

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento De Bioquímica E Imunologia

María José González Armijos

**Produção e Caracterização de uma Proteína Recombinante
Multiepitopica Loxoscelica (rMEPLox) expressa em plantas (*Arabidopsis
thaliana*)**

Belo Horizonte

2021

María José González Armijos

**Produção e Caracterização de uma Proteína Recombinante
Multiepitopica Loxoscelica (rMEPLox) expressa em plantas (*Arabidopsis
thaliana*)**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte das exigências para a obtenção do título de mestre.

Orientador: Dr. Carlos Chávez Olórtgui

Coorientador: Dr. Joni Esrom Lima

Belo Horizonte

2021

043 Armijos, María José González.
Produção e caracterização de uma proteína recombinante
multiepitópica loxoscélica (rMEPLox) expressa em plantas (*arabidopsis thaliana*)
[manuscrito] / María José González Armijos. - 2021.
74 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Dr. Carlos Delfin Chavez Olortegui.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia.

1. Bioquímica e imunologia. 2. Agrobacterium. 3. Aranha Marrom Reclusa.
Plantas Geneticamente Modificadas. 4. Proteínas Recombinantes de Fusão I.
Olortegui, Carlos Delfin Chavez. 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

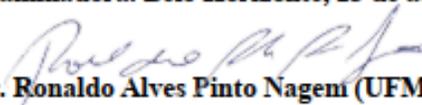


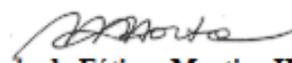
ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE Mestrado DE MARÍA JOSÉ GONZÁLEZ ARMIJOS. Aos vinte e três dias do mês de abril de 2021 às 14:00 horas, reuniu-se de forma “on line” pela plataforma “meet.google.com” no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da dissertação de Mestrado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado “Produção e Caracterização de uma Proteína Recombinante Multiepitópica Loxoscélica (rMEPLox) expressa em plantas (*Arabidopsis thaliana*)”, requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia, área de concentração: Bioquímica. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Carlos Delfin Chavez Olortegui, 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: Dr. Ronaldo Alves Pinto Nagem (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dra. Maria de Fátima Martins Horta (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Carlos Delfin Chávez Olórtégui - Orientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada:

APROVADA

REPROVADA

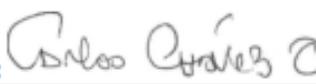
O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 23 de abril de 2021.


 Dr. Ronaldo Alves Pinto Nagem (UFMG)


 Dra. Maria de Fátima Martins Horta (UFMG)

Dr. Carlos Delfin Chavez Olortegui - Orientador (UFMG):


 Prof. Leda Quercia Vieira
 Coordenadora do Programa de Pós-Graduação
 em Bioquímica e Imunologia



Este trabalho foi desenvolvido no laboratório de Imunoquímica de Proteínas e no Laboratório de Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal do Instituto de Ciências Biológicas na Universidade Federal de Minas Gerais.

“A vida é uma espécie de bicicleta. Se quiser manter o equilíbrio, pedale para a frente”

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Carlos Delfín Chávez Olórtegui por me abrir as portas do seu laboratório, acreditar em mim e me orientar durante todo o mestrado.

Ao professor Dr. Joni Esrom Lima por me acolhe na sua equipe de trabalho, me co-orientar e sempre estar em cada momento para me ajudar.

À professora Leda Viera por me abrir as portas do programa e me ajudar para conseguir vir e fazer a iniciação científica e após o mestrado.

À Mg. Sc. Sabrina de Almeida Lima, pela amizade, confiança, por sempre estar disposta a me ajudar a crescer cientificamente e despejar todas minhas dúvidas.

Ao Dr. Denis Molina por me dar a força e ajuda que precisei durante o desenvolvimento de meus experimentos.

A meus amigos do Labimq, Leticia, Priscila, Raissa, Carolina, Tamara, Tamyris, Giovana, Manuela, Marina e Rafael, por ser minha família aqui no Brasil.

Ao Jamil por me prestar materiais e equipamento desinteressadamente e com aquele bom humor que lhe caracteriza.

A minha mãe pelo amor, compreensão e por sempre estar ali e me dar seus conselhos quando precisei nos momentos mais difíceis e por seu carinho infinito que tem para mim.

A Luis Viteri meu amor incondicional, por acreditar em mim, por suas palavras de alento para crescer científica e pessoalmente muito obrigada.

A minhas irmãs Marisol e Yajaira, pelo amor e por sempre me falar “você pode, se não dá certo intenta novamente que na outra vai dar”, a Camilo meu sobrinho fofinho, por tudo o amor que me dá e me eleva a seguir para frente.

Às agencias financiadoras especialmente á CAPES pela bolsa outorgada durante todo meu trabalho de mestrado.

RESUMO

O veneno das aranhas do gênero *Loxosceles* está composta, principalmente por uma mistura rica de metaloproteinases, fosfolipases e esfingomielinases. Atualmente existem diversos estudos para a produção de anti-venenos, mediante o uso de proteínas recombinantes, com a finalidade de perseverar a vida dos animais que produzem o veneno (aranhas) bem como dos animais produtores do soro, já que este veneno é muito tóxico. Por este motivo neste trabalho objetivou-se expressar e caracterizar a rMEPLox, uma proteína recombinante quimérica composta de epitopos das três principais toxinas dos venenos de aranhas do gênero *Loxosceles spp.*, em plantas como um novo sistema de expressão heteróloga. Inicialmente transferiu-se o gene de rMEPLox dos vetores de expressão para *E. coli* para um vetor plasmidial próprio de plantas (pMDC32). Seguidamente transformou-se *Agrobacterium tumefaciens* com estes vetores e estas bactérias específicas de plantas foram capazes de infectar a *Arabidopsis thaliana* mediante imersão floral. As plantas foram cultivadas e reproduzidas até obter a terceira geração (T3), para obter populações totalmente homocigotas. As proteínas totais foram extraídas de *A. thaliana* e o conteúdo proteico foi analisado por SDS-PAGE, ELISA e Western Blotting. Nos imunoenaios, sugerem que os extratos proteicos foram reconhecidos pelo soro anti-rMEPLox, previamente produzidos em *E. coli*. Por Western blotting foi possível observar a presença de bandas proteicas de aproximadamente 19 kDa, mesma massa molecular da rMEPLox. Estes resultados nos levam a confirmar o sucesso das transformações para *A. thaliana*; e que as plantas estão expressando a proteína rMEPLox.

Palavras chave: rMEPLox, pCR8, pMDC32, *Agrobacterium*, *Loxosceles*, expressão em *Arabidopsis*, plantas transgênicas.

ABSTRACT

The venom of spiders of the genus *Loxosceles* is mainly composed of a rich mixture of metalloproteinases, phospholipases and sphingomyelinases. Currently, there are several studies for the production of anti-poisons, using recombinant proteins, in order to persevere the life of animals that produce the poison (spiders) and also animals that produce serum, since this poison is very toxic. For this reason, this work aimed to express and characterize rMEPLox, a recombinant protein composed of epitopes of the three main toxins from spider's venoms of the genus *Loxosceles* spp., in plants as a new heterologous expression system. Initially, the rMEPLox gene was transferred from the expression vectors to *E. coli* in a plant-specific plasmid vector (pMDC32). Then, *Agrobacterium tumefaciens* was transformed with these vectors and these plant-specific bacteria were able to infect *Arabidopsis thaliana* through floral immersion. The plants were cultivated and reproduced until the third generation (T3) was obtained, to obtain totally homozygous populations. The total proteins were extracted from *A. thaliana* and the protein content was analyzed by SDS-PAGE, ELISA and Western Blotting. In immunoassays, they suggest that the protein extracts were recognized by the anti-rMEPLox serum, previously produced in *E. coli*. Through *Western blotting* it was possible to observe the presence of protein bands of approximately 19 kDa, the same molecular mass as rMEPLox. These results lead us to confirm the success of the transformations for *A. thaliana*; and that plants express the rMEPLox protein.

Keywords: rMEPLox, pCR8, pMDC32, *Agrobacterium*, *Loxosceles*, expression in *Arabidopsis*, transgenic plants.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Apresenta os principais acidentes produzidos por animais peçonhentos no Brasil (SINAN, 2019).	23
Figura 2. Faz referência aos acidentes produzidos pelas aranhas medicamente mas importantes no Brasil (SINAN, 2019).	24
Figura 3. <i>Loxosceles</i> adultos.	25
Figura 4. Observase a distribuição geografica dos acidentes do loxocelismo, notificados pela (SINAN, 2017).	26
Figura 5. Evolução do paciente com loxoscelismo cutaneo.	29
Figura 6. Apresenta a gravidade dos acidentes produzidos pelas aranhas medicamente importantes no Brazil (SINAN, 2019).	30
Figura 7. Mostra a composição do veneno das <i>Loxosceles</i>	30
Figura 8. Planta de <i>Arabidopsis thaliana</i> após de seis semanas de idade.	38
Figura 9. Vetor de recombinação pCR8.	53
Figura 10. PCR das bacterias transformadas.	54
Figura 11. PCR das colonias positivas (contem o gene de interesse).	55
Figura 12. Alinhamento do gene rMEPLox extraído da colônia 4.	56
Figura 13. Revelacao da PCR do vetor da planta com o gene de interesse.	57
Figura 14. Revelacao da PCR das colonias positivas digeridas.	58
Figura 15. Revelacao da PCR da <i>Agrobacterium</i>	59
Figura 16. Transformação em <i>Arabidopsis thaliana</i>	60

Figura 17. <i>Arabidopsis thaliana</i>	61
Figura 18. SDS-PAGE dos extratos proteicos das plantas transgênicas.....	62
Figura 19. ELISA dos extratos proteicos das plantas transgênicas frente a soro anti-rMEPLox.	63
Figura 20. Western blotting dos extratos das plantas.....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Meio Luria Bertani (LB) líquido	88
Tabela 2. Meio Caldo Super Optimal (SOC).....	88
Tabela 3. Meio Extrato de fermento de carne (YEB)	88
Tabela 4. Meio MGRL modificado.....	89
Tabela 5. Solução A.....	89
Tabela 6. Solução B – Tris HCl pH 8.8	89
Tabela 7. Solução C – Tris HCl pH 6.8.....	90
Tabela 8. Solução SDS 10%.....	90
Tabela 9. Tampão de Corrida 5x – pH 8.3.....	90
Tabela 10. Comassie Blue	90
Tabela 11. Tampão de amostra com redução 2x	90
Tabela 12. Solução descorante	91
Tabela 13. Tampão de transferência	91
Tabela 14. Solução de revelação.....	91
Tabela 15. PBS 10x	91
Tabela 16. PBS 10x	92
Tabela 17. Tampão de bloqueio	92
Tabela 18. Tampão de incubação.....	92

LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS

%	Porcentagem
±	Mais ou menos
°C	Grau Celsius
DAB	3,3'-diaminobenzidina
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
LiD1	Proteína dermonecrótica 1 de <i>Loxosceles intermedia</i>
M	Mol
mg	Miligrama
Mg+2	Íon magnésio
mL	Mililitro
MM	Massa molecular
mM	Milimolar
nm	Nanômetros
OPD	Ortofenilenodiamina
PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida
PBS	Tampão fosfato salino
PBS-T	Tampão fosfato salino com detergente Tween 20
PI	Pré-imune
pI	Ponto isoelétrico
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SINAN	Sistema nacional de notificações de agravos
Smase	Esfingomielinase
SMase I	Esfingomielinase-D de <i>L. laeta</i>
SMases-D	Esfingomielinase-D
TBS	Tampão Tris, KCl, NaCl
TBS-T	Tris Buffered Saline com detergente Tween 20
TEMED	Tetrametiletlenodiamino
µg	Microgramas
µL	Microlitros

pb	Pares de bases
kDa	Quilo Dalton
BSA	Albumina bovina
rMEPLox	Proteína multiepitopica recombinante loxoscelica
CPPI	Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos
LB	Meio Luria-Bertani
SOC	Super optimal broth ou caldo super ótimo
v/v	VolumeVolume/volumeVolume
EtOH	Etanol
Na ₂ HPO ₄	Fosfato de Sódio Bi-básico anidro
CaCl ₂ . 2H ₂ O	Cloreto de cálcio di-hidratado
MgSO ₄ .7H ₂ O	Sulfeto de magnésio hepta-hidratado
KCl	Cloreto de potássio
CuCl ₂	Cloreto de cobre
ZnCl ₂	Cloreto de zinco
MnCl ₂	Cloreto de manganésio
Na ₂ MoO ₄	Molibdato de sódio
CoCl ₂	Cloreto de cobalto
EDTA	Etilenodiaminotetracetato
Na ₂ EDTA	Etilenodiaminotetracetato dissódico di-hidratado
NaFe EDTA	Hidrato de Etilenodiaminotetracetato de sódio de ferro
H ₃ BO ₃	Ácido bórico
NH ₄ NO ₃	Nitrato de amônio
MES	Ácido 2- (N-morfolino) etanossulfônico
YEB	Extrato de fermento de carne
HindIII	(microrganismo) <i>Haemophilus aegyptius</i>
Bal	(microrganismo) <i>Brevibacterium albidium</i>
U	unidade
q.s.p	Quantidade suficiente para

SUMARIO

1. INTRODUÇÃO	20
1.1. Animais peçonhentos.....	21
1.2. <i>Loxosceles</i> e o loxoscelismo	23
1.3. Ontogenia das aranhas <i>Loxosceles</i> spp.....	27
1.4. Aspectos Clínicos do envenenamento de <i>Loxosceles</i>	27
1.5. Composição do veneno	30
1.6. Tratamentos e antivenenos	32
1.7. Proteínas recombinantes como antígenos alternativos.	33
1.8. Produção de proteínas recombinantes em plantas.....	35
1.9. Transformação genética em plantas mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	36
1.10. <i>Arabidopsis thaliana</i>	38
2. OBJETIVOS	41
2.1. Objetivo geral.....	41
2.2. Objetivos específicos	41
3. MATERIAL E MÉTODOS	42
3.1. Proteína rMEPLox produzida em <i>E. coli</i> e soro anti-rMEPLox.....	42
3.2. Criação das plantas	42
3.3. Amplificação do DNA por PCR e purificação do gene rMEPLox.	42

3.4. Adenilação e Ligação do gene rMEPLox ao vetor PCR8.....	43
3.5. Transformação e clonagem das bactérias XL1 Blue com o vetor PCR8+gene.....	44
3.6. Miniprep plasmidal Promega	44
3.7. Digestão das colônias pMDC32 + gene com as enzimas HINDIII e XBAL.	45
3.8. Obtenção de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> competentes.	46
3.9. Transformação em <i>Arabidopsis thaliana</i>	47
3.10. Extração das proteínas das plantas.	48
3.11. Quantificação	49
3.12. SDS-PAGE.....	49
3.13. Identificação da rMEPLox por Elisa.....	49
3.14. Análises por Western-Blot.	50
4. RESULTADOS	52
4.1. Identificação das bactérias positivas.	52
4.2. Expressão do gene rMEPLox em <i>Arabidopsis thaliana</i> Col-0.....	60
4.3. Extração das proteínas	61
4.4. SDS-PAGE dos extratos de plantas transgênicas	62
4.5. ELISA	63
4.6. Análises da antigenicidade dos extratos de plantas transgênicas por Western-Blotting.....	65

5. DISCUSSÃO	66
6. CONCLUSÕES	70
7. PERSPECTIVAS	71
REFERÊNCIAS	72
ANEXOS	88
9.1. Meios de cultura.....	88
9.2. Soluções para SDS-page e Western blotting	89
9.3. Soluções para ELISA	91

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, os acidentes com animais peçonhentos são causados por serpentes dos gêneros *Bothrops*, *Lachesis*, *Crotalus* e *Micrurus*, escorpiões do gênero *Tityus*, aranhas dos gêneros *Latrodectus*, *Phoneutria* e *Loxosceles*, e por insetos dos gêneros *Apis* e *Lonomia*. Seus venenos consistem de uma mistura de componentes com variados efeitos tóxicos que quando injetados em humanos (ou outros animais) produzem sintomas clínicos únicos. Entre as toxinas mais importantes estão as neurotoxinas, hemorraginas, toxinas coagulantes, miotoxinas e necrotoxinas (Vetter and Isbister, 2008). O tratamento dos acidentes consiste no uso de antivenenos que são efetivos contra os animais peçonhentos cujo veneno participou como antígeno na imunização dos animais produtores; entretanto, mesmo que os antivenenos atuais sejam considerados eficientes, praticamente nenhuma melhoria biotecnológica tem sido feita desde sua produção inicial.

Os antivenenos anti-peçonhas podem ser específicos e poliespecíficos (Theakston et al., 2003). Estes são fabricados em 21 países e principalmente produzidos em cavalos, no entanto a obtenção de estes soros causam sofrimentos nos animais e reduzem sua vida. O Instituto Butantan e o Centro de produção e Pesquisa de imunobiológicos (CPPI) são os principais produtores de soro contra os venenos das aranhas do gênero *Loxosceles* no Brasil. Não obstante a produção destas imunoterápicos é um problema pelo grande número de animais, por tanto quantidade de venenos, que se têm que usar durante o processo de produção (imunização e controle pre-clínico de qualidade) (Futrell, 1992; Theakston et al., 2003). No momento têm sido propostas outras alternativas para a

produção de novos imunógenos não tóxicos, com o propósito de produzir soro e evitar sofrimentos dos animais produtores.

1.1. Animais peçonhentos

Estima-se cerca de 200.000 espécies de animais venenosos (peçonhentos), sendo a maioria vertebrados, principalmente serpentes ou artrópodes dos quais destacam as aranhas, escorpiões, formigas etc. (Jenner and Undheim, 2017; Reynaud et al., 2020). Estes animais peçonhentos produzem uma substância tóxica (peçonha) que é utilizada para caça ou defesa e injetada no organismo alvo diante aparelhos especializados. Esta substancia contém uma mescla de toxinas a base de proteínas que pode conduzir a vários efeitos potencialmente mortais, incluindo cardiotoxicidade, neurotoxicidade, coagulação (Isoardi and Isbister, 2020; Laustsen et al., 2020). Devido à gravidade, morbidade e mortalidade causada por esta toxina, estes acidentes podem ser catalogados como emergências médicas complexas (Grashof et al., 2020; Oliveira et al., 2015).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2009), os envenenamentos fazem parte das enfermidades negligenciadas e constituem um problema mundial de saúde, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais. Atualmente no Brasil os acidentes causados pelos animais peçonhentos têm que ser notificados obrigatoriamente. O Ministério da Saúde implementou um Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) e em 1995 filiou-se com a Coordenação de Zoonoses e Animais Peçonhentos (CNCZAP) para a notificação de acidentes com estes organismos (Lemos et al., 2009; Martins et al., 2012).

Dados coletados pelo SINAN no Brasil (**figura 1**) mostram os acidentes ocasionados por estes animais nos últimos anos, onde se destacam os escorpiões e aranhas (Pucca et al., 2019). Apesar de o número de acidentes com escorpiões superarem os de aranhas, estes envenenamentos são considerados medicamente mais importantes devido à severidade e morbidade que apresentam.

