

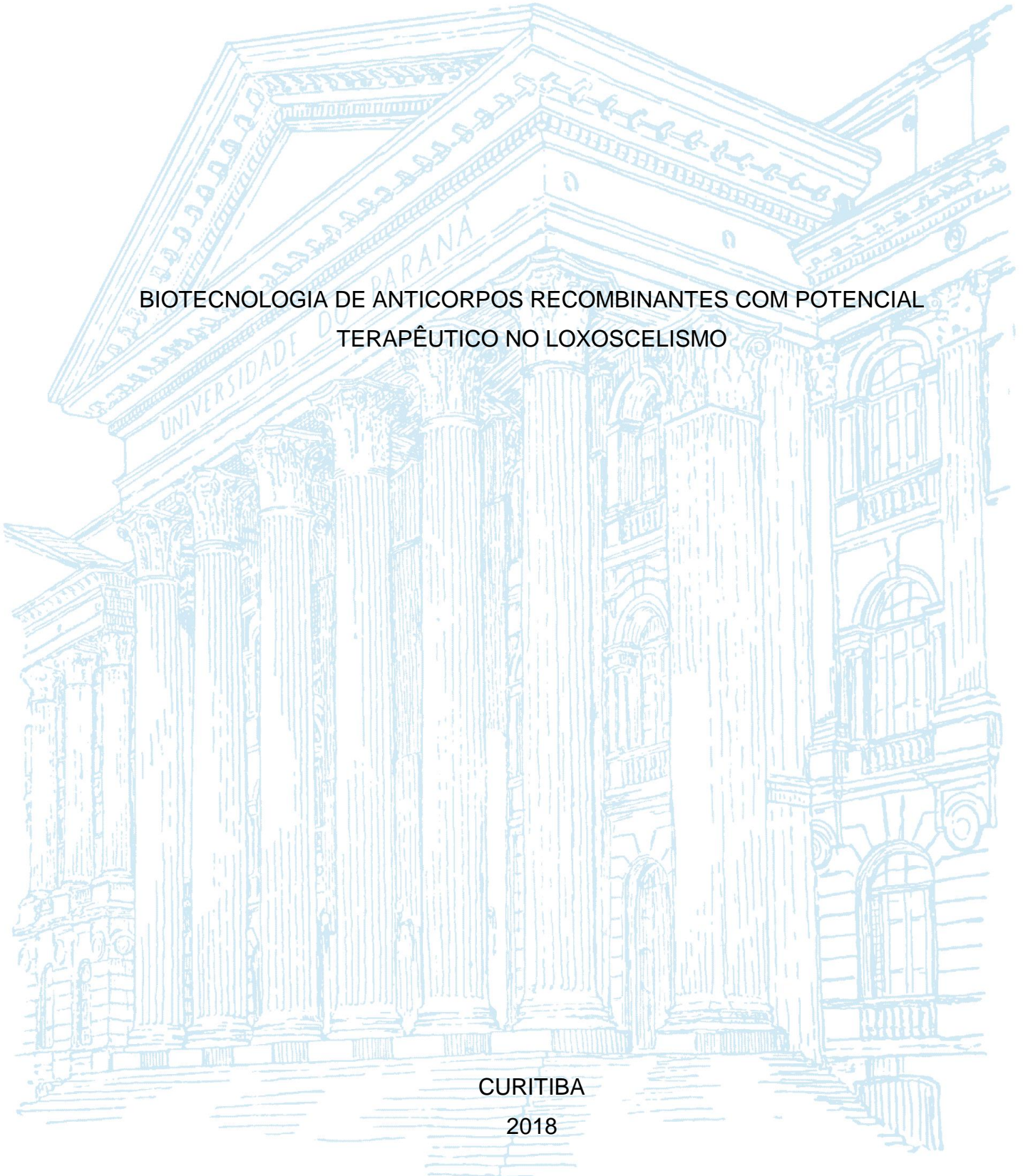
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

SARAH LOTT MORETTO

BIOTECNOLOGIA DE ANTICORPOS RECOMBINANTES COM POTENCIAL
TERAPÊUTICO NO LOXOSCELISMO

CURITIBA

2018



SARAH LOTT MORETTO

BIOTECNOLOGIA DE ANTICORPOS RECOMBINANTES COM POTENCIAL
TERAPÊUTICO NO LOXOSCELISMO

Monografia apresentada ao curso de Graduação em Ciências Biológicas, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Alessandra Becker Finco

Co-orientadora: Msc. Sabrina Karim-Silva

CURITIBA

2018

AGRADECIMENTOS

À professora Alessandra, querida orientadora, por nunca ter duvidado de mim desde o meu primeiro dia no laboratório, pela amizade, carinho, apoio, paciência, orientação, boas risadas durante os cafés e madrugadas em claro... Sou eternamente grata a você.

À minha co-orientadora, doutoranda Sabrina, pela paciência, apoio, carinho, amizade, compaixão e por se dispor a me explicar mil vezes as mesmas coisas...

Às professoras Larissa, minha segunda orientadora, e Juliana pelos conselhos e apoio.

À Bel, pela ajuda e apoio diários, almoços, cafés e caronas... Você foi essencial para a conclusão desse trabalho.

Aos meus pais, por terem me dado essa oportunidade inesquecível, e pelo simples fato de me amarem incondicionalmente. Não teria chegado até aqui sem o amor de vocês.

A todos do Laboratório de Imunoquímica, Isabel, Nicolle, Fábio, Chaara, João, Isabella, Bianca... Vocês fizeram parte dessa etapa da minha vida e fizeram cada dia de experimento valer a pena.

Aos meus queridos amigos da biologia, Damaris, Helen, Aléxia, Larissa, Carolina, Gustavo, Fernanda, Chaara, que sempre me faziam rir nas manhãs, tardes e noites de aula.

Aos meus queridos amigos, Helena e Rodrigo, que estiveram comigo desde o primeiro dia de aula, e sempre me deram motivos para sorrir e seguir em frente. Vocês são indispensáveis.

Ao meu namorado, Luiz Henrique, que sempre me incentivou a persistir nos momentos em que eu mais queria desistir. Obrigada por todos os segundos que esteve ao meu lado.

Ao CPPI (Centro de Pesquisa e Produção de Imunobiológicos) por gentilmente disponibilizar os venenos.

Às agências de fomento CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo auxílio financeiro à pesquisa no Brasil.

À UFPR pela oportunidade de estudar na instituição e permitir que esse trabalho fosse realizado.

*A Deus, que permaneceu ao meu lado nos meus momentos mais solitários.
Aos meus pais, Rossana e Antonio Carlos, que nunca soltaram minha mão.
Ao meu querido primo, Fernando, que agora não está mais entre nós, mas
certamente é um anjo ao lado do Senhor.*

*“A ciência é a poesia da realidade.”
(Richard Dawkins)*

RESUMO

O loxoscelismo é a principal forma de araneísmo na América do Sul, sendo causado pela inoculação do veneno de aranhas do gênero *Loxosceles*, mais conhecidas como aranhas marrom. As aranhas marrom estão distribuídas mundialmente e, no Brasil, as espécies consideradas de importância médica são *Loxosceles gaucho*, *L. laeta* e *L. intermedia*. Acidentes causados por aranhas deste gênero desencadeiam quadro clínico característico de dermonecrose no local da picada. Até o momento, não existe diagnóstico específico, e este se baseia em três aspectos: lesão compatível, epidemiologia e identificação do aracnídeo. As formas de tratamento recomendadas são administração de corticoides e uso de antivenenos, considerado o tratamento específico e de melhor resultado desde que administrado precocemente. Apesar das inovações tecnológicas, a produção dos soros antivenenos ainda obedece ao mesmo modelo básico proposto há um século. Neste sentido, considerando o uso crescente de anticorpos monoclonais e seus fragmentos humanizados como terapia em diversas patologias, este trabalho tem como objetivo produzir e caracterizar fragmentos de anticorpo recombinantes humanizados, nos formatos scFv e *diabody*, contra as toxinas dermonecróticas presentes no veneno de *Loxosceles intermedia*. Para isso, as sequências deduzidas das regiões variáveis do anticorpo monoclonal mAb7, previamente produzido pelo grupo, foram usadas como molde na humanização e construção de um fragmento de cadeia única (scFv) e um dímero de scFv denominado de *diabody*. A produção desses fragmentos de anticorpo foi realizada em sistema de expressão bacteriano e avaliada por PCR e eletroforese em gel de agarose. A caracterização dos fragmentos foi evidenciada por SDS-PAGE e imunoensaio ELISA e *Western blotting*. Os resultados do sequenciamento bem como o aparecimento de bandas específicas em gel de agarose confirmaram a construção dos fragmentos. A migração eletroforética dos extratos periplasmáticos demonstrou a eficiência de produção em sistema bacteriano. Foi possível verificar que os anticorpos recombinantes produzidos foram capazes de reconhecer especificamente as toxinas dermonecróticas do veneno de *L. intermedia*, da mesma maneira que a molécula parental, o anticorpo monoclonal mAb7, sugerindo eficiência na construção e produção dos fragmentos. Ensaio *in vitro*, como neutralização de hemólise e atividade esfingomielinásica, e *in vivo*, como a neutralização da atividade dermonecrótica em coelhos, são perspectivas para validação da funcionalidade e futuro emprego terapêutico destas moléculas.

Palavras-chave: Aranha marrom. Anticorpo recombinante. Antiveneno.

ABSTRACT

Loxoscelism is the main form of araneism in South America, being generated by the inoculation of the venom of spiders of the genus *Loxosceles*, also known as brown spiders. Brown spiders are spread worldwide and in Brazil, the species considered of medical importance are *Loxosceles gaucho*, *L. laeta* and *L. intermedia*. Accidents caused by spiders of this genus initiate the characteristic clinical feature of dermonecrosis on the bite site. Until now, there are no specific diagnosis, and it is based on three aspects: compatible lesion, epidemiology and identification of the arachnid. The recommended forms of treatment are steroids administration and the use of antivenoms, considered the specific treatment and of better result if administered early. Despite the technological innovations, the antivenom serum production still follows the same basic model proposed a century ago. In this sense, considering the increasing use of monoclonal antibodies and its humanized fragments as therapy forms in many pathologies, this work aims to produce and characterize humanized recombinant fragments of antibody, in scFv and *diabody* formats, against the dermonecrotic toxins from *Loxosceles intermedia* venom. For this, the deduced sequence of the monoclonal antibody mAb7 variable regions, previously produced by the group, were used as template in humanization and construction of a single chain fragment (scFv) and a scFv dimer denominated *diabody*. Production of the antibody fragments was performed in bacterial expression system and evaluated by PCR and agarose gel electrophoresis. The fragments characterization was performed by SDS-PAGE and immunoassays ELISA and *Western blotting*. Sequencing results as well as the appearance of specific bands on agarose gel confirmed the fragments construction. Electrophoretic migration of the periplasmic extract demonstrated the efficiency of production on bacterial system. It was possible to verify that the recombinant antibodies were capable of recognizing specifically the dermonecrotic toxins from *L. intermedia* venom likewise the parental molecule, the monoclonal antibody mAb7, suggesting efficiency on the construction and production of the fragments. *In vitro* assays, such as neutralization of hemolysis and sphingomyelinase activity, and *in vivo*, such as neutralization of dermonecrotic activity in rabbits, are prospects for the functionality validation and future therapeutic application of these molecules.

Keywords: Brown spider. Recombinant antibody. Antivenom.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - MORFOLOGIA DE <i>LOXOSCELES</i> SPP.	21
FIGURA 2 - COMPONENTES DO VENENO DE <i>LOXOSCELES</i>	21
FIGURA 3 - PERFIL ELETROFORÉTICO DAS PROTEÍNAS DO VENENO DE <i>LOXOSCELES</i>	23
FIGURA 4 - LOXOSCELISMO CUTÂNEO.....	26
FIGURA 5 - IMUNOGLOBULINA G E FRAGMENTOS RECOMBINANTES.....	28
FIGURA 6 - REDESIGN DO GENE SINTÉTICO DO ANTICORPO RECOMBINANTE	32
FIGURA 7 - EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL DAS COLÔNIAS TOP10 TRANSFORMADAS.....	38
FIGURA 8 - DIGESTÃO ENZIMÁTICA E SEQUENCIAMENTO PARA CONFIRMAÇÃO DO INSERTO	39
FIGURA 9 - CONSTRUÇÃO DO GENE PARA O ANTICORPO RECOMBINANTE <i>DIABODY</i>	40
FIGURA 10 - EXTRAÇÃO DO DNA PLASMIDIA DAS COLÔNIAS TOP10 TRANSFORMADAS.....	41
FIGURA 11 - SEQUENCIAMENTO DO <i>DIABODY</i>	41
FIGURA 12 - PCR DE COLÔNIA DAS CEPAS DE EXPRESSÃO.....	42
FIGURA 13 - SDS-PAGE DE AMOSTRAS CONTENDO OS FRAGMENTOS	46
FIGURA 14 - <i>WESTERN BLOTTING</i> DE AMOSTRAS CONTENDO OS FRAGMENTOS.....	47
FIGURA 15 - REATIVIDADE DOS FRAGMENTOS FRENTE AOS VENENOS.....	49

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - REATIVIDADE DOS EXTRATOS PERIPLASMÁTICOS CONTENDO SCFV	44
GRÁFICO 2 - REATIVIDADE DOS EXTRATOS PERIPLASMÁTICOS CONTENDO <i>DIABODY</i>	45
GRÁFICO 3 - REATIVIDADE DE AMOSTRAS CONTENDO OS FRAGMENTOS FRENTE AO VENENO	48

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - ACIDENTES POR ARANHAS NO PERÍODO DE 2007 A 2016 NO BRASIL	20
TABELA 2 - REAÇÃO DE PCR DE COLÔNIA.....	34

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

2xTY	- Yeast Extract Tryptone (Extrato de Levedura Triptona)
C1P	- Ceramide-1-Phosphate (Ceramida-1-Fosfato)
ECL	- Enhanced Chemiluminescence (Quimioluminescência)
ELISA	- Enzyme-linked Immunosorbent Assay (Ensaio de Imunoabsorção Enzimática)
HRP	- Horseradish Peroxidase (Peroxidase de Rábano)
ICK	- Inhibitor Cystine Knot (Nó de Cistina Inibidor)
IgGs	- Immunoglobulin G (Imunoglobulinas G)
IPTG	- Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (Isopropil- β -D-galactosídeo)
LB	- meio Luria-Bertani
LiD1	- <i>Loxosceles intermedia</i> dermonecrotic protein 1 (Proteína dermonecrótica 1 de <i>Loxosceles intermedia</i>)
LPA	- Lysophosphatidic Acid (Ácido lisofosfatídico)
LPC	- Lysophosphatidylcholines (Lisofosfatidilcolina)
mAb	- Monoclonal Antibody (Anticorpo monoclonal)
OD	- Optical Density (Densidade Óptica)
PBS	- Phosphate Buffered Saline (Solução salina tamponada com fosfato)
PLDs	- Phospholipases D (Fosfolipases D)
recLiD1	- <i>Loxosceles intermedia</i> recombinant dermonecrotic protein 1 (Proteína dermonecrótica 1 recombinante de <i>Loxosceles intermedia</i>)
ROS	- Reactive Oxygen Species (Espécies reativas de oxigênio)
scFv	- Single Chain Antibody Fragment (Fragmento de anticorpo de cadeia única)
SDS-PAGE	- Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio)
TCTP	- Translationally controlled tumour protein (proteína tumoral translacionalmente controlada)
TES	- Tris-HCl EDTA sucrose
TMB	- Tetramethylbenzidine (tetrametilbenzidina)
VH	- Variable domain of the Heavy chain (domínio variável da cadeia pesada de anticorpo)

VL - Variable domain of the Light chain (domínio variável da cadeia leve de anticorpo)

LISTA DE SÍMBOLOS

® - marca registrada

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	JUSTIFICATIVA.....	17
1.2	OBJETIVOS	18
1.2.1	Objetivo geral	18
1.2.2	Objetivos específicos.....	18
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1	EPIDEMIOLOGIA	19
2.2	ARANHAS DO GÊNERO <i>LOXOSCELES</i>	20
2.2.1	Morfologia e etologia	20
2.2.2	Veneno e as toxinas dermonecroticas.....	21
2.2.3	Efeitos biológicos do veneno	24
2.3	ACIDENTES POR <i>LOXOSCELES</i>	25
2.3.1	Loxoscelismo	25
2.3.2	Quadro clínico	25
2.3.3	Diagnóstico.....	26
2.3.4	Tratamento	26
2.4	ANTICORPOS POLICLONAIS, MONOCLONAIS E RECOMBINANTES.....	27
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3.1	VENENOS E ANTICORPOS	31
3.2	CLONAGEM DO GENE CODIFICANTE PARA O FRAGMENTO VARIÁVEL DE CADEIA SIMPLES DE ANTICORPO (SCFV)	32
3.3	CONSTRUÇÃO DO GENE CODIFICANTE PARA O FRAGMENTO DE ANTICORPO NO FORMATO <i>DIABODY</i>	33
3.4	EXPRESSÃO E EXTRAÇÃO DO SCFV E <i>DIABODY</i>	34
3.4.1	Expressão dos fragmentos de anticorpos.....	34
3.4.2	Extração dos fragmentos de anticorpos	35
3.5	PURIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS RECOMBINANTES	35
3.6	CARACTERIZAÇÃO IMUNOQUÍMICA E FUNCIONAL DOS FRAGMENTOS	
	35	
3.6.1	Ensaio Imunoenzimático (ELISA)	35
3.6.2	Eletroforese SDS-PAGE para caracterização dos fragmentos.....	36
3.6.3	<i>Western blotting</i>	37

4	RESULTADOS	38
4.1	CLONAGEM DO GENE CODIFICANTE PARA O FRAGMENTO VARIÁVEL DE CADEIA SIMPLES DE ANTICORPO (SCFV)	38
4.2	CONSTRUÇÃO E AMPLIFICAÇÃO DO FRAGMENTO DE ANTICORPO NO FORMATO <i>DIABODY</i>	39
4.3	ESCOLHA DA CEPA DE EXPRESSÃO.....	42
4.4	CARACTERIZAÇÃO IMUNOQUÍMICA DOS FRAGMENTOS	45
4.5	CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DOS FRAGMENTOS	48
5	DISCUSSÃO	50
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	55
6.1	RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	55
	REFERÊNCIAS	57

1 INTRODUÇÃO

O Loxoscelismo, ou araquidismo necrótico ou gangrenocutâneo, é causado pela inoculação do veneno das aranhas do gênero *Loxosceles* (SILVA *et al*, 2004) e é considerada a principal forma de araneísmo no Brasil (BRASIL, 2001; WOLFART *et al*, 2009). A Região Sul do Brasil registrou mais de 80.000 casos de acidentes por *Loxosceles* no período de 2000 a 2017, e mais da metade dos casos foi reportada no Estado do Paraná (BRASIL, 2018).

