE	40 VGKSFRRGGPQPLSLG	61 KLWENNTRTIGPFY	82 KLYKPPVNPYPGGI
20 QQLWPNGEIYVEISP	41 SFRGGPQPLSLGRGC	62 ENNTRTIGPFYDSI	83 KCPPVNPYPGGIRPY
21 WPNGEIYVEISPLR	42 GGPQPLSLGRGCTDF	63 TRTIGPFYDSIMLY	84 PVNPYPGGIRPYVNV

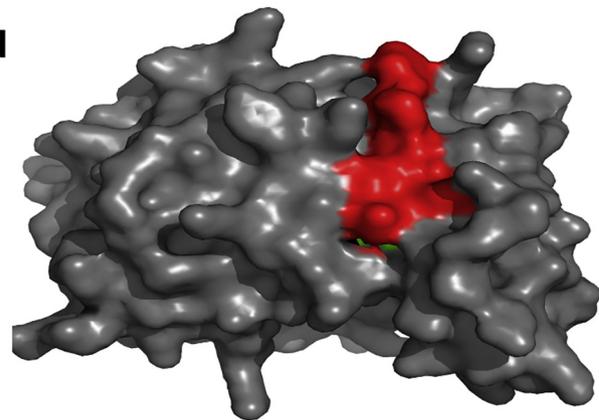
b



c



d



**Fig. 5.** Mapping of epitope recognized by Lox-mAb3 by SPOT. a) Peptides sequences from LALP1 synthesized on a cellulose membrane. Reactive SPOTs are highlighted in gray. b) Membrane containing peptides derived from LALP1 sequence, incubated with 1  $\mu$ g/mL of Lox-mAb3. Dark blue precipitate indicates reactive SPOTs in the membrane. c) 3D structure and d) surface configuration of LALP1 homology model generated by PyMol software, with the protein sequence recognized by the antibody highlighted in red and Met-turn sequence shown in green.

renal failure and hematologic disturbances that may include thrombocytopenia, disseminated intravascular coagulation and hemolytic anemia [1,5,6,8,31]. Various interventions have been used in Loxoscelism treatment, such as antivenom therapy, that has great potential if used in the first hours after the envenomation [14,31]. However, antivenoms are composed by heterologous proteins and can cause anaphylactic reactions since the antibodies are produced in horses. Furthermore, only 30% of antibodies content of antivenoms are directed against venom components and it is estimated that just 5% have neutralizing potential [1,2,32]. Further to the undesirable reactions associated with serotherapy, no much progress in its production has been made over the years. The use of large amounts of venoms for its production (both in immunizations and in preclinical neutralization potency tests) represents a limitation in the production and use of these antibodies for

therapeutic purposes due the difficulty in obtaining large quantities of *Loxosceles* sp. venom. Other issue related to these therapy is the suffering caused in producers animals, since the venoms used as immunogens are highly toxic to animals, which compromises its health [16,17]. In addition, the most toxic proteins in venoms are not always the most immunogenic, which can generate an antivenom with low neutralizing capacity, requiring the administration of higher doses in the patient [33].

In view of the difficulties inferred by the production and antivenoms administration, our reserch group have been employed new strategies in the experimental development of antivenoms: (i) the replacement of venom as immunogen for recombinants proteins in immunization protocols and (ii) the use of hibridomes technique to generate monoclonal antibodies more specific against the relevant

SPECIES	TOXIN	SEQUENCE	
<i>L. intermedia</i>	LALP1	179 FDKLWENNTRTIGPFDYDSIMLYGAYAFSKDTRKFKTMEPVEPGLPMKSVIQKGLSYYD	238
<i>L. intermedia</i>	LALP2	180 YRKTPSYMRTRVIGPFDYDSIMIYGETAGSRDPMHLKSMEANKPGVTLISSRYKDRDLTDLD	239
<i>L. intermedia</i>	LALP3	170 YEKRFENNTRVIGPFDYDSIMIYGETDARKSGS--VTMKVKKPGATLVNASLKHELTALD	227
<i>L. Laeta</i> (Brazil)	LALP4	82 FEKLWENKTRTIGDFDYDSIMLYGLLCLFKGSV-----	114
<i>L. gaucho</i>	LALP5	128 FEKLLESKTRTIGPFDYDSIMLYGSYAFSRDTEAVENHGTRRTRTPYEICHSKRKAELL-	186
<i>L. laeta</i> (Peru)	LALP-LP3	171 FDKLWENNTRTIGNFDYDSIMLY-----	193
<i>L. laeta</i> (Peru)	LALP-LP1	166 FKKKLENETRTIGDFDYDSIMLYG-----	189
<i>L. laeta</i> (Peru)	LALP-LP8	158 FKKKLENETRTIGYFDYDSIMLYGPYAF-----	185
<i>L. laeta</i> (Peru)	LALP-LP7	166 FKKKLENETRTIGDFDYDSIMLYGPYAFSKD-----	196
<i>L. laeta</i> (Peru)	LALP-LP2	161 FKKKLENETRTIGDFDYDSIMLYG-----	184
<i>L. laeta</i> (Peru)	LALP-LP4	160 FKKKLENETRTIGDFDYDSIMLYGPYAFSR-----	189
<i>L. laeta</i> (Peru)	LALP-LP5	160 FKKKLENETRTIGDFDYDSIMLYGPYASSK-----	189
<i>L. laeta</i> (Peru)	LALP-LP6	158 FKKKLENETRTIGDFDYDSIMLYGPYAFSKD-----	188

