

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

Rafael Jose Luis Saavedra Langer

Otimização de um sistema procarioto para a expressão da rMEPLox: um antígeno não tóxico promissor para a produção de antiveneno loxoscélico

Belo Horizonte
2021

Rafael Jose Luis Saavedra Langer

Otimização de um sistema procarioto para a expressão da rMEPLox: um antígeno não tóxico promissor para a produção de antiveneno loxoscélico

Dissertação submetida ao Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia.

Orientador: Dr. Carlos Delfín Chávez Olórtegui

Belo Horizonte
2021

043 Langer, Rafael Jose Luis Saavedra.

Otimização de um sistema procarioto para a expressão da rM EPLox: um antígeno não tóxico promissor para a produção de antiveneno loxoscélico [manuscrito] Rafael Jose Luis Saavedra Langer. – 2021. 58 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Dr. Carlos Delfín Chávez Olórtegui.

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

1. Bioquímica e imunologia. 2. Venenos de Aranha. 3. Proteínas Recombinantes. I. Olórtegui, Carlos Delfín Chávez. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 577.1



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



ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE RAFAEL JOSE LUIS SAAVEDRA LANGER. Aos vinte e sete dias do mês de agosto de 2021 às 14:00 horas, reuniu-se de forma “on line” utilizando a plataforma “Conferencia Web, 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 "Otimização de um sistema procarioto para a expressão da rMEPLox: um antígeno não tóxico promissor para a produção de antiveneno loxoscelico", 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 Chávez Olórtogui, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dra. Luiza Helena Gremski (Universidade Federal do Paraná), aprovado; Dr. Ronaldo Alves Pinto Nagem (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dr. Carlos Delfin Chávez Olórtogui - Orientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado. Pelas indicações o candidato foi considerado:

APROVADO

REPROVADO

O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato 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, 27 de agosto de 2021.

Dra. Luiza Helena Gremski (Universidade Federal do Paraná)

Dr. Ronaldo Alves Pinto Nagem (UFMG)

Dr. Carlos Delfin Chávez Olórtogui - Orientador (UFMG)

Agradecimentos

Ao Professor Dr. Carlos Chávez, pela oportunidade de continuar minha carreira científica, pela confiança depositada em mim e pela orientação durante todo o processo.

À doutoranda Tamara Fernandes por todo incentivo, auxílio e disponibilidade nos experimentos.

À Dra. Clara Guerra, pelos conselhos, paciência e grande disponibilidade.

À Dra. Sabrina Lima por todos os ensinamentos e disposição para esclarecimento de dúvidas.

A todos os colegas do Laboratório de Imunoquímica de Proteínas, pelo convívio, companheirismo e amizade.

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

Às amigas das disciplinas do curso de Bioquímica e Imunologia, Francisco, Sara, Thiago e Felipe, pelo apoio, conversas e risadas.

À minha amiga Amanda, por toda compreensão, ajuda e apoio em todos os momentos.

As minhas amigas Priscilla, Raissa e Thamyres, pela amizade e bons momentos vividos no dia a dia no laboratório.

A meus amigos, Juan Carlos, Manuel, Alberto e Grecia pelo apoio, conversas e bons momentos.

Aos meus pais, Rafael e Alicia e minha irmã Alicia, pelo amor incondicional, compreensão e apoio em todos os momentos.

E a todos que de alguma forma estiveram envolvidos e colaboraram com este trabalho.

“A ciência não só é compatível com a espiritualidade, mas também é uma fonte de espiritualidade profunda”.

Carl Sagan

Resumo

O loxoscelismo é a forma mais perigosa de araneísmo no Brasil e o uso de antiveneno é o tratamento recomendado. O antiveneno é produzido através da imunização de cavalos com o veneno de aranhas do gênero *Loxosceles*, o qual é tóxico para estes animais. Além disso, devido à grande quantidade de veneno necessária para a hiperimunização de cavalos, novas estratégias para a obtenção de antígenos têm sido propostas. Nesse sentido, nosso grupo de pesquisa produziu, previamente, uma proteína multiepitópica recombinante (rMEPLox) não tóxica derivada de toxinas de *Loxosceles*. rMEPLox apresentou ser um imunógeno de sucesso, sendo capaz de induzir a produção de anticorpos neutralizantes, os quais poderiam ser utilizados no tratamento do loxoscelismo. No entanto, o procedimento para obtenção de rMEPLox requer otimização para sua produção em escala compatível à fabricação industrial de antiveneno. Por tanto, o desenvolvimento de um protocolo eficiente para a produção de rMEPLox seria vantajoso. Para atingir este objetivo, avaliamos a influência de diferentes condições de cultura para a expressão ideal de rMEPLox, as quais foram definidas como o uso de *C43(DE3)pLysS* como cepa hospedeira, meio 2xTY, 0,6 mM IPTG, biomassa de $OD_{600nm} = 0,4$ e incubação a 30 °C por 16 h. Seguindo o protocolo otimizado, 39,84 mg/L de rMEPLox solúvel foi obtido e testado como um imunógeno. Os resultados mostram que a rMEPLox obtida preservou a imunogenicidade previamente observada e foi capaz de gerar anticorpos que reconhecem diferentes epítomos das principais toxinas do veneno de *Loxosceles*, o que a torna uma candidata promissora para a produção de antiveneno para o tratamento do loxoscelismo.

Palavras-chave: Otimização de expressão; Veneno de aranha *Loxosceles*; Proteína recombinante.

Abstract

Loxoscelism is the most dangerous araneism form in Brazil and antivenom therapy is the recommended treatment. Antivenom is produced by horse immunization with *Loxosceles* spider venom, which is toxic for the producer animal. Moreover, due to the high amount of venom required for horse hyperimmunization, new strategies for antigens obtention have been proposed. In this sense, our research group has previously produced a non-toxic recombinant multiepitopic protein (rMEPLox) derived from *Loxosceles* toxins. rMEPLox was a successful immunogen, being able to induce the production of neutralizing antibodies, which could be used in the Loxoscelism treatment. However, rMEPLox obtention procedure requires optimization, as its production needs to be scaled up to suit antivenom manufacture. Therefore, an effective protocol development for rMEPLox production would be advantageous. To achieve this objective, we evaluated the influence of different cultivation conditions for rMEPLox optimum expression which were defined as the use of *C43(DE3)pLysS* as a host strain, 2xTY medium, 0.6 mM IPTG, biomass pre induction of OD_{600nm} = 0.4 and incubation at 30 °C for 16 h. Following the optimized protocol, 39.84 mg/L of soluble rMEPLox was obtained and tested as immunogen. The results show that the obtained rMEPLox preserved the previously described immunogenicity, and it was able to generate antibodies that recognize different epitopes of the main *Loxosceles* venom toxins, which makes it a promising candidate for the antivenom production for loxoscelism treatment.

Keywords: Expression optimization; *Loxosceles* spider venom; Recombinant protein.

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1. Características das aranhas <i>Loxosceles</i>	13
Fig. 2. Vista anterior da <i>Loxosceles reclusa</i>	14
Fig. 3. Loxoscelismo no Brasil	14
Fig. 4. Principais evoluções históricas no conhecimento do veneno de aranha marrom	15
Fig. 5. Proporção dos transcritos das toxinas do veneno de <i>Loxosceles intermedia</i>	17
Fig. 6. Loxoscelismo cutâneo	18
Fig. 7. Loxoscelismo sistêmico	20
Fig. 8. Proteína recombinante multiepitópica loxoscélica (rMEPLox)	25
Fig. 9. Otimização do protocolo de expressão bacteriana da rMEPLox	36
Fig. 10. Análise de SDS-PAGE 15% da rMEPLox em frações solúveis e insolúveis de três cepas hospedeiras diferentes	37
Fig. 11. Purificação da rMEPLox analisada por SDS-PAGE 15%	39
Fig. 12. Atividades enzimáticas da rMEPLox	40
Fig. 13. Western blot do Extrato bruto e rMEPLox purificada reconhecidos por Lox-mAb3	41
Fig. 14. Reatividade entre soros de camundongos e rMEPLox	42
Fig. 15. Mapeamento de epítomos reconhecidos pelo soro hiperimune anti-rMEPLox utilizando técnica de SPOT	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação do Loxoscelismo	20
Tabela 2. Dispositivo mnemônico para o diagnóstico de loxoscelimso	21
Tabela 3. Resumo das variáveis de otimização testadas na expressão da proteína rMEPLox	38
Tabela 4. Resumo do procedimento de purificação da rMEPLox	39
Tabela 5. Sequências peptídicas da rMEPLox sintetizadas em uma membrana de celulose	43
Tabela 6. Experimentos de proteção <i>in vivo</i>	45

SUMARIO

1. Introdução	13
1.1. <i>Loxosceles spp.</i>	13
1.2. Veneno Loxóscelico	15
1.3. Loxoscelismo	17
1.3.1. Loxoscelismo cutâneo	18
1.3.2. Loxoscelismo sistêmico	19
1.4. Diagnóstico	20
1.5. Tratamento	22
1.6. Soroterapia	23
1.7. Proteínas recombinantes	24
1.8. Sistemas de expressão de proteínas	25
2. Objetivos	27
2.1. Geral	27
2.2. Específicos	27
3. Metodologia	27
3.1. Produção de proteína Quimérica	27
3.2. Otimização da expressão da rMEPLox	28
3.2.1. Cepas Bacterianas e Meios de cultura	28
3.2.2. Transformação	28
3.2.3. Expressão de rMEPLox em diferentes cepas de <i>E. coli</i>	28
3.2.4. Otimização do meio de cultura	29
3.2.5. Otimização do meio de cultura	29
3.2.6. Otimização da biomassa pré indução	29
3.2.7. Otimização do tempo de incubação pósindução	29
3.2.8. Otimização da temperatura de indução	30
3.3. Extração da rMEPLox	30
3.4. ELISA indireto para a quantificação de rMEPLox	30
3.5. Purificação da rMEPLox	31
3.6. Quantificação da Proteína purificada	31
3.7. Atividade Enzimática	32
3.7.1. Atividade Metaloproteásica	32
3.7.2. Atividade Hialuronidásica	32

3.8. Antigenicidade	32
3.9. Animais	33
3.10. Protocolo de imunização	33
3.11. Imunoensaio de SPOT	34
3.12. Ensaio de neutralização <i>in vivo</i>	34
4. Resultados	35
4.1. Otimização da expressão da rMEPLox	35
4.2. Purificação da rMEPLox	38
4.3. Atividades enzimáticas	38
4.4. Imunoensaios	40
4.5. Epítopos reconhecidos por anticorpos anti-rMEPLox	42
4.6. Neutralização da atividade letal	44
5. Discussão	45
6. Conclusões	49
7. Referências	49

1. Introdução

1.1. *Loxosceles* spp.

As aranhas do gênero *Loxosceles* são comumente conhecidas como “aranhas violino”, devido à proeminente marca em forma de violino encontrada em seu cefalotórax (Appel *et al.* 2005; Futrell 1992) (**Fig. 1a**). O nome *Loxosceles* significa pernas inclinadas, devido à maneira como a aranha mantém as pernas em repouso, sendo pronunciada de forma semelhante a isósceles, o triângulo de pernas iguais (**Fig. 1b**) (Vetter 2008).



Fig. 1. Características das aranhas *Loxosceles* a) Aranha violino, *Loxosceles reclusa*. b) *Loxosceles laeta* macho mostrando a posição da perna inclinada em repouso (Vetter 2008).

O comprimento do corpo dessas aranhas varia de 8 a 15 mm e as pernas podem medir de 8 a 30 mm (Da Silva *et al.* 2004). As aranhas *Loxosceles* apresentam expectativa de vida de 3 a 7 anos (Tambourgi, Gonçalves-de-Andrade, and van den Berg 2010). Possuem seis olhos dispostos em pares, com um par frontal e um par lateral de cada lado, sendo esta característica a melhor forma de identificar essas aranhas (**Fig. 2**) (Vetter and Visscher 1998). Várias espécies desse gênero são sinatrópicas, apresentando grande capacidade de colonização de áreas urbanas (Oliveira-Mendes *et al.* 2020). Dentro dos habitats humanos, são frequentemente encontradas atrás de móveis, sótãos e armários, tendo preferência por áreas escuras e secas (Swanson and Vetter 2006).



Fig. 2. Vista anterior da *Loxosceles reclusa*. Pode-se observar o padrão de 6 olhos dispostos em pares (Swanson and Vetter 2006).

Esse gênero possui distribuição global, sendo mais abundante nas Américas (Espino-Solis *et al.* 2009). No Brasil, 19 espécies foram reportadas, no entanto, *L. laeta*, *Loxosceles gaucho* e *Loxosceles intermedia*, representam um importante problema de saúde pública no Brasil, onde são o causante de cerca de 10.000 casos notificados a cada ano (**Fig. 3**) (Brasil 2021).

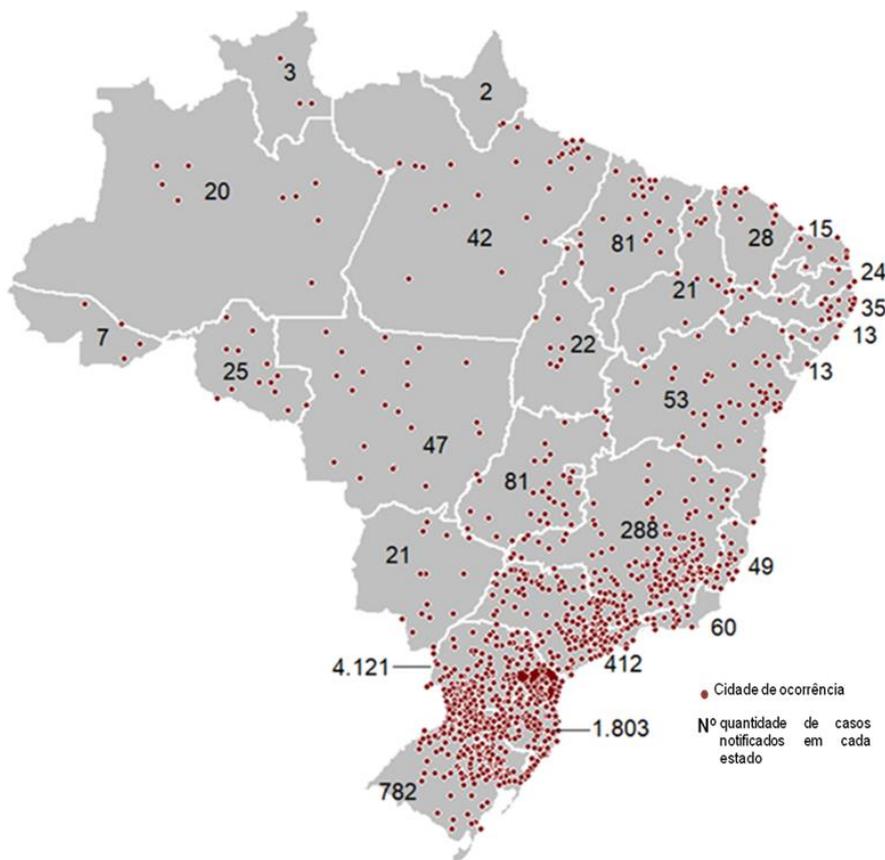


Fig. 3. Loxoscelismo no Brasil. Distribuição espacial das notificações de acidentes causados por aranhas do gênero *Loxosceles* no Brasil (SINAM, 2021).

1.2. Veneno Loxoscélico

O veneno da aranha marrom é estudado há mais de 60 anos (**Fig. 4**) (Chaves-Moreira *et al.* 2017). As análises proteômica e transcriptômica possibilitaram determinar que esse veneno é composto principalmente por peptídeos, proteínas e glicoproteínas de baixa massa molecular na faixa de 5-40 kDa que interagem com alvos celulares e moleculares provocando efeitos graves (Chaves-Moreira *et al.* 2019; Gremski *et al.* 2014). Entre as moléculas altamente expressas (95% dos transcritos do veneno) estão compostos pertencentes à família da fosfolipases D, metaloproteases do tipo astacina (LALP) e peptídeos de baixa massa molecular (**Fig. 5**) (Gremski *et al.* 2014).