A picada de aranhas deste gênero pode desencadear dois quadros clínicos característicos, sendo eles a forma cutânea, geralmente acompanhada de dor e eritema no local da picada, podendo evoluir para um quadro de dermonecrose; e também a forma sistêmica, tendo como sintomas característicos hemólise intravascular e falência renal (RIBEIRO *et al*, 2007; TAMBOURGI *et al*, 2010).

O tratamento atual para o loxoscelismo é feito a partir de diversas terapias, sendo as mais comuns e mais empregadas o uso de analgésicos, anti-histamínicos, corticosteroides e antivenenos (SILVA *et al.*, 2004; SWANSON e VETTER, 2006). O uso de antivenenos é considerado o tratamento específico, mas sua eficácia é observada desde que administrado até 72 horas após a picada (PAULI *et al*, 2009). Entretanto, por serem constituídos de anticorpos policlonais, apenas uma pequena fração reconhece e neutraliza de forma específica as toxinas presentes nos venenos (BRAZ *et al*, 1999).

Com o avanço da engenharia genética e molecular novas estratégias auxiliam no desenvolvimento de diferentes moléculas, como anticorpos monoclonais, seus fragmentos recombinantes e peptídeos sintéticos (ALVARENGA *et al*, 2003; DE MOURA *et al*, 2011; KARIM-SILVA *et al*, 2016), com o intuito de utilizá-los como ferramentas no tratamento do loxoscelismo. Além disso, dada a capacidade neutralizante dos anticorpos monoclonais e fragmentos recombinantes de anticorpo, estes apresentam-se como substitutos dos soros antivenenos policlonais utilizados atualmente como tratamento (LOVRECEK e TOMIC, 2011; CHOW e CASADEVALL, 2012).

A crescente produção de fragmentos recombinantes de anticorpos contra diversas toxinas, como as presentes em venenos de escorpião (DI TOMMASO *et al*, 2012), serpente (RONCOLATO *et al*, 2013; LEE *et al*, 2017) e da aranha *Loxosceles intermedia* (JIACOMINI *et al*, 2016; KARIM-SILVA *et al*, 2016), esses dois últimos

pelo nosso grupo, nos encorajam à produção e caracterização de tais moléculas recombinantes em novos formatos para aplicação na terapêutica.

1.1 JUSTIFICATIVA

O envenenamento por aracnídeos do gênero *Loxosceles* representa um grave problema de saúde pública no Brasil. Anualmente, 30% dos casos de envenenamento por picadas de aranha atribuem-se às espécies contidas nesse gênero. Um grande desafio para 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. O tratamento das vítimas de envenenamento tipicamente se faz com corticosteroides e pela administração do soro anti-veneno, que é o único tratamento específico, mas só é indicado com a confirmação do envenenamento, que geralmente não é possível pela falta de um teste diagnóstico. Quanto mais cedo for iniciado o tratamento, melhor será o prognóstico do paciente (PAULI *et al*, 2009).

Por mais que a biotecnologia esteja avançando cada vez mais nos últimos anos, a produção dos soros antivenenos ainda segue o mesmo modelo básico proposto há um século. Essa produção se baseia na imunização de animais de grande porte, utilizando grandes quantidades de veneno, com o objetivo de induzir a produção de anticorpos que sejam capazes de reconhecer e neutralizar as toxinas do veneno inoculado. Embora o tratamento por soroterapia possa ser eficaz, a administração de anticorpos heterólogos pode trazer sérios riscos aos seres humanos, devido à alta imunogenicidade, que pode resultar em reações anafiláticas provenientes da administração do soro equino hiperimmune, ou ainda reações tardias de hipersensibilidade tipo III, conhecidas como doença do soro. Tais características dos antivenenos também gera desconforto na comunidade médica na hora de prescrever o tratamento específico (LOVRECEK e TOMIC, 2011).

Sendo assim, é evidente que o desenvolvimento de moléculas anti-toxinas de baixa imunogenicidade, mas alta capacidade neutralizante e reduzido custo de produção, é de suma importância para melhorar a qualidade no tratamento de diversos tipos de envenenamento.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Produzir e caracterizar fragmentos de anticorpos recombinantes humanizados nos formatos scFv e *diabody* contra as toxinas dermonecróticas presentes no veneno de *Loxosceles intermedia*.

1.2.2 Objetivos específicos

- Obter o fragmento scFv a partir do gene recombinante humanizado sintetizado em plasmídeo de expressão.
- Construir o gene codificante para o fragmento recombinante *diabody*.
- Transformar bactérias com os vetores de expressão.
- Expressar os fragmentos de anticorpo scFv e *diabody* no sistema de expressão bacteriano e purifica-los.
- Caracterizar os fragmentos de anticorpos recombinantes imunoquimicamente.
- Avaliar a capacidade funcional dos fragmentos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 EPIDEMIOLOGIA

Existem mais de 47.000 espécies de aranhas descritas atualmente (WORLD SPIDER CATALOG, 2018) e 5 gêneros são considerados de importância médica ao redor do mundo por conterem as espécies mais venenosas. Esses gêneros são *Latrodectus spp.* (viúva-negra), *Loxosceles spp.* (aranha marrom), *Phoneutria spp.* (aranha armadeira), *Atrax* e *Hadronyche spp.* (aranha-teia-de-funil). No Brasil, as aranhas consideradas perigosas são as três primeiras, sendo que as duas últimas não apresentam casos registrados no Brasil (CHAGAS *et al*, 2010; LOVRECEK e TOMIC, 2011).

As aranhas do gênero *Loxosceles* são amplamente distribuídas pelo mundo, sendo encontradas na Europa, África, Oceania, Ásia e América (CHAGAS *et al*, 2010; ISBISTER e FAN, 2011), sendo descritas atualmente mais de 130 espécies. No Brasil são encontradas 14 espécies (WORLD SPIDER CATALOG, 2018), sendo duas delas descritas recentemente (FUKUSHIMA *et al*, 2017). Três espécies ocorrem com maior incidência nas regiões Sul e Sudeste e são responsáveis pelos casos de envenenamento humano: *Loxosceles gaucho*, *Loxosceles laeta* e *Loxosceles intermedia* (CHAGAS *et al*, 2010; RAMOS *et al*, 2015), sendo esta última a mais predominante no Estado do Paraná e, também, associada à maior parte dos acidentes (MARQUES-DA-SILVA e FISCHER, 2005; PINTO, 2009).

Segundo dados do Ministério da Saúde (BRASIL, 2018), foram registrados no Brasil, no período de 2007 a 2016, 260.600 casos de acidentes por aranhas, sendo que 31% (n=80.076) dos acidentes foram causados por aranhas do gênero *Loxosceles*. A região Sul registrou aproximadamente 90% (n=71.537) dos acidentes causados por *Loxosceles*, a maior incidência em todo o país. O Paraná registrou mais de 47.500 casos (66%), sendo o estado com maior número de notificações da região Sul. Dentre as ocorrências no Paraná, cerca de 40% (n=19.000) ocorreram na capital Curitiba (TABELA 1).

TABELA 1 - ACIDENTES POR ARANHAS NO PERÍODO DE 2007 A 2016 NO BRASIL

Gênero	Norte	Nordeste	Centro-Oeste	Sudeste	Sul	Total	Frequência
Ignorado/Branco	3.386	6.615	2.848	31.887	31.204	75.940	29%
<i>Phoneutria</i>	897	510	497	12.461	23.970	38.335	15%
<i>Loxosceles</i>	871	1.044	622	6.002	71.537	80.076	31%
<i>Latrodectus</i>	80	357	53	435	186	1.111	0%
Outras espécies	1.594	2.053	999	15.902	44.590	65.138	25%
Total	6.828	10.579	5.019	66.687	171.487	260.600	100%
Frequência	2%	4%	2%	26%	66%	100%	

FONTE: adaptado de Ministério da Saúde/SVS-SINAN (BRASIL, 2018)

LEGENDA: Número de notificações e frequência aproximada de acidentes por tipo de aranha e região do Brasil, no período de 2007 a 2016.

2.2 ARANHAS DO GÊNERO *LOXOSCELES*

2.2.1 Morfologia e etologia

As aranhas do gênero *Loxosceles* (Araneae, Sicariidae), mais conhecidas como aranhas-marrom, são caracterizadas pelo pequeno tamanho corporal, entre 1 e 5 centímetros, pernas finas e longas, cor amarronzada, como o próprio nome popular diz e apresentam uma marca escura no formato de violino disposta na região dorsal do cefalotórax (FIGURA 1-A) Além disso, possuem seis olhos dispostos em pares no formato de U, característicos desse gênero (FIGURA 1-B) (TAMBOURGI *et al*, 2010; GREMSKI *et al*, 2014). O nome *Loxosceles* significa pernas inclinadas, devido à posição das pernas que a aranha mantém quando está em repouso (FIGURA 1-C e 1-D) (VETTER, 2008).

Podem ser encontradas em cascas de árvores, entulhos de construção, como telhas e tijolos, móveis domésticos e quadros de parede, assim como em roupas e sapatos, sendo estas últimas situações em que ocorrem mais acidentes. Não são aracnídeos agressivos e a picada ocorre apenas quando pressionadas contra o corpo (BRASIL, 2001; SILVA *et al*, 2004; MARQUES-DA-SILVA e FISCHER, 2005; CHATZAKI *et al*, 2012).

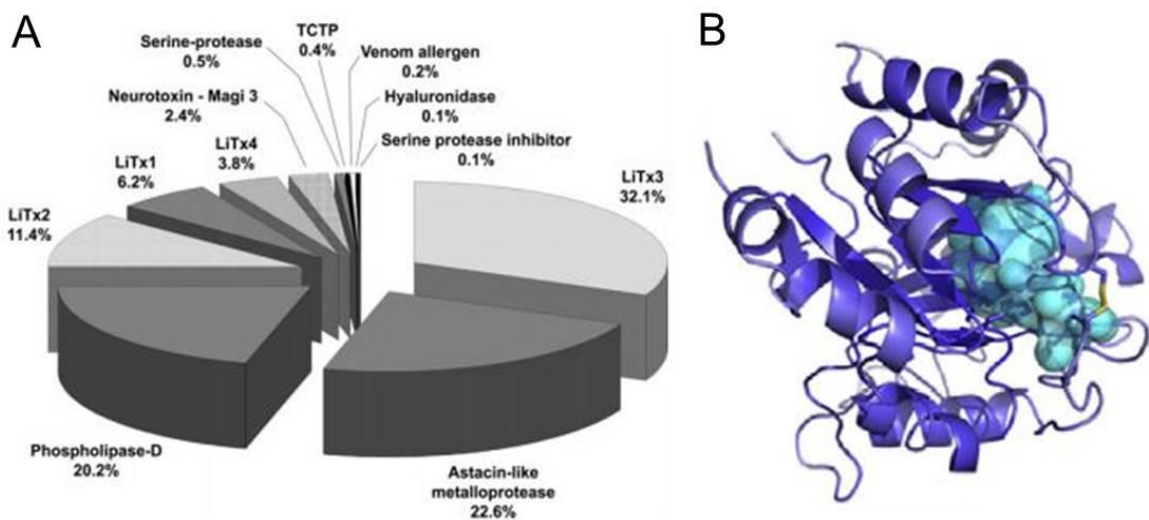
FIGURA 1 - MORFOLOGIA DE *LOXOSCELES* SPP.

FONTE: adaptado de Gremski *et al*, 2014 (A); adaptado de Vetter, 2008 (B), adaptado de Tambourgi *et al*, 2010 (C e D).

LEGENDA: marca em formato de violino na região dorsal do cefalotórax (A), disposição dos olhos em pares no formato de U (B), fêmea (C) e macho (D) de *Loxosceles intermedia*.

2.2.2 Veneno e as toxinas dermonecroticas

O veneno secretado pelas aranhas do gênero *Loxosceles* é composto de uma complexa mistura de proteínas, transcritas em diversas proporções (FIGURA 2-A), como as fosfolipases D (FIGURA 2-B), as astacinas (metaloproteases), hialuronidases, toxinas da família TCTP (proteína tumoral translacionalmente controlada), peptídeos da família ICK (nó de cistina inibidor; LiTx1-4), serino proteases, inibidores de serino protease e alérgenos (GREMSKI *et al*, 2010; 2014).

FIGURA 2 - COMPONENTES DO VENENO DE *LOXOSCELES*

FONTE: Gremski *et al*, 2010 (A); Gremski *et al*, 2014 (B).

LEGENDA: Proporção relativa de cada grupo de toxinas em relação ao total de transcritos codificados de toxinas do veneno (A); Estrutura tridimensional da fosfolipase D (B).

Essa complexa mistura de proteínas apresenta componentes que variam de 3 a 150 kDa de massa molecular (FIGURA 3) (FELICORI *et al*, 2009; CHAVES-

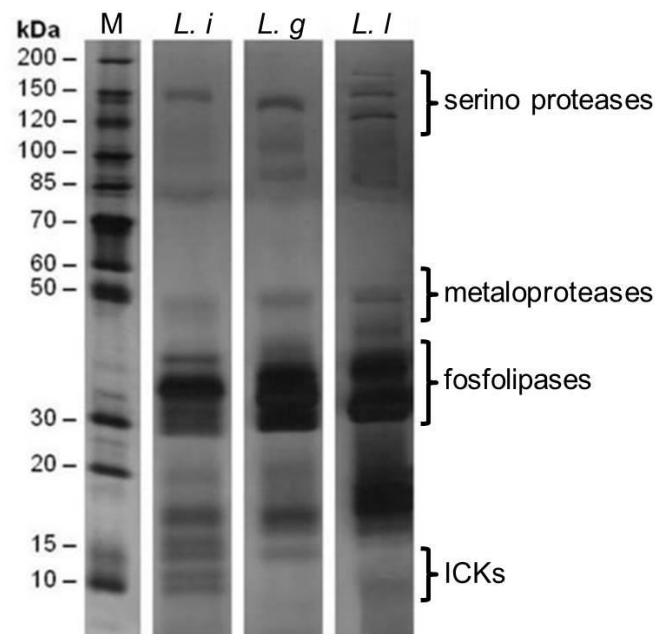
MOREIRA *et al*, 2017). As fosfolipases D (PLDs) encontradas no veneno apresentam massa molecular que varia entre 30 a 35 kDa e são consideradas os principais componentes do veneno de *Loxosceles* pois são responsáveis por causarem a maioria dos sinais observados no loxoscelismo. Elas são capazes de desencadear dermonecrose, catalisando a hidrólise de fosfolipídios, como as esfingomielinas presentes na membrana celular, causando a liberação de colina e ceramida 1-fosfato (C1P) (GREMSKI *et al*, 2014; CHAVES-MOREIRA *et al*, 2017). A C1P estimula a proliferação celular, impede a apoptose ao inibir as caspases 9 e 3, induz migração celular, promove inflamação e aumento da quantidade de espécies reativas de oxigênio (ROS). Rivera e colaboradores (2015) verificaram que, em altas concentrações, a C1P causa morte celular, sendo isso consistente com a ocorrência de lesões dermonecroticas causadas pela picada de aranhas marrom, local em que as concentrações de PLDs/C1P são altas.

Além disso, a catálise mediada pelas PLDs na presença de Mg^{+2} , o qual atua como co-fator, leva à hidrólise de lisofosfatidilcolina (LPC), além de liberar ácido lisofosfatídico (LPA). O LPA é um mediador lipídico do tipo fator de crescimento indutor de diversos efeitos patofisiológicos, como agregação plaquetária, secreção de citocinas e quimiocinas, aumento da permeabilidade endotelial, quimiotaxia, inflamação, angiogênese e progressão tumoral, além de aumentar a permeabilidade vascular, induzir intensa resposta inflamatória, agregação plaquetária, hemólise e toxicidade renal (GREMSKI *et al*, 2014; RIVERA *et al*, 2015; CHAVES-MOREIRA *et al*, 2017).

Com relação à ação dos demais componentes do veneno, sabe-se que as astacinas são proteases da família das metaloproteases e atuam degradando fibronectina e fibrinogênio. Os peptídeos da família ICK atuam como inseticidas, tendo afinidade por canais de sódio voltagem-dependente, porém não há evidência de que esses peptídeos estão envolvidos na patogênese no loxoscelismo. As proteínas TCTP são responsáveis por causarem edema e aumentar a permeabilidade vascular, pois são fatores de liberação de histamina. As enzimas hialuronidases degradam o ácido hialurônico, sendo este um importante componente da matriz extracelular de vertebrados, atuando como lubrificante, além de ser uma barreira que impede a entrada de partículas exógenas. Acredita-se que as hialuronidases são fatores de propagação, pois aumentam a difusão de outras toxinas provenientes do veneno por causarem a degradação da matriz extracelular,

além de estarem relacionadas com a necrose, edema e eritema característicos do envenenamento por *Loxosceles*. As serino proteases são zimogênios ativados por tripsina e estão relacionadas com a ativação do complemento, além de ter importante papel na degradação tecidual local e de interferirem na coagulação sanguínea e fibrinólise. Os inibidores de serino proteases possuem diferentes funções e atividades, sendo uma delas a atividade antitrombótica e anticoagulante relacionadas à inibição do Fator-Xa. Com relação aos alérgenos, apesar de estarem presentes no veneno, existem poucos relatos de caso em que a inoculação do veneno resultou em reações alérgicas (GREMSKI *et al*, 2014).

FIGURA 3 - PERFIL ELETROFORÉTICO DAS PROTEÍNAS DO VENENO DE *LOXOSCELES*



FONTE: adaptado de Ramada (2012).

LEGENDA: Gel de poliacrilamida 12,5% corado por prata, contendo 2 µg de proteínas provenientes do veneno de *Loxosceles intermedia*, *L. gaucha* e *L. laeta*. M: marcador molecular.

Com o advento da biologia molecular e do desenvolvimento de tecnologias que utilizam DNA recombinante, diversos estudos dos componentes do veneno de aranhas do gênero *Loxosceles* vêm elucidando diferentes funções e mecanismos de atuação das toxinas presentes no veneno (KALAPOTHAKIS *et al*, 2007; GREMSKI *et al*, 2014). A identificação de proteínas com atividade dermonecrótica, como a LiD1 (proteína dermonecrótica 1 de *Loxosceles intermedia*) (KALAPOTHAKIS *et al*, 2002) e a produção de proteínas recombinantes, como a recLiD1 (proteína dermonecrótica 1 recombinante de *Loxosceles intermedia*) (FELICORI *et al*, 2006) contribuíram para

a identificação de possíveis regiões que podem atuar como epítomos, com o intuito de produzir soros antivenenos com maior capacidade de neutralização *in vivo* do que soros produzidos contra o veneno como um todo (FELICORI *et al*, 2009; TAMBOURGI *et al*, 2010; GREMSKI *et al*, 2014).