Fig. 6. Alignment of metalloproteases homologs. Alignment was carried out using the program Clustal Omega. The sequence recognized by Lox-mAb3 in red, and the Met-turn region highlighted in green.

proteins present in *L. intermedia* venom [17,24,32,34–36]. Using these strategies, the maintenance of spiders for venom extraction is no longer necessary, the proteins used as immunogens can be produced in large scale and animal suffering is reduced [17]. With the second approach, in terms of reproducibility and specificity, this technology, unlike polyclonal antibodies, meets the challenge that 100% antivenom IgGs are therapeutic, since that selection is made through its neutralizing capacity [32].

Two neutralizing monoclonal antibodies against sphingomyelinase-D were previously produced by our group. Although these are the most studied proteins and are known to be the main responsible for the envenomation symptoms, it has been suggested that clinical

manifestations observed in loxoscelism are the result of synergistic activity among all components present in venom [31,35,36]. Therefore, it is also necessary to produce neutralizing antibodies against the other venoms components. Thus, in the present work, we used the two approaches mentioned here to produce antibodies able to neutralize other *Loxosceles* venom components that are involved in the loxoscelism manifestation. For this, a multiepitopic chimeric protein, composed by B-cell epitopes derived from the three main toxins families present in *Loxosceles* spider venoms (phospholipase-D, metalloproteases, and hyaluronidases), was used as antigen to produce monoclonal antibodies. This report is the first to describe a mAb that recognizes and neutralizes a fibrinolytic activity of metalloproteases

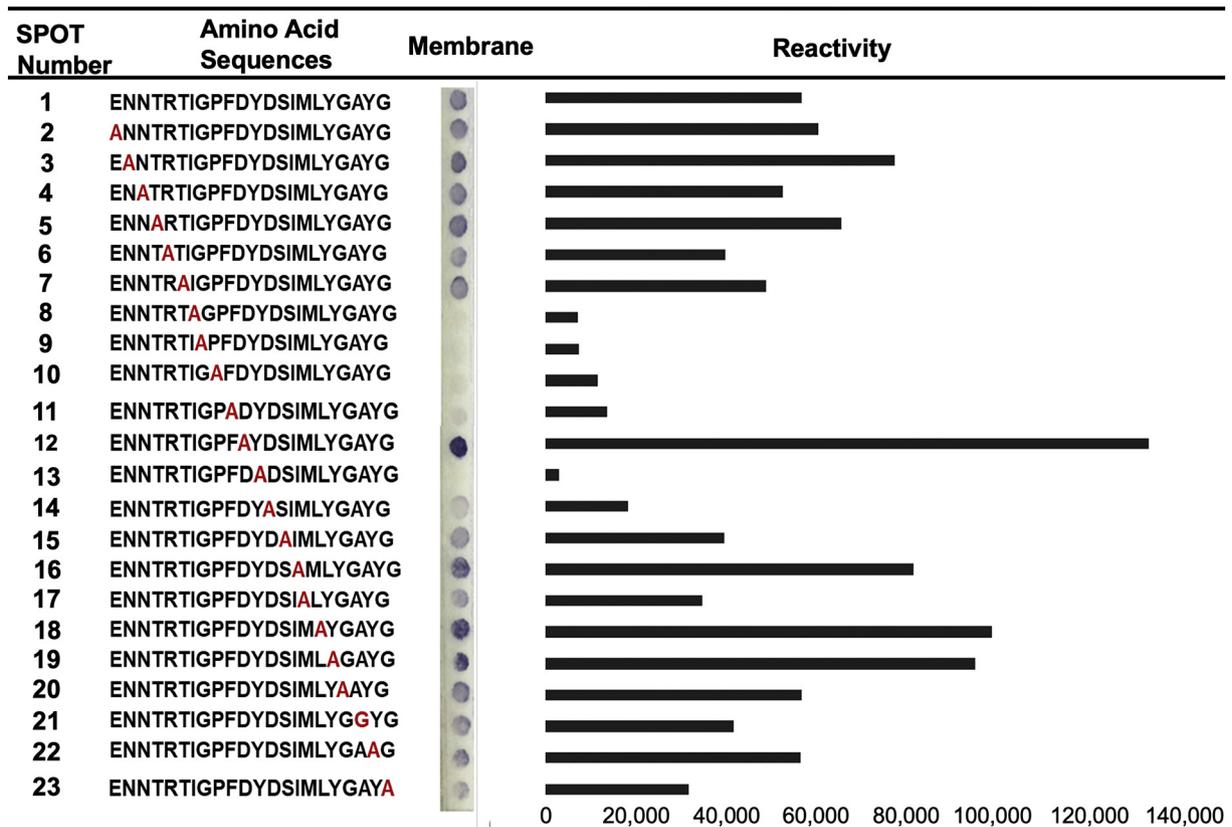
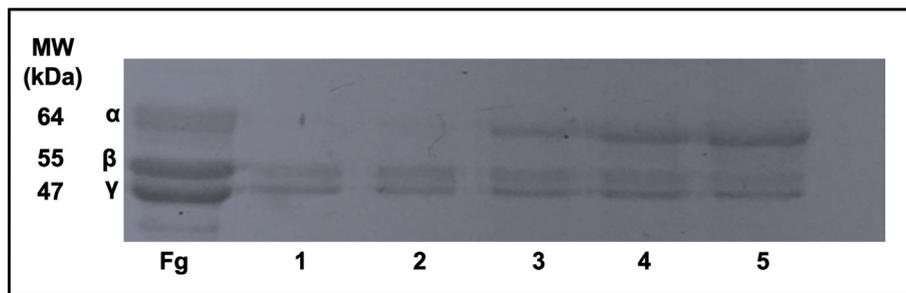