O termo loxoscelismo faz referência ao acidente causado pelas aranhas *Loxosceles* spp., pode chegar a gerar necroses na forma cutânea e insuficiência renal na forma sistêmica, (Isbister and Fan, 2011). A terapia usada para estes envenenamentos é o uso do antiveneno, que consiste de anticorpos isolados do soro ou plasma de animais hiper-imunizados (Costa et al., 2020; Laustsen et al., 2020).

A pesar de sua efetividade em neutralizar os efeitos tóxicos do envenenamento, estes antivenenos possuem algumas desvantagens pois podem causar reações adversas no paciente, além do elevado custo da fabricação. Por outro lado, durante o processo de produção dos antivenenos, os venenos usados são extremamente tóxicos para os animais soro produtores (Figueiredo et al., 2014). Frente a esta situação, o uso de proteínas recombinantes e não tóxicos podem ser alternativas prometedoras na procura de novos antídotos, visando obter uma maior produção, eficácia e segurança destes. (Laustsen et al., 2020).

Acidentes com animais peçonhentos

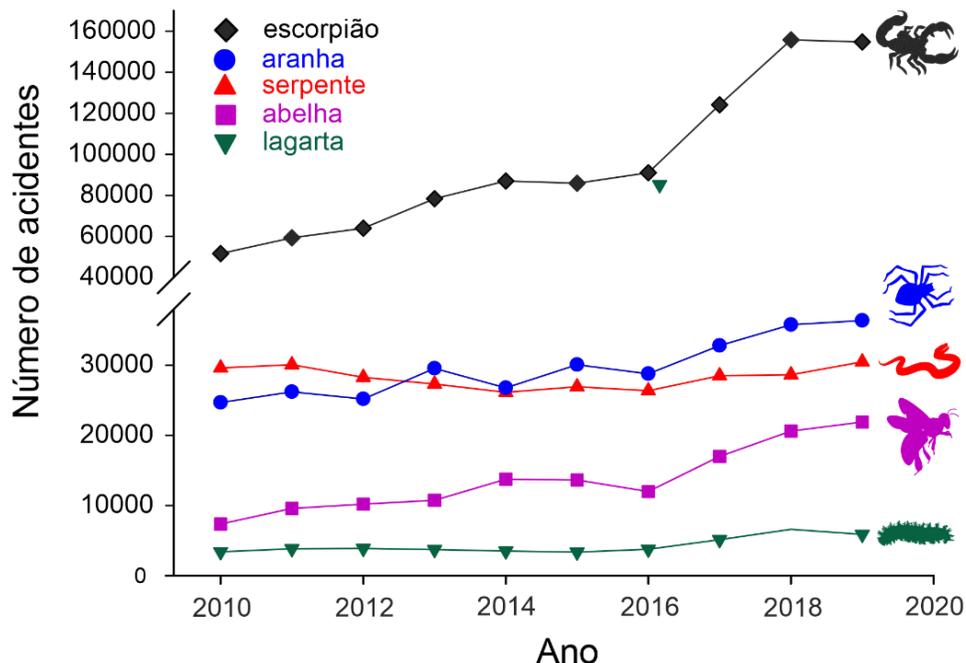


Figura 1. Apresenta os principais acidentes produzidos por animais peçonhentos no Brasil (SINAN, 2019).

1.2. *Loxosceles* e o loxoscelismo

No Brasil as aranhas encontram-se ocupando o segundo lugar nos envenenamentos causados por aracnídeos peçonhentos (**Figura 1**). Estas possuem um aparelho especializado e associado a glândulas venenosas, que produzem uma mescla de compostos tóxicos e não tóxicos (Marcussi et al., 2011). Quatro gêneros de aranhas são capazes de causar acidentes medicamente importante em humanos; sendo estes *Loxosceles* spp, *Phoneutra* spp, *Latrodectus* spp e *Atrax* spp. (Brazil et al., 2009).

Onde as aranhas do gênero *Loxosceles* encontram-se ocupando o primeiro lugar nestes envenenamentos (SINAN, 2019) (**Figura 2**). As aranhas *Loxosceles* spp. (Aracnidae: Sytodidae: Loxoscelinae), o também conhecida como “aranha marrom ou violino” abrangem 141 espécies, distribuídas em todos os continentes (Swanson and Vetter, 2006; White et al., 2017). Segundo Sezerino et al. (1998), a maioria destas espécies encontra-se na América do Sul, o que constitui nesta região um risco importante na saúde.

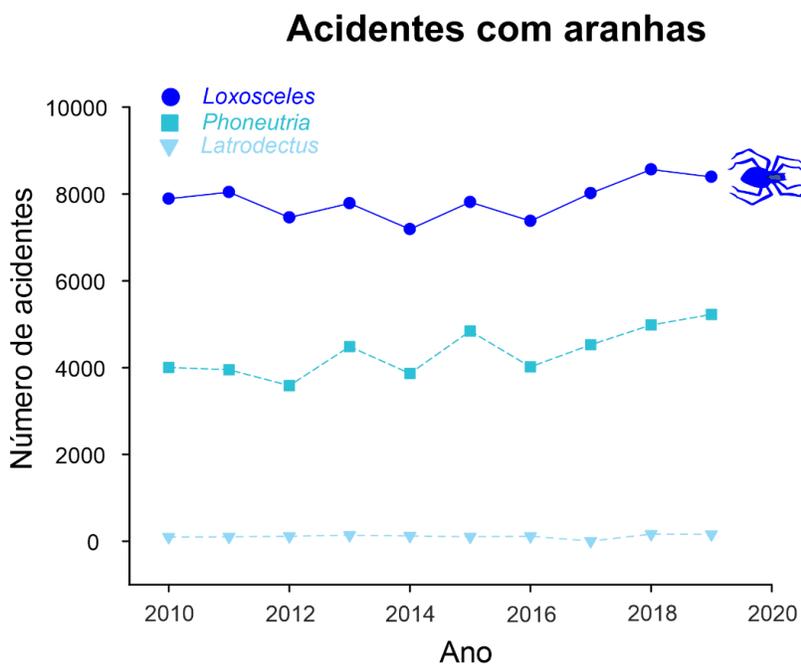


Figura 2. Faz referência aos acidentes produzidos pelas aranhas medicamente mas importantes no Brasil (SINAN, 2019).

O termo *Loxosceles* vem do grego *loxos*: curvas e *kelos*: patas de aspetos circular ou curvas; são aranhas noturnas, não agressivas e alimentam-se de animais pequenos (de Roodt et al., 2002) (**Figura 3**). Preferem os lugares secos, obscuros e tranquilos, vivem nos bosques, embaixo da casca dos arvores e

pedras; nas casas, podem se encontrar atrás de quadros, móveis, roupas e sapatos, sempre fora da incidência da luz direta.

Estas aranhas possuem um exoesqueleto composto por quitina, e seu veneno possui uma mescla composta principalmente por metaloproteínas, esfingomielinases e hialuronidases (Jackson and Parks, 1989). Este veneno, quando é inserido tanto nas pessoas como nos animais, a maioria das vezes passa despercebido, isto deve-se que a mordida não produz dor e suma-se a demora que os pacientes são levados ao centro de saúde para seu diagnóstico. (de Roodt et al., 2002).

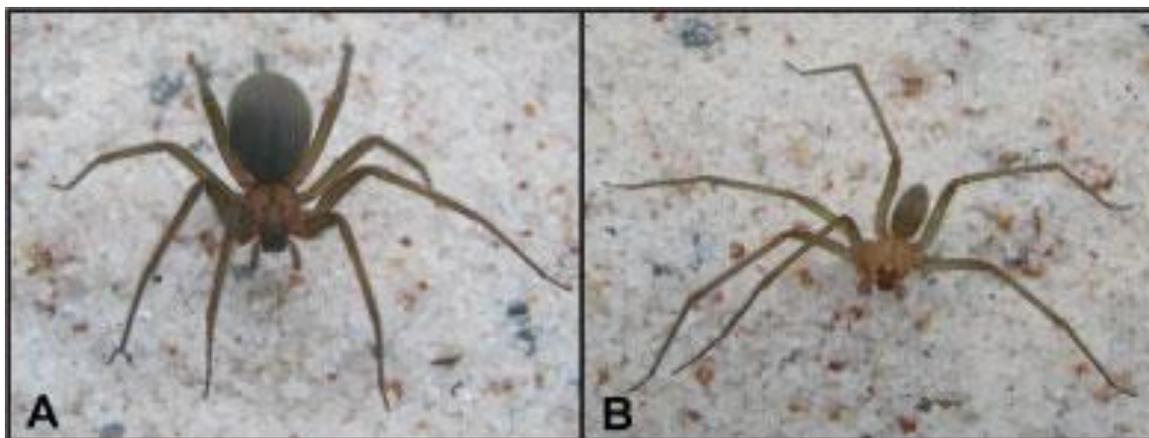


Figura 3. *Loxosceles* adultos.

No A) apresenta a *Loxosceles* fêmea, no B) o macho (menor que a fêmea) (Fischer et al., 2006)

Os primeiros casos de loxoscelismo causados pela aranha *Loxosceles laeta* foram registrados no ano 1937 em Chile e 1953 no Brasil (Lucas et al., 1983; Macchiavello, 1937). No Brasil atualmente encontram-se registradas 19 espécies de *Loxosceles*; sendo as de maior importância médica a *Loxosceles gaucho*, *Loxosceles intermedia* e *Loxosceles laeta*, que habitam principalmente no sul e sudeste do país (Catalog, 2019; Lopes et al., 2013) (**Figura 4**).

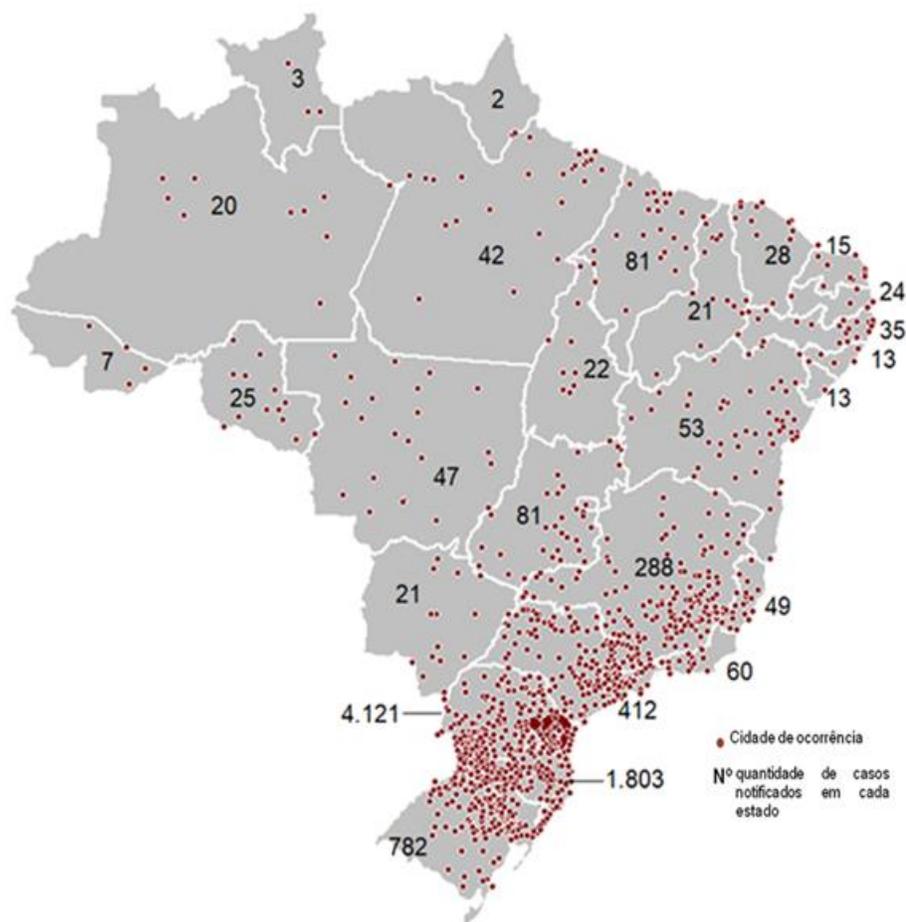


Figura 4. Observase a distribuição geografica dos accidentes do loxocelismo, notificados pela (SINAN, 2017).

Estas aranhas são conhecidas como aranha marrom, aranha assassina, reclusa ou aranha violino (Gonçalves-de-Andrade and Tambourgi, 2003; Vetter, 2008), e o quadro clinico resultante da mordida causada pela aranha *Loxosceles* é chamado loxoscelismo (Tambourgi et al., 2010; Vetter and Isbister, 2008). A (SINAN, 2019) reportou que cada ano existem mais de 8000 casos de envenenamentos por causa destes espécimes, chegando a causar nos pacientes desde morbidade até a morte (**figura 4**).

1.3. Ontogenia das aranhas *Loxosceles* spp.

Na ontogenia das aranhas *Loxosceles* spp são conhecidos três períodos: embrionário (ovulo fecundado até obter o corpo da aranha), larval (pré-larval e larva, incapaz de alimentar-se) e ninfominal (ninfas ou juvenis autossuficientes) (Vetter, 2008). A fertilidade e fecundidade varia de acordo com a espécie; assim, a meia de ovos por posta é de 150, 80, 89 e 62 para *L. intermedia*, *L. reclusa*, *L. laeta* e *L. gaucho* respectivamente (Fischer and Vasconcellos-Neto, 2005b; Galiano, 1967; Hite, 1966; Rinaldi et al., 1997).

As aranhas *Loxosceles* spp., são conhecidas por sobreviver largos períodos de tempo sem comida, isto devido ao lento metabolismo que apresenta estas espécies. Estudos de laboratório mostram que a longevidade meia da *L. reclusa* é de 2.5 anos (Hite, 1966), 7 anos para *L. laeta* (Lowrie, 1980), 3.2 anos para *L. intermedia* (Fischer and Vasconcellos-Neto, 2005a), e 3.6 para *L. gaucho* (Rinaldi et al., 1997) e em todas estas espécies as fêmeas tem uma maior longevidade quando comparadas aos machos.

Uma aranha fêmea adulta pode chegar a medir até 30 mm com as pernas estendidas e o corpo pode chegar a média de 8-15 mm. Morfologicamente estas aranhas apresentam uma distribuição de três pares de olhos bem esclarecida em forma de U e quatro pares de pernas longas (Chakrabarty, 2010).

1.4. Aspectos Clínicos do envenenamento de *Loxosceles*

O loxoscelismo nos humanos apresenta-se clinicamente de duas formas bem definidas: loxoscelismo cutâneo (**Figura 5**) e loxoscelismo-vícero-hemolítico; onde

o primeiro representa o 74-98% no total dos casos com uma gravidade leve e moderada principalmente **(Figura 6)** (Martino et al., 1979; Schenone et al., 1989; Sezerino et al., 1998).

A mordida destas aranhas produz eritema localizado como vermelhidão da pele e frequentemente a pessoa apresenta quadros de sonolência e pode causar ulceração e lesões dermonecroticas (De et al., 2002; Tambourgi et al., 2010). Nos casos crônicos pode conduzir a extirpações cirúrgicas da pele morta e deixar grandes cicatrizes (Martino et al., 1979). Se o tratamento é tardio o paciente pode apresentar lesões sistêmicas graves como hemólise, trombocitopenia, coagulação intravascular disseminada (CID) e insuficiência renal aguda (IRA) levando ao paciente a um coma e inclusive à morte (Pauli et al., 2006; Senff-Ribeiro et al., 2008). Feitosa et al. (1998) Mostrou que estas alterações hematológicas provavelmente são induzidas pelas metaloproteasas, como as Loxolisina A com massa molecular de (20-28 kDa) e a Loxolisina B com massamolecular de (32-35 kDa).



Figura 5. Evolução do paciente com loxoscelismo cutâneo.

Mostra no A) 24 horas, B) 9 dias, C) 16 horas e no D) 25 dias após da mordida (Isbister and Fan, 2011).

As respostas clínicas estão associadas de acordo ao gênero e idade da pessoa mordida, assim também a quantidade de veneno injetado (Sezerino et al., 1998) e ao local onde a pessoa foi mordida (Bernstein and Ehrlich, 1986). Além os venenos das *Loxosceles* possuem reatividade imunológica cruzada onde indicam uma alta identidade imunológica entre os venenos *L. gaucho* e a *L. intermedia* (Barbaro et al., 1994).

Gravidade dos acidentes

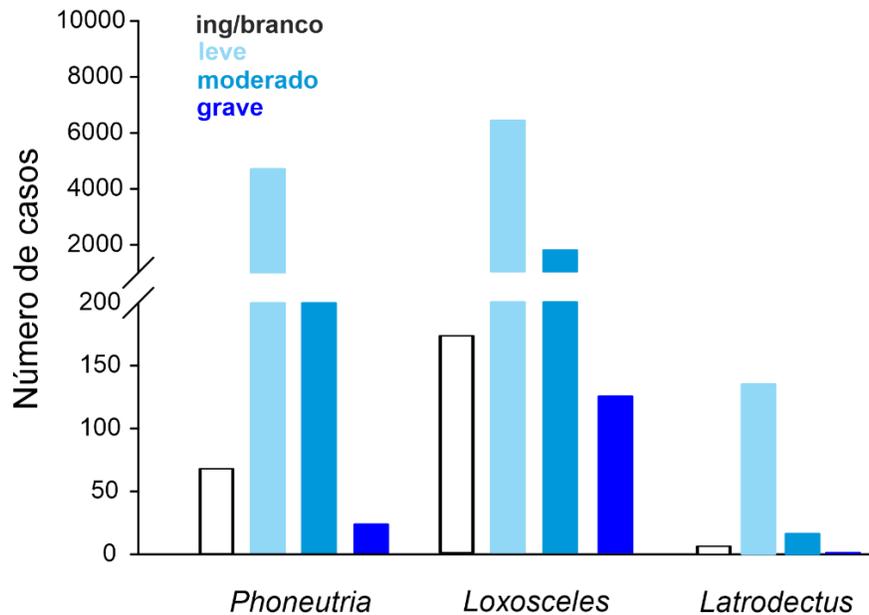


Figura 6. Apresenta a gravidade dos acidentes produzidos pelas aranhas medicamente importantes no Brazil (SINAN, 2019).

1.5. Composição do veneno

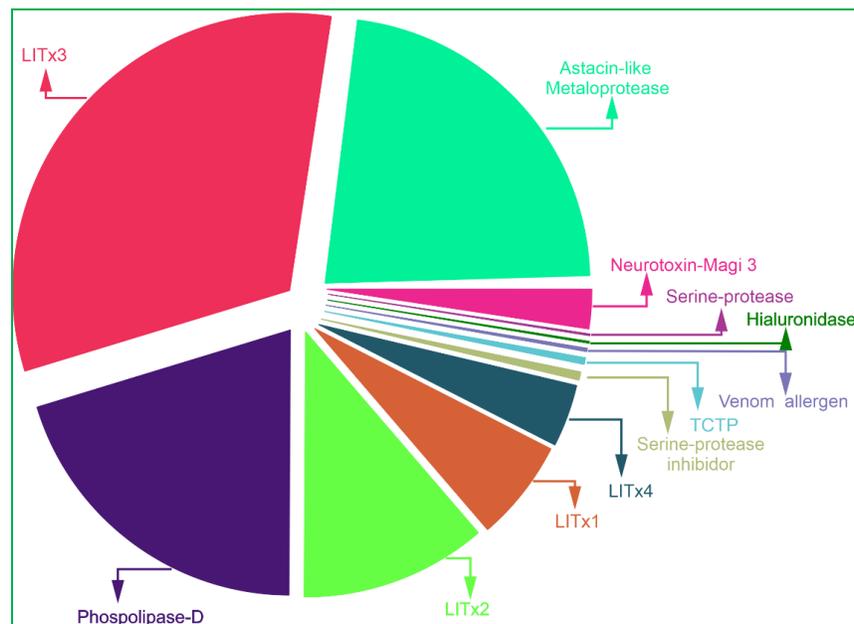


Figura 7. Mostra a composição do veneno das *Loxosceles*

A figura mostra os compostos maioritários do veneno das *Loxosceles*: isomorfos da proteína inseticida, fosfolipase D e a metaloproteína semelhante à astacina (Veiga et al., 2001).

