



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

SABRINA KARIM SILVA

LOXOSCELISMO: AVANÇOS E DESAFIOS NO DESENHO DE FRAGMENTOS DE  
ANTICORPOS COM POTENCIAL TERAPÊUTICO

CURITIBA

2019

SABRINA KARIM SILVA

LOXOSCELISMO: AVANÇOS E DESAFIOS NO DESENHO DE FRAGMENTOS DE  
ANTICORPOS COM POTENCIAL TERAPÊUTICO

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do título de doutora em microbiologia, parasitologia e patologia ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Larissa Magalhães Alvarenga

Co-Orientadoras: Prof<sup>a</sup> Dra. Alessandra Becker Finco; Prof<sup>a</sup> Dra. Juliana Ferreira de Moura

Área de concentração: Patologia

CURITIBA

2019

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas  
Biblioteca de Ciências Biológicas  
(Carla Fabiane Rasmussen - CRB/9-940)

Silva, Sabrina Karim.

Loxoscelismo: avanços e desafios no desenho de fragmentos de anticorpos com potencial terapêutico. / Sabrina Karim Silva. – Curitiba, 2019. 108 p.: il. ; 30cm.

Orientadora: Larissa Magalhães Alvarenga.

Coorientadora: Alessandra Becker Finco.

Coorientadora: Juliana Ferreira de Moura.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

1. Imunoglobulinas. 2. Imunologia. 3. Loxosceles. I. Título. II. Alvarenga, Larissa Magalhães. III. Finco, Alessandra Becker. IV. Moura, Juliana Ferreira de. V. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

CDD (20. ed.) 616.079



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MICROBIOLOGIA,  
PARASITOLOGIA E PATOLOGIA - 40001016044P0

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em MICROBIOLOGIA, PARASITOLOGIA E PATOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **SABRINA KARIM SILVA** intitulada: **Loxoscelismo: Avanços e desafios no desenho de fragmentos de anticorpos com potencial terapêutico**, sob orientação da Profa. Dra. **LARISSA MAGALHÃES ALVARENGA**, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação no rito de defesa. A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 28 de Novembro de 2019.

  
LARISSA MAGALHÃES ALVARENGA  
Presidente da Banca Examinadora

  
LUIS FELIPE MINOZZO FIGUEIREDO  
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ)

  
JOÃO CARLOS MINOZZO  
Avaliador Externo (PONTIFICA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ)

  
SILVIO MARQUES ZANATA  
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

  
BRENO CASTELLO BRANCO BEIRÃO  
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)



*À Deus por ser meu melhor amigo em todas  
as horas e nunca ter saído do meu lado.*

*“A persistência é o menor caminho do êxito”.*

*Charles Chaplin*

## AGRADECIMENTOS

À professora **Larissa**, minha orientadora, que no decorrer desses anos nos tornamos muito próximas uma da outra, formando um elo de carinho, amizade, compreensão e respeito. Professora Larissa, obrigada por acreditar, confiar em mim, ter tido paciência nesses anos e por ter contribuído imensamente para meu crescimento profissional e pessoal.

À minha co-orientadora, professora **Juliana**, pelo apoio, carinho, confiança e por compartilhar opiniões e conhecimento.

À minha co-orientadora, amiga, irmã, **Alessandra Becker Finco**. Lembro-me do primeiro dia no lab, você me ensinando e fazendo eu me apaixonar pela pesquisa. Os cafezinhos, as discussões, os puxões de orelha necessários para me tornar quem eu sou hoje. Por não me deixar desistir e estar comigo até o último segundo. Não tem palavras para eu descrever a sua importância na minha vida.

Ao professor **Billiald**, por todo o apoio, parceria, discussão dos experimentos e resultados, pelo carinho.

Ao professor, amigo **João Carlos Minozzo**. Professor é uma honra tê-lo na minha vida. Você é um exemplo de pessoa para o mundo, com sua bondade, humanidade, dedicação e carinho no que faz. Obrigada por estar ao meu lado, por contribuir com meu aprendizado, por torcer por mim e por ser meu amigo.

À minha **mãezinha**, meu alicerce, um exemplo de vida. Mãe se eu consegui é porque sou sua filha batalhadora, persistente que não desiste fácil.

Ao meu **paizinho** que me ensinou o que é amor e que ele não tem distância mesmo. Pai, o seu abraço é o melhor do mundo.

Aos meus irmãos **Alex, Sam e Sara; meus sobrinhos e minha Cunha Taty** que me apoiaram e entenderam os momentos que não pude estar com eles. Vocês torceram até o final, obrigada.

À você, meu amigo, “namorado”, “noivo” e futuro esposo (**Roberto Mota**), pelas orações, por estar ao meu lado e fazer uma transformação na minha vida só por estar nela.

À minha amiga, **Fátima**, eu não tenho palavras, pois o amor fala tudo né. Obrigada minha amiga, você é um presente de Deus que quero e preciso para toda minha vida.

À minha amiga, **Evanerose**, que não desistiu de mim e que nesse último ano estivemos juntas, apoiando uma à outra. Obrigada por torcer por mim.

Às lindas do Limq, **Isabel, Ale, Carla, Rafa, Michele, Maíra, Juliana, Camila**...meninas, nossas conversas, nossos desabafos, nossos encontros foram essenciais... Belzinha ficamos juntas até o fim hein...obrigada por estar em minha vida.

À todos que passaram pelo laboratório de imunquímica....**Guilherme** meu amigo Chileno..desculpa, Colombiano...kkk.....

À aluna de doutorado **Isabella**, por ter auxiliado na escrita do artigo e com os resultados de *docking*.

Aos **ICs** (alunos de iniciação científica, desculpa não citar o nome de todos, mas seria injusta se esquecesse de alguém) que nos ensinam a ensinar vocês, mas principalmente minha aluna **Sarah Moretto** que é um orgulho para mim, você foi um anjo que apareceu na minha vida para me ajudar na etapa final.

Ao meu amigo **Luís Felipe Minozzo**, por anos de amizade e por me ensinar a ser mais e mais perfeccionista...kkk

Ao meu amigo, braço direito, nosso técnico do laboratório, **Fabio Gaia**. Fabio, não tenho palavras para agradecer o carinho e os socorros que me fez...muito obrigada mesmo.

Ao **José**, nosso Nicaraguense, uma pessoa maravilhosa que conheci, com um coração gigantesco e ideias maiores ainda. Obrigada por me socorrer diversas vezes, por me ensinar, por ter tido paciência comigo.

À todos os **alunos da pós graduação** do programa de patologia básica que me ajudaram de forma direta ou indireta na realização desse trabalho, mas principalmente aos alunos do laboratório de nefrologia e neurobiologia.

À todos os **laboratórios e professores** do Setor de Ciências Biológicas que contribuíram na realização desse trabalho.

À **Fiocruz/Curitiba**, principalmente à Flavia Carneiro, por me ajudar na cromatografia e nas discussões dos resultados.

Aos meus **colegas de trabalho** que estiveram comigo nas madrugadas do HC das Clínicas. Mas principalmente as minhas amigas Helen e Edna, vocês são especiais de mais na minha vida, obrigada por cuidarem de mim.

Aos professores **Breno Beirão, Carlos Chavez, Luís Minozzo e João Minozzo** por terem aceitado fazer parte desse momento final, contribuindo na finalização dessa etapa da pesquisa.

À todos aqueles que direta ou indiretamente participaram dessa pesquisa, foram muitos, então desculpa se esqueci de citar o nome de alguém.

Ao **Programa de Pós Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia** e todos os professores do mesmo que se dedicam e tornam possível a realização desse trabalho.

Ao **CPPI** – Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiologia pelos soros, venenos, por apoiar e incentivar a pesquisa no Brasil.

Às agências de fomento: **CAPES** (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), **CNPq** (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) por contribuírem com a pesquisa do nosso país.

À **UFPR** por ter propiciado que a realização desse trabalho fosse possível.

À **vida**, pela oportunidade que me deu de passar pelo Laboratório de Imunoquímica (Limq), e, durante esses meros quase 9 anos ter conhecido pessoas maravilhosas que marcaram e me transformaram na pessoa que sou hoje, muito obrigada!



## RESUMO

Envenenamento por aranhas do gênero *Loxosceles spp.* (loxoscelismo) é um problema de saúde pública no Brasil, com mais de 6.000 casos por ano. O acidente é caracterizado por lesões dermonecroticas e/ou sistêmicas que, se não tratado de forma correta pode levar a sérios prejuízos inclusive a morte. O tratamento específico é baseado na administração do soro antiloxoscélico ou antiaracnídico. A produção do soro foi descrita há mais de um século e, apesar de eficaz trata-se de um método laborioso, que apresenta limitações importantes como a necessidade de altas quantidades de venenos brutos como imunógenos para os cavalos, o emprego de um grande número de animais, e seu uso pode implicar em reações adversas, dada a natureza heteróloga das imunoglobulinas. Atualmente, tem-se estudado o emprego de fragmentos de anticorpos recombinantes na terapia em diversas áreas da saúde humana, inclusive para envenenamento por serpentes e escorpiões. Fragmentos como scFv, *diabody*, *minibody* possuem baixa massa molecular, rápida difusão no tecido, estabilidade e são eficazes na neutralização, além de produzidos por diferentes sistemas de expressão. Nesse trabalho foram produzidos fragmentos de anticorpos humanizados que tiveram como *template* o monoclonal murino anti *Loxosceles intermedia*, LimAb7. A primeira geração de fragmentos produzidos, scFv<sub>15h</sub>Li7, manteve o perfil de reconhecimento da molécula de origem; porém, não foi capaz de neutralizar a atividade hemolítica *in vitro* do veneno. Tendo em vista que, a molécula parental liga-se próximo ao sítio ativo e, dessa forma poderia ocasionar impedimento estérico, foi inserida uma sequência que codifica CH3 a fim de aumentar o tamanho do fragmento. O *minibody* (scFv<sub>15h</sub>-C<sub>H</sub>3Li7) apresentou resultados mais promissores que o formato de scFv, mas manteve-se instável e com baixo rendimento de produção. As análises da sequência da primeira geração por *docking* sugeriram um deslocamento na interação com o antígeno e, com isso foram realizadas duas mutações reversas dando origem a segunda geração de fragmentos, scFv<sub>15h</sub>li7m e scFv<sub>5h</sub>Li7m (*diabody*). O scFv<sub>5h</sub>Li7m foi capaz de reconhecer o veneno e neutralizar os efeitos hemolíticos dependente ou não do sistema complemento, mesmo em concentrações altas da toxina; considerado então, promissor no tratamento de loxoscelismo.

Palavras chave: humanização de anticorpos, anticorpos recombinantes, *Loxosceles*, envenenamento.