Fig. 7. AlanineScan. Alanine analogues series of the peptide recognized by the monoclonal antibody were prepared by SPOT synthesis and subsequently tested using 1 µg/mL of Lox-mAb3. Dark blue precipitate indicates reactive SPOTs in the membrane. The reference peptide is at position 1 and each additional point corresponds to an alanine analog. Each bar represents the degree of binding of Lox-mAb3 with the reference peptide (first bar) or with an analog peptide in which the indicated residue has been replaced with alanine.



**Fig. 8.** Fibrinogenolytic activity neutralization. SDS-PAGE 10% in reducing conditions was performed. The fibrinogen chains  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$  are indicated on the left. Line (Fg) shows a positive control with untreated fibrinogen while line (1) shows alpha chain degradation when fibrinogen is treated with 3  $\mu$ g of *L. intermedia* venom for 16 h. The venom (3  $\mu$ g) was pre-incubated with different concentrations of Lox-mAb3: 10  $\mu$ g (line 2), 25  $\mu$ g (line 3), 50  $\mu$ g (line 4) and 100  $\mu$ g (line 5).

from *Loxosceles* spider venoms. Previous studies [29–31] have shown the production of neutralizing monoclonal antibodies reactive solely with phospholipase-D.

Twelve anti-rMEPlox monoclonal antibodies were obtained from the second screening, all displaying affinity for rMEPlox, however, only mAbs 4F5B2, 4F5B6 (Lox-mAb3), 4F5D6 and 4F5G4 were able to react with *L. intermedia* venom antigens (Fig. 1c). Therefore, due to its similar reactivity against *L. intermedia* venom when compared to anti-rMEPlox serum (positive control), Lox-mAb3 was chosen to proceed with the characterization steps. Western blot analysis demonstrated that Lox-mAb3 recognizes a 20 kDa protein in *L. intermedia* venom (Fig. 3b). Feitosa et al. [12] described metalloproteases with distinct substrate specificity and different size: (i) metalloproteases that bind and degrade gelatin with 32–35 kDa, (ii) proteases that are specific for gelatin but present fibronectinolytic and fibrinogenolytic activities with 20–28 kDa electrophoretic mobility. This data suggests that mAb recognizes the second type of metalloproteases. ELISA and Western blot assays showed that this monoclonal antibody also recognizes metalloproteases of, Brazilian *L. laeta*, *L. gaucho* and Peruvian *L. laeta* venoms (Fig. 4a and b). The results of polyspecificity of Lox-mAb3 diverge from previous observation that mAbs produced against *Loxosceles* spider venoms are mostly species-specific [30,32]. The observation that this polyvalent monoclonal antibody recognizes a metalloprotease from heterologous species, added to the fact that Lox-mAb3 belongs to IgG1 subclass, suggests its potential for the treatment of accidents caused by *Loxosceles* spp. spider bite, since IgG1 isotype is often preferred from the drug development perspective, due to its high stability and capacity to cause effector function [37].