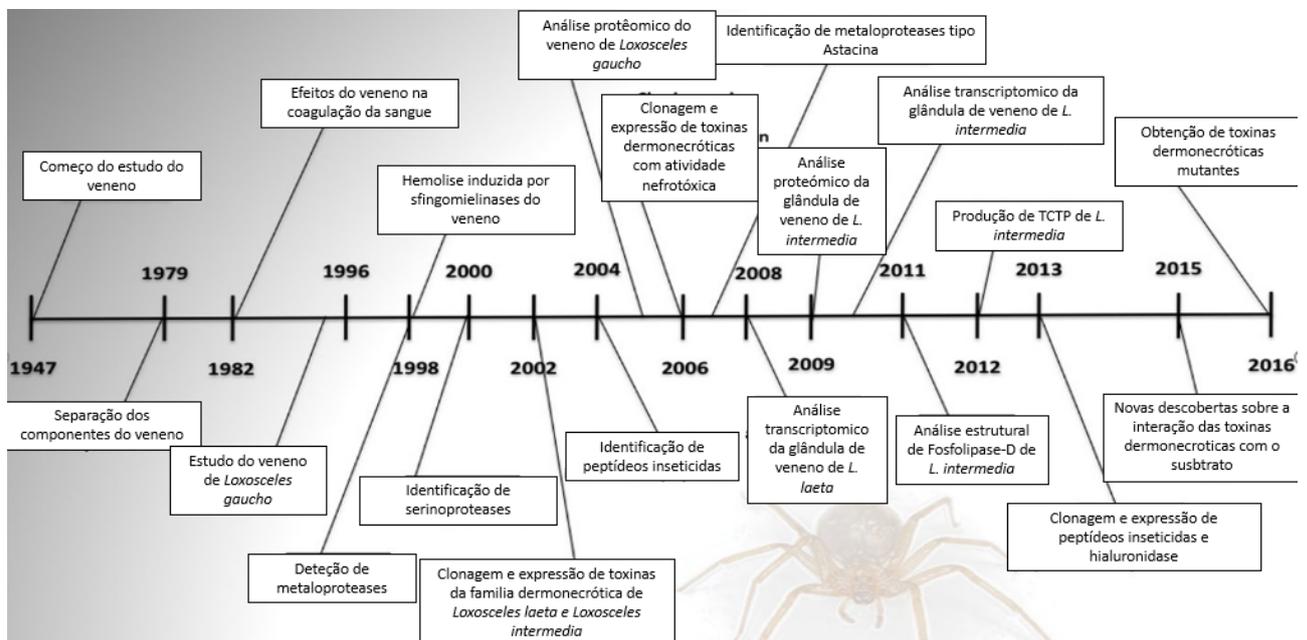


Fig 4. Principais evoluções históricas no conhecimento do veneno da aranha marrom, modificado (Chaves-Moreira *et al.* 2017).

Dentro das toxinas de importância clínica destacam-se as Fosfolipases D, Metaloproteases e Hialuronidases.:

As Fosfolipases D são proteínas com massa molecular entre 30 e 35 kDa e incluem um peptídeo sinal seguido por um propeptídeo e compreendem 20,2% de todas as toxinas codificadas por ESTs (marcador de sequência expressa), sendo uma proporção significativa das toxinas totais do veneno de *Loxosceles spp.* (Gremski *et al.* 2010). Estas moléculas catalisam a hidrólise de fosfolipídios, como a esfingomielina para liberar colina e produzir ceramida-fosfato (Chaim *et al.* 2011; Wille *et al.* 2013). No início, pensava-se que essas toxinas eram capazes de clivar exclusivamente os grupos fosfato da esfingomielina, por isso são comumente conhecidas como

esfingomielinases (Smase D), mas estudos posteriores descreveram outros substratos, como lisofosfolipídeos (Chaves-Moreira *et al.* 2011; Gremski *et al.* 2014; Wille *et al.* 2013).

Estas moléculas desempenham um papel importante no desenvolvimento de sinais e sintomas clínicos do loxoscelismo. Devido a sua capacidade de desencadear dermonecrose *in vivo*, as fosfolipases D da aranha marrom também são conhecidas como toxinas dermonecróticas (Appel *et al.* 2005; Da Silva *et al.* 2004; Swanson and Vetter 2006). Além disso, em experimentos controlados, descobriu-se que essa toxina aumenta a permeabilidade vascular e gera intensa resposta inflamatória, tanto no local da inoculação quanto no nível sistêmico, agregação plaquetária, hemólise, nefrotoxicidade e até mesmo morte (Appel *et al.* 2005; Senff-Ribeiro *et al.* 2008; Swanson and Vetter 2006; Tambourgi, Gonçalves-de-Andrade, and van den Berg 2010).

Também encontra-se as Metaloproteases tipo astacina, as quais são toxinas altamente expressas em venenos de *Loxosceles spp.* (Gremski *et al.* 2010). No veneno de *L. intermedia*, eles representam 9,8% dos transcritos da toxina, representando a segunda toxina mais expressa (Gremski *et al.* 2010). As astacinas são metaloproteases dependentes de zinco pertencentes à superfamília das metazincinas (Sterchi, Stöcker, and Bond 2009). Estas proteases são caracterizadas pelo motivo de ligação de zinco (HEXXHXXGXXH), em que as três histidinas estão envolvidas nessa ligação, a qual é necessária para a atividade catalítica, e um resíduo de metionina conservado abaixo do sítio ativo do metal dentro de uma volta Met (SXXMY), com um resíduo de tirosina que pode estar envolvido na fixação do substrato (Gomis-Rüth 2003; Sterchi, Stöcker, and Bond 2009).

As astacinas são encontradas em vários organismos, desde bactérias a mamíferos, com diferentes funções, como digestão, processamento de matriz extracelular, diferenciação de tecidos, ativação de fator de crescimento e degradação geral de proteínas (Sterchi, Stöcker, and Bond 2009). No veneno de *Loxosceles spp.*, esta toxina é chamada de LALP (protease tipo astacina de *Loxosceles*), que é dividida em Loxolisina A, uma protease de 20-28 kDa que degrada as cadeias Aa e Bb de fibronectina e fibrinogênio, e Loxolisina B, protease de 30-32 kDa com atividade gelatinolítica (Feitosa *et al.* 1998), sugerindo sua participação no sangramento, retardo na cicatrização de feridas, disseminação do veneno pelo compartimento intercelular e permeabilidade vascular (Nowatzki *et al.* 2012; Da Silveira *et al.* 2007).

Outro grupo de toxinas, as hialuronidasas, com massa molecular de 44 kDa, fazem parte das toxinas de baixa expressão no veneno de *Loxosceles spp.*, representando 0,13% do transcriptoma total (Gremski *et al.* 2010). Esta toxina decompõe o ácido hialurônico e, até certo ponto, a condroitina, o sulfato de condroitina e o sulfato de dermatana. O ácido hialurônico é um componente ubíquo da matriz extracelular dos vertebrados, onde preenche o espaço entre as células e atua como lubrificante e barreira à penetração de partículas estranhas (Marković-Housley *et al.* 2000).

Este tipo de enzima é encontrado em venenos de animais (Kemparaju and Girish 2006; Magalhães, da Silva, and Ulhoa 2008), sendo conhecidas como "fatores de disseminação do veneno" devido à sua capacidade de degradar componentes da matriz extracelular e aumentar a difusão de outras toxinas do local de inoculação (Kemparaju and Girish 2006). Edema, eritema e necrose são comuns no envenenamento por *Loxosceles*, indicando anormalidades na matriz extracelular. Embora a hialuronidase não seja responsável por gerar necrose, é um fator importante na disseminação do veneno, contribuindo para a disseminação e agravamento dos sintomas clínicos (V. P. Ferrer *et al.* 2013).

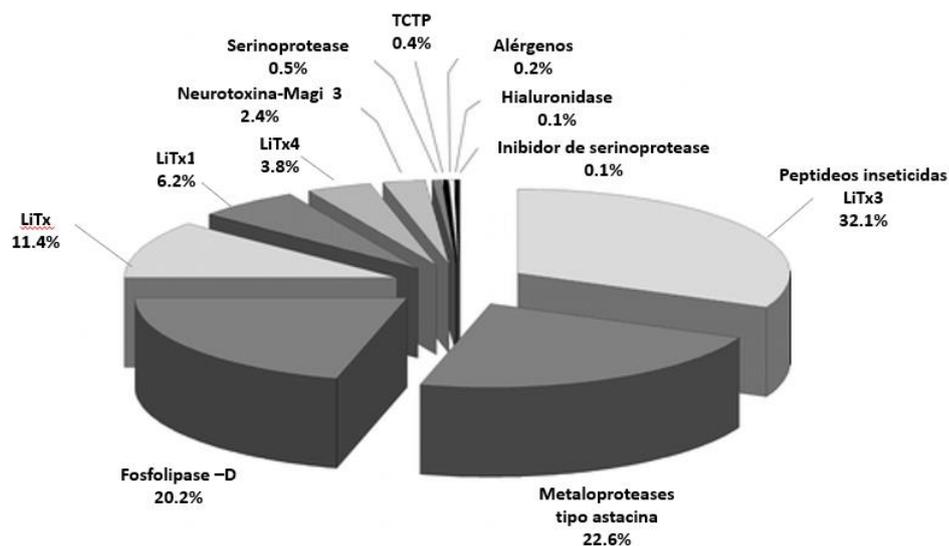


Fig 5. Proporção dos transcritos das toxinas do veneno de *Loxosceles intermedia*. Modificado de Gremski *et al.* 2010.

1.2.1. Loxoscelismo

Loxoscelismo é a condição clínica decorrente de envenenamento por mordida de aranhas *Loxosceles spp.* Pelas manifestações clínicas apresentadas, essa

condição é classificada como loxoscelismo cutâneo, em que os pacientes apresentam lesão que evolui lentamente para necrose e está associada a sintomas inespecíficos como cefaleia, vômitos, náuseas, erupção cutânea difusa e febre. Ou como o loxoscelismo sistêmico, em que além da lesão dermonecrotica, o paciente apresenta manifestações vasculares como hemólise, que pode levar à insuficiência renal aguda e coagulação vascular disseminada, que pode causar a morte (Futrell 1992; Isbister and Fan 2011).

1.2.2. Loxoscelismo cutâneo

Ocorre na maioria dos casos (Málaque *et al.* 2002; Schenone H., Saavedra T. 1989), manifestando-se inicialmente como dor e eritema leve (**Fig. 6A**), que geralmente evoluem para ulceração cutânea extensa e necrose. Como o curso da lesão é lento, o diagnóstico geralmente é feito 12-24 horas após a mordida, quando há progressão da lesão e dor local que apresenta às vezes bolhas hemorrágicas (**Fig. 6B**). Normalmente, em mais da metade dos casos, há evidência de necrose após 72 horas. Aproximadamente entre o 5º e o 7º dia, a lesão cutânea é delimitada e forma uma escara necrótica seca com bordas bem definidas (**Fig. 6C**). O tecido necrótico se desprende após aproximadamente 2-3 semanas, deixando uma úlcera com tecido granulomatoso, que pode levar semanas ou meses para cicatrizar (**Fig. 6D**) (Isbister and Fan 2011; Málaque *et al.* 2002).

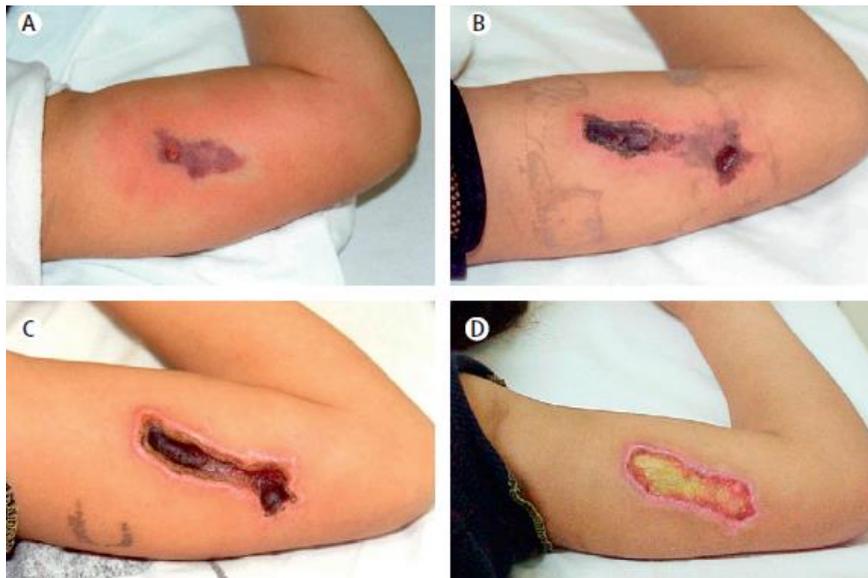


Fig 6. Loxoscelismo cutâneo. Progressão de ulceração e necrose de loxoscelismo cutâneo no dia 1 (A), dia 9 (B), dia 16 (C) e dia 25 (D) (Isbister and Fan 2011; Málaque *et al.* 2002).

A clínica do loxoscelismo cutâneo é causada principalmente por dano tecidual gerado pela infiltração de leucócitos polimorfonucleares (PMN) recrutados por ativação indireta do sistema complemento (Tambourgi *et al.* 2005). Dos componentes do veneno de *Loxosceles*, a esfingomielinase D é a responsável por induzir o fluxo de neutrófilos e dissociar as fibras de colágeno da derme, gerando a expressão da matriz metaloproteinase-9 (MMP-9), a qual é um dos principais fatores envolvidos na patogênese (Tambourgi *et al.* 2005). Além disso, essa toxina causa redução na expressão do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), responsável pela cicatrização e recuperação de feridas (Paixão-Cavalcante *et al.* 2007). Sendo, a diminuição da expressão do EGFR, responsável pela dificuldade de cicatrização observada nas lesões induzidas pelo veneno de *Loxosceles* (Tambourgi, Gonçalves-de-Andrade, and van den Berg 2010).

1.2.3. Loxoscelismo sistêmico

É uma manifestação menos comum que o loxoscelismo cutâneo, mas muito mais severa. Os principais sintomas incluem hemólise, coagulação intravascular disseminada e insuficiência renal aguda, que é a principal causa de morte (**Fig. 7**) (Málaque *et al.* 2002). Os sintomas do loxoscelismo sistêmico são resultado da atividade da SMase D, que induz a ativação de metaloproteinases ligadas à membrana, liberando glicoforinas e facilitando a ativação do sistema do complemento por meio da via alternativa. Além disso, a SMase D modifica a assimetria da membrana eritrocitária ao expor a fosfatidilserina, ativando a via clássica do complemento em eritrócitos, resultando em hemólise (Tambourgi *et al.* 2000, 2002; Tambourgi, Gonçalves-de-Andrade, and van den Berg 2010).

Ao mesmo tempo, a exposição de fosfatidilserina na superfície celular inicia a cascata de coagulação e agregação plaquetária (Tambourgi *et al.* 2002). Além disso, a SMase induz a clivagem da trombosmodulina e do receptor da proteína C endotelial, reduzindo a geração da proteína C ativa (van den Berg *et al.* 2007), o que contribui para o desenvolvimento da coagulação intravascular e de sintomas de choque (Tambourgi, Gonçalves-de-Andrade, and van den Berg 2010).



Fig 7. Loxoscelismo sistêmico. **A)** Bolsa para coleta de urina mostrando hemoglobinúria e/ou hematúria por hemólise intravascular 30 horas após o acidente. **B)** Urina normal 96 h após o acidente. Fotos: CIATox/SC (Centro de Informação e Assistência Toxicológica de Santa Catarina), Lopes *et al.* 2020 review.

1.3. Diagnóstico

Geralmente a mordida de aranhas *Loxosceles* spp. é indolor, o que faz com que o paciente só procure atendimento médico horas após o acidente (Futrell 1992). De acordo com Hess-Lopez *et al.*, apenas 23,3% dos casos notificados de loxoscelismo são realmente confirmados por identificação de aranha ou imunoensaio (Lopes *et al.* 2020).

Como os sintomas clínicos não são específicos ou se confundem comumente com cerca de 40 condições médicas, Sams *et al.*, geraram uma classificação, modificada por Stoecker *et al.*, com base na história do paciente e na evolução dos sintomas que podem auxiliar no diagnóstico de loxoscelismo (**Tabela 1**) (Sams *et al.* 2001; Stoecker, Vetter, and Dyer 2017).

Tabela 1. Classificação do Loxoscelismo .

Loxoscelismo	Características
Documentado	aranha encontrada após picada, identificada por pessoa habilitada, lesão típica, curso clínico típico;
Provável	aranhas encontradas na área, paciente pode ter sentido picada, visto uma aranha, lesão típica, curso clínico típico
Presuntivo	aranhas conhecidas por estarem na área, lesão compatível, curso clínico típico

Putativo paciente com diagnóstico subjetivo, aranhas desconhecidas na área, lesão cutânea atípica.

Modificada de Stoecker *et al.*, (2017).

Em 2017, Stoecker *et al.*, desenvolveram um dispositivo mnemônico chamado “*NOT RECLUSE*” para ajudar a prevenir diagnósticos errados de loxoscelismo. Esta contribuição resume os achados típicos e atípicos de lesões cutâneas causadas por *L. reclusa*. Nesse dispositivo, cada letra corresponde a uma característica que ajuda o médico a conhecer a evolução típica do loxoscelismo cutâneo e a excluir outras doenças (**Tabela 2**).