## ABSTRACT

Poisoning by *Loxosceles spp.* spiders (loxoscelism) is a public health problem in Brazil, with over 6,000 cases per year. The accident is characterized by dermonecrotic and / or systemic lesions that, if not treated correctly, can lead to serious damage including death. Specific treatment is based on administration of antiloxosceles or antiarachnid serum. Serum production has been described for over a century and, although effective, is a laborious method that has important limitations such as the need for high amounts of crude poisons as immunogens for horses, the use of a large number of animals, and their use may lead to adverse reactions given the heterologous nature of immunoglobulins. Currently, the use of recombinant antibody fragments in therapy in various areas of human health, including snake and scorpion poisoning, has been studied. Fragments such as scFv, diabody, minibody have low molecular mass, fast tissue diffusion, stability and are effective in neutralizing, and produced by different expression systems. In this work humanized antibody fragments having the murine monoclonal anti *Loxosceles intermedia*, LimAb7 as a template were produced. The first generation of fragments produced, scFv<sub>15h</sub>Li7, maintained the recognition profile of the source molecule, but was unable to counteract the in vitro hemolytic activity of the venom. Since the parent molecule binds near the active site and could thus cause steric hindrance, a sequence encoding CH3 was inserted to increase fragment size. The minibody (scFv<sub>15h</sub>-C<sub>H</sub>3Li7) showed more promising results than the scFv format, but remained unstable and with low yield. First generation sequence analysis by docking suggested a shift in interaction with the antigen, and two reverse mutations were performed, resulting in the second generation of fragments, scFv<sub>15h</sub>li7m and scFv<sub>5h</sub>Li7m (diabody). scFv<sub>5h</sub>Li7m was able to recognize the poison and neutralize the hemolytic effects dependent or not on the complement system, even at high toxin concentrations; considered promising in the treatment of loxoscelism.

Keywords: humanization of antibodies, recombinant antibodies, *Loxosceles*, poisoning.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: CARACTERÍSTICAS DA <i>Loxosceles intermedia</i> .....	23
FIGURA 2: ANÁLISE DOS COMPONENTES DO VENENO DE <i>Loxosceles spp.</i> ....	23
FIGURA 3: FOSFOLIPASE D .....	25
FIGURA 4: LOXOSCELISMO .....	28
FIGURA 5: DESVANTAGENS DE ANTIVENENOS PROVENIENTES DE MOLÉCULAS HETERÓLOGAS. ....	33
FIGURA 6: VISTA ESQUEMÁTICA DE DIFERENTES FORMATOS DE ANTICORPOS POLICLONAIS ANTIVENENOS DERIVADOS DO PLASMA. ....	35
FIGURA 7: FRAGMENTOS DE ANTICORPOS RECOMBINANTES.....	37
FIGURA 8: FRAGMENTO ÚNICO DE CADEIA VARIÁVEL.....	38
FIGURA 9: FRAGMENTO RECOMBINANTE, <i>MINIBODY</i> .....	39
FIGURA 10: FARMACOCINÉTICA DO ANTIVENENO.....	40
FIGURA 11: EXEMPLO DE UM DOMÍNIO VARIÁVEL DE ANTICORPO.....	41
FIGURA 12: RESUMO ESQUEMÁTICO DAS ESTRATÉGIAS ABORDADAS PARA ENGENHARIA DE ANTICORPOS.....	42
FIGURA 13: DESENHO DA SEGUNDA GERAÇÃO DE FRAGMENTOS DE ANTICORPOS, scFv <sub>15</sub> hLi7m. ....	48
FIGURA 14: ALINHAMENTO E ESTRUTURAS DOS DOMÍNIOS VARIÁVEIS DO LimAb7 HUMANIZADO.....	59
FIGURA 15: DESENHO, EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DO scFv <sub>15</sub> hLi7.....	62
FIGURA 16: CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DO scFv <sub>15</sub> hLi7.....	64
FIGURA 17: <i>DOCKING</i> DO LimAb7, scFv <sub>15</sub> hLi7 COM A RECOMBINANTE Lid1.....	66
FIGURA 18: <i>MINIBODY</i> scFv <sub>15</sub> -C <sub>H</sub> 3hLi7.....	67
FIGURA 19: CARACTERIZAÇÃO IMUNOQUÍMICA E FUNCIONAL DO scFv <sub>15</sub> - C <sub>H</sub> 3hLi7 ( <i>MINIBODY</i> ).....	69
FIGURA 20: REDESENHO DO GENE PARA O FRAGMENTO DE ANTICORPO HUMANIZADO COM A MUTAÇÃO REVERSA. ....	71
FIGURA 21: CLONAGEM E AMPLIFICAÇÃO DOS GENES CODIFICANTES PARA OS FRAGMENTOS HUMANIZADOS APÓS MUTAÇÃO REVERSA scFv <sub>15</sub> hLi7m e scFv <sub>5</sub> hLi7m. ....	73
FIGURA 22: PCR DE COLÔNIA DAS CEPAS DE EXPRESSÃO.....	74
FIGURA 23: ELISA DIRETO DO EXTRATO PERIPLASMÁTICO DAS CEPAS DE EXPRESSÃO DO scFv <sub>15</sub> hLi7m e scFv <sub>5</sub> hLi7m.....	76
FIGURA 24: VALIDAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS FRAGMENTOS scFv <sub>15</sub> hLi7m e scFv <sub>5</sub> hLi7m. ....	79
FIGURA 25: ENSAIO DE NEUTRALIZAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA <i>IN</i> <i>VITRO</i> .....	80

## ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1: NOTIFICAÇÕES DE ACIDENTES POR ARANHAS NO BRASIL NO PERÍODO ENTRE 2007 A 2016.....	22
TABELA 2: TRATAMENTO PROPOSTO PELO MINISTÉRIO DA SAÚDE PARA ACIDENTES CAUSADOS POR ARANHAS DO GÊNERO LOXOSCELES. ....	31
TABELA 3: REAÇÃO DE PCR EM COLÔNIA.....	50
TABELA 4: ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE AS SEQUENCIAS DAS REGIÕES VARIÁVEIS MURINAS DO ANTICORPO LimAb7 E AS SEQUÊNCIAS MODIFICADAS APÓS HUMANIZAÇÃO COM SEQUENCIAS DAS LINHAGENS GERMINATIVAS HUMANA. ....	60
TABELA 5: DADOS DA MODELAGEM <i>IN SILICO</i> . ....	65
TABELA 6: ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE AS SEQUÊNCIAS DAS REGIÕES VARIÁVEIS MURINAS DO ANTICORPO LimAb7 COM AS HUMANIZADAS ANTES E APÓS MUTAÇÃO REVERSA.....	71



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	16
1.1 CONTEXTO E PROBLEMA .....	16
1.2 OBJETIVOS .....	19
1.2.1 Objetivo Geral .....	19
1.2.2 Objetivos Específicos .....	19
1.3 JUSTIFICATIVA .....	19
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	21
2.1 EPIDEMIOLOGIA .....	21
2.2 ARANHAS DO GÊNERO <i>Loxosceles</i> .....	22
2.2.1 Características gerais .....	22
2.2.2 Composição do veneno .....	23
2.2.3 Efeitos biológicos do veneno .....	26
2.3 ACIDENTES CAUSADOS POR ARANHAS DO GÊNERO <i>LOXOSCELES</i> .....	27
2.3.1 Loxoscelismo .....	27
2.3.2 Diagnóstico .....	29
2.3.3 Tratamento .....	30
2.4 ANTICORPOS RECOMBINANTES .....	35
2.4.1 Fragmentos de anticorpos .....	35
2.4.2 Humanização de anticorpos .....	40
<b>3 METODOLOGIA</b> .....	45
3.1 VENENOS E ANTICORPOS .....	45
3.2 DESENHO E OBTENÇÃO DOS FRAGMENTOS DE ANTICORPOS RECOMBINANTE HUMANIZADOS PROVENIENTE DO LimAb7 .....	45
3.2.1 Primeira geração de fragmentos de anticorpos, scFv <sub>15</sub> hLi7 .....	45
3.2.2 scFv <sub>15</sub> -C <sub>H</sub> 3hLi7 ( <i>minibody</i> ) .....	46
3.2.3 Fragmentos após mutação reversa: scFv <sub>15</sub> hLi7m e scFv <sub>5</sub> hLi7m .....	47
3.2.3.1 Segunda geração de fragmentos de anticorpos, scFv <sub>15</sub> hLi7m .....	47
3.2.3.2 Segunda geração de fragmentos de anticorpos, scFv <sub>5</sub> hLi7m ( <i>diabody</i> ) .....	49
3.2.3.3 Expressão do scFv <sub>15</sub> hLi7m e scFv <sub>5</sub> hLi7m ( <i>diabody</i> ) .....	50
3.3 PURIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS .....	51
3.3.1 scFv <sub>15</sub> -C <sub>H</sub> 3hLi7 ( <i>minibody</i> ) .....	51
3.3.2 scFv <sub>15</sub> hLi7m e scFv <sub>5</sub> hLi7m ( <i>diabody</i> ) .....	52

3.4 CARACTERIZAÇÃO DOS FRAGMENTOS RECOMBINANTES .....	53
3.4.1 Ensaio Imunoenzimático (ELISA).....	53
3.4.1.1 ELISA direto .....	53
3.4.1.2 ELISA sanduíche.....	53
3.4.1.3 ELISA de competição .....	53
3.4.2 SDS-PAGE e <i>Imunoblotting</i> ( <i>dot blot</i> , <i>western blot</i> ) .....	54
3.5 CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO POR TAMANHO.....	55
3.6 MODELAGEM E ENCAIXE MOLECULAR (DOCKING).....	55
3.7 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE NEUTRALIZAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA .....	56
<b>4 RESULTADOS</b> .....	<b>58</b>
4.1 DESENHO, CONSTRUÇÃO E ANÁLISE ESTRUTURAL DO FRAGMENTO DE ANTICORPO RECOMBINANTE SCFV <sub>15</sub> HLI7, PRIMEIRA GERAÇÃO, PROVENIENTE DO MONOCLONAL LIMAB7 .....	58
4.2 CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DO FRAGMENTO DE ANTICORPO SCFV <sub>15</sub> HLI7.....	62
4.3 MODELAGEM E DOCKING DO FRAGMENTO DE ANTICORPO SCFV <sub>15</sub> HLI7 .....	64
4.4 MINIBODY-SCFV <sub>15</sub> -C <sub>H</sub> 3HLI7 - DESENHO, CONSTRUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO FRAGMENTO DE ANTICORPO RECOMBINANTE. ....	66
4.7 CARACTERIZAÇÃO IMUNOQUÍMICA E FUNCIONAL DOS FRAGMENTOS SCFV <sub>15</sub> HLI7M E SCFV <sub>5</sub> HLI7M.....	77
4.8 POTENCIAL DE NEUTRALIZAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA <i>IN VITRO</i> DOS DIFERENTES FRAGMENTOS PRODUZIDOS.....	79
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	<b>81</b>
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	<b>89</b>
<b>7 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>90</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>91</b>
<b>ANEXO 1 – INTERAÇÕES ENTRE OS RESÍDUOS DE AMINOÁCIDOS DOS ANTICORPOS E rLID1.....</b>	<b>103</b>
<b>ANEXO 2 – MAPA PLASMÍDEO pSW .....</b>	<b>104</b>
<b>ANEXO 3 – ARTIGO PUBLICADO 2018 .....</b>	<b>104</b>
<b>ANEXO 4 – ARTIGO PUBLICADO 2018 .....</b>	<b>106</b>