We further mapped the epitope recognized by Lox-mAb3 throughout its binding to a set of immobilized overlapping peptides covering the whole amino acid sequence of LALP1 from *L. intermedia* venom and the results show that Lox-mAb3 strongly recognizes three SPOTs (62, 63 and 64) that corresponds to the C-terminal sequence of LALP1 ( $_{184}$ ENNTRTIGPFDYDSIMLYGAY $_{205}$ ) (Fig. 5a and b). The multiepitopic protein is composed for eight B-cell linear epitopes and one conformational epitope. The sequence recognized by Lox-mAb3 is a linear epitope chosen due its immunogenicity [24]. All the reactive peptides share a common sequence containing nine amino acid residues  $_{190}$ IGPFDYDSI $_{198}$ . It is relevant to note that these sequence is located close to a important and conserved methionine residue within a Met-turn region (MX $Y$ ), which tyrosine residue might be involved in substrate fixation [38].

The outcomes obtained by alanine scan experiments show that the amino acids residues of the  $_{190}$ IGPFDYDSI $_{197}$  peptide sequence are important to Lox-mAb3 binding. All these amino acids, with Pro $_{192}$  exception, are strictly conserved among the sequences of metalloproteases homologs of *L. intermedia*, *L. gaucho* and *L. laeta* (Brazil and Peru) venoms (Fig. 6), explaining the cross-reactivity of this antibody with several metalloprotease isoforms (Fig. 4a and b). The Pro $_{192}$  residue is conserved in 31% of the analyzed sequences. Based on the 3D model

of LALP1, (UniProtKB - A0FKN6 (VMPA\_LOXIN)) it was demonstrated that the sequence  $_{190}$ IGPFDYDSI $_{197}$  is exposed on the protein surface, showing its availability for Lox-mAb3 binding. The peptide  $_{184}$ ENNTRTIGPFDYDSIMLYGAY $_{205}$  was recognized by Lox-mAb3, however, when the Ile $_{190}$ , Gly $_{191}$ , Pro $_{192}$ , Phe $_{193}$ , Tyr $_{195}$  or Asp $_{196}$  were replaced by Ala, in alanine scan assay, there was a drastic reduction of Lox-mAb3 recognition, demonstrating the importance of these seven amino acids in the metalloprotease recognition by Lox-mAb3. In the other hand, when Asp $_{194}$  was replaced by Ala, there was an increase of the recognition (Fig. 7). This observation could be used to improve rMEPlox structure to raise its immunogenicity.

In the last part of this study, the neutralization of metalloprotease activity under fibrinogen by Lox-mAb3 was evaluated. Fibronectin and fibrinogen cleavage by metalloproteases have an important role in the pathogenesis of loxoscelism, such as hemorrhage at the bite site, difficulty in healing wounds and can also increase tissue structures permeability, facilitating the spread of other harmful toxins throughout the victim body [38–40]. The monoclonal antibody generated in this study was able to neutralize the fibrinogenolytic activity caused by metalloprotease action. The crude venom degraded the  $\alpha$  chain fibrinogen (Fig. 8), however, venom pre-incubation with Lox-mAb3 (25, 50 and 100  $\mu$ g) showed a reduced  $\alpha$  chain degradation, suggesting that the use of the recombinant chimera as immunogen in monoclonal antibody production induced an antibody capable of neutralizing the metalloprotease fibrinogenolytic activity, which may lead to a decrease in hemorrhagic disturbances caused by *Loxosceles* envenomation.

Polyclonal antibodies, previously produced using rMEPlox as immunogen in rabbits, are also able to neutralize the fibrinogenolysis induced by *L. intermedia* venom [24]. However, this neutralization was observed only in high antibody concentration, such as 100  $\mu$ g, when compared to Lox-mAb3 which was able to prevent the fibrinogen degradation in lower concentrations (25  $\mu$ g) (Fig. 8). Furthermore, polyclonal antibodies possess a large number of IgGs that are not directed to venom toxins but to other antigens that the immunized animal came into contact during its life, while monoclonal antibodies present a single isotype, defined specificity and all selected antibodies are therapeutic [32,41]. Therefore, a pool of monoclonal antibodies directed towards clinically important venom toxins may be advantageous for envenomation therapy improvement.