Tabela 2. Dispositivo mnemônico para o diagnóstico de loxoscelismo.

	Características típicas do Loxoscelismo.	Diagnósticos diferenciais.
N Número	Lesão focal única; ocasionalmente duas mordidas.	Lesões múltiplas indicam infecção bacteriana, herpes zoster, pioderma gangrenoso, plantas venenosas ou picadas de artrópodes.
O Ocorrência	Normalmente envolve a compressão da aranha durante o vestir ou dormir.	Lesões que ocorrem após a jardinagem sugerem esporotricose.
T Tempo	A incidência de picadas de <i>Loxosceles spp.</i> , é sazonal; as aranhas são mais ativas durante a primavera e o verão.	
R Centro vermelho	A área central de uma mordida de <i>Loxosceles spp.</i> , é pálida, branco-azulada ou roxa, raramente vermelha.	Uma área central vermelha tem maior probabilidade de ser causada por outra picada de artrópode, celulite estreptocócica ou até mesmo antraz.
E Elevação	As mordidas de <i>Loxosceles spp.</i> , são planas ou ligeiramente afundadas.	Qualquer elevação torna improvável uma picada de <i>Loxosceles</i> e é provável outra picada de artrópode ou uma infecção bacteriana, como <i>S. aureus</i> .
C Crônica	A maioria dos casos são curados em três meses.	Lesões crônicas sugerem pioderma gangrenoso, câncer de pele não melanômica ou tularemia.
L Longa	A área necrótica normalmente não excede 10 cm.	Uma ferida com mais de 10 cm de largura sugere pioderma gangrenoso.

U Ulceras muito cedo	Picadas de <i>Loxosceles spp.</i> , normalmente ulceram após 7 a 14 dias após o envenenamento.	Ulceração antes de 7 dias sugere infecção bacteriana ou pioderma gangrenoso; crosting antes de 7 dias sugere antraz.
S Inchaço	Com exceção das regiões da cabeça e dos pés, as picadas de <i>Loxosceles spp.</i> , geralmente não causam muito inchaço.	Edema significativo sugere infecção bacteriana, principalmente celulite estreptocócica ou picadas de artrópodes.
E Exsudativo	Com exceção das pálpebras e dos dedos dos pés, as picadas de <i>Loxosceles spp.</i> , não são inicialmente exsudativas.	A formação de pus sugere infecção bacteriana, especialmente <i>S. aureus</i> ou pioderma gangrenoso.

Com relação às técnicas de imunodeteção, em 1998 Chávez-Olórtegui *et al.*, desenvolveram um ELISA para a detecção do veneno de *L. intermedia* em amostras de soro de pacientes (Chávez-Olórtegui *et al.* 1998) e em 2006 Stocker *et al.*, (Stoecker, Green, and Gomez 2006) usaram o ELISA para detectar o veneno de *L. reclusa* na concentração de 40 pg. Apesar da sensibilidade e especificidade dessa técnica, o uso do ELISA no diagnóstico da intoxicação loxoscelica é relatado em apenas 4,2% dos casos descritos (Lopes *et al.* 2020).

1.4. Tratamento

O tratamento do loxoscelismo pode variar dependendo da gravidade da lesão local. Com base na presença de necrose e sua extensão, Sams *et al.*, propuseram classificar as lesões em leves, moderadas e graves. Para cada tipo de lesão cutânea, propõe-se o uso de diferentes medicamentos e terapias. Em lesões leves, o tratamento inclui repouso, gelo, compressão, elevação, anti-histamínicos, aspirina e profilaxia anti-tétano e difteria. No caso de lesões moderadas, o tratamento com analgésicos, antibióticos são adicionados ao esquema; enquanto para as lesões graves é recomendada a dapsona, apesar dos efeitos colaterais (Sams *et al.* 2001).

Já para o controle dos efeitos sistêmicos do veneno, recomenda-se terapia de suporte (transusão e diálise em casos graves), hidratação e corticoterapia sistêmica (F and I 2016; Sams *et al.* 2001). Outras estratégias para o manejo terapêutico de lesões locais também incluem excisão cirúrgica, enxertos, oxigênio hiperbárico e terapia a vácuo, e o uso de antivenenos para tratar efeitos sistêmicos (Sams *et al.* 2001; Swanson and Vetter 2006; Tavares-Neto 2014).

No Brasil, o Ministério da Saúde recomenda um esquema de tratamento, onde o uso de antivenenos é indicado de acordo com a gravidade da intoxicação. Recomenda-se seu uso quando for identificada intoxicação nas primeiras 72 horas ou na presença de hemólise (quadro sistêmico). Os pacientes podem receber entre 5 e 10 ampolas de acordo com a gravidade da intoxicação. O uso de anti-sépticos e permanganato de potássio pode ajudar a prevenir infecções secundárias e promover a cura (Tavares-Neto 2014).

1.5. Soroterapia

Em 1961, técnicos do Instituto Butantan encontraram aranhas *Loxosceles spp.* nos locais onde foram reportados acidentes por mordidas de aranha, esta descoberta levou ao desenvolvimento da produção experimental do antiveneno, o qual começou a ser comercializado em 1964. Atualmente, os soros são comercializados no Brasil como fragmentos $F(ab')_2$ de IgG purificados nas seguintes apresentações; (i) soro anti-aracnídeo, produzido pelo Instituto Butantan, no estado de São Paulo, que é produzido a partir da mistura de venenos das aranhas *L. gaucho* e *Phoneutria nigriventer* e do escorpião *Tityus serrulatus*, e (ii) soro anti-loxoscélico produzido pelo Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos do Estado do Paraná (CPPI), que apresenta anticorpos contra o veneno de *L. gaucho*, *L. intermedia* e *L. laeta* (Butantan n.d.; CPPI - Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos. 2008; Hogan, Barbaro, and Winkel 2004).

Esses antivenenos são produzidos hiperimunizando cavalos com venenos brutos. Para desenvolver os protocolos de imunização, grandes quantidades de veneno de *Loxosceles spp.* são requeridas, no qual apenas para a imunização de um cavalo precisa-se de ser ordenhado o veneno de aproximadamente 300 aranhas. A manutenção de um número tão elevado de aranhas é trabalhosa, perigosa, exige muito tempo, infraestrutura especial e pessoal qualificado (Calabria *et al.* 2019; Figueiredo *et al.* 2014; Pauli *et al.* 2009). Além disso, o veneno bruto de aranha exerce efeitos tóxicos em animais produtores, como úlceras e abscessos, comprometendo a qualidade de vida do animal (Theakston, Warrell, and Griffiths 2003).

Além disso, como o veneno é uma mistura de diferentes moléculas biológicas, nem todos os seus componentes têm importância semelhante na produção de anticorpos neutralizantes, além do fato de a imunogenicidade dos componentes mais importantes não é uniforme, o que diminui a especificidade neutralizante do soro. Da

mesma forma, cada ciclo de imunização leva a uma resposta imune diferente, que nem sempre gera anticorpos com potência uniforme para serem usados como imunobiológicos (Maria *et al.* 2005). Dessa forma, a produção de antiveneno apresenta dois grandes problemas: (i) quantidade e toxicidade do veneno e (ii) variabilidade da imunogenicidade.

1.6. Proteínas recombinantes

Técnicas de biologia molecular foram essenciais para a compreensão dos venenos loxoscélicos. Devido a pequena quantidade de veneno produzida (volume e concentração proteica) há dificuldade em isolar os componentes individuais do veneno (Chaves-Moreira *et al.* 2017). O desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante permitiu o uso de técnicas de expressão de proteínas heterólogas, que fornecem a base para métodos alternativos na produção de antivenenos.

Em 2002, Fernandes-Pedrosa *et al.*, com base nessa tecnologia, produziram a esfingomielinase D recombinante de *L. laeta*, que preservou a atividade tóxica do veneno bruto. E quando essa proteína recombinante foi utilizada em esquemas de imunização, os soros produzidos neutralizaram a atividade dermonecrótica do veneno de *L. laeta* (Fernandes-Pedrosa *et al.*, 2002).

Seis anos depois, Mazoni de Almeida *et al.* (2008), utilizaram três isoformas de SMase D recombinante para imunizar cavalos e produzir soro anti-loxoscélico, que apresentou capacidade neutralizante semelhante ao soro comercial (Manzoni de Almeida *et al.*, 2008). Apesar dos resultados promissores do uso de proteínas recombinantes na produção de soro neutralizante, essas proteínas ainda mantêm a atividade tóxica característica, apresentando efeitos adversos nos animais imunizados.

Para resolver os problemas de toxicidade presentes em proteínas loxoscélicas recombinantes, em 2013 nosso grupo de pesquisa construíram e expressaram uma proteína quimérica (rCpLi) que contém três epítomos da sequência da toxina dermonecrótica de *L. intermedia* (LiD1). Esta proteína quimérica não apresentou toxicidade e quando foi utilizada para imunizar coelhos, os anticorpos produzidos foram capazes de neutralizar os efeitos dermonecróticos e hemorrágicos de rLiD1, apresentando níveis de neutralização semelhantes aos anticorpos produzidos contra rLiD1 (Mendes *et al.* 2013).

Com base nesses resultados, Figueiredo *et al.* (2014), usou esta proteína quimérica para imunizar cavalos. Para isso, foi desenvolvido um esquema de imunização com doses iniciais de veneno bruto acompanhadas de doses subsequentes de proteína quimérica. Esse protocolo permitiu o desenvolvimento de anticorpos que mostraram a mesma reatividade por ELISA que os detectados contra antivenenos produzidos por protocolos tradicionais (CPPI). Além disso, esse soro neutralizou a atividade dermonecrótica do veneno loxoscélico *in vivo*. O uso de rCpLi em esquemas de imunização reduziu a quantidade de veneno bruto em 67% (Figueiredo *et al.* 2014).

Com relação ao aumento do potencial de neutralização de anticorpos e para imitar o veneno loxoscélico bruto, nosso grupo inseriu epítomos de outras proteínas: três epítomos lineares de uma isoformas de metaloprotease semelhante a astacina 1 (LALP1) e dois epítomos lineares de hialuronidase (LiHYAL) de *L. intermedia*; e um epítomo linear de uma esfingomielinase D (SMase-I) de *L. laeta* gerando a proteína quimérica recombinante de *Loxosceles* (rMEPLox) (Fig. 8). Essa proteína permaneceu não tóxica e foi capaz de estimular a resposta imune humoral em coelhos imunizados, no qual os anticorpos gerados foram capazes de neutralizar a ação do veneno de *L. intermedia* (Lima *et al.* 2018).

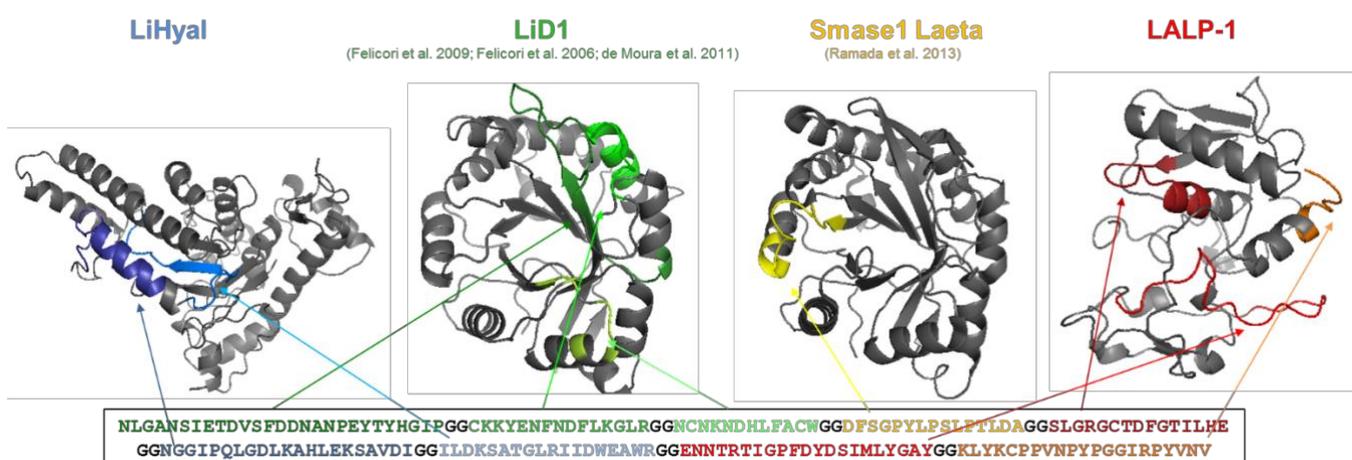


Fig 8. Proteína recombinante multiepítópica loxoscélica (rMEPLox). Observa-se os diferentes epítomos e as proteínas de procedência os quais compõem a rMEPLox.

1.7. Sistemas de expressão de proteínas

Tendo base os resultados obtidos com a rMEPLox optidos por Lima *et al.* (Lima *et al.* 2018), a próxima etapa é avaliar a capacidade dessa proteína em produzir soro

antiloxoscélico em equino. Para isso, precisa-se contar com grandes quantidades de proteína, sendo necessário otimizar a produção da rMEPLox.

O sistema de expressão bacteriana é amplamente utilizado para a obter produtos de DNA recombinante, uma vez que oferece diversas vantagens como alto nível de expressão, rápida multiplicação celular e necessidade de meios simples. Sendo *Escherichia coli* o típico sistema de expressão procariótica e um dos mais atraentes produtores de proteínas heterólogas (Gomes *et al.* 2016).

Este sistema de expressão utiliza um vetor que contém a sequência da proteína de interesse a ser expressa, vetor pET, o qual possui o sistema promotor T7. Nesse sistema, o gene de interesse é clonado por trás de um promotor reconhecido pela polimerase de RNA do fago T7. A polimerase é colocada no genoma bacteriano em um profago (λ DE3) que está sobre o controle transcricional do promotor lacUV5. Dessa forma, a expressão da proteína de interesse pode ser induzida pela lactose ou pelo seu análogo isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG). Para controlar a expressão basal do promotor T7, geralmente é utilizada a lisozima T7, a qual inibe a iniciação da transcrição do promotor T7 por meio da sua ligação à RNA polimerase (Graumann and Premstaller 2006; Moffatt and Studier 1987; Rosano and Ceccarelli 2014; Studier and Moffatt 1986). Este sistema é considerado muito popular para a expressão de proteínas recombinantes (Graumann and Premstaller 2006).

A principal cepa de *E. coli* utilizada como sistema de expressão é a *BL21 (DE3)*. A *BL21 (DE3)* é utilizada como cepa padrão para iniciar os primeiros ensaios de expressão. Esta cepa foi descrita pela primeira vez por Studier em 1986 após várias modificações da linhagem B (Studier and Moffatt 1986) e possui como característica a deficiência em protease Lon e protease OmpT, o que impede a degradação de proteínas heterólogas e extracelulares (Gottesman 1996; Rosano and Ceccarelli 2014).

No entanto, a cepa *BL21 (DE3)* pode não expressar bem a proteína recombinante por apresentar desregulações metabólicas, como o acúmulo da proteína recombinante em corpos de inclusão que são agregados insolúveis da proteína mal dobrada sem atividade biológica. Quando isso ocorre deve-se optar por cepas alternativas como a *Rosetta (DE3)*, que é uma cepa derivada de *BL21 lacZY* (TurnerTM). Esta cepa foi projetada para melhorar a expressão de proteínas contendo códons raramente usados por *E. coli*. Isso é conseguido graças à presença de tRNA para os códons AUA, AGG, AGA, CUA, CCC e GGA. Isso permite a esta cepa uma ampla tradução em comparação com as cepas de *E. coli* que usam apenas seus próprios códons.

Outra cepa de *E. coli* que tem contribuído significativamente para a produção de proteínas recombinantes de difícil expressão na forma solúvel é a *C43 (DE3)*. Essa cepa, desenvolvida por Miroux e Walker em 1996, contém duas mutações na região 10 do promotor lacUV5, que permitem melhorar a expressão de proteínas globulares e de membrana, conseguindo expressar de forma eficiente proteínas que não podem ser expressas em grandes quantidades na cepa *BL21 (DE3)* (Amin *et al.* 2019; Sørensen and Mortensen 2005; Srivastava, Mishra, and Chaudhuri 2019; Walker 1996; Yang *et al.* 2018).

Por isso nesse trabalho foram usadas estas cepas bacterianas para desenvolver a otimização do protocolo de expressão da rMEPLox.

2. Objetivos

2.1. Geral

Optimizar a produção de uma proteína recombinante multiepitópica loxóscelica (rMEPLox)

2.2. Específicos

- Determinar as melhores condições de expressão da rMEPLox.
- Caracterizar bioquímica e imunologicamente a proteína expressa.
- Analisar a capacidade da proteína recombinante de gerar anticorpos neutralizantes.