<b>ANEXO 5 – ARTIGO SUBMETIDO EM OUTUBRO 2019.....</b>	<b>104</b>
<b>ANEXO 6 – ARTIGO EM REVISÃO PARA SUBMISSÃO.....</b>	<b>105</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 CONTEXTO E PROBLEMA

Acidentes com aranhas estão entre os maiores problemas de saúde pública no mundo, e, o envenenamento por esses animais ainda é considerado doença tropical negligenciada. Dentre as mais de 44.000 espécies de aranhas, as do gênero *Loxosceles* podem levar prejuízo a humanos (LAUSTSEN et al., 2016; DIAS-LOPES et al., 2018). *Loxosceles spp.* estão distribuídas em todo o mundo, com aproximadamente 130 espécies. No Brasil, *Loxosceles intermedia*, *Loxosceles gaucho* e *Loxosceles laeta* são uma preocupação médica particular, pois entre 2007 a 2016 foram registrados mais de 80 mil casos, sendo 90% notificados no estado do Paraná. Dentre todos os componentes do veneno das numerosas espécies de *Loxosceles*, a Fosfolipases D (30-35 KDa) é a principal responsável pelos efeitos deletérios. O loxoscelismo é resultado do envenenamento por *Loxosceles spp.*, que pode apresentar sintomas cutâneos (eritema, edema, dermonecrose) ou cutâneo-viscerais (hemólise, insuficiência renal, coagulopatia). O tratamento específico disponível é a soroterapia (produzida no Brasil, Peru e México), mas em alguns casos o corticóide pode ser administrado. Nos países onde não há o soro, o antibiótico dapsona é comumente prescrito; embora não haja consenso sobre a eficácia dessa terapia inespecífica (OLAFSEN et al., 2004)

Existem, no mercado mundial, 10 soros utilizados para tratamento de acidentes por aranhas, sendo todos produzidos a partir da hiperimunização de equinos, segundo recomendações da Organização Mundial da Saúde (OMS). Embora, esses soros sejam efetivos, sua produção leva ao prejuízo dos animais, além de conter moléculas heterólogas que podem causar efeitos adversos, pois apenas uma pequena porcentagem (menos de 5%) corresponde a anticorpos capazes de neutralizar as toxinas do veneno (ALVARENGA et al., 2014; LAUSTSEN et al., 2018). A produção do soro antiloxoscélico é laboriosa, necessitando da captura de uma grande quantidade de aranha para obtenção do veneno e imunização do cavalo (DUARTE et al., 2015).

Conseqüentemente, essas moléculas heterólogas podem induzir reações anafiláticas mediadas por IgE ou mais comumente por meio de ativação do complemento (LAUSTSEN et al., 2016, 2018). Levando em consideração as



desvantagens da administração do soro, o alto custo de produção - variando de acordo com o sistema imunológico do animal - e a dificuldade em obter o antígeno, é necessário o desenvolvimento inovador de novas terapias. Pesquisas têm sido propostas para imunização com epítopos sintéticos e toxinas recombinantes, eliminando a necessidade de usar animais para obter seus venenos. No entanto, essas novas propostas de imunização ainda implicam no emprego de moléculas heterólogas. Para diminuir a imunogenicidade e facilitar a produção foram desenvolvidos anticorpos e fragmentos recombinantes compatíveis com os sistemas imunológicos humanos, proporcionando uma terapia mais segura, eficaz e otimizada (LAUSTSEN et al., 2018).

Uma vez que alguns venenos podem ter componentes com efeitos deletérios distintos ou apresentar um sinergismo entre as diferentes toxinas, acredita-se que uma produção de anticorpos recombinantes à base de mistura apresente maior eficácia. Numerosos formatos de anticorpos podem ser desenvolvidos e ainda não existe um modelo ideal para o tratamento de envenenamentos, mas os estudos atuais sugerem o emprego de anticorpos recombinante como alternativa às terapias clássicas (DUARTE et al., 2015, LAUSTEN et al., 2016, 2018).

O anticorpo monoclonal LimAb7, previamente produzido, apresenta capacidade de reconhecer e neutralizar os efeitos tóxicos de *Loxosceles intermedia*, conforme demonstrado *in vivo* (ALVARENGA et al., 2003). A partir da clonagem, é possível construir fragmentos de anticorpos com propriedades farmacocinéticas e meia-vida otimizada. O tamanho reduzido do fragmento aumenta a taxa de difusão, a penetrabilidade do tecido e a biodistribuição enquanto diminui a imunogenicidade. Uma vez que as toxinas são rapidamente absorvidas e distribuídas, essas moléculas recombinantes menores têm um grande potencial para efeitos de neutralização. Além disso, a eficácia do fragmento pode ser aumentada através da construção de diferentes formatos, biespecíficos ou com mutações pontuais visando aumento da estabilidade e a afinidade das moléculas contra o alvo (LAUSTSEN et al., 2016, 2018).

Os fragmentos de anticorpos são geralmente formados por cadeias variáveis leves e pesadas representados pelos Fabs (fragmentos de anticorpos) e scFvs (fragmento variável de cadeia única). Quando essas moléculas não são homólogas às humanas, elas podem se tornar imunogênicas e formar agregados pela perda da porção constante (Fc). Portanto, existe uma apreensão em injetar esses fragmentos

nos seres humanos, criando uma barreira ao seu uso. Para superar essa preocupação, estratégias foram desenvolvidas pelo grupo para tornar esses fragmentos mais compatíveis com seres humanos (humanização de anticorpos), no entanto faz-se necessário compreender as características das regiões variáveis do anticorpo (AHMADZADEH et al., 2014, LAUSTEN et al., 2018, AUBREY et al., 2019).

O processo de humanização neste trabalho foi baseado no transplante da região determinante da complementariedade (*grafting* CDR) de um anticorpo murino em uma sequência codificadora de um scFv humano, na qual a região de *framework* permanece humana com algumas mudanças em resíduos de aminoácidos, mas as regiões determinantes para especificidade do anticorpo (CDRs) são de origem murina e dirigidas para fosfolipases presentes no veneno de *Loxosceles intermedia*. Para manutenção da estrutura canônica original, alguns resíduos chaves foram preservados. Após análise da sequência, utilizando ferramenta do IMGT® (*the international ImMunoGeneTics information system*®, <http://www.imgt.org>) e do modelo 3D, foi realizada mutação reversa em alguns resíduos próximos às CDRs (HONEGGER et al., 2009; MUZARD et al., 2009; LÈGER et al., 2011; SAFDARI et al., 2013), seguindo as recomendações obtidas pelos resultados de Xu et al. (2018). Essa estratégia foi considerada um processo de humanização eficaz em outros trabalhos (MIETHE et al., 2016; LEBOZEC et al., 2017).

Fragmentos no formato scFv e *diabody* são tipicamente expressos em *Escherichia coli*. Além disso, para aumentar o rendimento, é inserido um peptídeo sinal que direciona a molécula para o ambiente oxidativo do periplasma, contribuindo para a formação de pontes de sulfeto (FIELDS et al., 2013; LAUSTSEN et al., 2018; LEBOZEC et al., 2018).

Neste trabalho, uma estratégia de humanização do anticorpo recombinante LimAb7 foi realizada para obter scFv e fragmentos de anticorpos do tipo *diabody*. Eles foram expressos em procariotos, mantiveram o mesmo perfil de reconhecimento da molécula parental, apresentaram potencial neutralizante e maior proximidade de uma molécula homóloga. As inovações tecnológicas acerca desse tema contribuem para produção de antivenenos mais efetivos e seguros, além de serem mais sustentáveis, pois independem de veneno e animais para a produção.

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 Objetivo Geral

Desenhar, produzir e avaliar características estruturais e funcionais de fragmentos de anticorpos recombinantes humanizados contra toxinas loxoscélicas.

### 1.2.2 Objetivos Específicos

- Realizar estudos *in silico* para o *design* do gene codificador das regiões variáveis de cadeia leve (VL) e pesada (VH) humanizadas de fragmentos de anticorpos em diferentes formatos;
- Utilizar sistema procarioto para produzir os fragmentos de anticorpos recombinantes;
- Avaliar características estruturais, imunoquímicas dos fragmentos;
- Avaliar a neutralização *in vitro* dos diferentes fragmentos de anticorpos frente à atividade hemolítica do veneno de *Loxosceles intermedia*.

## 1.3 JUSTIFICATIVA

Em um estudo realizado por Alvarenga et al. (2003) foram produzidos 13 anticorpos monoclonais contra o veneno de *Loxosceles intermedia*, dos quais, 12 reconheceram o veneno ou a fração dermonecrótica (DNF) quando testados por ELISA e *Western Blot*, reagindo com proteínas de 32 a 35 kDa. Essa massa molecular de proteínas corresponde à família Loxtox e a proteínas com atividade fosfolipídica do veneno, as quais são consideradas como as principais indutoras da ação necrótica e hemolítica. Dentre os anticorpos obtidos, o anticorpo monoclonal LimAb7 mostrou uma alta reatividade contra essas proteínas, levando a uma neutralização total do efeito necrótico *in vivo*. Desse modo, este anticorpo serviu como protótipo para produção de um *biosensor* ligado a fosfatase alcalina (JIACOMINI et al, 2016) com capacidade de detectar e quantificar veneno de *L. intermedia*; e também de um fragmento de anticorpo no formato de *diabody* que apresenta potencial protetor aos 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 poderia apresentar riscos.

Desta maneira surgiu a proposta da presente tese em obter uma molécula humanizada, a partir do fragmento variável de cadeia única murina denominado scFv<sub>15</sub>LimAb7, com substituição de algumas sequências murinas por humanas, respeitando homologias estruturais e características intrínsecas ao sítio de interação ao antígeno.

O fragmento de anticorpo recombinante é uma molécula estável, completamente funcional e bivalente, possui alta taxa de difusão, com nível de atividade entre 10 minutos e 6 horas. Tendo em vista o potencial do LimAb7 e seus fragmentos recombinantes de origem murina já caracterizados pelo nosso grupo torna-se relevante o desenvolvimento desse projeto em otimizar a construção e produção de fragmentos humanizados como alternativa para o tratamento do loxocelismo.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 EPIDEMIOLOGIA

Existem mais de 45 mil espécies de aranhas venenosas em todo o mundo. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), quatro gêneros de aranhas podem causar envenenamento no ser humano: *Latrodectus spp.* (viúva negra), *Loxosceles spp.* (aranha marrom/reclusa), *Atrax e Hadronyche spp.* (aranha teia de funil) e *Phoneutria spp.* (armadeira). No Brasil não foram reportados acidentes com *Atrax e Hadronyche spp.* (CHAGAS et al., 2010; LISE, GARCIA, 2007; LOVRECEK e TOMIC, 2011; WORLD SPIDER CATALOG, 2018).