As *Loxosceles* apresentam queliceras as quais estão associados a uma glândula venenosa, que ajudam a expulsar o veneno seja para paralisar ou matar as presas, ou em defesa própria; podendo este último causar acidentes ocasionais nas pessoas (Cordeiro et al., 2015). O veneno deste gênero contém uma mistura rica em proteínas e toxinas peptídicas, neurotoxinas, enzimas, aminoácidos livres e sais inorgânicos todos com massas moleculares diferentes, dificultando a criação de um antídoto (Chaim et al., 2011; Cordeiro et al., 2015; Hula and Niedobová, 2020).

Análises moleculares realizados por (Da Silva et al., 2004; Feitosa et al., 1998) encontraram no veneno deste gênero proteínas de baixa massa molecular como hidrolases, hialuronidases, lipases, metalo e serino proteases, peptidases, collagenases, fosfatase alcalina, fosfolipases ou esfingomielinase D (SMase D) e outras enzimas que proporcionam lesões profundas. Esta última enzima é a principal responsável do loxoscelismo, que ao hidrolisar a esfingomielina resulta na formação da ceramida-1-fosfato e colina, que em presença de Mg^{2+} , pode catalisar a liberação da colina produzindo ácido lisofosfatídico o qual é um mediador de lipídeos dentro das células (Forrester et al., 1978; Paixão-Cavalcante et al., 2006; Tambourgi et al., 1995; van Meeteren et al., 2004).

As famílias da fosfolipase D são toxinas mais bem estudadas caracterizadas do veneno das *Loxosceles* por participarem no desenvolvimento da dermonecrose (Chaves-Moreira et al., 2019; Grashof et al., 2020; Isbister and Fan, 2011; Pedroso et al., 2015). Este veneno desencadeia uma resposta inflamatória complexa que

ativa as citocinas inflamatórias e pro-inflamatórias mediadores de lipídios, dando lugar a um efeito hemolítico nos glóbulos vermelhos (Barbaro et al., 2010). Então o veneno deste gênero pode causar a ativação do complemento, agregação plaquetária, migração dos leucócitos e resposta inflamatória, além de conter uma hialuronidase, que aumenta o tamanho da lesão do tecido, por favorecer o espalhamento do veneno (Magalhães et al., 2013; Tambourgi et al., 2000). Por outro lado está toxina é responsável do efeito gravitacional na pele e na propagação do veneno (Senff-Ribeiro et al., 2008).

Algumas metaloproteinases são dependentes do zinco e apresentam atividade gelatinolítica, caseinolítica e fibrinogenolítica, similar à estatina; as quais tem funções como a hidrolises, digestão de peptídeos e degradação da matriz celular e extracelular (Trevisan-Silva et al., 2010).

1.6. Tratamentos e antivenenos

Existem múltiplos tratamentos para os envenenamentos causados por estas aranhas como por exemplo o uso de fentolamina, heparina, nitroglicerina tópica etc (Da Silva et al., 2004). No entanto outros autores aconselham não usar estas terapias, porque as investigações realizadas até o momento ainda não recomendam seu uso (Futrell, 1992; Wendell, 2003). O tratamento mais recomendado é a soroterapia com soro específico, sendo muito eficaz si este é aplicado precocemente (Isoardi and Isbister, 2020).

No Brasil são produzidos dois antivenenos para acidentes por aranhas *Loxosceles*, no Instituto Butantan, SP, que produz o soro anti-arácido utilizando

na imunização uma mistura dos venenos das aranhas *L. gaúcho* e *Phoneutria nigriventer* e dos escorpiões, *T. serrulatus* y *T. bahiensis* (Da Silva et al., 2004). Outro é produzido pelo Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos (CPPI) em Paraná, produzem um soro polivalente anti-*oxosceles*, com o veneno das *L. gaucho*, *L. intermedia* e *L. laeta* (Health Secretary, 2002).

Brasil consome cerca de 22.000 ampolas de soro antiloxoscelico por ano, o qual se precisa de 1.8 g de veneno, que a sua vez é extraído de aproximadamente 36.000 aranhas (Chaves-Moreira et al., 2019). Em vista do grande consumo de veneno, se está na procura de novas antígenos alternativos como é o uso de toxinas recombinantes presentes nos venenos (Grashof et al., 2020). O veneno loxoscelico é obtido mediante a secreção da glândula apócrina das aranhas, não entanto a produção é baixa obtendo aproximadamente entre 0.15 - 0.45 μL por animal vivo, e 0,8 μL de toxina de glândulas dissecadas (Geren et al., 1976). Os venenos atuam em diferentes mecanismos farmacológicos os quais tem sido e estão sendo investigados para o desenvolvimento de novos fármacos e produtos biotecnológicos (Nicholson et al., 2006). O veneno cru ou toxinas recombinantes concentram-se nos efeitos necrotizantes e coagolotoxicos (Lima et al., 2018; Pauli et al., 2009).

1.7. Proteínas recombinantes como antígenos alternativos.

Tendo em conta a difícil produção dos soros, surgiu a necessidade do uso de novas ferramentas para a obtenção de proteínas heterologas, como uma alternativa para o desenvolvimento de soros anti-veneno (Olvera et al., 2006). Na

atualidade a geração das proteínas recombinantes está sendo obtidas e aplicadas com êxito, ao usar epitopos das *Loxosceles intermedia*.

Kalapothis et al. (2002) Expressou a proteína recLiD1 a partir da LiD1 (proteína dermonecrotica da *Loxosceles intermedia*), a qual foi fusionada com a proteína β -galactósido, obtendo como resultado a proteína recLiD1 com massa molecular de aproximadamente 31 kDa. Esta proteína gerou anticorpos reativos contra as proteínas dermonecroticas nativas, no entanto esta proteína não gerou atividade dermonecrotica.

Assim nosso grupo, mediante a técnica de *SPOT* vêm mapeando epitopos para à geração de novas proteínas recombinantes, com o objetivo de imunizar animais para a produção de anticorpos e pôr em gerar proteção contra os efeitos dos venenos das aranhas *Loxosceles* (Frank, 1992). Felicori et al. (2009) Com a técnica já descrita geraram seis epitopos, um destes foi o peptídeo NLGANSIETDVSFDDNANPEYTYHGIP, ensaios *in vivo* mostraram que esse imunógeno foi capaz de proteger coelhos contra a dermonecrosis em aproximadamente 70%.

Previamente foi produzido o anticorpo monoclonal LimAb7 o qual apresentou atividade dermonecrotica frente ao veneno da *L intermedia* e não gerou reações cruzadas com outros venenos das *Loxosceles* (Alvarenga et al., 2003). Então com o uso da técnica *phage-display* e este anticorpo fizeram a identificação do epitopo conformacional LiD1 NCNKNDHLFACW, e quando foi usado como imunógeno favoreceu a redução da dermonecrose em um 60% e a hemorragia em um 80% frente ao veneno cru da *L intermedia* (De Moura et al., 2011).

Outra das proteínas desenvolvidas foi a proteína quimera recombinante (rCpLi) produzida por Mendes et al. (2013), mediante ensaios *in vivo* demonstrou esta proteína produz anticorpos capazes de gerar proteção dermonecrotica. No entanto a proteção na atividade hemorrágica foi ao redor do 75% e a atividade edematogênica foi menor. Mas pode-se melhorar esta resposta ao inserir mas imunógenos nesta proteína (Felicori et al., 2009).

Então para melhorar as atividades já descritas, foi desenvolvida uma nova proteína recombinante multiepitopica loxoscelica (rMEPLox). Esta proteína é não toxica e contém epitopos das principais toxinas envolvidas no loxoscelismo. Lima et al. (2018) Mostrou que ao imunizar animais com esta proteína, houve a produção de anticorpos capazes de neutralizar a dermonecrosis ao desafiar os animais com o veneno loxoscelico cru, além de neutralizar a metaloproteinase e a hialuronidase.

1.8. Produção de proteínas recombinantes em plantas

As plantas são plataformas atrativas para a produção de proteínas recombinantes, sendo uma alternativa aos sistemas convencionais de bactérias, leveduras e mamíferos (Temporini et al., 2019). As grandes vantagens para a geração de proteínas em plantas transgênicas incluem a estabilidade do material genético na planta e o baixo custo de produção (Blokhina et al., 2020; Rosales-Mendoza et al., 2016). Isto devido a que oferecem uma maior segurança e com baixo risco de endotoxinas ou derivados de patógenos como príons e vírus. Além disto, as plantas requerem só água, CO₂, temperatura e luz adequada para seu

crescimento, o que facilita uma produção ilimitada (Ma et al., 2003; Nandi et al., 2016).

Neste contexto têm sido utilizadas vários tipos de plantas para a produção de produtos biofarmaceuticos (Lagassé et al., 2017; Thomas et al., 2011). As plantas mais estudadas para expressar proteínas recombinantes são a *Nicotina tabacum*, *Nicotina benthamiana*, *Solanum tuberosum*, *Oryza sativa*, *Zea mays*, *Glycine max*, *Medicago sativa*, *Triticum* e *Arabidopsis thaliana* Temporini et al. (2019) . Além destas, algumas leguminosas e cereais são considerados para a produção de biofármacos, devido a que as proteínas se concentram nas sementes e podem armazenar-se durante tempos longos (Donini and Marusic, 2019).

Na indústria farmacêutica podem-se produzir plantas transgênicas para expressar anticorpos monoclonais, antígenos, vacinas, enzimas terapêuticas (Bamogo et al., 2019; Dobrica et al., 2018; Redkiewicz et al., 2014). Sendo possível que muitos peptídeos se expressem nas partes comestíveis e saborosas das plantas, o que significa que a vacina ativa pode ser facilmente ingerida pelo organismo alvo, obtendo assim uma vacina a base de plantas para imunizar organismos via oral e com baixo custo (Scotti and Rybicki, 2013; Takeyama et al., 2015).

1.9. Transformação genética em plantas mediada por *Agrobacterium tumefaciens*.

Agrobacterium tumefaciens é uma bactéria utilizada na engenharia gênica das plantas mais exitosa na natureza, sendo utilizada nos laboratórios de

biotecnologia molecular para a transferência de genes desejáveis a plantas dicotiledôneas (Kámán-Tóth et al., 2018; Masli et al., 2009). A primeira planta monocotiledônea transformada foi a *Asparagus officinalis* (Bytebier et al., 1987) por em dando lugar a novas plantas transgênicas.

O método mais utilizado para a transformação de *A. tumefaciens* é por eletroporação, o qual utiliza um campo elétrico que permite um aumento na permeabilidade da membrana celular bacteriana, melhorando a absorção do DNA transferido e integrando o DNA-T nas células vegetais (Kotnik, 2013; Mattanovich et al., 1989).

Assim muitos trabalhos mostram que *A. tumefaciens* é eficiente conduzindo e integrando transgenes intactos dentro do genoma da planta (Gelvin, 1998). Estas pesquisas têm contribuído para a produção de produtos bioterapêuticos em plantas, obtendo transformações genéticas estáveis e convertendo a esta bactéria numa ferramenta imprescindível dentro da biotecnologia de transferência de genes nas células vegetais (Kámán-Tóth et al., 2018; Temporini et al., 2019).

1.10. *Arabidopsis thaliana*

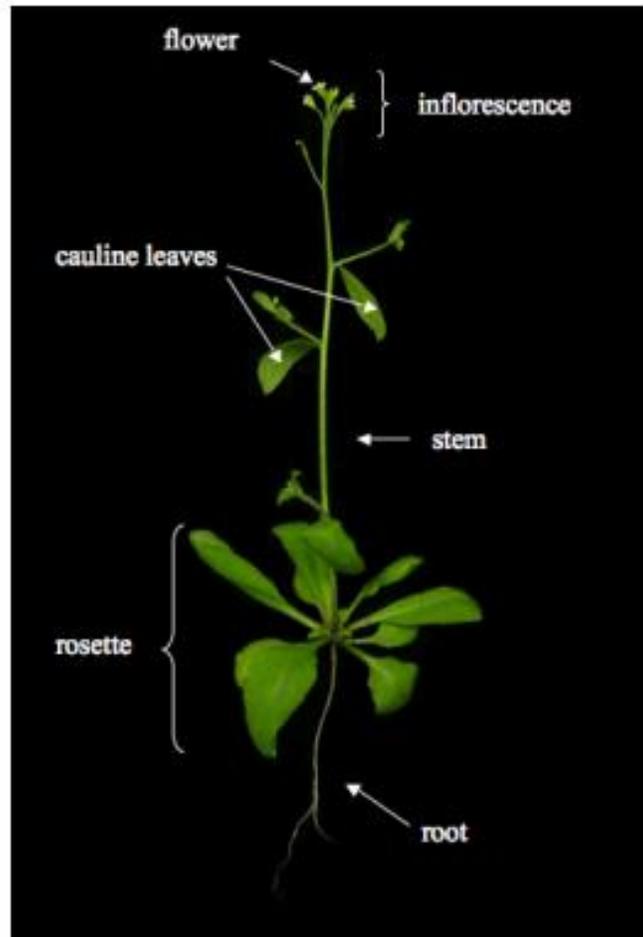


Figura 8. Planta de *Arabidopsis thaliana* após de seis semanas de idade.

Este grafico ilustra as partes que estão compondo uma planta de *Arabidopsis*: a raiz, rosseta, talho, folhas e dentrou da inflorescencia as flores (Alvarez-Buylla et al.).

Arabidopsis thaliana pertence à família Brassicaceae, encontrasse distribuída pela América do norte, Europa e Ásia; posse muitos ecotipos entre estes destacam-se os Columbia-0, Landsberg e Wassilewskija, (Alonso-Blanco and Koornneef, 2000; Chen et al., 2006). Sendo seu genoma o terceiro em ser sequenciado, só depois de *Caenorhabditis elegans* e *Drosophila melanogaster* (Adams et al., 2000; Consortium*, 1998). Em 1986 foi publicado o primero trabalho

com *A. thaliana* diante a transformação gênica mediada por T-DNA (Stachel et al., 1986).

O ciclo de vida da *A. thaliana* é de aproximadamente seis a oito semanas incluindo a germinação, desenvolvimento, floração, maturação e formação de sementes. Aos 20 dias forma-se o botão floral e aos 30 visualiza-se a inflorescência, e 15 dias depois ocorre o desenvolvimento das sementes e finalmente dá-se a senescência (Delatorre and Silva, 2008). As flores apresentam quatro sépalas verdes, quatro pétalas brancas, seis estambres, um gineceu interno, não entanto os frutos são siliquas as quais produzem milhares de sementes por planta (Meinke et al., 1998). *A. thaliana* além de ter o ciclo de vida curto, facilidade do cultivo, a estatura da planta pequena e seu custo de produção baixo é uma espécie modelo para a produção de novos estudos genéticos diante a transformação genica mediada por *A. tumefaciens* (Chang et al., 2020; Labra et al., 2004) **(figura 8)**.

Estudos realizados por (Wang et al., 2018; Wu et al., 2014) mostraram que as transformações em *A. thaliana* tem sido utilizado com êxito para construções genicas com ajuda de ferramentas e recursos genéticos (Zhang et al., 2020). Estas transformações podem ser diante vários métodos como imersão floral, bombardeou biolítico ou infiltração de agro bactérias (Provart et al., 2016; Rosas-Díaz et al., 2017). O início da transição vegetativa da *A. thaliana* começa nas folhas, continua nas flores e termina nas sementes; durante este processo a planta está inteiramente condicionada por vários fatores ambientais e endógenos;

que ao final incidem na produção dos genes alvos. (Andrés and Coupland, 2012; Srikanth and Schmid, 2011).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Expressar a Proteína Recombinante Multiepitópica Loxoscélica (rMEPLox) em *Arabidopsis thaliana*, e avaliar seu caráter imunogênico na produção de anticorpos neutralizantes.

2.2. Objetivos específicos

- ✓ Expressar a proteína rMEPLox em plantas do gênero *Arabidopsis thaliana*;
- ✓ Produzir plantas transgênicas homozigotas que contenham a proteína recombinante rMEPLox;
- ✓ Extrair a proteína de diferentes partes do vegetal;
- ✓ Avaliar o potencial de reconhecimento e neutralização dos anticorpos anti-rMEPLox contra os venenos de aranhas *Loxosceles spp.*

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Proteína rMEPLox produzida em *E. coli* e soro anti-rMEPLox

Neste trabalho nós utilizamos como controle de alguns ensaios, a proteína rMEPLox produzida em *E. coli* e soros anti-rMEPLox, os quais foram produzidos previamente em coelhos (Lima et al., 2018).

3.2. Criação das plantas

As plantas de *Arabidopsis thaliana* foram cultivadas na Sala de Cultivo de Plantas do Laboratório de Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal do Departamento de Botânica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Foram cultivadas a uma temperatura controlada de 20 ± 2 °C, foto período de 12 horas luz e 12 horas no escuro e uma umidade relativa de 60%.

3.3. Amplificação do DNA por PCR e purificação do gene rMEPLox.

A PCR foi realizada para à incorporação de nosso gene (rMEPLox) no vector de recombinação (pCR8), este processo é chamado de clonagem. Onde se fez a partir da construção do vetor pET28b+rMEPLox. Utilizou-se os iniciadores da Quimera Aranha Fw: (5'-ATGGGGAATCTGGGCG-3') e Rv: (5'-CACATTGACATACGGACGGATA-3'). As mesclas foram feitas a partir da PCR com volumevolume final de 20 µL, este mix continham: iniciador Fw 0.2 µM, iniciador Rv 0,2 µM, DNA 100 ng, cloreto de magnésio 2 mM, dNTP 0,4 mM, *Platinum™* Taq DNA Polymerase 1 U e tampão 1x (pH 8.4, Tris-HCl e KCl) seguindo as orientações próprias do fabricante Invitrogen.

A reação foi feita no termociclador T-100 Biorad utilizando o protocolo descrito por Dellaporta et al. (1983) com algumas modificações. Se fez 30 ciclos, sendo a desnaturação a 95 °C por 5 minutos; anelamento dos iniciadores a 55 °C por 1 minuto; alargamento a 72 °C por 1 minuto; extensão final a 72 °C durante 10 minutos. Após da PCR, o produto da amplificação foi avaliado através de eletroforeses de agarose ao 1% em tampão TAE e corado com *SYBR Safe DNA Gel Stain* (Invitrogen). Se analisou o gel ao comparar com o padrão de massa molecular *1 Kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen). Finalmente se fez a purificação do gene rMEPLox (551pb posição da banda no gel de agarose), seguindo as instruções do Wizard SV Gel PROMEGA, onde a banda foi excisada e submetida para à purificação obtendo o DNA, este material foi quantificado no Nanodrop.