3. Metodología

3.1. Produção de proteína Quimerica

Como descrito por Lima *et al.* (Lima *et al.* 2018), a proteína rMEPLox foi construída contendo três epítopes de SMase D de *L. intermedia* (NLGANSIETDVSFDDNANPEYTYHGIP, SKKYENFNDFLKGLR, and NCNKNDHLFACW), um epítopo (DFSGPYLPSLPTLDA) de *L. laeta* SMase-I, três epítopos de LALP-1 (SLGRGCTDFGTILHE, ENNTRTIGPFDYDSIMLYGAY, and LYKCPPVNPYPGGIRPYVNV), um epítopo de LIHYAL (NGGIPQLGDLKAHLEKSAVDI) e finalmente o epítopo (ILDKSATGLRIIDWEAWR)

correspondente ao sítio ativo de LiHYAL, as sequências dos epítomos foram espaçadas por dois códons de glicina.

3.2. Otimização da expressão da rMEPLox

3.2.1. Cepas Bacterianas e Meios de cultura

Para os ensaios de expressão, foram utilizadas três cepas da bactéria *E. coli*: *BL21(DE3)*, *Rosetta(DE3)* e *C43(DE3)pLysS* e os seguintes meios de cultura: Luria-Bettani (LB, 10g/L peptona, 5g/L extrato de levedura e 5g/L NaCl), Super Broth (SB, 32g/L peptona, 20g/L extrato de levedura e 5g/L NaCl), Terrific Broth (TB, 12g/L peptona, 24g/L extrato de levedura, 8g/L glicerol, 17mM KH₂PO₄ e 72 mM K₂HPO₄) e 2xTY (16g/L peptona, 10g/L extrato de levedura e 5g/L NaCl).

3.2.2. Transformação

Para 50 µL de bactérias, foi adicionado 1 µL do vetor pET26-b (+) contendo a sequência de codificação para a proteína rMEPLox. A mistura foi homogeneizada e mantida no gelo durante 5 minutos. Em seguida, foi transferido para uma cubeta de eletroporação e submetida a uma descarga de eletroporador (Micropulser e Electroporator, Biorad), nas condições de micropulser Ec1 com cubeta de quartzo de 0.1 cm. Após o eletrochoque, a mistura foi transferida para um eppendorf de 1,5 mL com 1000 µL de meio SOC (Super Optima Broth) e mantida a 37 °C por 1 hora na estufa ORION® 502 (FANEM). Alíquotas de 50 µL e 100 µL de cultura foram plaqueadas em placas de Petri contendo 20 mL de meio SOC (2% Triptona, 0,5% de extrato de levedura, 10mM NaCl, 2,5mM KCl, 10mM MgCl₂ e 10mM MgSO₄) suplementado com o antibiótico Canamicina em 50 µg/mL. As placas foram incubadas durante a noite a 37 °C.

3.2.3. Expressão de rMEPLox em diferentes cepas de *E.coli*

Primeiramente, foi avaliada a habilidade de três cepas de *E. coli* para expressão da rMEPLox. Para isso, colônias isoladas de cada cepa foram cultivadas em 5 mL de meio 2xTY contendo 250 µg de Canamicina a 37 °C, com agitação de 180 rpm. No dia seguinte, 7 mL de meio 2xTY foram inoculados com 70 µL de pré inóculo e incubado nas mesmas condições. Uma vez que as células atingiram a fase meio-exponencial (OD_{600nm} = 0.4), a indução da expressão da rMEPLox foi iniciada com a

adição de 0.6 mM IPTG e incubação a 30 °C, 180 rpm por 4 h. Finalmente, as células foram coletadas e a quantidade de rMEPLox foi quantificada.

3.2.4. Otimização do meio de cultura

Para determinar a influência de diferentes meios de cultura na quantidade de rMEPLox expressa, quatro tipos de meios de cultura foram avaliados: LB, TB, SB e 2xTY. Foram feitos 5 mL de pré inóculo de *C43(DE3)pLysS* contendo o plasmídeo pET26-rMEPLox. Depois, 7 mL de cada meio foram inoculados com 70 µL de pré inóculo. Quando a OD_{600nm} atingiu 0.4, a expressão foi induzida com 0.6 mM de IPTG. As bactérias foram incubadas a 30 °C, 180 rpm por 4 h. Finalmente, as células foram coletadas e a quantidade de rMEPLox foi quantificada.

3.2.5. Otimização da concentração do indutor

Bactérias *C43(DE3)pLysS* contendo pET26-rMEPLox foram cultivadas *overnight* em meio 2xTY contendo canamicina (50 µg/mL). Em seguida, 5 frascos com 7 mL de meio 2xTY foram inoculados com 70 µL de pré inóculo, e foram incubados a 37 °C, 180 rpm. Quando a OD_{600nm} atingiu 0.4, a indução foi feita individualmente através de diferentes concentrações de IPTG (0.15, 0.3, 0.6 e 1 mM). Após 4 h de incubação a 30°C, 180 rpm, as células foram coletadas e a quantidade de rMEPLox foi quantificada.

3.2.6. Otimização da biomassa pré indução

Quatro culturas contendo 7 mL do meio 2xTY foram inoculados com 70 µL de pré inóculo de *C43(DE3)pLysS*-pET26-rMEPLox e incubados a 37 °C, 180 rpm. Quando a OD_{600nm} atingiu 0.2, 0.4, 0.8 e 1,6, a indução da expressão foi iniciada com 0.6 mM de IPTG e as bactérias foram incubadas a 30°C por 4 h, 180 rpm. Finalmente, as células foram coletadas e a quantidade de rMEPLox foi quantificada.

3.2.7. Otimização do tempo de incubação pós indução

Para determinar o apropriado tempo de incubação pós indução, um erlenmayer com 30 mL de meio 2xTY foi inoculado com 300 µL de pré inóculo *C43(DE3)pLysS*-pET26-rMEPLox e, quando obteve-se a OD_{600nm} de 0.4, a indução foi feita com 0.6 mM de IPTG a 30 °C a 180 rpm. Em diferentes intervalos de tempo: 4, 8, 16 e 24 h e 2 mL de cultura foram coletados e a quantidade de rMEPLox expressa foi quantificada.

3.2.8. Otimização da temperatura de indução

O efeito de diferentes temperaturas de indução (25 °C, 30 °C e 37 °C) na expressão de rMEPLox foi avaliado. Para este propósito, 3 culturas contendo 7 mL de meio 2xTY foram inoculados com 70 µL de pré inóculo *C43(DE3)pLysS-pET26-rMEPLox* e ao atingir a OD_{600nm} de 0.4, a indução foi feita com 0.6 mM de IPTG. Após a indução, cada frasco foi incubado a 180 rpm a 25°C, 30°C e 37 °C, as células foram coletadas e a quantidade de rMEPLox expressa foi quantificada.

3.3. Extração da rMEPLox

Para obter a rMEPLox produzida em bactérias e analisar se ela foi expressa em condições solúveis ou insolúveis (Lima *et al.* 2018), as células foram ressuspensas em tampão A (10 mM Na₂HPO₄, 3 mM NaH₂PO₄, 500 mM NaCl e 30 mM Imidazol) na proporção de 10 mL/L de expressão, acrescida de 100 µg de lisozima e 0,1 mM de phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), e incubada no gelo por 30 minutos. Posteriormente, as células foram sonicadas com 8 pulsos de 9 segundos cada, com amplitude de 37% (sonicador Fischer Scientific). Em seguida, o extrato foi submetido a 3 ciclos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento a 37 °C em banho maria. Então, essa suspensão foi centrifugada a 10.000 g a 4 °C por 20 minutos. O sobrenadante foi coletado, o qual contém o extrato de proteínas solúveis, e armazenada a 4 °C. O pellet resultante foi ressuspendido em tampão de lise citoplasmática insolúvel (tampão de lise citoplasmática solúvel acrescentado de 8 M de ureia) e a suspensão foi centrifugada a 10.000g a 4 °C por 20 minutos. O sobrenadante resultante foi coletado e armazenado a 8 °C.

3.4. ELISA indireto para a quantificação de rMEPLox

A quantificação de rMEPLox expressa, foi realizada por meio de ensaios de imunorreatividade por ELISA, como descrito por Chavez-Olórtegui *et al.*, (Chavez-Olortegui *et al.* 1991). Placas de ELISA (COSTAR) foram sensibilizadas *overnight* a 4° C com 100 µL de extrato bruto (solúvel e insolúvel) em diluição de 1/10 e 1/50 em tampão de bicarbonato de sódio 0,02 M, pH 9,6. Após o bloqueio [caseína a 2% em solução salina tampão de fosfato (PBS)] e lavagem (Tween 20 a 0,05% - PBS), 0,5 µg/mL do anticorpo monoclonal Lox-mAb3, o qual reconhece o epítopo 8 da rMEPLox (Costa *et al.* 2020) foi adicionado e incubado por 1 h a 37 °C. As placas foram lavadas e incubadas, por 1 h a 37 °C, com anti- IgG de camundongo conjugada a peroxidase

horseradish (HRP, Sigma-Aldrich) (diluição 1/10.000). A reação foi iniciada com a adição de 0,2 µg/mL de dicloridrato de o-fenilenodiamina [OPD (Sigma-Aldrich, MO, EUA)] e incubada por 30 minutos em temperatura ambiente no escuro. A reação foi interrompida com 0,08 M H₂SO₄. Os valores de absorvância foram determinados a 490 nm. Uma curva com diferentes concentrações de rMEPLox (1 µg/poço a 0,0625/poço) foi utilizada como padrão. Todos os ensaios foram feitos em duplicata. Extratos bacterianos de colônias não induzidas foram usados como um branco. Todas as medições foram feitas em triplicata.

3.5. Purificação da rMEPLox

Um litro de C43(De3)pLysS foi cultivado seguindo as condições otimizadas. Após a extração da proteína, as frações solúveis e insolúveis foram purificadas por cromatografia de afinidade usando uma coluna de níquel HP HisTrap™ em um sistema cromatográfico AKT_a. Para fazer isso, inicialmente a coluna de 5 mL foi equilibrada com 25 mL de tampão de equilíbrio (Na₂HPO₄ 10 mM, NaH₂PO₄ 3 mM, NaCl 500 mM, Imidazol 30 mM, pH 7,4 para a fração solúvel e Na₂HPO₄ 10 mM, NaH₂PO₄ 3 mM, 500 mM NaCl, Imidazol 30 mM, ureia 8 M, pH 7,4 para a fração insolúvel) a 5 ml/min. Em seguida, 10 mL do extrato bacteriano bruto foram carregados na coluna (0,5 mL/min). Depois disso, a coluna foi lavada com o tampão de equilíbrio até a absorvância a 280 nm atingir o nível basal. Para eluir a proteína, um tampão de eluição (Na₂HPO₄ 10 mM, NaH₂PO₄ 3 mM, NaCl 500 mM, Imidazol 500 mM, pH 7,4) foi usado e as proteínas liberadas foram fracionadas. Os eluídos contendo rMEPLox obtidos da purificação da fração solúvel foram reunidos, misturados e dialisados contra 15 mM PBS, utilizando uma membrana de 1 kDa de poro. A proteína foi aliquoteada e armazenada a 4 °C. Da mesma forma, o mesmo procedimento foi realizado para as eluições da purificação da fração insolúvel.

3.6. Quantificação da Proteína purificada

A proteína purificada, pós diálise, foi quantificada através do método de Lowry (LOWRY *et al.* 1951), utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão. O ensaio foi feito em duplicata, em microplaca de 96 poços. As absorvâncias foram medidas a 490 nm em leitor de microplaca iMark™ (Biorad) e a rMEPLox quantificada foi armazenada a 4 °C até seu uso.

3.7. Atividade Enzimática

3.7.1. Atividade Metalloproteásica

A potencial atividade metaloproteínase da rMEPLox produzida na fração solúvel foi determinada por digestão com fibrinogênio (Fg), conforme descrito por Lima *et al.* O Fg foi dissolvido em solução de trabalho (25 mM Tris-HCl, 0,15 M NaCl, pH 7,4), veneno de *L. intermedia* (3 µg) ou rMEPLox (3 µg) foi adicionado a 500 µL de solução de Fg em razão molar de enzima para o substrato 1/52 (p/p) e incubado a 37 °C por 16 h. Após a incubação, alíquotas de 50 µl foram misturadas com um volume igual de solução desnaturante (Ureia 10 M, 4% β-mercaptoetanol, 4% SDS) por mais 16 h. Uma alíquota de 15 µl da solução final foi aplicada em SDS-PAGE a 10% sob condições redutoras e corada com Coomassie blue.

3.7.2. Atividade Hialuronidásica

Para avaliar se a proteína recombinante produzida apresenta atividade hialuronidase, foi seguido o método descrito por Horta *et al.*, com algumas modificações: concentrações de 0,23 a 15 µg de veneno bruto de *L. intermedia* (LiV) ou rMEPLox foram incubadas com tampão acetato (acetato 0,2 M, NaCl 15 M, pH 6) e ácido hialurônico 2,5 mg/ml em microplacas de 96 poços. Uma curva com valores de 100, 75, 50, 25 e 0 % da atividade da hialuronidase foi usada como controle. A placa foi incubada a 37 °C por 30 min e 200 µL de 2,5% (p/v) de brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) dissolvido em 2% (p/v) de NaOH foi adicionado aos poços para precipitação do ácido hialurônico. A turbidez produzida foi medida a 405 nm. Os testes foram realizados em triplicata e as concentrações correspondentes a 50% da atividade da hialuronidase foram determinadas para o veneno bruto ou rMEPLox da fração solúvel.

3.8. Antigenicidade

Para confirmar a antigenicidade da rMEPLox produzida nas condições otimizadas, um ensaio de Western blot foi realizado usando 9 µg de rMEPLox da fração solúvel e o extrato bacteriano bruto. Como padrão utilizou-se marcador de massa molecular de proteínas (Bio Rad). Um 15% SDS-PAGE foi primeiro preparado e o gel foi executado a 150 V durante 1 hora. Após a eletroforese, as proteínas foram

transferidas para uma membrana de nitrocelulose de 0,22 μm (Bio-Rad). Após bloqueio (0,3% de Tween 20-PBS) durante 1 hora, a membrana foi incubada com 0,5 μg / ml de Lox-mAb3 durante 1 hora à temperatura ambiente. A membrana de nitrocelulose foi então lavada e incubada durante 1 h à temperatura ambiente com anti- IgG de camundongo conjugada a peroxidase *horseradish* (Sigma -Aldrich) diluído 1/10000, em Tween 20 -PBS a 0,05%. Após várias lavagens, a reação foi desenvolvida pela adição do substrato de peroxidase (tetrahydrocloroto de 3'-diaminobenzidina (DAB) e cloronaftol).

3.9. Animais

Vinte e cinco camundogos BALB/c fêmeas (entre 6 e 8 semanas) foram obtidos no Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Brasil, e mantidos no Biotério do Departamento de Bioquímica e Imunologia do ICB. Os animais receberam água e comida sob condições ambientais controladas. A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal - UFMG (45/2020).

3.10. Protocolo de imunização

Cinco camundogos foram imunizados com rMEPLox da fração solúvel. Após a coleta de soros pré-ímmes (PI), todos os animais receberam uma injeção subcutânea inicial de 50 μg /animal de rMEPLox em adjuvante completo de Freund (Sigma-Aldrich). Uma dose igual de proteína em $\text{Al}(\text{OH})_3$ foi administrada em onze injeções subsequentes, com intervalos de 15 dias.

Uma semana após a última imunização, os camundogos foram sangrados e a reatividade do soro contra rMEPlox foi avaliada por ELISA. Para isso, placas ELISA (Costar) foram sensibilizadas *overnight* a 4 °C com 100 μL de uma solução 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de rMEPLox em tampão de bicarbonato de sódio 0,02 M, pH 9,6. Após bloqueio (2% de caseína em PBS) e lavagem (Tween 20 -PBS 0,01%), soros pré-ímmes e ímmes dos camundogos (diluição de 1/100 a 1/6400) foram adicionados e incubados por 1 hora a 37 °C. As placas foram lavadas e incubadas, por 1 h a 37 °C, com anti- IgG de camundongo conjugada a peroxidase *horseradish* (HRP, Sigma-Aldrich) (diluição 1/10.000). A reação foi iniciada com a adição de 0,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de dicloridrato de o-fenilenodiamina [OPD (Sigma-Aldrich, MO, EUA)] e incubada por 30 minutos em temperatura ambiente no escuro. A reação foi interrompida com 0,08 M H_2SO_4 . Os

valores de absorvância foram determinados a 490 nm. Todas as medições foram feitas em triplicata.

