

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ISABELLA GIZZI JIACOMINI

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO IMUNOQUÍMICA DE ANTICORPOS ANTI-
TOXINAS LOXOSCELICAS**



CURITIBA

2017

ISABELLA GIZZI JIACOMINI

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO IMUNOQUÍMICA DE ANTICORPOS ANTI-
TOXINAS LOXOSCElicas**

Monografia apresentada à disciplina
Trabalho de Conclusão de Curso II
como requisito à conclusão do
Curso de Biomedicina, Setor de
Ciências Biológicas, Universidade
Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Larissa
Magalhães Alvarenga

Co-orientadora: Profa. Alessandra
Becker Finco

CURITIBA

2017

TERMO DE APROVAÇÃO

ISABELLA GIZZI JIACOMINI

PRODUÇÃO, E CARACTERIZAÇÃO IMUNOQUÍMICA DE ANTICORPOS ANTI-TOXINAS LOXOSCELICAS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Biomedicina da Universidade Federal do Paraná como requisito à obtenção do título de biomédico, pela seguinte banca examinadora:

Profa. Dra. Larissa Magalhães Alvarenga
Orientadora – Departamento de Patologia Básica
Setor de Ciências Biológicas – UFPR

Dra. Flávia Raquel Gonçalves Carneiro
Instituto Carlos Chagas/FIOCRUZ, Curitiba, PR.

Prof. Dr. Silvio Marques Zanata
Departamento de Patologia Básica
Setor de Ciências Biológicas – UFPR

Curitiba, 4 de dezembro de 2017.

AGRADECIMENTOS:

Primeiramente à Deus, meu fiel protetor e amigo ao longo de toda minha vida.

À minha orientadora, Professora Larissa Magalhães Alvarenga, pela contribuição crucial que teve em minha formação como cientista e sobretudo, como pessoa; pela parceria e credibilidade, pelo ensino constante e por me estimular a questionar e enfrentar minhas dificuldades, sempre com serenidade, verdade e otimismo. Aqui deixo minha eterna gratidão.

À minha co-orientadora, Professora Alessandra Becker Finco, que desde o início de minha trajetória me auxiliou e ensinou com muito carinho e paciência, me mostrando o poder da positividade e que sempre há uma luz no fim do túnel.

Ao Professor Philippe Billiald, que mesmo de longe me teve papel fundamental em muitos momentos do meu desenvolvimento profissional, agindo sempre com muito carinho e prontidão.

À Professora Juliana de Moura, pelo carinho, consideração, ensinamentos e amizade todos esses anos.

Aos colegas do laboratório, Guillermo, Sabrina, Camila, Nicolle, Guilherme, Isabel e Carla, pelos ensinamentos, parceria e cooperação.

Aos meus pais, Josias e Helen, meus maiores amigos e incentivadores durante toda minha vida, que me ensinaram o valor da humildade e da honestidade e que muito se esforçaram para que um dia estivesse onde estou.

À minha irmã Isadora, pelo amor incondicional, pelo suporte emocional e por ser verdadeiramente uma irmã.

Aos meus avós Adão e Maria, que apesar de não estarem mais conosco, certamente cuidam de mim lá de cima.

À minha tia Thais, pelo incentivo, fé em minha pessoa, amor incondicional e amizade verdadeira.

Ao meu namorado Felipe, pelo apoio, carinho e paciência durante esse período, torcendo sobretudo pela minha felicidade, com muito amor e altruísmo.

À minha sogra Regina, por tornar esse período tão intenso mais leve e cheio de paz com sua amizade e constante apoio.

Aos meus queridos amigos Adam e Débora, pela amizade verdadeira, suporte e o desejo genuíno pelo meu sucesso e felicidade que sempre demonstraram.

À Rafaela Lenzi Fogaça, pelos ensinamentos, auxílio, amizade, conselhos e companheirismo.

À Luís Felipe Minozzo, pelo cuidado e amizade, pelo lembrete constante da importância do positivismo e pelas sugestões e ideias que sempre alavancaram meu trabalho.

Aos membros da banca, Dra. Flávia Carneiro e Prof. Silvio Zanata, por aceitarem avaliar meu trabalho com muita prontidão e consideração.

À Universidade Federal do Paraná e a todos docentes de Biomedicina, por incentivarem e propiciarem meu crescimento intelectual sempre com muita dedicação e paixão pelo que ensinam.

E por fim, a todos que de alguma forma contribuíram para que isso fosse possível, expresso aqui minha gratidão.

“Foi o tempo que dedicaste à tua rosa que a fez
tão importante”

(Antoine de Saint-Exupéry)

RESUMO

O envenenamento por aracnídeos do gênero *Loxosceles* representa um grave problema de saúde pública no Brasil. Com mais de 100 espécies contidas neste gênero, são consideradas mais importantes do ponto de vista clínico na região da América do Sul a *Loxosceles gaucho*, *Loxosceles intermedia* e *Loxosceles laeta*. Os sintomas derivados da picada dessas aranhas compõem um quadro clínico caracterizado tipicamente por uma síndrome hemolítica-necrótica. Uma parcela dos pacientes também apresenta fortes complicações sistêmicas, desenvolvendo quadros severos de insuficiência renal e conseqüentemente sucumbindo por falência múltipla dos órgãos. O diagnóstico que concerne o Loxoscelismo enfrenta limitações, tendo em vista que muitos casos não são reportados e que os sinais clínicos iniciais podem se mostrar inespecíficos. Dessa maneira, a existência de um imunoenensaio capaz de detectar a presença destas toxinas livres no paciente através da coleta e análise de seus fluidos biológicos se faz necessário. Tendo isso em vista, o presente estudo objetivou a caracterização e o sequenciamento de anticorpos monoclonais derivados dos hibridomas murinos LmAb2 e LmAb12 que reconhecem componentes presentes em venenos loxoscelicos. Resultados demonstraram que os hibridomas permanecem funcionais após seu descongelamento e a obtenção da sequência gênica codificadora da região hipervariável de cadeia leve para o LmAb2 permitiu a confirmação de sua origem murina, bem como predição da estrutura secundária. A obtenção prévia pelo grupo, das sequências das regiões hipervariáveis de cadeia leve e pesada do LmAb12, bem como de seu alvo (através de co-imunoprecipitação/espectrometria de massa), permitiu a realização da análises *in silico* de modelagem e *docking*. Ensaios de caracterização como ELISA e *Western Blotting* revelaram que anticorpos monoclonais secretados pelos hibridomas LmAb2 e LmAb12 apresentaram reatividade aos venenos das espécies de *Loxosceles intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta*, representando uma interessante ferramenta para a melhor compreensão do papel de algumas toxinas no contexto do envenenamento, assim como a utilização futura dos mesmos em ensaios imunodiagnósticos através da sua produção na forma recombinante.

Palavras-chave: *Loxosceles*, recombinante, anticorpo, hibridoma, monoclonal.

ABSTRACT

Envenomation by arachnids of the *Loxosceles* genus represents a great public health concern in Brazil. Even though *Loxosceles* sp. is comprised of more than a hundred species, *Loxosceles gaucho*, *Loxosceles intermedia* and *Loxosceles laeta* are considered to be the most relevant in South America from a clinical point of view. The symptoms derived from the bite of these spiders paint a clinical picture composed primarily by a hemolytic-necrotic syndrome. A number of patients also presents great systemic implications, developing severe kidney insufficiency and consequently multiple organ failure. Nowadays, the diagnosis of Loxoscelism faces limitations, given that many cases aren't reported and the initial symptoms can come to be quite nonspecific. Thus, the existence of an immunoassay capable of detecting the presence of this toxins in the patient's system through the draw and analysis of their biological fluids would be of utter necessity. Taking that into account, the present study aimed to characterize and sequence the monoclonal antibodies derived from the murine LmAb2 and LmAb12 hybridomes. Results show that hybridomes remain functional after thawing and that the obtainment of the sequence of the variable portion of the light chain of the LmAb2 allowed confirmation of its murine origin, and two-dimensional structure prediction. The previous sequencing of the LmAb12 heavy and light chains, carried out by our group, as well as the identification of the amino acid sequence of its probable target (assessed by co-immunoprecipitation/mass-spectrometry), allowed the performance of in silico analysis such as homology modelling and docking. The employment of immunoassays, such as ELISA and Western Blotting, reveal that both monoclonal antibodies display reactivity towards the venoms of *Loxosceles intermedia*, *Loxosceles gaucho* and *Loxosceles laeta* species, representing an interesting tool for an enhanced comprehension of the role played by some toxins in the context of envenomation, as well as future utilization in immunodiagnostic assays and therapy through their recombinant production.

Key words: Loxosceles, recombinant, antibody, hybridome, monoclonal.

LISTA DE FIGURAS:

- Figura 1. A) Transcriptoma do veneno de *Loxosceles intermedia*. Fonte: Gremski et. al, 2010. B) Análise eletroforética dos venenos de *Loxosceles*. Amostras dos venenos contendo 2µg de proteínas de *L. intermedia* (2), *L. gaucho* (3) e *L. laeta* (4) foram submetidas à eletroforese vertical de poliacrilamida em presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) a 12,5% em condições não redutoras, e coradas por prata. Fonte: Adaptado da dissertação de mestrado de Juliani Salvini Ramada. 16
- Figura 2. A) O motivo presente no “nó de cisteína inibidor” consiste em uma folha antiparalela estabilizada por um nó de cisteína. Folhas beta estão mostradas em laranja e 6 resíduos que formam o nó de cisteína estão numerados (1-6). Pontes dissulfeto internas estão representadas em verde, e a ponte dissulfeto mais interna em vermelho. B) O nó de cisteína é composto por um anel formado por duas pontes dissulfeto (em verde) e por seções intermediárias do esqueleto polipeptídico (em cinza), intercruzados por uma terceira ponte dissulfeto (em vermelho) que atravessa o anel para criar um nó (ICK). Fonte: Adaptado de Saez et al., 2010. ... 17
- Figura 3. Representação estrutural da imunoglobulina G e dos diversos formatos de fragmentos recombinantes de anticorpo. Fonte: Adaptado de Fields et. al, 2013. 19
- Figura 4. Fluxograma ilustrativo do panorama dos resultados obtidos. Os resultados estão divididos em parte I (referente ao Lmab2) e parte II (referente ao LmAb12). Em amarelo estão destacados os ensaios previamente realizados pelo grupo..... 28
- Figura 5. Gel de agarose 2% representando as diversas condições testadas para a amplificação da cadeia pesada. É esperado um fragmento na faixa de 350-450 pares de base, conforme observado em 3 e em 5 (controle positivo). Fonte: Acervo pessoal. 30
- Figura 6. Gel de Agarose 2% representando a re-amplificação da cadeia pesada (realizada em duplicata) nas condições estabelecidas em 5.3.2 (temperatura de anelamento 55 °C, 150 mM de MgCl₂ e cDNA proveniente da extração de RNA de out/2016). Fonte: Acervo Pessoal..... 31
- Figura 7. Gel de Agarose 2% representando a amplificação da cadeia leve. Espera-se observar um fragmento na altura de 320-350 pares de base. Vários primers reversos foram testados e amplificação foi observada para os pares de primers utilizados nas reações representadas em 2 (VLFuniv/VLR2), 3 (VLFuniv/VLR4), 4 (VLFuniv/VLR5) e 5 (VLFuniv/VLR6) quando comparados com o controle positivo (6). Fonte: Acervo Pessoal. 31
- Figura 8. Gel de Agarose – Digestão dos amplicons obtidos para cadeia leve com a enzima de restrição BciVI. Indicada por uma seta está a cadeia aberrante observada para o produto VLR2. Para o produto VLR1 não foi observada digestão. Já para os produtos VLR4 e VLR5 nada pode ser afirmado. Fonte: Acervo Pessoal 32
- Figura 9. Gel de Agarose 2% – Representação do PCR de Colônia para Cadeia Leve. Diversas colônias foram testadas e amplificação do inserto contido no plasmídeo das colônias 1 e 2 demonstrou-se na altura esperada para cadeia leve (aprox. 350 pares de base). Fonte: Acervo Pessoal..... 33
- Figura 10. Representação do PCR de Colônia para Cadeia Pesada. Diversas colônias foram testadas e amplificação do inserto contido no plasmídeo das colônias 1, 3 e 4

demonstrou-se na altura esperada para cadeia pesada (aprox. 400 pares de base). Fonte: Acervo Pessoal.....	34
Figura 12. “ <i>Collier de perles</i> ”. Representação bidimensional da região de cadeia leve do LmAb2 em esquema de “colar de pérolas” evidenciando os domínios variáveis da região de cadeia leve (representados de maneira colorida). Em azul está representado o CDR1, em verde claro o CDR2 e em verde escuro CDR3. Obtido através da inserção da sequência representada em 5.6 em um banco de dados de imunoglobulinas (IMGT). Fonte: IMGT – International Immunogenetics Information System.....	36
Figura 13. Isotipagem do LmAb2 realizada a partir do kit comercial IsoStrip (Roche Applied Science). Observa-se caracterização da cadeia leve como <i>kappa</i> (na primeira <i>strip</i>) e de isotipo de imunoglobulina G1 (na segunda <i>strip</i>). Fonte: Acervo Pessoal.....	37
Figura 14. Gráfico representando as reatividades obtidas por ELISA para o sobrenadante celular de LmAb2 e anticorpo LmAb2 purificado frente aos três venenos Loxoscelicos. Como controle positivo foi utilizado o anticorpo LimAb7 (Alvarenga et al, 2003) específico para o veneno de <i>L. intermedia</i> na concentração de 1,25 µg. mL ⁻¹ . O controle negativo foi realizado através da ausência de anticorpo primário. Fonte: Acervo Pessoal.	37
Figura 15. Gráfico representando as reatividades obtidas por ELISA quando diferentes lotes de LmAb2 purificados foram testados frente aos venenos de <i>Loxosceles intermedia</i> , <i>Loxosceles gaucho</i> e <i>Loxosceles laeta</i> . Como controle positivo foi utilizado o anticorpo LimAb7 (Alvarenga et al, 2003) específico para o veneno de <i>L. intermedia</i> na concentração de 1,25 µg. mL ⁻¹ . O controle negativo foi realizado através da ausência de anticorpo primário. Fonte: Acervo Pessoal.	39
Figura 16. Fotografia da revelação das membranas de Western Blotting por ECL. Representado à esquerda está o controle positivo do ensaio (soro equino anti-loxoscelico (SALOX) na diluição de 1:40.000). A revelação do controle positivo foi realizada através de IgG anti-horse diluída 1:30.000 e posterior adição de luminol/H ₂ O ₂ . Representado ao lado do controle positivo está o resultado obtido mediante incubação do anticorpo LmAb2 na concentração de 5 µg.ml ⁻¹ . A revelação foi realizada através de incubação de IgG anti-mouse, diluída 1:4000 e posterior adição de luminol/H ₂ O ₂ . Ambas membranas foram reveladas em filme ultra-sensível. Fonte: Acervo Pessoal.	39
Figura 18. A) Esquemática da membrana de celulose contendo os peptídeos que compõe a sequência linear das fosfolipases Lid1 (<i>L. intermedia</i>), 1xx1 (<i>L. laeta</i>) e A1H (<i>L. gaucho</i>), onde os ensaios de SPOT foram realizados. B) Fotografia do filme ultra-sensível onde revelação da membrana esquematizada em A (quando incubada com LmAb2 purificado na concentração de 1 µg.ml ⁻¹) foi realizada. Spots reativos podem ser observados em preto e em diferentes tons de cinza, com intensidade de cor diretamente proporcional à reatividade. Fonte: Acervo Pessoal.	41
Figura 19. Fotografia da revelação das membranas de SPOT por ECL quando incubadas com IgG anti-mouse-HRP diluído 1:10000. Fonte: Acervo Pessoal.	42
Figura 20. Fotografia da revelação das membranas de SPOT por ECL quando incubadas com 1 µg. mL ⁻¹ do anticorpo anti-Acanthamoeba mAb3 (Becker-finco et al, 2012). Fonte: Acervo Pessoal.....	43

Figura 21. Alinhamento de SPOTs contidos na membrana de celulose (representada na Fig. 18) que demonstraram reatividade frente ao LmAb2. Através do software Clustal Omega, spots reativos foram divididos em clusters de alinhamento de acordo com sua similaridade. Na representação acima, asteriscos representam identidade, “:” representam alta similaridade e “.” similaridade. Fonte: Clustal Omega/EBI-UK.	44
Figura 22. Estrutura tridimensional das fosfolipases contidas na membrana de SPOT, posicionamento tridimensional dos peptídeos mais reativos nestas estruturas e sequência aminoacídica dos peptídeos/spots reativos. Modelos obtidos através do programa PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC). Fonte: Acervo Pessoal.....	46
Figura 23. Alinhamento de SPOT reativos na estrutura tridimensional da fosfolipase 1XX1 de <i>Loxosceles laeta</i> e a medição da distância entre os spots e o sítio catalítico da enzima foram realizados utilizando o programa PyMOL(The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC.. A nomenclatura dos spots está colorida de acordo com sua localização na estrutura tridimensional da proteína. Fonte: Acervo Pessoal.....	47
Figura 24. Alinhamento de SPOT reativos na estrutura tridimensional da fosfolipase A1H de <i>Loxosceles gaucho</i> e a medição da distância entre os spots e o sítio catalítico da enzima foram realizados utilizando o programa PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC). A nomenclatura dos spots colorida de acordo com sua localização na estrutura tridimensional da proteína. Fonte: Acervo Pessoal.....	48
Figura 25. Alinhamento de SPOTS reativos na estrutura tridimensional da fosfolipase Lid1 de <i>Loxosceles intermedia</i> e a medição da distância entre os spots e o sítio catalítico da enzima foram realizados utilizando o programa PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC). Nomenclatura dos spots colorida de acordo com sua localização na estrutura tridimensional da proteína. Fonte: Acervo Pessoal.....	49
Figura 26. A) Gel de agarose 2% representando a amplificação das regiões de cadeia leve e pesada do LmAb12. Observa-se uma banda na altura de 400 pares de base para cadeia pesada e 350 pares de bases para cadeia leve, como esperado. B) Sequenciamento do LmAb12 representado através do <i>collier de perles</i> das cadeias leve e pesada, obtido através do software IMG/QUEST. Fonte: ensaios previamente realizados pelo grupo.	51
Figura 27. Caracterização Imunoquímica do LmAb12 através do ensaio de Western Blot. 10 µg de veneno de <i>Loxosceles intermedia</i> , <i>gaucho</i> e <i>laeta</i> foram transferidos em triplicata para uma membrana e incubados com (i) LmAb12 50 µg. mL ⁻¹ (ii) LimAb7 10 µg. mL ⁻¹ (iii) soro antiloxoscelico - SaLOX (1:50). A revelação foi realizada por IgG anti-mouse HRP (1:4000) e IgG anti-horse (1:30000). O substrato utilizado para observação dos imunocomplexos foi o DAB/Cloronaftol. Fonte: Previamente realizado pelo grupo.	51
Figura 28. Alinhamento entre notinas loxoscelicas descritas por de Castro et al, 2004 e Matsubara et al, 2013 (Litx1, LgTx1a e Lttx1c), realizado através do software Clustal-Omega. Legenda: “*” para resíduos conservados, “:” para resíduos muito similares e “.” para resíduos similares. Fonte: Adaptado de Clustal Omega/EBI-UK	52

- Figura 29. Alinhamento intraspécie entre notinas (Lgtx1a, Litx1 e Lltx1c) e fosfolipases loxoscelicas (A1H, 1xx1 e Lid1). Em destaque estão as regiões onde maior similaridade e identidade foram encontradas. Legenda: “*” para resíduo conservado, “:” para resíduos muito similares e “.” para resíduos similares. Fonte: Clustal Omega/EBI-UK. 53
- Figura 30. Alinhamento entre os motivos encontrados após alinhamento entre fosfolipases e notinas Loxoscelicas representado na Fig. 29. Em destaque está a região onde maior identidade foi encontrada. Legenda: “*” para resíduo conservado, “:” para resíduos muito similares e “.” para resíduos similares. Fonte: Clustal Omega/EBI-UK. 53
- Figura 31. A) Modelo tridimensional de maior score do *docking* entre o LmAb12 e a LiTx1, realizado através do programa ZDOCK, e representação dos contatos aminoacídicos possivelmente envolvidos na interação antígeno/anticorpo (Obtidos através do programa PDBSum). B) Vista aproximada dos contatos amonoacídicos observados na interação antígeno/anticorpo. C) Diagrama representativo e quantitativo dos tipos de interação entre os aminoácidos contidos na LiTX e nas regiões de *loop* do LmAb12. Fonte: Acervo Pessoal/PyMOL/PDBsum 56
- Figura 32. Posicionamento tridimensional da região do motivo de similaridade encontrado entre as fosfolipases e notinas na Fig, 30 (DXSR) na estrutura tridimensional da LiTx1. Observa-se que um contato identificado entre o loop 3 de cadeia leve (Gly-62) e a LiTx1 (Gly 39) esta contido dentro do motivo. A) Orientação 1. B) Orientação 2. Fonte: PyMOL. 59
- Figura 33. Fotografia da revelação da membrana de SPOT em filme ultra-sensível quando incubada com $1 \mu\text{g. mL}^{-1}$ de LmAb12. Fonte: Acervo Pessoal..... 60
- Figura 34. Fotografia da revelação das membranas de SPOT em filme ultra-sensível quando incubadas com $2 \mu\text{g. mL}^{-1}$ de LmAb12. Fonte: Acervo Pessoal..... 60

LISTA DE TABELAS:

Tabela 1. Descrição dos reagentes e respectivas concentrações utilizadas na reação de PCR para amplificação da região hipervariável de cadeia pesada. Fonte: Adaptado de Fields et al, 2013.....	23
Tabela 2. Descrição dos reagentes e respectivas concentrações utilizadas na reação de PCR para amplificação da região hipervariável de cadeia leve. Oito pares de primers (VKREV1-VKREV9) foram testados para amplificação e estão descritos abaixo. Fonte: Adaptado de Fields et al, 2013.	23
Tabela 3. Legenda para interpretação dos resultados do alinhamento de proteínas. Resíduos de amino ácido estão agrupados de acordo com suas características químicas e indicados por cor. Fonte: Adaptado da documentação do programa Clustal-Omega/EBI-UK.	44
Tabela 4. Distância tridimensional entre SPOTs reativos das espécies <i>L. intermedia</i> , <i>L. laeta</i> e <i>L. gaucho</i> (observados na Fig. 18) mensurada através do software PyMOL. Spots de mesma coloração apresentam identidade de sequência aminoacídica (demonstrada na Fig. 21). Fonte: Acervo Pessoal.....	45
Tabela 5. Contatos entre aminoácidos observados nas regiões hipervariáveis de cadeia leve e pesada do LmAb12 e a estrutura da LiTx1 baseadas nos dados extraídos do modelo de docking através do software PDBSum. Também representados estão os tipos de interação envolvidos nos contatos aminoacídicos, resíduos envolvidos sua distância (em angstroms). Fonte: Acervo Pessoal.....	57

LISTA DE ABREVIATURAS:

- AP – Fosfatase Alcalina ou Alkaline Phosphatase
- cDNA – DNA complementar
- CDR – *Cluster differentiation regions* ou regiões hipervariáveis
- DAB – Diaminobenzil
- DEPC – Dietil pirocarbonato
- DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
- DMSO – Dimetilsulfóxido ou Sulfóxido de dimetilo
- DNA – Ácido Desoxirribonucleico
- DNF – Fator Dermonecrótico do veneno de *Loxosceles intermedia*
- EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético
- ELISA – *Enzyme Linked Immunoabsorbance Assay*
- FR – Regiões de *Framework*
- HRP – *horseradich peroxidase* ou peroxidase de rábano silvestre
- ICK – *inhibitor cystein knot* ou nó inibidor de cisteína
- IgG – Imunoglobulina tipo G
- IPTG - Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosideo
- LPA – Ácido Lisofosfatídico
- mAb – *Monoclonal antibody* ou anticorpo monoclonal
- OPD – O-phenilenediamina
- pAb – *Polyclonal antibody* ou anticorpo policlonal
- PBS – *Phosphate Buffered Saline* ou tampão fosfato salino
- PCR – Reação em cadeia da polimerase
- pPI – Proteína L de *Streptococcus magnus*
- rLid 1 – Toxina dermonecrótica recombinante de *Loxosceles Intermedia 1*
- RNA – Ácido Ribonucleico
- RT-PCR – Reação em cadeia da polimerase por transcrição reversa
- scFv – *Single chain variable fragment* ou fragmento variável de cadeia única
- SDS – Dodecil sulfato de sódio
- TBS – Tris Buffered Saline ou tampão salino Tris

VH – *Variable Heavy Chain* ou Cadeia Pesada

VL – *Variable Light Chain* ou Cadeia Leve

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. OBJETIVOS	12
2.1. Objetivos Gerais	12
2.2. Objetivos Específicos	12
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
3.1. Loxoscelismo	13
3.2. Toxinas presentes no veneno Loxoscelico:	14
3.3. Toxinas de Baixa Massa:	16
3.4. Diagnóstico do Loxoscelismo:	17
3.5. Anticorpos monoclonais, policlonais e anti-venenos:	18
4. MATERIAIS E MÉTODOS	21
4.1. Produção e purificação do anticorpo monoclonal LmAb2	21
4.2. Caracterização dos Anticorpos Monoclonais Murinos	21
4.2.1. Sequenciamento das regiões hipervariáveis de Cadeia Leve (VL) e Cadeia Pesada (VH) de imunoglobulinas (IgG) do hibridoma secretor:	21
4.2.2. Clonagem e Transformação:	24
4.3. Sequenciamento	24
4.4. Análises Bioinformáticas	25
4.5. ELISA (Enzyme-linked Immunoabsorbance Assay)	25
4.5.1 Caracterização do anticorpo monoclonal LmAb2	25
4.6 SDS-PAGE/Western Blot	26
4.7 <i>SPOT Synthesis</i> /Mapeamento de Epítomos para Fosfolipases D:	26
4.7.1 Regeneração das membranas:	27
4.8. <i>Docking</i> mAb12/LiTx1:	27
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO (PARTE 1):	29
5.1. Produção do anticorpo monoclonal LmAb2	29
5.2. Extração de RNA/RT-PCR	29
5.3. Amplificação de VH e VL por PCR	29
5.3.1 Cadeia Pesada:	29
5.3.2. Re-amplificação da cadeia pesada em novas condições:	30
5.3.3 Cadeia Leve:	31
5.4. Digestão dos produtos de VL com BCiVI:	32
5.5. PCR de Colônia e MINIPREP	33
5.5.1. PCR de Colônia para transformantes com a Cadeia Leve	33
5.5.2. PCR de Colônia para transformantes com a Cadeia Pesada:	33
5.5.3. Rendimento do MINIPREP – dosagem <i>nanodrop</i> TM	34
5.6. Sequenciamento	34
5.7. Caracterização Imunoquímica do LmAb2	36
5.7.1. Isotipagem do LmAb2:	36
5.7.2. ELISA para caracterização do LmAb2 frente aos venenos de Loxosceles:	37
5.7.3. ELISA para avaliação do perfil de reconhecimento de diferentes lotes de LmAb2 frente aos venenos de Loxosceles:	38
5.8. Western Blotting:	39

5.9. SPOT SYNTHESIS	40
5.10. Análise <i>in silico</i> dos epítomos reconhecidos pelo LmAb2:	43
5.10.1. Alinhamento dos peptídeos/spots reconhecidos pelo LmAb2	43
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO (PARTE 2):	50
6.1. Caracterização do LmAb12 e Espectrometria de Massa:	50
6.1.1. Estudos de similaridade entre notinas loxoscelicas:	51
6.1.2. Estudos de similaridade entre notinas e fosfolipases loxoscelicas:.....	52
6.2. Modelagem molecular e <i>docking</i>:	54
6.2.1. Interações entre aminoácidos:.....	56
6.2.2. Posicionamento do motivo DGSK/DCSR no modelo de <i>docking</i> :	57
6.3. SPOT Synthesis/Mapeamento de Epítomos do LmAb12:	59
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS:	61
8. PERSPECTIVAS FUTURAS	63
9. REFERÊNCIAS	65

1. INTRODUÇÃO

O envenenamento por aracnídeos do gênero *Loxosceles* representa um grave problema de saúde pública no Brasil. Anualmente, 50% dos casos de envenenamento por picadas de aranha se atribuem às espécies contidas nesse gênero. Apesar de apresentar aproximadamente 130 espécies, são consideradas mais importantes do ponto de vista clínico na região da América do Sul as espécies *Loxosceles gaucho*, *Loxosceles intermedia* e *Loxosceles laeta*. Os sintomas derivados da picada dessas aranhas caracterizam uma síndrome hemolítica-necrótica, composta principalmente por uma isquemia prolongada no local da picada, podendo acarretar em consequente necrose do tecido da região onde houve inoculação do veneno com o passar dos dias. Uma parcela dos pacientes também pode apresentar complicações em relação a esse quadro inicial, desenvolvendo quadros severos de hemólise e insuficiência renal.

O veneno é representado por uma mistura complexa de componentes, nem todos completamente investigados, ou tiveram seu papel elucidado no contexto do envenenamento. Outro desafio para o o Loxoscelismo é o diagnóstico, que enfrenta limitações tendo em vista que os sinais clínicos iniciais podem se mostrar inespecíficos e muitas vezes a picada não é percebida, de maneira que quando manifestações mais severas ocorrem pode ser muito tarde para alguma intervenção específica. Dessa maneira, se faz necessário o estudo e caracterização de ferramentas que permitam o melhor entendimento do mecanismo de ação do veneno, como também o desenvolvimento de ensaios com capacidade de detectar a presença destas toxinas no paciente de maneira precoce e específica.

Imunoglobulinas G são estruturas compostas por duas cadeias leves idênticas, cada uma com domínios constantes e variáveis e por duas cadeias pesadas, também idênticas, compostas por um domínio variável e dois domínios constantes, e habitualmente empregadas como ligantes específicos, amplamente utilizadas na detecção e estudo de diferentes moléculas. Atualmente, técnicas de engenharia genética permitem a manipulação das sequências destas imunoglobulinas favorecendo o desenvolvimento do desenho de uma gama de diferentes formatos de fragmentos de anticorpos, incluindo os scFvs, Fabs e diabodyds. Estes fragmentos podem

consequentemente sofrer modificações químicas e genéticas, para ajuste de sua afinidade, imunogenicidade e meia vida.

A produção de fragmentos variáveis de cadeia única específicos para toxinas presentes nos venenos de serpente, de escorpião, como também para toxinas presentes no veneno da aranha *Loxosceles intermedia*, este último realizado pelo nosso grupo, nos encoraja à obtenção destas moléculas recombinantes tendo em vista o potencial de empregabilidade de tais moléculas no diagnóstico e tratamento dos envenenamentos.

Dois anticorpos monoclonais murinos (LmAb2 e LmAb12) produzidos pelo nosso grupo, apresentam capacidade de reconhecer não somente o veneno de *L. intermedia*, como também componentes presentes nos venenos de *L. gaucho* e *L. laeta*. Todavia, estes ainda não foram caracterizados quanto ao seu potencial neutralizante, bem como em formatos recombinantes.

Considerando-se o potencial inovador e a eficácia dos fragmentos de anticorpos recombinantes, esse projeto objetiva em um primeiro momento caracterizar esses anticorpos e propor o emprego de tais moléculas no diagnóstico do loxoscelismo.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos Gerais

Caracterização imunoquímica e funcional dos anticorpos monoclonais LmAb2 e LmAb12.

2.2. Objetivos Específicos

- Caracterizar o perfil de interação do anticorpo monoclonal LmAb2 com os venenos Loxoscelicos através de imunoenaios, como *Western Blotting* e ELISA.
- Determinar o possível sitio de ligação do LmAb2 e LmAb12 às fosfolipases e às notinas presentes no veneno de *Loxosceles* sp. através do mapeamento de epítomos, empregando a técnica de Spot Synthesis.
- Obter a sequência das regiões hipervariáveis de cadeia leve e pesada do anticorpo monoclonal LmAb2.
- Através dos dados de sequência e espectrometria previamente obtidos para o LmAb12, realizar análises *in silico* de modelagem e *docking*.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Loxoscelismo

Descrito por Heineken e Lowe em 1832 (Lucas et al, 2015) o gênero *Loxosceles* (*Araneae, Sicariidae*) é composto por aproximadamente 130 espécies descritas. Segundo o Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), somente no ano de 2015, foram reportados 26,298 casos de envenenamento por aracnídeos oriundos deste gênero, incluindo 30 óbitos. As aranhas marrons, como são popularmente chamados, podem ser encontradas em locais secos e inóspitos, geralmente em estruturas de madeira e em pilhas de folhas. No entanto, essas aranhas também se adaptaram à vida doméstica, geralmente presentes dentro das roupas, sapatos e armários. No América do Norte, as espécies responsáveis pelo envenenamento são principalmente *Loxosceles reclusa*, *Loxosceles desertica* e *Loxosceles arizonica*. Já na América do Sul, as espécies consideradas mais importantes do ponto de vista clínico são a *Loxosceles intermedia*, *Loxosceles gaucho* e *Loxosceles laeta* (Chaim et al, 2011).

Os sinais e sintomas consequentes da inoculação do veneno destes animais caracterizam o quadro do Loxoscelismo. Um tanto assintomático em um primeiro momento, pode apresentar complicações que envolvem desde necrose dérmica no local da picada (loxoscelismo cutâneo simples), até falência múltipla de órgãos (loxoscelismo sistêmico). Casos nos quais as lesões dermonecroticas irradiam-se gravitacionalmente para os tecidos adjacentes caracterizam o loxoscelismo cutâneo complicado (Rojas et al, 2017). Já o loxoscelismo cutâneo-víscero-hemolítico ou sistêmico é menos frequente, (ocorrendo em aproximadamente 13% dos casos) afetando em maior parte crianças e caracterizado por manifestações como distúrbios de coagulação (coagulação intravascular disseminada e hemólise intravascular) e falência renal levando as vítimas à óbito, caso não tratadas (Hogan et al, 2004). Os efeitos do veneno variam de acordo com a espécie que provoca o envenenamento em questão e com o organismo da vítima, todavia, o perfil sintomático principal se mantém devido à mistura de toxinas que compõe os venenos desse gênero (Ticona et al, 2006).

O tratamento das vítimas de envenenamento tipicamente se faz pela administração do soro anti-veneno e corticosteroides. Quanto mais cedo for iniciado o tratamento, melhor será o prognóstico do paciente (Pauli et. al. 2009). O soro anti-loxoscelico é tipicamente produzido em equinos. Os animais recebem um *pool* de venenos das três espécies de maior relevância clínica (*Loxosceles intermedia*, *Loxosceles gaucho* e *Loxosceles laeta*) e mediante à imunização produzem um soro contendo anticorpos policlonais capazes de neutralizar venenos das três espécies mencionadas acima. Todavia, o soro deve ser administrado no máximo até 72 horas após o incidente para que haja melhora no prognóstico do paciente.

Entretanto, a terapia com anti-soro pode ocasionar reações anafiláticas provenientes da administração do soro equino hiperimune ou ainda reações tardias de hipersensibilidade tipo III, conhecidas como doença do soro. Tendo em vista esta problemática, estudos experimentais recentes estão caminhando na direção do estímulo de uma resposta imune protetora contra os efeitos adversos do veneno através da administração de peptídeos miméticos às toxinas, ou ainda terapia passiva pelo emprego de anticorpos monoclonais e recombinantes com potencial de neutralização das toxinas dermonecróticas (Malaque et al, 2011, Silva et al, 2016).

3.2. Toxinas presentes no veneno Loxoscelico:

Os principais componentes estudados presentes nas toxinas Loxoscelicas são as esfingomelinases ou fosfolipases D. Estudos recentes mostram que aproximadamente 20% do transcriptoma do veneno de *Loxosceles intermedia* corresponde a sequências codificadoras de fosfolipases D e que uma única espécie é capaz de produzir variadas isoformas da enzima (Gremski et al, 2010). A massa molecular de tais enzimas varia entre 29-34 kDa, e sua atividade catalítica consiste na hidrólise de esfingomiélna e outros glicerofosfolipídeos encontrados nas membranas celulares. Em geral, as fosfolipases são encontradas também no organismo de mamíferos em suas variadas isoformas. O tipo de fosfolipase é determinado pela posição onde ocorre quebra da ligação éster no glicerofosfolipídeo. As fosfolipases D realizam essa clivagem na ligação fosfo-diéster terminal da fosfatidilcolina.

Os produtos dessa reação, o ácido lisofosfatídico (LPA) e a ceramida-1-fosfato, apresentam ampla atividade biológica, sendo capazes de desencadear uma gama de respostas celulares dentre proliferação e migração celular, produção de mediadores inflamatórios como prostaglandinas, ativação do fator de transcrição $\text{Nf}\kappa\text{B}$ e fibrose tecidual (Frohman et al, 2015).

Após análises cristalográficas das fosfolipases loxoscelicas, estas foram classificadas de acordo com a composição química de seu sítio catalítico, sendo divididas em classes I em II. As fosfolipases Classe I são encontradas em *Loxosceles intermedia* e apresentam uma ponte dissulfeto e uma alça hidrofóbica (Ullah et al., 2011). Já as Classe II, encontradas em *Loxosceles gaucho* apresentam uma ponte dissulfeto adicional que estabiliza essa alça hidrofóbica e torna o sítio catalítico mais ocluído (Ullah et al, 2014). Supõe-se que se o sítio ativo de uma fosfolipase estiver mais exposto (possuir menos pontes dissulfeto) – característica derivada de sua composição aminoacídica – sua atividade biológica será mais expressiva.

Outras toxinas presentes no veneno foram identificadas em estudos de transcriptoma das glândulas de veneno de *Loxosceles sp.* Entre elas estão as proteases hialuronidase e serinoprotease, toxinas de baixa massa ou notinas, o fator liberador de histamina e lecitinas tipo-C que atuam em conjunto com as fosfolipases D na geração das manifestações clínicas típicas do envenenamento (Chaves-Moreira et al,2017).

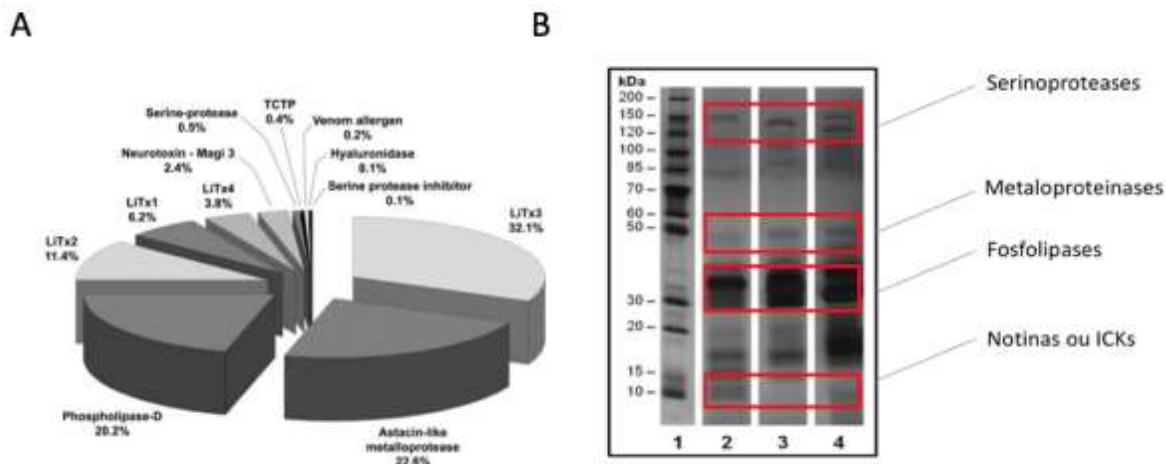


Figura 1. A) Transcriptoma do veneno de *Loxosceles intermedia*. Fonte: Gremski et al, 2010. B) Análise eletroforética dos venenos de *Loxosceles*. Amostras dos venenos contendo 2µg de proteínas de *L. intermedia* (2), *L. gaucho* (3) e *L. laeta* (4) foram submetidas à eletroforese vertical de poliacrilamida em presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) a 12,5% em condições não redutoras, e coradas por prata. Fonte: Adaptado da dissertação de mestrado de Juliani Salvini Ramada.

3.3. Toxinas de Baixa Massa:

Um estudo de Gremski et al, 2010, revelou que 43,5% das ESTs (“*Expression Sequence Tags*”) encontradas na glândula de veneno de *L. intermedia* eram codificadoras de toxinas presentes no veneno. Dentre essas ESTs codificadoras de toxinas, 54,9% correspondiam à peptídeos ICK (do inglês, *Inhibitor Cystine Knot*) e resultados obtidos quando realizado o proteoma do veneno de *L. intermedia* corroboram com alta expressão desses transcritos (Trevisan-Silva, 2017).

Também denominados de notinas (do inglês *knottins*), esses peptídeos apresentam massa molecular variando de 5,6 a 7,9 kDa e são caracterizados pelas propriedades neurotóxicas exibidas em canais iônicos e receptores expressos no sistema nervoso central de insetos e mamíferos, apresentando atividade inseticida já reportada contra pragas de interesse econômico como *Spodoptera frugiperda* e *Spodoptera cosmioides* (Gremski et al, 2010).

Já descritos na literatura para *Loxosceles intermedia* são os peptídeos ICK LiTx1, LiTx2, LiTx3 (de Castro et al, 2004), LiTx4 (de Moura et al, 2006), U₂-SCRTX-Li1b (Matsubara et al, 2013), LgTx1a, LgTx1b e LiTx1(a-f) (Matsubara et al, 2017). Através da clonagem desses peptídeos por Gremski et al, 2010, a presença de um grande número de resíduos de cisteína pode ser observada na sua estrutura. Esses resíduos apresentam capacidade de estabelecer pontes dissulfeto intracadeia, se organizando e compondo um motivo estrutural por nome de “nó de cisteína inibidor” ou (do inglês, *Inhibitor Cystine Knot*). Esse motivo tem como característica 10 cadeias do tipo β antiparalelas estabilizadas por um nó de cisteína (Figura 2). Devido a essa conformação, os peptídeos ICK são também denominados notinas (do inglês, “*knottins*”).

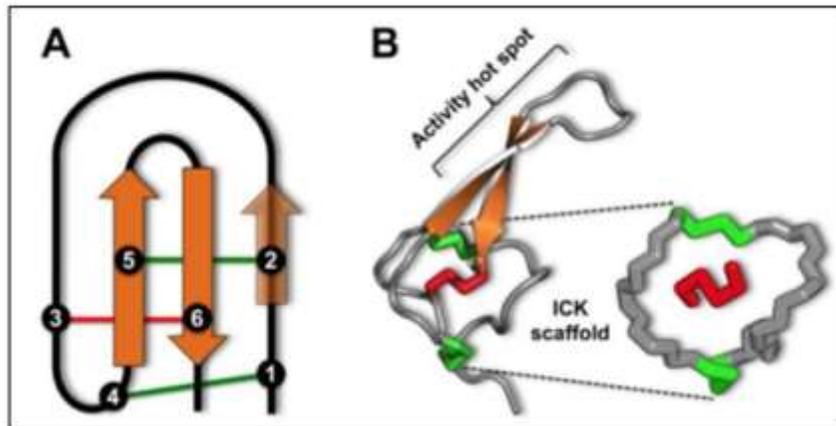


Figura 2. A) O motivo presente no “nó de cisteína inibidor” consiste em uma folha antiparalela estabilizada por um nó de cisteína. Folhas beta estão mostradas em laranja e 6 resíduos que formam o nó de cisteína estão numerados (1-6). Pontes dissulfeto internas estão representadas em verde, e a ponte dissulfeto mais interna em vermelho. B) O nó de cisteína é composto por um anel formado por duas pontes dissulfeto (em verde) e por seções intermediárias do esqueleto polipeptídico (em cinza), inter cruzados por uma terceira ponte dissulfeto (em vermelho) que atravessa o anel para criar um nó (ICK). Fonte: Adaptado de Saez et al., 2010.

Considerando o potencial de interação das notinas com canais iônicos, existe um interesse na utilização destas toxinas em estudos acerca dos canais com as quais interagem e avaliar se as mesmas participam de forma isolada ou sinergicamente com as outras toxinas, já bem caracterizadas, no contexto do envenenamento. Adicionalmente, o fato de muitas notinas apresentarem atividade inseto-específica cria a possibilidade de exploração destas, visando sua utilização na como bioinseticidas para o controle de pragas de interesse econômico na agricultura ou mesmo em saúde pública, na ótica de controle de insetos vetores de doenças.

3.4. Diagnóstico do Loxoscelismo:

Atualmente, não existem registros de um diagnóstico laboratorial para o Loxoscelismo, sendo o respectivo geralmente realizado clinicamente através da análise morfológica de lesões cutâneas aparentes e na subsequente evolução do quadro clínico. Na maioria dos casos, um diagnóstico afirmativo não pode ser realizado, tendo em vista que a maioria dos pacientes não traz o animal ao hospital para sua identificação (Stoecker et al, 2006).

O aparecimento de lesões cutâneas necróticas é o sinal usualmente utilizado para o diagnóstico, todavia, não é específico aos casos de envenenamento por *Loxosceles* sp., podendo estar presente em uma variedade de outras condições. Na situação da ausência dos sintomas usuais, o diagnóstico do Loxoscelismo se complica ainda mais, tornando-se um desafio para o clínico e um perigo eminente para a vítima acidentada.

Considerando-se isto, o desenvolvimento de um ensaio diagnóstico de maior especificidade e objetividade é de grande interesse e importância e é nesse sentido que o emprego de moléculas de anticorpos anti-veneno tem sido estudado (Alvarenga et al, 2003, Jacomini et al, 2013).

3.5. Anticorpos monoclonais, policlonais e anti-venenos:

Imunoglobulinas G são proteínas heterodiméricas compostas por duas cadeias leves (L) e duas cadeias pesadas (H), estas podendo ser funcionalmente divididas em domínios variáveis (que interagem diretamente com o antígeno) e domínios constantes (responsáveis pela sua função efetora). Em relação à sua origem, podem ser policlonais (originadas de diferentes clones de linfócitos B e específicas para diferentes epítomos de um mesmo antígeno) ou monoclonais (originadas de um único clone de linfócito B e específicas para somente um epítomo antigênico) (Schroeder et al, 2011).

A produção de anticorpos monoclonais juntamente com o emprego da engenharia molecular, vem possibilitando o desenvolvimento e construção de fragmentos recombinantes de anticorpos a partir do conhecimento das sequências dos mesmos. Esses avanços são refletidos no número elevado de anticorpos monoclonais e recombinantes utilizados atualmente no tratamento e diagnóstico de doenças inflamatórias, cardiovasculares, infecciosas e tumorais (Chow e Casadevall, 2012).