2.2.3 Efeitos biológicos do veneno

Os efeitos biológicos do veneno de *Loxosceles* são avaliados através de ensaios *in vivo*, utilizando coelhos, ratos e camundongos, e *in vitro*, com o emprego de eritrócitos e plasma humanos. Chaves-Moreira e colaboradores (2017) relatam que, nos estudos de Babcock *et al* (1981) e Bascur *et al* (1982), foi observado que o veneno causa necrose, hemólise em eritrócitos humanos, diminuição do tempo de coagulação em plasma humano, alterações no tempo de tromboplastina e protrombina, além de alterações na contagem de plaquetas e degradação de fibrinogênio-fibrina. Também foi relatado por Dias-Lopes *et al* (2010) e Lucato *et al* (2011) que as toxinas do veneno podem levar a lesão renal aguda em ratos e que esta lesão é independente das lesões dermonecróticas. Além disso, análises de células endoteliais em cultura expostas ao veneno evidenciaram alteração na adesão celular, seguida da retração e descolamento dessas células, resultando em apoptose. Tais efeitos nas células endoteliais podem estar relacionados à hemorragia observada no loxoscelismo sistêmico, devido à resultante fragilidade dos vasos sanguíneos.

Com relação ao loxoscelismo cutâneo, foi observado que o veneno induz o aumento na expressão e secreção de metaloproteínases de matriz por queratinócitos humanos, as quais estão relacionadas à morte celular e, presumidamente, à dermonecrose (CORRÊA *et al*, 2016). Já a inoculação de veneno em camundongos levou a liberação de mediadores inflamatórios, como prostaglandinas, interleucinas, proteína atraente de monócito e de queratinócito, além de migração leucocitária e edema no local de inoculação do veneno. (BARBARO *et al*, 2010).

A ação hemolítica do veneno foi elucidada por Tambourgi e colaboradores em 2000, quando foi identificado o mecanismo de indução de hemólise dependente de complemento pelo veneno. Os autores descrevem que a incubação de eritrócitos humanos com veneno de *Loxosceles intermedia* resulta na clivagem de glicoforinas

presentes na superfície dos eritrócitos, facilitando a ativação do complemento e a ocorrência de hemólise. Foi observado que a atividade das fosfolipases induziu a ativação de metaloproteases endógenas, as quais clivam glicoforinas. Também foi verificado que a hemólise dependente do complemento é transferida de célula a célula, justificando extensa hemólise causada pelo envenenamento por *Loxosceles*.

2.3 ACIDENTES POR *LOXOSCELES*

2.3.1 Loxoscelismo

Loxoscelismo, também chamado de araquidismo necrótico ou gangrenocutâneo, é a forma mais importante de araneísmo na América do Sul (WASSERMAN e ANDERSON, 1984; ISBISTER e FAN, 2011; LIMA *et al.*, 2018) e mais grave no Brasil (BRASIL, 2001), sendo causada por aranhas do gênero *Loxosceles*. Pode apresentar-se na forma cutânea e, também, na forma sistêmica (ISBISTER e FAN, 2011). De acordo com o Ministério da Saúde (BRASIL, 2018), a Região Sul do Brasil registrou mais de 260.000 casos de araneísmo no período de 2000 a 2017, sendo que mais da metade destes ocorreram apenas no Estado do Paraná.

2.3.2 Quadro clínico

O quadro clínico após a picada caracteriza-se, na maioria dos casos, por ausência de dor no local em que o veneno foi inoculado e o desenvolvimento de edema e eritema suave. Entre as primeiras 24 horas, passa a ser visível equimose e palidez no local, além do surgimento de dor acompanhado do eritema. Essa lesão cutânea (FIGURA 4) decorrente da picada pode evoluir para um quadro de necrose, podendo deixar uma úlcera de difícil cicatrização (BRASIL, 2014).

FIGURA 4 - LOXOSCELISMO CUTÂNEO



FONTE: Ocañas e Mifuji (2013).

LEGENDA: Evolução da lesão cutânea resultante da inoculação do veneno de *Loxosceles* na coxa direita de uma garota de 10 anos de idade no México.

Além do loxoscelismo cutâneo, existe a forma mais grave, denominada loxoscelismo cutâneo-hemolítico, em que os sintomas são hemólise intravascular nem sempre associada à lesão cutânea, podendo levar a insuficiência e falência renal devido à necrose tubular, em alguns casos (BRASIL, 2014).

2.3.3 Diagnóstico

Apesar de alguns resultados laboratoriais sugerirem os efeitos sistêmicos do loxoscelismo, ainda não existe nenhum diagnóstico específico indicado pelo Ministério da Saúde, portanto este se baseia em três aspectos: lesão compatível, epidemiologia e identificação do aracnídeo (CABRERIZO *et al*, 2009; GREMSKI *et al*, 2014). Alguns autores têm trabalhado com intuito de desenvolver testes capazes de detectar veneno no local da picada (KRYWKO e GOMEZ, 2002; McGLASSON *et al*, 2009) e em amostras de sangue humano contendo venenos loxoscélicos (GOMEZ *et al*, 2002; JIACOMINI *et al*, 2016), mas nenhum deles encontra-se em uso, pois precisam ser aprimorados no que diz respeito à sensibilidade e detecção de venenos de demais espécies.

2.3.4 Tratamento

Até o momento, o tratamento para o loxoscelismo é controverso, pois não há um consenso e diversas terapias são empregadas. A administração de analgésicos, vasodilatadores, anti-histamínicos, antibióticos, corticosteroides e antivenenos,

diálise, transfusões de sangue, como também a elevação do local da picada e aplicação de compressa fria são alguns dos tratamentos mais utilizados (SILVA *et al*, 2004; PAULI *et al*, 2006; SWANSON e VETTER, 2006).

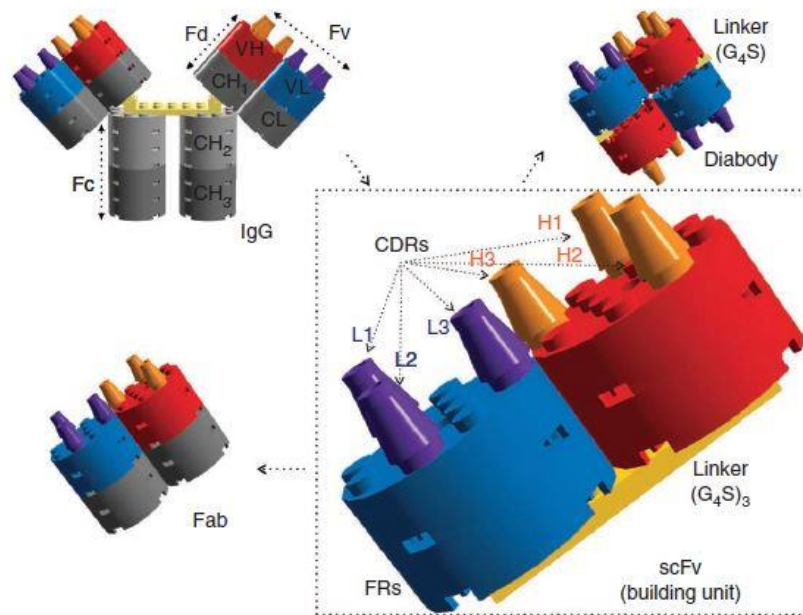
No Brasil, são utilizados antivenenos loxoscélicos, os quais estão disponíveis em dois tipos: soro antiloxoscélico e soro antiaracnídico. O soro antiloxoscélico é poliespecífico para os venenos de *L. laeta*, *L. gaucho* e *L. intermedia*, sendo produzido pelo Centro de Produção de Pesquisa de Imunobiológicos, Paraná, Brasil, obtido através do plasma de cavalos imunizados com os venenos das três espécies de *Loxosceles* (SORO ANTILOXOSCÉLICO, 2008). O soro antiaracnídico, e também antiescorpiônico, é proveniente do plasma de cavalos imunizados com os venenos de aranhas dos gêneros *Loxosceles* e *Phoneutria* (“aranha-armadeira”) e de escorpiões do gênero *Tityus* (SORO ANTIARACNÍDICO E ESCORPIÔNICO, 2012).

Apesar de o uso de antivenenos ser o tratamento específico no Brasil (PAULI *et al*, 2006) e de ser possível o seu direcionamento para espécies específicas (BRAZ *et al*, 1999), eles são compostos de anticorpos policlonais, e apenas uma pequena parcela desses anticorpos reconhece toxinas dos venenos. Além disso, este não é um tratamento sem riscos. A administração de anticorpos heterólogos em seres humanos pode levar a reações de hipersensibilidade devido ao reconhecimento de moléculas de composição estranha pelo sistema imune (BRASIL, 2014).

2.4 ANTICORPOS POLICLONAIS, MONOCLONAIS E RECOMBINANTES

Anticorpos, ou imunoglobulinas, são proteínas que possuem a capacidade de se ligar a diferentes classes de antígenos, através de regiões denominadas epítopos. Essas moléculas se mostram ideais para tratamento, devido à especificidade de se ligar a um antígeno (QIU *et al*, 2017). As imunoglobulinas G (IgGs), uma classe de anticorpos, são proteínas que se apresentam em formato de Y, sendo constituídas de duas cadeias leves (L) idênticas, cada uma com um domínio constante e um variável, e duas cadeias pesadas (H), constituídas três domínios constantes e um domínio variável. Os domínios variáveis são os que interagem diretamente com o antígeno e os domínios constantes são responsáveis pela função efetora (FIGURA 5) (FIELDS *et al*, 2013).

FIGURA 5 - IMUNOGLOBULINA G E FRAGMENTOS RECOMBINANTES



FONTE: adaptado de Fields *et al* (2013).

LEGENDA: Representação estrutural da imunoglobulina G e dos diversos formatos de fragmentos de anticorpo recombinantes. Fc=fragmento cristalizável. Fab=fragmento de ligação do antígeno. FRs= região de framework. CDRs=regiões determinantes de complementariedade.

Apesar dos avanços decorridos ao longo de um século de soroterapia, o emprego de anticorpos heterólogos produzidos a partir da imunização de equinos ainda tem suas restrições, devido ao receio de desencadear reações adversas (LOVRECEK e TOMIC, 2011; CHOW e CASADEVALL, 2012). Em adição, a produção dos soros demanda uma grande quantidade de veneno para a imunização e para os testes de potência pré-clínicos, além de que apenas uma parcela dos anticorpos produzidos, cerca de 20%, é direcionada para as proteínas do veneno, e menos de 5% apresenta ação de neutralização dessas toxinas (ALVARENGA *et al*, 2014; FIGUEIREDO *et al*, 2014).

Nos últimos anos, diversos grupos vêm buscando formas de melhorias para a produção de anticorpos policlonais antiloxoscélicos. Uma variedade de moléculas, como proteínas recombinantes (FELICORI *et al*, 2006), quimera (FIGUEIREDO *et al*, 2014), peptídeos sintéticos (FELICORI *et al*, 2009; DIAS-LOPES *et al*, 2010; RAMADA *et al*, 2013) e mimotopos (DE MOURA *et al*, 2011) foram empregados na validação de anticorpos neutralizantes ou como imunógenos alternativos. Outro viés é o uso de anticorpos monoclonais, que podem apresentar algumas vantagens em relação aos policlonais, como reprodutibilidade e especificidade, e desse modo mostram-se uma alternativa eficaz na terapêutica de algumas doenças (AHMAD *et*

al, 2012; CHOW e CASADEVALL, 2012; ALVARENGA *et al*, 2014) e têm potencial de substituição dos soros heterólogos (LOVRECEK e TOMIC, 2011; CHOW e CASADEVALL, 2012). Guilherme *et al* (2001) produziram anticorpos monoclonais contra venenos de *L. gaucho*, porém os mesmos não foram capazes de neutralizar a atividade tóxica dos venenos de *L. intermedia*, *L. gaucho* ou *L. laeta*. Já Dias Lopes *et al* (2014) obtiveram o anticorpo monoclonal murino mAb16, que reconhece os venenos de *L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta*, mas apresenta inibição parcial dos efeitos tóxicos.

O anticorpo monoclonal LimAb7 produzido por Alvarenga *et al* (2003) reconhece a fração proteica de 32 a 35 kDa, correspondendo ao grupo de proteínas do veneno com atividade dermonecrótica, as fosfolipases D, as quais são consideradas as principais indutoras da ação necrótica e hemolítica. Dias-Lopes *et al* (2010) utilizaram o LimAb7 para evidenciar a interação do veneno de *L. intermedia* com cardiomiócitos. De Moura e colaboradores (2011) utilizaram a técnica de *Phage display* para mapear os epítomos reconhecidos pelo LimAb7. Além disso, o LimAb7 foi testado, no formato recombinante para detecção e também neutralização do veneno de *L. intermedia* (JIACOMINI *et al*, 2016; KARIM-SILVA *et al*, 2016). Nessa perspectiva, novas tecnologias utilizando fragmentos de anticorpos podem ser consideradas alternativas no tratamento de acidentes por aranhas e outros animais peçonhentos.

Os anticorpos recombinantes estão emergindo como uma ferramenta de alto potencial para aplicações terapêuticas em oncologia, processos inflamatórios, doenças autoimunes, rejeição de transplantes, entre outros (ALVARENGA *et al*, 2014). Uma forma utilizada para a obtenção de anticorpos recombinantes baseia-se no uso de hibridomas secretores de anticorpos monoclonais para a obtenção das sequências de imunoglobulinas. O benefício do uso de anticorpos monoclonais consiste na manutenção da região de reconhecimento do antígeno (parátipo) da imunoglobulina original e, assim, da sua especificidade. Ainda, como demonstrado por alguns grupos, esses fragmentos tendem a conservar a mesma capacidade de funcional, sendo isso imprescindível para aplicação terapêutica (MOUSLI *et al*, 1999).

Dentre os diversos formatos de anticorpos recombinantes, o menor fragmento funcional de anticorpo é o scFv (fragmento de anticorpo de cadeia única), o qual possui as cadeias leve (VL) e pesada (VH) da porção variável, unidas por um ligante

peptídico (*linker*) de, aproximadamente, 15 resíduos de aminoácido. O *linker* deve ligar a região carboxiterminal de um domínio variável com o aminoterminal do outro, permitindo estabilidade estérica das duas cadeias variáveis, sem acometer a capacidade de ligação com o antígeno (AUBREY *et al*, 2003). Os resíduos de aminoácidos mais empregados são Gly (glicina) e Ser (serina), que contribuem para a flexibilidade da molécula, mas também podem ser intercalados com Glu (ácido glutâmico) e Lys (lisina) para melhorar a solubilidade. Quando o *linker* utilizado é menor - 5 resíduos – ocorre a formação de dímeros, denominados *diabody* (AHMAD *et al*, 2012; ALVARENGA *et al*, 2014).

Outros formatos de construção dos fragmentos de anticorpos recombinantes podem ser constituídos de duas cadeias variáveis idênticas unidas (*nanobodies* bivalentes ou *diabody*), scFvs bi-específicos unidos enfileirados (tandem). Além disso, podem ser formadas moléculas quiméricas, como a construção *nanobody-human Fc*, na qual a adição de uma região Fc humana a um scFv ou *nanobody* heterólogo reduz significativamente a chance de reconhecimento pelo sistema imune humano (ESPINO-SOLIS *et al*, 2009).

Recentemente, as sequências das regiões variáveis de cadeias leve e pesada do anticorpo monoclonal mAb7 já bem caracterizado (Alvarenga *et al*, 2003) serviram como protótipo para produção de um biosensor ligado à fosfatase alcalina (JIACOMINI *et al*, 2016) com capacidade de quantificar veneno de *L. intermedia*; e também de um *diabody*, que apresenta potencial protetor dos efeitos tóxicos do mesmo veneno (KARIM-SILVA *et al*, 2016). No entanto, este último permanece de inteira composição murina e seu emprego para tratamento humano ainda pode apresentar riscos.

Surgiu então a proposta do presente projeto de obter uma molécula num formato humanizado, a partir do fragmento de cadeia única murino scFvLimAb7, construído previamente pelo grupo (KARIM-SILVA *et al*, 2016), com substituição de algumas sequências murinas por sequências humanas, respeitando homologias estruturais e características intrínsecas ao sítio de interação com o antígeno. Deste modo, visamos a produção e caracterização de diferentes fragmentos de anticorpos humanizados, com intuito de empregá-los na neutralização das toxinas loxoscélicas em modelos *in vitro*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 VENENOS E ANTICORPOS

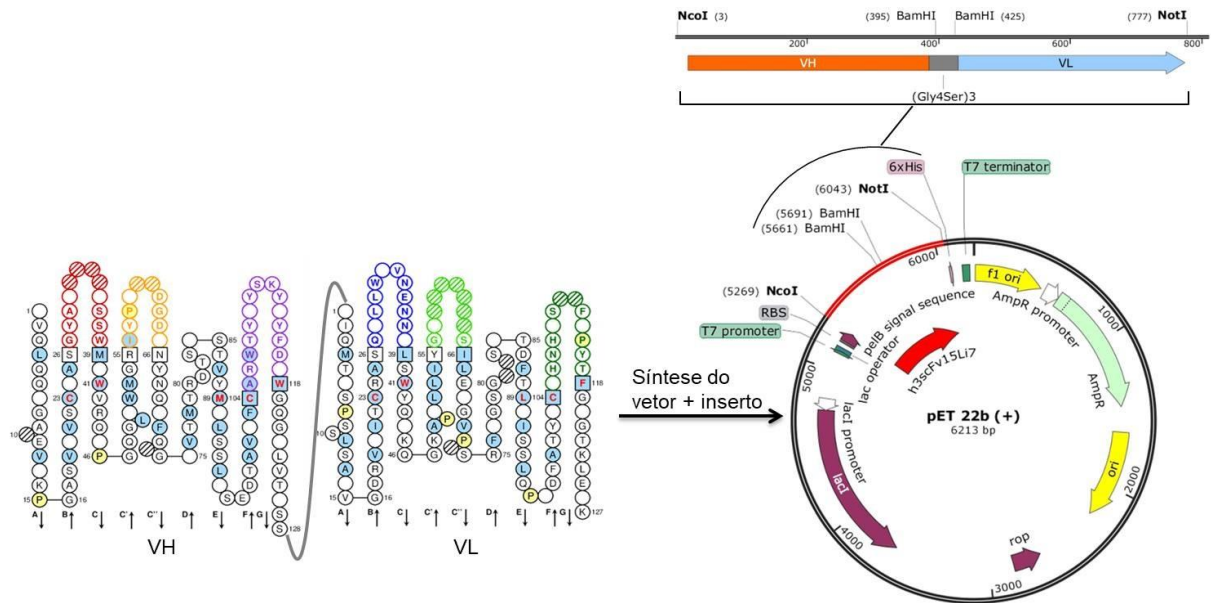
O veneno de *Loxosceles intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta* foi gentilmente cedido pelo Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos (CPPI – Piraquara, PR, Brasil).