3.11. Imunoensaio de SPOT

Foi preparada por SPOT síntese uma membrana de celulose contendo 57 pentadecapeptídeos sobrepostos por 3 resíduos cobrindo toda a sequência primária da rMEPLox, como detalhado por Lima *et al.* (Lima *et al.* 2018), com o objetivo de mapear epítomos lineares de células B. A síntese de peptídeos foi realizada usando um sintetizador Multipep ResPep SL Automatic SPOT (IntavisAG, Bioanalytical Instruments, Germany), como previamente descrito por Laune *et al.*, (Laune *et al.* 2002).

Para os ensaios de imunodeteção, as membranas foram bloqueadas *overnight* com TBS-albumina de soro bovino (3%), sacarose (5%). Em seguida, as membranas foram lavadas com TBS e incubadas com soro hiperimune (diluição 1/400). A ligação do anticorpo foi detectada utilizando IgG anti-camundongo de cabra conjugado com fosfatase alcalina (Sigma, diluição 1/2000) por 90 min, a 37 ° C. Após a lavagem, o substrato 5-bromo-4-cloro- 3-indolil fosfato (Sigma) e 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 brometo de difeniltetrazólio (Sigma) foram adicionados e um precipitado azul foi formado nos peptídeos reativos. As membranas foram fotografadas e regeneradas usando dimetilformamida, seguido por SDS 1%, β-mercaptoetanol 0,1% em 8 M de ureia e por etanol/água/ácido acético (50:40:10 vol/vol/vol) e etanol.

3.12. Ensaios de neutralização *in vivo*

A resposta imune desencadeada pela rMEPLox produzida nas condições otimizadas foi avaliada em camundongos BALB/c, quanto ao seu potencial para neutralizar a letalidade causada pelos venenos de *Loxosceles*. Dez animais foram imunizados 4 vezes com 50 µg/animal da fração solúvel rMEPLox, com intervalos de 15 dias. Em seguida, os camundongos controle (não imunizados) e imunizadas foram divididos em dois grupos de dez animais (cinco imunes e 5 não imunes), o primeiro grupo recebeu 0,5 mL de PBS 1X contendo 2,5 DL₅₀ (25 µg/20 g) por via intraperitoneal (ip) de veneno de *L. intermedia* e o segundo grupo recebeu 1,5 DL₅₀ (15 µg /20 g) (Braz *et al.* 1999). Os animais foram observados até 72 h após a injeção.

4. Resultados

4.1. Otimização da expressão da rMEPLox

O potencial de três cepas de *E. coli*: *BL21(DE3)*, *Rosetta(DE3)* e *C43(DE3)pLysS* para produzir rMEPLox foi avaliado. Após a lise e extração das proteínas, os extratos brutos contendo as frações solúvel e insolúvel foram analisados por ELISA indireto para quantificar a rMEPLox produzida por cada cepa. Duas cepas, *BL21(DE3)* e *Rosetta(DE3)*, expressaram apenas rMEPLox na fração insolúvel (12,42 mg/L e 14,21 mg/L, respectivamente) (**Fig. 9** e **10**). No entanto, *C43(DE3)pLysS* expressou maiores quantidades de rMEPLox (23,92 mg/L), com 18,31 mg de rMEPLox sendo expressos na fração solúvel. Por esta razão, as seguintes etapas de otimização foram realizadas usando *C43(DE3)pLysS* como a cepa hospedeira com a quantidade de rMEPLox solúvel e insolúvel sendo medida para cada condição de otimização.

Para a otimização dos meios, foram utilizados quatro meios de cultura os quais usam peptona e extrato de levedura como fonte de nitrogênio orgânico. Esses meios foram divididos em meios enriquecidos (SB e TB) e meios menos suplementados (LB e 2xTY). Os resultados mostram que os meios menos suplementados suportam níveis mais elevados de expressão de rMEPLox solúvel, especialmente os meios 2xTY, 18,67 mg/L e os meios enriquecidos aumentaram a expressão de rMEPLox em formas insolúveis (**Fig. 9B**). O excesso de fontes de nitrogênio no meio de cultura parece diminuir o rendimento de rMEPLox solúvel e aumentar a quantidade de rMEPLox insolúvel. Portanto, com base nos resultados obtidos, a expressão da rMEPLox solúvel parece ser afetada pela concentração das fontes de nitrogênio nos meios de cultura.

A influência do indutor na produção de rMEPLox foi avaliada pela adição de IPTG na concentração final de 0,15, 0,3, 0,6 e 1 mM. Com base nos resultados, mostrados na Fig. 9C, a indução por concentrações superiores a 0,6 mM IPTG ofereceram a melhor produção de rMEPLox solúvel (18,56mg/L) em comparação com concentrações menores de IPTG.

Para identificar a biomassa ótima de *C43(DE3)pLysS* antes da indução, quatro culturas com diferentes concentrações de biomassa foram avaliadas e cada uma foi induzida em diferentes pontos de crescimento bacteriano (diferentes biomassas). Para isso, a expressão de rMEPLox foi induzida usando 0,6 mM IPTG em três pontos da

fase de crescimento exponencial, representados por OD_{600nm} de 0,2, 0,4 e 0,8; e fase estacionária de crescimento (OD_{600nm} = 1,6). Os resultados (Fig. 9D) indicam que a biomassa ótima para iniciar a expressão da proteína recombinante foi obtida quando a indução ocorreu no segundo ponto da fase exponencial (OD_{600nm} = 0,4). A biomassa de 0,4 produziu 18,67 mg/L de rMEPLox solúvel.

A indução do *C43(DE3)pLysS* transformado foi realizada em diferentes períodos (4, 8, 16 e 24 h). O maior rendimento de rMEPLox foi detectado às 16 h (39,44 mg/L), como mostrado na Fig. 9E. A quantidade de proteína recombinante diminui em torno de 24 h.

A influência de diferentes temperaturas para a produção de rMEPLox foi avaliada. Para isso, três culturas *C43(DE3)pLysS* transformadas foram cultivadas em condições otimizadas (meio 2xTY, 0,6 mM IPTG, biomassa OD_{600nm} = 0,4 e indução de 16 h). Após a adição do indutor, as culturas foram incubadas a 25, 30 e 37 °C. A quantificação da rMEPLox mostrou que a temperatura de 30 °C produz os maiores rendimentos de rMEPLox (39,87 mg/L). Quando a temperatura aumenta para 37 °C, a produção de rMEPLox diminui, conforme mostrado na Fig. 9F. Na Tabela 3, se resume as variáveis de otimização testadas na expressão da proteína rMEPLox.

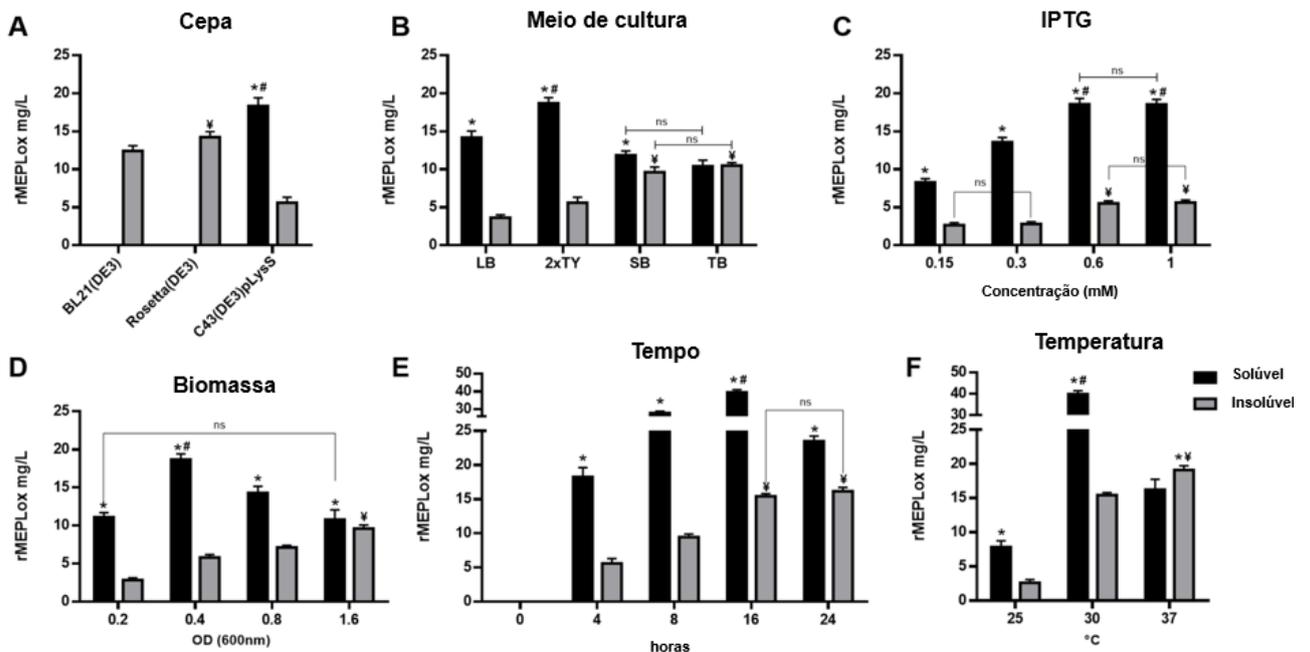


Fig 9. Otimização do protocolo de expressão bacteriana da rMEPLox. **A)** Produção de rMEPLox em cepas de *E. coli*: *BL21(DE3)*, *Rosetta(DE3)* e *C43(DE3)pLysS*. A influência da cepa hospedeira no desempenho de rMEPLox solúvel foi avaliada em culturas sob agitação por 4 h a 30 °C. **B)** Efeito de quatro meios de cultura na produção de rMEPLox solúvel. A cepa *C43(DE3)pLysS* transformada foi

cultivada em meio LB, 2xTY, SB e TB por 4 h a 30 °C e 180 rpm. **C)** Produção de rMEPLox solúvel em diferentes concentrações de IPTG. Concentrações de IPTG de 0,15, 0,3, 0,6 e 1 mM foram adicionadas às culturas em OD_{600nm} atingindo 0,4. Após 4 h de incubação a 30 °C e 180 rpm, a produção de rMEPLox foi quantificada. **D)** Influência da biomassa antes da indução da expressão de rMEPLox solúvel. A produção de proteína foi induzida em diferentes biomassas bacterianas (OD_{600nm} = 0,2, 0,4, 0,8 e 1,6). Após incubação a 4 g a 30 °C e 180 rpm, a rMEPLox solúvel produzida foi quantificada. **E)** Produção de rMEPLox em diferentes tempos de incubação. A proteína recombinante solúvel foi quantificada após incubação às 4, 8, 16 e 24 h. **F)** Produção de rMEPLox por incubação a 25, 30 e 37 °C. Os resultados foram analisados por meio do teste ANOVA bidirecional e os valores de P <0,05 foram considerados significativos. As barras marcadas com "*" revelam rendimentos de proteína significativamente mais elevados entre as formas solúvel e insolúvel para a mesma condição testada; as barras marcadas com "#" revelam rendimentos de proteína estatisticamente maiores entre as diferentes condições testadas, para a forma solúvel; e as barras marcadas com "¥" revelam rendimentos de proteína mais elevados estatisticamente significativos entre as diferentes condições testadas, para a forma insolúvel. ns = diferença não significativa ".

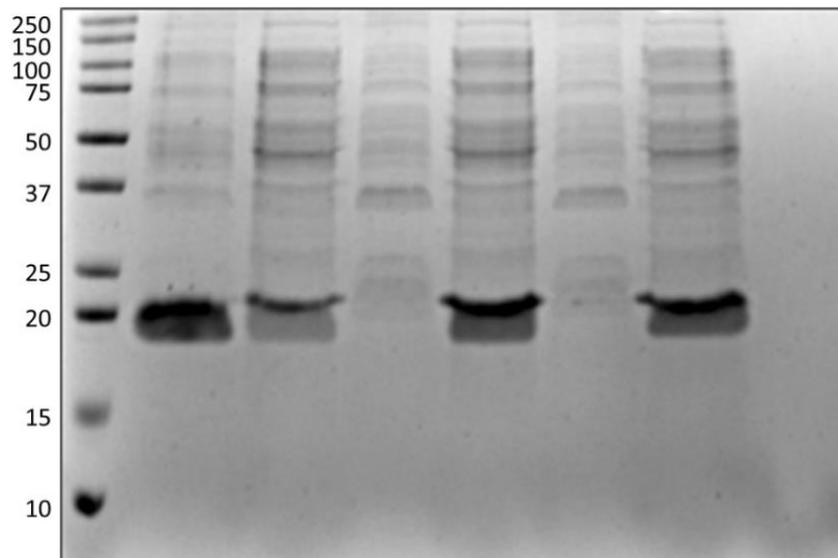


Fig 10. Análise de SDS-PAGE 15% da rMEPLox em frações solúveis e insolúveis de três cepas hospedeiras diferentes. O gel foi corado com Coomassie Blue. Na primeira faixa, MM: marcador de proteína (Bio Rad # 1610374). Na segunda linha, a fração solúvel contendo rMEPLox foi produzida em *C43(DE3)pLysS*. Na terceira faixa, a fração insolúvel contendo rMEPLox produzida em *C43(DE3)pLysS*. A quarta e quinta faixas mostram as frações solúveis e insolúveis de *BL21(DE3)*, apenas a fração insolúvel contém rMEPLox. Além disso, a sexta e a sétima faixas mostram as frações solúveis e insolúveis de *Rosetta(DE3)*, apenas a fração insolúvel contém rMEPLox. A produção de rMEPLox foi induzida por 0,6 mM IPTG a 30 °C por 4 h.

Tabela 3. Resumo das variáveis de otimização testadas na expressão da proteína rMEPLox.

Variáveis	Condições testadas				
	Cepas	BL21 (DE3)	Rosetta (DE3)	C43(DE3)pLysS	-
Meio	LB	2xTY	SB	TB	
[IPTG]	0.15 mM	0.3 mM	0.6 mM	1 mM	
Biomassa (OD ₆₀₀)	0.2	0.4	0.6	1.6	
Tempo indução	4h	8h	16h	24h	
Temperatura	20°C	30°C	37°C	-	

As condições destacadas em negrito e cinza foram as que deram o melhor rendimento de proteína expressa.

4.2. Purificação da rMEPLox

A purificação de rMEPLox produzida num litro de meio de cultura seguindo as condições otimizadas foi realizada por cromatografia de afinidade em coluna de níquel (GE helthcare). A rMEPLox purificada foi eluída com imidazol 500 mM. Após a purificação, o extrato bruto e a rMEPLox purificada foram avaliadas num SDS-PAGE 15% sob condições de redução (**Fig. 11**). A rMEPLox é visualizada como uma banda de 20 kD, conforme descrito por Lima *et al.* A purificação por afinidade recuperou 47,31 mg de rMEPLox (34,15 mg correspondendo a rMEPLox solúvel e 13,16 mg a insolúvel) o que representa 85,71 % de eficiência. Na **Tabela 4**, os dados da purificação do protocolo otimizado aqui proposto são comparados com o rendimento da rMEPLox produzida de acordo com o protocolo detalhado por Lima *et al.* 2018.

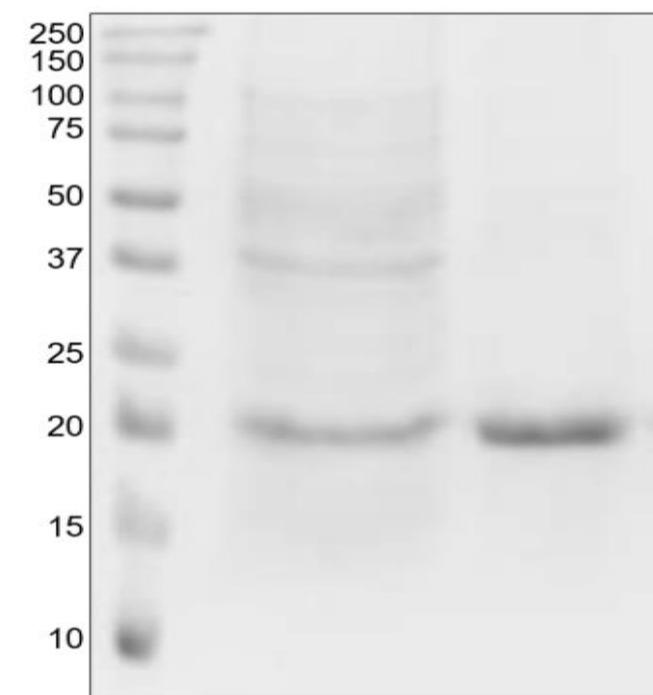


Fig 11. Purificação da rMEPLox, analisada por SDS-PAGE 15%. O gel foi corado com Coomassie Blue. Na primeira faixa, MM: marcador de proteína (kD) (Bio Rad # 1610374). Na segunda faixa, a fração solúvel contendo rMEPLox induzida por 0,6 mM IPTG a 30 °C por 16 h. Na terceira faixa, rMEPLox purificada.