No contexto do loxoscelismo, alguns anticorpos monoclonais já foram produzidos e ainda vem sendo caracterizados. Alvarenga et al, 2003 produziram um anticorpo monoclonal murino LiMab7, o qual foi capaz de detectar e neutralizar toxinas loxoscelicas, no entanto apresentou especificidade somente para componentes presentes no veneno da aranha *L. intermedia*. Já no estudo de Dias-Lopes, 2014,

visando a produção de anticorpos monoclonais, animais foram imunizados com uma forma recombinante das fosfolipases D, presente no veneno de *L. intermedia* (rLid1). Dos dezessete clones selecionados, um clone demonstrou reatividade cruzada para a fração total dos três venenos de *Loxosceles* (*L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta*) e encorajador potencial neutralizante em ensaios de desafio com a rLid1.

Apesar de utilizados em larga-escala, anticorpos monoclonais apresentam algumas desvantagens. Sua produção pode apresentar obstáculos quando os mesmos têm necessidade de utilização em grandes quantidades. A produção de anticorpos monoclonais a partir da tecnologia de hibridoma além de minuciosa, é dispendiosa e requer investimentos constantes em cultivo celular para que se mantenham vivas e estáveis as linhagens secretoras destes anticorpos (Fields et al, 2013).

Com os recentes adventos da engenharia genética, tornou-se possível a produção recombinante de moléculas de anticorpo no formato de fragmentos variáveis de menor tamanho e em diferentes configurações, nos mais variados sistemas biológicos. Os fragmentos únicos de cadeias variáveis (scFv) são pequenas estruturas que possuem habilidade de se ligar à um antígeno específico. Eles consistem do domínio variável da cadeia pesada (VH) unido ao domínio variável da cadeia leve (VL) por um ligante peptídico que assegura sua estabilidade estérica e flexibilidade. (Aubrey et al., 2003).

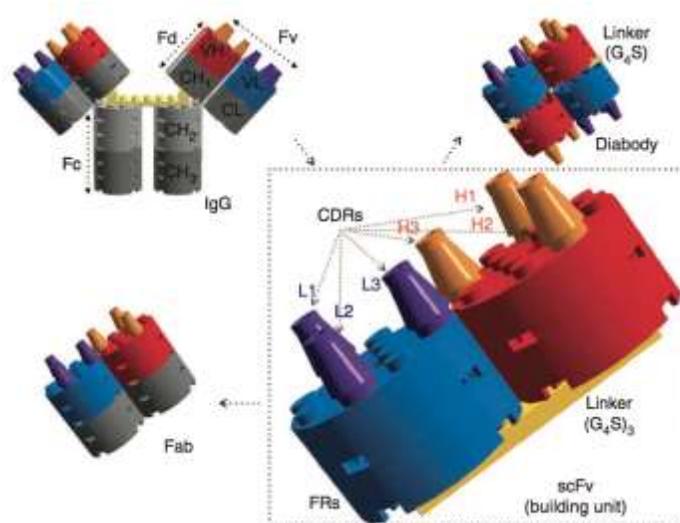


Figura 3. Representação estrutural da imunoglobulina G e dos diversos formatos de fragmentos recombinantes de anticorpo. Fonte: Adaptado de Fields et. al, 2013.

A produção de fragmentos variáveis de cadeia única específicos para toxinas presentes nos venenos de serpente (Roncolato et al., 2013) e da aranha *Loxosceles intermedia* (Karim-Silva et al, 2016, Jacomini et al 2016), estes dois últimos realizados pelo nosso grupo, nos instigam à produção destas moléculas recombinantes em diferentes formatos.

O anticorpo monoclonal Limab7 (Alvarenga et a, 2003) serviu ainda como protótipo para produção de um *biosensor* ligado a fosfatase alcalina (Jacomini et al, 2016) com capacidade de ligação ao veneno de *L. intermedia*.

Após sua produção, esses fragmentos foram submetidos à uma série de ensaios imunoenzimáticos e provaram possuir capacidade de detecção de concentrações picomolares do veneno de *Loxosceles intermedia* com alta sensibilidade, mostrando o potencial da aplicação de tais fragmentos no diagnóstico de pacientes acidentados. Considerando que atualmente não existem registros de um diagnóstico laboratorial para o Loxoscelismo, sendo este geralmente baseado na evolução do quadro clínico, tendo em vista que a maioria dos pacientes não traz o animal para identificação, o desenvolvimento de um ensaio como este apresenta grande potencial de utilização em futuros ensaios diagnósticos, tendo em vista que facilita o diagnóstico de Loxoscelismo com rapidez e confiabilidade.

Além disso, o grupo produziu previamente anticorpos monoclonais murinos, LmAb2 e LmAb12, ambos com capacidade de reconhecer não somente o veneno de *Loxosceles intermedia*, como também componentes presentes nos venenos de *Loxosceles gaucho* e *L. laeta*, contudo, estes ainda não foram caracterizados quanto ao seu potencial neutralizante, como também em formatos recombinantes. Deste modo, visamos produção e caracterização de fragmentos de anticorpos recombinantes do LimAb2, com intuito de empregá-los no desenvolvimento de um imunensaio para o loxoscelismo, bem como estudar/identificar os alvos presentes nos diferentes venenos que são reconhecidos pelo LmAb2 e LmAb12.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Os venenos de *L. laeta*, *L. gaucho*, e *L. intermedia*, assim como o soro antiloxoscélico foram gentilmente cedidos pelo Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos (CPPI – Piraquara, PR, Brasil).

4.1. Produção e purificação do anticorpo monoclonal LmAb2

Foram descongeladas as células do hibridoma produtor de LmAb2. Uma vez descongeladas, estas foram transferidas para um tubo com 5 ml de meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco) e 1% de penicilina-streptomicina (5.000 U.ml⁻¹ – Thermofisher) e centrifugadas por 6 min à 125g, 20 °C, para remoção do agente crioprotetor (di-metil sulfóxido – DMSO). Então, ressuspensas em 3 ml deste meio e incubadas à 37°C, 5% CO₂. O sobrenadante celular foi recuperado diversas vezes e os anticorpos secretados purificados. Uma vez que as células atingiram a confluência esperada (aprox. 5x10⁵ células.ml⁻¹), foi realizada a extração de RNA.

Os anticorpos monoclonais murinos foram purificados a partir do sobrenadante de hibridoma secretor LmAb2 (previamente produzido pelo grupo). As células foram mantidas em cultivo e o sobrenadante celular foi recuperado em diversos momentos. Os anticorpos foram purificados a partir do sobrenadante por cromatografia de afinidade utilizando colunas de proteína A e proteína G imobilizadas em Sepharose CNBr- (Sigma[®]) e através de eluição ácida utilizando glicina 0.1M, pH 2.5 (Fields et al, 2013).

4.2. Caracterização dos Anticorpos Monoclonais Murinos

4.2.1. Sequenciamento das regiões hipervariáveis de Cadeia Leve (VL) e Cadeia Pesada (VH) de imunoglobulinas (IgG) do hibridoma secretor:

O hibridoma selecionado LmAb2 foi cultivado e o RNA total isolado de um número aproximado de 4 x 10⁶ células utilizando Trizol Reagent (Life Technologies) para que fosse realizada a síntese do cDNA.

O meio de cultura de duas garrafas (24 cm³) de LmAb2 foi aspirado e as garrafas lavadas com PBS 1X, estéril. Para cada 10 cm³ de volume, 1 ml de Trizol foi

adicionado. Posteriormente, as garrafas foram incubadas por 5 min, à temperatura ambiente sobre constante homogeneização. Cada ml do lisado então obtido foi distribuído em tubos com clorofórmio. Tubos foram cuidadosamente invertidos, até que se formasse uma emulsão e então centrifugados à 10.000 rpm por 20 min, 4°C. A fase aquosa foi recuperada e distribuída em tubos contendo isopropanol. Os tubos foram armazenados à -20°C, overnight.

No dia seguinte, os tubos foram centrifugados nas mesmas condições do dia anterior e o sobrenadante descartado. 1ml de Etanol 75% com água DEPC (água ultra-pura, tratada com dietil pirocarbonato) 0,1% foi adicionado à cada tubo. Os tubos foram novamente centrifugados à 6.000 rpm por 10 min, 4°C e o sobrenadante descartado. À cada tubo foi adicionado 30µl de água DEPC e o pellet ressuspendido. O RNA foi dosado com o auxílio do nanodrop™ e armazenado à - 20°C.

Uma vez extraído o RNA, uma RT-PCR foi realizada para a transcrição reversa deste RNA em DNA complementar (cDNA) segundo o protocolo de Fields et al, 2013.

Após preparada a reação, os tubos foram incubados à 65°C por 5 min em um termociclador e posteriormente no gelo por 2 mins. Subsequentemente, se adicionou 1 µl de Transcriptase Reversa (Superscript III, Invitrogen) aos tubos e estes foram incubados por mais 1 hora à 42°C. As amostras prontas de cDNA foram armazenadas à - 20°C até as próximas etapas e o RNA extraído armazenado à - 80°C.

4.2.1.1. Amplificação da Cadeia Pesada (VH): (em µl)

A amplificação da cadeia pesada foi realizada de acordo com o protocolo descrito em Fields et al, 2013, nas condições demonstradas abaixo:

	Tubo de Reação	Controle Negativo
Água DEPC	38,75	39,75
Rxn Buffer (10x)	5	5
MgCl ₂ (25 mM)	1,5	1,5

DNTP (10 mM)	1	1
cDNA	1	-
Primer 989 (1 μ M)	1	1
Primer 988 (1 μ M)	1	1
Platinum Taq [©] (5 U μ L ⁻¹)	0,25	0,25

Tabela 1. Descrição dos reagentes e respectivas concentrações utilizadas na reação de PCR para amplificação da região hipervariável de cadeia pesada. Fonte: Adaptado de Fields et al, 2013.

Sequências dos primers utilizados:

- 988 (RevU) – GAG GTS MAR CTG CAG SAG TCW GG
- 989 (ForU) – GAC ACGT GGA TAR ACM GAT GG

4.2.1.2. Amplificação da Cadeia Leve (VL): (em μ l)

A amplificação da cadeia leve foi realizada de acordo com o protocolo descrito em Fields et al, 2013, nas condições demonstradas abaixo:

	Tubo de Reação	Controle Negativo
Água DEPC	32,75	33,75
GoTaq Buffer (5x) (Promega)	10	10
MgCl ₂ (25mM)	3	3
DNTP (10 mM)	1	1
cDNA	1	1
VL Forward Universal (1 μ M)	1	1
VL Reverse 1-9 (1 μ M)	1	1
GoTaq [©] (5 U μ l. ⁻¹) Promega	0,25	0,25

Tabela 2. Descrição dos reagentes e respectivas concentrações utilizadas na reação de PCR para amplificação da região hipervariável de cadeia leve. Oito pares de primers (VKREV1-VKREV9) foram testados para amplificação e estão descritos abaixo. Fonte: Adaptado de Fields et al, 2013.

Sequências dos primers utilizados:

- VL *kappa* Forward Uni – GGA TAC AGT TGG TGC AGC ATC
- VKREV1 - GAG GTS MAR GTC CAG SAG TCW GG
- VKREV2 – GAT ATT GTG ATA ACC CAG
- VKREV4 – GAC ATT GTG CTG ACC CAA TCT
- VKREV5 – GAC ATT GTG CTA ACT CAG TCT
- VKREV6 – GAT ATT GTG CTA ACT CAG TCT
- VKREV7 – GACT ATC CAG ATG ACA CAG ACT
- VKREV8 – GAC ATC CAG CTG ACT CAG TCT
- VKREV9 – CAA ATT GTT CTC ACC CAG TCT

Os produtos das reações de PCR foram analisados quando aplicados (9 μ l amostra + 1 μ l GoTaq Buffer 5X) em um gel de agarose 2% com um padrão (Promega G2101 100 bp ladder), submetido à uma tensão de 80V. O mesmo gel foi corado por brometo de etídeo e fotodocumentado sobre luz ultravioleta.

4.2.2. Clonagem e Transformação:

Os produtos de PCR foram purificados pela coluna Invitex, clonados no vetor pGEM T-easy (Promega) e quimiotransformados na estirpe de *Escherichia coli* TG1. Os clones recombinantes foram selecionados por α -complementação com IPTG/X-gal e submetidos à reação de PCR de colônia para a confirmação da presença do inserto.

As colônias positivas para clonagem dos insertos de interesse observadas após a PCR de colônia foram submetidas à extração de seu DNA plasmidial (MINIPREP) utilizando o kit QiaPrep (Qiagen).

4.3. Sequenciamento

Uma vez purificado o DNA plasmidial dos vetores que continham as sequências de VH e VL, o sequenciamento destes foi realizado. Em torno de 300 ng de DNA plasmidial de VH e VL foram utilizados para reação de sequenciamento e sequenciados

utilizando-se o Big Dye terminator (Thermo Fisher) e o sequenciador XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

4.4. Análises Bioinformáticas

O resultado do sequenciamento foi analisado através do software IMG/QUEST (Lefranc et al, 2005), que permite a análise da sequência de aminoácidos de imunoglobulinas (IG), identificando as sequências gênicas variáveis e hipervariáveis através de alinhamento com um banco de dados de imunoglobulinas. Fornecendo, ainda, a estrutura secundária (“Colar de pérolas”) das imunoglobulinas, destacando as regiões de estrutura (FR) e loops hipervariáveis (ou CDRs) H1, H2, H3 (CDRs da cadeia pesada), L1 L2 e L3 (CDRs de cadeia leve), que são responsáveis pela interação com o antígeno alvo.

4.5. ELISA (Enzyme-linked Immunoabsorbance Assay)

4.5.1 Caracterização do anticorpo monoclonal LmAb2

Foram imobilizadas as toxinas de *Loxosceles intermedia*, *Loxosceles gaucho* e *Loxosceles laeta* ($5 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$) em uma placa de poliestireno e armazenadas à 4°C overnight. No dia seguinte a placa foi submetida a lavagens com PBS 1X e $110 \mu\text{l}$ /poço de solução de bloqueio (caseína 2%, PBS 1X) foi adicionado. Após incubação de 1 hora, à 37°C , a placa foi lavada novamente e incubada com (i) mAb7 $1.25 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ (ii) LmAb2 $1.25 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ (iii) Sobrenadante Celular de LmAb2 (aplicado diretamente na placa), por 1 hora à 37°C . Após repetidas lavagens, foi adicionada IgG anti-mouse HRP (*horseradich peroxidase*) diluída 1:4000 (Sigma Aldrich), por 1 hora à 37°C . A revelação foi realizada pela adição de OPD/ H_2O_2 e a reação terminada pela adição de H_2SO_4 .

4.5.2. Caracterização dos diferentes lotes de LmAb2:

Empregamos outro teste de ELISA para avaliar a reatividade de diferentes lotes de LmAb2, purificados conforme descrito em 4.1, em relação aos venenos de *Loxosceles intermedia*, *gaucho* e *laeta* com o intuito de avaliar se o reconhecimento diferencial frente aos venenos, bem como a reatividade, permaneceu a mesma. Para isso $5 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ do veneno de *L. intermedia*, *gaucho* e *laeta* foram previamente imobilizados em uma

placa de poliestireno e armazenadas à 4 °C *overnight*. No dia seguinte a placa foi submetida à lavagens com PBS 1X e 110 µl/poço de solução de bloqueio (caseína 2%, PBS 1X) foi adicionado. Após incubação de 1 hora, à 37°C, a placa foi lavada novamente e incubada com (i) mAb7 2.5 µg. ml⁻¹ | (ii) Lote 1 de LmAb2 10 µg. ml⁻¹ (iii) Lote 2 de LmAb2 10 µg ml⁻¹, (iv) Lote 3 de LmAb2 10 µg. ml⁻¹ | e (v) Lote 4 de LmAb2 10 µg. ml⁻¹, por 1 hora à 37°C. Após repetidas lavagens, foi adicionada IgG anti-mouse HRP (*horseradich peroxidase*) diluída 1:4000 (Sigma Aldrich), por 1 hora à 37°C. A revelação foi realizada por OPD/H₂O₂ e a reação terminada pela adição de H₂SO₄.

4.6 SDS-PAGE/Western Blot

Foi realizada uma eletroforese SDS-page em gel de poliacrilamida de 12,5% das toxinas de *L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta* na concentração de 5 µg/poço, em duplicata. Este gel foi transferido à 100 volts durante 2 horas para uma membrana de nitrocelulose para a realização do ensaio de *Western Blot*. Após a transferência das proteínas à membrana, foi realizada etapa de bloqueio com leite em pó desnatado 5%/Tween 0,05%, em seguida a membrana foi dividida em 2 segmentos menores, cada um representando uma replicata. As membranas foram incubadas respectivamente com (i) LmAb2 purificado (5 µg.ml⁻¹), e (ii) soro equino pAb anti-L.int diluído 1:40.000 (SALOX). Por fim, após 3 lavagens com PBS-Tween 0,05% 1X, as membranas foram incubadas com IgG anti-mouse conjugado à HRP (Sigma Aldrich) na diluição de 1:4000 e IgG anti-horse HRP na diluição de 1:30000, respectivamente. A membrana foi revelada por H₂O₂/Luminol em filme ultra-sensível (G&E Life Sciences).

4.7 SPOT Synthesis/Mapeamento de Epítomos para Fosfolipases D:

Com intuito de identificar epítomos antigênicos das três proteínas dermonecróticas de *L. intermedia* (LiD1) (Kalapothakis et al., 2002), *L. laeta* (SMase I) (Fernandes Pedrosa et al., 2002) e *L. gaucho* (A1H – LoxGa.), reconhecidos pelos anticorpos monoclonais, o método de *Spot synthesis* foi empregado (Frank, 1992). Sobre uma membrana de celulose foram construídos 278 peptídeos lineares, com 15 aminoácidos cada, sobrepostos por 12 resíduos abrangendo as sequências primárias

de proteínas fosfolipases-D de três espécies de *Loxosceles*. Após a síntese, os peptídeos permaneceram adsorvidos sobre a membrana e ensaios imunológicos para o reconhecimento dos epítomos foram realizados.

Utilizando o mesmo protocolo empregado por Ramada et al, 2013, estas membranas de celulose contendo a sequência linearizada das fosfolipases loxoscelicas foram lavadas com Tampão Tris-Salina (TBS - 150 mM de cloreto de sódio, 25 Mm Tris, pH 7,2) e bloqueadas *overnight* com 3% de BSA (albumina bovina sérica) em TBS e 0,1% de Tween 20 à 4°C. As membranas foram testadas em diferentes condições: (i) LmAb2 diluído na concentração de 1 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ ii) LmAb12 na concentração 1 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ e 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ e iii) anticorpo monoclonal irrelevante (mAb3) na concentração de 1 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$. Esses diferentes anticorpos foram diluídos em solução de incubação (1% BSA em TBS e Tween 20 0,1%) e incubados com a membrana por 90 minutos à 37 °C. A ligação do anticorpo com as membranas foi evidenciada através da adição de IgG anti-mouse conjugada à HRP na diluição de 1:10.000 por 60 minutos, 37 °C. Após três lavagens de 10 minutos com TBS, as membranas foram reveladas por H_2O_2 /Luminol em filme ultra-sensível (G&E Life Sciences) e os spots reativos observados. Este mesmo ensaio foi repetido somente para a IgG anti-mouse conjugada à peroxidase em varias diluições (1:4.000, 1:8.000, 1:10.000) para verificar reatividade inespecífica.

4.7.1 Regeneração das membranas:

Para reutilização das membranas em ensaios futuros, estas foram tratadas com uma solução contendo uréia 8M, 1% de SDS (Dodecil Sulfato de Sódio) e 0,1% de β – mercaptoetanol para a remoção dos anticorpos ligados aos peptídeos contidos nas membranas. Para a remoção da uréia, as membranas foram lavadas com uma solução de etanol 50%, e acido acético 10%.

4.8. *Docking* mAb12/LiTx1:

Um modelo tridimensional foi criado para o anticorpo LmAb12 (previamente produzido e caracterizado pelo grupo) com base na sequência de suas regiões hipervariáveis de cadeia leve e pesada, levando em conta similaridade com modelos

pré-estabelecidos e utilizando o programa PIGS (**P**rediction of **I**mmuno**G**lobulin **S**tructure). Tendo em vista a hipervariabilidade encontrada no CDR3 das regiões de cadeia pesada das imunoglobulinas, um refinamento de *loop* também foi realizado para criação de um modelo mais fidedigno. Um modelo para a notina LiTx1 também foi criado utilizando-se o programa Swiss-model à partir da toxina Spiderina-1A da aranha *Oxyopes takobius* (PDB: P86716 – 38 % de similaridade encontrada). Após criados os modelos, com auxílio do software ZDOCK, o *docking* entre os modelos de LmAb12 e da notina LiTx1 foi realizado.

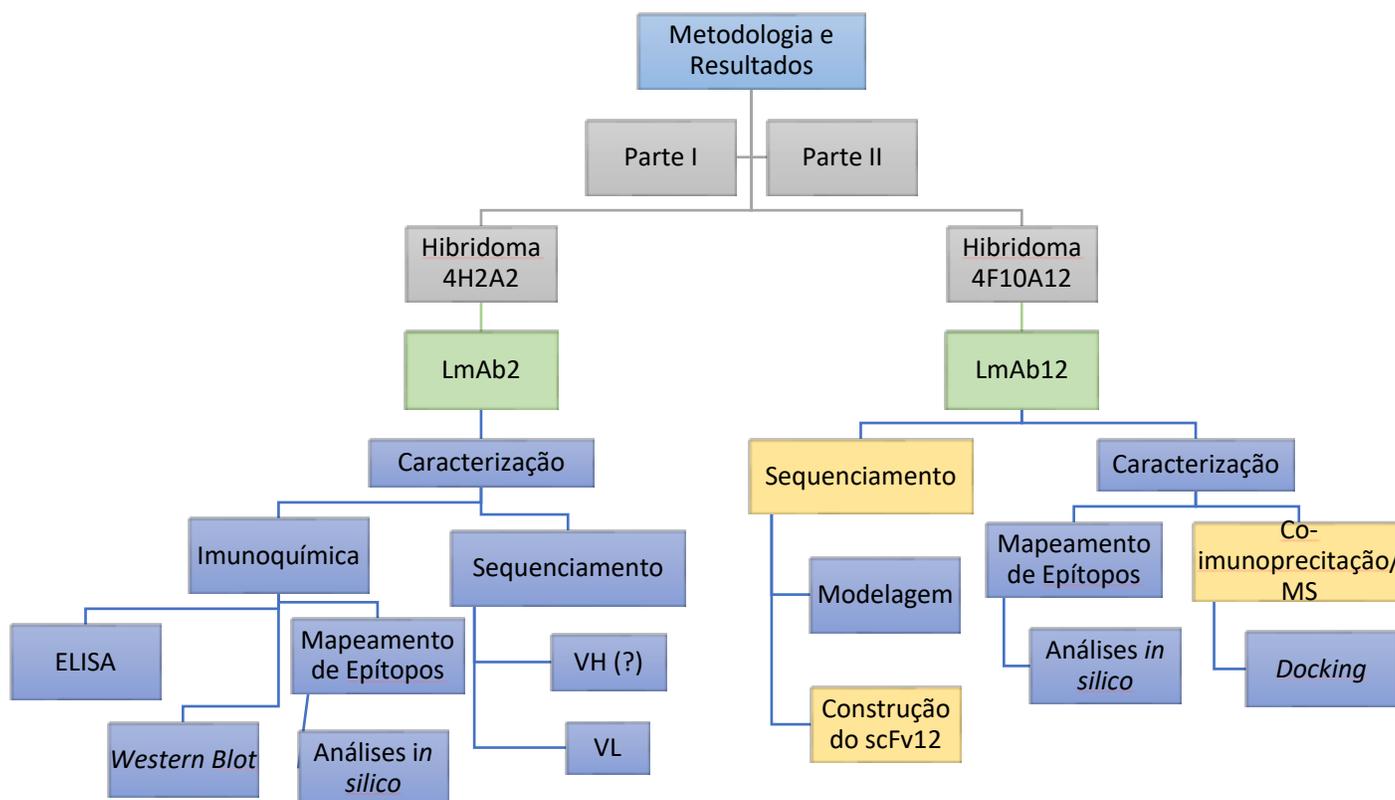


Figura 4. Fluxograma ilustrativo do panorama dos resultados obtidos. Os resultados estão divididos em parte I (referente ao LmAb2) e parte II (referente ao LmAb12). Em amarelo estão destacados os ensaios previamente realizados pelo grupo.