3.4. Adenilação e Ligaç o do gene rMEPLox ao vetor PCR8

O fragmento de interesse de 551 pb foi puncionado do gel e purificado utilizando-se o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) conforme especifica o do fabricante. Para garantir a adenila o do produto de PCR, incubou-se todo o produto da purifica o com 200 µM de dATP, 1 U de Taq DNA polimerase (Phoentria) em tamp o de rea o 1B 1x. A rea o foi ent o levada para termociclador T-100 sob temperatura de 72 °C por 30 minutos.

O fragmento obtido foi ligado ao vetor de entrada pCR8/GW/TOPO da Invitrogen. Para a rea o de liga o foram usados 1 µL de NaCl 1.2 M, MgCl₂ 0.06 M; 0.5 µL de vetor e 4.5 µL de produto de PCR (aproximadamente 600 ng); incubados a 23 °C por 30 minutos.

3.5. Transformação e clonagem das bactérias XL1 Blue com o vetor PCR8+gene

Para saber si o gene rMEPLox foi inserido corretamente no vector, se fez uma transformação em *E. coli*, esta transformação foi feita mediante electroporação de acordo com o protocolo descrito por (Dobrica et al., 2018). Onde usou-se cepas de *Escherichia coli* XL1 blue e o vetor pCR8/GW/TOPO + rMEPLox. Este vetor confere resistência ao antibiótico Canamicina. Após da transformação incubou-se em meio SOC (**Tabela 2**) durante 1 hora a 37 °C. As bactérias foram plaqueadas em meio de cultura sólido Luria Bertani (LB) (**Tabela 1**) contendo Canamicina (100mg/L^{-1}) e deixou-se na estufa *overnight* a 37 °C. O resultado da transformação foi confirmado por PCR das colônias obtidas. A PCR foi feita seguindo os mesmos passos já descritos no item 3.4. Se fez um procedimento similar na transformação com o segundo vetor pMDC32 + rMEPLox e com a mesma cepa bacteriana.

3.6. Miniprep plasmidal Promega

Para a obtenção do DNA, as colônias positivas do vetor pCR8 + rMEPLox, foram selecionadas para a extração do DNA diante a MiniPrep do DNA plasmidal; seguindo o protocolo do fabricante (Promega miniprep plasmidal), onde as cepas positivas foram inoculadas em Meio LB + Canamicina (100mg/L^{-1}). Ao dia seguinte se centrifugou os inoculos a 4000 rpm, após se resuspendeu usando tampão de resuspensão (próprio do kit), isto se passou para um tubo novo. Após

se adicionou 250 µl de tampão de lises, se inverteu três vezes e se deixou por quatro minutos. Depois se adicionou 10 µl de protease alcalina e se inverteu quatro vezes para se misturou, seguidamente adicionou-se solução neutralizante 350 µl e centrifugamos por 10 minutos a rotação máxima. O lizado foi transferido para uma coluna do kit e se centrifugou por um min a rotação máxima. Depois se adicionou tampão da lavagem na coluna 750 µl, centrifugamos por um minuto a rotação máxima, se fez este passo uma vez, mas com 250 µl de tampão de lavagem. Passado este tempo transferiu-se a coluna a um tubo novo e adicionou-se 50 µl de tampão de eluição. Finalmente se dosou o DNA (ng/µl) e o DNA obtido foi analisado pelo Sequenciamento Sanger. Se fez o mesmo procedimento com o vetor pMDC32 + rMEPLox, este vetor confere resistência a espectinomicina (100mg/L^{-1}).

3.7. Digestão das colônias pMDC32 + gene com as enzimas HINDIII e XBAL

Para confirmar si o vector pMDC32+gene encontrasse amplificando na posição esperada, neste caso nas 551pb se fez a digestão das colônias. Isto se fez mediante uma PCR com o DNA extraído de cada colônia do vector pMDC32+rMEPLox, onde usou-se as enzimas de restrição Xbal e Hind III 1 unidade de enzima por cada µg de DNA. Este ensaio foi feito com 4, 8 e 16 horas respectivamente e o volume final foi de 20µl. Seguidamente se fez um gel de agarose ao 1% usando tampão TAE e corremos as mostras a 100V, coramos com *SYBR Safe DNA Gel Stain* (Invitrogen) e visualizamos as bandas no transiluminador (UV) para confirmar a restrição das enzimas no DNA.

3.8. Obtenção de *Agrobacterium tumefaciens* competentes.

A partir dos vetores binários foi feita a transformação com a cepa *A. tumefaciens*. Onde se isolou uma colônia de *A. tumefaciens* (GV3101) em 100ml de meio YEB líquido (**Tabela 3**) contendo (100mg/L^{-1}) de rifampicina e deixamos no shaker por 24 horas a 100rpm e 28 °C. Posteriormente colocou-se os 100ml do inoculo em 800ml de meio YEB novo sem antibiótico, deixamos em agitação para seu crescimento até atingir a OD_{600} . Seguidamente se transfiro toda a cultura a tubos falcon e centrifugou-se a 2000G por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e se resuspendeu o pellet em meio HEPES 1mM gelado e centrifugou-se novamente nas mesmas condições, após resuspendimos o pellet em glicerol ao 10% gelado por 15 minutos mais, descartamos o sobrenadante e finalmente resuspendemos em 2ml de glicerol gelado ao 10%, finalmente se fez alíquotas de 40 μL , congelamos as células competentes em nitrogênio líquido e as guardamos no -80°C para seu uso.

A transformação se fez mediante electroporação seguindo o protocolo Mattanovich et al. (1989), onde se descongelaram as cepas de *A. tumefaciens* no gelo e se adicionou entre 2 a 10ng de DNA rMEPLox, após colocou-se 50 μL de esta suspensão em uma cuba de electroporação e aplicou-se um impulso elétrico de voltagem inicial de 2.5 kV. Após do eletrochoque as células foram transferidas imediatamente a meio SOC e incubou-se ao 28 °C durante uma hora. Se plaque-o em meio LB com rifampicina e Canamicina (100 mg/L^{-1}) as placas foram incubadas no shaker por 48 horas ao 28 °C, e passado esse período se fez a PCR de colônia e seguidamente um gel de agarose ao 1%, este foi colorido com SYBR

Safe DNA Gel Stain (Invitrogen) para a verificação das colônias positivas em *Agrobacterium* que têm o gene rMEPLox implementado.

3.9. Transformação em *Arabidopsis thaliana*.

Se fez a transformação de *Agrobacterium* contendo o gene rMEPLox em plantas, com a finalidade da expressão este gene. Onde se fez inoculo de uma colônia de *A. tumefaciens* + rMEPLox em Meio liquido LB, adicionou-se antibióticos rifampicina e canamicina (100 mg/L^{-1}), deixou-se a $28 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 18 horas sobre agitação (180 rpm). Após centrifugou-se a 3500 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente (para obter o *pellet*). Este pellet foi ressuspendido com 2 mL de Silwest-L 77 0.02% contendo sacarose 5%. Seguidamente se fez a transformação em plantas de *A. thaliana* por imersão floral (Williamson et al., 1987) em plantas de *A. thaliana* com 45 dias de idade.

O cultivo das plantas transformadas foi realizado segundo o protocolo descrito por Davod et al. (2018), onde as plantas foram cultivadas a condições do laboratório, com temperatura que oscilou entre $21 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, fotoperíodo 12 horas luz e 12 horas escuro, até obter as sementes, sendo estas a geração T0. As sementes foram coletadas, esterilizadas e cultivadas em meio MGRL (**Tabela 4**) modificado contendo higromicina (100 mg/L^{-1}). Estas placas foram hibernadas a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 3-4 dias, passados estes dias levamos as placas para a sala de criação para a germinação das mesmas durante 10 dias. Após deste tempo, se fez a seleção das plantas transgênicas e estas foram transferidas a novas placas com meio MGRL modificado sem antibiótico, deixou-se até que estas apresentassem

3-4 folhas. As jovens plantas foram cultivadas em substrato, com o mesmo fotoperíodo e temperatura descrito anteriormente, deixou-se até obter as sementes T1 sendo a primeira geração (Trujillo et al., 2020). Se fez o mesmo procedimento para as seguintes gerações até obter a terceira geração (T3), onde todas as plantas são homocigotas.

3.10. Extração das proteínas das plantas.

A extração do DNA foi realizada de acordo com (Doyle and Doyle, 1987) com algumas modificações, onde se pegou 1 g das folhas recolhidas de plantas maduras e 1 g da raiz, se triturou este tecido com nitrogênio líquido (Masli et al., 2009; Trujillo et al., 2020), após se suspendeu com tampão de extração previamente resfriado (Tris-HCl 100 mM pH 8), sacarose 30%, SDS 1% e β -mercaptoetanol 0,07% e se centrifugou a 8000 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi passado a um novo falcom e se extraiu as proteínas com o dobro de volume de acetona com tricloroacético 10% (p/v) e β -mercaptoetanol (2-ME) 0,07% (v/v). Esta mistura de proteínas incubou-se ao -20 °C overnight, após se centrifugou ao 10000 rpm durante 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento final se lavou com metanol 100% resfriado ao 4 °C e acetona ao 80% (temperatura ambiente) respectivamente. Deixou-se secar o sedimento e se suspendeu com PBS-1x (**Tabela 15**), após se dialisou as amostras overnight em PBS 1x, seguidamente liofilizou-se em um sistema LABCONCO (FreeZone 6L).

3.11. Quantificação

A proteína liofilizada foi reconstituída em solução PBS 1x (**Tabela 16**), o conteúdo foi dosado seguindo o método de Lowry et al. (1951). O ensaio foi realizado em uma microplaca de 96 poços, por duplicata se usou BSA para a curva padrão, para as mostras usou-se as soluções do kit *DC Protein Assay-BIORAD*. As leituras das reações foram realizadas em um leitor de ELISA com filtro 655nm e a curva foi calculada de acordo a leitura das concentrações do padrão de BSA.

3.12. SDS-PAGE

Se fez o gel eletroforeses SDS-page 12%, seguindo o método Laemmli (1970). As amostras foram resuspendidas com tampão de amostra 2x (**Tabela 12**), e foram sometidas a uma corrente de 120V em tampão da corrida 1x (**Tabela 9**) durante 60 minutos. O gel foi corado com Comassie Blue R 250 (**Tabela 10**), a temperatura ambiente e deixou-se sobre agitação overnight. Lavou-se com solução descorante (**Tabela 11**). As massas apresentadas no gel foram confirmadas pelo padrão de peso molecular de proteínas (LMW – SDS Marker Kit - GE Healthcare).

3.13. Identificação da rMEPLox por Elisa

A técnica de ELISA foi usada com a finalidade de saber si as plantas transformadas estão expressando a proteína rMEPLox. No primeiro dia se sensibilizou a placa de 96 poços com diferentes concentrações (5, 10 e 15 µg/µL) dos extratos da planta transgênica e dos extratos não transgênicos, em tampão

carbonato, 100 µL por poço. As placas foram incubadas na geladeira a 4 °C overnight. Ao seguinte dia se lavou a placa três vezes com PBS-T ao 0.05%, e foi realizada uma etapa de bloqueio da placa com leite em pó desnatado a 3% em PBS 50mM (**Tabela 17**), e incubamos durante uma hora a 37 °C, em tampão de incubação (**Tabela 18**), para evitar ligações inespecíficas. Passado este tempo lavou-se 3 vezes com PBS-T 0,05% e se colocou tampão de incubação com soro anti-rMEPLox em diferentes diluições (1:200, 1:600 e 1:1000), se incubou por uma hora a 37 °C, após se lavou 3 vezes. Seguidamente se colocou o conjugado anti-coelho em uma diluição 1:10000, deixamos por uma hora na estufa a 37 °C e lavamos 3 vezes. Finalmente revelamos com OPD para detectar o reconhecimento antigênico. Deixou-se no escuro por 30 min, esta reação foi parada com 25µl/poço de H₂SO₄ 2M e as absorvâncias foram medidas a 490nm no leitor de microplaca *iMark*TM (Biorad).

3.14. Análises por Western-Blot.

Se fez SDS-PAGE como descrito no item 3.11. A transferência do gel se fez a uma membrana de nitrocelulose (4 °C, durante duas horas a 100V) em tampão de transferência (**Tabela 13**) seguindo o método de (Towbin et al., 1979). Passado este tempo a membrana foi bloqueada com tampão de bloqueio (leite desnatado 1%, Tween 20 e PBS 0,3%) por uma hora. Após se lavo 3 vezes por cinco minutos com PBS-T 0.05%. Depois se incubou com soro de coelho anti-rMEPLox e diluído com o mesmo tampão de bloqueio (1:1000) durante uma hora a temperatura ambiente e sobre agitação. A membrana foi lavada com PBS-T a 0.05% e se incubaram com IgG anti-coelho (1/15000) em tampão de bloqueio por uma hora a

temperatura ambiente. Após uma última lavagem, a membrana foi revelada usando 3,3'-diaminebencidina tetrahydrocloruro de hidrato (DAB) mais 4-cloto-1-naftol (**Tabela 14**) como foi descrito por (Alvarenga et al., 2003).

4. RESULTADOS

4.1. Identificação das bactérias positivas.

No presente trabalho se utilizou a proteína recombinante quimera rMEPLox, produzida no laboratório Imunoquímica de Proteínas da Universidade Federal de Minas Gerais, para melhorar a produção desta proteína, neste trabalho usou-se o sistema de produção em planta. Para a expressão da proteína rMEPLox em *Arabidopsis thaliana*, foi necessário transferir o gene de rMEPLox do vetor de expressão em *E. coli* pET-26b para o vetor pMDC32, que é o vetor de expressão em plantas. Um vetor de recombinação chamado pCR8 (**Figura 9**) foi utilizado para mediar essa transferência. Foi necessário então, amplificar o gene que estava em pET-26b, purificá-lo diretamente do gel de eletroforese, e ligá-lo ao pCR8. O amplicon de rMEPLox obtido pela PCR do cDNA foi visualizado uma banda única (resultados não mostrados), após da purificação, foi ligado ao vetor pCR™8/GW/TOPO®.

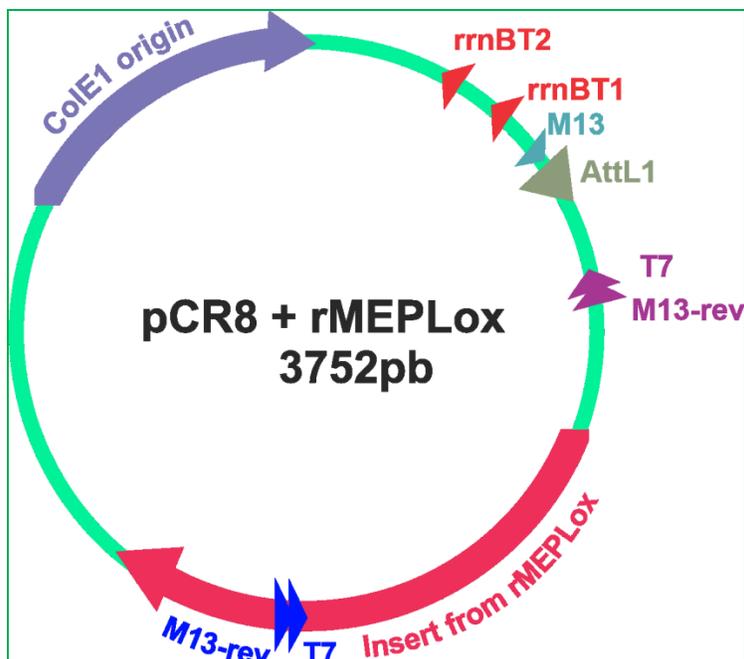


Figura 9. Vetor de recombinação pCR8.

Contendo a sequência do gene rMEPLox. O inserto do gene rMEPLox está ressaltado em rosa escuro.

Após a ligação, bactérias de clonagem XL1 Blue foram transformadas com a construção do vetor pCR8+rMEPLox. 17 colônias foram selecionadas para fazer a PCR de colônia das bactérias transformadas, usando primers específicos para o gene rMEPLox. Uma eletroforese das amplificações da PCR de colônia mostrou que a maioria destas foram positivas por apresentarem bandas de aproximadamente 550 pb, tamanho esperado para o gene de rMEPLox. Apenas as colônias 6 e 8 não amplificaram o gene (**figura 10**). Fizemos também a PCR das mesmas colônias com dois primers diferentes, que amplificam o vetor pCR8 e estas mostraram a amplificação na posição esperada tanto do vetor pCR8 aproximadamente nas 2000pb e o gene rMEPLox ao redor de 550pb. O qual

concorda com a literatura, sendo o número de bases do vetor pCR8 é de 2817pb e da proteína químera rMEPLox 551pb (Lima et al., 2018) (**figura 11**).

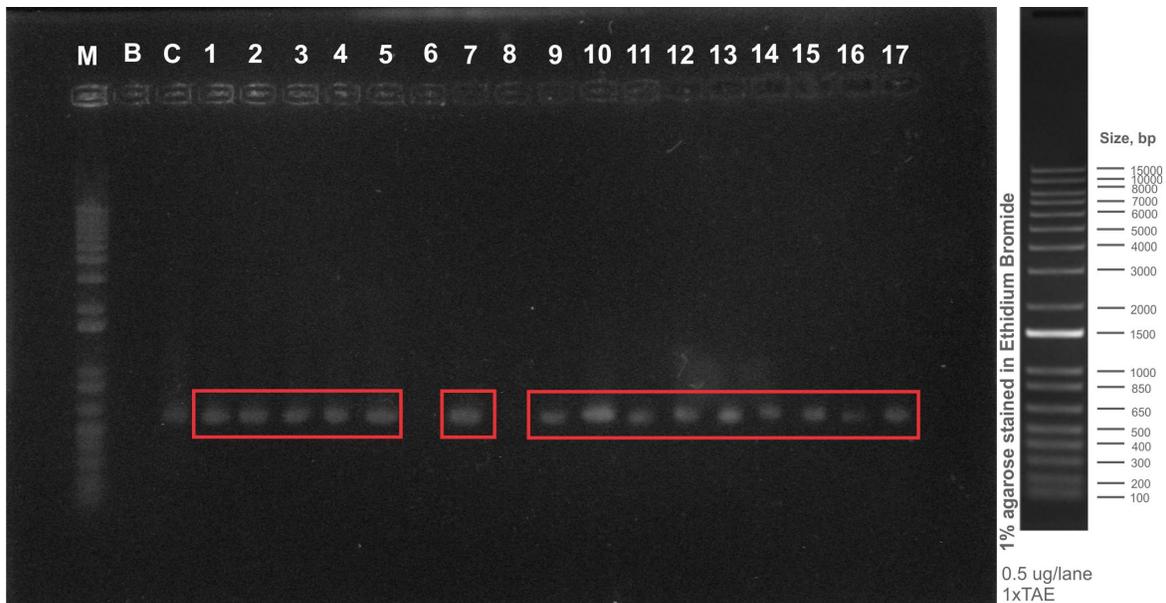


Figura 10. PCR das bactérias transformadas.