Tabela 4. Resumo do procedimento de purificação da rMEPLox.

Etapas	Solúvel (mg)	Insolúvel (mg)	Total (mg)	Rendimento (%)
Protocolo otimizado				
Extrato bruto	39.87	15.42	55.29	100
Cromatografia de afinidade	34.15	13.16	47.31	85.18
Protocolo anterior				
Extrato bruto	-	10.25	10.25	100
Cromatografia de afinidade	-	8.79	8.79	85.75

Os rendimentos foram calculados considerando 1 L de cultura bacteriana transformada e comparados com o protocolo não otimizado descrito acima.

4.3. Atividades enzimáticas

A vantagem de usar rMEPLox em vez de veneno bruto ou proteínas tóxicas é o fato de que essa proteína recombinante carece de toxicidade. Os testes realizados

mostram que rMEP_{Lox} não apresenta atividades tóxicas de hialuronidase ou metaloproteinase (fibrinogenolítica) (**Fig. 12**).

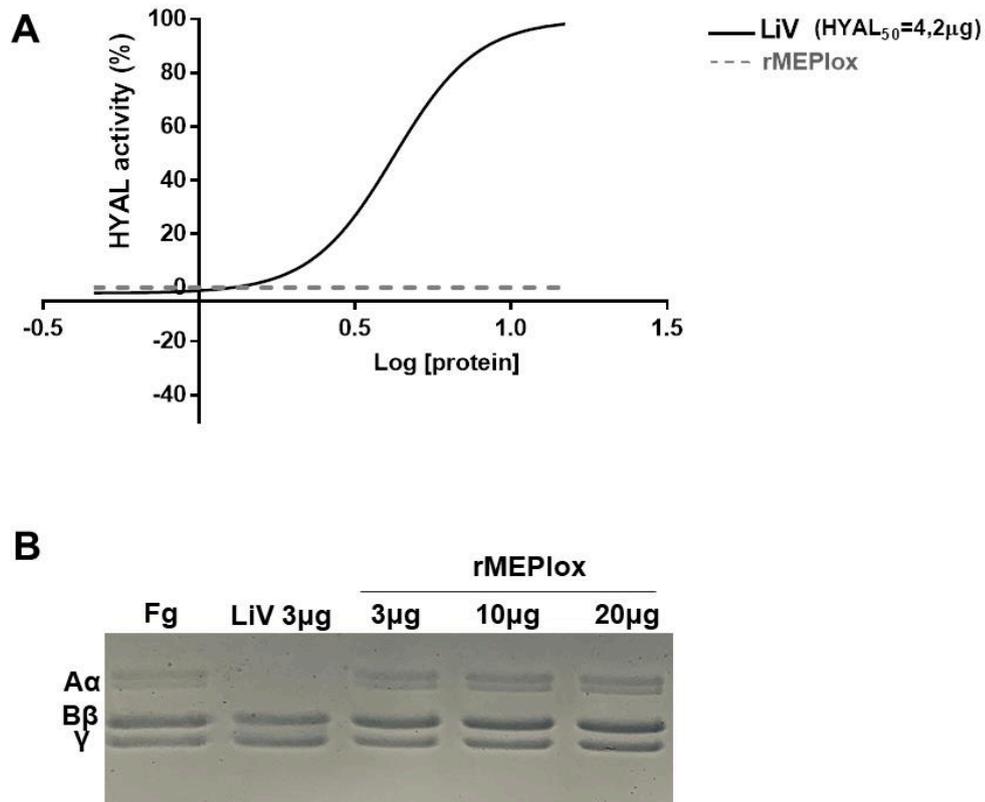


Fig 12. Atividades enzimáticas da rMEP_{Lox}. **A)** Ensaio turbidimétrico para detectar a atividade hialuronidase. Diluições seriadas de rMEP_{Lox} e LiV foram utilizadas para determinar a concentração capaz de degradar 50% do ácido hialurônico na solução teste (HYAL50). **B)** Ensaio fibrinogenolítico para avaliar a atividade proteolítica da rMEP_{Lox}. Na primeira faixa, fibrinogênio (Fg) mostrando as bandas correspondentes às subunidades α , β e γ . A segunda pista mostra Fg previamente incubado com LiV, que foi capaz de degradar completamente a subunidade α . A terceira faixa mostra Fg previamente incubado com rMEP_{Lox}, mostrando bandas de Fg intactas.

4.4. Imunoensaios

A antigenicidade da rMEP_{Lox} foi avaliada por Western blot. Como esperado, rMEP_{Lox} purificada e no extrato bruto, foram reconhecidas como uma banda de 20 kDa pelo anticorpo monoclonal Lox-mAb3 (**Fig. 13**), o qual foi desenvolvido por Costa *et al.*

2020. Este resultado demonstra que a proteína de 20 kDa expressa em condições otimizadas é, de fato, rMEPLox. Para testar a imunogenicidade da proteína recombinante, camundongos BALB/c foram imunizados com 50 µg de rMEPLox. Sete dias após a quarta, oitava e décima segunda doses, os camundongos foram sangrados e os soros foram analisados por ELISA. Todos os animais imunizados produziram anticorpos contra rMEPLox em soro diluído 1/800 (**Fig. 14**). O soro pré-imune (PI) foi usado como controle negativo que não mostrou reatividade contra rMEPLox. Este resultado demonstra reatividade sérica específica contra rMEPLox, sugerindo seu potencial imunogênico.

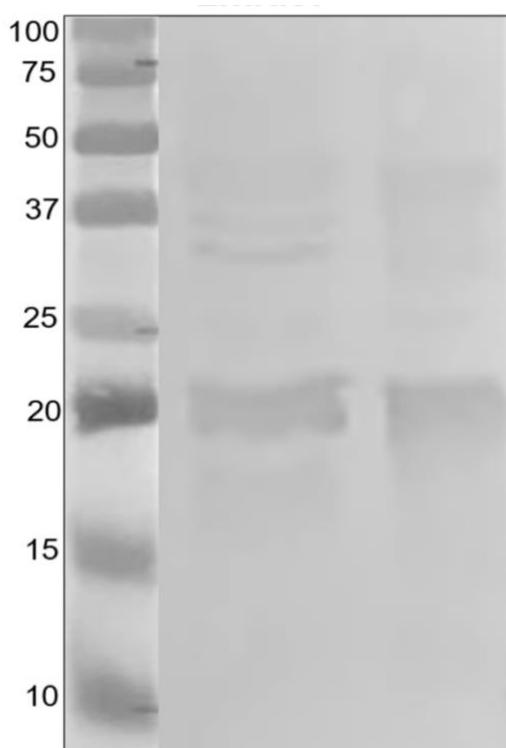


Fig 13. Western blot do extrato bruto e rMEPLox purificada reconhecidos por Lox-mAb3 (0,5 µg / ml). Na primeira faixa, MM: marcador de proteína (kD) (Bio Rad # 1610374). Na segunda faixa, a fração solúvel contendo rMEPLox induzida por 0,6 mM IPTG a 30 °C por 16 h. Na terceira faixa, rMEPLox purificada.

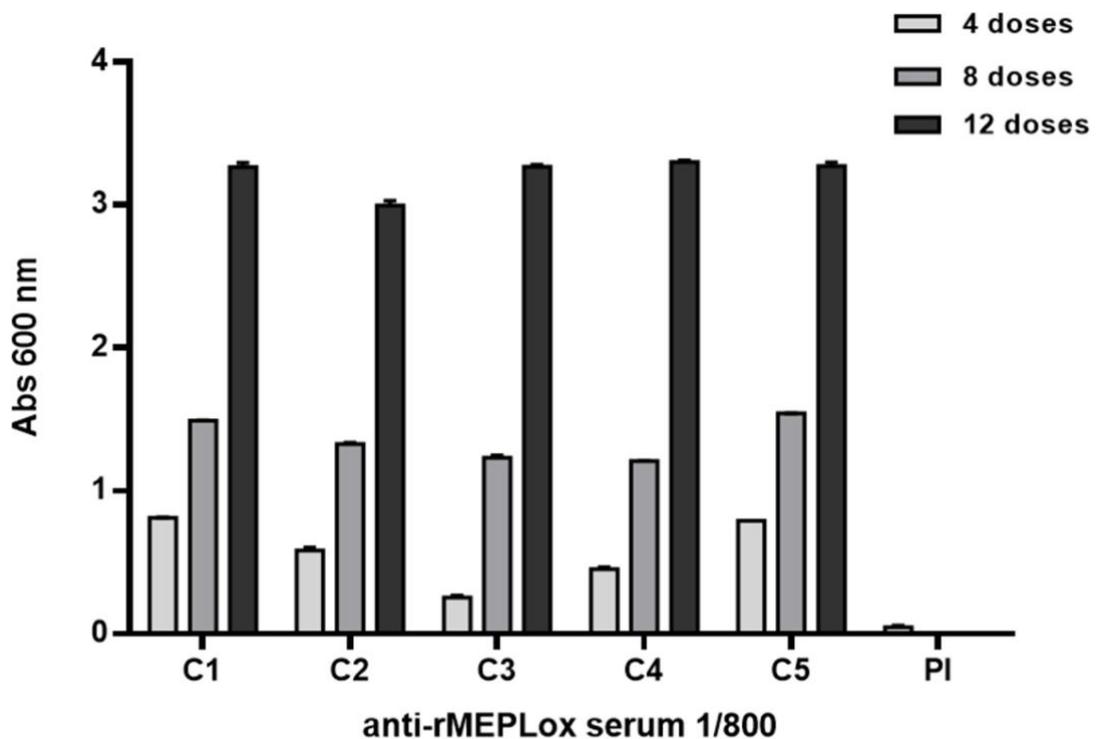


Fig 14. Reatividade entre soros de camundongos e rMEPlox. As placas de ELISA foram sensibilizadas com 0,5 µg/100 µL de rMEPlox. O soro anti rMEPlox foi diluído em 1/800 e o soro pré-imune (PI) (controle negativo) foi diluído em 1/200. Anti- IgG de camundongo conjugada a peroxidase *horseradish* (HRP, Sigma-Aldrich) (diluição 1/10000) foi utilizado como anticorpo secundário.

4.5. Epítopos reconhecidos por anticorpos anti-rMEPlox

Os epítopos da rMEPlox foram mapeados usando o método SPOT. Para isso, foi preparada uma membrana contendo 57 peptídeos de 15 resíduos de aminoácidos (**Tabela 5**) cobrindo a sequência de completa da rMEPlox (Frank 1992). A **Fig. 15B-D** mostra o padrão de reatividade de soros anti-rMEPlox de camundongos 1, 3 e 4, apresentando elevado título de soro (1/400 diluído) para peptídeos ligados à membrana.

Os nove epítomos presentes na composição de rMEPlox foram reconhecidos pelos soros imunes de camundongos, seis deles com a sequência completamente reconhecida, Li Smase Epi 1 (DFSGPYLPSLPTLDA), LALP1 Epi 1 (SLGRGCTDFGILHE), LALP1 Epi2 (ENNTRTIGPFDYDSIMLYGAY), LALP1 Epi 3 (KLYKCPPVNPYPGGIRPYVNV), LID Epi 1(NLGANSIETDVSFDDNANPEYTYHGIP) e LID Epi2 (CKKYENFNDFLKGLR). Os outros epítomos foram parcialmente reconhecidos: LID Epi 3 (NCNKDHLFACW) Li Hyal Epi1 (NGGIPQLGDLKAHLEKSAVDI) e Li Hyal Epi 2 (ILDKSATGLRIIDWEAWR). Os aminoácidos não reconhecidos pelos soros imunes são destacados em negrito. Em contraste, apenas o soro imune do camundongo 3 reconhece o epítomo Li Hyal Epi1 (NGGIPQLGDLKAHLEKSAVDI) (**Fig. 15C**).

Tabela 5. Sequências peptídicas da rMEPlox sintetizadas em uma membrana de celulose.

SPOT sobreposição de sequências de peptídeos		
1	NLGANSIETDVSFDD	20 WGGDFSGPYLPSLPT
2	ANSIETDVSFDDNAN	21 DFSGPYLPSLPTLDA
3	IETDVSFDDNANPEY	22 GPYLPSLPTLDAGGS
4	DVSFDDNANPEYTHY	23 LPSLPTLDAGGSLGR
5	FDDNANPEYTHYGIP	24 LPTLDAGGSLGRGCT
6	NANPEYTHYGIPGGC	25 LDAGGSLGRGCTDFG
7	PEYTHYGIPGGCKKY	26 GGSLGRGCTDFGTIL
8	THYGIPGGCKKYENF	27 LGRGCTDFGTILHEG
9	GIPGGCKKYENFNDF	28 GCTDFGTILHEGGNG
10	GGCKKYENFNDFLKG	29 DFGTILHEGGNGGIP
11	KKYENFNDFLKGLRG	30 <i>TILHEGGNGGIPQLG</i>
12	ENFNDFLKGLRGGNC	31 <i>HEGGNGGIPQLGDLK</i>
13	NDFLKGLRGGNCNKN	32 <i>GNGGIPQLGDLKAHL</i>
14	LKGLRGGNCNKNNDHL	33 <i>GIPQLGDLKAHLEKS</i>
15	LRGGNCNKNNDHLFAC	34 QLGDLEKSAVD
16	GNCNKNNDHLFACWGG	35 DLKAHLEKSAVDIGG
17	NKNNDHLFACWGGDFS	36 AHLEKSAVDIGGILD
18	DHLFACWGGDFSGPY	37 EKSAVDIGGILDKSA
19	FACWGGDFSGPYLPS	38 AVDIGGILDKSATGL
		39 IGGILDKSATGLRII
		40 ILDKSATGLRIIDWE
		41 KSATGLRIIDWEAWR
		42 TGLRIIDWEAWRGGE
		43 RIIDWEAWRGGENNT
		44 DWEAWRGGENNTRTI
		45 AWRGGENNTRTIGPF
		46 GGNNTRTIGPFDYD
		47 NNTRTIGPFDYDSIM
		48 RTIGPFDYDSIMLYG
		49 GPFYDSIMLYGAYG
		50 DYDSIMLYGAYGGKL
		51 SIMLYGAYGGKLYKC
		52 LYGAYGGKLYKCPPV
		53 AYGKLYKCPPVNPY
		54 GKLYKCPPVNPYPGG
		55 YKCPPVNPYPGGIRP
		56 PPVNPYPGGIRPYVN
		57 PVNPYPGGIRPYVNV

Os SPOTs reativos são destacados em cinza. Os peptídeos Li Hyal Epi1 que só foram reconhecidos pelo soro do camundongo 3, também estão em negrito e itálico.

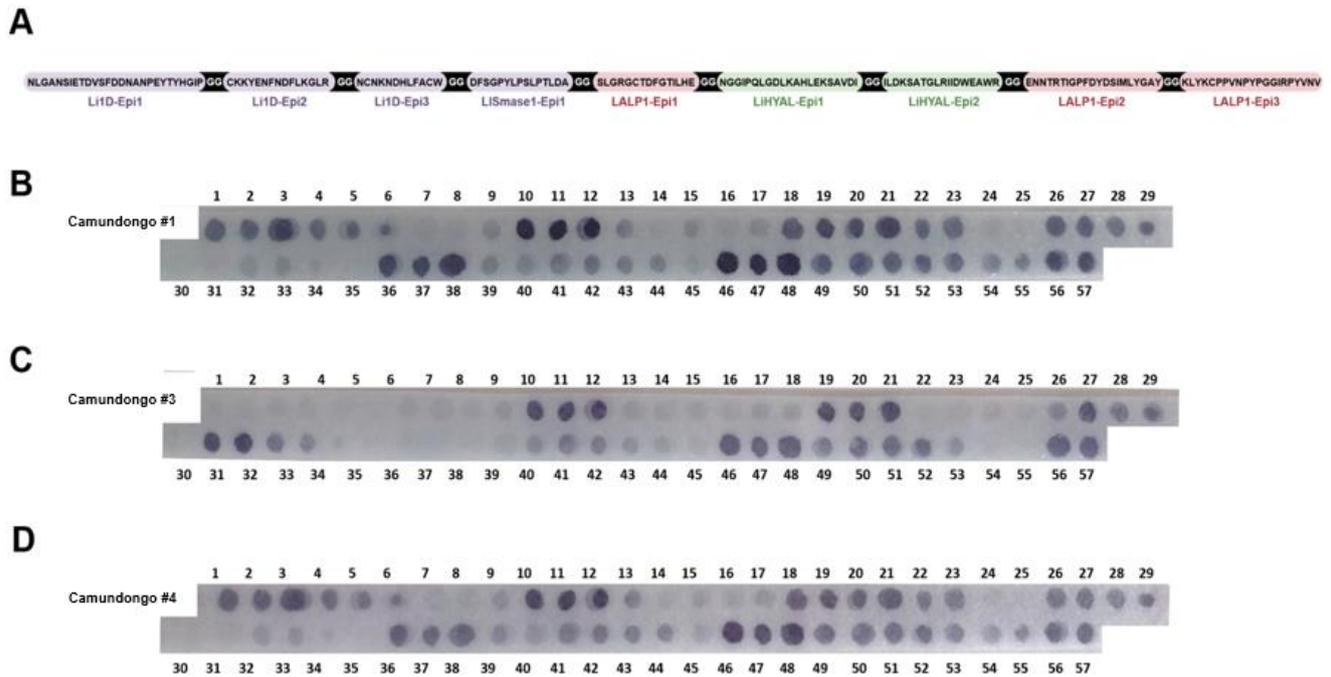


Fig 15. Mapeamento de epítomos reconhecidos pelo soro hiperimune anti-rMEPLox utilizando técnica de SPOT. A) Sequência esquemática da rMEPLox. **B)** Membrana SPOT da rMEPLox incubada com soro de camundongo # 1 (diluição 1/400). O precipitado azul escuro indica manchas reativas. **C)** Membrana SPOT da rMEPLox incubada com soro # 3 de camundongo (diluição 1/400). O precipitado azul escuro indica manchas reativas. **D)** Membrana SPOT da rMEPLox incubada com soro de camundongo # 4 (diluição 1/400). O precipitado azul escuro indica manchas reativas.