Fonte: Acervo pessoal.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO (PARTE 1):

5.2. Produção do anticorpo monoclonal LmAb2

As células do hibridoma LmAb2 (4A₂H₂) foram descongeladas e sua viabilidade e secreção de anticorpos funcionais, segundo previa o protocolo de Fields et al, 2013.

5.3. Extração de RNA/RT-PCR

Foram realizadas duas extrações de RNA total dos hibridomas LmAb2 (4A₂H₂), uma em novembro/2016 e outra em outubro/2017, conforme o protocolo de Fields et al, 2013. Para a primeira extração, a concentração obtida de RNA foi de 1,49 µg.µl⁻¹ e para a segunda, 1,63 µg.µl⁻¹

5.3. Amplificação de VH e VL por PCR

5.3.1 Cadeia Pesada:

A amplificação da cadeia pesada enfrentou dificuldades. O protocolo inicial de Fields et al, 2013, indicava a quantidade de 150 mM de MgCl₂ como a recomendável para a reação de PCR. Após uma série de testes, observou-se que essa quantidade não era a ideal para a amplificação. Desta forma, diferentes concentrações de MgCl₂, temperaturas de anelamento, cDNA (Extração 1 e Extração 2) e Taq polimerase foram testadas segundo o protocolo de Roux et al, 2009. O fragmento somente apresentou amplificação na seguinte condição: Platinum Taq (Invitrogen) – 0,25 µl (5 U µl.⁻¹), temperatura de anelamento de 55 °C, 150 mM MgCl₂, 1,5 µl de cDNA – Extração 1 – outubro/2016.

A função do íon magnésio na reação de PCR é amplamente descrita, e sabe-se que este atua como co-fator enzimático para a DNA polimerase e tem papel importante na promoção do anelamento de primers que não se ligam a sequência alvo de maneira estável. Tendo isso em vista, ajustes na sua quantidade podem ser cruciais para otimização de uma reação de PCR e amplificação da região nucleotídica desejada (Markoulatos et al, 2002). A temperatura utilizada para anelamento dos primers também tem grande importância, considerando que cada primer tem uma temperatura ótima

para anelamento na sequência a ser replicada, calculada baseando-se no seu conteúdo de citosina e guanina, tamanho e concentração a ser utilizada na reação de PCR (Roux, 2009, Apte et al, 2003). Considerando-se isto, a temperatura de 55°C, combinada com o aumento da quantidade de MgCl₂, promoveu amplificação da região hipervariável de cadeia pesada, indicada abaixo, quando comparada com o controle positivo (Fig. 5). Então observou-se um fragmento na altura de aproximadamente 350-450 pares de base, conforme o tamanho esperado para a região codificante da cadeia pesada.

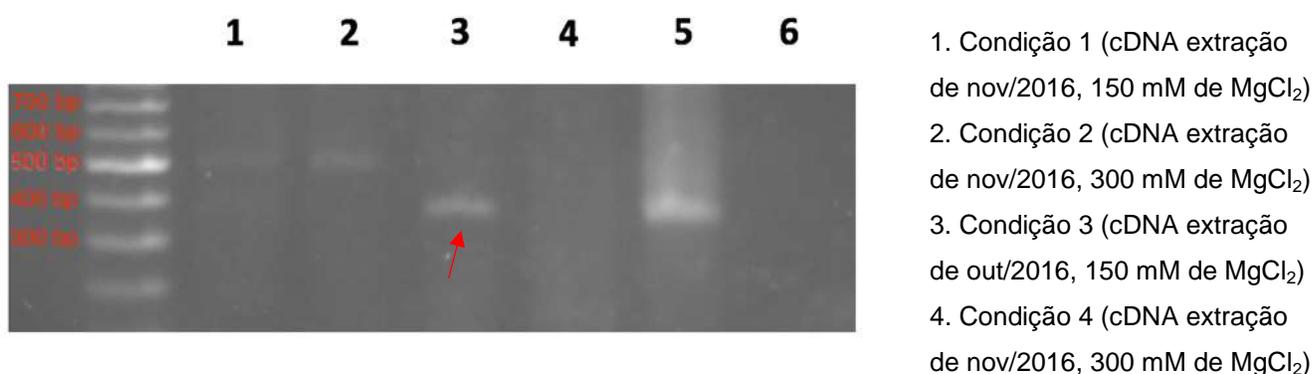


Figura 5. Gel de agarose 2% representando as diversas condições testadas para a amplificação da cadeia pesada. É esperado um fragmento na faixa de 350-450 pares de base, conforme observado em 3 e em 5 (controle positivo). Fonte: Acervo pessoal.

1. Condição 1 (cDNA extração de nov/2016, 150 mM de MgCl₂)
2. Condição 2 (cDNA extração de nov/2016, 300 mM de MgCl₂)
3. Condição 3 (cDNA extração de out/2016, 150 mM de MgCl₂)
4. Condição 4 (cDNA extração de nov/2016, 300 mM de MgCl₂)
5. Controle Positivo
6. Controle Negativo

5.3.2. Re-amplificação da cadeia pesada em novas condições:

Para obtenção de uma maior quantidade de amplicons de região hipervariável de cadeia pesada, foi realizada uma amplificação adicional nas novas condições, estabelecidas em 5.3.1. e descritas em 4.5.1, utilizando cDNA proveniente do RNA extraído em outubro/2017. Abaixo está representada sua amplificação

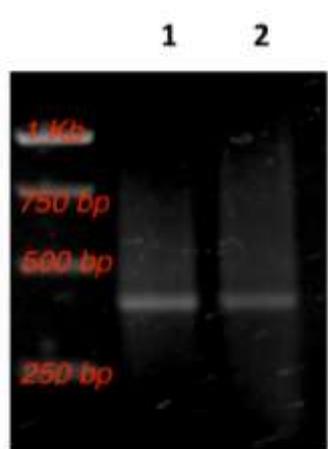


Figura 6. Gel de Agarose 2% representando a re-amplificação da cadeia pesada (realizada em duplicata) nas condições estabelecidas em 5.3.2 (temperatura de anelamento 55 °C, 150 mM de MgCl₂ e cDNA proveniente da extração de RNA de out/2016). Fonte: Acervo Pessoal.

5.3.3 Cadeia Leve:

Os resultados apresentam amplificação de um fragmento de DNA, podendo se tratar da região variável da cadeia leve, sendo que para as combinações de primer VLF/VLR2, VLF/VLR3, VLF/VLR5 e VLF/VLR6 observam-se bandas na altura de aproximadamente 350 pares de base, conforme esperado. A cadeia leve foi amplificada logo na primeira tentativa e o cDNA utilizado foi o da extração de RNA realizada em novembro/16.

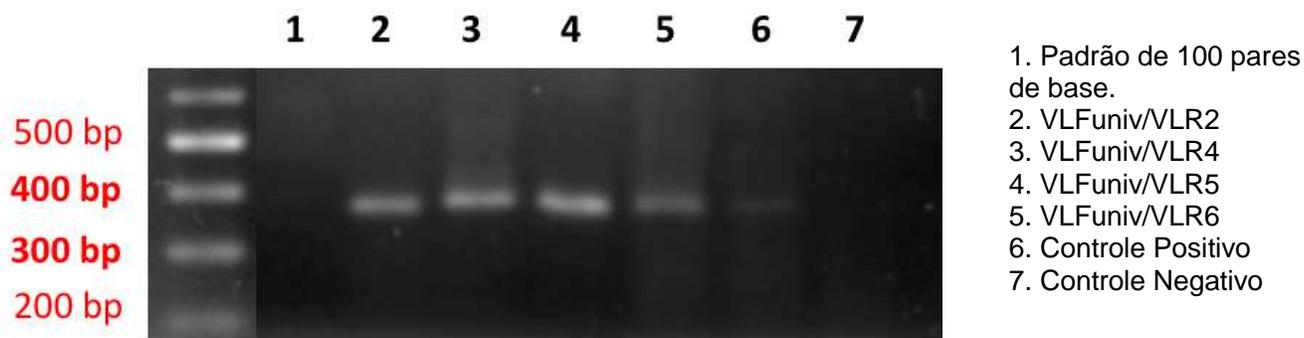


Figura 7. Gel de Agarose 2% representando a amplificação da cadeia leve. Espera-se observar um fragmento na altura de 320-350 pares de base. Vários primers reversos foram testados e amplificação foi observada para os pares de primers utilizados nas reações representadas em 2 (VLFuniv/VLR2), 3 (VLFuniv/VLR4), 4 (VLFuniv/VLR5) e 5 (VLFuniv/VLR6) quando comparados com o controle positivo (6). Fonte: Acervo Pessoal.

5.4. Digestão dos produtos de VL com BciVI:

Células comumente utilizadas no processo de fusão com células de mieloma, para geração de hibridomas, são derivadas do clone MOPC-21, que expressa um transcrito, de mesmo nome, codificante para uma cadeia leve *kappa* aberrante. Esse transcrito então é traduzido na forma de uma imunoglobulina afuncional devido à ocorrência de um rearranjo gênico que acarreta na inserção de um códon de parada na sequência codificante e conseqüente término prematuro da tradução da estrutura de cadeia leve (Juste et al, 2006).

Tendo isso em vista, com objetivo de detectar quais produtos de amplificação apresentavam sequência codificante de cadeia leve funcional, os produtos de amplificação produzidos em 5.3.3 (VLFuniv/VLR2; VLFuniv/VLR4; VLFuniv/VLR5; VLFuniv/VLR6) foram digeridos com a enzima de restrição BciVI, que cliva especificamente o transcrito MOPC-21 presente em cadeias leves aberrantes segundo o protocolo descrito por Fields et al, 2013. O produto de amplificação de cadeia leve que apresentou digestão foi referente ao amplicon amplificado com o par de primers VLFuniv/VLR2, conforme indicado por seta na Figura 8. O produto VLR1 não apresentou fragmentação e o resultado obtido para os produtos VLR4 e VLR5 foi inconclusivo. Desta forma, o amplicon selecionado para ser inserido no vetor pGEM (amplicon VLFuniv/VLR1) foi posteriormente transformado em células TG1 competentes.

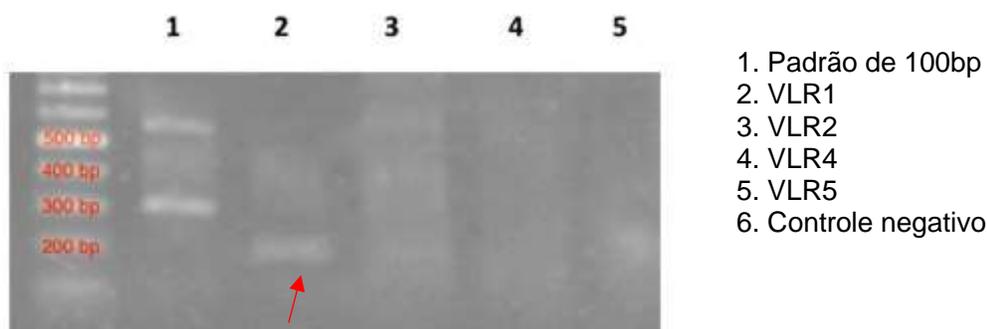


Figura 8. Gel de Agarose – Digestão dos amplicons obtidos para cadeia leve com a enzima de restrição BciVI. Indicada por uma seta está a cadeia aberrante observada para o produto VLR2. Para o produto VLR1 não foi observada digestão. Já para os produtos VLR4 e VLR5 nada pode ser afirmado. Fonte: Acervo Pessoal

5.5. PCR de Colônia e MINIPREP

Após a transformação dos insertos ligados ao vetor Pgem-T easy nas células TG1, 6 colônias brancas foram selecionadas separadamente para o VH e para o VL e submetidas à uma PCR utilizando primers para os respectivos insertos. De acordo com o protocolo utilizado (Fields et al, 2013) pode-se observar amplificação na altura esperada quando os insertos são transformados com sucesso, tanto para cadeia leve (colônias 1, 2), quanto para cadeia pesada (1, 3, 6 e 7).

5.5.1. PCR de Colônia para transformantes com a Cadeia Leve:

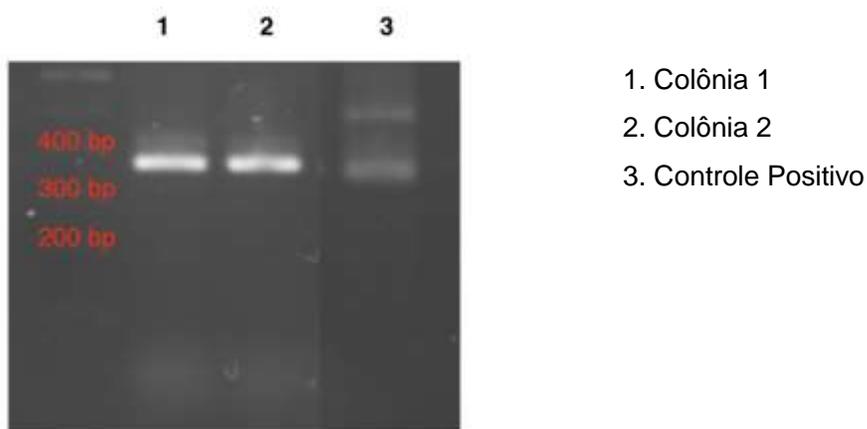


Figura 9. Gel de Agarose 2% – Representação do PCR de Colônia para Cadeia Leve. Diversas colônias foram testadas e amplificação do inserto contido no plasmídeo das colônias 1 e 2 demonstrou-se na altura esperada para cadeia leve (aprox. 350 pares de base). Fonte: Acervo Pessoal.

5.5.2. PCR de Colônia para transformantes com a Cadeia Pesada:

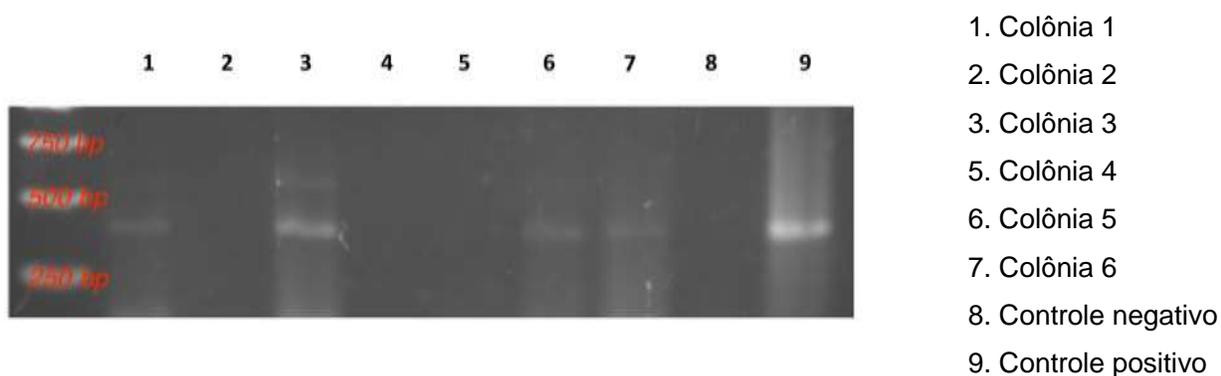


Figura 10. Representação do PCR de Colônia para Cadeia Pesada. Diversas colônias foram testadas e amplificação do inserto contido no plasmídeo das colônias 1, 3 e 4 demonstrou-se na altura esperada para cadeia pesada (aprox. 400 pares de base). Fonte: Acervo Pessoal.

5.5.3. Rendimento do MINIPREP – dosagem *nanodrop*TM

Uma vez que as colônias transformadas com sucesso foram selecionadas, foi realizado um pré-inóculo das mesmas e no dia seguinte a extração do DNA plasmidial destas células. O rendimento obtido foi dentro do esperado segundo o protocolo de Fields et al, 2013.

Colônias VH

- Colônia 1: Concentração = $103 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$
 $260/230 = 1,65$ (ideal aprox. 2) & $260/280 = 1,67$ (ideal aprox. 1,8)
- Colônia 3: Concentração = $294 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$
 $260/230 = 1,73$ (ideal aprox. 2) & $260/280 = 1,91$ (ideal aprox. 1,8)

Colônias VL

- Colônia 1: Concentração = $944 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$
 $260/230 = 1.95$ (ideal aprox. 2) & $260/280 = 2.2$ (ideal aprox. 1,8)
- Colônia 2: Concentração = $921 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$
 $260/230 = 1,96$ (ideal aprox. 2) & $260/280 = 2.2$ (ideal aprox. 1,8)

5.6. Sequenciamento

A sequência da região hipervariável de cadeia leve do anticorpo LmAb2 foi obtida e está representada abaixo. Já o sequenciamento da região hipervariável da cadeia pesada não obteve sucesso devido às dificuldades encontradas nos processos de transformação e seleção de colônias transformadas, anteriores ao sequenciamento.

Acredita-se que a presença de um grande número de colônias satélites e mesmo de amplificação inespecífica (tendo em vista que os primers utilizados eram degenerados) tenha influência neste processo (Chan et al, 2013, Linhart et al, 2002). Ainda, a qualidade do cDNA utilizado e dos amplicons obtidos é de extrema relevância e deve ser levada em conta. Considerando isto, uma nova extração do RNA de hibridomas produtores de LmAb2 deverá ser realizada para re-amplificação da região hipervariável de cadeia pesada e subsequentes transformação e sequenciamento.

>LmAb2_VL

```
GA*ACAGTTGGTGC**CATCAGCCCTT***TTCCAAC TTT**CCCCGA**CGAACGTGAAT
GGATATTCTAGATGTTGCATACAGTAATAAACACCCACATCCTCAGCCTCCACTCTA
CTGATTCTCAATGTGAAAG***TTCCTGACCCAC**CCACTGAACCTGTCT**GACTCCT
GAGGCAAGGTT**GGACATCCGATATATCAGGAG**GAGGAGACTGGCCTGGCCTCT
GCAAGAACCAAT****GTAAGTGTTGCCATTACTATGCAGGAGACTCTTACTAG**CTG
CAGGAGATGGATA****CTCTCCAGGAGTGA**GTACAGA*GGTGCAG**TGCGTCAT**
CAATA*CA
```

Nota: Alguns pares de base foram propositalmente omitidos por se tratar de uma sequência passível de depósito de patente.

Com base na análise dos resultados do sequenciamento, empregando-se a ferramenta interativa IGMT, foi possível confirmar a sequência variável da cadeia leve (VL) que apresentou 98,98% de similaridade com a sequência murina IGKV2-137*01 F (Ref. AJ231263). Também foi possível obter a representação da estrutura secundária dos domínios variáveis do anticorpo pela formação do *Collier de Perles*, onde observa-se para cadeia leve a confirmação de resíduos conservados, uma cisteína na posição 23^o, triptofano na 41^o, aminoácido hidrofóbico na 89^o, cisteína 104^o e fenilalanina ou triptofano na 118^o (Fields et al., 2013).

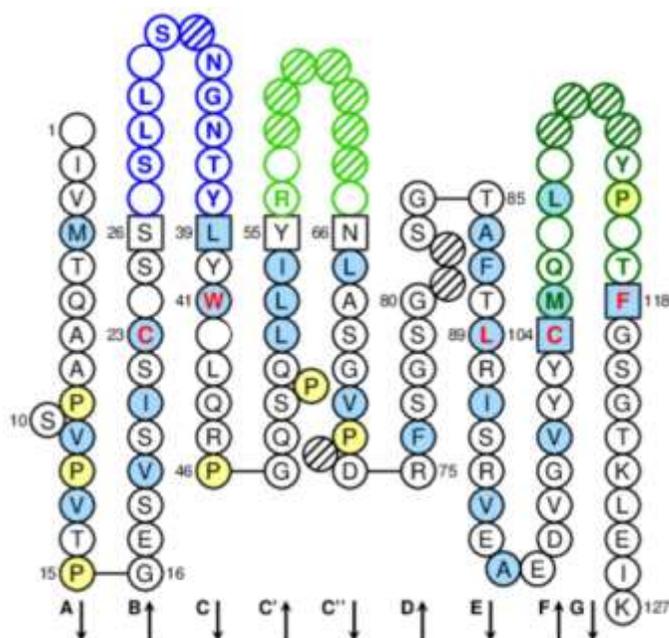


Figura 11. “*Collier de perles*”. Representação bidimensional da região de cadeia leve do LmAb2 em esquema de “colar de pérolas” evidenciando os domínios variáveis da região de cadeia leve (representados de maneira colorida). Em azul está representado o CDR1, em verde claro o CDR2 e em verde escuro CDR3. Obtido através da inserção da sequência representada em 5.6 em um banco de dados de imunoglobulinas (IMGT). Fonte: IMGT – International Immunogenetics Information System.

Nota: Alguns aminoácidos foram propositalmente omitidos por se tratar de uma sequência passível de depósito de patente.

5.7. Caracterização Imunoquímica do LmAb2

5.7.1. Isotipagem do LmAb2:

Após utilização do teste de isotipagem *Isostrip* (Roche) pode-se observar que o anticorpo LmAb2 corresponde à uma imunoglobulina do tipo G1 com cadeia leve *kappa*. Pelo fato da cDNA codificante da região de cadeia leve ter sido amplificado com os iniciadores específicos para imunoglobulinas com cadeia leve tipo *kappa*, esse resultado já era esperado e somente foi confirmado, diferente do isotipo G1 observável somente através do ensaio de isotipagem. Esses resultados corroboram com a sequência nucleotídica obtida para cadeia leve do LmAb2, que quando pesquisada em um banco de dados de imunoglobulinas (IMGT/VQUEST) encontrou alta similaridade de

sequência com a cadeia leve de uma imunoglobulina de isotipo G, cadeia leve *kappa* (IGKV2-137*01 F - Ref. AJ231263).