In conclusion, our results show, for the first time, the use of a multiepitopic chimeric non-toxic protein, composed by B-cell epitopes derived from the three main toxins' families present in *Loxosceles* spider venoms for the monoclonal antibody production. The generated mAb recognizes metalloprotease of medically important *Loxosceles* venoms and is also capable of neutralizing its fibrinogenolytic activity. These results open possibilities for the potential utilization of Lox-mAb3, together with mAbs previously produced against sphingomyelinase-D, to improve therapeutic antivenoms against loxoscelism, covering the neutralization of the major proteins responsible for clinical manifestations.

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.176>.

## Author statement

Tamara G. F. Costa first author of the manuscript, designed and performed the experiments and wrote the initial version of the manuscript.

Thamyres C. S. de Assis, Sabrina A. Lima, Christina A. Martins, Alessandra B. Finco, Luís F. M. Figueiredo, João C. Minozzo, Silvio S. Veiga, Vanete T. Soccol and Ricardo A. Machado-de-Ávila performed some of the experiments and data analysis in order to complete the work.

Fernanda Costal-Oliveira, Clara Guerra-Duarte and Evanguedes Kalapothakis read and corrected the manuscript, contributing to English corrections, helped in data categorization and also contributed to the revision of figures and text.

Carlos Chávez-Olortegui corresponding author of the manuscript and Larissa M. Alvarenga financially support the work, supervised the project and also revised the main text of the manuscript.

## Declaration of competing interest

The authors state no conflict of interest.

## Acknowledgements

This research was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil (CNPq) (Process: 406163/2018-9), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brazil - CAPES (Program COFECUB Process: 88881.191812/2018-01) and by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, Brazil (FAPEMIG).