4.6. Neutralização da atividade letal

Foi determinada a capacidade da resposta imune gerada por rMEPLox em camundongos vacinados para neutralizar a atividade letal do veneno de *Loxosceles*. Conforme relatado na **Tabela 6**, 40% (2/5) dos camundongos imunizados resistiram ao desafio com 2,5 DL₅₀ de veneno de *L. intermedia*. E quando a dose foi reduzida para 1,5 DL₅₀, os camundongos imunizados foram totalmente protegidos (100% de sobrevivência) (5/5), enquanto todas os camundongos controle morreram com ambas DL₅₀.

Tabela 6. Experimentos de proteção *in vivo*.

<i>Dose de veneno de L. intermedia</i> (DL ₅₀ / 20 g mouse)	Grupo	Sobrevivendo/desafiado(%)
1.5	Controle	0/5 (0)
	Imunizadas	5/5 (100)
2.5	Controle	0/5 (0)
	Imunizadas	2/5 (40)

Grupos de cinco camundongos receberam intraperitonealmente 15 mg/20 g ou 25 mg/20 g de peso de camundongo (1,5 DL₅₀ e 2,5 DL₅₀) de veneno de *L. intermedia*. Os camundongos sobreviventes foram contados 72 h após a injeção.

5. Discussão

O loxoscelismo é uma condição produzida pela picada de aranhas do gênero *Loxosceles* e representa um importante problema para a saúde pública brasileira (Brasil 2021). O veneno das aranhas *Loxosceles* é composto por diferentes toxinas como a Esfingomielinase D, as proteases do tipo Astacina e as Hialuronidases, as quais são responsáveis pelos sintomas do envenenamento humano, como dermonecrose e envenenamento sistêmico (Isbister and Fan 2011; Swanson and Vetter 2006; Vetter 2008). Este último é especialmente perigoso pelas complicações como anemia hemolítica, disfunção renal e coagulopatias que podem levar à morte (Appel *et al.* 2005). Para o tratamento do loxoscelismo, o Ministério da Saúde incentiva o uso do soro antiveneno (Tavares-Neto 2014), o qual é produzido pelo Centro de Pesquisa e Produção de Imunobiológicos no estado do Paraná (CPPI) e pelo Instituto Butantan no estado de São Paulo. Estes soros são produzidos através da imunização de cavalos com o veneno bruto de *Loxosceles spp.* e o fragmento F (ab') 2 das imunoglobulinas é purificado (Butantan n.d.; CPPI - Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos. 2008). No entanto, para os protocolos de imunização é necessária a obtenção de grandes quantidades do veneno de *Loxosceles*. Apenas para a imunização de um cavalo são necessárias cerca de 300 aranhas, as quais exigem infraestrutura especial para sua criação (Calabria *et al.* 2019; Figueiredo *et al.* 2014; Pauli *et al.* 2009). Além disso, o veneno gera efeitos tóxicos nos animais produtores, como úlceras e abscessos, o que compromete a qualidade de vida do animal (Theakston, Warrell, and Griffiths 2003).

Para solucionar esse inconveniente, nosso grupo de pesquisa está interessado em avaliar a possibilidade de substituir o veneno bruto na produção de soro anti toxinas loxoscelicas, por isso foi desenvolvida uma proteína multiepitópica recombinante (rMEPLox) que contém os epítomos das principais toxinas do veneno de *Loxosceles spp.*, (esfingomielinase - D, hialuronidase e metaloprotease semelhante à astacina). Esta proteína é caracterizada pela ausência de toxicidade e pela capacidade de gerar uma resposta imunológica protetora em coelhos imunizados (Lima *et al.* 2018), mas alguns inconvenientes na produção desta proteína, como a presença de corpos de inclusão, dificulta sua extração, além de problemas de solubilidade, presença de peptídeo sinal e baixo rendimento na produção foram observados. Portanto, no presente estudo buscamos otimizar a produção de rMEPLox para sua utilização em programas de imunização em equinos para se obter soro anti-*Loxoscelélico*, visando melhorar os problemas encontrados na produção atual do soro.

A seleção da cepa bacteriana hospedeira apropriada é a primeira etapa na expressão da proteína recombinante. Para atingir este objetivo, o plasmídeo pET26b contendo a sequência rMEPLox foi inserido em três cepas diferentes de *E. coli*. Para a expressão de proteínas heterólogas, as cepas *DE3* de *E. coli* são a primeira escolha quando se trabalha com os plasmídeos pET, que são baseados no promotor T7, pois essas cepas produzem RNA polimerase para este promotor (Kaur, Kumar, and Kaur 2018). Neste estudo de otimização, *C43(DE3)pLysS* produziu níveis mais elevados de proteína solúvel em comparação com outras cepas (Fig. 9A e 10). Desenvolvida por Miroux e Walker em 1996, esta cepa contém duas mutações na região -10 de lacUV5, que permite uma melhor superexpressão de proteínas globulares e de membrana. Esta característica permite que esta cepa expresse proteínas que não podem ser expressas em grandes quantidades na cepa *BL21(DE3)* (Amin *et al.* 2019; Sørensen and Mortensen 2005; Srivastava, Mishra, and Chaudhuri 2019; Walker 1996; Yang *et al.* 2018)

Os resultados obtidos mostram que meios menos suplementados são superiores na expressão de rMEPLox solúvel, especialmente meios 2xTY que suportam maiores quantidades de proteína recombinante solúvel do que meios LB. Quando é aumentada a quantidade de fontes de nitrogênio orgânico (peptona e extrato de levedura), meio SB e TB, obtém-se a quantidade de formas insolúveis de rMEPLox. Isso sugere que a expressão de rMEPLox solúvel é limitada pela concentração da fonte de nitrogênio no meio. Isso poderia ser explicado pela pressão

das fontes de nutrientes nas vias metabólicas modificadas e as funções regulatórias que as bactérias sofrem durante a superexpressão de proteínas heterólogas (Ignatova *et al.* 2003; Tseng and Leng 2012).

A biomassa ideal para iniciar a indução de rMEPLox foi avaliada e os resultados mostraram que a quantidade de proteína recombinante foi maximizada quando o indutor foi adicionado a $OD_{600nm} = 0,4$, que representa a fase exponencial média de crescimento bacteriano (Fazaeli *et al.* 2019). Por outro lado, a melhor concentração de IPTG como indutor foi de 0,6 mM (**Fig. 9C**). Porém, a quantidade de proteína produzida foi semelhante quando se utilizou 1 mM (18,45 mg/L), portanto, a quantidade de 0,6 mM foi selecionada para obter a melhor relação custo-benefício.

O controle da temperatura é um fator importante na redução do estresse e no aumento da solubilidade durante a expressão de proteínas recombinantes no sistema bacteriano. As consequências da redução da temperatura de incubação é a eliminação parcial das proteases de choque térmico induzidas sob condições de superexpressão (Chesshyre and Hipkiss 1989; M. Ferrer *et al.* 2003; Sørensen and Mortensen 2005). Foram avaliadas três diferentes temperaturas de incubação (25, 30 e 37 °C) e de acordo com esses resultados, ao reduzir a temperatura de incubação para 30 °C por 16 h, a quantidade de rMEPLox solúvel produzida foi melhorada (39,84 mg/L). Para comparação, este rendimento cai para 16,46 mg/L (2,42 vezes menos) quando a temperatura de incubação é aumentada para 37 °C (**Fig. 9F**). Essa observação pode ser explicada pelo acúmulo de proteínas recombinantes nos corpos de inclusão, que é consequência da diminuição da estabilidade e do correto dobramento causados por altas temperaturas (Sørensen and Mortensen 2005). Em resumo, as condições ideais para obter grandes quantidades de rMEPlox são usar C43 (DE3) pLysS como cepa hospedeira, meio 2xTY, 0,6 mM IPTG, biomassa de $OD_{600nm} = 0,4$ e incubação a 30 °C por 16 h. (**Tabela 3**).

Como a rMEPLox não apresenta nenhuma atividade enzimática (**Fig. 12**) que possa ser usada para quantificá-la no extrato bacteriano, e técnicas como Bradford e Lowry também reconhecerão proteínas da bactéria, um teste ELISA indireto foi desenvolvido para quantificá-la em solúvel e frações insolúveis antes da purificação. Para reconhecer a proteína recombinante, foi utilizado o anticorpo monoclonal Lox-mAb3, previamente produzido por Costa *et al.* (2020), que reconhece o epítipo LALP1-Epi1 em rMEPLox.

O uso desta metodologia permite a quantificação da rMEPLox produzida em baixo volume de expressão e ressuspensa em baixa quantidade de tampão de extração, ajudando a reduzir a quantidade de reagentes usados para expressão de proteínas e economizando tempo, uma vez que a etapa de purificação não é necessária para quantificar a rMEPLox produzida no extrato bacteriano.

A proteína recombinante produzida foi purificada e submetida à análise de Western blot e comparada com a fração bruta. O anticorpo monoclonal Lox-mAb3 foi usado para confirmar a expressão da proteína. Após a purificação de rMEPLox, apenas uma banda de 20 kDa foi observada em SDS-PAGE 15%, diferente das duas bandas mostradas no estudo de Lima *et al.*, (2018), correspondendo a rMEPLox e rMEPLox com sequência líder pelB. Isso significa que com o protocolo otimizado a rMEPLox foi exportada corretamente para o espaço periplasmático (Singh *et al.* 2013). Além disso, a otimização da expressão de rMEPLox resultou em um aumento de 5,39 vezes (55,29 mg/L) em comparação com a condição não otimizada (10,25 mg/L) (**Tabela 4**).

A rMEPLox otimizada é adequada para desenvolver uma resposta imune humoral em camundongos BALB/c, a qual pode neutralizar a letalidade do veneno de *L. intermedia* em camundongos vacinados. Os camundongos imunizados mostraram maior resistência aos efeitos letais de 2,5 e 1,5 DL₅₀ do veneno bruto, principalmente em 1,5 DL₅₀, onde todos os camundongos imunizados desafiados resistiram. Esses resultados são consistentes com relatos anteriores de animais imunizados com proteínas recombinantes de *Loxosceles*, que mostraram o desenvolvimento de anticorpos protetores capazes de neutralizar os efeitos tóxicos do veneno de *Loxosceles* (Araujo *et al.* 2003; Dias-Lopes *et al.* 2010; Felicori *et al.* 2006; Lima *et al.* 2018). Além disso, os soros de camundongos imunizados produzidos neste trabalho podem reconhecer os epítomos neutralizantes que constituem a rMEPLox. Este resultado apóia o uso de rMEPLox como uma alternativa ao veneno bruto para o desenvolvimento de um novo protocolo de imunização para produzir soro antiveneno em cavalos.

Figueiredo *et al.*, (2014) desenvolveram um novo protocolo de imunização que combina uma dose inicial de veneno bruto com as seguintes doses de uma proteína quimérica recombinante (rCpLi) para imunizar cavalos. Este novo esquema gerou um antiveneno com a mesma reatividade e capacidade de neutralização daqueles relatados para a produção de antiveneno tradicional. Além disso, este esquema de

imunização reduz a quantidade de veneno bruto em 67% e não compromete a qualidade de vida dos cavalos produtores. Como a rMEPLox contém apenas epítopos imunogênicos das principais toxinas do veneno de *Loxosceles* (Costa *et al.* 2020; Lima *et al.* 2018), o uso dessa proteína recombinante juntamente com o esquema de imunização desenvolvido por Figueiredo *et al.*, (2014) e seguido por Duarte *et al.*, (2015) o soro produzido pode ter uma maior especificidade (Duarte *et al.* 2015; Figueiredo *et al.* 2014).

Por outro lado, a oportunidade de iniciar o desenvolvimento de novos anticorpos monoclonais também está aberta. A **Fig. 15C** mostra que o soro do camundongo BALB/c #3 reconhece a sequência Li Hyal-Epi1 que é interessante para a produção de anticorpos monoclonais contra hialuronidase presente no veneno de *Loxosceles*. Nosso grupo já produziu anticorpos monoclonais que neutralizam as atividades de fosfolipases-D e metaloproteases (Alvarenga *et al.* 2003; Costa *et al.* 2020; Dias-Lopes *et al.* 2014). Nesse sentido, é importante produzir um mAb capaz de neutralizar a atividade hialuronidase de *Loxosceles*, uma vez que essa toxina é responsável por aumentar a difusão do veneno e a extensão da lesão (Appel *et al.* 2005; Veiga *et al.* 2000). O uso de uma mistura de mAbs neutralizantes contra as toxinas responsáveis pelos principais sintomas clínicos pode melhorar o uso terapêutico de antivenenos no tratamento do loxoscelismo.

6. Conclusões

Este estudo indicou que a quantidade e a solubilidade de rMEPLox aumentam quando produzida sob um protocolo otimizado, o qual está baseado no uso da cepa *C43(DE3)pLysS*, meio 2xTY, 0,6mM IPTG, biomassa $OD_{600nm} = 0,4$, tempo de incubação de 16 h a 30 °C. O que gera o primeiro passo para o início da produção a grande escala.

A rMEPLox é um antígeno com uso promissor de para a produção de soro antiveneno policlonal e monoclonal.