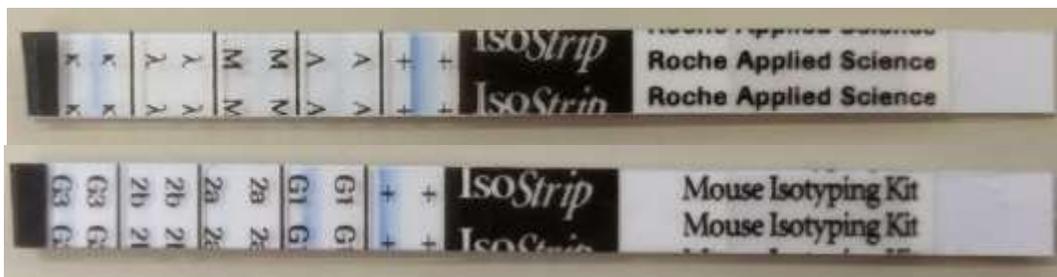


Figura 12. Isotipagem do LmAb2 realizada a partir do kit comercial IsoStrip (Roche Applied Science). Observa-se caracterização da cadeia leve como *kappa* (na primeira *strip*) e de isotipo de imunoglobulina G1 (na segunda *strip*). Fonte: Acervo Pessoal.

5.7.2. ELISA para caracterização do LmAb2 frente aos venenos de Loxosceles:

Um teste de ELISA foi empregado para avaliar a ligação do anticorpo purificado frente aos componentes presentes nos venenos das três diferentes espécies de Loxosceles; para isso $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ dos venenos de *L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta* foram previamente imobilizados na placa e incubados com LmAb2 purificado utilizado na concentração de $1.25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ e seu sobrenadante celular aplicado diretamente na placa.

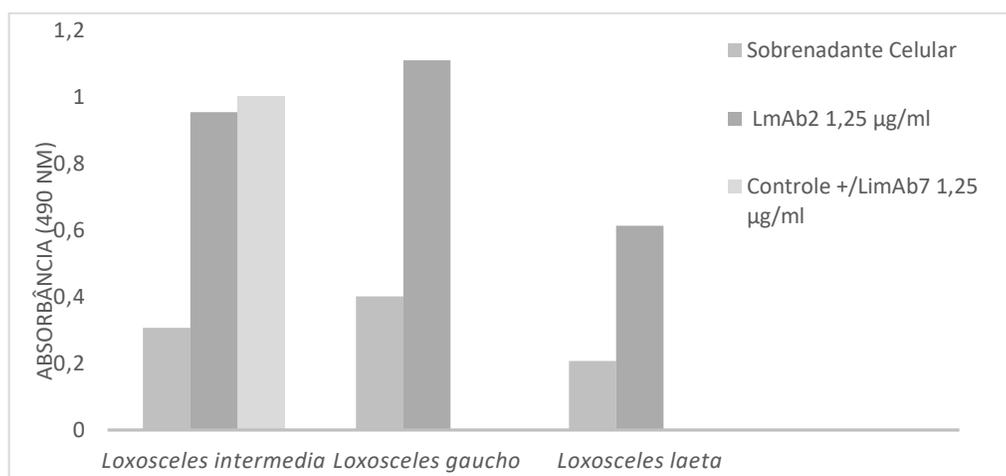


Figura 13. Gráfico representando as reatividades obtidas por ELISA para o sobrenadante celular de LmAb2 e anticorpo LmAb2 purificado frente aos três venenos Loxoscelicos. Como controle positivo foi utilizado o anticorpo LimAb7 (Alvarenga et al, 2003) específico para o veneno de *L. intermedia* na

concentração de $1,25 \mu\text{g. mL}^{-1}$. O controle negativo foi realizado através da ausência de anticorpo primário. Fonte: Acervo Pessoal.

Diferente do anticorpo mAb7, produzido por Alvarenga et al, 2003, que apresenta afinidade somente ao veneno de *Loxosceles intermedia* e foi utilizado com um controle positivo neste ensaio, observa-se que o LmAb2 apresenta reconhecimento frente aos venenos das três espécies loxoscelicas, da mesma maneira descrita para o anticorpo monoclonal LiD1mAb16, produzido por Dias-Lopes et al, 2014. Observa-se também um maior reconhecimento pelos componentes do veneno de *L. gaucho*, seguido então por *L. intermedia* e *L. laeta*.

5.7.3. ELISA para avaliação do perfil de reconhecimento de diferentes lotes de LmAb2 frente aos venenos de Loxosceles:

Um teste de ELISA foi empregado para avaliar a ligação dos diferentes lotes de anticorpo purificado frente aos componentes presentes nos venenos das três diferentes espécies de Loxosceles; para isso $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ dos venenos de *L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta* foram previamente imobilizados em uma placa de poliestireno e incubados com 4 diferentes lotes de LmAb2 purificado, utilizado na concentração de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Observa-se que a reatividade diferencial frente aos venenos se mantêm, como esperado, o que indicaria que as diversas purificações foram bem-sucedidas.



Figura 14. Gráfico representando as reatividades obtidas por ELISA quando diferentes lotes de LmAb2 purificados foram testados frente aos venenos de *Loxosceles intermedia*, *Loxosceles gaucho* e *Loxosceles laeta*. Como controle positivo foi utilizado o anticorpo LimAb7 (Alvarenga et al, 2003) específico para o veneno de *L. intermedia* na concentração de $1,25 \mu\text{g. mL}^{-1}$. O controle negativo foi realizado através da ausência de anticorpo primário. Fonte: Acervo Pessoal.

5.8. Western Blotting:

Confirmando os perfis de reatividade observados por ELISA, o mAb2 demonstrou reconhecimento frente aos venenos das três diferentes espécies de *Loxosceles*. Em relação às frações reconhecidas, observam-se bandas na altura de 29-34 kDa, provavelmente correspondentes às fosfolipases, componentes bem caracterizados e responsáveis pelos efeitos dermonecróticos do veneno (Appel et al, 2008), Fig. 16.

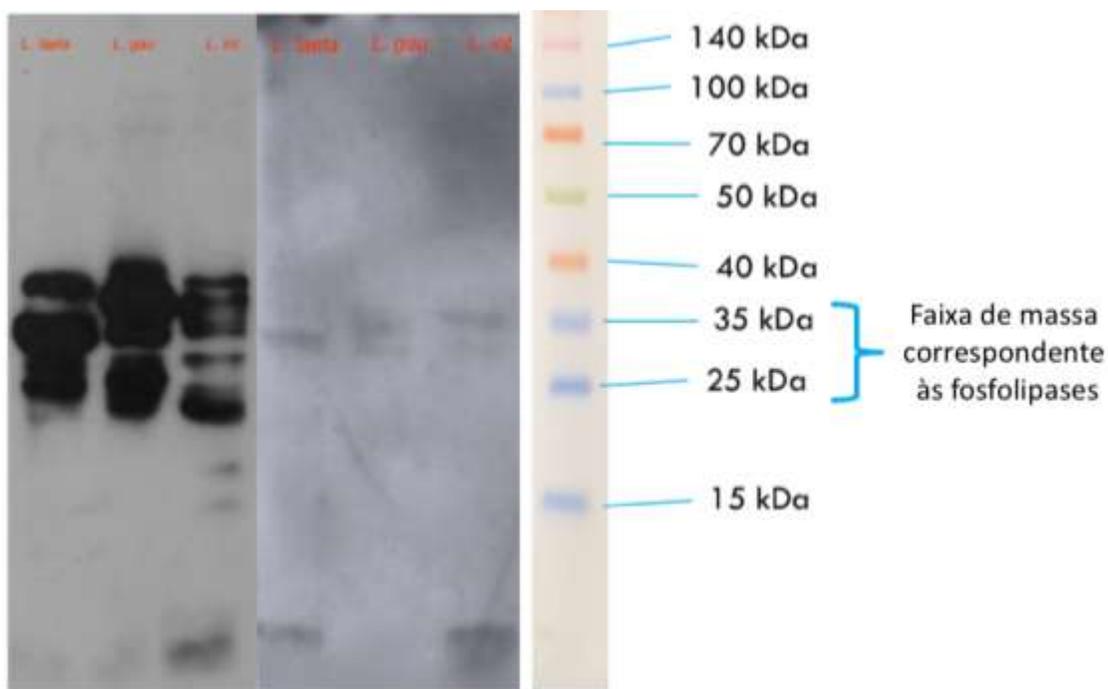


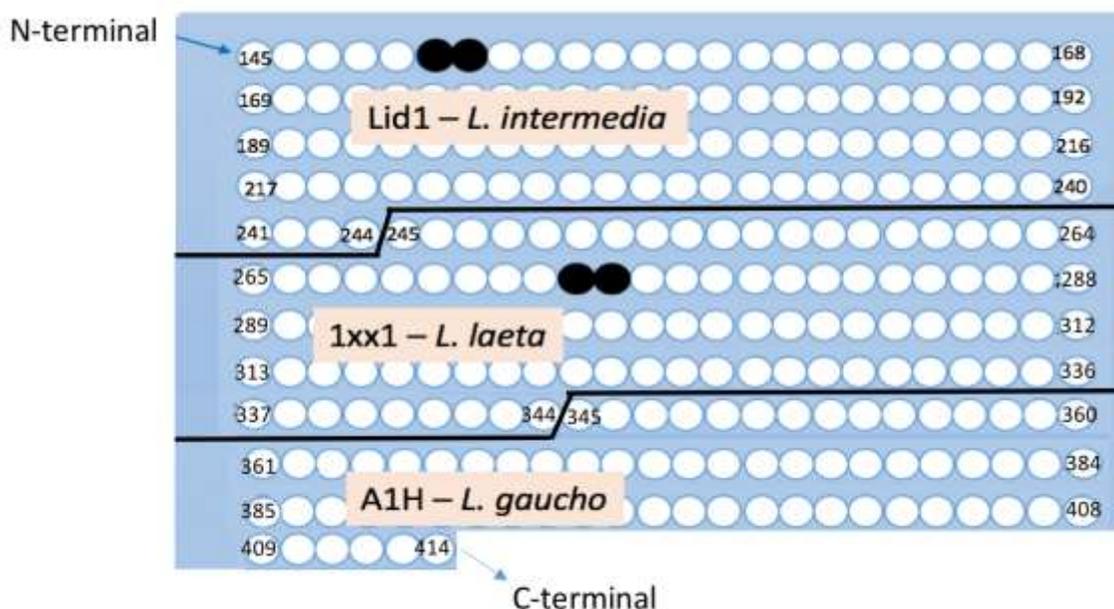
Figura 15. Fotografia da revelação das membranas de Western Blotting por ECL. Representado à esquerda está o controle positivo do ensaio (soro equino anti-loxoscelico (SALOX) na diluição de 1:40.000). A revelação do controle positivo foi realizada através de IgG anti-horse diluída 1:30.000 e posterior adição de luminol/ H_2O_2 . Representado ao lado do controle positivo está o resultado obtido mediante incubação do anticorpo LmAb2 na concentração de $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$. A revelação foi realizada através de incubação de IgG anti-mouse, diluída 1:4000 e e posterior adição de luminol/ H_2O_2 . Ambas membranas foram reveladas em filme ultra-sensível. Fonte: Acervo Pessoal.

5.9. SPOT SYNTHESIS

O ensaio de SPOT foi realizado sob três diferentes condições, em duas membranas distintas. (i) incubando-se o anticorpo LmAb2 purificado na concentração de $1 \mu\text{g. mL}^{-1}$, (ii) incubando-se somente o anticorpo secundário IgG anti-mouse HRP diluído 1:10.000 e (iii) incubando-se um anticorpo monoclonal irrelevante na concentração de $1 \mu\text{g. mL}^{-1}$ à membrana contendo os epítomos lineares das fosfolipases de *L. intermedia*, *gaucho* e *laeta*.

Quando a membrana contendo as fosfolipases foi incubada com o LmAb2 purificado, na concentração de $1 \mu\text{g. mL}^{-1}$, observou-se reatividade em relação aos epítomos das fosfolipases das três espécies *Loxoscelicas*. Isso poderia sugerir que o LmAb2 teria um potencial protetor, uma vez que tem afinidade pelas toxinas dermonecróticas presentes nos três venenos e que esses componentes são fortemente implicados nos mecanismos deletérios do envenenamento (Appel et al, 2008).

A



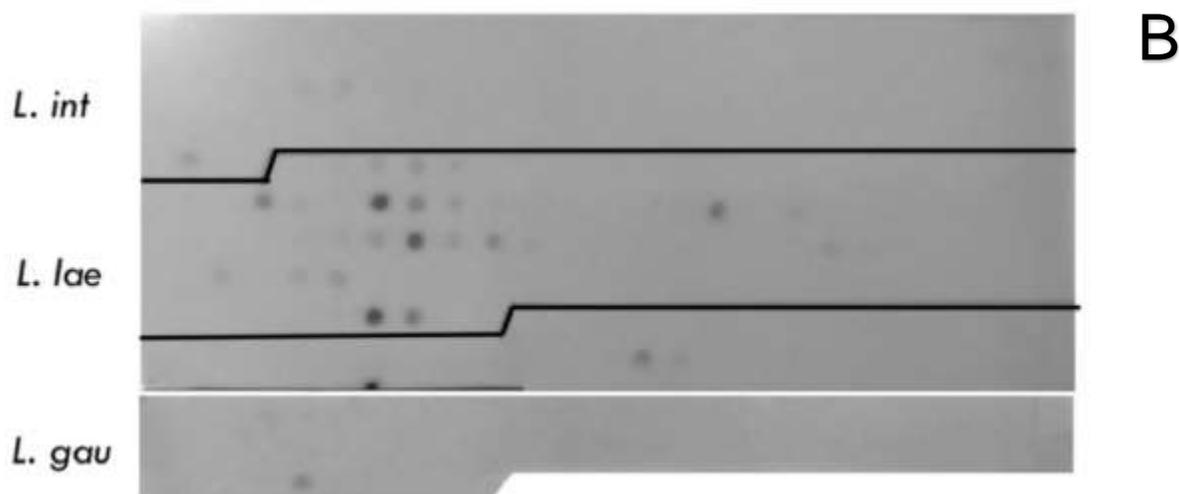


Figura 16. A) Esquemática da membrana de celulose contendo os peptídeos que compõe a sequência linear das fosfolipases Lid1 (*L. intermedia*), 1xx1 (*L. laeta*) e A1H (*L. gaucho*), onde os ensaios de SPOT foram realizados. B) Fotografia do filme ultra-sensível onde revelação da membrana esquematizada em A (quando incubada com LmAb2 purificado na concentração de $1 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$) foi realizada. Spots reativos podem ser observados em preto e em diferentes tons de cinza, com intensidade de cor diretamente proporcional à reatividade. Fonte: Acervo Pessoal.

Uma maior reatividade é observada para o segmento de membrana correspondente a fosfolipase D de *L. laeta*, o que contraria os resultados obtidos por ELISA, onde a menor reatividade observada por parte do LmAb2 é referente ao veneno bruto de *L. laeta*. A pequena reatividade observada para *L. gaucho* também é intrigante, visto que por ELISA, esse veneno é o mais reativo frente ao LmAb2. Isto por que no ensaio de ELISA as toxinas imobilizadas permanecem na sua estrutura nativa e a reatividade frente à epítomos conformacionais pode ser observada. Contudo, através do ensaio de *Spot Synthesis*, apenas o mapeamento de epítomos lineares pode ser realizado. No sentido desta problemática, de Moura et al., 2011 demonstrou que o anticorpo LimAb7 (anticorpo anti-*Loxosceles intermedia* produzido por Alvarenga et. al, 2003), apesar de demonstrar alta reatividade frente a Lid1 em ensaios de *Western Blot* e ELISA, não possuía reatividade alguma frente a sequência linearizada da fosfolipase Lid1 (também de *Loxosceles intermedia*), através do ensaio de *Spot Synthesis*. Esse resultado encorajou o emprego da técnica de *phage display* com o objetivo de identificarem-se possíveis epítomos descontínuos de interação entre o LimAb7 e Lid1. Como resultado, após o *screening* de quatro bibliotecas de fagos, quatro peptídeos

miméticos foram selecionados, todavia, nenhum deles mostrava similaridade com a sequência linear de aminoácidos da Lid1. Tendo isso em vista, a região epitópica putativa do LimAb7 foi predita com auxílio da ferramenta MIMOP (Moreau et al, 2007) e a localização tridimensional dos resíduos na estrutura da Lid1 realizada (C197, Y224, W225, T226, D228, K229, R230, T232 e Y248), demonstrando o possível epítipo conformacional de interação do LimAb7 na sua estrutura.

Para geração de resultados mais fidedignos e levando em conta alta sensibilidade do substrato ECL, em um primeiro momento a membrana com as fosfolipases foi incubada apenas com IgG anti-mouse conjugada à HRP em diversas diluições (1:4000, 1:8000, 1:10000) de forma a observar-se possível presença de reatividade inespecífica deste em relação aos epítipos da membrana. Reatividade inespecífica foi encontrada para as diluições de 1:4000 e 1:8000 (dados não mostrados). No entanto, diluindo-se a IgG anti-mouse 1:10000, toda reatividade é eliminada (Fig. 19) podendo-se atribuir os resultados mostrados acima como provenientes de reatividade exclusiva do LmAb2.

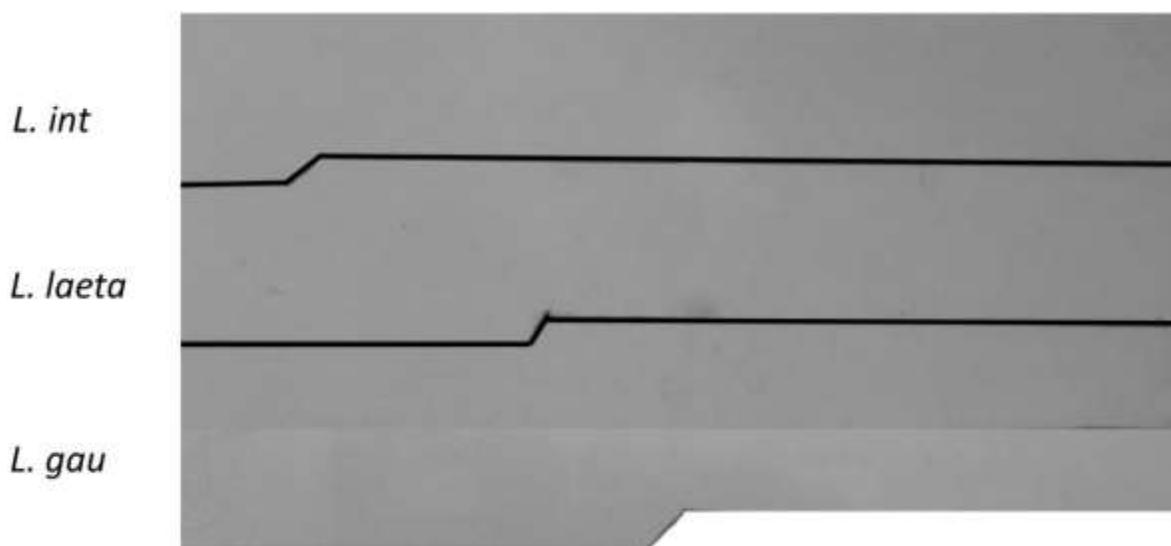


Figura 17. Fotografia da revelação das membranas de SPOT por ECL quando incubadas com IgG anti-mouse-HRP diluído 1:10000. Fonte: Acervo Pessoal.

Para demonstração da especificidade do LmAb2 às fosfolipases, foi incubado à membrana um anticorpo monoclonal irrelevante previamente produzido pelo grupo

mAb3 (específico para proteínas de *Acanthamoeba* – Becker Finco et al, 2012) na mesma concentração utilizada para o LmAb2. ($1 \mu\text{g. mL}^{-1}$).

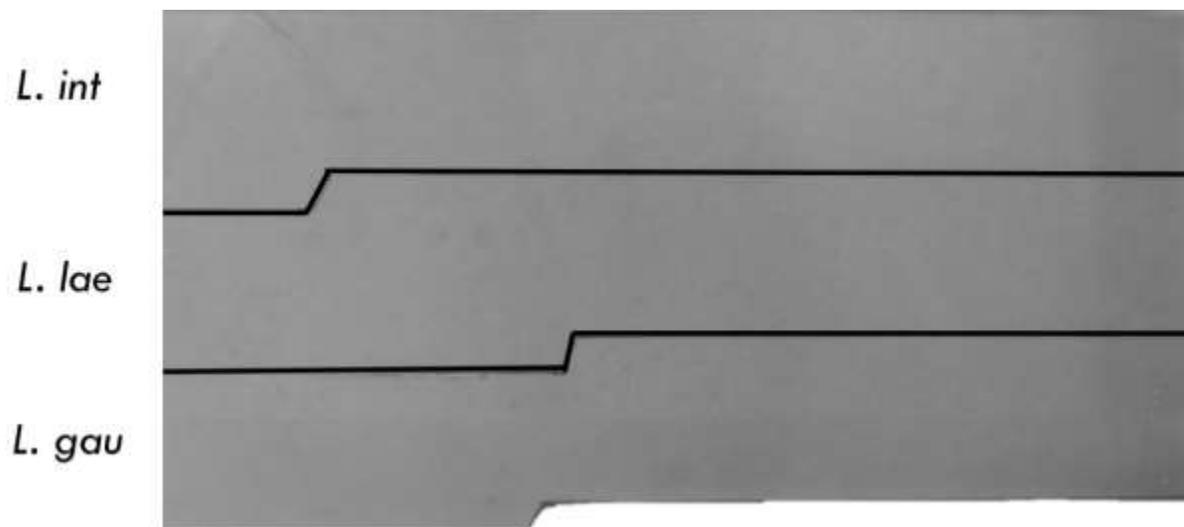


Figura 18. Fotografia da revelação das membranas de SPOT por ECL quando incubadas com $1 \mu\text{g. mL}^{-1}$ do anticorpo anti-*Acanthamoeba* mAb3 (Becker-finco et al, 2012). Fonte: Acervo Pessoal.

5.10. Análise *in silico* dos epítomos reconhecidos pelo LmAb2:

5.10.1. Alinhamento dos peptídeos/spots reconhecidos pelo LmAb2

Tendo em vista que o anticorpo LmAb2 é monoclonal, espera-se que os diferentes spots reativos a ele tenham sequência com algum grau de identidade entre si. Com o objetivo de avaliar as similaridades entre os diferentes epítomos reconhecidos pelo LmAb2, um alinhamento entre as sequências dos spots de média e alta reatividade foi realizado. Grande identidade e similaridade foi encontrada para os spots e agrupada em *clusters*. (Fig. 21).



Figura 19. Alinhamento de SPOTs contidos na membrana de celulose (representada na Fig. 18) que demonstraram reatividade frente ao LmAb2. Através do software Clustal Omega, spots reativos foram divididos em clusters de alinhamento de acordo com sua similaridade. Em verde, estão destacados os spots reativos de *L. laeta*, em vermelho os de *L. intermedia* e em azul, os de *L. gaucho*. Na representação acima, asteriscos representam identidade, “:” representam alta similaridade e “.” similaridade. Fonte: Clustal Omega/EBI-UK.

Resíduos	Cor	Propriedade
AVFPMILW	VERMELHO	Pequenos e hidrofóbicos (anel aromático)
DE	AZUL	Ácidos
RK	MAGENTA	Básicos
STYHCNGQ	VERDE	Hidroxil + sulfidril + aminas
Outros	CINZA	Aminoácidos não usuais

Tabela 3. Legenda para interpretação dos resultados do alinhamento de proteínas. Resíduos de aminoácido estão agrupados de acordo com suas características químicas e indicados por cor. Fonte: Adaptado da documentação do programa Clustal-Omega/EBI-UK.