Observase no gel de agarose ao 1%, corado com *SYBR Safe*. Após da PCR no vetor de entrada pCR8. Na primeira canaleta M: marcador de massa molecular 10000pb. Já nos quadros vermelhos as colônias positivas que contém o gene rMEPLox, aproximadamente 550 pb.

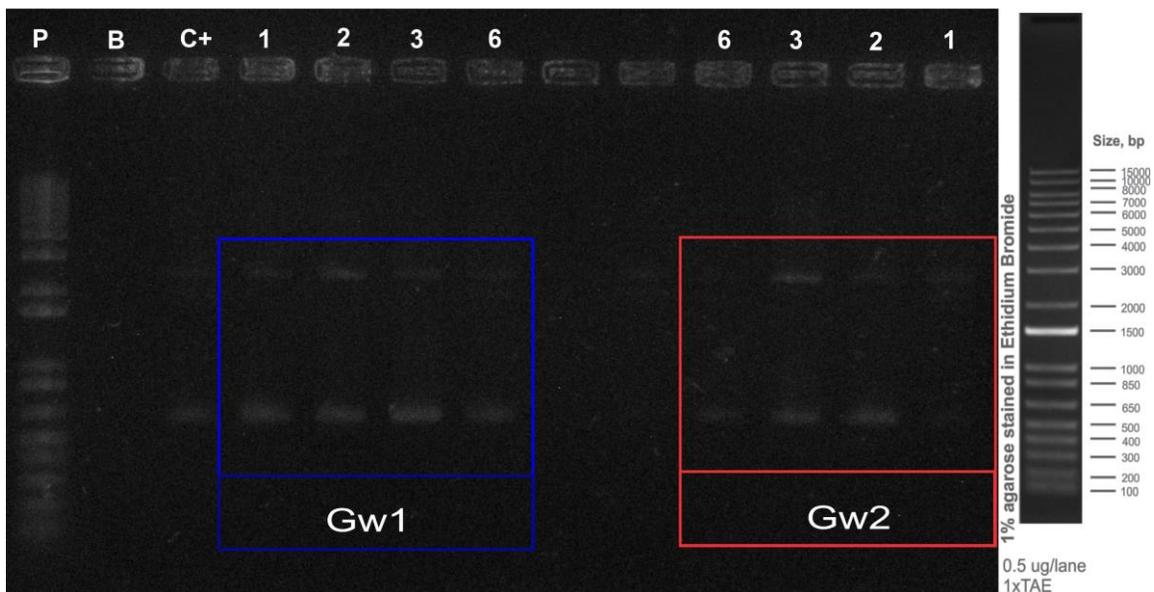


Figura 11. PCR das colônias positivas (contem o gene de interesse).

Gel de agarose ao 1%, corado com SYBR Safe. Após da PCR no vector de entrada pCR8. Na primeira canaleta P: marcador de massa molecular 10000pb (Invitrogen). No quadrado azul (primer fw) e no vermelho (primer rw), observasse à amplificação do gene rMEPLox.

Antes de prosseguir com a recombinação entre o pCR8 e o pMDC32 (vetor de expressão em plantas), nós solicitamos um sequenciamento para confirmar se a construção pCR8+rMEPLox estava correta. Com ajuda do programa CLUSTAL descrito por (Jang et al., 2020), podese observar na **figura 12** que o sequenciamento de sanger do vetor pCR8+rMEPLox encontram-se alinhadas corretamente na direção 5' a 3' com o gene rMEPLox obtido da *E. coli*.

seq_clone4	TTTTCAACTTTGTAMAAAAAGCAGGCTCCGAATTCGCCCTTATGGGGAATCTGGGCGCGA	60
rMEPLox	-----CCATGGGGAATCTGGGCGCGA	21

seq_clone4	ATAGCATTGAAACCGATGTGAGCTTTGATGATAATGCGAATCCGGAATATACCTATCATG	120
rMEPLox	ATAGCATTGAAACCGATGTGAGCTTTGATGATAATGCGAATCCGGAATATACCTATCATG	81

seq_clone4	GCATTCCGGGCGGCTGCAAAAAATATGAAAATTTTAAGATTTTCTGAAAGGCCTGCGCG	180
rMEPLox	GCATTCCGGGCGGCTGCAAAAAATATGAAAATTTTAATGATTTTCTGAAAGGCCTGCGCG	141

seq_clone4	GCGGCAATTGCAATAAAAAATGATCATCTGTTTTCGTGCTGGCTCGAGGATTTTTCAGGTC	240
rMEPLox	GCGGCAATTGCAATAAAAAATGATCATCTGTTTTCGTGCTGGCTCGAGGATTTTTCAGGTC	201

seq_clone4	CGTATCTGCCGAGTCTGCCGACGCTGGATGCGGGCGGTTCTCTGGGCCGTGGCTGCMCCG	300
rMEPLox	CGTATCTGCCGAGTCTGCCGACGCTGGATGCGGGCGGTTCTCTGGGCCGTGGCTGACCCG	261

seq_clone4	ATTTTGGTACGATTCTGCATGAAGGCGGTAACGGCGGTATTCCGCAGCTGGGCGATCTGA	360
rMEPLox	ATTTTGGTACGATTCTGCATGAAGGCGGTAACGGCGGTATTCCGCAGCTGGGCGATCTGA	321

seq_clone4	AAGCGCACCTGGAAAAAGCGCCGTGGATATTGGCGGTATCCTGGACAAATCTGCAACCG	420
rMEPLox	AAGCGCACCTGGAAAAAGCGCCGTGGATATTGGCGGTATCCTGGACAAATCTGCAACCG	381

seq_clone4	GTCTGCGTATTATCRACKGGGAAGCTTGGCGTGGCGGTGAAAACAATACCCGCACGATTG	480
rMEPLox	GTCTGCGTATTATCGACTGGGAAGCTTGGCGTGGCGGTGAAAACAATACCCGCACGATTG	441

seq_clone4	GCCCGTTTGATTATGACAGTATCATGCTGTATGGTGCCTACGGCGGTAAACTGTATAAAT	540
rMEPLox	GCCCGTTTGATTATGACAGTATCATGCTGTATGGTGCCTACGGCGGTAAACTGTATAAAT	501

seq_clone4	GTCCGCCGGTGAATCCGTATCCGGGTGGTATCCGTCCGTATGTCAATGTGAAGGGCGAAT	600
rMEPLox	GTCCGCCGGTGAATCCGTATCCGGGTGGTATCCGTCCGTATGTCAATGTG-----	551

Figura 12. Alinhamento do gene rMEPLox extraído da colônia 4.

O sequenciamento pelo método de Sanger alinhado com o gene produzido inicialmente em *E. coli*.

Após de confirmar que a transferência do gene para o vetor pCR8 estava correta, a colônia 10 foi usada para a segunda transformação no vetor de destino pMDC32 (plasmídeo próprio para expressar em plantas). A revelação da PCR foi feita em um gel de eletroforeses, onde revelou que o gene rMEPLox encontrasse amplificando perto das 10000pb (**figura 13**). Para confirmar que o gene encontra-

se inserido no vector pMDC32 se se fez uma segunda PCR na qual usou-se as enzimas de restrição *Xba*I e *HIND*III, onde a revelação mostrou que o gene esta amplificação do gene aproximadamente nas 550pb (**figura 14**) o que confirma o resultado com o trabalho de (Lima et al., 2018).

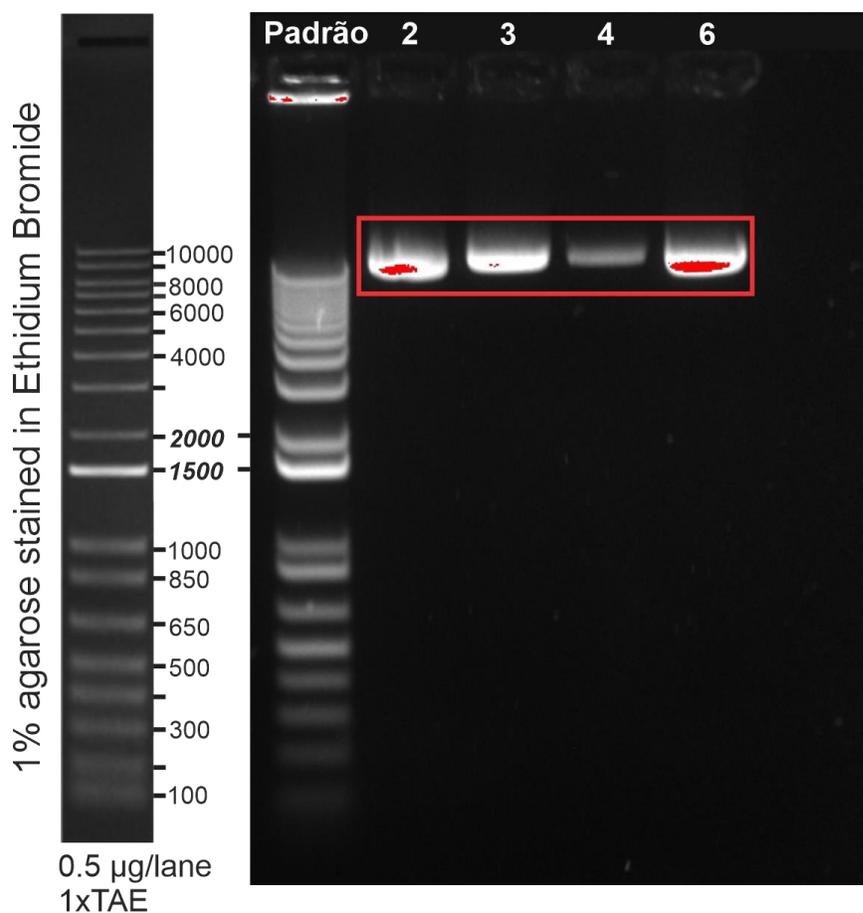


Figura 13. Revelação da PCR do vetor da planta com o gene de interesse.

Gel de agarose ao 1%, corado com *SYBR Safe*. Na primeira canaleta P: marcador de massa molecular. No quadrado vermelho observe a amplificação do gene de interesse acima de 10000 pb., obtido a través da PCR no vector de destino pMDC32.



Figura 14. Revelação da PCR das colônias positivas digeridas.

Gel de agarose ao 1%, corado com SYBR Safe. Na primeira canaleta P: marcador de massa molecular 10000pb. No quadrados vermelho apresentam a amplificação do gene rMEPLox no vector de destino pMDC32, obtidos através da digestão com as enzimas de restrição *XbaI* e *HindIII*.

Finalmente o gene rMEPLox foi transformado em *A. tumefaciens*. Esta transformação foi feita por eletroporação, se fez uma PCR de 8 colônias e a revelação destas foi realizada em um gel de agarose ao 1%, mostrando a amplificação do gene ao redor de 550 pb e da *Agrobacterium* encontras-se com aproximadamente 1300pb, o que concorda tanto com o trabalho feito por (Lima et al., 2018) e com o realizada por (Alippi et al., 2011) que demonstraram que a *Agrobacterium* amplifica em 1066 pb (figura 13 a 15).

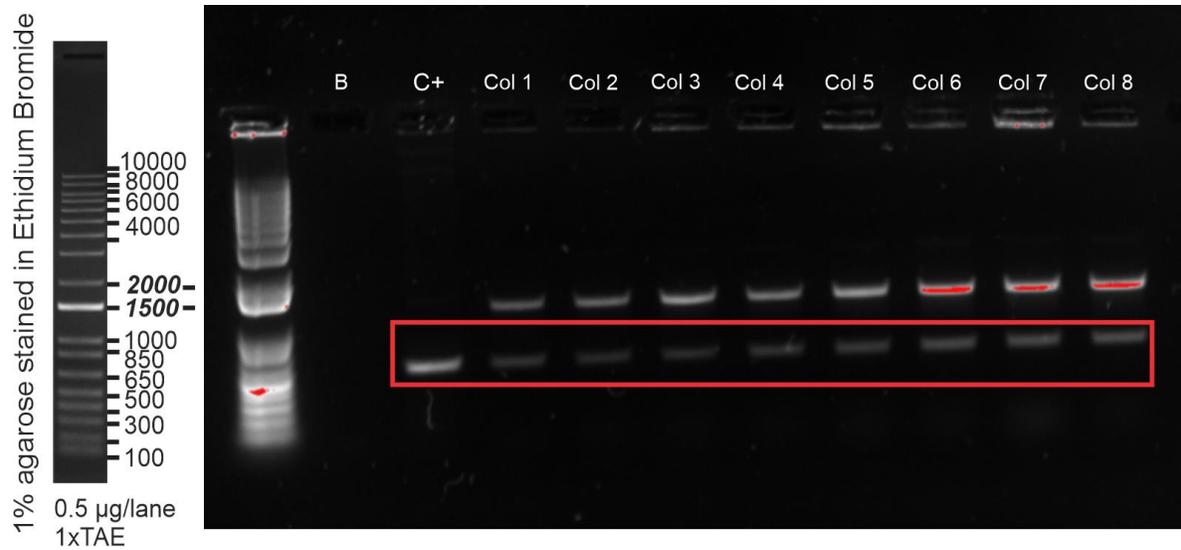


Figura 15. Revelação da PCR da *Agrobacterium*.

Gel de agarose ao 1%, corado com *SYBR Safe* obtido da reação de PCR. No quadrado vermelho apresentam a amplificação do gene de interesse aproximadamente 550 pb., na *Agrobacterium*; na primeira canaleta apresenta o marcador molecular 10000pb.

4.2. Expressão do gene rMEP_{Lox} em *Arabidopsis thaliana* Col-0

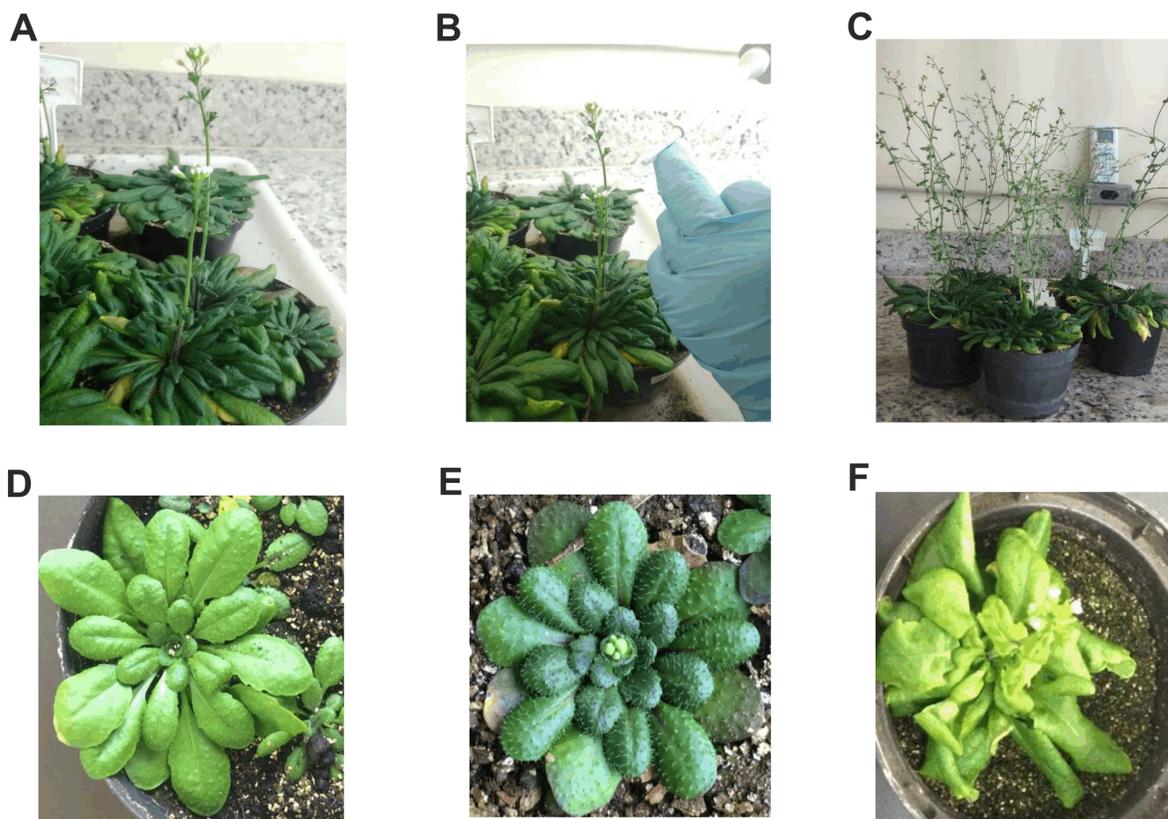


Figura 16. Transformação em *Arabidopsis thaliana*.

No A) apresenta-se plantas WT *A. thaliana*. B) transformação nas plantas WT com a construção pMDC32+rMEP_{Lox}. C) Plantas transformadas com o gene rMEP_{Lox} (seis semanas de idade). D) Planta transgênica geração T0. E) Apresenta a primeira geração (T1) e na F) a segunda geração (T2) das plantas transgênicas que contêm a proteína rMEP_{Lox}.

Após da transformação de *Agrobacterium* nas plantas se obtiveram as gerações T0, T1 e T2 respectivamente, mostrando-nos na geração T2 uma diferença nas folhas frente às gerações T0 e T1 **figura 16** e na **figura 17** observasse no A) *Arabidopsis thaliana* com 8 semanas de idade sendo o controle e no B) a *Arabidopsis* transgênica T2 após de 8 semanas de idade. Se fez a extração das proteínas destas plantas, seguindo o protocolo descrito por (Doyle and Doyle, 1987).

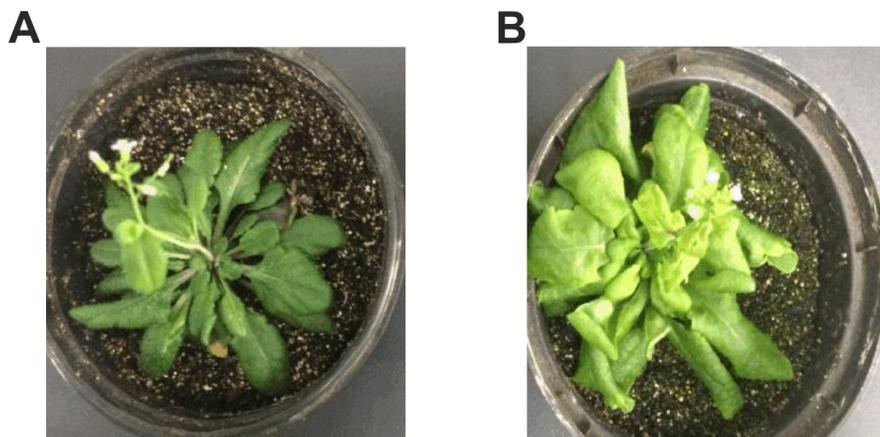


Figura 17. *Arabidopsis thaliana*.

A) planta *Arabidopsis thaliana* WT. B) Planta *Arabidopsis thaliana* (T2) transformada com a construção pMDC32+rMEPlox.