## References

- [1] J.M. Futrell, Loxoscelism, *Am J Med Sci* (1992) 261–267, <https://doi.org/10.1097/00004441-199210000-00008>.
- [2] C.J. Hogan, K.C. Barbaro, K. Winkel, Loxoscelism: old obstacles, new directions, *Ann. Emerg. Med.* 44 (2004) 608–624, <https://doi.org/10.1016/j.annemergmed.2004.08.028>.
- [3] D.L. Swanson, R.S. Vetter, Loxoscelism, *Clin. Dermatol.* 24 (2006) 213–221, <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2005.11.006>.
- [4] G.K. Isbister, H.W. Fan, Spider bite, *Lancet* (2011) 2039–2047, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)62230-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)62230-1).
- [5] M. de F. Fernandes-Pedrosa, I. de L.M. Junqueira-de-Azevedo, R.M. Gonçalves-de-Andrade, L.S. Kobashi, D.D. Almeida, P.L. Ho, D.V. Tambourgi, Transcriptome analysis of *Loxosceles laeta* (Araneae, Sicariidae) spider venomous gland using expressed sequence tags, *BMC Genomics* 9 (2008) 1–12, <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-279>.
- [6] L.H. Gremski, R.B. Da Silveira, O.M. Chaim, C.M.A. Probst, V.P. Ferrer, J. Nowatzki, H.C. Weinschutz, H.M.I. Madeira, W. Gremski, H.B. Nader, A. Senff-Ribeiro, S.S. Veiga, A novel expression profile of the *Loxosceles intermedia* spider venomous gland revealed by transcriptome analysis, *Mol. Biosyst.* 6 (2010) 2403–2416, <https://doi.org/10.1039/c004118a>.
- [7] R.B. Da Silveira, J.F. Dos Santos Filho, O.C. Mangili, S.S. Veiga, W. Gremski, H.B. Nader, C.P. Von Dietrich, Identification of proteases in the extract of venom glands from brown spiders, *Toxicon*. 40 (2002) 815–822, [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(02\)00078-8](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(02)00078-8).
- [8] P.H. Da Silva, R.B. Da Silveira, M. Helena Appel, O.C. Mangili, W. Gremski, S.S. Veiga, Brown spiders and loxoscelism, *Toxicon* 44 (2004) 693–709, <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2004.07.012>.
- [9] P. Ferrer, T.L. De Mari, L.H. Gremski, D.T. Silva, R. Bertoni, W. Gremski, O.M. Chaim, A. Senff-ribeiro, H.B. Nader, S.S. Veiga, A novel hyaluronidase from brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom (Dietrich's Hyaluronidase): from cloning to functional characterization, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7 (2013) <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002206>.
- [10] L.H. Gremski, D. Trevisan-Silva, V.P. Ferrer, F.H. Matsubara, G.O. Meissner, A.C.M. Wille, L. Vuitika, C. Dias-Lopes, A. Ullah, F.R. De Moraes, C. Chávez-Olortegui, K.C. Barbaro, M.T. Murakami, R.K. Arni, A. Senff-Ribeiro, O.M. Chaim, S.S. Veiga, Recent advances in the understanding of brown spider venoms: from the biology of spiders to the molecular mechanisms of toxins, *Toxicon* 83 (2014) 91–120, <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.02.023>.
- [11] D. Chaves-Moreira, A. Senff-Ribeiro, A.C.M. Wille, L.H. Gremski, O.M. Chaim, S.S. Veiga, Highlights in the knowledge of brown spider toxins, *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* 23 (2017) 1–12, <https://doi.org/10.1186/s40409-017-0097-8>.
- [12] L. Feitosa, W. Gremski, S.S. Veiga, M.C.Q.B. Elias, E. Graner, O.C. Mangili, R.R. Brentani, Detection and characterization of metalloproteinases with gelatinolytic, fibronectinolytic and fibrinogenolytic activities in Brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom, *Toxicon* 36 (1998) 1039–1051, [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(97\)00083-4](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(97)00083-4).
- [13] S.S. Veiga, L. Feitosa, V.L.P. dos Santos, G.A. de Souza, A.S. Ribeiro, O.C. Mangili, M.A. Porcionatto, H.B. Nader, C.P. Dietrich, R.R. Brentani, W. Gremski, Effect of brown spider venom on basement membrane structures, *Histochem. J.* 32 (2000) 397–408, <https://doi.org/10.1023/A:1004031019827>.
- [14] I. Pauli, J. Puka, I. Cristina, The efficacy of antivenom in loxoscelism treatment, 48 (2006) 123–137, <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.05.005>.
- [15] I. Pauli, J.C. Minozzo, P. Henrique da Silva, O.M. Chaim, S.S. Veiga, Analysis of therapeutic benefits of antivenin at different time intervals after experimental envenomation in rabbits by venom of the brown spider (*Loxosceles intermedia*), *Toxicon* 53 (2009) 660–671, <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.01.033>.
- [16] P.A.L. Calabria, L.H.A.L. Shimokava-Falcao, M. Colombini, A.M. Moura-da-Silva, K.C. Barbaro, E.L. Faquim-Mauro, G.S. Magalhaes, Design and production of a recombinant hybrid toxin to raise protective antibodies against *Loxosceles* spider venom, *Toxins (Basel)* 11 (2019) 1–21, <https://doi.org/10.3390/toxins11020108>.
- [17] F.M. Figueiredo, C. Dias-lobes, L.M. Alvarenga, J. McCormack, T.M. Mendes, R.A.M.-Ávila, C. Minozzo, E. Kalapothakis, C. Ch. Innovative immunization protocols using chimeric recombinant protein for the production of polyspecific *Loxoscelic* antivenom in horses, *Toxicon* 86 (2014) 59–67, <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.05.007>.
- [18] A. Olvera, B. Ramos-Cerrillo, J. Estévez, H. Clement, A. de Roodt, J. Paniagua-Solís, H. Vázquez, A. Zavaleta, M. Salas Arruz, R.P. Stock, A. Alagón, North and South American *Loxosceles* spiders: development of a polyvalent antivenom with recombinant sphingomyelinases D as antigens, *Toxicon* 48 (2006) 64–74, <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.04.010>.
- [19] A. Catalán, W. Cortes, H. Sagua, J. González, J.E. Araya, Two new phospholipase D isoforms of *Loxosceles laeta*: cloning, heterologous expression, functional characterization, and potential biotechnological application, *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 25 (2011) 393–403, <https://doi.org/10.1002/jbt.20399>.
- [20] C.G. Duarte, C. Bonilla, G. Guimaraes, R.A.M. de Avila, T.M. Mendes, W. Silva, B. Tintaya, A. Yarleque, C. Ch. 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* (2014) 1–4, <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.10.023>.
- [21] L. Felicori, P.B. Fernandes, M.S. Giusta, C.G. Duarte, E. Kalapothakis, C. Nguyen, F. Molina, C. Granier, C. Chávez-olortegui, An in vivo protective response against toxic effects of the dermonecrotic protein from *Loxosceles intermedia* spider venom elicited by synthetic epitopes, *Vaccine* 27 (2009) 4201–4208, <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.04.038>.
- [22] J. De Moura, L. Felicori, V. Moreau, G. Guimarães, C. Dias-lobes, L. Molina, Protection against the toxic effects of *Loxosceles intermedia* spider venom elicited by mimotope peptides, *Vaccine* 29 (2011) 7992–8001, <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.08.065>.
- [23] T.M. Mendes, D. Oliveira, L.F.M. Figueiredo, R.A. Machado-de-Avila, C.G. Duarte, C. Dias-Lopes, G. Guimarães, L. Felicori, J.C. Minozzo, C. Chávez-Olortegui, 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 (2013) 2749–2755, <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.03.048>.
- [24] S. de A. Lima, C. Guerra-Duarte, F. Costal-Oliveira, T.M. Mendes, L.F. Luís, D. Oliveira, R.A.M. de Avila, V.P. Ferrer, D. Trevisan-Silva, S.S. Veiga, J.C. Minozzo, E. Kalapothakis, C. Chávez-Olortegui, Recombinant protein containing B-cell epitopes of different *Loxosceles* spider toxins generates neutralizing antibodies in immunized rabbits, *Front. Immunol.* 9 (2018) <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00653>.
- [25] Oliver H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265–275.
- [26] C. Chavez-Olortegui, D.A. Amara, H. Roachat, C. Diniz, C. Granier, In vivo protection against scorpion toxins by liposomal immunization, *Vaccine* 9 (1991) 907–910, [https://doi.org/10.1016/0264-410X\(91\)90012-U](https://doi.org/10.1016/0264-410X(91)90012-U).
- [27] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 (1970) 680–685, <https://doi.org/10.1038/227680a0>.
- [28] D. Laune, F. Molina, G. Ferrières, S. Villard, C. Bès, F. Rieunier, T. Chardès, C. Granier, Application of the Spot method to the identification of peptides and amino acids from the antibody paratope that contribute to antigen binding, *J. Immunol. Methods* 267 (2002) 53–70, [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(02\)00140-0](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(02)00140-0).
- [29] C.A. Bello, A.L.N. Hermogenes, A. Magalhaes, S.S. Veiga, L.H. Gremski, Isolation and biochemical characterization of a fibrinolytic proteinase from *Bothrops leucurus* (white-tailed jararaca) snake venom, 88 (2006) 189–200, <https://doi.org/10.1016/j.jbiochi.2005.07.008>.
- [30] O.M. Chaim, D. Trevisan-Silva, D. Chaves-Moreira, A.C.M. Wille, V.P. Ferrer, F.H. Matsubara, O.C. Mangili, R.B. da Silveira, L.H. Gremski, W. Gremski, A. Senff-Ribeiro, S.S. Veiga, Brown spider (*Loxosceles* genus) venom toxins: tools for biological purposes, *Toxins (Basel)* 3 (2011) 309–344, <https://doi.org/10.3390/toxins3030309>.
- [31] C.M.S. Malaque, O.M. Chaim, M. Entres, K.C. Barbaro, *Loxosceles* and Loxoscelism: Biology, Venom, Envenomation, and Treatment, 20, 2016 <https://doi.org/10.1007/978-94-007-6389-0>.
- [32] A.H. Laustsen, J. María Gutiérrez, C. Knudsen, K.H. Johansen, E. Bermúdez-Méndez, F.A. Cerni, J.A. Jürgensen, L. Ledsgaard, A. Martos-Esteban, M. Øhlenschläger, U. Pus, M.R. Anderson, B. Lomonte, M. Engmark, M.B. Pucca, Pros and cons of different