Em relação à proximidade tridimensional entre spots reativos de uma mesma espécie, as medidas da distância entre spots para *L. gaucho* e *L. laeta* estão

representadas na tabela abaixo. Distâncias menores de 10 Å entre spots indicam que essas sequências provavelmente pertencem à um mesmo epítipo, tendo em vista que o raio da interface de interação de um anticorpo (parátipo) com um antígeno (epítipo) é de aproximadamente 10 Å. (Moreau et al, 2006, Chakrabarti et al, 2006). A proximidade entre estes spots confirma a característica monoclonal do anticorpo LmAb2. Dessa maneira, diferentes spots reativos de uma mesma espécie comporiam um mesmo epítipo, ao qual o LmAb2 apresenta especificidade.

SPOTS	Espécie	Distância
196 - 242	<i>Loxosceles intermedia</i>	7.6 Å
295 - 278	<i>Loxosceles laeta</i>	4.5 Å
295 - 343	<i>Loxosceles laeta</i>	7.5 Å
278 - 343	<i>Loxosceles laeta</i>	8.8 Å
390 - 372	<i>Loxosceles gaucho</i>	4.6 Å
278 - 414	<i>Loxosceles gaucho</i>	6.5 Å
390 - 414	<i>Loxosceles gaucho</i>	7.9 Å

Tabela 4. Distância tridimensional entre SPOTs reativos das espécies *L. intermedia*, *L. laeta* e *L. gaucho* (observados na Fig. 18) mensurada através do software PyMOL. Spots de mesma coloração apresentam identidade de sequência aminoacídica (demonstrada na Fig. 21). Fonte: Acervo Pessoal.

Através das análises realizadas, observa-se que os spots 196 e 242 de *L. intermedia* estão à 7.6 Å de distância e os spots 343 e 295 de *Loxosceles laeta* à 7.5 Å de distância. Interessantemente, em referência aos resultados de alinhamento entre spots mostrados na Fig. 21, o spot 196 de *L. intermedia* é muito similar ao spot 295 de *L. laeta*, e o spot 242 de *L. intermedia* possui identidade considerável com o spot 343 de *L. laeta*. Isso sugere que os aminoácidos contidos nos spots 196 e 242/343 e 295; compõe um único epítipo reconhecido de maneira específica pelo LmAb2. O mesmo se observa para *L. gaucho*, onde os spots 390 e 372 estão à 5.2 Å de distância e são altamente similares aos spots 278 e 295 de *L. laeta*, respectivamente (que apresentam 4.5 Å de distância entre si), sugerindo que estes spots compõem um mesmo epítipo

5.10.2. Posicionamento tridimensional dos spots reativos:

Objetivando analisar o posicionamento espacial dos peptídeos mais reativos frente ao LmAb2 na estrutura tridimensional de suas respectivas proteínas, a partir dos dados de cristalografia e difração de raio-X obtidos para a proteína fosfolipase-D de *L. laeta* (SMase 1 – PDB:1xx1), e a proteína fosfolipase-D de *L. intermedia* (Lid1 – PDB: 3RLH) os peptídeos foram alinhados com suas respectivas proteínas. Um modelo para a proteína fosfolipase-D de *L. gaucho* (LoxGA) foi construído utilizando o modelo da Lid1 (*L. intermedia*) através do software Swiss-Model.

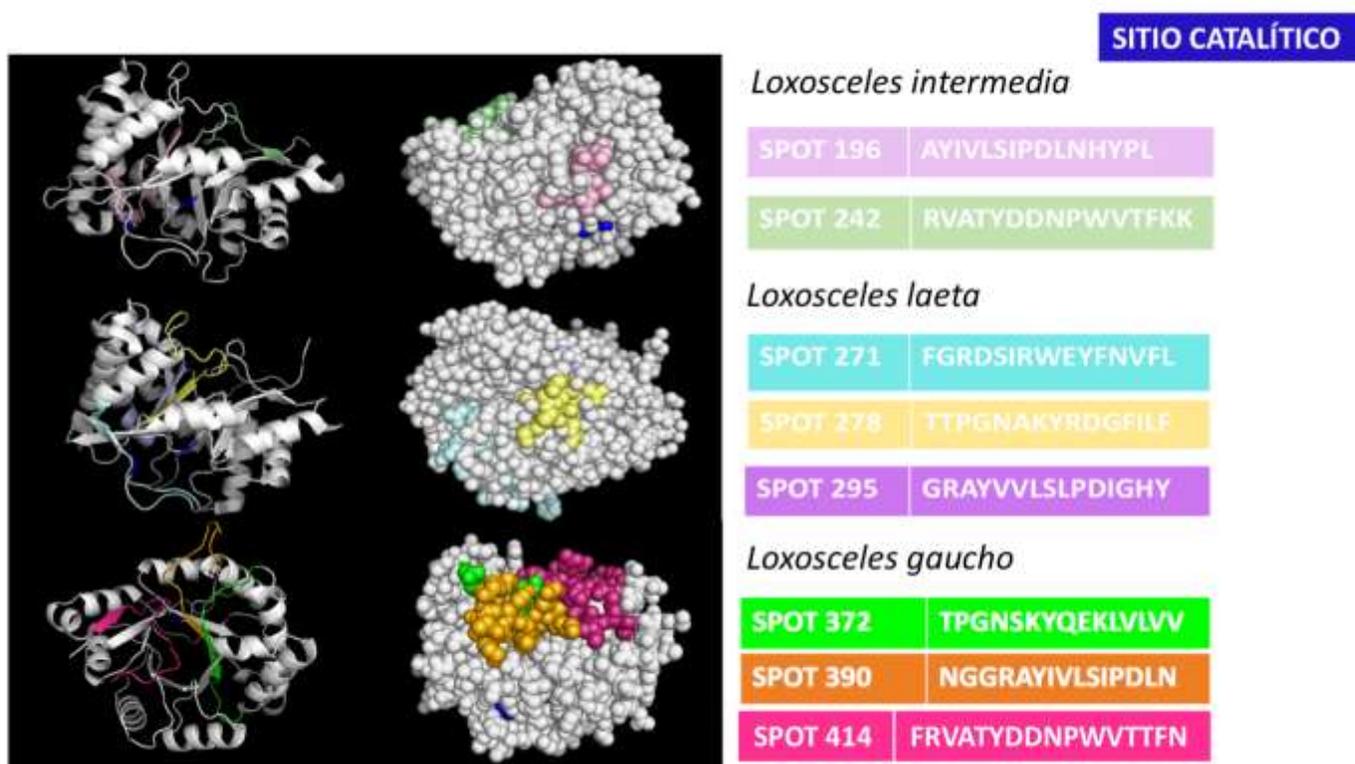


Figura 20. Estrutura tridimensional das fosfolipases contidas na membrana de SPOT, posicionamento tridimensional dos peptídeos mais reativos nestas estruturas e sequência aminoacídica dos peptídeos/spots reativos. Modelos obtidos através do programa PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC). Fonte: Acervo Pessoal

Através destas análises *in silico*, verificou-se o posicionamento na estrutura tridimensional dos peptídeos mais reativos contidos nas proteínas dermonecroticas,

quando expostos ao LmAb2. Tanto a exposição dos spots bem como a distância entre um spot e outro (Tabela 2) e sua proximidade do sitio catalítico foram analisadas (Figuras 23, 24 e 25). Observa-se que o sitio catalítico da Lid1 (*L. intermedia*) encontra-se mais exposto que o da Smase I/1xx1 de *L. laeta*, corroborando com a classificação de Ullah et al, 2011, que afirma que os resíduos de histidina do sitio catalítico das fosfolipases-D de classe I (presentes no veneno de *L. intermedia*) estão mais expostos e com isso o sitio catalítico mais disponível. Nota-se também que alguns peptídeos apresentam certa proximidade do sitio catalítico (abaixo de 10 Å), o que poderia indicar que o reconhecimento do LmAb2 é realizado próximo à esta região, portanto, sua interação com as toxinas poderia neutralizar os efeitos dermonecroticos das fosfolipases por impedimento alostérico deste sitio.

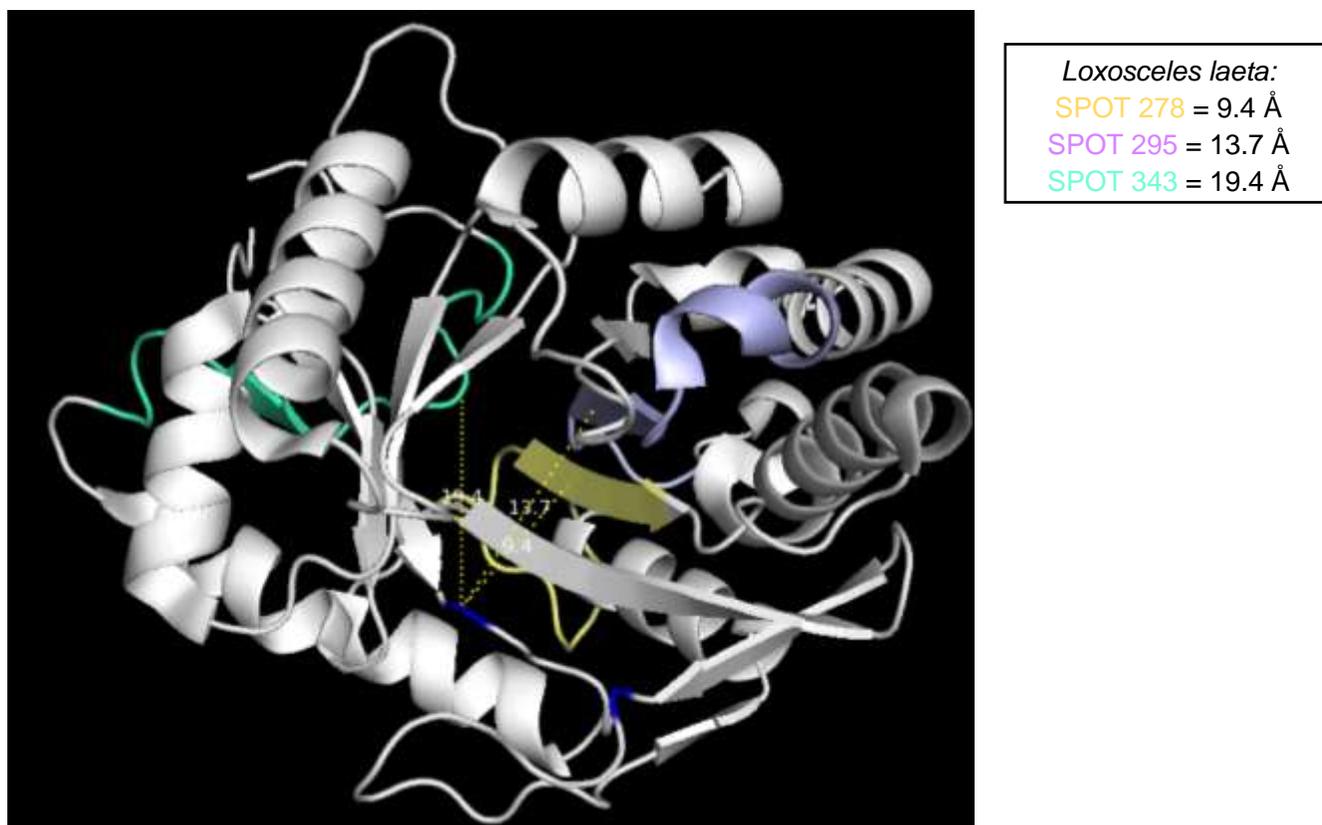


Figura 21. Alinhamento de SPOT reativos na estrutura tridimensional da fosfolipase 1XX1 de *Loxosceles laeta* e a medição da distância entre os spots e o sitio catalítico da enzima foram realizados utilizando o programa PyMOL(The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC.. A

nomenclatura dos spots está colorida de acordo com sua localização na estrutura tridimensional da proteína. Fonte: Acervo Pessoal.



Loxosceles gaucho:
SPOT 372 = 14.9 Å
SPOT 390 = 9.4 Å
SPOT 414 = 19.7 Å

Figura 22. Alinhamento de SPOT reativos na estrutura tridimensional da fosfolipase A1H de *Loxosceles gaucho* e a medição da distância entre os spots e o sitio catalítico da enzima foram realizados utilizando o programa PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC). A nomenclatura dos spots colorida de acordo com sua localização na estrutura tridimensional da proteína. Fonte: Acervo Pessoal

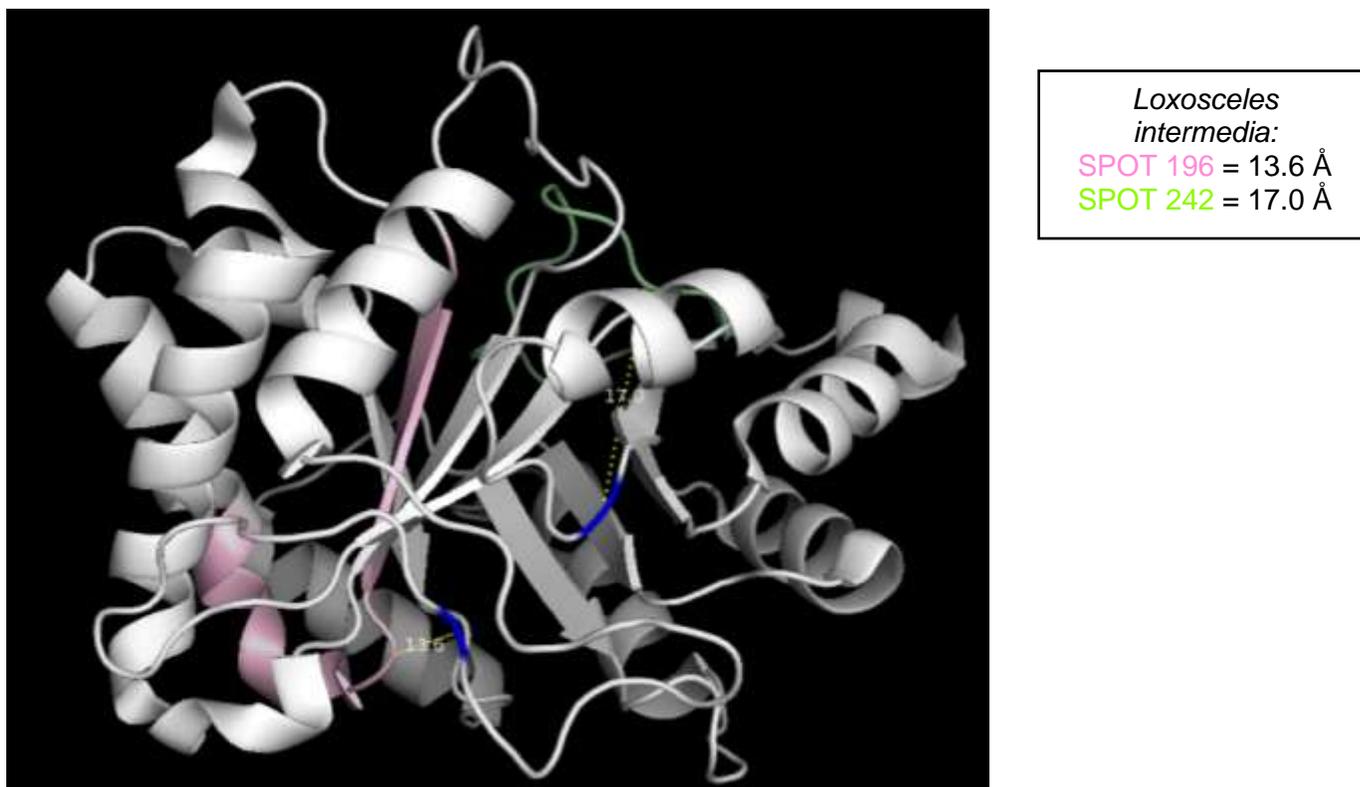


Figura 23. Alinhamento de SPOTS reativos na estrutura tridimensional da fosfolipase Lid1 de *Loxosceles intermedia* e a medição da distância entre os spots e o sitio catalítico da enzima foram realizados utilizando o programa PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC). Nomenclatura dos spots colorida de acordo com sua localização na estrutura tridimensional da proteína. Fonte: Acervo Pessoal.

Figura 24. A) Gel de agarose 2% representando a amplificação das regiões de cadeia leve e pesada do LmAb12. Observa-se uma banda na altura de 400 pares de base para cadeia pesada e 350 pares de bases para cadeia leve, como esperado. B) Sequenciamento do LmAb12 representado através do *collier de perles* das cadeias leve e pesada, obtido através do software IMGT/VQUEST. Fonte: ensaios previamente realizados pelo grupo.

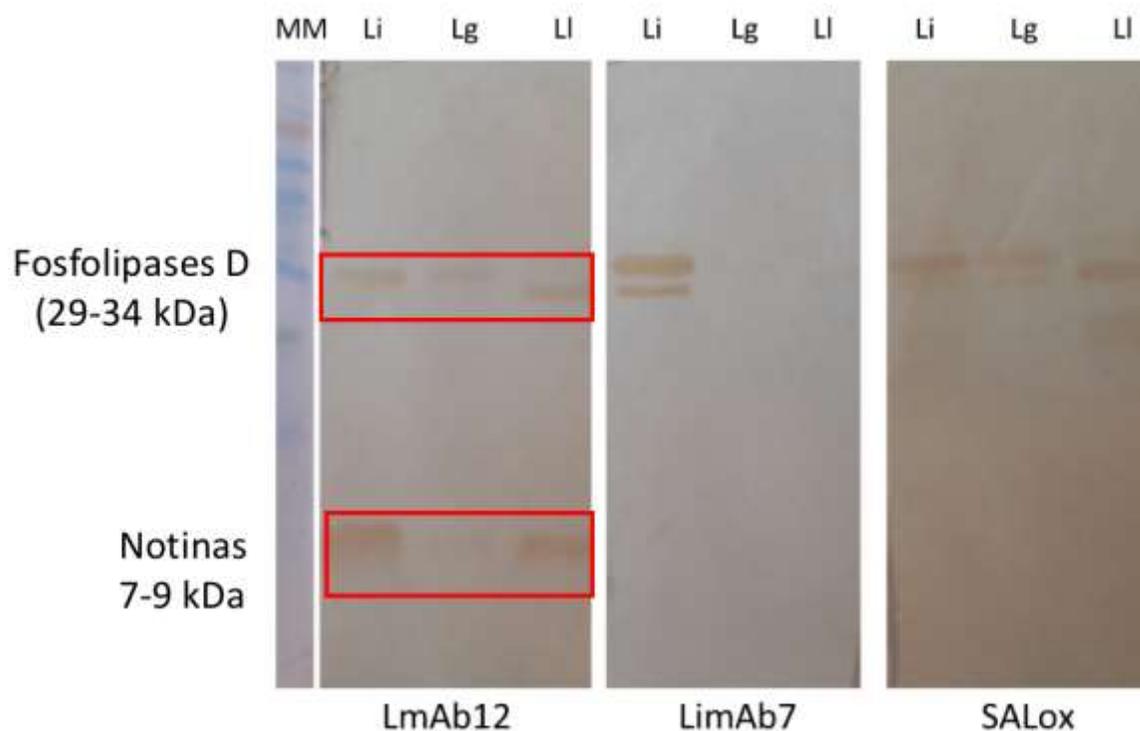


Figura 25. Caracterização Imunoquímica do LmAb12 através do ensaio de Western Blot. 10 μg de veneno de *Loxosceles intermedia*, *gaucho* e *laeta* foram transferidos em triplicata para uma membrana e incubados com (i) LmAb12 50 μg . mL^{-1} (ii) LimAb7 10 μg . mL^{-1} (iii) soro antiloxoscelico - SaLOX (1:50). A revelação foi realizada por IgG anti-mouse HRP (1:4000) e IgG anti-horse (1:30000). O substrato utilizado para observação dos imunocomplexos foi o DAB/Cloronaftol. Fonte: Previamente realizado pelo grupo.

6.1.1. Estudos de similaridade entre notinas loxoscelicas:

Tendo em vista, em um primeiro momento, foi estudada a similaridade entre as notinas loxoscelicas mais caracterizadas, LiTx1, LgTx1a e LiTx1c. (de Castro et al,

2004), através do alinhamento de suas sequências aminoacídicas representado na Fig 28.

```

LiTx1      --HGDGSKGCATKPDDWCCKNTPCKCPAWSSTSECRCAMDCSRRCK      44
Lgtx1a    --HGDGSKGCATKPDDWCCKNTPCKCPAWSSTSECRCAMDCSRRCK      44
LlTx1c    ACHGDGSKGCATQPDDWCCKKTPCK-PAWSSESECRCAQDCSRSCR      45
          *****:*****:***** ***** ***** ***** *;

```

Figura 26. Alinhamento entre notinas loxoscelicas descritas por de Castro et al, 2004 e Matsubara et al, 2013 (Litx1, LgTx1a e Lltx1c), realizado através do software Clustal-Omega. Legenda: “*” para resíduos conservados, “:” para resíduos muito similares e “.” para resíduos similares. Fonte: Adaptado de Clustal Omega/EBI-UK

Observa-se grande similaridade entre as sequências de notinas, sendo a LiTx1 idêntica à LgTx1a e ambas muito parecidas com a LiTx1c, com apenas algumas diferenças pontuais aminoacídicas. Esses resultados são compatíveis com os dados de alinhamento de notinas loxoscelicas realizado por Matsubara et. al, 2017, que sugeriu que essa família de toxinas seria conservada e ortóloga entre as espécies *Loxosceles intermedia*, *gaucho* e *laeta*.

6.1.2. Estudos de similaridade entre notinas e fosfolipases loxoscelicas:

Tendo isso em vista, a similaridade entre as notinas LiTx1, LgTx1a e LiTx1c e as fosfolipases Lid1, LoxGA_A1H e 1XX1 foi analisada. Destacada nos alinhamentos abaixo está a região de maior identidade entre essas estruturas. Observa-se nas regiões alinhadas entre a LgTx1a e loxGA_A1H uma conservação dos aminoácidos Gly3, Gly5 e Ser6 e alta similaridade para a Lys6, compondo o motivo **GXGSζ**. Entre a LiTx1 e a Lid1, resíduos conservados ou quimicamente similares observados foram AcAsp38, Cys39, Arg40, Cys42 e Lys43, compondo o motivo **DCXRCK** através de uma similaridade com a Ser40 e Arg42. Já entre a LiTx1c e a 1XX1, há conservação dos resíduos AcAsp7, Cys8 e Arg10 e similaridade para uma Glu6 e Ser9, compondo o motivo **XDCXR** (Fig. 29).