O anticorpo monoclonal murino LimAb7 foi purificado a partir de sobrenadante do hibridoma secretor (produzido pelo grupo) por cromatografia de afinidade usando proteína A imobilizada em Sepharose CNBr- (Sigma®) nas condições descritas pelo fabricante.

Fragmento variável de cadeia única humanizado (scFv) (previamente produzido pelo grupo) - O LimAb7 foi empregado como molécula alvo para o desenho do fragmento de anticorpo recombinante, com base no sequenciamento das cadeias variáveis leve (VL) e pesada (VH) do hibridoma (número do acesso do GenBank KT381972) (JIACOMINI *et al*, 2016). O desenho do fragmento humanizado deu-se a partir da modificação sítio específica das cadeias variáveis pesada e leve do anticorpo LimAb7. Para tanto, foi necessário um estudo da homologia e conservação de resíduos de cadeias variáveis de anticorpos humanos (OLAFSEN *et al*, 2004; LIU e MAY, 2012; KIM *et al*, 2014). O gene codificante para o fragmento humanizado (scFv) foi sintetizado de maneira a conter o DNA que codifica a sequência de VH e VL unidas por uma região codificante para um ligante peptídico (*linker*) de 15 aminoácidos (Gly₄Ser)₃ que contém dois sítios de restrição para a enzima *BamHI*. O gene para o scFv foi sintetizado em vetor de expressão pET-22b (+) (6213 pares de base), entre os sítios para as enzimas de restrição *NcoI* e *NotI*, produzido pela Genscript® (FIGURA 6) para se dar início à produção, purificação e, posteriormente, aos ensaios de caracterização imunoquímica e funcional dos fragmentos.

Todas as amostras foram dosadas pelo método de Bradford (1976), aliquotadas e armazenadas a -20°C.

FIGURA 6 - REDESIGN DO GENE SINTÉTICO DO ANTICORPO RECOMBINANTE



FONTE: a autora (2018).

LEGENDA: clonagem do gene sintético, após a realização de mutações pontuais previamente pelo grupo, no plasmídeo de expressão pET-22b (+). Nota: alguns aminoácidos foram omitidos por se tratar de sequência passível de patente.

3.2 CLONAGEM DO GENE CODIFICANTE PARA O FRAGMENTO VARIÁVEL DE CADEIA SIMPLES DE ANTICORPO (scFv)

Para a clonagem do vetor pET-22b (+) contendo o inserto de scFv, células bacterianas cepa *Escherichia coli* TOP10 (genótipo F-*mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *recA1* *araD139* Δ (*araleu*) 7697 *galU* *galK* *rpsL* (StrR) *endA1* *nupG*) foram utilizadas para transformação. A transformação foi obtida através de processo químico. Para a obtenção das células bacterianas quimiocompetentes, 50 mL de cultura (meio Luria-Bertani (LB) (pH 7,0 (1% (w/v) peptona, 0,5% (w/v) extrato de levedura e 0,170 M de Cloreto de Sódio)) em fase exponencial de crescimento (densidade óptica (OD) A_{600nm} 0,4-0,7) foram centrifugados (5.000xg, 4°C, 10 minutos) e, ao pellet, foi adicionado 25 mL de cloreto de cálcio (CaCl₂ 0,1M). As bactérias foram mantidas a temperatura de 4°C por 1 hora e, após nova centrifugação (5.000xg, 4°C, 10 minutos), ressuspensas novamente em 2 mL de CaCl₂. Para a transformação, um volume de 100 μ L de bactérias competentes adicionado de 150ng do vetor de expressão pET-22b (+) contendo o inserto de interesse foi mantido a 4°C durante 30 minutos. Passado esse tempo, as bactérias foram submetidas a um choque térmico, 42°C por 1 minuto, e 5

minutos a 4°C. Posteriormente, foi adicionado 400µL de meio S.O.C. (2% triptona, 0.5% extrato de levedura, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄ e 20 mM de glucose) . As bactérias foram mantidas a 37°C por 45 minutos sob agitação de 150 rpm antes da semeadura em meio LB ágar, acrescido de ampicilina, e incubadas a 37°C por 16 horas. As colônias transformadas, sendo estas as que cresceram no meio LB ágar + ampicilina, foram selecionadas e colocadas em meio para o crescimento da cultura e posterior extração de DNA plasmidial (*miniprep*), que foi purificado utilizando-se o kit MSB[®] Spin PCRapace (Strattec, Berlin, Germany) nas condições descritas pelo fabricante e dosados em espectrofotômetro (*Thermo Scientific NanoDrop 2000*). Para confirmar a presença do inserto, o vetor purificado foi submetido a digestão enzimática com as enzimas de restrição *NotI* e *NcoI*, e o produto dessa digestão foi visualizado por eletroforese em gel de agarose 1%, corado com corante *Safer* (K9-16C, Kasvi) e sequenciado em sequenciador 3500XL (Applied Biosystems, Genetic Analyzer), seguindo o modelo de sequenciamento de DNA por SANGER.

3.3 CONSTRUÇÃO DO GENE CODIFICANTE PARA O FRAGMENTO DE ANTICORPO NO FORMATO *DIABODY*

Para a construção do inserto do dímero de scFv (*diabody*), o vetor pET-22b (+) contendo o inserto de interesse (scFv) foi submetido a uma digestão enzimática com *BamHI* afim de diminuir o ligante peptídico para cinco resíduos de aminoácido (Gly4Ser).

Após a digestão enzimática, uma eletroforese em gel de agarose 2% foi empregada para certificação do corte realizado com *BamHI*. Após a confirmação, o vetor digerido foi purificado a partir do gel de agarose 1% utilizando o protocolo Quick Gel Extration Kit Protocols (Qiagen). A enzima T4 ligase (Promega) foi utilizada para união das extremidades coesas do vetor digerido. A clonagem e purificação do vetor pET-22b (+) contendo a construção do fragmento para *diabody* segue o mesmo protocolo descrito no item 3.2.

Posteriormente, foi realizado o sequenciamento das amostras para confirmação da presença do inserto. As sequências foram alinhadas no *software MultAlin*.

3.4 EXPRESSÃO E EXTRAÇÃO DO SCFV E *DIABODY*

3.4.1 Expressão dos fragmentos de anticorpos

O vetor recombinante pET-22b (+) foi inserido em bactérias cepas *E. coli* AD494 pLysS (genótipo $\Delta(\text{araABC-leu})7697 \Delta\text{lacX74} \Delta\text{malF3} \Delta\text{phoAPvull} \text{phoR} \text{trxB}::\text{Kanr} \lambda(\text{DE3}) \text{F}'[\text{lacIq} \text{lacZ}\Delta\text{M15} \text{proAB+}] \text{pLysS}$), Rosetta (genótipo F-, *ompT hsdSB(rB- mB-) gal dcm* $\lambda(\text{DE3}) \text{pRARE}^6$ (Cam^R)), HB2151 (genótipo K12, *ara, (lac-pro), thiF'* proA^+B^+ , lac^{Iq} *lacZM15*) e BL21 star (genótipo F-, *ompT lon hsdS_B* (rB-mB-) *gal dcm rne131* $\lambda(\text{DE3})$), e, após a transformação das bactérias quimiocompetentes, de acordo com o protocolo descrito no item 3.2, foi realizada uma PCR de colônia (TABELA 2) a fim de verificar a presença do inserto nas cepas escolhidas para expressão.

TABELA 2 - REAÇÃO DE PCR DE COLÔNIA

Reagente	Tubo de reação (μL)	Controle negativo (μL)
H ₂ O DEPC	23,35	23,35
MgCl ₂ buffer [10x]	3	3
MgCl ₂ 50mM	0,9	0,9
DNTp 20mM	0,5	0,5
primer T7 universal	1	1
primer T7 terminator	1	1
GoTaq polimerase	0,25	0,25
Colônia	1	-

FONTE: Adaptado de Fields et al. (2013).

LEGENDA: Descrição dos reagentes e respectivas concentrações utilizadas na reação de PCR de colônia para verificar a presença do inserto nas cepas de expressão.

Realizada a verificação, foi feito o pré-inóculo, no qual foram incubadas, separadamente, as quatro cepas de *E. coli* individualmente em 10 mL de meio 2xTY (Extrato de Levedura Triptona) pH 7,4 (1,6% (w/v) peptona, 1% (w/v) extrato de levedura e 0,085 M de Cloreto de Sódio) acrescido de ampicilina (50 μg/mL), sob agitação de 250 rpm a 37°C, por 16 horas. No dia seguinte, foi realizada a amplificação da cultura bacteriana a partir de 0,5 mL do pré-inóculo para cada 100 mL de meio 2xTY contendo ampicilina (50 μg/mL), sob agitação de 250 rpm, até atingir a fase exponencial ($A_{600\text{nm}}$ 0,6 - 0,8). Posteriormente, foi feita a indução da expressão proteica nestas células através da adição de 0,8 mM isopropyl thiogalactoside (IPTG), incubadas por mais 16 horas a 16°C (100 rpm).

3.4.2 Extração dos fragmentos de anticorpos

As bactérias foram coletadas após centrifugação (5000 xg, 20 min, 4°C), ressuspensas em tampão TES (0,2 M tris-HCl, pH 8,0; 0,5 mM EDTA; 0,5 M sucrose) (20 mL por litro de cultura original) e mantidas em gelo por 15 minutos. Logo após, foram submetidas a um choque osmótico pela adição de TES diluído 1:4 em H₂O (30 ml por litro de cultura original). Após incubação em gelo durante 30 minutos, a suspensão foi centrifugada (10.000 xg, 4°C, 15 min). Os sobrenadantes obtidos contendo as proteínas foram extensivamente dialisados contra PBS (solução salina tamponada com fosfato) pH 7,4 (0,137 M NaCl; 0,0027 M KCl; 0,01 M Na₂HPO₄; 0,0018 M KH₂PO₄) (MUZARD et al., 2009; ZAHID et al., 2011).

3.5 PURIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS RECOMBINANTES

O scFv e o *diabody* foram purificados por cromatografia de afinidade a partir do extrato periplasmático centrifugado a 10.000 xg por 30 minutos a 4°C (100 mL obtidos a partir de 1600 mL de cultura bacteriana) em coluna preparada com 1 mL de proteína L agarose (Pierce Biotechnology, Thermo Scientific). A coluna foi submetida a suave agitação por 16 horas a 4°C e, após lavagem com 50 mL de PBS (pH 7,4), as proteínas recombinantes foram eluídas em frações de 0,3 mL com glicina (0,1 M, pH 2,2). As frações foram testadas pelo método de Bradford (1976) e as que continham as proteínas recombinantes foram, então, unidas e extensivamente dialisadas em solução PBS, que permaneceu a 4°C *overnight*. As amostras purificadas foram armazenadas a -20°C até sua utilização.

3.6 CARACTERIZAÇÃO IMUNOQUÍMICA E FUNCIONAL DOS FRAGMENTOS

3.6.1 Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

Placas de micropoços (Corning Costar®) foram revestidas com 5 µg/mL de veneno de *L. intermedia* diluído em 0,02 M de tampão de bicarbonato de sódio (pH 9,6), 100 µL/poço, durante 16 horas a 4°C e depois saturadas com caseína 2% (180 µL/poço) durante 1 hora a 37°C para evitar ligação não específica.

As placas foram, então, incubadas com as preparações dos extratos não dialisados ou dialisados das quatro cepas de expressão do scFv e *diabody*, os purificados do scFv e *diabody*, o flow through da coluna de purificação do scFv e *diabody* (extrato periplasmático passado pela coluna de purificação que contém as proteínas que não se ligaram à proteína L) e, como controles negativos, os extratos não dialisados das quatro cepas sem vetor. Foi feita uma diluição seriada (puro, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16) de cada extrato com tampão de incubação (caseína 2%, 0,05% Tween 20 e PBS), sendo aplicados 100 µL/poço. Em seguida, as placas foram incubadas com anti-histidina (1:1000) (Invitrogen) e anti-mouse-HRP (1:4000) (Sigma-Aldrich) ou proteína L-HRP (1:2000) (Pierce Biotechnology), 100 µL/poço. A reação foi evidenciada pela adição de solução de substrato TMB (100 µL/poço) durante 15 minutos ao abrigo da luz. A reação foi parada com 50 µL/poço de ácido sulfúrico H₂SO₄ 1:20 (v/v). A absorbância foi avaliada em comprimento de onda 450 nm, num leitor de placas de ELISA (leitora de microplacas Polaris, MARCONI). Entre cada etapa, os poços foram lavados cinco vezes com solução de lavagem (0,15 M NaCl, 0,05% Tween 20).

3.6.2 Eletroforese SDS-PAGE para caracterização dos fragmentos

Dois géis em concentração de 12,5% de acrilamida (LAEMMLI, 1970) foram preparados para a migração os extratos periplasmáticos dialisados centrifugados, flow through da coluna de purificação, extrato periplasmático não solúvel, purificado em tampão glicina pH 2,2, fragmento purificado após a diálise em tampão PBS, ou os venenos de *Loxosceles intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta*, a 5µg/mL por canaleta, em presença de 10% dodecil sulfato de sódio (SDS) em sistema BioRad. Utilizou-se 35 µL por canaleta de cada amostra. Estas amostras foram adicionadas ao tampão de amostra em condições não redutoras (tris-HCl 0,5 mol/L, pH 6.8, glicerol 10%, SDS 10% (p/v) e azul de bromofenol 0,1% (p/v)) e fervidas por 3 minutos. A migração aconteceu utilizando-se tampão de migração (Tris 0,025 mol/l, glicina 0,2 mol/L e SDS 0,5%, pH 8.3) sob voltagem de 150 V.

Um dos géis foi colocado em solução Coomassie Blue (125 g Coomassie Brilliant Blue R-250, 225 mL metanol, 45 mL ácido acético glacial CH₃COOH, 225 mL H₂O destilada) por 40 minutos. Então, o gel foi lavado com solução descorante (45

mL etanol, 90 mL ácido acético glacial e 850 mL H₂O destilada) consecutivas vezes até a visualização das bandas proteicas.

O outro gel foi utilizado na eletrotransferência das proteínas para membrana de nitrocelulose.

3.6.3 *Western blotting*

Caracterização imunoquímica do fragmento: O outro gel descrito acima foi utilizado na eletrotransferência das proteínas para membrana de nitrocelulose 0,45 µm. A transferência ocorre devido ao contato do gel com a membrana, dentro de uma cuba de eletroforese preenchida com tampão de transferência pH 8,3 (0,192 M glicina, 0,025 M Tris, 20% de metanol absoluto (v/v) PM 32,04), sob corrente de 24 V durante 16 horas e, posteriormente, por mais uma hora a 48 V. Após a eletrotransferência, a presença das proteínas foi certificada mergulhando-se a membrana de nitrocelulose em solução de Ponceau 0,2% e 10% de ácido acético.

Após a visualização, a membrana foi lavada com H₂O destilada e PBS a fim de remover o Ponceau. A membrana foi incubada com uma solução de bloqueio (PBS contendo 5% (w/v) de leite seco sem gordura e 0,3% (v/v) de Tween 20) (LAEMMLI, 1970; ALVARENGA et al., 2003) a fim de bloquear locais de ligação não específicos na membrana. Em seguida, foi adicionado anti-histidina (1:1000) e anti-mouse-HRP (1:4000) diluídos em PBS – 0,05% Tween 20, a fim de caracterizar os fragmentos presentes na membrana.

Todas as etapas foram realizadas por 1 hora a 37°C sob agitação e, entre as etapas, a membrana foi lavada três vezes com PBS contendo 0,05% de Tween 20. Os imunocomplexos foram evidenciados por quimioluminescência (ECL) (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, EUA).

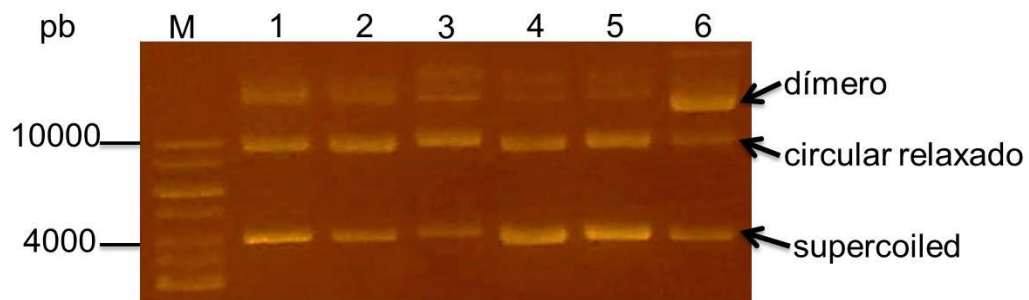
Caracterização da atividade funcional do fragmento: A caracterização foi feita através da técnica de *Western blotting*, descrito acima, em que foram separadas em SDS-PAGE e transferidas para membrana de nitrocelulose as proteínas do veneno total de *L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta*. Os extratos periplasmáticos dialisados do scFv e *diabody*, um extrato irrelevante e o anticorpo monoclonal LimAb7, na concentração de 10µg/mL, foram avaliados quanto à reatividade frente às frações proteicas dos venenos.

4 RESULTADOS

4.1 CLONAGEM DO GENE CODIFICANTE PARA O FRAGMENTO VARIÁVEL DE CADEIA SIMPLES DE ANTICORPO (scFv)

Com o intuito de amplificar o vetor pET-22b (+) contendo o inserto para o scFv, bactérias TOP 10 foram transformadas e 6 clones crescidos em meio LB ágar foram selecionados para a confirmação da transformação. Após extração e purificação do vetor, foi possível visualizar em gel de agarose três bandas: acima de 10000 e, aproximadamente, 10000 e 4000 pares de base, correspondendo ao vetor na forma de dimerizada, circular relaxada e supercoiled (superenovelado), respectivamente (FIGURA 7).