- therapeutic antibody formats for recombinant antivenom development, *Toxicon* 146 (2018) 151–175, <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.03.004>.
- [33] W.S. Maria, D.T. Velarde, L.M. Alvarenga, C. Nguyen, S. Villard, Localization of epitopes in the toxins of *Tityus serrulatus* scorpions and neutralizing potential of therapeutic antivenoms, *Toxicon* 46 (2005) 210–217, <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.03.024>.
- [34] A.H. Laustsen, M. Solà, E.C. Jappe, S. Oscoz, L.P. Lauridsen, M. Engmark, Biotechnological Trends in Spider and Scorpion Antivenom Development, 2016 <https://doi.org/10.3390/toxins8080226>.
- [35] L.M. Alvarenga, M.S. Martins, J.F. Moura, E. Kalapothakis, J.C. Oliveira, O.C. Mangili, C. Granier, C. Chávez-Olórtegui, Production of monoclonal antibodies capable of neutralizing dermonecrotic activity of *Loxosceles intermedia* spider venom and their use in a specific immunometric assay, *Toxicon* 42 (2003) 725–731, <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2003.09.006>.
- [36] C. Dias-lobes, L. Felicori, L. Rubrecht, S. Cobo, L. Molina, C. Nguyen, P. Galéa, Generation and molecular characterization of a monoclonal antibody reactive with conserved epitope in sphingomyelinases D from *Loxosceles* spider venoms, *Vaccine* 32 (2014) 2086–2092, <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.02.012>.
- [37] N.A.P.S. Buss, S.J. Henderson, M. McFarlane, J.M. Shenton, L. De Haan, Monoclonal antibody therapeutics: history and future, *Curr. Opin. Pharmacol.* 12 (2012) 615–622, <https://doi.org/10.1016/j.coph.2012.08.001>.
- [38] F.X. Gomis-Rüth, S. Trillo-Muyo, W. Stöcker, Functional and structural insights into astacin metalloproteinases, *Biol. Chem.* 393 (2012) 1027–1041, <https://doi.org/10.1515/hsz-2012-0149>.
- [39] V.C. Zanetti, R.B. Silveira, J.L. Dreyfuss, J. Haoach, O.C. Mangili, S.S. Veiga, W. Gremski, Morphological and biochemical evidence of blood vessel damage and fibrinogenolysis triggered by brown spider venom, *Toxicon* 13 (2002) 135–148.
- [40] R.B. Da Silveira, A.C.M. Wille, O.M. Chaim, M.H. Appel, D.T. Silva, C.R.C. Franco, L. Toma, O.C. Mangili, W. Gremski, C.P. Dietrich, H.B. Nader, S.S. Veiga, Identification, cloning, expression and functional characterization of an astacin-like metalloprotease toxin from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom, *Biochem. J.* 406 (2007) 355–363, <https://doi.org/10.1042/BJ20070363>.
- [41] L.M. Alvarenga, M. Zahid, A. di Tommaso, M.O. Juste, N. Aubrey, P. Billiald, J. Muzard, Engineering Venom's toxin-neutralizing antibody fragments and its therapeutic potential, *Toxins (Basel)* 6 (2014) 2541–2567, <https://doi.org/10.3390/toxins6082541>.