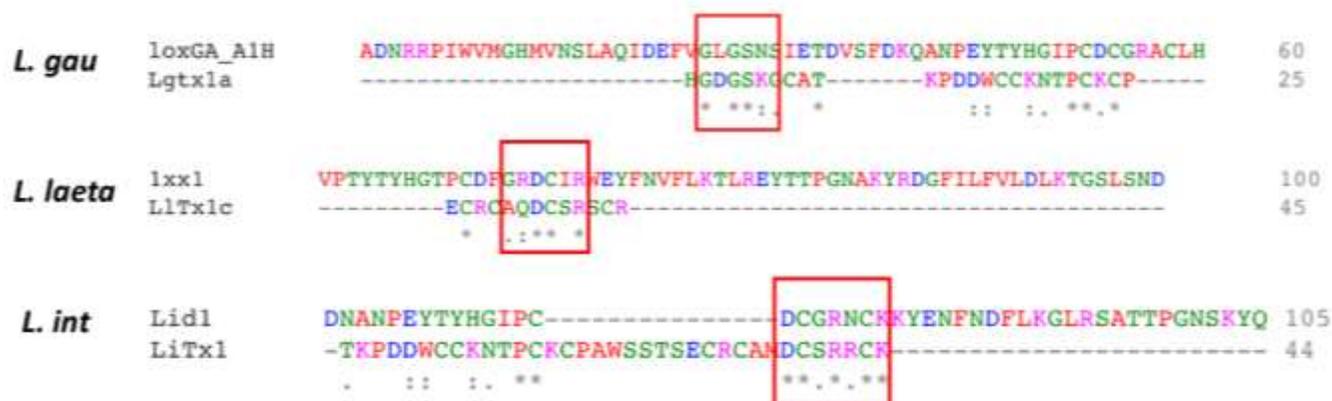


Figura 27. Alinhamento intraspécie entre notinas (Lgtx1a, Litx1 e Lltx1c) e fosfolipases loxoscelicas (A1H, 1xx1 e Lid1). Em destaque estão as regiões onde maior similaridade e identidade foram encontradas. Legenda: “*” para resíduo conservado, “:” para resíduos muito similares e “.” para resíduos similares. Fonte: Clustal Omega/EBI-UK.

Quando realizado um alinhamento entre os motivos aminoacídicos encontrados, observa-se um motivo menor (DXSK/DXSR), composto por resíduos conservados de ácido aspártico e serina e demais resíduos aminoacídicos de grupos funcionais similares (lisina e arginina), conforme representado na Figura 30, que poderia justificar a reação cruzada observada nos ensaios de *Western blotting*.

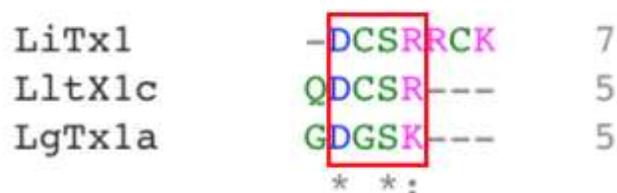


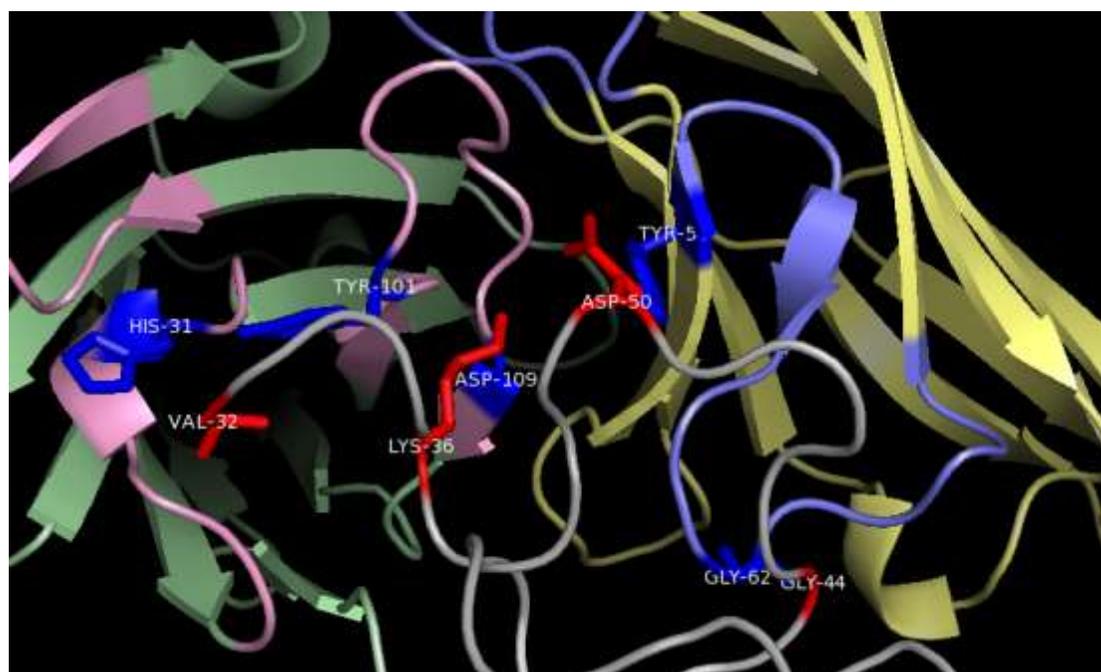
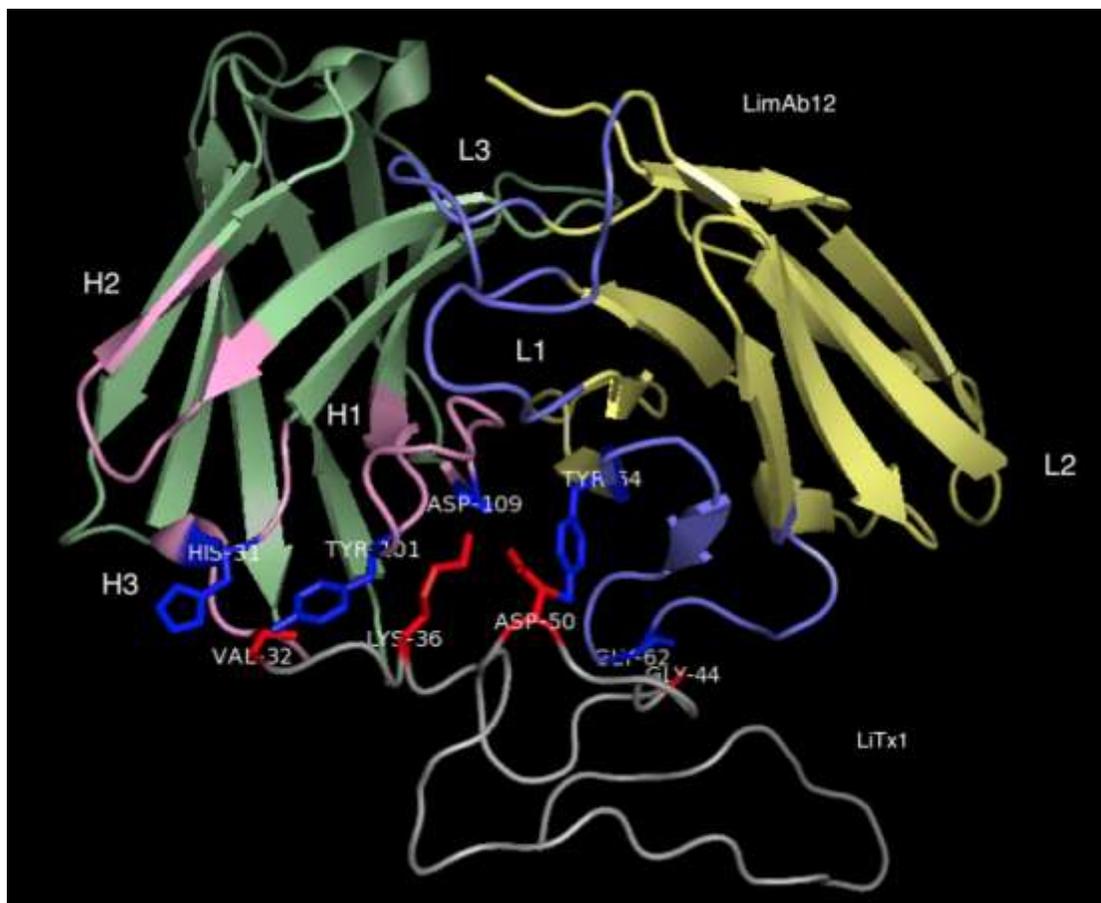
Figura 28. Alinhamento entre os motivos encontrados após alinhamento entre fosfolipases e notinas Loxoscelicas representado na Fig. 29. Em destaque está a região onde maior identidade foi encontrada. Legenda: “*” para resíduo conservado, “:” para resíduos muito similares e “.” para resíduos similares. Fonte: Clustal Omega/EBI-UK.

6.2. Modelagem molecular e *docking*:

Com base nos resultados do sequenciamento e da espectrometria de massa para o LmAb12 e com o objetivo de estudar os mecanismos de interação do LmAb12 e possível alvo LiTx1, análises *in silico* foram realizadas. Utilizando o software Swiss-model, um modelo tridimensional para a LiTx1 (PDB id. Q6B4T5) foi construído à partir da notina Spiderina A da aranha *Oxyopes takobius* (PDB id: 2N85), apresentando uma identidade de 38.43% com a respectiva estrutura. Adicionalmente, visando obter um modelo fidedigno para o LmAb12 o software Kotai Ab Builder foi utilizado, e um modelo para LmAb12 obtido apresentando 98.3% de identidade para a cadeia leve (PDB id. 4TQE) e 84.3% de identidade para a cadeia pesada (PDB id: 2GSI). Subsequentemente, um refinamento do loop H3 (CDR3 da cadeia pesada) também foi realizado para otimização do modelo.

Uma vez gerados os modelos para LmAb12 e LiTx1/Lgtx1a, foi possível realizar o *docking* entre as duas moléculas para obtenção do complexo de ligação LmAb12:LiTx1/LgTx1a. Para isso, utilizou-se o software ZDOCK que percorreu todas as possíveis combinações de interação entre o LmAb12 e a LiTx1, retornando cerca de 2000 *outputs* e visando obter previsões acuradas através da avaliação da complementariedade estrutural e energia de solvatação entre essas duas estruturas.

Abaixo está representado o modelo que obteve maior *score*, dentre os 2000 modelos gerados pelo algoritmo utilizado pelo programa. Quanto mais negativo o *score* total, maior a probabilidade de o modelo gerado representar a estrutura nativa da interação. Esse *score* é calculado através da soma e balanceamento entre os *scores* de energia, representados por forças eletrostáticas (pontes salinas, ligações de hidrogênio, ligações iônicas, pontes dissulfeto) e interações de van der Waals.



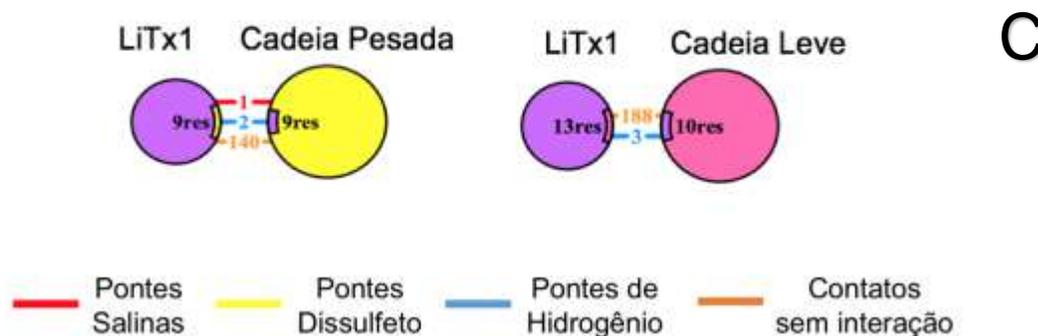


Figura 29. A) Modelo tridimensional de maior score do *docking* entre o LmAb12 e a LiTx1, realizado através do programa ZDOCK, e representação dos contatos aminoacídicos possivelmente envolvidos na interação antígeno/anticorpo (Obtidos através do programa PDBSum). B) Vista aproximada dos contatos amonoacídicos observados na interação antígeno/anticorpo. C) Diagrama representativo e quantitativo dos tipos de interação entre os aminoácidos contidos na LiTX e nas regiões de *loop* do LmAb12. Fonte: Acervo Pessoal/PyMOL/PDBsum

6.2.1. Interações entre aminoácidos:

Com o objetivo de estudar mais à fundo a interação entre o LmAb12 e a notina LitX1 através do *docking*, análises adicionais com o objetivo de avaliar possíveis interações entre resíduos de aminoácidos presentes nas regiões de CDR do LmAb12 e na LiTx1, a ferramenta PDBSum foi utilizada. Os CDRs L2, H1 e H3 do LmAb12 apresentaram envolvimento previsto na interação com a LiTx1, como representado na Tabela 3 e Fig. 31.

A análise sugeriu que a cadeia lateral de uma Gly62 no *loop* L2 interage com uma Gly44 na LiTx1, bem como as cadeias laterais da Tyr54 com a Asp50, através da formação de pontes de hidrogênio. Já no *loop* H1, observa-se interação entre a cadeia lateral de uma His31 com uma Val32 também através de pontes de hidrogênio. Por fim, no *loop* H3, observam-se interações de hidrogênio entre a cadeia lateral da Tyr101 com a mesma Val32. Adicionalmente, nesse mesmo *loop* H3 há uma possível formação de ponte salina através da interação entre a Asp109 e Lis36.

O estudo de Ramaraj et. al, 2012, realizou o *docking* de um grande número de estruturas não-redundantes (53 na sua totalidade) e avaliou a frequência de todos contatos aminoacídicos encontrados entre complexos antígeno/anticorpo. Dentre os

441 contatos numericamente possíveis, observou-se uma frequência significativa de aproximadamente 90 contatos específicos parátopo/epítopo. Dentre eles, contatos **Gly-Gly, Asp-Lis, Tyr-Asp, Asp-Glu, His-Val** (expressos sentido parátopo:epítopo) foram observados, corroborando com os resultados obtidos para o *docking* LmAb12:LiTx1, demonstrados na tabela abaixo.

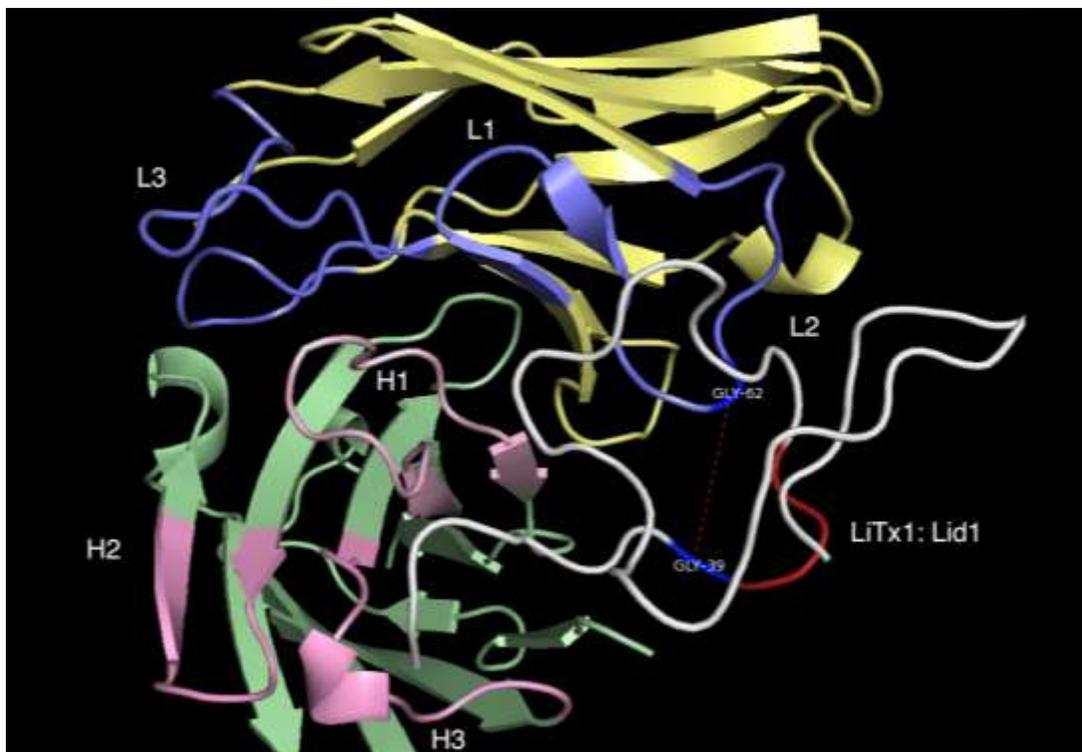
LmAb12	Resíduo do CDR	LiTx1	Tipo de interação	Distância (Å)
L2	Gly (62)	Gly (44)	Ponte de hidrogênio	1.62
	Tyr (54)	Asp (50)		2.08
	Asp (65)	Glu (69)		2.94
H1	His (31)	Val (32)	Ponte de hidrogênio	1.80
H3	Tyr (101)	Val (32)	Ponte de hidrogênio	1.45
	Asp (109)	Lis (36)	Ponte Salina	3.18

Tabela 5. Contatos entre aminoácidos observados nas regiões hipervariáveis de cadeia leve e pesada do LmAb12 e a estrutura da LiTx1 baseadas nos dados extraídos do modelo de docking através do software PDBSum. Também representados estão os tipos de interação envolvidos nos contatos aminoácidos, resíduos envolvidos sua distância (em angstroms). Fonte: Acervo Pessoal.

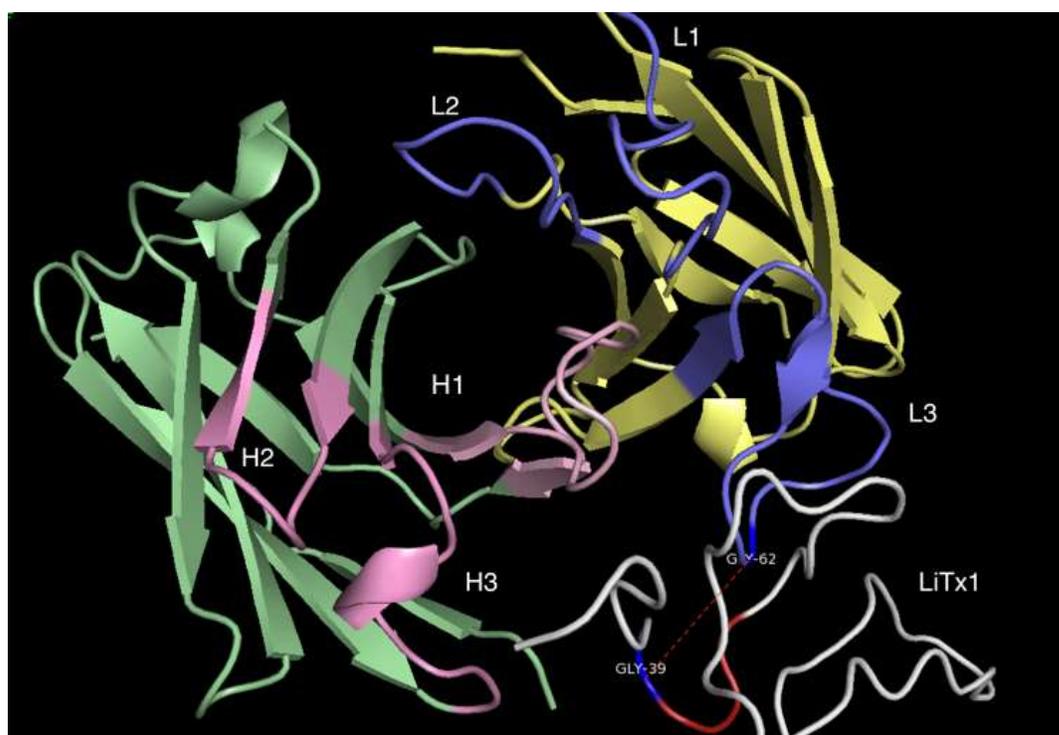
6.2.2. Posicionamento do motivo **DGSK/DCSR** no modelo de *docking*:

Após realizadas as análises de alinhamento, o motivo encontrado DGSK/DCSR foi localizada na estrutura tridimensional da LiTx1 e representado em vermelho na figura abaixo. Sua localização se encontrou espacialmente muito próxima à interação de ponte de hidrogênio (representada em linha pontilhada) entre o resíduo de Gly39 presente na estrutura da LiTx1, e a Gly62 no *loop* 2 da cadeia leve do LmAb12. Considerando que anticorpos monoclonais podem apresentar reconhecimento à mais de um epítopo, caso ambos apresentem regiões conservadas de alta similaridade (Cummings et al, 1984), a predição obtida poderia justificar o perfil de reatividade cruzada frente às fosfolipase observado para o LmAb12 em ensaios de *Western Blotting*, visto que o LmAb12 estaria interagindo com o antígeno através de diversos

contatos (Fig. 32), estando um deles justamente contido na região de similaridade com as fosfolipases de *Loxosceles intermedia*, *gaucho* e *laeta*.



A



B

Figura 30. Posicionamento tridimensional da região do motivo de similaridade encontrado entre as fosfolipases e notinas na Fig, 30 (DXSR) na estrutura tridimensional da LiTx1. Observa-se que um contato identificado entre o loop 3 de cadeia leve (Gly-62) e a LiTx1 (Gly 39) esta contido dentro do motivo. A) Orientação 1. B) Orientação 2. Fonte: PyMOL.

6.3. SPOT Synthesis/Mapeamento de Epítomos do LmAb12:

O ensaio de SPOT foi realizado sob diferentes condições, em duas membranas distintas. Para a membrana contendo as fosfolipases, (i) incubando-se o anticorpo LmAb12 purificado na concentração de $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$, (ii) incubando-se o anticorpo LmAb12 purificado na concentração de $2 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Quando a membrana contendo as fosfolipases foi incubada com o LmAb12 após sua purificação, nas concentrações de $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (Fig. 33) e $2 \mu\text{g. mL}^{-1}$ (Fig. 34), observou-se reatividade dose-dependente em relação aos epítomos da fosfolipase 1XX1 de *Loxosceles laeta*, todavia com baixa intensidade. Por esse motivo, análises de posicionamento tridimensional desses epítomos não foram realizadas. No entanto, considerando o perfil de reconhecimento do LmAb12 perante as fosfolipases das três espécies (observado através *Western Blotting*) e o pequeno reconhecimento destas no mapeamento de epítomos, existiria (i) possibilidade do reconhecimento do LmAb12 frente aos venenos se dar em epítomos descontínuos contidos nas fosfolipases (de Moura et. al, 2011) ou (ii) a reatividade baixa se atribuiria ao fato do alvo primário deste anticorpo ser as notinas e não as fosfolipases, de acordo com o perfil de reconhecimento observado em *Western Blotting* e dos dados obtidos para co-immunoprecipitação acoplada à espectrometria de massa.