4.3. Extração das proteínas

Foram extraídas as proteínas totais das folhas de plantas transgênicas da construção pMDC32 contendo o gene rMEPlox da geração T2, e plantas não transgênicas, de acordo ao método de descrito no item 3.10. As proteínas foram quantificadas de acordo com a técnica de (Lowry et al., 1951). A expressão da proteína nas plantas transgênicas foi determinada com os ensaios SDS-page, seguido pelo imunoenensaio ELISA e confirmado com o *Western blotting* e como controle negativo usou-se os extratos das plantas não transgênicas como mostra os itens 4.4 e 4.5.

4.4. SDS-PAGE dos extratos de plantas transgênicas

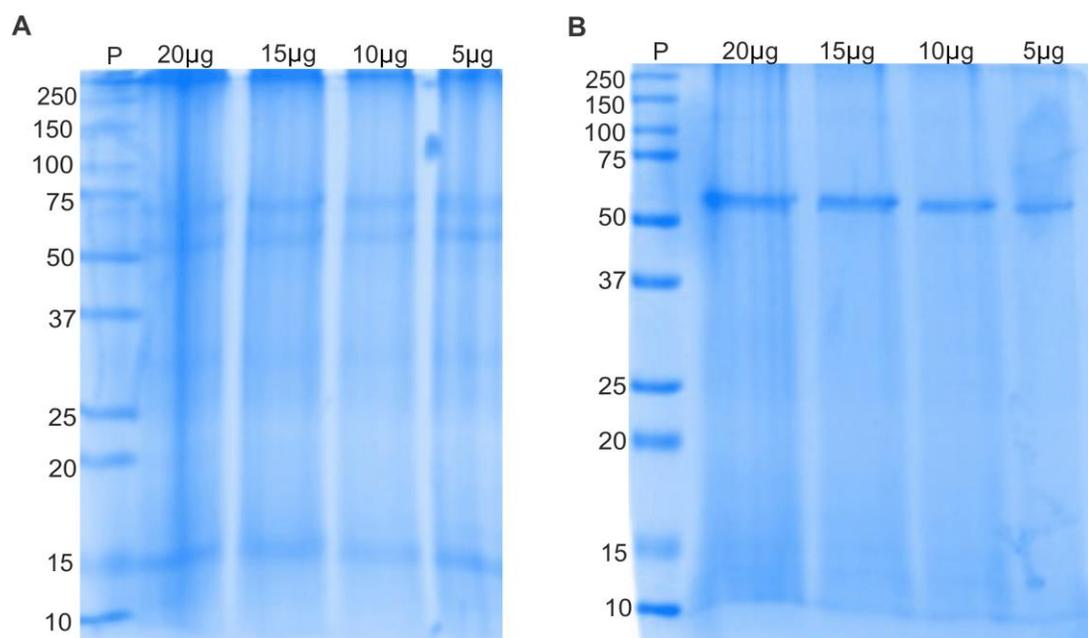


Figura 18. SDS-PAGE dos extratos proteicos das plantas transgênicas.

A) SDS-PAGE com redução. Na primeira canaleta o marcador molecular (P), nas canaletas 2-5 extrato da planta transgênica em concentrações diferentes. B) SDS-PAGE sem redução. Na primeira canaleta o marcador molecular (P), nas canaletas 2-5 extrato da planta transgênica em concentrações diferentes.

El perfil proteico de todos os extratos proteicos foram testados pelo método de eletroforeses SDS-page usando tampão da mostra com e sem redução (**Tabela 11**) e em diferentes concentrações da proteína (5 µg, 10 µg e 15 µg). A revelação do gel mostrou a presença de várias bandas proteicas, de diversas massas

moleculares, evidenciando que foi possível extrair proteínas das folhas de *Arabidopsis* (Figura 18).

4.5. ELISA

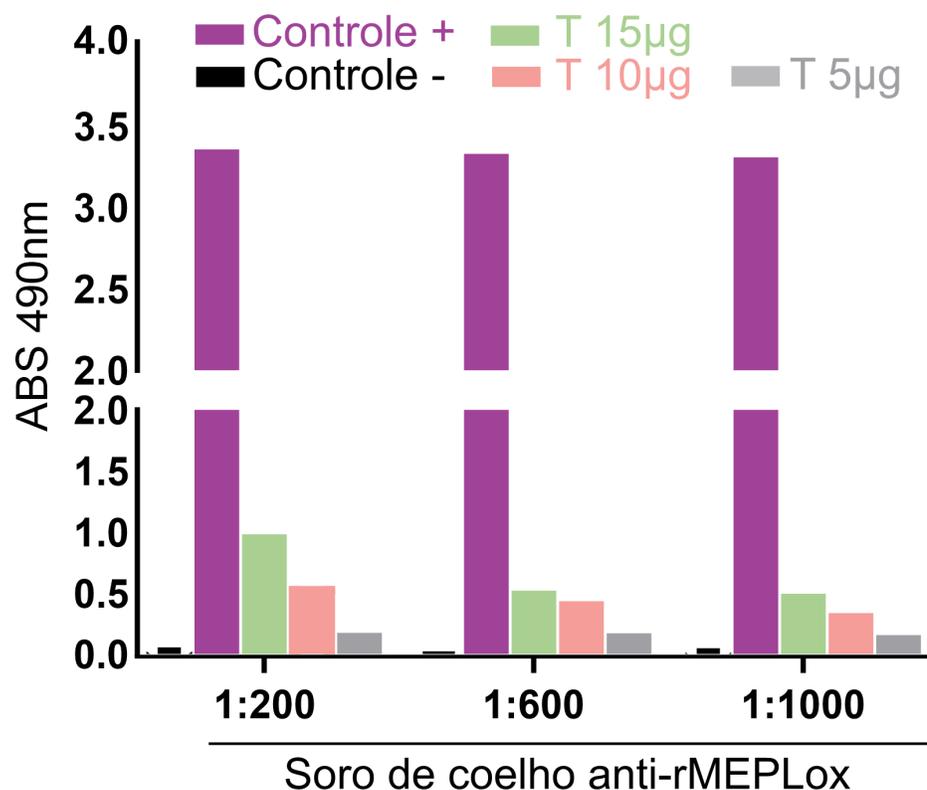


Figura 19. ELISA dos extratos proteicos das plantas transgênicas frente a soro anti-rMEPLox. A placa se sensibilizou com concentrações diferentes de extrato das plantas, tanto transgênica como WT e testada com soro anti-rMEPLox em diferentes diluições, a reação foi revelada com anticorpo anti-IgG de coelho 1/15000-Peroxidase e OPD *SigmaFast*. O ensaio se fez em triplicata e no y mostrasse a absorbância a 490nm.

Para saber se os extratos das plantas transgênicos são reativos ao soro anti-rMEPLox, se fez um ensaio de ELISA. Este mostrou que o soro de coelho anti-rMEPLox possui reatividade frente a todos os extratos (em concentrações

diferentes 5 μg , 10 μg e 15 μg), nas diluições de 1:200, 1:600 e 1:1000 respectivamente (**figura 19**).

4.6. Análises da antigenicidade dos extratos de plantas transgênicas por Western-Blotting.

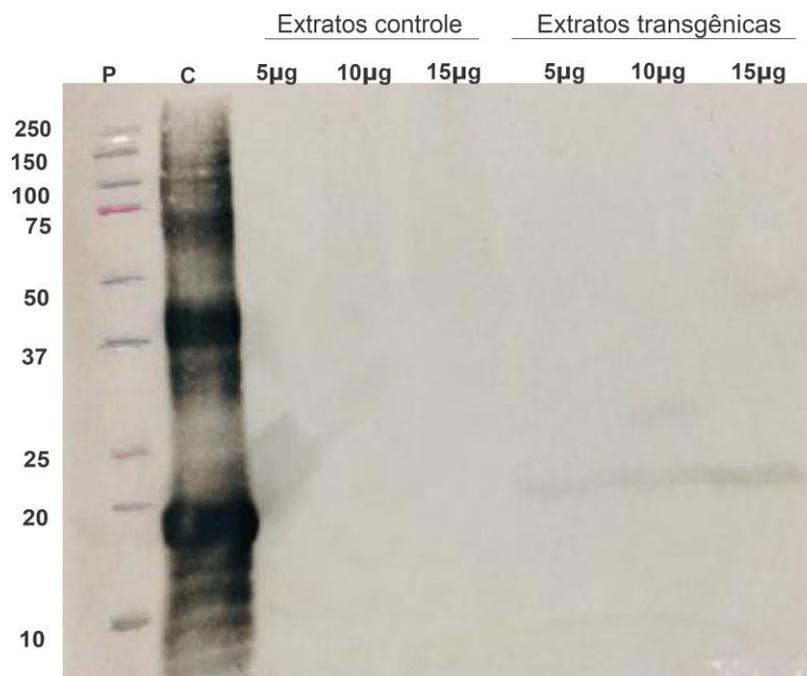


Figura 20. Western blotting dos extratos das plantas

A primeira canaleta contém o marcador molecular (P). Nas seguintes canaletas no seguinte ordem: canaleta 2 o controle positivo (rMEPLox), 3-5 extrato controle (WT) e 6-8 extrato transgênico, foram incubados com soro anti-rMEPLox (1/1000) e revelado com anticorpo anti-IgG de coelho 1/15000 – Peroxidase e DAB.

Na (**figura 20**) pode-se observar que os extratos transgênicos (em diferentes concentrações) reagiram ao soro anti-rMEPLox, mostrando a presença de uma banda aproximadamente nas 20 kDa (massa molecular da rMEPLox); e os extratos não transgênicos não reagiram ao soro anti-rMEPLox, como era o esperado.

5. DISCUSSÃO

Tendo em vista a melhoria da qualidade dos antivenenos e dos animais produtores, o uso tradicional de venenos inteiros como antígenos na produção e na avaliação pré-clínica dos antivenenos tende a ser progressivamente substituído pela utilização de toxinas purificadas, toxinas recombinantes e/ou dos seus epitopos previamente definidos. Na literatura existem muitos trabalhos com candidatos a vacinas expressos em plantas. Dentre eles podemos exemplificar: expressão de antígenos protetores em *Nicotiana tabacum* contra hepatite B, anthrax, parvovírus, e vírus da raiva (Aziz et al., 2002) (Ashraf et al., 2005; Aziz et al., 2002; Molina et al., 2005); em cenoura contra sarampo (Bouche et al., 2003); em soja contra hepatite B (Huang et al., 2008); em milho contra enterotoxinas causadas por *E. coli* (Streatfield and Howard, 2003); em batata contra o vírus de Newcastle (Berinstein et al., 2005); em alfafa contra a Fasciola hepática, rotavírus, vírus da febre aftosa, reovírus, e enterotoxinas de *E. coli* (Dong et al., 2005; Joensuu et al., 2010; Kapusta et al., 1999; Santos et al., 2005).

Como já foi descrito anteriormente proteínas recombinantes estão sendo utilizados, como antígenos na produção de novos antivenenos anti-loxooscélicos. Uma destas é a proteína rMEPLox, formada por nove epitopos tanto lineais como conformacionais. Os epitopos que constituem a proteína recombinante se encontram os epitopos da SMase D da *L. intermedia*, sendo um epitopo conformacional (NCNKNDHLFACW) e dos lineares (LGANSIETDVSFD DNANPEYTYHGIP e SKKYENFNDFLKGLR) (Mendes et al., 2013), contem

também um epitopo linear (DFSGPYLPSLPTLDA) da SMase-I da *L. laeta* (Ramada et al., 2013), da LALP-1 três epitopos lineares (SLGRGCTDFGTILHE, ENNTRTIGPFDYDSIMLYGAY e KLYKCPPVNPYPGGIRPYVNV), e dos epitopos lineares da *L. intermedia* (LiHYAL) (NGGIPQLGDLKAHLEKSAVDI e ILDKSATGLRIIDWEAWR). Foi demonstrado que rMEPLox é uma proteína não tóxica e gera anticorpos capazes de neutralizar os efeitos tóxicos do veneno total das loxosceles (Lima et al., 2018). Sem embargo sua produção em maior escala, na bactéria *E. coli*, é um tanto difícil pela baixa solubilidade que apresenta. Assim uma alternativa para a produção da rMEPLox é a sua expressão utilizando o sistema de planta. Para este trabalho, a planta alvo escolhida foi *Arabidopsis thaliana*, planta modelo dos estudos de genética e biologia molecular.

O uso de vetores foi necessário para à expressão da proteína na planta, neste estudo usou-se dos vetores, estes tinham que ser compatíveis, tanto o vector que dona (pCR8/GW/TOPO) como o acceptor (pMDC32), para lograr uma eficiente transformação do gene até as plantas (Smedley and Harwood, 2015). Os vetores usados neste estudo foram o pCR8/GW/TOPO, sendo um vector de recombinação e muito usado para o transporte do gene de interesse ao vector especificamente da planta que foi o pMDC32. A confirmação da presença do gene rMEPLox foi mediante a revelação da PCR onde observou-se, que os resultados obtidos foram exitosos, ambos vetores estavam amplificando o gene rMEPLox na posição esperada, aproximadamente nas 550 pb (**Figura 10, 13 e 14**). Estes resultados são similares ao Scotton et al. (2017) onde mostrou uma eficiente clonagem do gene *Bl-1* no vector pCR8/GW/TOPO. E Wu et al. (2010) fez uma

transformação eficiente do gene *AtFUT*_{4.1} no vector pMDC32, de duas *Arabidopsis* α (1,2) para a identificação de fucosiltransferasas em plantas de tabaco.

O método utilizado neste estudo para a obtenção de plantas transgênicas, se usou *Agrobacterium*, isto para a introdução do gene nas plantas WT, esta bactéria tem a capacidade de transferir o DNA entre diferentes reinos (Valderrama, 2005). Assim neste trabalho conseguimos transformar o gene rMEPLox em *Agrobacterium*; ao revelar a PCR observou-se que se encontram amplificando na posição esperada tanto *Agrobacterium* como o gene (**Figura 15**). Kámán-Tóth et al. (2018) Também mostraram uma eficiente transformação do plasmídeo pTRV2 in pCAM- BIA3301 mediante electroporação.

Para a expressão do gene de interesse nas plantas mediado por *A. tumefaciens* usou-se o método de imersão floral, (Narusaka et al., 2010). Esta técnica é usada para a transformação tanto de proteínas quimeras e fungos como foi demonstrado por Williamson et al. (1987) ao inserir *Botrytis cinérea* em morango. Uma característica das transformações por imersão floral nas plantas, mediadas por *Agrobacterium* é que são relativamente fáceis, rápidas e altamente eficientes (Chumakov and Moiseeva, 2012; Mersereau et al., 1990; Wu et al., 2014).

Após da extração das proteínas do material vegetal, os extratos foram sometidos a SDS-PAGE. As condições da eletroforese usada neste trabalho não permitiram observar a proteína rMEPLox expressa em *Arabidopsis*. Entretanto, o ensaio de ELISA que é mais sensível e usa anticorpos específicos, mostrou a presença da proteína nos extratos transgênicos e a reatividade estava ausente nos extratos não transgênicos. Obtivemos resultados similares ao de Trujillo et al.

(2020) onde mostrou a presença da proteína LTBenfero em plantas de tabaco, ao realizar a expressão mediada por *Agrobacterium*. Estes dados sugerem que o teste de ELISA (Chávez-Olórtegui et al., 1998), pode ser uma técnica sensível e rápida para a detecção de antígenos em extrato de plantas transgênicas .

Finalmente para confirmar a presença da da proteína rMEPLox e sugerir a massa molecular desta proteína nas plantas transgênicas foi realizado o teste de *western blotting* e anticorpos específicos anti-rMEPLox. O resultado obtido foi a verificação de uma banda proteica de aproximadamente 19 kDa, de massa molecular confirmando desta forma que as plantas transformadas com o gene rMEPLox estão expressando a proteína recombinante composta de epitopos. A massa molecular determinada estão de acordo com os dados obtidos com o trabalho feito por Lima et al. (2018)

Os resultados obtidos neste trabalho mostram que a proteína recombinante rMEPLox foi expressada eficientemente em *Arabidopsis thaliana*. Esta pode-se converter em uma boa candidata para ser usada como antígenos na produção de antivenenos terapêuticos.

6. CONCLUSÕES

- ✓ O gene rMEPLox foi amplificado tanto no vector de recombinação pCR8 como no segundo vector o pMDC32 (especifico para transformar em plantas) aproximadamente nas 550 pb como era o esperado.
- ✓ Na digestão do vector pMDC32 se confirmou que amplificou na posição esperada, perto das 550 pb.
- ✓ Já na amplificação de *Agrobacterium* + rMEPLox mostrou que o gene encontrasse aproximadamente nas 550 pb e *Agrobacterium* nas 1066 pb.
- ✓ Se tem os primeiros indícios que as folhas das plantas transgênicas estão produzindo a proteína rMEPLox;
- ✓ A proteína rMEPLox expressa nas folhas foi reconhecida pelos anticorpos do soro de coelho imunizados com rMEPLox produzidos em *E. coli*;
- ✓ A proteína rMEPLox das plantas transgênicas tem aproximadamente 19 kDa.

7. PERSPECTIVAS

- ✓ Purificar a proteína obtida dos extratos das plantas;

- ✓ Avaliar a capacidade imunogênica e antigênica da proteína extraída das plantas;

- ✓ Expressar a proteína quimera multiepitópica toxoscélica (rMEPLox) em plantas comestíveis (tomate, cenoura ou alface) para uso vacinal.

- ✓ Realizar ensaios de neutralização com o soro dos animais imunizados.

- ✓ Imunizar camundongos para a produção de anticorpos;

8. REFERÊNCIAS

- Adams, M.D., Celniker, S.E., Holt, R.A., Evans, C.A., Gocayne, J.D., Amanatides, P.G., Scherer, S.E., Li, P.W., Hoskins, R.A. and Galle, R.F. (2000) The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* **287**, 2185-2195.
- Alippi, A.M., López, A.C. and Balatti, P.A. (2011) Métodos para la detección de *Agrobacterium* a partir de muestras de material vegetal, suelo y agua.
- Alonso-Blanco, C. and Koornneef, M. (2000) Naturally occurring variation in *Arabidopsis*: an underexploited resource for plant genetics. *Trends in plant science* **5**, 22-29.
- Alvarenga, L.M., Martins, M.S., Moura, J.F., Kalapothakis, E., Oliveira, J.C., Mangili, O.C., Granier, C. and Chávez-Olórtegui, C. (2003) Production of monoclonal antibodies capable of neutralizing dermonecrotic activity of *Loxosceles intermedia* spider venom and their use in a specific immunometric assay. *Toxicon* **42**, 725-731.
- Alvarez-Buylla, E.R., Corvera-Poiré, A., Garay-Arroyo, A., García-Ponce, B., Jaimes-Miranda, F. and Pérez-Ruiz, R.V. 9. A MADS view of plant development and evolution. *Topics in Animal and Plant Development: From Cell Differentiation to Morphogenesis*, 181.
- Andrés, F. and Coupland, G. (2012) The genetic basis of flowering responses to seasonal cues. *Nature Reviews Genetics* **13**, 627-639.
- Ashraf, S., Singh, P., Yadav, D.K., Shahnawaz, M., Mishra, S., Sawant, S.V. and Tuli, R. (2005) High level expression of surface glycoprotein of rabies virus in tobacco leaves and its immunoprotective activity in mice. *Journal of biotechnology* **119**, 1-14.
- Aziz, M.A., Singh, S., Kumar, P.A. and Bhatnagar, R. (2002) Expression of protective antigen in transgenic plants: a step towards edible vaccine against anthrax. *Biochemical and biophysical research communications* **299**, 345-351.