FIGURA 7 - EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL DAS COLÔNIAS TOP10 TRANSFORMADAS

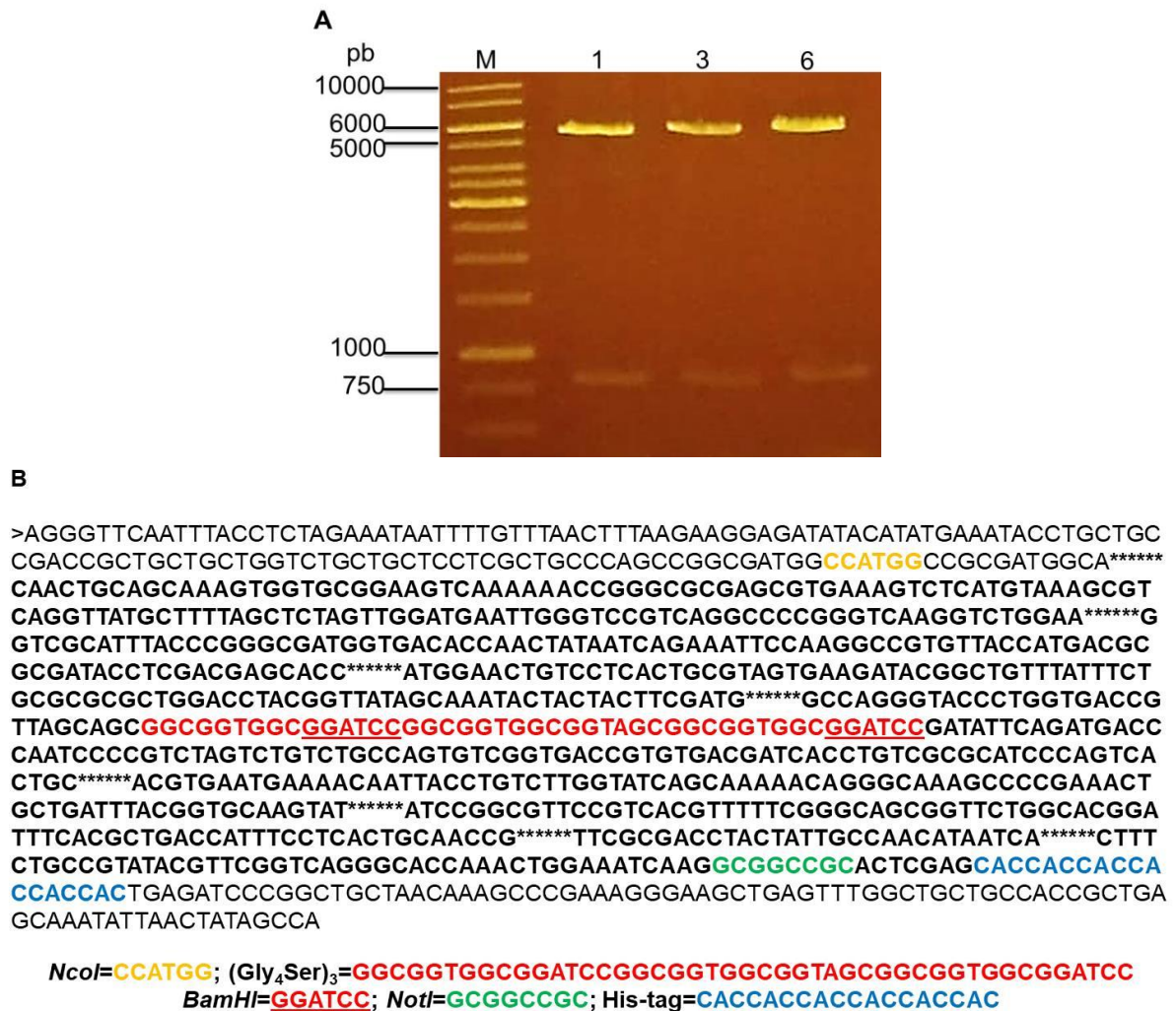


FONTE: a autora (2018).

LEGENDA: gel de agarose 1% após extração de DNA plasmidial confirmando o vetor na bactéria TOP10. Números representam as colônias. M=marcador molecular. pb=pares de base. As setas indicam as possíveis formas do vetor.

Após confirmação da transformação das 6 colônias, 3 clones foram escolhidos e seus plasmídeos purificados foram digeridos com as enzimas de restrição *NotI* e *NcoI*, com o intuito de verificar a presença do gene de interesse, através da eletroforese em gel de agarose. O corte com essas enzimas resultou em dois fragmentos, o inserto com 809 pares de base correspondente ao gene de interesse que codifica para o scFv, já que para a cadeia pesada temos 450 pb e cadeia leve 350 pb mais a região codificante do ligante, e o vetor linearizado sem inserto com 5493 pares de base. Desta maneira, foi possível inferir a produção e síntese correta do plasmídeo proveniente da Genscript® (FIGURA 8-A). Realizou-se também o sequenciamento do material genético obtido das colônias de *E. coli* positivas para o pET-22b (+) + scFv, no qual verificou-se que nenhuma mutação foi inserida ao longo dos processos de amplificação do vetor (FIGURA 8-B).

FIGURA 8 - DIGESTÃO ENZIMÁTICA E SEQUENCIAMENTO PARA CONFIRMAÇÃO DO INSERTO



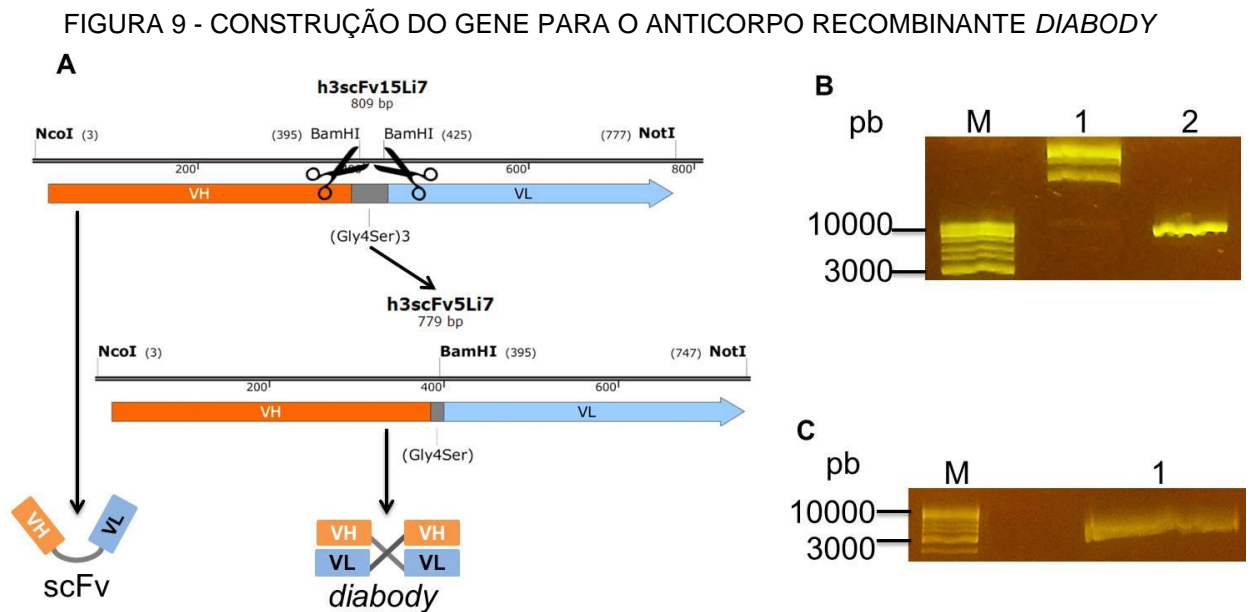
FONTE: a autora (2018).

LEGENDA: A- gel de agarose 1% após reação de digestão enzimática com as enzimas de restrição *NcoI* e *NotI*, verificando a presença do vetor (5493pb) e do inserto (809 pb). Números representam o produto de digestão do DNA plasmidial. M= marcador molecular. B- resultado do sequenciamento obtido a partir do produto de *miniprep* purificado confirmando o gene para o scFv. *=bases omitidas por se tratar de sequência passível de patente.

4.2 CONSTRUÇÃO E AMPLIFICAÇÃO DO FRAGMENTO DE ANTICORPO NO FORMADO *DIABODY*

Para a construção do *diabody* o mesmo plasmídeo pet 22b (+) contendo o scFv foi utilizado. O inserto scFv apresenta entre o gene de VH e VL um gene que codifica para 15 aminoácidos responsável pela ligação de VH e VL. Nessa região estão contidos dois sítios para a enzima *BamHI*. Ao submeter esse plasmídeo pET-22b (+) à digestão enzimática com *BamHI*, foi possível reduzir o ligante para uma região que codifica apenas 5 resíduos de aminoácidos (FIGURA 9-A). No entanto, após a digestão o vetor torna-se linear, com as extremidades coesas. Tanto o vetor

antes da digestão quanto o produto da digestão enzimática foram verificados em gel de agarose 1%, sendo observadas bandas de tamanhos distintos (Figura 9-B) Todo o produto de digestão foi aplicado em novo gel de agarose com o objetivo de purificar o vetor linear (Figura 9-C). Utilizou-se a enzima T4 DNA ligase para a união das extremidades coesas e obtenção do vetor circular contendo agora o inserto codificante para o *diabody* (FIGURA 9-A).

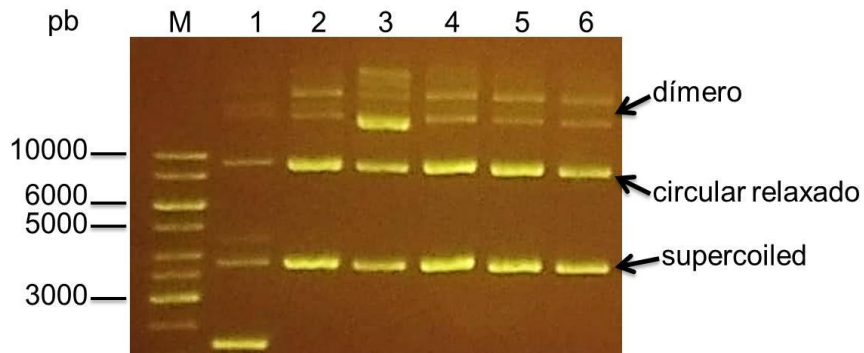


FONTE: a autora (2018).

LEGENDA: A- construção gene para o fragmento no formato *diabody* através da reação de digestão enzimática pela enzima de restrição *BamHI*, reduzindo o *linker* a 5 resíduos de aminoácidos. B- gel de agarose 2% com 1- o produto de *miniprep* da colônia 6 TOP10 e 2- produto da digestão enzimática do produto de *miniprep* da mesma colônia. C- gel de agarose 1% com o produto total da reação de digestão enzimática para purificação do gel. M- marcador molecular.

O produto da ligação, pET-22b (+) + *diabody*, foi inserido em *E. coli* TOP10 afim de amplificar o material genético. As colônias positivas foram selecionadas com ampicilina, pois o vetor pET-22b (+) confere à bactéria resistência a este antibiótico, e confirmadas por eletroforese em gel de agarose 1% com a visualização dos produtos da extração de DNA plasmidial (*miniprep*). Foi possível visualizar o vetor nas suas três formas conformacionais dímero, circular relaxado e supercoiled (superenovelado) (FIGURA 10).

FIGURA 10 - EXTRAÇÃO DO DNA PLASMIDIAL DAS COLÔNIAS TOP10 TRANSFORMADAS



FONTE: a autora (2018).

LEGENDA: gel de agarose 1% após extração de DNA plasmidial confirmando o vetor na bactéria TOP10. M=marcador molecular. Números representam as colônias. As setas indicam as possíveis formas do vetor.

A confirmação da construção correta do fragmento *diabody* foi feita através de amplificação por PCR do gene (dados não mostrados) e por sequenciamento do material genético obtido das colônias de *E. coli* positivas para o pET-22b (+) + *diabody* (FIGURA 11).

FIGURA 11 - SEQUENCIAMENTO DO DIABODY

```
>TACGGGTCAATTCCCTCTAGAATAATTTTGTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGAAATACCTGCTGG
GATGCTGCTGCTGGTCTGCTGCTCCTCGCTGCCAGCCGCGCATGGCCATGGCCGCGATGGCA*****CA
ACTGCAGCAAAGTGGTGCAGGAAGTCAAAAAACCGGGCGCGAGCGTGAAAGTCTCATGTAAAGCGTCA
GGTTATGCTTTTAGCTCTAGTTGGATGAATTGGGTCCGTCAGGCCCGGGTCAAGGTCTGGAA*****GGT
CGCATTTACCCGGGCGATGGTGACACCAACTATAATCAGAAATCCAAGGCCGTGTTACCATGACGCGC
GATACCTCGACGAGCACC*****ATGGAAGTGTCTCACTGCGTAGTGAAGATACGGCTGTTTATTTCTGC
GCGCGCTGGACCTACGGTTATAGCAAATACTACTACTTCGATG*****GCCAGGGTACCCTGGTGACCGTT
AGCAGCGGCGGTGGCGGATCCGATATTCAGATGACCCAATCCCGTCTAGTCTGTCTGCCAGTGTCCGG
TGACCGTGTGACGATCACCTGTGCGCATCCAGTCACTGC*****ACGTGAATGAAAACAATTACCTGT
CTTGGTATCAGCAAAAACAGGGCAAAGCCCCGAAACTGCTGATTTACGGTGCAAGTAT*****ATCCGGC
GTTCCGTCACGTTTTTCGGGCAGCGGTTCTGGCACGGATTTACGCTGACCATTTCCTCACTGCAACCG
*****TTCGCGACCTACTATTGCCAACATAATCA*****CTTCTGCCGTATACGTTCCGGTCAGGGCACAAA
CTGAAATCAAGGCGGCCGACTCGAGCACCACCACCACCACCTGAGATCCGGCTGCTAACAAAG
CCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAAATATAACTAAGGCCAC
```

*Nco*I=CCATGG; (Gly₄Ser)₃=GGCGGTGGCGGATCC
*Bam*HI=GGATCC; *Not*I=GCGGCCGC; His-tag=CACCACCACCACCACCAC

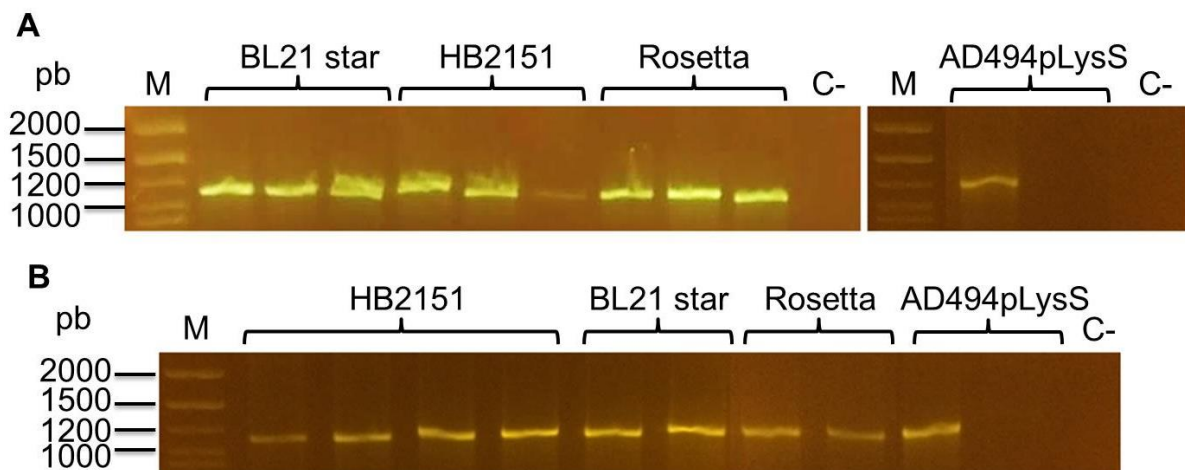
FONTE: a autora (2018).

LEGENDA: resultado do sequenciamento feito a partir do produto de *miniprep* purificado confirmando o gene para o *diabody*. *=bases omitidas por se tratar de sequência passível de patente.

Tendo sido evidenciada a correta construção e amplificação do vetor pET-22b (+) + scFv e também pET-22b (+) + *diabody*, a próxima etapa foi a transformação de diferentes cepas de bactérias *E. coli* para verificar qual maquinaria apresenta melhor mecanismo de expressão para esses fragmentos. As cepas avaliadas foram AD494pLysS, BL21 star, Rosetta e HB2151. Primeiramente, para avaliar a correta transformação, de alguns clones de cada cepa transformada foram

analisados por PCR de colônia. Os iniciadores (primers T7) utilizados na reação para amplificação da região de interesse amplificaram um fragmento de 1029 pares de base correspondente ao tamanho esperado para o inserto com a utilização deste iniciador, validando a transformação das colônias avaliadas. Dos 2 clones escolhidos para a cepa AD494pLysS, apenas um foi eficientemente transformado, tanto para a transformação com o vetor + scFv quanto para o *diabody*, sugerindo que essa cepa AD494pLysS apresente uma maior resistência à metodologia de preparação utilizando a técnica de quimiocompetência. Não foi possível verificar diferença entre o tamanho do fragmento scFv em relação ao *diabody*, mas isso já era esperado porque a redução de uma região codificante de 15 resíduos de aminoácidos para 5 não é o suficiente para gerar uma alteração visível na migração em gel de agarose, mas confirma a introdução do vetor nas bactérias (FIGURA 12),

FIGURA 12 - PCR DE COLÔNIA DAS CEPAS DE EXPRESSÃO



FONTE: a autora (2018).

LEGENDA: Gel de agarose 2% após PCR de colônia verificando a presença do gene do scFv (A) e do diabody (B). M= marcador molecular. Controle negativo (C-): reação de PCR sem colônia.