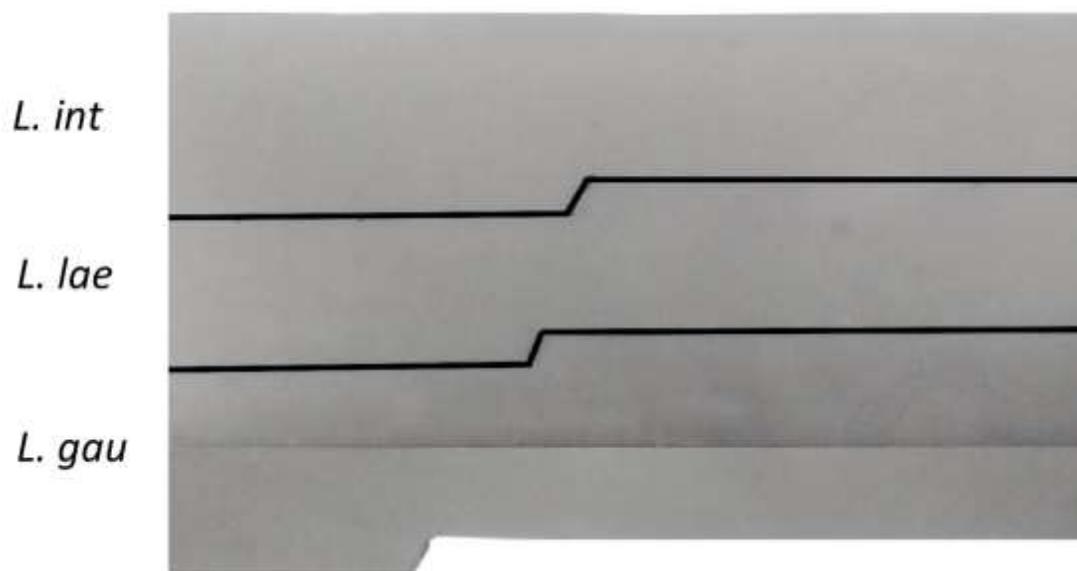


Figura 31. Fotografia da revelação da membrana de SPOT em filme ultra-sensível quando incubada com $1 \mu\text{g. mL}^{-1}$ de LmAb12. Fonte: Acervo Pessoal

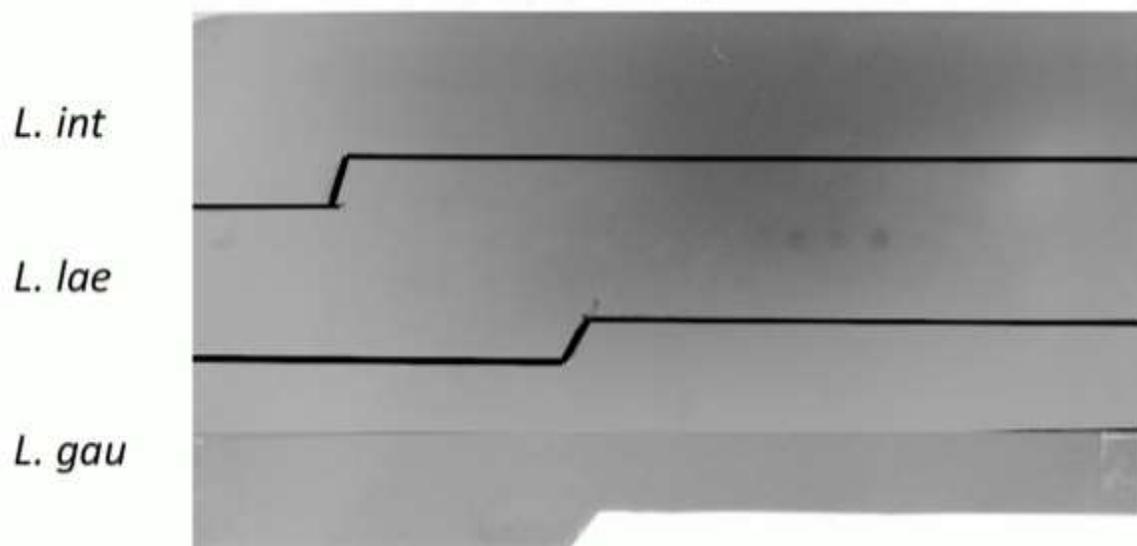


Figura 32. Fotografia da revelação das membranas de SPOT em filme ultra-sensível quando incubadas com $2 \mu\text{g. mL}^{-1}$ de LmAb12. Fonte: Acervo Pessoal.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS:

Com a realização deste trabalho foi possível concluir que:

- A caracterização imunoquímica do anticorpo monoclonal LmAb2 foi realizada e observou-se reatividade frente às fosfolipases D dos venenos de *L. intermedia*, *gaucho* e *laeta*, evidenciada por *Western Blotting* e mapeamento de epítomos.
- Os aminoácidos que participam do epítopo reativo ao LmAb2 localizaram-se em sua maioria próximos ao sítio ativo das fosfolipases, o que sugere um potencial efeito neutralizante da atividade dermonecrótica dessas proteínas. No entanto, futuros ensaios *in vivo* e *in vitro* necessitariam ser realizados para confirmação desta atividade neutralizante.
- O sequenciamento e isotipagem do LmAb2 foram realizados. No entanto, somente a sequência da região hipervariável de cadeia leve foi obtida.
- Um segundo anticorpo monoclonal, LmAb12, foi caracterizado quanto à sua reatividade frente as sequências linearizadas das fosfolipases loxoscelicas. Quantidades duas vezes maiores do anticorpo foram necessárias (em relação ao LmAb2) e ainda assim pouca reatividade foi observada, corroborando com o perfil observado em *Western Blotting*, onde o reconhecimento preferencial deste anticorpo se encontra na faixa das notinas, ou que se trata de um epítopo conformacional.
- Através de dados de sequenciamento e co-imunoprecipitação acoplada à espectrometria de massa previamente obtidos para o LmAb12, o *docking* deste com seu alvo predito (LiTx1) foi realizado e as possíveis regiões de contato entre essas duas estruturas identificadas. Os contatos encontrados estavam de acordo com os contatos frequentemente observados na interação antígeno/anticorpo.
- Um motivo de similaridade foi encontrado entre as fosfolipases e notinas, localizado em uma das regiões de contato do LmAb12 com a LiTx1,

justificando a reatividade cruzada observada para o LmAb12 em *Western Blotting*.

- Ambos anticorpos constituem ferramentas de potencial emprego imunodiagnóstico no Loxoscelismo. Ainda, o anticorpo LmAb2 apresenta potencial terapêutico a ser explorado, visto sua afinidade pelas fosfolipases, e o anticorpo LmAb12 potencial de utilização no estudo funcional das notinas, cuja atividade biológica em mamíferos ainda é desconhecida (LmAb12).

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

8.1. LmAb2

- Uma maneira de avaliar os componentes do veneno que se ligam especificamente e preferencialmente ao LmAb2 seria o emprego de futuros ensaios de co-imunoprecipitação acoplados à espectrometria de massa (Kessler et al, 1975).
- Obter a sequência da região hipervariável de cadeia pesada do LmAb2.
- A partir da identificação da sequência do potencial alvo do LmAb2 e das sequências das regiões hipervariável leve e pesada, ensaios *in silico* de modelagem e *docking* podem ser realizados, visando oferecer um maior *insight* a respeito das interações entre LmAb2 e seu alvo.
- A caracterização funcional do anticorpo quanto a seu potencial de neutralização também pode ser realizada, através dos ensaios de hemólise e atividade esfingomielinásica (Amplex-red).
- Através do conhecimento da sequência das regiões de cadeia leve e pesada, um fragmento recombinante de LmAb2 pode ser construído em diversos formatos (e.g. scFv, diabody, minibody) para ser empregado em ensaios imunodiagnósticos e em terapia anti-veneno.
- Aspectos como o sistema de expressão do fragmento, humanização, bem como a sua produção fusionada com biosensores (e.g. peptídeo mimético de biotina, fosfatase alcalina) também pode ser explorada para otimização de sua atividade.

8.2. LmAb12

Tendo em vista que a construção de um fragmento recombinante derivado de LmAb12 nas formas de scFv e diabody foi previamente realizada pelo grupo, e os respectivos já caracterizados:

- A espectrometria de massas dos co-immunoprecipitados de LmAb12/veneno de *Loxosceles intermedia* e *laeta* pode ser realizada, e outros alvos homólogos identificados.
- Seu potencial imunodiagnóstico pode ser explorado através de diferentes desenhos experimentais de ELISA, visando a detecção do veneno de *L. intermedia*, *gaucho* e *laeta* em diversos fluidos biológicos (e.g. urina, soro, suor, saliva).
- Ensaio de caracterização funcional da sua capacidade de neutralização podem ser realizados tanto para o monoclonal murino, quanto para os fragmentos e o potencial terapêutico desses anticorpos estudado.
- Tendo em vista a reatividade do LmAb2 e LmAb12 frente aos venenos loxoscelicos, a construção de um fragmento de anticorpo biespecífico contendo as regiões variáveis do LmAb2 e LmAb12 pode potencializar a utilização desses anticorpos no diagnóstico através do aumento da sensibilidade do ensaio.
- Tendo em vista o reconhecimento primário do LmAb12 pelas notinas, conforme observado por *Western Blotting* e mapeamento de epítomos, este anticorpo pode representar uma ferramenta interessante para o estudo dessas proteínas.

9. REFERÊNCIAS

ALVARENGA, L. M.; MARTINS, M. S.; MOURA, J. F.; KALAPOTHAKIS, E., OLIVEIRA, J. C, MANGILI, O. C.; GRANIER, C.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. Production of monoclonal antibodies capable of neutralizing dermonecrotic activity of *Loxosceles intermedia* spider venom and their use in a specific immunometric assay. **Toxicon** 42(7):725-31. 2003.

APPEL M.H., DA SILVEIRA R.B., CHAIM O.M., PALUDO K.S., SILVA D.T., CHAVES D.M., DA SILVA P.H., MANGILI O.C., SENFF-RIBEIRO A., GREMSKI W., NADER H.B., VEIGA S.S. Identification, cloning and functional characterization of a novel dermonecrotic toxin (phospholipase D) from brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. **Biochim. Biophys. Acta.** 1780:167–178. 2008.

APTE, A.; DANIEL, S. PCR Primer Design. **PCR Primer: A Laboratory Manual**, 2nd edition (eds. Dieffenbach and Dveksler). CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY, USA, 2003.

BIENERT S, WATERHOUSE A, DE BEER TA, TAURIELLO G, STUDER G, BORDOLI L, SCHWEDE T. The SWISS-MODEL Repository - new features and functionality. **Nucleic Acids Res.** 45(D1): D313-D319, 2017.

CHAIM, O. M., TREVISAN-SILVA, D., CHAVES-MOREIRA, D., WILLE, A. C. M., FERRER, V. P., MATSUBARA, F. H., VEIGA, S. S. Brown Spider (*Loxosceles* genus) Venom Toxins: Tools for Biological Purposes. **Toxins**, 3(3), 309–344. 2011.

CHAKRABARTI, P., JANIN, J. Dissecting protein-protein recognition sites. **Proteins.** 47(3):334-43. 2002.

CHAN, W.-T., VERMA, C. S., LANE, D. P., & GAN, S. K.-E. A comparison and optimization of methods and factors affecting the transformation of *Escherichia coli*. **Bioscience Reports**, 33(6), e00086. 2013.

CHAVES-MOREIRA, D., CHAIM, O. M., SADE, Y. B., PALUDO, K. S., GREMSKI, L. H., DONATTI, L., DE MOURA, J., MANGILI, O. C., GREMSKI, W., DA SILVEIRA, R. B., SENFF-RIBEIRO, A. AND VEIGA, S. S. Identification of a direct hemolytic effect dependent on the catalytic activity induced by Phospholipase-D (dermonecrotic toxin) from brown spider venom. **J. Cell. Biochem.**, 107: 655–666. 2009.

CHAVES-MOREIRA, D.; RIBEIRO-SENFF, A; WILLE, A. C. M; GREMSKI, L. H.; CHAIM, O. M.; VEIGA, S. S. **Journal of venomous animals and toxins including tropical diseases**, 23:6. 2017.

CHOW, S. K., CASADEVALL, A. Monoclonal Antibodies and Toxins —A Perspective on Function and Isotype. **Toxins**, 4(6), 430-454; 2012.

CUMMINGS H. S., PLOPLIS, V. A., BEALS, J. M., CASTELLINO, F. J. Interspecies cross-reactivity of monoclonal antibodies to various epitopes of human plasminogen. **Arch Biochem Biophys**. Apr; 230(1): 306–315. 1984

DIAS-LOPES A, L. FELICORI A, L. RUBRECHT B, S. COBO B, L. MOLINA B, C. NGUYENB, P. GALÉA, C. GRANIER B, F. MOLINA B, C. CHÁVEZ-OLÓRTEGUI. Generation and molecular characterization of a monoclonal antibody reactive with conserved epitope in sphingomyelinases D from *Loxosceles* spider venoms. **Vaccine**. 32:2086–2092. 2014.

DE CASTRO, C. S., SILVESTRE F. G., ARAÚJO, S. C, DE MY, G., MANGILI, O. C., CHÁVEZ-OLÓRTEGUI C, KALAPOTHAKIS, E. Identification and molecular cloning of insecticidal toxins from the venom of the brown spider *Loxosceles intermedia*. **Toxicon**, 44(3):273-80, 2004.

DE MOURA, J., FELICORI, L., MOREAU, V., GUIMARÃES, G., DIAS-LOPES, C., MOLINA, L., ALVARENGA, L., FERNANDES, P., FRÉZARD, F., RIBEIRO, R., FLEURY, C., NGUYEN, C., MOLINA, F., GRANIER, C. AND CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. Protection against the toxic effects of *Loxosceles intermedia* spider venom elicited by mimotope peptides. **Vaccine**. Volume 29 (7992-8001). 2011.

EICKSTEDT, V. R. D. Aranhas de importância médica no Brasil. Venenos animais: uma visão integrada. Rio de Janeiro: P.151–72. **Epuc**; 1994.

FERNANDES PEDROSA M. DE F., JUNQUEIRA DE AZEVEDO IDE L., GONÇALVES-DE-ANDRADE R. M., VAN DEN BERG C. W., RAMOS C. R., HO P. L., TAMBOURGI D. V. Molecular cloning and expression of a functional dermonecrotic and haemolytic factor from *Loxosceles laeta* venom. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 298: 5 (638-645). 2002.

FIELDS, C.; O'CONNELL, D., XIAO, S.; LEE, G. U., BILLIALD, P., MUZARD, J. **Nature protocols**. 8: 1125–1148. 2013.

FRANK, R. Spot-synthesis: an easy technique for the positionally addressable, parallel chemical synthesis on a membrane support. **Tetrahedron** 48, 9217–9232. 1992,

FROHMAN, M. A. (2015). The phospholipase D superfamily as therapeutic targets. **Trends Pharmacol Sci**. 3:137-44. 2015

FUTRELL, J. M. Loxoscelism. **American Journal of Medical Science**, 304:261–7. 1992.

GREMSKI L. H., DA SILVEIRA R. B., CHAIM O. M., PROBST C. M., FERRER V. P., NOWATZKI J., WEINSCHUTZ H. C., MADEIRA H. M., GREMSKI W., NADER H. B. A

novel expression profile of the *Loxosceles intermedia* spider venomous gland revealed by transcriptome analysis. **Molecular biosystems**. 2403–2416. 2010

HARRIS, F.; PHOENIX, D.A. An investigation into the ability of c-terminal homologues of *Escherichia coli* low molecular mass penicillin-binding proteins 4, 5 and 6 to undergo membrane interaction. **Biochimie**, 79. 171–174. 1997.

HOGAN CJ, BARBARO KC, WINKEL K. Loxoscelism: old obstacles, new directions. **Annals of Emergency Medicine**, 44:608–24. 2004.

J.X. DONG, Z.F. LI, H.T. LEI, Y.M. SUN, F. DUCANCEL, Z.L. XU, J.C. BOULAIN, J.Y. YANG, Y.D. SHEN, H. WANG. Development of a single-chain variable fragment-alkaline phosphatase fusion protein and a sensitive direct competitive chemiluminescent enzyme immunoassay for detection of ractopamine in pork. **Analitica Chimica Acta**, 736:85–91. 2012.

JIACOMINI GIZZI, I.; SILVA, S. K.; AUBREY, N.; MUZARD. J., CHAVEZ-OLORTEGUI, C.; DE MOURA, J.; BILLIALD, P., ALVARENGA, L., M. Immunodetection of the “brown” spider (*Loxosceles intermedia*) dermonecrotxin with an scFv alkaline phosphatase fusion protein. **Immunology letters**. 173 1–6. 2016.

JUSTE, M., MUZARD, J., BILLIALD, P. Cloning of the antibody kappa light chain V-gene from murine hybridomas by bypassing the aberrant MOPC21-derived transcript. **Anal Biochem**. 349 (159-161). 2006.

KALAPOTHAKIS E., ARAUJO S. C., DE CASTRO C. S., MENDES T. M., GOMEZ M. V., MANGILI, O. C., GUBERT I. C., CHÁVEZ-OLÓRTEGUI C. Molecular cloning, expression and immunological properties of LiD1, a protein from the dermonecrotic family of spider venom. **Toxicon**, 40:12, (1691-1699). 2002.

KARIM-SILVA, S., DE MOURA, J., NOIRAY, M., MINOZZO, J. C., AUBREY, N., ALVARENGA, L. M., BILLIALD, P. Generation of recombinant antibody fragments with toxin-neutralizing potential in loxoscelism. **Immunology Letters** 176: 90–96. 2016

LASKOWSKI, R. A.; PDBsum: summaries and analyses of PDB structures, **Nucleic Acids Research**. Volume 29, Issue 1, 2001.

LEFRANC, M.-P., GIUDICELLI, V., KAAS, Q., DUPRAT, E., JABADO-MICHALOUD, J., SCAVINER, D., LEFRANC, G. IMGT, the international ImMunoGeneTics information system®. **Nucleic Acids Research**, 33 (Database Issue). 2005.

LINHART, C., SHAMIR, R. Degenerate primer design: theoretical analysis and the HYDEN program. **Methods in Molecular Biology**. 402:221-244. 2007.

LUCAS S. M. The history of venomous spider identification, venom extraction methods and antivenom production: a long journey at the Butantan Institute, São Paulo, Brazil. **Journal of Venomous Animals And Toxins Including Tropical Diseases**, 21:21. 2015.

MALAUQUE C. M., M.L. SANTORO, J.L. CARDOSO, M.R. CONDE, C.T. NOVAES, J.Y. RISK, F.O. FRANC, A, C.R. DE MEDEIROS, H.W. FAN. Clinical picture and laboratorial evaluation in human loxoscelism. **Toxicon**, 58 (8) 664–671. 2011.

MARKOULATOS, P.; SIAFAKAS, N.; MONCANY, M. Multiplex polymerase chain reaction: A practical approach. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. Volume 16, (47-51). 2002.

MATSUBARA, F.; GREMSKI, L.; MEISSNER, G. et al. A novel ICK peptide from the *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom gland: Cloning, heterologous expression and immunological cross-reactivity approaches. **Toxicon**, 71 (148-158). 2013.

MATSUBARA, F.; MEISSNER, G.; HERZIG, V. et al. Insecticidal activity of a recombinant knottin peptide from *Loxosceles intermediavenom* and recognition of these peptides as a conserved family in the genus. **Insect Molecular Biology**. 26 (25-34). 2017.

MOREAU, V, GRANIER, C, VILLARD, S., LAUNE D., MOLINA, F. Discontinuous Epitope Prediction Based on Mimotope Analysis. **Bioinformatics**. 22 (1088-1095). 2006.

MUZARD, J., BOUABDELLI, M., ZAHID, M., OLLIVIER, V., LACAPÈRE, J. J., JANDROT-PERRUS, M. AND BILLIALD, P. Design and humanization of a murine scFv that blocks human platelet glycoprotein VI in vitro. **The FEBS Journal**, 276: 4207–4222. 2009

N.I. PLATNICK, the world spider catalog, version 13.5. American Museum of Natural History, 2013. Disponível em: <http://research.amnh.org/iz/spiders/catalog> (acesso em 10.05.17).

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

PIERCE BG, WIEHE K, HWANG H, KIM BH, VREVEN T, WENG Z. ZDOCK Server: Interactive Docking Prediction of Protein-Protein Complexes and Symmetric Multimers. **Bioinformatics**, 30(12): 1771-3. 2014.

RAMADA, J. S.; BECKER, F. A.; MINOZZO, J. C.; FELICORI, L. F.; DE AVILA, R. A. M.; MOLINA, F.; NGUYEN, C.; DE MOURA, J.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C.; ALVARENGA, L. M.; (2013). Synthetic peptides for in vitro evaluation of the neutralizing potency of *Loxosceles* antivenoms. **Toxicon**. 73 (47-55). 2013.

RAMARAJ, T., ANGEL, T., DRATZ, E. A., JESAITIS, A. J., & MUMEY, B. Antigen–antibody interface properties: Composition, residue interactions, and features of 53 non-redundant structures. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1824(3), 520–532. 2012.

ROJAS, J. M., ARÁN-SEKUL, T., CORTÉS, E., JALDÍN, R., ORDENES, K., ORREGO, P. R., ... CATALÁN, A. Phospholipase D from *Loxosceles laeta* Spider Venom Induces IL-6, IL-8, CXCL1/GRO- α , and CCL2/MCP-1 Production in Human Skin Fibroblasts and Stimulates Monocytes Migration. **Toxins**, 9(4), 125. 2017.

RONCOLATO, E. C., PUCCA, M. B., FUNAYAMA, J. C., BERTOLINI, T. B., CAMPOS, L. B., BARBOSA, J. F. Human antibody fragments specific for *Bothrops jararacussu* venom reduce the toxicity of other *Bothrops sp.* venoms. **Journal of Immunotoxicology**, 10(2):160-8. 2013.

Secretaria da Saúde. Aranhas: aspectos clínicos e epidemiológicos. Disponível em: <http://www.saude.pr.gov.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=390> (acesso em 18.06.17).

SIEVERS F, WILM A, DINEEN DG, GIBSON TJ, KARPLUS K, LI W, LOPEZ R, MCWILLIAM H, REMMERT M, SÖDING J, THOMPSON JD, HIGGINS D. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. **Molecular Systems Biology**.

SINAN (Sistema de Informação de Agravo de Notificação). Sistema Único de Saúde (SUS). Casos de acidentes por aranhas no brasil. (2015). Em ministério da saúde (ed. 2015) Brasília;

STOECKER, W. V., GREEN, J. A., & GOMEZ, H. F. 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), 888–890. 2006.

TICONA, C. A. M., SÁNCHEZ., C. C. Loxoscelismo: evaluación clínica, tratamiento y prevención. Instituto Nacional De Salud. 2006.

ULLAH, A., DE GIUSEPPE, P. O., MURAKAMI, M. T., TREVISAN-SILVA, D., WILLE, A. C. M., CHAVES-MOREIRA, D., GREMSKI, L. H., DA SILVEIRA, R. B., SENNF-RIBEIRO, A., CHAIM, O. M., VEIGA, S. S. & ARNI, R. K. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of a class II phospholipase D from *Loxosceles intermedia* venom. **Acta Crystallographica**. F67, 234-236. 2011.

ULLAH, A., MAGALHAES, G. S., MASOOD, R., MARIUTTI, R. B., CORONADO, M. A., MURAKAMI, M. T., BARBARO, K. C. & ARNI, R. K. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of a novel sphingomyelinase D from *Loxosceles gaucho* venom. **Acta Crystallographica**. F70, 1418-1420. 2014.

YAMASHITA K., IKEDA K., AMADA K., LIANG S., TSUCHIYA Y., NAKAMURA H., SHIRAI H., STANDLEY D. M.; Kotai Antibody Builder: automated high-resolution structural modeling of antibodies. **Bioinformatics**, Volume 30, Issue 22, 2014.

ZAHID M., LOYAU S., BOUABDELLI M., AUBREY N., JANDROT-PERRUS M., BILLIALD P. Design and reshaping of an scFv directed against human platelet glycoprotein VI with diagnostic potential, **Analytical Biochemistry**, 417:274-282. 2011.

ZELA, S. P., FERNANDES PEDROSA, M. F., MURAKAMI, M. T., DE ANDRADE, S. A., ARNI, R. K. & TAMBOURGI, D. V. Crystallization and preliminary crystallographic analysis of SMase I, a sphingomyelinase from *Loxosceles laeta* spider venom. **Acta Crystallographica**. D60, 1112-1114. 2004