As aranhas do gênero *Loxosceles* pertencem à família Sicariidae, ordem Araneida, classe Arachnida e filo Arthropoda. Essas aranhas possuem ampla distribuição geográfica sendo descritas aproximadamente 130 espécies em diversas partes do mundo. Dentre as espécies de *Loxosceles* comumente citadas pela capacidade de gerar o efeito dermonecrotico ou por sua grande distribuição e contato com ambientes humanos, são bem conhecidas: *L. laeta* (Li) (Chile; Peru; Brasil, principalmente em Santa Catarina), *L. gaucho* (Lg) (Brasil, principalmente São Paulo), *L. reclusa* (Lr) (estados centrais e sul dos Estados Unidos da América), *L. deserta* (Ld) (Estados Unidos da América e México), *L. rufescens* (Espanha), *L. hirsuta* (Lh) (Brasil) e *L. intermedia* (Li) (Brasil, principalmente no Paraná). Cada espécie tem características e distribuições próprias, no entanto, é importante ressaltar que dentre as 14 espécies prevalentes no Brasil e no estado do Paraná, *L. intermedia* (MELLO-LEITÃO, 1934) é a mais abundante (MARQUES-DA-DILVA e FISCHER, 2005; FELICORI et al., 2009; RIVERA et al., 2015; FUKUSHIMA et al., 2017).

Desde 2001, o Brasil vem apresentando um aumento no número de casos e, isto pode estar associado ao desequilíbrio ecológico associado ao desflorestamento, extinção de predadores naturais, mudança climática, práticas de manejo de pragas, o qual resulta na adaptação da aranha ao ambiente urbano. Acredita-se que a dispersão dessas aranhas foi altamente facilitada pela sua proliferação em madeiras, tijolos, telhas e dessa forma, serem transportadas para outras áreas geográficas (ANDRADE e TAMBOURGI, 2003; GREMSKI et al., 2014).

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: NOTIFICAÇÕES DE ACIDENTES POR ARANHAS NO BRASIL NO PERÍODO ENTRE 2007 A 2016.

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	<b>71.537</b>	<b>80.076</b>	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%
<b>Total</b>	6.828	10.579	5.019	66.687	171.487	<b>260.600</b>	100%
<b>Frequência</b>	2%	4%	2%	26%	66%	100%	

FONTE: adaptado de MINISTÉRIO DA SAÚDE/SVS-SINAN (BRASIL, 2018)

## 2.2 ARANHAS DO GÊNERO *Loxosceles*

### 2.2.1 Características gerais

O nome *Loxosceles* significa “pernas inclinadas”, e refere-se à maneira como a aranha posiciona suas pernas em relação ao resto do corpo. Essas aranhas variam de 1-5 cm de comprimento, possuem evidente dimorfismo sexual, sendo a fêmea maior que o macho. Possuem uma coloração castanha, sendo popularmente denominada “aranha marrom” e, no cefalotórax há uma imagem que se assemelha a um violino. Apresentam seis olhos dispostos em pares que não se tocam e ficam em forma de U padrão (FIGURA 1). Este posicionamento do olho tem sido descrito como critério para identificar as aranhas-marrons. Podem viver por meses sem alimentos ou água e resistir à variação de temperatura entre 8-43 °C. As fêmeas possuem longevidade de 1176±478 dias e os machos de 557±87 dias (*L. intermedia*). Elas constroem teias irregulares que se assemelham a algodão. Alimentam-se de baratas, grilos, mas preferem presas mortas (TAMBOURGI et al., 2010; MARTINS et al., 2011; GREMSKI et al., 2014).

FIGURA 1: CARACTERÍSTICAS DA *Loxosceles intermedia*.

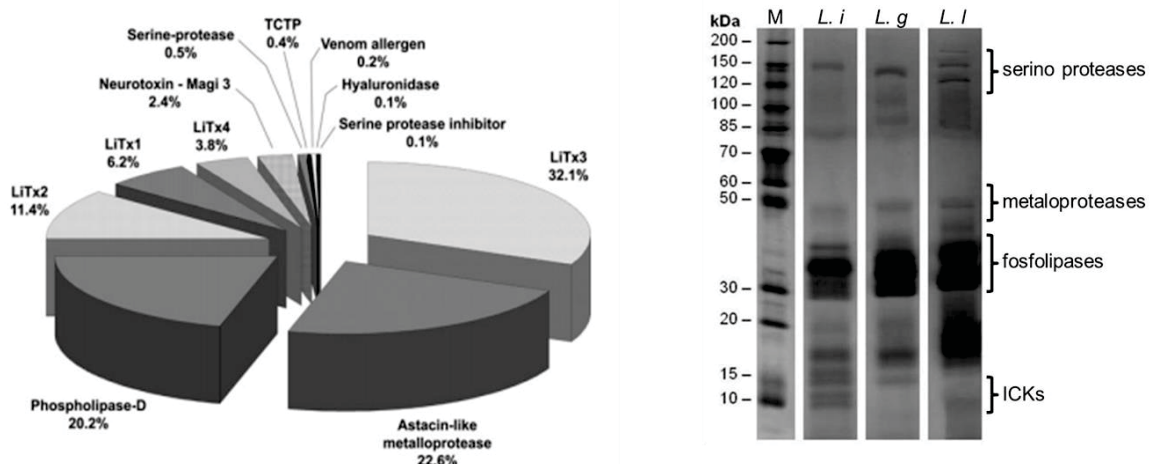
FONTE: adaptado de GREMSKI et al., 2014 (A); adaptado de VETTER et al., 2008 (B), adaptado de TAMBOURGI et al., 2010 (C e D).

LEGENDA: sinal 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).

### 2.2.2 Composição do veneno

A quantidade de veneno produzido contém aproximadamente 20-200  $\mu\text{g}$  de proteína total e, depende do sexo, idade, espécie, estado nutricional e tamanho da aranha (revisado por GREMSKI et al., 2014).

O veneno possui uma mistura complexa de toxinas com moléculas altamente expressas como as fosfolipases D, astacinas (metaloproteínas) e peptídeos inseticidas de baixa massa molecular, como também toxinas com baixo nível de expressão como hialuronidase, serino protease, inibidores de serino protease, alérgenos e membros da família Tumor Translacionalmente Controlado (TCTP) (FIGURA 2) (FELICORI et al., 2009; GREMSKI et al., 2014).

FIGURA 2: ANÁLISE DOS COMPONENTES DO VENENO DE *Loxosceles spp.*

FONTE: adaptado de RAMADA et al., 2012 e GREMSKI et al., 2014

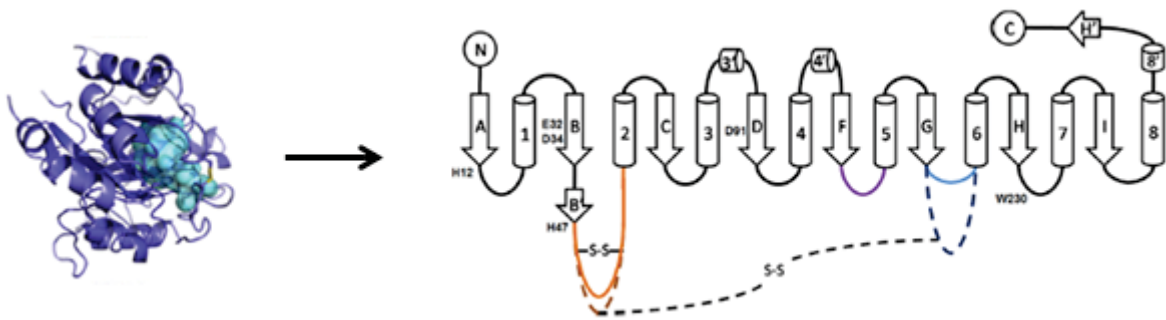
LEGENDA: Proporção relativa de cada grupo de toxinas em relação ao total de transcritos codificados da glândula de veneno (esquerda) Gel de poliácridamida 12,5% corado por prata, contendo 2  $\mu\text{g}$  de proteínas provenientes do veneno de *L. intermedia*, *L. gauchoi* e *L. laeta* (direita). M: marcador molecular.



As fosfolipases D (PLD), com massa de 30-35 kDa, foram identificadas como principais componentes ativos do veneno de *Loxosceles*. As PLDs são solúveis em água e tampões fisiológicos e catalisam a hidrólise de fosfolipídios como a esfingomiéline na ligação fosfodiéster liberando colina e produzindo ceramida 1-fosfato (C1P). C1P estimula proliferação celular, inibe apoptose, induz migração celular e promove inflamação. PLD também pode atuar na hidrolização da lisofosfatidilcolina (LPC) dependente de  $Mg^{+2}$  para aumentar o ácido lisofosfatídico (LPA). LPA pode induzir agregação plaquetária, secreção de citocinas e quimiocinas, hiperpermeabilidade endotelial, quimiotaxia, inflamação, angiogênese e progressão do tumores. Sabe-se que LPC e LPA contribuem para a patogênese da PLDs. No início acreditava-se que as fosfolipases clivavam apenas esfingomiéline, por isso denominado esfingomiélinase; porém outros grupos são clivados como glicerofosfolipídios e lisofosfolipídios. Desse modo, alguns autores acreditam que o termo fosfolipase D (PLD) é o mais apropriado (GREMSKI *et al.*, 2014; RIVERA *et al.*, 2015).

A PLD possui diferentes isoformas conforme cada espécie, entretanto, alguns aminoácidos são conservados e participam do sítio catalítico como: His12, Glu32, Asp34, Asp91, His47, Asp 52, Trp 230, Asp233, Asn252. A PLD possui 8 folhas beta e 8 alfa hélice ( $\alpha/\beta$ )<sub>8</sub> em formato de barril e o *loop* é estabilizado por pontes de dissulfeto, com sítio catalítico na interface mediado por ligação de íons metálicos e dois resíduos de histidina envolvidos na estabilização e hidrólise da esfingomiéline e fosfolipídeos (LP). O íon  $Mg^{2+}$  é essencial para catálise e este sítio também é conservado. Acredita-se que além das isoformas, pontes dissulfeto adicionais conforme cada espécie pode acarretar em variações nas afinidades ou atividades enzimáticas, o que explica a diferença dos sintomas clínicos, severidade observada no local da picada, como também os efeitos sistêmicos apresentados após o envenenamento por diferentes espécies do gênero *Loxosceles* (FIGURA 3) (MURAKAMI *et al.*, 2005; TAMBOURGI *et al.*, 2010; GREMSKI *et al.*, 2014).

FIGURA 3: FOSFOLIPASE D



FONTE: adaptado de GREMSKI et al., 2014

LEGENDA: representação da estrutura da toxina de *L. laeta* (esquerda). Topologia estrutural da fosfolipase D mostrando as folhas beta e alfa hélice que irão formar a proteína em formato de barril (direita).

Tratando-se dos demais componentes do veneno, as **astacinas** são metaloproteases dependentes de zinco. Em *L. intermedia* foram identificadas Loxolisin A que degrada fibronectina e fibrinogênio e Loxolisin B com atividade genolítica. As toxinas Inibidor da Cistina *Knot* (**ICK**) atuam em canais iônicos, como sódio, cálcio e potássio. As **TCTP** liberam histaminas e a partir da sua recombinante foram demonstrados edema e aumento da permeabilidade vascular. **Hialuronidase** degrada ácido hialurônico (HA), que é um componente da matriz extracelular (MEC). Dessa forma, o veneno age na matriz e aumenta a difusão de outras toxinas no local da inoculação, contribuindo para o espalhamento do veneno. No envenenamento, a presença de edema, eritema e necrose é comum, o qual indica distúrbio na MEC. Apresentam ainda, **serino proteases** que atuam como zimogênio ativado pela tripsina. Acredita-se que essas enzimas ativem o complemento e estão relacionadas com coagulação sanguínea e fibrinólise. Os **inibidores de serino protease** presentes no veneno possuem função de proteção para suas próprias proteínas. Apesar de o veneno possuir **alergenos**, estes são pouco relatados nos acidentes loxoscélicos (revisado por GREMSKI et al., 2014).