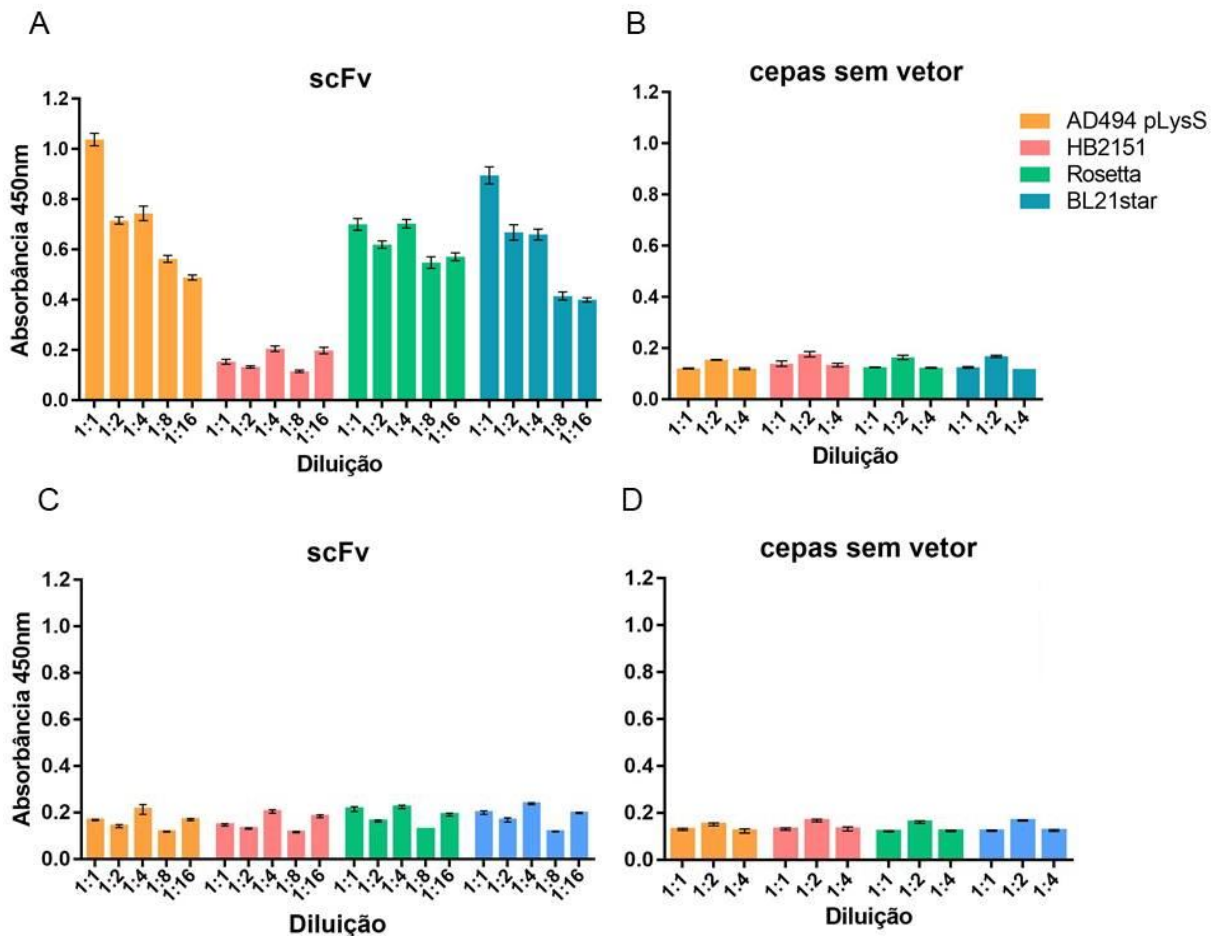
4.3 ESCOLHA DA CEPA DE EXPRESSÃO

Ambos os fragmentos scFv e *diabody* foram expressos nas diferentes cepas de bactérias aqui transformadas, sendo direcionadas a secretar a molécula recombinante para o espaço periplasmático por ação da sequência *peIB* presente no vetor pET 22b (+) (FIELDS *et al*, 2013). O emprego de diferentes cepas visa avaliar qual maquinaria bacteriana apresenta melhor estratégia para a produção de maiores concentrações dos fragmentos. Para avaliar os extratos periplasmáticos obtidos quanto à presença de quantidades de fragmento, estes foram testados frente

ao veneno de *L. intermedia* pela técnica de ELISA. Para a detecção da reatividade do fragmento frente ao veneno, duas estratégias foram utilizadas: o fragmento apresenta dois marcadores na sua estrutura, uma cauda de poli-histidina e sítio de interação com proteína L. Para evidenciar o fragmento foram empregadas moléculas marcadas que interagem com esses marcadores, tais como um anticorpo anti-tag de histidina e anti-mouse marcado com uma enzima e proteína L também marcada com uma enzima.

Primeiramente, os extratos periplasmáticos contendo o fragmento scFv foram testados. Foi possível observar que o marcador do fragmento contendo o sítio de interação para a proteína L apresentou melhores resultados quando comparado ao marcador cauda de histidina (GRÁFICO 1-A e 1-C). Não foi possível evidenciar reatividade do fragmento frente ao veneno quando a detecção foi realizada pela cauda de histidina, sendo estas reatividades comparáveis ao controle negativo que são os extratos periplasmáticos de bactérias não transformadas (GRÁFICO 1-C e 1-D). No entanto, a detecção com proteína L demonstrou que os extratos periplasmáticos das cepas AD494pLysS, BL21 star e Rosetta produziram os fragmentos e estes reconhecem o veneno. Já a cepa HB2151 parece não apresentar maquinaria específica para a produção do fragmento. Esses resultados são corroborados pela ausência de reatividade dos extratos das bactérias não transformadas (GRÁFICO 1-B).

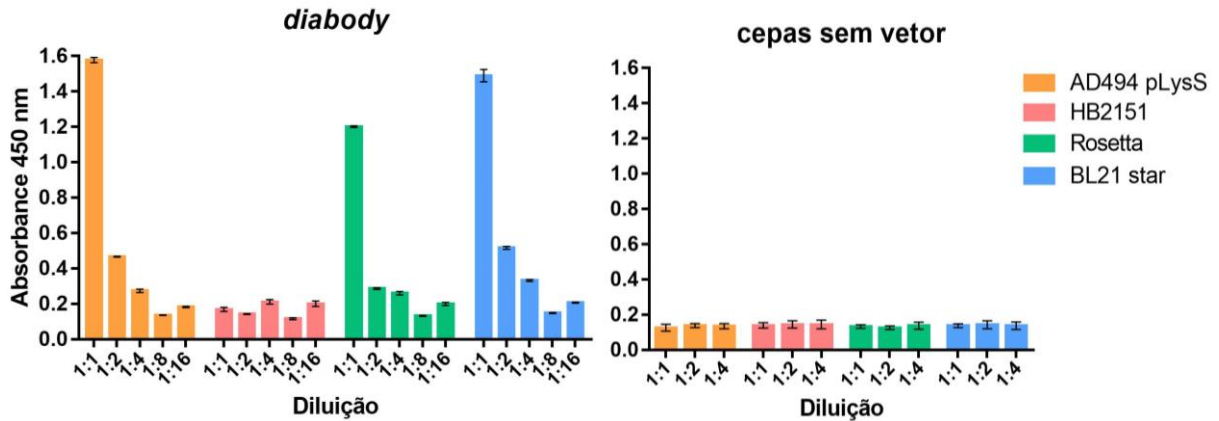
GRÁFICO 1 - REATIVIDADE DOS EXTRATOS PERIPLASMÁTICOS CONTENDO SCFV



FONTE: a autora (2018).

LEGENDA: ELISA direto do extrato periplasmático das cepas de expressão do scFv. A placa foi imobilizada com 5 µg/mL de veneno de *L. intermedia*, os extratos foram incubados em diversas diluições, a reatividade foi verificada através de proteína L-HRP (1:2000) (gráficos 1-A e 1-B) e anticorpo anti-histidina (1:1000) e anti-mouse-HRP (1:4000) (gráficos 1-C e 1-D), e o substrato foi TMB. O extrato periplasmático das cepas sem vetor foi utilizado como controle negativo. Barras indicam o erro padrão das médias.

Posteriormente, os extratos periplasmáticos do fragmento *diabody* foram testados. Como visto anteriormente para os ensaios de ELISA, o marcador do fragmento com o sítio de interação para a proteína L apresentou melhores resultados quando comparado ao marcador cauda de histidina, então prosseguiu-se a detecção do *diabody* apenas por proteína L-HRP. Verificou-se que o extrato da cepa AD494pLysS apresentou maior reatividade frente ao veneno, seguida das cepas BL21 star e Rosetta (GRÁFICO 2), assim como observado para o scFv. O extrato da cepa HB2151 apresentou reatividade muito baixa, similar à dos extratos das cepas não transformadas usadas como controle negativo da reação.

GRÁFICO 2 - REATIVIDADE DOS EXTRATOS PERIPLASMÁTICOS CONTENDO *DIABODY*

FONTE: a autora (2018).

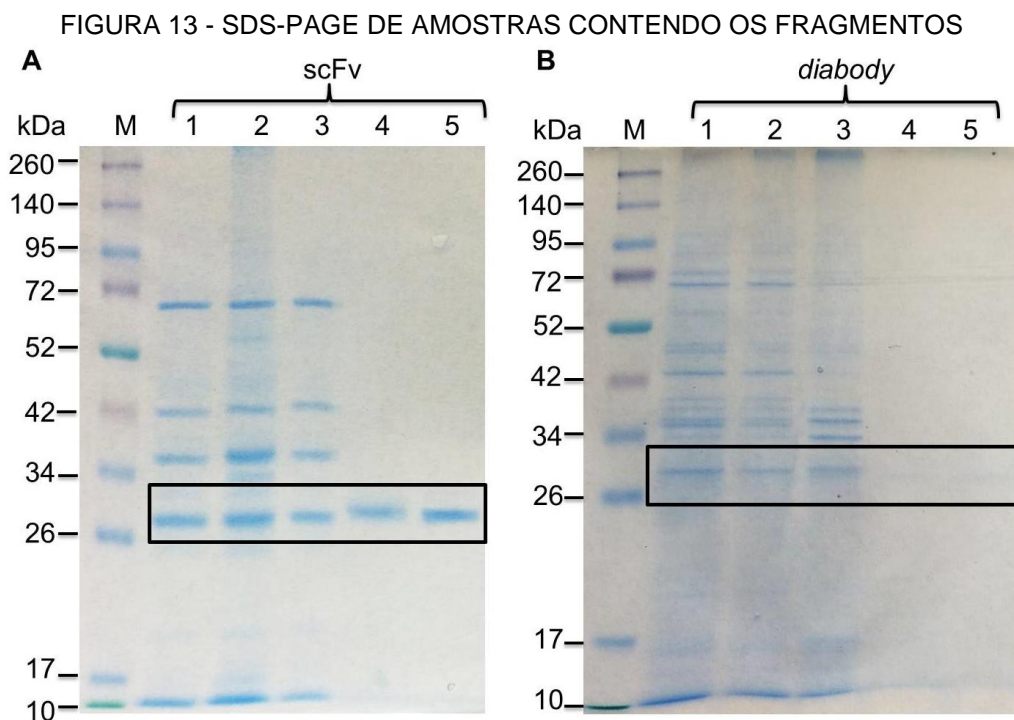
LEGENDA: ELISA direto do extrato periplasmático das cepas de expressão do *diabody*. A placa foi imobilizada com 5 µg/mL de veneno de *L. intermedia*, os extratos foram incubados em diversas diluições, a reatividade foi verificada através de proteína L-HRP (1:2000), e o substrato foi TMB. O extrato periplasmático das cepas sem vetor foi utilizado como controle negativo. Barras indicam o erro padrão das médias.

O objetivo da utilização de várias cepas de bactérias e a caracterização delas foi para tentar identificar qual a melhor cepa que seria capaz de produzir os fragmentos de interesse e que estes fossem funcionais. Neste sentido, a escolha de uma das cepas para expressão e purificação dos fragmentos foi baseada na reatividade (absorbância) dos extratos. Esta reatividade sugere a presença do fragmento no extrato, sendo que quanto maior a reatividade possivelmente maior a concentração de fragmento, bem como a interação com o veneno sugere que estes fragmentos são funcionais. As cepas que produziram os fragmentos scFv e *diabody* e que apresentaram maior reatividade foram a AD494pLysS, seguida da BL21 star. Levando em consideração que o grupo (KARIM-SILVA *et al*, 2016) trabalhou previamente com as cepas AD494pLysS e BL21, e foi visto que a primeira apresentava maior eficiência na produção dos fragmentos recombinantes, tanto para scFv quanto para *diabody*, decidiu-se prosseguir este trabalho utilizando a cepa de expressão AD494pLysS.

4.4 CARACTERIZAÇÃO IMUNOQUÍMICA DOS FRAGMENTOS

Os dois fragmentos foram expressos em cepa *E. coli* AD494pLysS. Os fragmentos que são direcionados para o espaço periplasmático da bactéria foram extraídos por choque osmótico e consequente rompimento da parede celular para obtenção do extrato periplasmático. Para a purificação dos fragmentos, foi utilizada

cromatografia de afinidade em coluna de proteína L-agarose. O gel de eletroforese evidencia o perfil proteico das amostras após a extração periplasmática e purificação dos fragmentos. O fragmento recombinante scFv é caracterizado por apresentar um perfil eletroforético com massa molecular de 27 kDa. A presença deste perfil foi observada na amostra após a extração periplasmática, porém em meio a outras tantas proteínas provenientes da própria bactéria. Entretanto, após a purificação do fragmento, apenas uma única proteína foi verificada, sugerindo a eficácia na purificação (Figura 13-A). O *diabody*, apesar de formar dímeros de scFv por causa do ligante reduzido e apresentar uma massa molecular de aproximadamente 50 kDa, quando em eletroforese, esses dímeros são desfeitos e visualiza-se uma proteína com a mesma massa de um scFv. Quando se observou as amostras do extrato periplasmático do *diabody*, foi possível confirmar a presença de uma proteína com massa em torno de 27 kDa. No entanto, nas amostras após purificação quase não foi possível a visualização da proteína (FIGURA 13-B). O fragmento scFv parece ter sido expresso em maior quantidade, o que favoreceu a purificação e visualização no gel. A expressão do fragmento scFv parece ter sido mais eficiente quando comparada à expressão do *diabody*.

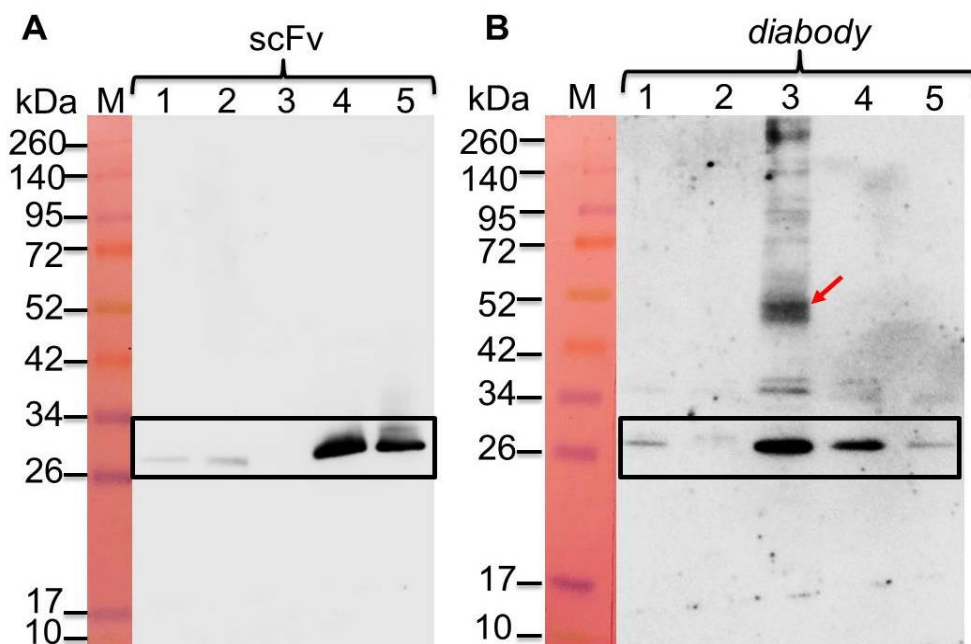


FONTE: a autora (2018).

LEGENDA: gel SDS-PAGE 12,5% corado por azul de Coomassie. Amostras: extrato periplasmático dialisado centrifugado (linha 1); flow through da coluna de proteína L (linha 2); extrato periplasmático não solúvel (linha 3); purificado em tampão glicina pH 2,2 (linha 4); fragmento purificado após a diálise em tampão PBS (linha 5). O retângulo indica as proteínas referentes ao scFv e *diabody*.

Através da eletroforese, foi possível avaliar o perfil das amostras dos extratos periplasmáticos e fragmentos purificados e sugerir que os fragmentos foram produzidos dada a similaridade das massas moleculares das proteínas analisadas. Para a confirmação da presença dos fragmentos de anticorpos, foi empregada a técnica de *Western blotting*. Nas amostras do scFv apenas uma banda de, aproximadamente, 27 kDa foi visualizada e esta banda é muito mais evidente nas amostras após purificação (Figura 14-A). Nas amostras de *diabody*, também foi observada uma banda em torno de 27 kDa e, diferentemente do que foi visto na eletroforese, foi possível a verificação do fragmento após a purificação, mas parece que há uma perda quando a amostra é dialisada. Outra constatação importante é a presença de várias bandas na amostra referente ao extrato periplasmático não solúvel, na qual além da presença da banda em torno de 27 kDa outra banda mostra-se bastante evidente com massa molecular de, aproximadamente, 50 kDa podendo, ser o fragmento na sua estrutura dimerizada (FIGURA 14-B).

FIGURA 14 - WESTERN BLOTTING DE AMOSTRAS CONTENDO OS FRAGMENTOS



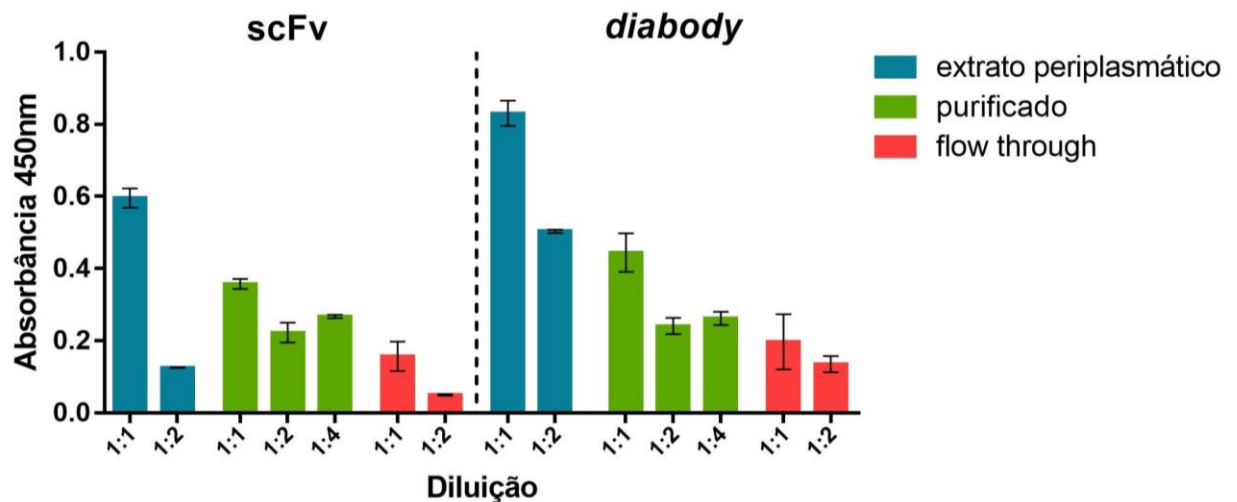
FONTE: a autora (2018).