- Bamogo, P.K.A., Brugidou, C., Sérémé, D., Tiendrébéogo, F., Djigma, F.W., Simpire, J. and Lacombe, S. (2019) Virus-based pharmaceutical production in plants: an opportunity to reduce health problems in Africa. *Virology Journal* **16**, 1-16.
- Barbaro, K., Eickstedt, V. and Mota, I. (1994) Antigenic cross-reactivity of venoms from medically important *Loxosceles* (Araneae) species in Brazil. *Toxicon* **32**, 113-120.
- Barbaro, K.C., Lira, M.S., Araújo, C.A., Pareja-Santos, A., Távora, B.C., Prezotto-Neto, J.P., Kimura, L.F., Lima, C., Lopes-Ferreira, M. and Santoro, M.L. (2010) Inflammatory mediators generated at the site of inoculation of *Loxosceles gaucho* spider venom. *Toxicon* **56**, 972-979.
- Berinstein, A., Vazquez-Rovere, C., Asurmendi, S., Gómez, E., Zanetti, F., Zabal, O., Tozzini, A., Grand, D.C., Taboga, O. and Calamante, G. (2005) Mucosal and systemic immunization elicited by Newcastle disease virus (NDV) transgenic plants as antigens. *Vaccine* **23**, 5583-5589.
- Bernstein, B. and Ehrlich, F. (1986) Brown recluse spider bites. *The Journal of emergency medicine* **4**, 457-462.
- Blokhina, E.A., Mardanova, E.S., Stepanova, L.A., Tsybalova, L.M. and Ravin, N.V. (2020) Plant-Produced Recombinant Influenza A Virus Candidate Vaccine Based on Flagellin Linked to Conservative Fragments of M2 Protein and Hemagglutinin. *Plants* **9**, 162.
- Bouche, F.B., Marquet-Blouin, E., Yanagi, Y., Steinmetz, A. and Muller, C.P. (2003) Neutralising immunogenicity of a polyepitope antigen expressed in a transgenic food plant: a novel antigen to protect against measles. *Vaccine* **21**, 2065-2072.
- Brazil, T.K., Pinto-Leite, C.M., Almeida-Silva, L.M., Lira-da-Silva, R.M. and Brescovit, A.D. (2009) Aranhas de importância médica do Estado da Bahia, Brasil. *Gazeta Médica da Bahia* **79**.
- Bytebier, B., Deboeck, F., De Greve, H., Van Montagu, M. and Hernalsteens, J.-P. (1987) T-DNA organization in tumor cultures and transgenic plants of the

- monocotyledon *Asparagus officinalis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **84**, 5345-5349.
- Catalog, W.S. (2019) World spider catalog version 20.5. .
- Chaim, O.M., Trevisan-Silva, D., Chaves-Moreira, D., Wille, A.C.M., Ferrer, V.P., Matsubara, F.H., Mangili, O.C., Silveira, R.B.d., Gremski, L.H. and Gremski, W. (2011) Brown spider (*Loxosceles genus*) venom toxins: tools for biological purposes. *Toxins* **3**, 309-344.
- Chakrabarty, P. (2010) Genotypes: a concept to help integrate molecular phylogenetics and taxonomy. *Zootaxa* **2632**, 67-68.
- Chang, H.-F., Wang, S.-L., Lee, D.-C., Hsiao, S.S.-Y., Hashimoto, Y. and Yeh, K.-C. (2020) Assessment of indium toxicity to the model plant *Arabidopsis*. *Journal of Hazardous Materials* **387**, 121983.
- Chaves-Moreira, D., Matsubara, F.H., Schemczssen-Graeff, Z., De Bona, E., Heidemann, V.R., Guerra-Duarte, C., Gremski, L.H., Chávez-Olórtegui, C., Senff-Ribeiro, A. and Chaim, O.M. (2019) Brown Spider (*Loxosceles*) Venom Toxins as Potential Biotools for the Development of Novel Therapeutics. *Toxins* **11**, 355.
- (Chávez-Olórtegui, C., Zanetti, V.C., Ferreira, A.P., Minozzo, J.C., Mangili, O.C. and Gubert, I.C. (1998) ELISA for the detection of venom antigens in experimental and clinical envenoming by *Loxosceles intermedia* spiders. *Toxicon* **36**, 563-569.
- Chen, M.J., Yuan, Z. and Huang, H. (2006) Delayed flowering, an *Arabidopsis* gene that acts in the autonomous flowering promotion pathway and is required for normal development. *Journal of Integrative Plant Biology* **48**, 27-34.
- Chumakov, M. and Moiseeva, E. (2012) Technologies of *Agrobacterium* plant transformation in planta. *Applied Biochemistry and Microbiology* **48**, 657-666.
- Consortium*, C.e.S. (1998) Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science* **282**, 2012-2018.

- Cordeiro, F.A., Amorim, F.G., Anjolette, F.A. and Arantes, E.C. (2015) Arachnids of medical importance in Brazil: main active compounds present in scorpion and spider venoms and tick saliva. *Journal of venomous animals and toxins including tropical diseases* **21**, 24.
- Costa, T.G., Costal-Oliveira, F., de Assis, T.C., Lima, S.A., Martins, C.A., Finco, A.B., Veiga, S.S., Soccol, V.T., Machado-de-Ávila, R.A. and Figueiredo, L.F. (2020) Engineered Antigen Containing Epitopes From *Loxosceles Spp.* Spider Toxins Induces a Monoclonal Antibody (Lox-mAb3) Against Astacin-Like Metalloproteases. *International journal of biological macromolecules*, S0141-8130 (0120) 33617-33615.
- Da Silva, P.H., Da Silveira, R.B., Appel, M.H., Mangili, O.C., Gremski, W. and Veiga, S.S. (2004) Brown spiders and loxoscelism. *Toxicon* **44**, 693-709.
- Davod, J., Fatemeh, D.N., Honari, H. and Hosseini, R. (2018) Constructing and transient expression of a gene cassette containing edible vaccine elements and shigellosis, anthrax and cholera recombinant antigens in tomato. *Molecular biology reports* **45**, 2237-2246.
- De, A.R., Salomón, O.D., Lloveras, S.C. and Orduna, T. (2002) Poisoning by spiders of *Loxosceles* genus. *Medicina* **62**, 83-94.
- De Moura, J., Felicori, L., Moreau, V., Guimarães, G., Dias-Lopes, C., Molina, L., Alvarenga, L., Fernandes, P., Frézard, F. and Ribeiro, R. (2011) Protection against the toxic effects of *Loxosceles intermedia* spider venom elicited by mimotope peptides. *Vaccine* **29**, 7992-8001.
- de Roodt, A.R., Salomón, O.D., Lloveras, S.C. and Orduna, T.A. (2002) Envenenamiento por arañas del género *Loxosceles*.
- Delatorre, C.A. and Silva, A.A.d. (2008) *Arabidopsis thaliana*: uma pequena planta um grande papel. *Revista de Ciências Agrárias* **31**, 58-67.
- Dellaporta, S.L., Wood, J. and Hicks, J.B. (1983) A plant DNA minipreparation: version II. *Plant molecular biology reporter* **1**, 19-21.
- Dobrica, M.-O., Lazar, C., Paruch, L., van Eerde, A., Clarke, J.L., Tucureanu, C., Caras, I., Ciulean, S., Onu, A. and Tofan, V. (2018) Oral administration of a

- chimeric hepatitis B Virus S/preS1 antigen produced in lettuce triggers infection neutralizing antibodies in mice. *Vaccine* **36**, 5789-5795.
- Dong, J.-L., Liang, B.-G., Jin, Y.-S., Zhang, W.-J. and Wang, T. (2005) Oral immunization with pBsVP6-transgenic alfalfa protects mice against rotavirus infection. *Virology* **339**, 153-163.
- Donini, M. and Marusic, C. (2019) Current state-of-the-art in plant-based antibody production systems. *Biotechnology letters* **41**, 335-346.
- Doyle, J.J. and Doyle, J.L. (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue.
- Feitosa, L., Gremski, W., Veiga, S.S., Elias, M.C.Q., Graner, E., Mangili, O.C. and Brentani, R.R. (1998) Detection and characterization of metalloproteinases with gelatinolytic, fibronectinolytic and fibrinogenolytic activities in brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. *Toxicon* **36**, 1039-1051.
- Felicori, L., Fernandes, P.B., Giusta, M.S., Duarte, C.G., Kalapothakis, E., Nguyen, C., Molina, F., Granier, C. and Chávez-Olórtegui, C. (2009) An in vivo protective response against toxic effects of the dermonecrotic protein from *Loxosceles intermedia* spider venom elicited by synthetic epitopes. *Vaccine* **27**, 4201-4208.
- Figueiredo, L.F., Dias-Lopes, C., Alvarenga, L.M., Mendes, T.M., Machado-de-Ávila, R.A., McCormack, J., Minozzo, J.C., Kalapothakis, E. and Chávez-Olórtegui, C. (2014) Innovative immunization protocols using chimeric recombinant protein for the production of polyspecific loxoscelic antivenom in horses. *Toxicon* **86**, 59-67.
- Fischer, M.L. and Vasconcellos-Neto, J. (2005a) Development and life tables of *Loxosceles intermedia* Mello-Leitao 1934 (Araneae, Sicariidae). *The Journal of Arachnology* **33**, 758-766.
- Fischer, M.L. and Vasconcellos-Neto, J. (2005b) Parameters affecting fecundity of *Loxosceles intermedia* Mello-Leitao 1934 (Araneae, Sicariidae). *The Journal of Arachnology* **33**, 670-680.

- Fischer, M.L., Vasconcellos-Neto, J. and dos Santos Neto, L.G. (2006) The prey and predators of *Loxosceles intermedia* mello-Leitao 1934 (Araneae, Sicariidae). *The Journal of Arachnology* **34**, 485-488.
- Forrester, L., Barrett, J. and Campbell, B. (1978) Red blood cell lysis induced by the venom of the brown recluse spider: the role of sphingomyelinase D. *Archives of biochemistry and biophysics* **187**, 355-365.
- Frank, R. (1992) Spot-synthesis: an easy technique for the positionally addressable, parallel chemical synthesis on a membrane support. *Tetrahedron* **48**, 9217-9232.
- Futrell, J.M. (1992) Loxoscelism. *The American journal of the medical sciences* **304**, 261-267.
- Galiano, M.E. (1967) Ciclo biológico e desarrollo de *Loxosceles laeta* (Nicolet, 1849). *Acta Zoologica Lilloana* **23**, 431-464.
- Gelvin, S.B. (1998) The introduction and expression of transgenes in plants. *Current Opinion in Biotechnology* **9**, 227-232.
- Geren, C.R., Chan, T.K., Howell, D.E. and Odell, G.V. (1976) Isolation and characterization of toxins from brown recluse spider venom (*Loxosceles reclusa*). *Archives of biochemistry and biophysics* **174**, 90-99.
- Gonçalves-de-Andrade, R.M. and Tambourgi, D.V. (2003) First record on *Loxosceles laeta* (Nicolet, 1849)(Araneae, Sicariidae) in the West Zone of Sao Paulo City, Sao Paulo, Brazil, and considerations regarding its geographic distribution. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **36**, 425-426.
- Grashof, D., Zdenek, C.N., Dobson, J.S., Youngman, N.J., Coimbra, F., Benard-Valle, M., Alagon, A. and Fry, B.G. (2020) A Web of Coagulotoxicity: Failure of Antivenom to Neutralize the Destructive (Non-Clotting) Fibrinogenolytic Activity of *Loxosceles* and *Sicarius* Spider Venoms. *Toxins* **12**, 91.
- Health Secretary, C., Parana, Brazil (2002) Acidentes Loxoscélicos. *Protocolo técnico e fluxo de atenção em Curitiba*.
- Hite, J.M. (1966) Biology of the brown recluse spider.

- Huang, Z., LePore, K., Elkin, G., Thanavala, Y. and Mason, H.S. (2008) High-yield rapid production of hepatitis B surface antigen in plant leaf by a viral expression system. *Plant Biotechnology Journal* **6**, 202-209.
- Hula, V. and Niedobová, J. (2020) The Mediterranean Recluse Spider *Loxosceles rufescens* (Dufour, 1820): a new invasive for Socotra Island (Yemen). *Rendiconti Lincei. Scienze Fisiche e Naturali*, 1-5.
- Isbister, G.K. and Fan, H.W. (2011) Spider bite. *The Lancet* **378**, 2039-2047.
- Isoardi, K.Z. and Isbister, G.K. (2020) Poisoning by venomous animals. *Medicine* **48**, 220-223.
- Jackson, H. and Parks, T.N. (1989) Spider toxins: recent applications in neurobiology. *Annual review of neuroscience* **12**, 405-414.
- Jang, J., Khanom, S., Moon, Y., Shin, S. and Lee, O.R. (2020) PgCYP76B93 docks on phenylurea herbicides and its expression enhances chlorotoluron tolerance in *Arabidopsis*. *Applied Biological Chemistry* **63**, 1-11.
- Jenner, R.A. and Undheim, E. (2017) *Venom: the secrets of nature's deadliest weapon*: Smithsonian Institution.
- Joensuu, J.J., Conley, A.J., Lienemann, M., Brandle, J.E., Linder, M.B. and Menassa, R. (2010) Hydrophobin fusions for high-level transient protein expression and purification in *Nicotiana benthamiana*. *Plant physiology* **152**, 622-633.
- Kalapothakis, E., Araujo, S.C., de Castro, C.S., Mendes, T.M., Gomez, M.V.c., Mangili, O.C., Gubert, I.C. and Chávez-Olórtegui, C. (2002) Molecular cloning, expression and immunological properties of LiD1, a protein from the dermonecrotic family of *Loxosceles intermedia* spider venom. *Toxicon* **40**, 1691-1699.
- Kámán-Tóth, E., Pogány, M., Dankó, T., Szatmári, Á. and Bozsó, Z. (2018) A simplified and efficient *Agrobacterium tumefaciens* electroporation method. *3 Biotech* **8**, 148.
- Kapusta, J., Modelska, A., Figlerowicz, M., Pniewski, T., Letellier, M., Lisowa, O., Yusibov, V., Koprowski, H., Plucienniczak, A. and Legocki, A. (1999) A

- plant-derived edible vaccine against hepatitis B virus. *The FASEB journal* **13**, 1796-1799.
- Kotnik, T. (2013) Lightning-triggered electroporation and electrofusion as possible contributors to natural horizontal gene transfer. *Physics of life reviews* **10**, 351-370.
- Labra, M., Vannini, C., Grassi, F., Bracale, M., Balsemin, M., Basso, B. and Sala, F. (2004) Genomic stability in *Arabidopsis thaliana* transgenic plants obtained by floral dip. *Theoretical and Applied Genetics* **109**, 1512-1518.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature* **227**, 680-685.
- Lagassé, H.D., Alexaki, A., Simhadri, V.L., Katagiri, N.H., Jankowski, W., Sauna, Z.E. and Kimchi-Sarfaty, C. (2017) Recent advances in (therapeutic protein) drug development. *F1000Research* **6**.
- Laustsen, A.H., Ainsworth, S., Lomonte, B., Kini, R.M. and Chávez-Olórtegui, C. (2020) Novel Immunotherapies Against Envenomings by Snakes and Other Venomous Animals. *Frontiers in Immunology* **11**, 1004.
- Lemos, J.d.C., Almeida, T.D.d., Fook, S.M.L., Paiva, A.d.A. and Simões, M.O.d.S. (2009) Epidemiologia dos acidentes ofídicos notificados pelo Centro de Assistência e Informação Toxicológica de Campina Grande (Ceatox-CG), Paraíba. *Revista Brasileira de Epidemiologia* **12**, 50-59.
- Lima, S.d.A., Guerra-Duarte, C., Costal-Oliveira, F., Mendes, T.M., Figueiredo, L.F., Oliveira, D., Machado de Avila, R.A., Ferrer, V.P., Trevisan-Silva, D. and Veiga, S.S. (2018) Recombinant protein containing B-cell epitopes of different *Loxosceles* spider toxins generates neutralizing antibodies in immunized rabbits. *Frontiers in Immunology* **9**, 653.
- Lopes, P.H., Bertani, R., Gonçalves-de-Andrade, R.M., Nagahama, R.H., van den Berg, C.W. and Tambourgi, D.V. (2013) Venom of the Brazilian spider *Sicarius ornatus* (Araneae, Sicariidae) contains active sphingomyelinase D: potential for toxicity after envenomation. *PLoS neglected tropical diseases* **7**.

- Lowrie, D. (1980) Starvation longevity of *Loxosceles laeta* (Nicolet)(Araneae). *Entomological News* **91**, 130-132.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of biological chemistry* **193**, 265-275.
- Lucas, S., Cardoso, J. and Moraes, A. (1983) Loxoscelismo: relato de um acidente humano atribuído a *Loxosceles amazonica* Gertsch, 1967 (Araneae, Scytodidae, Loxoscelinae). *Mem Inst Butantan* **84**, 47-48.
- Ma, J.K., Drake, P.M. and Christou, P. (2003) The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nature Reviews Genetics* **4**, 794-805.
- Macchiavello, A. (1937) *Loxosceles laeta*, causa del aracnoidismo cutáneo o mancha gangrenosa de Chile. *Rev Chil Hist Nat* **41**.
- Magalhães, G.S., Caporrino, M.C., Della-Casa, M.S., Kimura, L.F., Prezotto-Neto, J.P., Fukuda, D.A., Portes-Junior, J.A., Neves-Ferreira, A.G., Santoro, M.L. and Barbaro, K.C. (2013) Cloning, expression and characterization of a phospholipase D from *Loxosceles gaucho* venom gland. *Biochimie* **95**, 1773-1783.
- Marcussi, S., Arantes, E., Soares, A., Giglio, J. and Mazzi, M. (2011) Escorpiões: biologia, envenenamento e mecanismos de ação de suas toxinas. *Ribeirão Preto: Fundação de Pesquisas Científicas (FUNPEC)*.
- Martino, O., Mathet, H., Masini, R., Ibarra Grasso, A., Thompson, R., Gondell, C. and Bosch, J. (1979) Emponzoñamiento humano provocado por venenos de origen animal. Estudio epidemiológico, clínico y experimental. *Ministerio de Bienestar Social de la Nación. Secretaría de Salud, Buenos Aires*, 105-115.
- Martins, B.F., dos Santos Campos, A.P., Selegim, M.R., Ballani, T.d.S.L., Tavares, E.O. and de Oliveira, M.L.F. (2012) Accidents caused by snakes (*Bothrops spp.* And *Crotallus spp.*) In children: report of two cases. *Rev Rene* **13**.
- Masli, D.I.A., Kadir, A.P.G. and Yunus, A.M.M. (2009) Transformation of oil palm using *Agrobacterium tumefaciens*. *J Oil Palm Res* **21**, 643-652.