Ainda se tem muito que descobrir sobre o veneno e sua ação tóxica, por isso alguns autores vêm usando tecnologias de DNA recombinante para esclarecer o papel das mesmas. Kalapothakis et al. (2002) identificou e caracterizou a LiD1, uma proteína expressa na glândula do veneno de *L. intermedia*, pertencente a família de proteínas com atividade dermonecrótica. Em 2006, Felicori et al., produziram a proteína recombinante (rLiD1) com intuito de conhecer os resíduos que participam do sítio ativo da toxina e, com isso encontrar regiões antigênicas que poderiam

servir como epítomos para indução de anticorpos recombinantes. A mutação sítio dirigida, LiRecDT1H12A (KUSMA et al., 2008), da proteína recombinante LiRecDT1 (CHAIM et al., 2006), foi de grande importância, pois permitiu a elucidação do papel deste aminoácido na atividade catalítica da toxina, no entanto outros sítios têm se mostrado relevante no papel dessa enzima (VUITIKA et al., 2016).

### 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. Gremski et al. (2014) em sua revisão de literatura, cita que alguns autores notaram que coelhos expostos ao veneno apresentam edema inicial sobre a derme, aumento da permeabilidade vascular, deposição da rede de fibrina, trombose de vasos sanguíneos, degeneração da parede dos vasos bem como infiltração e agregação de células inflamatórias, principalmente neutrófilos. Em tempos de exposição mais longos pode acontecer mionecrose de miofibrilas, infiltração leucocitária no músculo esquelético e, finalmente destruição da integridade da epiderme, hemorragia massiva observando necrose de colágeno em torno da epiderme. 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 dermonecroticas.

Experimentos com células endoteliais de veia umbilical (HUVEC) apontam que o veneno estimula expressão de E-selectina de células endoteliais e secreção de IL-8 por macrófagos (PATEL et al., 1994 apud GREMSKI et al., 2014). A partir de culturas de fibroblastos expostos a PLD recombinante observou-se desregulação de IL6, IL8, CXCL1, CXCL2 que são importantes ativadores inflamatórios. Os autores postulam que junto com o endotélio, os fibroblastos na derme também medeiam a desregulação e ativação dos leucócitos envolvidos na dermonecrose (DRAGULEV et al., 2007 apud GREMSKI et al., 2014). A ligação direta do veneno na superfície de

células endoteliais também foi reportada levando a alteração na adesão celular, seguida da retração e descolamento dessas células, resultando em apoptose. Assim como, a internalização das toxinas envolvendo vesículas endocíticas que levam ao lisossomo e culmina em morte por apoptose (PALUDO et al., 2006; NOWATZKI et al., 2010 apud GREMSKI et al., 2014).

Com relação ao loxoscelismo cutâneo, foi observado que o veneno induz o aumento na expressão e secreção de metaloproteinases 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).

Referente à ação do veneno sobre os eritrócitos, acredita-se que a hemólise está associada com mecanismo distinto, seja por efeito direto (CHAVES-MOREIRA, 2009; KARIM-SILVA et al., 2016; VUITIKA et al., 2016) ou dependente de complemento (TAMBOURGI, 2000; VAN DEN BERG et al., 2018). Tambourgi e colaboradores em 2000 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 CAUSADOS POR ARANHAS LOXOSCELES

### 2.3.1 Loxoscelismo

As aranhas do gênero *Loxosceles* podem ser encontradas peridomiciliar e intradomiciliarmente em brechas, fendas e orifícios de casas, procurando abrigo em caixas, cantos de armários e gavetas, dentro de roupas, toalhas e roupas de cama. Possuem hábitos noturnos, não sendo agressivas, desde que não se sintam ameaçadas. O acidente, denominado loxoscelismo, ocorre quando a aranha é

pressionada contra o corpo da vítima, dessa forma os locais mais atingidos são tronco, coxas e braços (MARQUES-DA-SILVA, FISCHER 2005; RIBEIRO et al. 2007; OKAMOTO et al., 2012).

A gravidade do acidente pode ser influenciada por fatores que envolvem a aranha (estágio de desenvolvimento, sexo, quantidade de veneno injetado, espécie) e/ou o paciente (local de envenenamento, tecido adiposo e extremidades são mais sensíveis; idade e constituição genética) (MACHADO et al., 2005; TAMBOURGI et al., 2000, 2010). A maioria dos envenenamentos com sintomas é causada por aranhas fêmeas, devido à quantidade de veneno liberado ser maior do que a do macho. A aranha injeta não mais que 30 µg de proteína, apesar de já ter sido reportado a liberação de até 200 µg (CHAGAS et al., 2010; GREMSKI et al., 2014).

O envenenamento por *Loxosceles spp.* divide-se em quadro clínico cutâneo/dermonecrotico e quadro cutâneo-visceral/sistêmico (hemolítico). O quadro cutâneo, que corresponde a 87 – 98% dos casos é caracterizado inicialmente entre 2 a 8 horas por dor, queimação e formação de uma região edemaciada associada a eritema. Esses sintomas acentuam-se nas primeiras 24 a 72 horas após o acidente, podendo levar a três tipos de lesão: incompleta (bolha serosa, edema, calor e rubor, com ou sem dor e queimação); sugestiva (endurecimento, bolha, equimose e dor tipo queimação); característica (dor em queimação, lesões hemorrágicas focais, mescladas com áreas pálidas de isquemia, denominando placa marmórea e, evoluir para necrose). A úlcera causada pelo loxoscelismo requer meses até cicatrização (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**) (TAMBOURGI et al., 2000; BRASIL, 2001, 2009; RIBEIRO et al., 2007; PINTO et al., 2009).

FIGURA 4: LOXOSCELISMO



FONTE: a AUTORA, 2019.

LEGENDA: evolução da lesão característica causada pela picada da aranha *Loxosceles* em região de coxa esquerda de uma criança de 3 anos e 5 meses.

O quadro clínico cutâneo-visceral ou sistêmico ocorre com menor frequência (1-13%) nos casos de envenenamento por *Loxosceles spp.*, sendo que a espécie comumente envolvida é a *L. laeta* (CABRERIZO et al., 2009; RIBEIRO, 2007). Nas primeiras 24 horas após a picada podem surgir sintomas como: astenia, febre, êmese, cefaléia, alterações sensoriais, insônia e coma. Manifestações de maior gravidade incluem alterações no quadro hematológico caracterizadas por anemia, icterícia, hemoglobinúria, neutropenia, agregação plaquetária e, conseqüentemente, trombocitopenia, além de coagulação intravascular disseminada (BRASIL, 2001, 2009; RIBEIRO et al., 2007; PINTO et al., 2009). Manifestações sistêmicas envolvendo alterações renais podem acarretar Insuficiência Renal Aguda (IRA) (hemoglobinúria e hematúria) e até mesmo obstrução do lúmen tubular (IRA oligúrica ou não oligúrica). Sintomas como febre, náuseas, vômito e convulsões têm sido reportados, sugerindo atuação do veneno no sistema nervoso central (BRASIL, 2001, 2009; RIBEIRO et al., 2007; PINTO et al., 2009).

### 2.3.2 Diagnóstico

Apesar de alguns resultados laboratoriais sugerirem os efeitos sistêmicos do loxoscelismo, ainda não existe nenhum diagnóstico específico para o loxoscelismo, portanto este se baseia em três aspectos (CABRERIZO et al., 2009; GREMSKI et al., 2014):

- Lesão compatível: depende dos estágios da lesão, tempo do acidente e localização da picada.
- Epidemiologia: corresponde a características próprias do gênero *Loxosceles*, como seu habitat.
- Identificação do aracnídeo: captura da aranha, o que é dificultoso, pois sua picada é indolor.

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; WASSERMAN et al., 2009) e em amostras de sangue humano contendo veneno loxoscélicos (GOMEZ et al., 2002; JIACOMINI et al., 2016). Contudo, apesar de existirem diferentes ensaios *in vitro* capazes de identificar e quantificar veneno de *Loxosceles spp.*, nenhum deles encontra-se disponível para uso, pois alguns precisam ser melhorados no que diz respeito à sensibilidade e detecção de um



número maior de espécies de aranhas causadoras do loxoscelismo (DIAS-LOPES et al., 2018).

### 2.3.3 Tratamento

Não existe nenhum consenso para o tratamento do loxoscelismo e diferentes terapias são propostas de acordo cada país. No Chile, apesar dos corticóides não inativarem o veneno, quase todos os pacientes recebem esse medicamento associado com anti-histamínicos, e apenas 3,5% recebem soro. No México é prescrito dapsona (usada para tratamento de hanseníase) para todos os pacientes. Essa droga é recomendada por limitar a migração e infiltração de neutrófilos no local da picada, porém, seus efeitos são severos e devem ser administrados sobre supervisão. Os EUA, diferente de outros países, utilizam antibiótico para tratar as lesões com intuito de prevenir infecção (PAULI et al., 2006; GREMSKI et al., 2014).

Contudo, a terapia específica mais utilizada é o uso de antiveneno contra *Loxosceles spp.*, os quais estão disponíveis no Brasil, México, Argentina (antiveneno derivado de cavalo (Fab')<sub>2</sub>) e Peru (antiveneno IgG total). Os antivenenos têm sido produzidos no Brasil desde a década de 60 por Furlanetto (1961). Atualmente, o Ministério da Saúde disponibiliza dois antivenenos: soro antiloxoscélico, SALox, (anticorpos contra os venenos de *L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta*), produzido pelo Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos do Estado do Paraná (CPPI) e; soro antiaracnídeo, SAAr, produzido pelo Instituto Butantan, São Paulo (contra venenos de *Loxosceles gaucho*, *Phoneutria nigriventer*, *Tityus serrulatu* e *Tityus bahiensis*). Existem também, dois outros produtores comerciais de antivenenos *Loxosceles*: o Instituto Nacional de Saúde, em Lima/Peru (produzido a partir do veneno de *L. laeta*); e o Instituto Bioclon, no México (PAULI et al., 2006; BRASIL, 2009; GREMSKI et al., 2014; DUARTE et a., 2015).

O tratamento proposto pelo Ministério da Saúde para o loxoscelismo é realizado de acordo com a seguinte classificação: leve (lesão incaracterística, sem alterações laboratoriais), moderado (lesão sugestiva ou característica, podendo ou não haver alterações sistêmicas) e grave (lesão característica e alteração laboratorial). Sendo que, apenas nos casos moderados e graves é administrada a soroterapia e corticoterapia (TABELA 2) (BRASIL 2001, 2009).