LEGENDA: *Western blotting* dos fragmentos purificados. Amostras: extrato periplasmático dialisado centrifugado (1); flow through da coluna de proteína L (2); extrato periplasmático não solúvel (3); purificado em tampão glicina pH 2,2 (4); fragmento purificado após a diálise em tampão PBS (5). M – membranas de nitrocelulose coradas por ponceau após transferência, evidenciando o marcador de massa molecular. A revelação foi feita com anti-histidina (1:1000) e anti-mouse-HRP (1:4000), e evidenciada com ECL. O retângulo indica as proteínas referentes ao scFv e *diabody*. A seta indica a provável presença do *diabody* na forma dimérica.

4.5 CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DOS FRAGMENTOS

Os experimentos anteriores foram capazes de caracterizar imuniquimicamente os fragmentos aqui produzidos. Mas a principal característica a se saber destes fragmentos é se eles são funcionais, ou seja, se são capazes de reconhecer a sua molécula alvo, o veneno de *L. intermedia*. Um ELISA foi empregado para identificar a capacidade de interação dos fragmentos scFv e *diabody* com as toxinas do veneno. As amostras do extrato periplasmático, os fragmentos purificados e também as proteínas que não ligaram na coluna de purificação (flow through) foram testadas. Os extratos periplasmáticos de ambos os fragmentos mostraram reatividade frente às toxinas. Esta reatividade foi diminuída quando avaliado os fragmentos purificados. Ainda foram avaliadas as proteínas que não ligaram. Os fragmentos estão sendo produzidos e são capazes de reagir com o seu antígeno alvo, as toxinas do veneno (GRÁFICO 3).

GRÁFICO 3 - REATIVIDADE DE AMOSTRAS CONTENDO OS FRAGMENTOS FRENTE AO VENENO



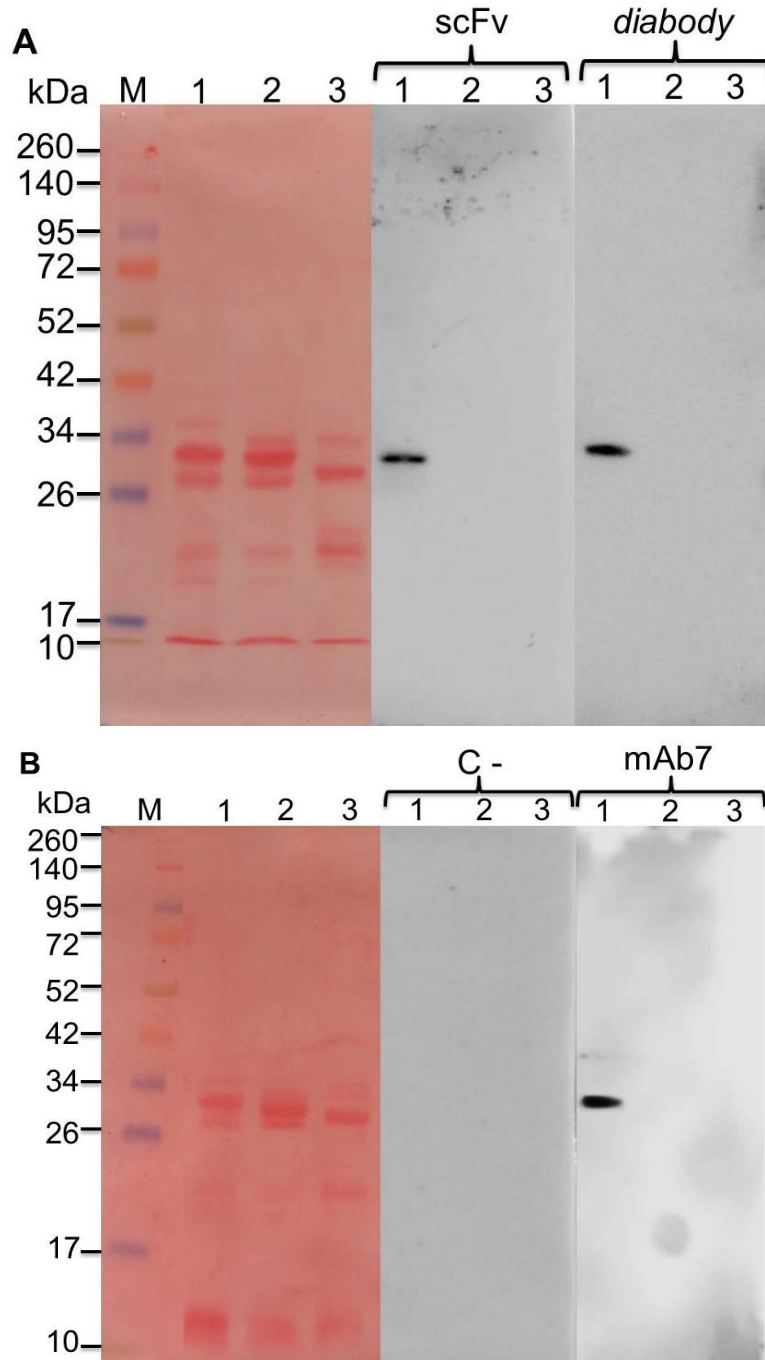
FONTE: a autora (2018).

LEGENDA: ELISA direto dos anticorpos recombinantes purificados, extrato periplasmático e flow through do scFv e *diabody*. A placa foi imobilizada com 5 µg/mL de veneno de *L. intermedia*, as amostras foram incubadas em diversas diluições, a reatividade foi verificada através de proteína L-HRP e o substrato foi TMB. Barras indicam o erro padrão das médias.

Além disso, foi feito um *Western blotting*, em que foi verificada a reatividade dos extratos periplasmáticos do scFv e do *diabody* frente aos venenos de *Loxosceles intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta*. Ambos apresentaram reatividade especificamente para as fosfolipases D do veneno de *L. intermedia*, confirmando

que a especificidade frente a essas toxinas não foi afetada pelo processo de humanização dos fragmentos (FIGURA 15).

FIGURA 15 - REATIVIDADE DOS FRAGMENTOS FRENTE AOS VENENOS



FONTE: a autora (2018).

LEGENDA: *Western blotting* dos extratos periplasmáticos dos fragmentos frente aos venenos totais. Amostras: *Loxosceles intermedia* (1); *L. gaucho* (2); *L. laeta* (3). M – membranas de nitrocelulose coradas por ponceau após transferência, evidenciando o marcador de massa molecular. C- = extrato periplasmático irrelevante como controle negativo. mAb7 – 10 µg/mL. A revelação foi feita com anti-histidina (1:1000) e anti-mouse-HRP (1:4000), evidenciada por ECL.

5 DISCUSSÃO

Apesar de existirem anticorpos recombinantes no formato scFv humano capazes de reconhecer toxinas escorpiônicas, ainda não existem trabalhos para aranhas (LAUSTSEN *et al*, 2016). A proposta do presente estudo foi caracterizar dois formatos de fragmentos de anticorpos - o scFv e o *diabody* – humanizados. Os genes codificantes para esses fragmentos foram previamente sequenciados pelo nosso grupo de pesquisa a partir das sequências codificantes das regiões variáveis do anticorpo monoclonal murino mAb7, que foi utilizado como protótipo para obtenção de uma molécula humanizada a partir de substituição de algumas sequências murinas por sequências humanas, respeitando homologias estruturais e características intrínsecas ao sítio de interação ao antígeno. Após análise bioinformática, o gene foi sintetizado no formato scFv e inserido no vetor de expressão pET-22b (+).

Um segundo formato de fragmento foi construído, em que o gene sintético foi remodelado, conferindo a diminuição do ligante de 15 aminoácidos para 5 aminoácidos. A modificação do tamanho do ligante, através de ferramentas básicas da engenharia genética, permite a expressão de fragmentos recombinantes formados de dois (*diabody*), três (*triabody*) e até quatro (*tretabody*) frações variáveis. Esses oligômeros possuem a vantagem de apresentar maior avidéz pelo antígeno conforme maior o número de scFv na molécula (FIELDS *et al*, 2013).

Ambos os fragmentos scFv e *diabody* foram produzidos em bactérias, considerada uma forma eficiente de produção, devido ao baixo custo e curto período de produção relacionados à rápida taxa de crescimento desses microrganismos (AHMAD *et al*, 2012; SPADIUT *et al*, 2014). No entanto, bactérias constituem sistema procaríoto e apresentam maquinaria simples para a expressão de proteínas. Porém, este obstáculo foi contornado com a utilização de cepas bacterianas com modificações genéticas que favorecem a expressão de proteínas com estruturas mais complexas.

Para expressão dos fragmentos scFv e *diabody*, diferentes cepas de bactérias *E. coli* foram avaliadas. A cepa AD494 pLysS (DE3) tem como característica a ausência da enzima tiorredoxina redutase. Tal característica favorece a formação de pontes dissulfeto da proteína a ser sintetizada no citoplasma, sendo assim, uma vantagem quando as proteínas produzidas são

dependentes da formação das pontes dissulfeto para o correto enovelamento. Já a cepa BL21 star (DE3) não possui as proteases Lon e OmpT, responsáveis por degradar proteínas tidas como estranhas para a maquinaria bacteriana (mecanismo de reparo), e as RNAses são afuncionais, propriedades que permitem a produção de um maior número de transcritos e produto proteico (NOVAGEN, 2002-2003; GARCÍA-FRAGA *et al*, 2015; KARIM-SILVA *et al*, 2016). A cepa Rosetta (DE3) é otimizada para a produção eficiente de proteínas que são codificadas por códons raros ao sistema bacteriano pela presença de RNA transportadores que interagem com esses códons – condição importante, considerando a expressão de proteínas complexas provenientes de informação genética de células eucariotas (NOVAGEN, 2022-2003; RAVAL *et al*, 2017). Todas essas três cepas foram eficazes em produzir o fragmentos scFv e *diabody*. No entanto, melhores resultados de expressão foram observados para as cepas AD494 pLysS (DE3) e BL21 star, sugerindo que as características que promovem a estabilidade da proteína e do RNA mensageiro são importantes na produção desses formatos de fragmentos.

Por outro lado, a cepa HB2151 não expressa a T7 polimerase, a qual é um indutor para expressão quando se utiliza vetores do tipo pET, como foi utilizado. Assim, como as bactérias dessa cepa sofreram indução apenas por IPTG, provavelmente resultou nos níveis de proteína reduzidos observados. Além disso, Chan *et al* (2010) afirmam que as bactérias HB2151 sofrem estresse mecânico quando submetidas a altas rotações, e as proteínas presentes no espaço periplasmático acabam extravasando para o meio externo. No protocolo utilizado para expressão, o mesmo para as quatro cepas, as culturas de bactérias em meio líquido são submetidas a uma rotação de 250rpm durante a fase exponencial e, posteriormente para a extração, o sobrenadante é descartado e são recuperadas apenas as células para o choque osmótico. É provável que a ineficiência de produção observada pela cepa HB2151 deve-se à baixa expressão das proteínas e, também, ao extravasamento destas para o meio externo, o qual foi descartado durante o processo de extração.

Outra característica importante a ser considerada é a forma de captura da proteína recombinante para a caracterização e, principalmente, para a purificação. Pensando nisso, foram testados dois marcadores do fragmento: cauda de poli-histidina e sítio de interação com proteína L. Ambos detectam e purificam a proteína por cromatografia de afinidade, diferenciando-se pela forma de ligação com o

fragmento. Extensamente utilizada na purificação de fragmentos recombinantes, a cauda de histidina geralmente não afeta a estrutura ou função da proteína a qual está ligada, devido a seu pequeno tamanho e ausência de carga em pH fisiológico (SPRIESTERSBACH *et al*, 2014). Entretanto, por se tratar de uma sequência aminoacídica que não faz parte da composição original da molécula, algumas alterações podem ocorrer. A detecção por proteína L elimina as desvantagens atribuídas a caudas ligantes por interagir com uma região presente na cadeia VL sem interferir com a interação antígeno–anticorpo (RODRIGO *et al*, 2015). Essas características são uma possível explicação para os melhores resultados encontrados com o uso de proteína L na detecção dos fragmentos scFv e *diabody*, nos testes de ELISA para avaliar a expressão nas diferentes cepas de bactéria. A ausência de detecção pela cauda de histidina pode estar relacionada à modificação da estrutura do fragmento, com perda da afinidade pelo antígeno, ou por causa da estrutura conformacional da proteína, a região contendo a cauda de histidina pode estar recoberta ou bloqueada e inacessível para interações. Os autores Muzard *et al* (2009) e Fields *et al* (2013) discutem que a presença de um marcador na porção final da molécula, apesar de ser útil para purificação da proteína de interesse, pode promover agregação e dobramento incorreto. Sendo assim, a ausência de detecção da cauda de histidina pode ser explicada pelo provável enovelamento incorreto dos fragmentos.

Entretanto, Fields *et al* (2013) recomendam o uso de anticorpos anti-histidina para a detecção dos fragmentos purificados no ensaio de *Western blotting*, possivelmente pelo fato de que as amostras contendo os fragmentos são fervidas antes de serem submetidas à corrente elétrica para migração em SDS-PAGE, e a conformação estrutural original da proteína é desfeita, expondo a cauda de histidina. Como observado nos ensaios de *Western blotting*, o uso de anticorpos anti-histidina evidenciaram, de maneira específica, os fragmentos produzidos.

A próxima etapa foi a caracterização da funcionalidade dos fragmentos. Analisou-se a capacidade de ligação do scFv e *diabody* ao veneno de *Loxosceles intermedia* em ensaios de ELISA e *Western blotting*. Os resultados mostraram que ambos reconheceram o veneno de *L. intermedia*, preservando o perfil de ligação ao antígeno observado com o anticorpo parental mAb7, analisado em condições semelhantes.

Já se sabe que o veneno total das aranhas *Loxosceles* apresenta uma mistura complexa de compostos biologicamente ativos, principalmente proteínas e peptídeos com ação tóxica e/ou enzimática (VEIGA *et al*, 2000; GREMSKI, *et al*, 2010). Entre as toxinas produzidas pelas aranhas do gênero *Loxosceles*, destacam-se as fosfolipases. De acordo com dados da literatura, essas toxinas são as principais responsáveis pelos efeitos biológicos que ocorrem nos acidentados após a picada (SILVA *et al*, 2004; APPEL *et al*, 2005; SWANSON e VETTER, 2006). Essas enzimas catalisam a hidrólise de fosfolipídios como esfingomiéline (SILVA *et al*, 2004; VAN MEETEREN *et al*, 2004; CHAIM *et al*, 2011; HORTA *et al*, 2013; WILLE *et al*, 2013). O anticorpo monoclonal LimAb7 produzido por Alvarenga *et al* (2003) reconhece proteínas de 32 a 35 kDa, massa molecular que corresponde às proteínas com atividade de esfingomiélinase do veneno, as quais são consideradas como as principais indutoras da ação necrótica e hemolítica. A capacidade de neutralizar a atividade esfingomiélinásica do veneno pode ser um bom parâmetro a ser considerado na tentativa de identificar moléculas com potencial farmacológico.

Experimentos realizados pelo nosso grupo de pesquisa já demonstraram que a ação de neutralização dos efeitos do veneno pode estar associada não só a neutralização das frações ativas dos componentes do veneno, mas também por efeito alostérico, nas regiões de interação antígeno-anticorpo. Neste segundo, caso o tamanho do fragmento pode ser de extrema importância para impedir os efeitos deletérios causados pelo veneno de *Loxosceles*. Por esse motivo torna-se relevante a construção de fragmentos em diferentes formatos e tamanhos. Além disso, a humanização da molécula permite uma melhor aplicabilidade em uso terapêutico por minimizar as reações adversas como as encontradas quando há o emprego de moléculas heterológicas (JIACOMINI, 2017).

Diferentes estudos e abordagens mostram que a utilização de fragmentos de anticorpos recombinantes estão sendo caracterizados com sucesso em ensaios de neutralização de diferentes compostos, como é o caso dos estudos do grupo de Oliveira (2009), com a neutralização de enzimas fosfolipases de serpentes, e o grupo de Amaro (2011), com a neutralização da enzima Ts1 de *Tityus serrulatus*, evidenciando que anticorpos recombinantes também são capazes de neutralizar efeitos tóxicos tanto de venenos ofídicos quanto escorpiônicos.

Atualmente, a engenharia de biomoléculas tem gerado bilhões de dólares por ano com mais de 200 proteínas recombinantes disponíveis na indústria

biofarmacêutica. Fragmentos de anticorpos recombinantes representam o maior crescimento da classe desses produtos comercializados, sendo que essas moléculas podem ser utilizadas não apenas em aplicações terapêuticas, mas também em imunodeteção, purificação e aplicações de bioseparação. Outra vantagem do uso de fragmentos de anticorpos é atribuída ao aumento da taxa de penetração nos tecidos e o baixo tempo de retenção, comparados com a molécula inteira (SPADIUT *et al*, 2014).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No decorrer desse estudo, a proposta de trabalho foi alcançada. Os fragmentos de anticorpos recombinantes humanizados nos formatos scFv e *diabody* foram produzidos em sistema procarioto com sucesso e a caracterização confirmou o êxito da interação com as toxinas dermonecróticas presentes no veneno de *Loxosceles intermedia*. Respeitando os objetivos do estudo, o seguinte foi alcançado:

- Bactérias de clonagem foram eficientemente transformadas e o vetor contendo o fragmento scFv recombinante humanizado foi obtido em grandes quantidades.
- A estratégia de digestão enzimática empregada foi eficaz e permitiu a correta construção do fragmento recombinante *diabody*.
- As quatro cepas de bactéria selecionadas para expressão dos fragmentos scFv e *diabody* foram transformadas adequadamente permitindo a expressão dos fragmentos.
- O sistema de expressão bacteriano mostrou-se eficiente na produção do gene sintético, que foi expresso como monômero scFv e dímero *diabody*. Além disso, constatou-se melhores resultados quando a cepa *E. coli* AD494pLySs e BL21star foram analisadas.
- Nas amostras purificadas do conteúdo extraído a partir da expressão bacteriana foi possível validar a presença dos fragmentos através da detecção do marcador (*tag*) que essas moléculas apresentam.
- Os fragmentos recombinantes foram capazes de detectar o veneno de *L. intermedia* especificamente da mesma maneira que o mAb7.