### Anexo 3:

International Journal of Biological Macromolecules 187 (2021) 66–75



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Biological Macromolecules

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ijbiomac](http://www.elsevier.com/locate/ijbiomac)



## A prokaryote system optimization for rMEPLox expression: A promising non-toxic antigen for *Loxosceles* antivenom production

Rafael Saavedra-Langer<sup>a</sup>, **Tamara G.F. Costa<sup>a</sup>**, Sabrina A. Lima<sup>a</sup>, Fernanda Costal-Oliveira<sup>a</sup>, Christina A. Martins<sup>a</sup>, Ricardo A. Machado-de-Ávila<sup>b</sup>, João C. Minozzo<sup>c</sup>, Vanete T. Soccol<sup>d</sup>, Clara Guerra-Duarte<sup>e</sup>, Evanguedes Kalapothakis<sup>f</sup>, Carlos Chávez-Olórtegui<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamentos de Bioquímica e Imunologia, Instituto Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

<sup>b</sup> Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC), Criciúma, SC, Brazil

<sup>c</sup> Centro de Pesquisa e Produção de Imunobiológicos of Paraná State (CPPPI), Brazil

<sup>d</sup> Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, PR, Brazil

<sup>e</sup> Diretoria de Pesquisa e Desenvolvimento, Fundação Ezequiel Dias, 30510-010 Belo Horizonte, MG, Brazil

<sup>f</sup> Genética, Ecologia e Evolução, Instituto Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

### Anexo 4:

	22/12/2021 870210119362 09:38  29409161940741725
<b>Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT</b>	
Número do Processo: BR 10 2021 026051 3	
<b>Dados do Depositante (71)</b>	
<b>Dados do Pedido</b>	
<b>Natureza Patente:</b>	10 - Patente de Invenção (PI)
<b>Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54):</b>	COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA CONTRA A ATIVIDADE NECRÓTICA LOCAL DE VENENOS OFÍDICOS E USOS
<b>Resumo:</b>	A presente tecnologia trata de uma composição imunogênica contendo um peptídeo sintético, definido pela SEQ ID No1, e seu uso para preparar soro ou uma vacina para prevenção da atividade necrótica do veneno de serpentes da subfamília Crotalinae através da produção de anticorpos neutralizantes.
<b>Figura a publicar:</b>	1

Anexo 5:

 <b>INPI</b> INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL	11/02/2022 870220012528 17-18  29409161940743310
<b>Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT</b>	
<b>Número do Processo:</b> BR 10 2022 002686 6	
<b>Dados do Depositante (71)</b>	
<b>Dados do Pedido</b>	
<b>Natureza Patente:</b>	10 - Patente de Invenção (PI)
<b>Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54):</b>	PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE PROTEÍNA RECOMBINANTE MULTIEPÍTOPO DE LOXOSCELES E USO
<b>Resumo:</b>	A presente tecnologia trata de um processo otimizado para produção da proteína recombinante multiepítipo de Loxosceles (rMPELox), definida pela SEQ ID No1, em sistema heterólogo procaríoto. A proteína pode ser utilizada como antígeno para produção de soros contra acidentes de aranhas do gênero Loxosceles.
<b>Figura a publicar:</b>	2