TABELA 2: TRATAMENTO PROPOSTO PELO MINISTÉRIO DA SAÚDE PARA ACIDENTES CAUSADOS POR ARANHAS DO GÊNERO LOXOSCELES.

Acidente	Soro	Gravidade	Nº ampolas
Loxoscelismo	Antiloxoscélico (SALox) ou Antiaracnídico (SAAr)	<b>Leve:</b> aranha identificada, lesão incharacterística, ausência de comprometimento sistêmico.	-
		<b>Moderado:</b> independentemente da identificação do agente, lesão sugestiva ou característica, manifestações sistêmicas inespecíficas (exantema, febre), ausência de hemólise.	5 <sup>a</sup>
		<b>Grave:</b> lesão característica, manifestações clínicas e/ou evidências laboratoriais de hemólise intravascular.	10 <sup>a</sup>

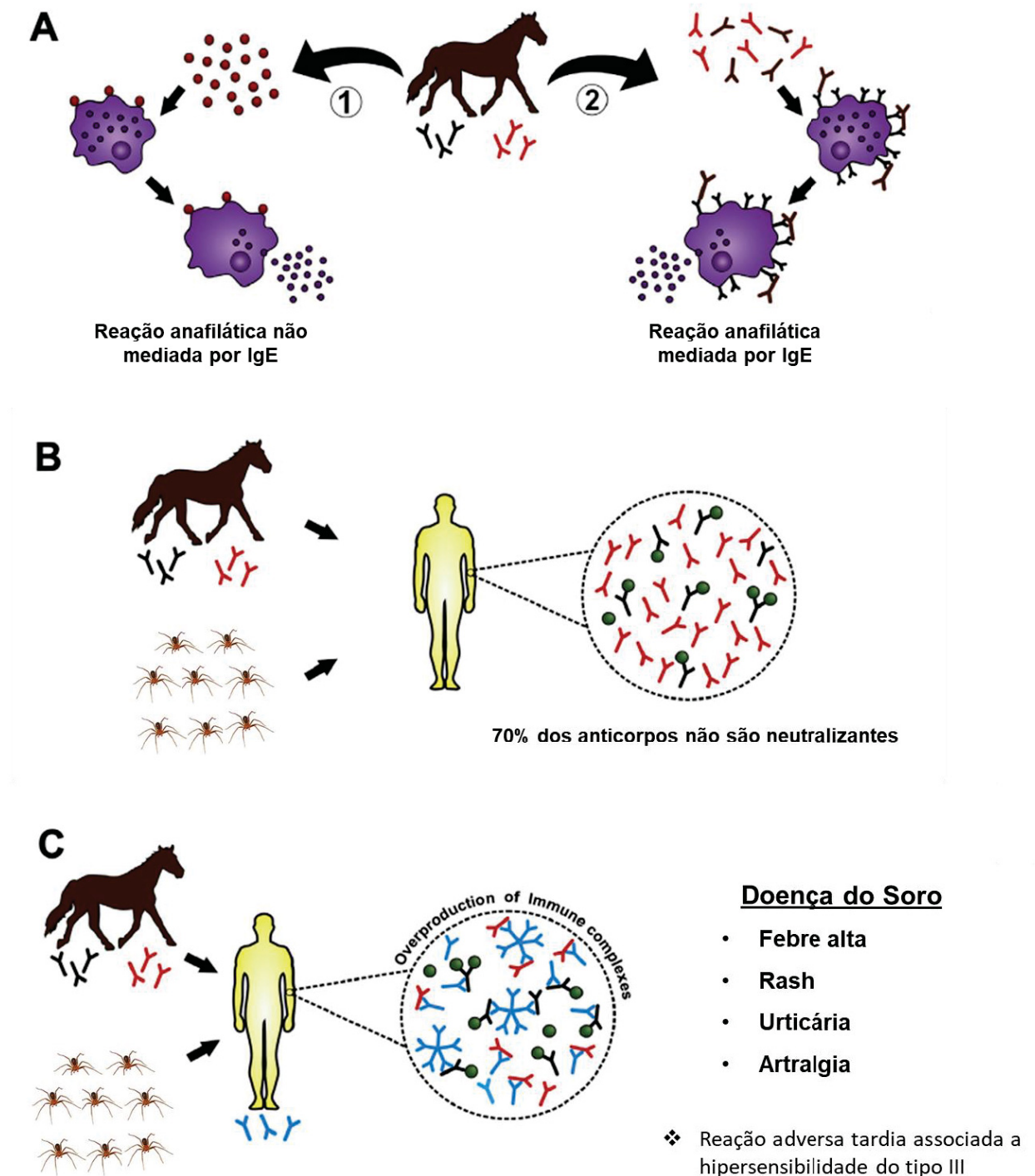
a) recomenda-se a associação com prednisona: em adultos, 40mg/dia; e em crianças, 1mg/kg/dia, durante 5 dias  
 FONTE: adaptado de BRASIL, 2009.

O antiveneno específico tem maior potencial quando administrado nas primeiras horas após o envenenamento. O ideal é que o paciente receba o soro o mais breve possível, ou pelo menos até 12 horas após a picada, sendo que após 72 horas não é recomendado. Entretanto, Málaque et al. (2002) apud Pauli et al. (2003), menciona que mesmo que o soro não previna a lesão dermonecrotica, ele pode conter a extensão da lesão e limitar a ocorrência dos efeitos sistêmicos (PAULI et al., 2006; 2009).

A produção da soroterapia é trabalhosa, pois se faz necessário imunizar animal (geralmente cavalo) para obter anticorpos totais que podem sofrer digestão enzimática eliminando a porção constante do anticorpo. No entanto, no soro estão presentes imunoglobulinas totais do animal, dirigidas contra diferentes antígenos, sendo que somente 30% são específicas para componentes do veneno. Dentre as imunoglobulinas reativas ao veneno total estima-se que apenas 5% apresenta potencial neutralizante. Dessa forma, por se tratar de moléculas heterólogas, estas podem levar a reações anafiláticas mediada por IgE ou, a mais comum, pela ativação do sistema de complemento. Os anticorpos heterólogos podem se complexar a imunoglobulinas humanas inespecíficas e resultar na formação de imunocomplexos, que podem depositar-se em tecidos alvos (vasos sanguíneos, glomérulo, articulações) mediando processo inflamatório e doença do soro (febre alta, eritema, urticária e artralgia), uma reação adversa associada à hipersensibilidade do tipo III (1 a 2 semanas após a terapia com antiveneno) (FIGURA 5) (LAUSTEN et al., 2018).

Mesmo após os avanços de um século da soroterapia, a utilização de soros heterólogos produzidos a partir da imunização de equídeos ainda é restrita pelo temor das reações adversas que podem ocorrer. Dentre as manifestações leves provocadas pelo reconhecimento imunológico do soro estão rubor cutâneo, urticária, náuseas, vômito e crise asmática, assim como reações mais graves que são representadas por arritmias cardíacas, hipotensão arterial, choque anafilático e quadro obstrutivo das vias respiratórias, apesar destas últimas serem menos frequentes. Reações tardias, como a doença do soro, também podem estar presentes. Nesse caso, os sintomas de urticária local ou generalizada, febre e artralgia aparecem de 1 a 15 dias após a administração do antiveneno. Ainda, doses complementares podem ser necessárias, aumentando o risco dessas reações (FIGURA 5) (LOVRECEK e TOMIC, 2011).

FIGURA 5: DESVANTAGENS DE ANTIVENENOS PROVENIENTES DE MOLÉCULAS HETERÓLOGAS.



FONTE: adaptado de LAUSTSEN et al., 2018

LEGENDA: (A) Pacientes podem desenvolver reações adversas resultando da ativação do complemento (esquerda) ou mediada por IgE. (B) aproximadamente 70% ou mais dos anticorpos não são dirigidos para toxinas do veneno e, com isso é necessário uma grande dose de anticorpos equinos, o qual não tem valor terapêutico, mas podem causar reações adversas. (C) Uma grande quantidade de anticorpos anti-veneno combinado com anticorpos humanos anti-anticorpos de cavalo pode resultar na superprodução de complexos imunes. Esses podem depositar em vasos, glomérulos, articulações, mediando inflamação e promovendo doença do soro, de 1 a 2 semanas depois da administração da terapia antiveneno.

Além das reações indesejáveis provocadas em humanos, em relação a produção dos soros existem dificuldades ainda quanto ao uso de grandes quantidades de veneno para a imunização, na realização de testes de potência pré-clínica, como também é relatada na literatura sofrimento dos animais que são expostos ao veneno (FIGUEIREDO et al., 2014).

Vários grupos vêm tentando contribuir com melhorias para a produção de anticorpos policlonais antiloxoscélicos. Proteínas recombinantes (ALMEIDA et al., 2008; FELICORI et al., 2006, LIMA et al., 2018), 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 como imunógenos alternativos ou na qualificação de anticorpos neutralizantes.

Outra possibilidade é oferecida pelo uso de anticorpos monoclonais, que podem apresentar algumas vantagens em relação aos policlonais como reprodutibilidade e especificidade, e desse modo surge como uma alternativa eficaz na terapêutica de algumas doenças (AHMAD et al., 2012; CHOW e CASADEVALL, 2012; ALVARENGA et al., 2014). 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*. Dias Lopes et al. (2014) obteve o anticorpo monoclonal murino, mAb16, que reconhecem os venenos de *L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta*, mas apresenta inibição parcial dos efeitos tóxicos.

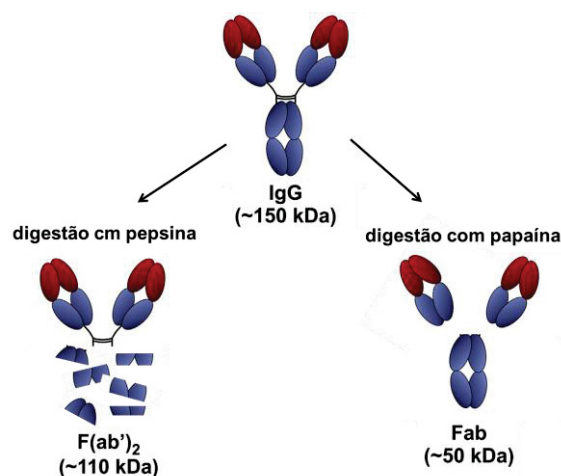
O anticorpo monoclonal LimAb7 produzido por Alvarenga et al. (2003) reconhece proteínas de 32 a 35 kDa, correspondendo à família Loxtox e a proteínas com atividade de fosfolipase do veneno, as quais são consideradas como as principais indutoras da ação necrótica e hemolítica. Em 2010, o LimAb7 foi empregado por Dias-Lopes et al. (2010), para evidenciar a interação do veneno de *L. intermedia* com cardiomiócitos. De Moura et al. (2011) utilizaram a técnica de *Phage display* para mapear os epítomos reconhecidos pelo LimAb7. E mais recentemente, foi empregado no formato recombinante para detecção de veneno de *L. intermedia* em soro (JIACOMINI et al., 2016) e com potencial de neutralização da atividade hemolítica *in vitro* (KARIM-SILVA et al., 2016). Novas tecnologias utilizando fragmentos de anticorpos poderiam ser avaliadas como alternativa no tratamento dos acidentes com animais peçonhentos, a partir do LimAb7.