7. Referências

- Alvarenga, Larissa M. *et al.* 2003. "Production of Monoclonal Antibodies Capable of Neutralizing Dermonecrotic Activity of *Loxosceles Intermedia* Spider Venom and Their Use in a Specific Immunometric Assay." *Toxicon* 42(7): 725–31.
- Amin, Aatif *et al.* 2019. "Expression Purification of Transmembrane Protein MerE

- from Mercury-Resistant *Bacillus Cereus*.” *Journal of Microbiology and Biotechnology* 29(2): 274–82.
- Appel, M. H., R. Berton da Silveira, W. Gremski, and Silvio S. Veiga. 2005. “Insights into Brown Spider and Loxoscelism.” *Invertebrate Survival Journal* 2(2): 152–58.
- Araujo, Simone C. *et al.* 2003. “Protection against Dermonecrotic and Lethal Activities of *Loxosceles Intermedia* Spider Venom by Immunization with a Fused Recombinant Protein.” *Toxicon* 41(3): 261–67.
- van den Berg, Carmen W., R. M. Gonçalves-de-andrade, F. C. Magnoli, and D. V. Tambourgi. 2007. “*Loxosceles* Spider Venom Induces the Release of Thrombomodulin and Endothelial Protein C Receptor: Implications for the Pathogenesis of Intravascular Coagulation as Observed in Loxoscelism.” *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 5(5): 989–95.
- Brasil, Ministério da Saúde. 2021. “Banco de Dados Do Sistema Único de Saúde-DATASUS.” *Banco de dados do Sistema Único de Saúde-DATASUS*.
<http://www.datasus.gov.br>.
- Braz, Adriana *et al.* 1999. “Development and Evaluation of the Neutralizing Capacity of Horse Antivenom against the Brazilian Spider *Loxosceles Intermedia*.” *Toxicon* 37(9): 1323–28.
- Butantan, Instituto. “Bula: Soro Aracnídico (*Loxosceles* e Phoneutria) e Antiescorpiônico.” <http://www.butantan.gov.br/Documents/soro-antiaracnídico-e-escorpiônico.pdf>.
- Calabria, Paula A.L. *et al.* 2019. “Design and Production of a Recombinant Hybrid Toxin to Raise Protective Antibodies against *Loxosceles* Spider Venom.” *Toxins* 11(2): 1–21.
- Chaim, Olga M. *et al.* 2011. “Phospholipase-D Activity and Inflammatory Response Induced by Brown Spider Dermonecrotic Toxin: Endothelial Cell Membrane Phospholipids as Targets for Toxicity.” *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1811(2): 84–96.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbali.2010.11.005>.
- Chaves-Moreira, Daniele *et al.* 2011. “The Relationship between Calcium and the Metabolism of Plasma Membrane Phospholipids in Hemolysis Induced by Brown Spider Venom Phospholipase-D Toxin.” *Journal of Cellular Biochemistry* 112(9): 2529–40.
- . 2017. “Highlights in the Knowledge of Brown Spider Toxins.” *Journal of*

- Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases* 23(1): 1–12.
- . 2019. “Brown Spider (*Loxosceles*) Venom Toxins as Potential Biotools for the Development of Novel Therapeutics.” *Toxins* 11(6).
- Chavez-Olortegui, Carlos *et al.* 1991. “In Vivo Protection against Scorpion Toxins by Liposomal Immunization.” *Vaccine* 9(12): 907–10.
- Chávez-Olórtegui, Carlos *et al.* 1998. “ELISA for the Detection of Venom Antigens in Experimental and Clinical Envenoming by *Loxosceles Intermedia* Spiders.” *Toxicon* 36(4): 563–69.
- Chesshyre, Julian A., and Alan R. Hipkiss. 1989. “Low Temperatures Stabilize Interferon α -2 against Proteolysis in *Methylophilus Methylophilus* and *Escherichia Coli*.” *Applied Microbiology and Biotechnology* 31(2): 158–62.
- Costa, Tamara G.F. *et al.* 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* 162: 490–500. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.176>.
- CPPI - Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos. 2008. “Soro Antiloxoscélico Poliespecífico.” <http://www.saude.pr.gov.br/arquivos/File/CPPI/bulas/loxos.pdf>.
- Dias-Lopes, C. *et al.* 2010. “A Protective Immune Response against Lethal, Dermonecrotic and Hemorrhagic Effects of *Loxosceles Intermedia* Venom Elicited by a 27-Residue Peptide.” *Toxicon* 55(2–3): 481–87.
- . 2014. “Generation and Molecular Characterization of a Monoclonal Antibody Reactive with Conserved Epitope in Sphingomyelinases D from *Loxosceles* Spider Venoms.” *Vaccine* 32(18): 2086–92. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.02.012>.
- Duarte, C. G. *et al.* 2015. “Anti-Loxoscelic Horse Serum Produced against a Recombinant Dermonecrotic Protein of Brazilian *Loxosceles Intermedia* Spider Neutralize Lethal Effects of *Loxosceles Laeta* Venom from Peru.” *Toxicon* 93: 37–40.
- Espino-Solis, G. P., L. Riaño-Umbarila, B. Becerril, and L. D. Possani. 2009. “Antidotes against Venomous Animals: State of the Art and Prospectives.” *Journal of Proteomics* 72(2): 183–99. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2009.01.020>.
- F, Davanzo, and Rebutti I. 2016. “Loxoscelism: Proposal of a New Protocol for

- Treatment." *Journal of Clinical Case Reports* 06(03).
- Fazaeli, Aliakbar *et al.* 2019. "Expression Optimization, Purification, and Functional Characterization of Cholesterol Oxidase from *Chromobacterium* Sp. DS1." *PLoS ONE* 14(2): 1–15.
- Feitosa, Loara *et al.* 1998. "Detection and Characterization of Metalloproteinases with Gelatinolytic, Fibronectinolytic and Fibrinogenolytic Activities in Brown Spider (*Loxosceles Intermedia*) Venom." *Toxicon* 36(7): 1039–51.
- Felicori, L. *et al.* 2006. "Functional Characterization and Epitope Analysis of a Recombinant Dermonecrotic Protein from *Loxosceles Intermedia* Spider." *Toxicon* 48(5): 509–19.
- Ferrer, Manuel *et al.* 2003. "Chaperonins Govern Growth of *Escherichia Coli* at Low Temperatures [2]." *Nature Biotechnology* 21(11): 1266–67.
- Ferrer, Valéria Pereira *et al.* 2013. "A Novel Hyaluronidase from Brown Spider (*Loxosceles Intermedia*) Venom (Dietrich's Hyaluronidase): From Cloning to Functional Characterization." *PLoS Neglected Tropical Diseases* 7(5): 1–12.
- Figueiredo, Luís F.M. *et al.* 2014. "Innovative Immunization Protocols Using Chimeric Recombinant Protein for the Production of Polyspecific Loxoscelic Antivenom in Horses." *Toxicon* 86: 59–67.
- Frank, Ronald. 1992. "Spot-Synthesis: An Easy Technique for the Positionally Addressable, Parallel Chemical Synthesis on a Membrane Support." *Tetrahedron* 48(42): 9217–32.
- Futrell, J. M. 1992. "Loxoscelism." *American Journal of the Medical Sciences* 304(4): 261–67.
- Gomes, Amitha Reena, Sonnahallipura Munivenkatappa Byregowda, Belamaranahally Muniveerappa Veeregowda, and Vinayagamurthy Balamurugan. 2016. "An Overview of Heterologous Expression Host Systems for the Production of Recombinant Proteins." *Advances in Animal and Veterinary Sciences* 4(7): 346–56.
- Gomis-Rüth, F. Xavier. 2003. "Structural Aspects of the Metzincin Clan of Metalloendopeptidases." *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part B Molecular Biotechnology* 24(2): 157–202.
- Gottesman, Susan. 1996. "Proteases and Their Targets in *Escherichia Coli*." *Annual Review of Genetics* 30: 465–506.
- Graumann, Klaus, and Andreas Premstaller. 2006. "Manufacturing of Recombinant

- Therapeutic Proteins in Microbial Systems.” *Biotechnology Journal* 1(2): 164–86.
- Gremski, Luiza Helena *et al.* 2010. “A Novel Expression Profile of the *Loxosceles* Intermedia Spider Venomous Gland Revealed by Transcriptome Analysis.” *Molecular BioSystems* 6(12): 2403–16.
- . 2014. “Recent Advances in the Understanding of Brown Spider Venoms: From the Biology of Spiders to the Molecular Mechanisms of Toxins.” *Toxicon* 83: 91–120. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.02.023>.
- Hogan, Christopher J., Katia Cristina Barbaro, and Ken Winkel. 2004. “Loxoscelism: Old Obstacles, New Directions.” *Annals of Emergency Medicine* 44(6): 608–24.
- Ignatova, Z., A. Mahsunah, M. Georgieva, and V. Kasche. 2003. “Improvement of Posttranslational Bottlenecks in the Production of Penicillin Amidase in Recombinant *Escherichia Coli* Strains.” *Applied and Environmental Microbiology* 69(2): 1237–45.
- Isbister, Geoffrey K., and Hui Wen Fan. 2011. “Spider Bite.” *The Lancet* 378(9808): 2039–47.
- Kaur, Jashandeep, Arbind Kumar, and Jagdeep Kaur. 2018. “Strategies for Optimization of Heterologous Protein Expression in *E. Coli*: Roadblocks and Reinforcements.” *International Journal of Biological Macromolecules* 106: 803–22. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.080>.
- Kemparaju, K., and K. S. Girish. 2006. “Snake Venom Hyaluronidase: A Therapeutic Target.” *Cell Biochemistry and Function* 24(1): 7–12.
- Laune, Daniel *et al.* 2002. “Application of the Spot Method to the Identification of Peptides and Amino Acids from the Antibody Paratope That Contribute to Antigen Binding.” *Journal of Immunological Methods* 267(1): 53–70.
- Lima, Sabrina de Almeida *et al.* 2018. “Recombinant Protein Containing B-Cell Epitopes of Different *Loxosceles* Spider Toxins Generates Neutralizing Antibodies in Immunized Rabbits.” *Frontiers in Immunology* 9(APR).
- Lopes, Priscila Hess, Carla Cristina Squaiella-Baptistão, Mário Octávio Thá Marques, and Denise V. Tambourgi. 2020. “Clinical Aspects, Diagnosis and Management of *Loxosceles* Spider Envenomation: Literature and Case Review.” *Archives of Toxicology* 94(5): 1461–77. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02719-0>.
- LOWRY, O. H., N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR, and R. J. RANDALL. 1951. “Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent.” *The Journal of biological chemistry* 193(1): 265–75. [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)52451-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52451-6).

- Magalhães, Marta R., Nelson Jorge da Silva, and Cirano J. Ulhoa. 2008. "A Hyaluronidase from Potamotrygon Motoro (Freshwater Stingrays) Venom: Isolation and Characterization." *Toxicon* 51(6): 1060–67.
- Málaque, Ceila Maria Sant Ana *et al.* 2002. "Clinical and Epidemiological Features of Definitive and Presumed Loxoscelism in São Paulo, Brazil." *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo* 44(3): 139–43.
- Maria, W. S. *et al.* 2005. "Localization of Epitopes in the Toxins of Tityus Serrulatus Scorpions and Neutralizing Potential of Therapeutic Antivenoms." *Toxicon* 46(2): 210–17.
- Marković-Housley, Zora *et al.* 2000. "Crystal Structure of Hyaluronidase, a Major Allergen of Bee Venom." *Structure* 8(10): 1025–35.
- Mendes, T. M. *et al.* 2013. "Generation and Characterization of a Recombinant Chimeric Protein (RCpLi) Consisting of B-Cell Epitopes of a Dermonecrotic Protein from *Loxosceles Intermedia* Spider Venom." *Vaccine* 31(25): 2749–55. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.03.048>.
- Moffatt, Barbara A., and F. William Studier. 1987. "T7 Lysozyme Inhibits Transcription by T7 RNA Polymerase." *Cell* 49(2): 221–27.
- Nowatzki, Jenifer *et al.* 2012. "Brown Spider (*Loxosceles Intermedia*) Venom Triggers Endothelial Cells Death by Anoikis." *Toxicon* 60(3): 396–405. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.04.333>.
- Oliveira-Mendes, Bárbara Bruna Ribeiro de *et al.* 2020. "From Taxonomy to Molecular Characterization of Brown Spider Venom: An Overview Focused on *Loxosceles Similis*." *Toxicon* 173(September 2019): 5–19.
- Paixão-Cavalcante, Danielle *et al.* 2007. "Tetracycline Protects against Dermonecrosis Induced by *Loxosceles* Spider Venom." *Journal of Investigative Dermatology* 127(6): 1410–18.
- Pauli, Isolete *et al.* 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(6): 660–71.
- Rosano, Germán L., and Eduardo A. Ceccarelli. 2014. "Recombinant Protein Expression in Escherichia Coli: Advances and Challenges." *Frontiers in Microbiology* 5(APR): 1–17.
- Sams, Hunter H., Cory A. Dunnick, Michael L. Smith, and Lloyd E. King. 2001. "Necrotic Arachnidism." *Journal of the American Academy of Dermatology* 44(4):

- 561–76.
- Schenone H., Saavedra T., Rojas A. & Villaroel F. 1989. “Loxoscelismo E N Chile .
Estúdio S Epidemiológicos , Clínico S Y Experimentales.” *31(6)*: 403–15.
- Senff-Ribeiro, Andrea *et al.* 2008. “Biotechnological Applications of Brown Spider
(*Loxosceles* Genus) Venom Toxins.” *Biotechnology Advances* 26(3): 210–18.
- Da Silva, Paulo Henrique *et al.* 2004. “Brown Spiders and Loxoscelism.” *Toxicon*
44(7): 693–709.
- Da Silveira, Rafael B. *et al.* 2007. “Identification, Cloning, Expression and Functional
Characterization of an Astacin-like Metalloprotease Toxin from *Loxosceles*
Intermedia (Brown Spider) Venom.” *Biochemical Journal* 406(2): 355–63.
- Singh, Pranveer *et al.* 2013. “Effect of Signal Peptide on Stability and Folding of
Escherichia Coli Thioredoxin.” *PLoS ONE* 8(5).
- Sørensen, Hans Peter, and Kim Kusk Mortensen. 2005. “Soluble Expression of
Recombinant Proteins in the Cytoplasm of Escherichia Coli.” *Microbial Cell
Factories* 4(Figure 1): 1–8.
- Srivastava, Vishal, Shivam Mishra, and Tapan K. Chaudhuri. 2019. “Enhanced
Production of Recombinant Serratiopeptidase in Escherichia Coli and Its
Characterization as a Potential Biosimilar to Native Biotherapeutic Counterpart.”
Microbial Cell Factories 18(1): 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1267-x>.
- Sterchi, Erwin E., Walter Stöcker, and Judith S. Bond. 2009. “Meprins, Membrane-
Bound and Secreted Astacin Metalloproteinases.” *Molecular Aspects of Medicine*
29(5): 309–28. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mam.2008.08.002>.
- Stoecker, William V., Jonathan A. Green, and Hernan F. Gomez. 2006. “Diagnosis of
Loxoscelism in a Child Confirmed with an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
and Noninvasive Tissue Sampling.” *Journal of the American Academy of
Dermatology* 55(5): 888–90.
- Stoecker, William V., Richard S. Vetter, and Jonathan A. Dyer. 2017. “Not Recluse-a
Mnemonic Device to Avoid False Diagnoses of Brown Recluse Spider Bites.”
JAMA Dermatology 153(5): 377–78.
- Studier, F. William, and Barbara A. Moffatt. 1986. “Use of Bacteriophage T7 RNA
Polymerase to Direct Selective High-Level Expression of Cloned Genes.” *Journal
of Molecular Biology* 189(1): 113–30.
- Swanson, David L., and Richard S. Vetter. 2006. “Loxoscelism.” *Clinics in Dermatology*
24(3): 213–21.

- Tambourgi, Denise V. *et al.* 2000. "Loxosceles Intermedia Spider Envenomation Induces Activation of an Endogenous Metalloproteinase, Resulting in Cleavage of Glycophorins from the Erythrocyte Surface and Facilitating Complement-Mediated Lysis." *Blood* 95(2): 683–91.
- . 2002. "Mechanism of Induction of Complement Susceptibility of Erythrocytes by Spider and Bacterial Sphingomyelinases." *Immunology* 107(1): 93–101.
- . 2005. "Loxosceles Sphingomyelinase Induces Complement-Dependent Dermonecrosis, Neutrophil Infiltration, and Endogenous Gelatinase Expression." *Journal of Investigative Dermatology* 124(4): 725–31.
- Tambourgi, Denise V., Rute M. Gonçalves-de-Andrade, and Carmen W. van den Berg. 2010. "Loxoscelism: From Basic Research to the Proposal of New Therapies." *Toxicon* 56(7): 1113–19. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.01.021>.
- Tavares-Neto, José. 2014. Revista Baiana de Saúde Pública *Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes Por Animais Peçonhentos*.
- Theakston, R. D.G., D. A. Warrell, and E. Griffiths. 2003. "Report of a WHO Workshop on the Standardization and Control of Antivenoms." *Toxicon* 41(5): 541–57.
- Tseng, Chi Ling, and Chih Hsiang Leng. 2012. "Influence of Medium Components on the Expression of Recombinant Lipoproteins in Escherichia Coli." *Applied Microbiology and Biotechnology* 93(4): 1539–52.
- Veiga, Silvio S. *et al.* 2000. "Effect of Brown Spider Venom on Basement Membrane Structures." *Histochemical Journal* 32(7): 397–408.
- Vetter, Richard S. 2008. "Spiders of the Genus *Loxosceles* (Araneae, Sicariidae): A Review of Biological, Medical and Psychological Aspects Regarding Envenomations." *Journal of Arachnology* 36(1): 150–63.
- Vetter, Richard S., and P. Kirk Visscher. 1998. "Bites and Stings of Medically Important Venomous Arthropods." *International Journal of Dermatology* 37(7): 481–96.
- Walker, Bruno Miroux & John E. 1996. "Over-Production of Proteins in Escherichia Coli: Mutant Hosts That Allow Synthesis of Some Membrane Proteins and Globular Proteins at High Levels." *Journal of Molecular Biology* (67): 289–98.
- Wille, Ana Carolina Martins *et al.* 2013. "Modulation of Membrane Phospholipids, the Cytosolic Calcium Influx and Cell Proliferation Following Treatment of B16-F10 Cells with Recombinant Phospholipase-D from *Loxosceles Intermedia* (Brown Spider) Venom." *Toxicon* 67: 17–30. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.01.027>.

Yang, Ge, Kun Yu, Jan Kubicek, and Jörg Labahn. 2018. "Data on Solubilization, Identification, and Thermal Stability of Human Presenilin-2." *Data in Brief* 17: 626–30. <http://dx.doi.org/10.1016/j.dib.2018.01.039>.