6.1 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Com fragmentos devidamente produzidos, seria interessante sua avaliação como ferramenta de neutralização *in vitro*, através da avaliação da inibição da hemólise causada pelo veneno de *Loxosceles*, e inibição da atividade esfingomielinásica desencadeante da demonecrose. Tendo em vista o sucesso

obtido previamente com o fragmento *diabody* murino nesses ensaios, pressupõe-se que o fragmento humanizado também possa apresentar o mesmo papel. A validação da funcionalidade desses fragmentos humanizados também deve ser analisada em ensaio *in vivo* da inibição da dermonecrose em coelhos, utilizados hoje como modelo para a validação dos soros de cavalos hiperimunes empregados na produção dos antivenenos.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, Z. A., YEAP, S. K., ALI, A. M., HO, W. Y., ALITHEEN, N. B. M., HAMID, M. scFv Antibody: Principles and Clinical Application. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2012, p. 1-15, 2012.
- ALVARENGA, L. M., et al.. Production of monoclonal antibodies capable of neutralizing dermonecrotic activity of *Loxosceles intermedia* spider venom and their use in a specific immunometric assay. **Toxicon**, v. 42, p. 725-731, 2003.
- AMARO, I.; RIAÑO-UMBARILA, L.; BECERRIL, B.; POSSANI, L. D. Isolation and characterization of a human antibody fragment specific for Ts1 toxin from *Tityus serrulatus* scorpion. **Immunol Lett**, v. 139, p. 73-79, 2011.
- APPEL, M. H., DA SILVEIRA, R. B., GREMSKI, W., VEIGA, S. S. Insights into brown spider and loxoscelism. **Invertebrate Survival Journal**, p. 152-158, 2005.
- AUBREY, N., et al.. Design and evaluation of a diabody to improve protection against a potent scorpion neurotoxin. **Cell Mol Life Sci.**, v. 60, p. 617-628, mar. 2003.
- BABCOCK, J. L., CIVELLO, D. J., GEREN, C. R. Purification and characterization of a toxin from brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*) venom gland extracts. **Toxicon**, v. 19, p. 677–689, 1981.
- BARBARO, K. C., LIRA, M. S., ARAÚJO, C. A., PAREJA-SANTOS, A., TÁVORA, B. C., PREZOTTO-NETO, J. P., KIMURA, L. F., LIMA, C., LOPES-FERREIRA, M., SANTORO, M. L. Inflammatory mediators generated at the site of inoculation of *Loxosceles gaucho* spider venom. **Toxicon**, n. 56, p. 972-9, 2010.
- BASCUR, L., YEVENES, I., BARJA, P. Effects of *Loxosceles laeta* spider venom on blood coagulation. **Toxicon**, v. 20, p. 795–796, 1982.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72(1-2), p. 248–254, 1976.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. 2ª ed. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, Centro Nacional de Epidemiologia, Coordenação de Vigilância das Doenças Transmitidas por Vetores e Antropozoonoses, 2001. Disponível em:

<http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/funasa/manu_peconhentos.pdf>.

Acesso em: 5 ago. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Protocolos clínicos para acidentes por aranhas dos gêneros *Phoneutria* e *Loxosceles*, e serpentes da família Elapidae**. 2014.

Disponível em:

<http://www.saude.pr.gov.br/arquivos/File/Protocolosclnicosrecomendacaoparavigilancia_maior_2014.pdf>. Acesso em: 6 ago. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Casos de acidentes por aranhas. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 2000 a 2017**. 2018. Disponível em:

<<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/junho/25/1-Casos-Araneismo-2000-2017.pdf>>. Acesso em: 5 ago. 2018.

BRAZ A., et al.. Development and evaluation of the neutralizing capacity of horse antivenom against the Brazilian spider *Loxosceles intermedia*. **Toxicon**, v. 37, p. 1323-1328, 1999.

CABRERIZO S., et al.. Loxoscelismo: epidemiología y clínica de una patología endémica en el país. **Arch Argent Pediatr**, v. 107, p. 152-159, mar. 2009.

CHAGAS, F. B., D'AGOSTINI, F. M., BETRAME, V. Aspectos epidemiológicos dos acidentes por aranhas no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Evidência**, v. 10, n. 1-2, p. 121-130, jan./dez., 2010.

CHAIM, O. M. et al., Brown spider (**Loxosceles** genus) venom toxins: tools

for biological purposes. **Toxins**, v.3, p. 309-344, 2011.

CHAN, C. E., et al.. Optimized Expression of Full-Length IgG1 Antibody in a Common *E. coli* Strain. **PLoS one**, v. 5, e10261, abr. 2010.

CHATZAKI, M., et al.. Cutaneous loxoscelism caused by *Loxosceles similis* venom and neutralization capacity of its specific antivenom. **Toxicon**. v. 60, p. 21-30, 2012.

CHAVES-MOREIRA, D., et al. Highlights in the knowledge of brown spider toxins. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 23, n. 6, 2017.

CHOW, S. K.; CASADEVALL, A.. Monoclonal Antibodies and Toxins - A Perspective on Function and Isotype. **Toxins**, v. 4, p. 430-454, 2012.

CORRÊA, M. A., OKAMOTO, C. K., GONCALVES-DE-ANDRADE, R. M., VAN DEN BERG, C. W., TAMBOURGI, D. V. Sphingomyelinase D from *Loxosceles laeta* venom induces the expression of MMP7 in human keratinocytes: contribution to dermonecrosis. **PLoS One**, n. 11, vol. 4, 2016.

DE MOURA, J., et al. Protection against the toxic effects of *Loxosceles intermedia* spider venom elicited by mimotope peptides. **Vaccine**, v. 29, p. 7992-8001, 2011.

DIAS-LOPES, C. et al. Cardiotoxic effects of *Loxosceles intermedia* spider venom and the recombinant venom toxin rLiD1. **Toxicon**, v. 56, p. 1426–1435, 2010.

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

DI TOMMASO A., JUSTE M.O., MARTIN-EAUCLAIRE M.F., DIMIER-POISSON I., BILLIALD P., AUBREY N.. Diabody Mixture Providing Full Protection against Experimental Scorpion Envenoming with Crude *Androctonus australis* Venom. **The journal of biological chemistry**, v. 287, p. 14149–14156, abr. 2012

ESPINO-SOLIS G.P., *et al.* Antidotes against venomous animals: State of the art and perspectives. **Journal of Proteomics**, v. 72, p. 183-199, mar. 2009.

FELICORI, L., *et al.* Functional characterization and epitope analysis of a recombinant dermonecrotic protein from *Loxosceles intermedia* spider. **Toxicon**, v. 48, p. 509-519, 2006.

FELICORI, L., *et al.* An *in vivo* protective response against toxic effects of the dermonecrotic protein from *Loxosceles intermedia* spider venom elicited by synthetic epitopes. **Vaccine**, v. 27, p. 4201-4208, 2009.

FIELDS, C., O'CONNELL, D., XIAO, S., LEE, G. U., BILLIALD, P., & MUZARD, J. Creation of recombinant antigen-binding molecules derived from hybridomas secreting specific antibodies. **Nature Protocols**, vol. 8, n. 6, p. 1125–1148, 2013.

FUKUSHIMA, C. S., ANDRADE, R. M. G., BERTANI, R. Two new Brazilian species of *Loxosceles* Heineken & Lowe, 1832 with remarks on *amazonica* and *rufescens* groups (Araneae, Sicariidae). **ZooKeys**, v. 667, p. 67–94, 2017.

GARCÍA-FRAGA, B., DA SILVA, A. F., LÓPEZ-SEIJAS, J., SIEIRO, C. Optimizes expression conditions for enhancing production of two recombinant chitinolytic enzymes from different prokaryote domains. **Bioprocess Biosyst Eng**, out. 2015. DOI 10.1007/s00449-015-1485-5

GOMEZ H.F.; KRYWKO D.M.; STOECKER W.V.. A New Assay for the Detection of *Loxosceles* Species (Brown Recluse) Spider Venom. **Annals of emergency medicine**, v. 39, p. 469-474, mai. 2002.

GREMSKI, L. H., *et al.* A novel expression profile of the *Loxosceles intermedia* spider venomous gland revealed by transcriptome analysis. **Molecular BioSystems**, v. 6, n.12, p. 2403-2416, 2010.

GREMSKI L. H., et al. Recent advances in the understanding of brown spider venoms: From the biology of spiders to the molecular mechanisms of toxins.

Toxicon, v. 83, p. 91-120, 2014.

HORTA, C. C. R., et al. “Lysophosphatidic Acid Mediates the Release of Cytokines and Chemokines by Human Fibroblasts Treated with *Loxosceles* Spider Venom.”

The Journal of investigative dermatology, v. 133, p. 1682–85, 2013.

ISBISTER, G. K.; FAN, H. W.. Spider bite. **Lancet**, v. 378, p. 2039–2047, 2011.

JIACOMINI I., et al. Immunodetection of the “brown” spider (*Loxosceles intermedia*) dermonecrotin with an scFv-alkaline phosphatase fusion protein. **Immunology Letters**, v. 173, p. 1-6, 2016.

JIACOMINI, I., G. **PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO IMUNOQUÍMICA DE ANTICORPOS ANTITOXINAS LOXOSCELICAS**. Monografia, 2017.

KALAPOTHAKIS, E., et al. Molecular cloning, expression and immunological properties of LiD1, a protein from the dermonecrotic family of *Loxosceles intermedia* spider venom. **Toxicon**, v. 40, p. 1691-1699, 2002.

KALAPOTHAKIS, E., et al. The Loxtox protein family in *Loxosceles intermedia* (Mello-Leitão) venom. **Toxicon**, v. 50, p. 938-946, 2007.

KARIM-SILVA, S. **Construção e caracterização de um *diabody* específico contra toxinas do veneno de *Loxosceles intermedia***. Dissertação (Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2016.

KARIM-SILVA, S., et al.. Generation of recombinant antibody fragments with toxin-neutralizing potential in loxoscelism. **Immunology Letters**, v. 176, p. 90-96, 2016.

KIM, Y. P., et al. Effective Therapeutic Approach for Head and Neck Cancer by an Engineered Minibody Targeting the EGFR Receptor. **PLoS ONE**, v. 9, e113442, 2014.

KRYWKO D. M.; GOMEZ H. F.. Detection of *Loxosceles* Species Venom in Dermal Lesions: A Comparison of 4 Venom Recovery Methods. **Annals of emergency medicine**, v. 39, p. 475-480, mai. 2002.

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

LAUSTSEN, A. H. et al. Biotechnological trends in spider and scorpion antivenom development. **Toxins**, v. 8, p. 226, jul. 2016.

LEE, C-H., et al. Single Chain Antibody Fragment against Venom from the Snake *Daboia russelii formosensis*. **Toxins**, v. 9, n. 11, p. 347, out. 2017.

LIMA, S. A., et al. Recombinant Protein Containing B-Cell Epitopes of Different *Loxosceles* Spider Toxins Generates Neutralizing Antibodies in Immunized Rabbits. **Front. Immunol**, v. 9, art. 653, 2018.

LIU, H., MAY, K. Disulfide bond structures of IgG molecules. **mAbs**, v. 4, p. 17–23, 2012.

LOVRECEK, D.; TOMIC, S.. A Century of Antivenom. **Coll. Antropol.**, v. 35, p. 249–258, 2011.

LUCATO, R. V., et al. *Loxosceles gaucho* Venom-Induced Acute Kidney Injury – In Vivo and In Vitro Studies. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, e1182, maio, 2011.

MARQUES-DA-SILVA, E.; FISCHER M. L.. Distribuição das espécies do gênero *Loxosceles* Heineken & Lowe, 1835 (Araneae; Sicariidae) no Estado do Paraná. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, p. 331-335, jul/ago. 2005.

McGLASSON D.L., et al.. Duration of *Loxosceles reclusa* Venom Detection by ELISA from Swabs. **Clin Lab Sci**, v. 22, p. 216-22, 2009.

MOUSLI, M., *et al.* A recombinant single-chain antibody fragment that neutralizes toxin II from the venom of the scorpion *Androctonus australis hector*. **FEBS Lett**, v.442, p.183-188, jan. 1999.

MUZARD, J., *et al.* Grafting of protein L-binding activity onto recombinant antibody fragments. **Analytical Biochemistry**, v. 388, p. 331-338, 2009.

NOVAGEN 2002-2003 CATALOG. Protein expression, procariotic expression, pET system tutorial. p. 88-82.

OCAÑAS, L. G., MIFUJI, R. M. Cutaneous Loxoscelism. **New England Journal of Medicine**, n. 369, v. 5, e6, 2013.

OLAFSEN, T., *et al.* Characterization of engineered anti-p185HER-2 (scFv-CH3)₂ antibody fragments (minibodies) for tumor targeting. **Protein Engineering Design and Selection**, v. 17, p. 315–323, 2004.

OLIVEIRA C.Z.. Caracterização funcional e estrutural de inibidores de fosfolipases A2 isolados do plasma de serpente *Bothrops jararacussu*. 2009. **Tese de Doutorado** - Universidade de São Paulo (USP). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto Ribeirão Preto.

PAULI, I., *et al.* The efficacy of antivenom in loxoscelism treatment. **Toxicon**, v. 48, p. 123-137, 2006.

PAULI, I., *et al.* Analysis of therapeutic benefits of antivenin at diferente time intervals after experimental envenomation in rabbits by venom of the brown spider (*Loxosceles intermedia*). **Toxicon**, v. 53, p. 660-671, 2009.

PINTO, L. R. **Loxoscelismo em Curitiba: uma abordagem geográfica**. Dissertação (Mestrado em Geografia) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

QIU, J., QIU, T., HUANG, Y., CAO, Z. Identifying the Epitope Regions of Therapeutic Antibodies Based on Structure Descriptors. **Int. J. Mol. Sci**, v. 18, 2457, 2017.

RAMADA, J. S. **Desenvolvimento de ensaio *in vitro* para avaliar a potência neutralizante de soro antiloxoscélico de uso terapêutico**. Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

RAMADA, J. S. *et al.* Synthetic peptides for in vitro evaluation of the neutralizing potency of *Loxosceles* antivenoms. **Toxicon**, v. 73, p. 47-55, 2013.

RAMOS, R. F. M., *et al.* Acidente loxoscélico. **Revista da AMRIGS**, v. 59, p. 134-139, abr/jun. 2015.

RAVAL, R., SIMSA, R., RAVALL, K. Expression studies of *Bacillus licheniformis* chitin deacetylase in *E. coli* Rosetta cells. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 104, p. 1692-1696, 2017.

RIBEIRO, R. O. S., *et al.* Biological and structural comparison of recombinant phospholipase D toxins from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. **Toxicon**, v. 50, p. 1162-1174, 2007)

RIVERA, I., ORDOÑEZ, M., PRESA, N., GOMEZ-LARRAURI, A., SIMÓN, J., TRUEBA, M., GOMEZ-MUNÓZ, A. Sphingomyelinase D/Ceramide 1-Phosphate in Cell Survival and Inflammation. **Toxins**, v. 7, p. 1457-1466, 2015.

RODRIGO G., GRUVEGÅRD M., ALSTINE J.M.V.. Antibody fragments and their purification by protein L affinity chromatography. **Antibodies**, v. 4, p. 259-277, 2015.

RONCOLATO, E.C., *et al.* Human antibody fragments specific for *Bothrops jararacussu* venom reduce the toxicity of other *Bothrops* sp. venoms. **J. Immunotoxicol**, v. 10, p. 160–168, 2013.

SILVA, P. H., *et al.* Brown spiders and loxoscelism. **Toxicon**, v. 44, p. 693-709, 2004.

SPADIUT, O., CAPONE, S., KRAINER, F., GLIEDER, A., HERWIG, C.. Microbials for the production of monoclonal antibodies and antibody fragments. **Trends in Biotechnology**, v. 32, p. 54-60, jan. 2014.

SPRIESTERSBACH, A., et al. Purification of His-tagged proteins. In: **Methods in Enzymology**. Hilden, Germany: Elsevier Inc., p. 15. 2014.

SORO ANTIARACNÍDICO (*LOXOSCELES* e *PHONEUTRIA*) E ANTIESCORPIÔNICO: solução. Responsável técnico Ivone Kazuko Yamaguchi. Butantã: Instituto Butantã, 2012. 1 bula de remédio. Disponível em: <<http://www.butantan.gov.br/Documents/soro-antiaracn%C3%ADdico-e-escorpi%C3%B4nico.pdf>>. Acesso em: 6 ago. 2018.

SORO ANTILOXOSCÉLICO POLIESPECÍFICO: solução. Responsável técnico Takako Miyawaki. Piraquara: Centro de Produção e Pesquisas de Imunobiológicos – C.P.P.I., 2008. 1 bula de remédio. Disponível em: <<http://www.saude.pr.gov.br/arquivos/File/CPPI/bulas/loxos.pdf>>. Acesso em: 6 ago. 2018.

SWANSON, D. L.; VETTER, R. S. Loxoscelism. **Clinics in Dermatology**, v.21, p. 213-221, 2006.

TAMBOURGI, D.V., MORGAN, B.P., de ANDRADE, R.M.G., MAGNOLI, F.C., Van Den BERG, C.W. *Loxosceles intermedia* spider envenomation induces activation of an endogenous metalloproteinase, resulting in cleavage of glycophorins from the erythrocyte surface and facilitating complement-mediated lysis. **BLOOD**, v.95, p. 683-691, 2000.

TAMBOURGI D.V., GONÇALVES-DE-ANDRADE R.M., VAN DEN BERG C.W. Loxoscelism: From basic research to the proposal of new therapies. **Toxicon**, v. 56, p. 1113–1119, 2010.

VAN MEETEREN, L. A., et al. Spider and Bacterial Sphingomyelinases D Target Cellular Lysophosphatidic Acid Receptors by Hydrolyzing Lysophosphatidylcholine. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, 10833–10836, 2004.

VEIGA, S. S., et al. Identification of high molecular weight serine-proteases in *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. **Toxicon**, v. 38, p. 825-839, 2000.

VETTER, R. S. Spiders of the genus *Loxosceles* (Araneae, Sicariidae): a review of biological, medical and psychological aspects regarding envenomations. **Journal of Arachnology**, v. 36, p. 150-163, 2008.

WASSERMAN, G. S.; ANDERSON, P. C.. Loxoscelism and necrotic arachnidism. **J. Toxicol. - Clin. Toxicol.**, n. 21, v. 4-5, p. 451-472, 1983-1984.

WILLE, A. C. M., et al. Modulation of membrane phospholipids, the cytosolic calcium influx and cell proliferation following treatment of B16-F10 cells with recombinant phospholipase-D from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. **Toxicon**, v. 67, p. 17–30, 2013.

WOLFART, S. C., CHENET, D. C., QUADROS, R. M., FERRUZZI, P., MARQUES, S. M. T. Epidemiologia de acidentes araneídeos de interesse em Saúde Pública em Curitiba, Santa Catarina (2006-2008). **Revista Ciência & Saúde**, v. 2, n. 1, p. 30-36, jan./jun. 2009.

WORLD SPIDER CATALOG. World Spider Catalog. Version 19.5. Natural History Museum Bern. Disponível em: <<http://wsc.nmbe.ch>>. Acesso em: 12 nov 2018.

ZAHID M., et al.. Design and reshaping of an scFv directed against human platelet glycoprotein VI with diagnostic potential. **Analytical Biochemistry**, v. 417, p. 274–282, 2011.