## 2.4 ANTICORPOS RECOMBINANTES

### 2.4.1 Fragmentos de anticorpos

O médico inglês Edward Jenner foi o pioneiro da vacinação do séc XVIII. Em 1890, von Behring e Kitasato reportaram que o soro de animais que foram injetados pequenas doses de toxina diftérica continha um ingrediente chamado antitoxina, o qual hoje é conhecido como anticorpo. A partir da descoberta da penicilina, em 1930, as doenças infecciosas foram tratadas com antibióticos e a soroterapia ficou limitada para doenças virais e toxinas, os quais não possuem opções alternativas de terapêutica (AHMAD et al., 2012). Há mais de um século, a soroterapia é considerada o tratamento específico para envenenamento e, apesar de ser efetivo, muitas vezes trazem efeitos indesejáveis por se tratar de moléculas heterólogas, pois podem causar reação anafilática mediada por IgE ou mais comumente pela ativação de complemento. Os antivenenos são compostos por imunoglobulinas ou fragmentos produzidos por digestão enzimática e, essas misturas não são exclusivas para bloqueio das toxinas, pois contêm anticorpos totais do animal imunizado (FIGURA 6) (LAUSTSEN et al., 2018). Segundo Lovrecek e Tomic (2011) e Lucas (2015) a doença do soro que pode aparecer entre 1 e 15 dias após a administração do antiveneno é a reação mais comum.

FIGURA 6: VISTA ESQUEMÁTICA DE DIFERENTES FORMATOS DE ANTICORPOS POLICLONAIS ANTIVENENOS DERIVADOS DO PLASMA.



FONTE: adaptado de LAUSTSEN et al., 2018

LEGENDA: IgG: molécula total de anticorpo IgG. F(ab')<sub>2</sub>: digestão enzimática específica da IgG por pepsina. Fab: digestão por papaína em região específica.

Em 1975 Köhler e Milstein customizaram a produção de anticorpos *in vitro*, pela técnica de produção de anticorpos monoclonais (mAbs), mais tarde nomeados de “balas mágicas”. Porém, esses anticorpos monoclonais quando administrado em múltiplas doses podem levar a resposta imune com anticorpos humanos anti anticorpos murinos (HAMA). Essa reação pode levar a eliminação do mAbs pelo organismo ou mesmo gerar reações alérgicas comprometendo o tratamento (LÉGER et al., 2011).

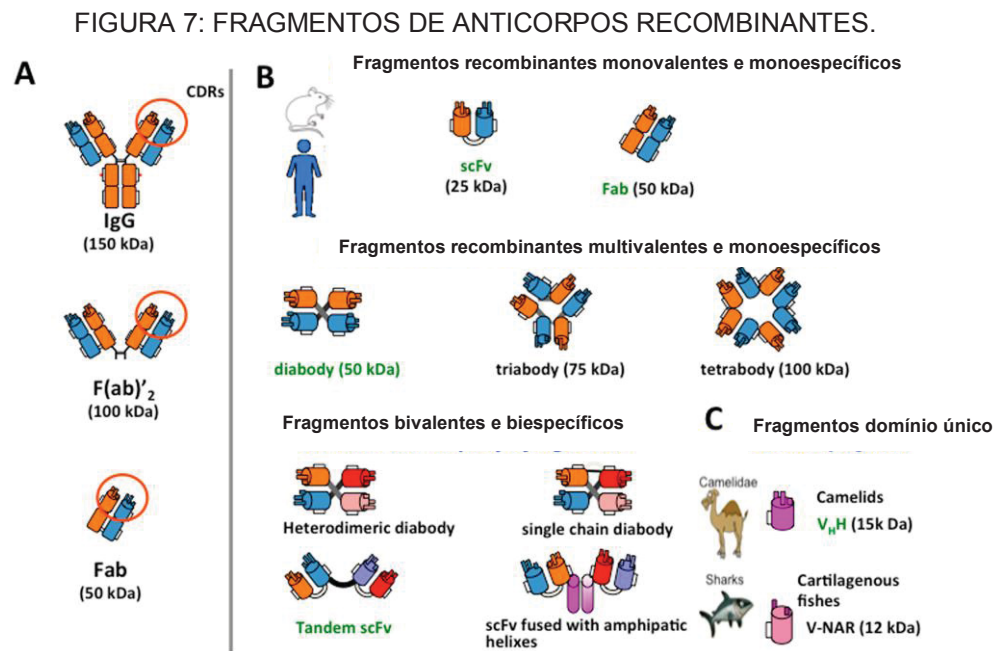
Como uma maneira de evitar as desvantagens dos antivenenos provenientes de moléculas heterólogas, acredita-se que a utilização de anticorpos recombinantes seja uma solução viável, já que sua construção em sistemas bacterianos é capaz de sintetizar e expressar grandes quantidades de anticorpos contra vários antígenos, o que diminuiria o custo da produção e; de acordo com sua construção, evitaria o desencadeamento de respostas imunológicas indesejadas. O bom conhecimento atual sobre a estrutura dos anticorpos, o acesso ao gene somado à possibilidade de manipulação e experimentação dos diferentes formatos de proteínas recombinantes permitiram a obtenção de novas formas de moléculas terapêuticas com propriedades melhoradas, algumas delas denominadas fragmentos de anticorpos (Fv/Fab). A carga, solubilidade e estabilidade do anticorpo recombinante também podem ser alteradas de acordo com sua construção, assim como sua especificidade e reconhecimento do antígeno alvo (AHMAD et al., 2012).

Tais fragmentos com especificidade predeterminada podem ser produzidos em um sistema heterólogo após a clonagem do cDNA que codifica os domínios variáveis das cadeias leves e pesadas de um anticorpo (AUBREY et al., 2003; HOLLIGER et al, 2005; AHMAD et al, 2012). Dessa forma, fragmentos de anticorpos recombinantes estão emergindo como uma nova classe de drogas com alto potencial para aplicações terapêuticas em oncologia, processos inflamatórios, doenças autoimunes, rejeição de transplantes, entre outros (ALVARENGA et al., 2014).

Dependendo da construção, o anticorpo recombinante pode conter apenas as regiões variáveis leve e pesada do anticorpo unidas por um ligante peptídico (scFv); duas cadeias variáveis idênticas unidas (*nanobodies* bivalentes ou *diabody*); scFvs biespecíficos unidos enfileirados (*tandem*); ou 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 diminui consideravelmente a



chance de reconhecimento pelo sistema imune humano (FIGURA 7) (ESPINOSOLIS et al., 2009).



FONTE: adaptada de ALVARENGA et al., 2014.

LEGENDA: proteólise da molécula total do anticorpo IgG (A); formatos de fragmentos de anticorpos recombinantes, variando o tamanho (B).

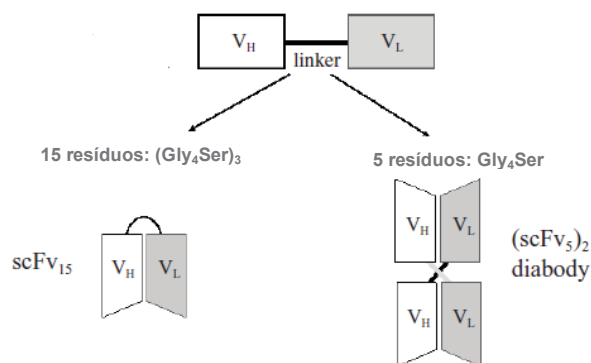
O menor fragmento funcional de anticorpo é o fragmento variável de cadeia simples (scFv), o qual possui cadeia leve (VL) e pesada (VH) da porção variável. Os scFv quando produzidos geralmente são ativos, mas instáveis. A introdução, por manipulação genética de um *linker* peptídico flexível de aproximadamente quinze resíduos de aminoácidos é habitualmente empregado, e com isso ocorre uma associação entre as cadeias variáveis que mantêm a função de reconhecimento antigênico preservado e ainda apresenta estabilidade (FIGURA 8). O *linker* deve ligar a região carboxiterminal de um domínio variável com o aminoterminal do outro sem afetar a capacidade de ligação com o antígeno. Os resíduos mais utilizados são Gly e Ser que contribuem para a flexibilidade, mas também podem ser intercalados com Glu e Lys para melhorar a solubilidade (ALVARENGA et al., 2014; AHMAD et al., 2012). Estas moléculas, scFv, são pouco ou não imunogênicas e servem igualmente como molde base para o desenvolvimento de novas formas de agentes terapêuticos, isso porque suas propriedades intrínsecas podem ser modificadas por evolução dirigida *in vitro*, seja por modulação da especificidade, por melhoramento da afinidade ou aumento da estabilidade. Os scFv correspondem a estrutura



mínima implicada no reconhecimento específico de um antígeno e, na última década, seu emprego vem ganhando mercado no tratamento e diagnóstico de várias patologias (AUBREY et al., 2003; HOLLIGER et al., 2005; AHMAD et al., 2012).

*Linker* menor que 12 resíduos podem formar dímeros, pois possuem mais dificuldade de manter VH e VL do mesmo scFv juntos (SAFDARI et al., 2013). *Diabody* são anticorpos recombinantes diméricos composto da associação não covalente de dois fragmentos de anticorpos de cadeia única (scFv) que se ligam ao antígeno de maneira bivalente. Possui tamanho similar ao Fab (aproximadamente 50 kDa), o qual é considerado o formato mais adequado de fragmentos de anticorpos para terapia com antivenenos em termos de eficácia de neutralização e biodisponibilidade (FIGURA 8). Estrutura de cristal mostrou que o domínio VH de uma cadeia parecia com o domínio VL de outra e vice-versa (AUBREY et al., 2003).

FIGURA 8: FRAGMENTO ÚNICO DE CADEIA VARIÁVEL.



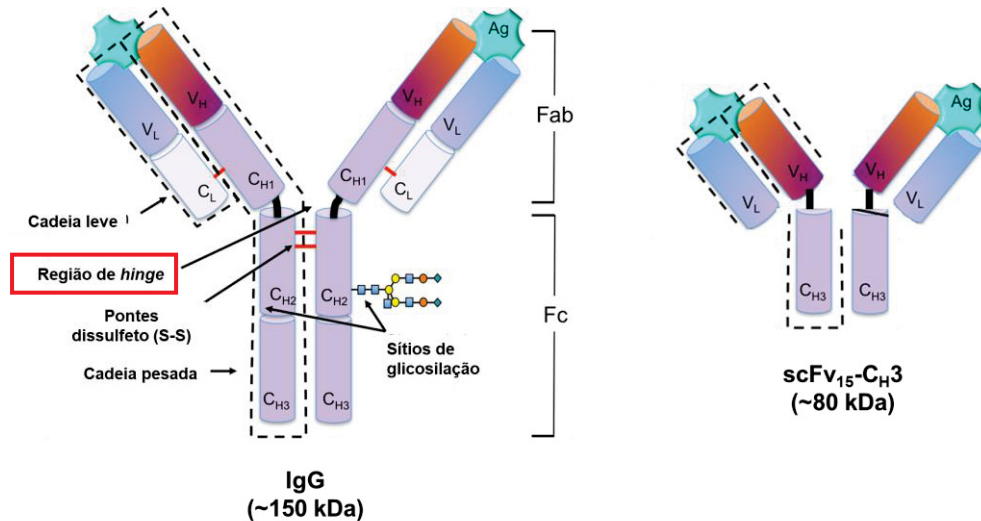
FONTE: adaptada de AUBREY et al., 2003.