- Mattanovich, D., Rüker, F., da Camara Machado, A., Laimer, M., Regner, F., Steinkellner, H., Himmler, G. and Katinger, H. (1989) Efficient transformation of *Agrobacterium spp.* by electroporation. *Nucleic Acids Research* **17**, 6747-6747.
- Meinke, D.W., Cherry, J.M., Dean, C., Rounsley, S.D. and Koornneef, M. (1998) *Arabidopsis thaliana*: a model plant for genome analysis. *Science* **282**, 662-682.
- Mendes, T., Oliveira, D., Figueiredo, L., Machado-de-Avila, R., Duarte, C., Dias-Lopes, C., Guimarães, G., Felicori, L., Minozzo, J. and Chávez-Olortegui, C. (2013) Generation and characterization of a recombinant chimeric protein (rCpLi) consisting of B-cell epitopes of a dermonecrotic protein from *Loxosceles intermedia* spider venom. *Vaccine* **31**, 2749-2755.
- Mersereau, M., Pazour, G.J. and Das, A. (1990) Efficient transformation of *Agrobacterium tumefaciens* by electroporation. *Gene* **90**, 149-151.
- Molina, A., Veramendi, J. and Hervás-Stubbs, S. (2005) Induction of neutralizing antibodies by a tobacco chloroplast-derived vaccine based on a B cell epitope from canine parvovirus. *Virology* **342**, 266-275.
- Nandi, S., Kwong, A., Holtz, B., Erwin, R., Marcel, S. and McDonald, K. (2016) Techno-economic analysis of a transient plant-based platform for monoclonal antibody production. *mAbs* **8**.
- Narusaka, M., Shiraishi, T., Iwabuchi, M. and Narusaka, Y. (2010) The floral inoculating protocol: a simplified *Arabidopsis thaliana* transformation method modified from floral dipping. *Plant Biotechnology* **27**, 349-351.
- Nicholson, G.M., Graudins, A., Wilson, H.I., Little, M. and Broady, K.W. (2006) Arachnid toxinology in Australia: from clinical toxicology to potential applications. *Toxicon* **48**, 872-898.
- Oliveira, N.d.R., Sousa, A.C.d.R., Belmino, J.F.B., Furtado, S.d.S. and Leite, R.d.S. (2015) The epidemiology of envenomation via snakebite in the State of Piauí, Northeastern Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **48**, 99-104.

- Olvera, A., Ramos-Cerrillo, B., Estévez, J., Clement, H., De Roodt, A., Paniagua-Solís, J., Vazquez, H., Zavaleta, A., Arruz, M.S. and Stock, R.P. (2006) North and South American *Loxosceles* spiders: development of a polyvalent antivenom with recombinant sphingomyelinases D as antigens. *Toxicon* **48**, 64-74.
- Paixão-Cavalcante, D., Van den Berg, C.W., de Freitas Fernandes-Pedrosa, M., de Andrade, R.M.G. and Tambourgi, D.V. (2006) Role of matrix metalloproteinases in HaCaT keratinocytes apoptosis induced by *Loxosceles* venom sphingomyelinase D. *Journal of investigative dermatology* **126**, 61-68.
- Pauli, I., Minozzo, J.C., da Silva, P.H., Chaim, O.M. and Veiga, S.S. (2009) 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**, 660-671.
- Pauli, I., Puka, J., Gubert, I.C. and Minozzo, J.C. (2006) The efficacy of antivenom in loxoscelism treatment. *Toxicon* **48**, 123-137.
- Pedroso, A., Matioli, S.R., Murakami, M.T., Pidge-Queiroz, G. and Tambourgi, D.V. (2015) Adaptive evolution in the toxicity of a spider's venom enzymes. *BMC evolutionary biology* **15**, 290.
- Provar, N.J., Alonso, J., Assmann, S.M., Bergmann, D., Brady, S.M., Brkljacic, J., Browse, J., Chapple, C., Colot, V. and Cutler, S. (2016) 50 years of Arabidopsis research: highlights and future directions. *New Phytologist* **209**, 921-944.
- Pucca, M.B., Cerni, F.A., Janke, R., Bermúdez-Méndez, E., Ledsgaard, L., Barbosa, J.E. and Laustsen, A.H. (2019) History of envenoming therapy and current perspectives. *Frontiers in Immunology* **10**, 1598.
- Ramada, J.S., Becker-Finco, A., Minozzo, J.C., Felicori, L.F., de Avila, R.A.M., Molina, F., Nguyen, C., de Moura, J., Chávez-Olórtegui, C. and Alvarenga, L.M. (2013) Synthetic peptides for in vitro evaluation of the neutralizing potency of *Loxosceles* antivenoms. *Toxicon* **73**, 47-55.

- Redkiewicz, P., Sirko, A., Kamel, K.A. and Góra-Sochacka, A. (2014) Plant expression systems for production of hemagglutinin as a vaccine against influenza virus. *Acta Biochimica Polonica* **61**.
- Reynaud, S., Ciolek, J., Degueudre, M., Saez, N.J., Sequeira, A.F., Duhoo, Y., Brás, J.L., Meudal, H., Cabo Diez, M. and Fernández Pedrosa, V. (2020) A Venomics approach coupled to high-throughput toxin production strategies identifies the first venom-derived melanocortin receptor agonists. *Journal of medicinal chemistry*.
- Rinaldi, I.M., Forti, L.C. and Stropa, A.A. (1997) On the development of the brown spider *Loxosceles gaucho* Gertsch (Araneae, Sicariidae): the nympho-imaginal period. *Revista Brasileira de Zoologia* **14**, 697-706.
- Rosales-Mendoza, S., Angulo, C. and Meza, B. (2016) Food-grade organisms as vaccine biofactories and oral delivery vehicles. *Trends in biotechnology* **34**, 124-136.
- Rosas-Díaz, T., Cana-Quijada, P., Amorim-Silva, V., Botella, M.A., Lozano-Durán, R. and Bejarano, E.R. (2017) *Arabidopsis* NahG plants as a suitable and efficient system for transient expression using *Agrobacterium tumefaciens*. *Molecular plant* **10**, 353-356.
- Santos, M.J.D., Carrillo, C., Ardila, F., Ríos, R.D., Franzone, P., Piccone, M.E., Wigdorovitz, A. and Borca, M.V. (2005) Development of transgenic alfalfa plants containing the foot and mouth disease virus structural polyprotein gene P1 and its utilization as an experimental immunogen. *Vaccine* **23**, 1838-1843.
- Schenone, H., Saavedra, T., Rojas, A. and Villarroel, F. (1989) Loxoscelismo en Chile: Estudios epidemiológicos, clínicos y experimentales. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* **31**, 403-415.
- Scotti, N. and Rybicki, E.P. (2013) Virus-like particles produced in plants as potential vaccines. *Expert review of vaccines* **12**, 211-224.
- Scotton, D.C., Azevedo, M.D.S., Sestari, I., Da Silva, J.S., Souza, L.A., Peres, L.E.P., Leal Jr, G.A. and Figueira, A. (2017) Expression of the *Theobroma cacao* Bax-inhibitor-1 gene in tomato reduces infection by the

- hemibiotrophic pathogen *Moniliophthora perniciosa*. *Molecular plant pathology* **18**, 1101-1112.
- Senff-Ribeiro, A., da Silva, P.H., Chaim, O.M., Gremski, L.H., Paludo, K.S., da Silveira, R.B., Gremski, W., Mangili, O.C. and Veiga, S.S. (2008) Biotechnological applications of brown spider (*Loxosceles* genus) venom toxins. *Biotechnology advances* **26**, 210-218.
- Sezerino, U.M., Zannin, M., Coelho, L.K., Gonçalves, J., Jr., Grando, M., Mattosinho, S.G., Costa Cardoso, J.L., von Eickstedt, V.R., Siqueira França, F.O., Barbaro, K.C. and Fan, H.W. (1998) A clinical and epidemiological study of *Loxosceles* spider envenoming in Santa Catarina, Brazil. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **92**, 546-548.
- SINAN (2017) Sistema de Informação de Agravos de Notificação.
- SINAN (2019) Acidente por animais peçonhentos - notificações registradas no sistema de informação de agravos de notificação - BRASIL.
- Smedley, M.A. and Harwood, W.A. (2015) Gateway®-compatible plant transformation vectors. In: *Agrobacterium Protocols* pp. 3-16. Springer.
- Srikanth, A. and Schmid, M. (2011) Regulation of flowering time: all roads lead to Rome. *Cellular and molecular life sciences* **68**, 2013-2037.
- Stachel, S.E., Timmerman, B. and Zambryski, P. (1986) Generation of single-stranded T-DNA molecules during the initial stages of T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to plant cells. *Nature* **322**, 706-712.
- Streatfield, S.J. and Howard, J.A. (2003) Plant-based vaccines. *International journal for parasitology* **33**, 479-493.
- Swanson, D.L. and Vetter, R.S. (2006) Loxoscelism. *Clinics in Dermatology* **24**, 213-221.
- Takeyama, N., Kiyono, H. and Yuki, Y. (2015) Plant-based vaccines for animals and humans: recent advances in technology and clinical trials. *Therapeutic advances in vaccines* **3**, 139-154.
- Tambourgi, D., Magnoli, F., Von Eickstedt, V., Benedetti, Z., Petricevich, V. and Silva, W.D.d. (1995) Incorporation of a 35 kda purified protein from

- loxosceles venom transforms human erythrocytes into activators of autologous complement alternative pathway. *Resumos*.
- Tambourgi, D.V., Gonçalves-de-Andrade, R.M. and van den Berg, C.W. (2010) Loxoscelism: From basic research to the proposal of new therapies. *Toxicon* **56**, 1113-1119.
- Tambourgi, D.V., Morgan, B.P., de Andrade, R.M., Magnoli, F.C. and van den Berg, C.W. (2000) *Loxosceles intermedia* spider envenomation induces activation of an endogenous metalloproteinase, resulting in cleavage of glycoporphins from the erythrocyte surface and facilitating complement-mediated lysis. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology* **95**, 683-691.
- Temporini, C., Colombo, R., Calleri, E., Tengattini, S., Rinaldi, F. and Massolini, G. (2019) Chromatographic tools for plant-derived recombinant antibodies purification and characterization. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 112920.
- Theakston, R.D.G., Warrell, D. and Griffiths, E. (2003) Report of a WHO workshop on the standardization and control of antivenoms. *Toxicon* **41**, 541-557.
- Thomas, D.R., Penney, C.A., Majumder, A. and Walmsley, A.M. (2011) Evolution of plant-made pharmaceuticals. *International journal of molecular sciences* **12**, 3220-3236.
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **76**, 4350-4354.
- Trevisan-Silva, D., Gremski, L.H., Chaim, O.M., da Silveira, R.B., Meissner, G.O., Mangili, O.C., Barbaro, K.C., Gremski, W., Veiga, S.S. and Senff-Ribeiro, A. (2010) Astacin-like metalloproteases are a gene family of toxins present in the venom of different species of the brown spider (genus *Loxosceles*). *Biochimie* **92**, 21-32.

- Trujillo, E., Rosales-Mendoza, S. and Angulo, C. (2020) A multi-epitope plant-made chimeric protein (LTBentero) targeting common enteric pathogens is immunogenic in mice. *Plant Molecular Biology* **102**, 159-169.
- Valderrama, A.M. (2005) Transformación de plantas mediada por *Agrobacterium*: "Ingeniería genética natural aplicada". *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín* **58**, 2569-2585.
- van Meeteren, L.A., Frederiks, F., Giepmans, B.N., Pedrosa, M.F.F., Billington, S.J., Jost, B.H., Tambourgi, D.V. and Moolenaar, W.H. (2004) Spider and bacterial sphingomyelinases D target cellular lysophosphatidic acid receptors by hydrolyzing lysophosphatidylcholine. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 10833-10836.
- Veiga, S., Zanetti, V., Braz, A., Mangili, O. and Gremski, W. (2001) Extracellular matrix molecules as targets for brown spider venom toxins. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **34**, 843-850.
- Vetter, R.S. (2008) Spiders of the genus *Loxosceles* (Araneae, Sicariidae): a review of biological, medical and psychological aspects regarding envenomations. *The Journal of Arachnology* **36**, 150-163.
- Vetter, R.S. and Isbister, G.K. (2008) Medical aspects of spider bites. *Annu. Rev. Entomol.* **53**, 409-429.
- Wang, Y.-C., Yu, M., Shih, P.-Y., Wu, H.-Y. and Lai, E.-M. (2018) Stable pH Suppresses Defense Signaling and is the Key to Enhance *Agrobacterium*-Mediated Transient Expression in *Arabidopsis* Seedlings. *Scientific reports* **8**, 1-9.
- Wendell, R.P. (2003) Brown recluse spiders: a review to help guide physicians in nonendemic areas. *Southern medical journal* **96**, 486-491.
- White, J., Cardoso, J. and Fan, H.W. (2017) Clinical toxicology of spider bites. In: *Handbook of clinical toxicology of animal venoms and poisons* pp. 259-329. CRC Press.
- WHO (2009) Neglected tropical diseases: the 17 neglected tropical diseases.

- Williamson, B., McNicol, R. and DOLAN, A. (1987) The effect of inoculating flowers and developing fruits with *Botrytis cinerea* on post-harvest grey mould of red raspberry. *Annals of applied biology* **111**, 285-294.
- Wu, H.-Y., Liu, K.-H., Wang, Y.-C., Wu, J.-F., Chiu, W.-L., Chen, C.-Y., Wu, S.-H., Sheen, J. and Lai, E.-M. (2014) AGROBEST: an efficient *Agrobacterium*-mediated transient expression method for versatile gene function analyses in *Arabidopsis* seedlings. *Plant methods* **10**, 19.
- Wu, Y., Williams, M., Bernard, S., Driouch, A., Showalter, A.M. and Faik, A. (2010) Functional identification of two nonredundant *Arabidopsis* α (1, 2) fucosyltransferases specific to arabinogalactan proteins. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 13638-13645.
- Zhang, Y., Chen, M., Siemiatkowska, B., Toleco, M.R., Jing, Y., Strotmann, V., Zhang, J., Stahl, Y. and Fernie, A.R. (2020) A Highly-Efficient *Agrobacterium*-Mediated Method for Transient Gene Expression and Functional Studies in the Leaves of *Arabidopsis* and Various Other Plant Species. *Plant Communications*, 100028.

9. ANEXOS

9.1. Meios de cultura

Tabela 1. Meio Luria Bertani (LB) líquido

Reagente	Quantidade
NaCl	10 g
Triptona	10 g
Extrato de levedura	5g
Água destilada	q.s.p. 1000 mL

*Para meio sólido acrescentar 15g de Agar.

Tabela 2. Meio Caldo Super Optimal (SOC).

Reagente	Quantidade
NaCl	0.5 g
KCl	1.8g
MgSO ₄	4.8g
Triptona	20 g
Extrato de levedura	5g
Dextrose	3.63g
Água destilada	q.s.p. 1000 mL

Tabela 3. Meio Extrato de fermento de carne (YEB)

Reagente	Quantidade
Extrato de carne	5 g
Sacarose	5 g
MgSO ₄	240 g
Extrato de levedura	1 g
Dextrose	3.63g
Água MiliQ	q.s.p. 1000 mL

*Atingir o pH = 6.8

Tabela 4. Meio MGRL modificado

Macronutrientes		Micronutrientes	
Reagente	Quantidade	Reagente	Quantidade
Fosfato de sódio bibásico anidro	7.1 g	EDTA dihidratado	4.35 g
Cloreto de cálcio	58.8 g	cloreto de manganésio tetrahidratado	407.7 mg
Sulfeto de magnésio heptahidratado	74 g	cloreto de zinco	27.53 mg
EDTA sódio férrico trihidratado	732.7 mg	cloreto de cobre bihidratado	32.73 mg
Cloreto de potasio	74.551 g	ácido bórico	370,98 mg
		cloreto de cobalto hexahidratado	6.19 mg
		molibdato de sódio dihidratado	5 mg
Água MiliQ			q.s.p. 1000 mL
Nitrato de amônio			1mM
Ácido 2- (N-morfolino) etanossulfônico (MES)			1M

*Atingir o pH 5.8

9.2. Soluções para SDS-page e Western blotting

Tabela 5. Solução A

Reagente	Quantidade
Acrilamida	29.2 g
Bis-acrilamida	0.8 g
Água destilada	q.s.p. 100 mL

Tabela 6. Solução B – Tris HCl pH 8.8

Reagente	Quantidade
Tris	18.15 g
Água destilada	q.s.p. 100 mL

Tabela 7. Solução C – Tris HCl pH 6.8

Reagente	Quantidade
Tris	6 g
Agua destilada	q.s.p. 100 mL

Tabela 8. Solução SDS 10%

Reagente	Quantidade
Dodecil sulfato de sódio	10.0 g
Agua destilada	q.s.p. 100 mL

Tabela 9. Tampão de Corrida 5x – pH 8.3

Reagente	Quantidade
Tris	4.5 g
Glicina	21.6 g
Dodecil sulfato de sódio	1.5 g
Agua destilada	q.s.p. 300 mL

Tabela 10. Comassie Blue

Reagente	Quantidade
Comassie Blue R 250	25%
Metanol	50%
Ácido acético	10%

Tabela 11. Tampão de amostra com redução 2x

Reagente	Quantidade
Solução C	1 mL
Glicerol P.A	0.8 mL
SDS 10%	1.4 mL
B-mercaptoetanol	0.4 mL
Azul de bromofenol 0.2%	0.4 mL

Tabela 12. Solução descorante

Reagente	Quantidade
Metanol	50%
Ácido acético	10%

Tabela 13. Tampão de transferência

Reagente	Quantidade
Tris	3.03 g
Glicina	14.42 g
Metanol	200 mL
Água destilada	q.s.p. 1000 mL

Tabela 14. Solução de revelação

Reagente	Quantidade
Solução A	10 mg de diaminobenzidina (DAB) em 2 mL de PBS gelado (4 °C) e 8 mL de PBS uso
Solução B	5 mg de cloronaftol em 1.66 mL de metanol e 8.32 mL de PBS uso
Misturar à solução A na B e adicionar 8.32 µL de peróxido de hidrógeno 30%	

9.3. Soluções para ELISA

Tabela 15. PBS 10x

Reagente	Quantidade	Quantidade de água destilada
Sol. A. Fosfato de Sódio monobásico	12 g	200 mL
Sol. B. Fosfato de sódio dibásico	35.49 g	500 mL
Adicionar a Solução A na B e ajustar o pH para 7.4. Medir o volumen final e adicionar 9 g de NaCl por cada 100 mL		

Tabela 16. PBS 10x

Reagente	Quantidade	Quantidade de agua destilada
Sol. A. Carbonato de Sódio	2.65 g	500 mL
Sol. B. Bicarbonato de sódio	4.2 g	1000 mL
Adicionar a Solução A na B e ajustar o pH para 9.6.		

Tabela 17. Tampão de bloqueio

Reagente	Quantidade
Leite em pó desnatado	1.5 g
PBS uso	q.s.p. 50 mL

Tabela 18. Tampão de incubação

Reagente	Quantidade
Tampão de bloqueio	5 mL
PBS-Tween 20	45 mL