LEGENDA: Cadeia leve (VL) e pesada (VH) unidas por um *linker* de 15 (scFv<sub>15</sub>) ou 5 (*diabody*) resíduos de aminoácido.

O *minibody* é um fragmento de anticorpo recombinante que possui o scFv contendo CH3 de cadeia pesada do anticorpo. Esse fragmento pode ser expresso em sistema bacteriano, mantendo sua especificidade e afinidade em relação à molécula de origem, mostrando mais efetiva e promissora tendo em vista seu poder de penetração dada pelo seu tamanho e rápido *clearance in vivo* (HU et al., 1996; YAZAKI et al., 2001; OLAFSEN et al., 2004; KIM et al., 2014). Entretanto, esse fragmento produzido em *E. coli* possui limitação devido a sua estabilidade e, para solucionar isso, pesquisadores focam em ajustar o *linker* e a região de *hinge*, além de alterar a orientação em relação as cadeias variáveis leve e pesada. Assim o fragmento pode se tornar mais solúvel, podendo contribuir na sua estabilidade e

funcionalidade. Em alguns estudos o *minibody* tem se mostrado mais específico que sua molécula de origem (FIGURA 9) (OLAFSEN et al., 2004; KIM et al., 2014).

FIGURA 9: FRAGMENTO RECOMBINANTE, *MINIBODY*.

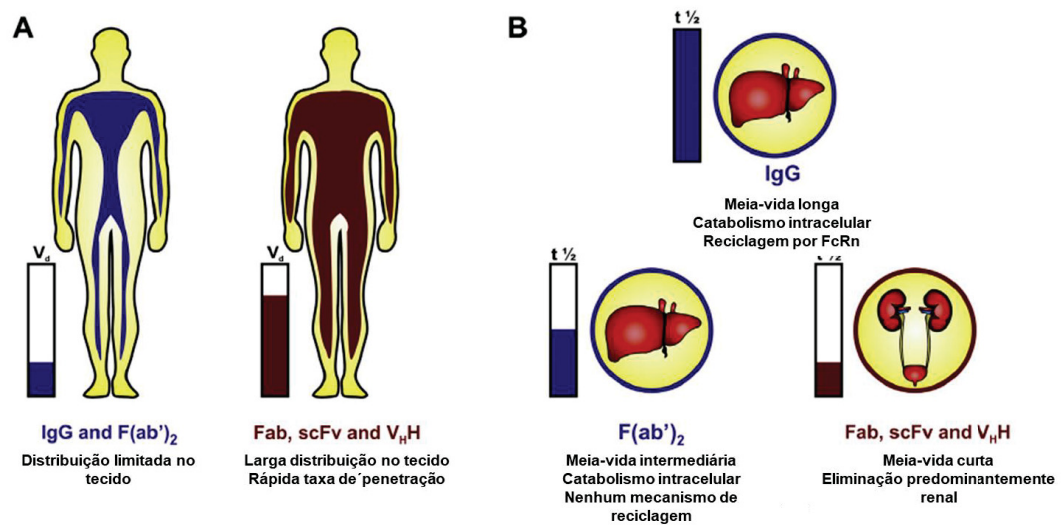


FONTE: adaptado de MURPHY et al., 2016.

LEGENDA: representação esquemática do fragmento de anticorpo recombinante em formato de minibody, scFv15-CH3.

Os scFv podem ser bivalentes, monovalentes, biespecíficos. Tendo em vista seu baixo peso molecular e rápida difusão no tecido, acredita-se que sejam candidatos ideais para a neutralização de substâncias tóxicas provenientes de envenenamento, já que a ligação de um scFv específico ao sítio de ligação de uma molécula tóxica inativaria seu sítio ativo, e conseqüentemente inibiria seu efeito prejudicial. Segundo análises, o formato *diabody* possui melhor retenção em tecidos, baixa imunogenicidade, rápida distribuição e meia vida prolongada e, por causa do seu tamanho a filtração renal é inferior ao limiar (FIGURA 10) (AHMAD et al., 2012; LAUSTSEN et al., 2018).

FIGURA 10: FARMACOCINÉTICA DO ANTIVENENO.



FONTE: adaptado de LAUSTSEN et al., 2018.

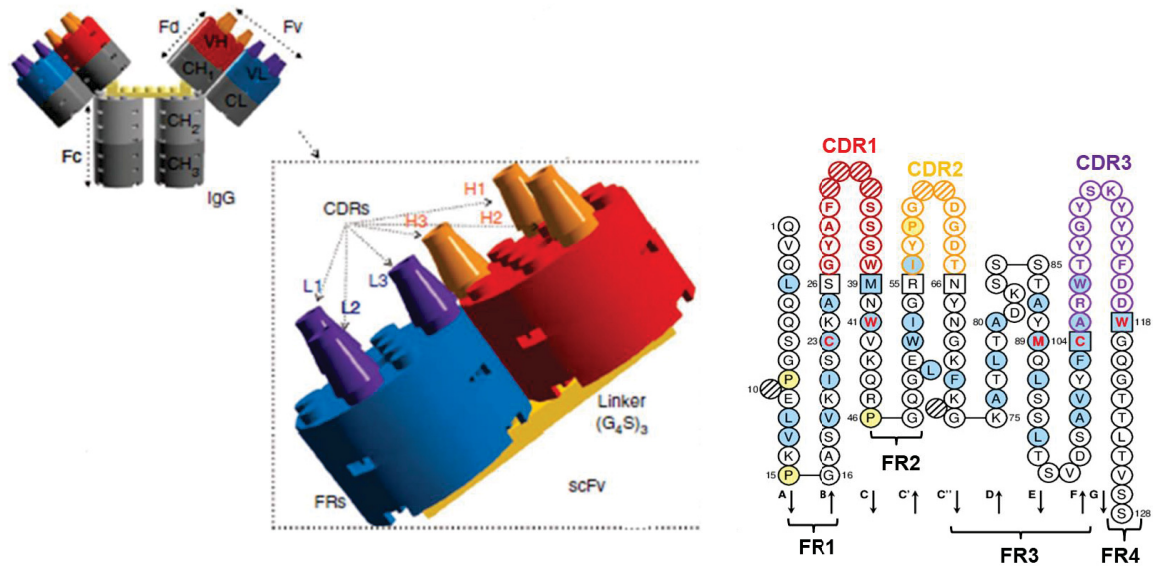
LEGENDA: (A) perfil de distribuição de diferentes formatos de anticorpos, mostrando seu volume de distribuição. (B) mecanismo de eliminação de diferentes formatos de anticorpos, indicando sua meia-vida de eliminação.

Uma via comumente explorada para obtenção de scFv é baseada no uso de hibridomas secretores de anticorpos monoclonais para a obtenção das sequências de imunoglobulinas. A vantagem no uso de anticorpos monoclonais consiste na manutenção do paratopo da imunoglobulina original, conseqüentemente da sua especificidade e ainda, como foram demonstrados por alguns grupos, tais fragmentos conservam a mesma capacidade protetora, sendo isso imprescindível para o caso de envenenamentos (MOUSLI et al., 1999). A construção de um scFv a partir de um anticorpo monoclonal pode ser feita em um sistema de expressão bacteriana e já foi testado com eficiência também para toxinas de escorpião (AUBREY et al., 2001 e 2003).

#### 2.4.2 Humanização de anticorpos

Imunoglobulinas são compostas de quatro cadeias polipeptídicas (duas cadeias idênticas pesada (H) e duas leves (L)). Cada cadeia possui um domínio constante (C) e um domínio variável (H). Cada cadeia variável possui três regiões (*loops*) hipervariáveis (CDR1, CDR2, CDR3) que estão envolvidas diretamente na interação com o antígeno. Entre os CDRs existem regiões conservadas

denominadas de *framework* (FR1, FR2, FR3 e FR4) (FIGURA 11) (FIELDS et al., 2010; AHMADZADEH et al., 2014).



FONTE: adaptado de FIELDS et al., 2013.

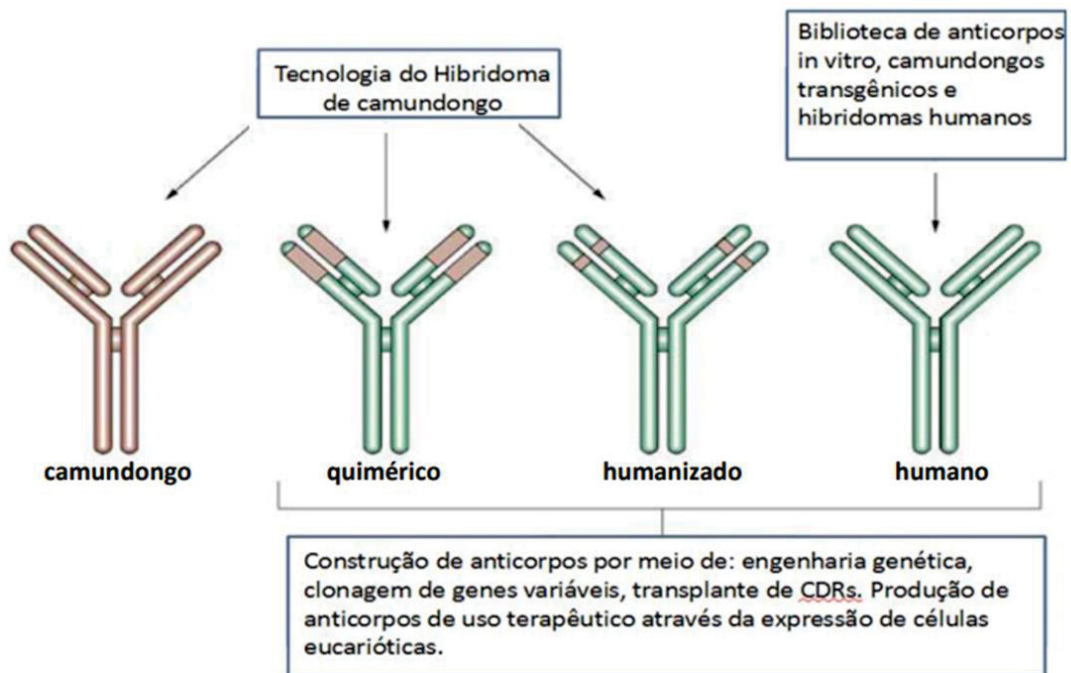
LEGENDA: *Collier de Perles* gerado pela ferramenta IMGT. Sequência depositada no GenBank, número de acesso: KT381972

Na década de 70 Kabat et. al. identificou CDR baseado em critérios estatísticos, sendo as sequências mais variáveis nas imunoglobulinas. Na década de 80, Clothia et al., inferiu que as regiões hipervariáveis tem uma conformação especial chamada estrutura canônica, que são determinadas pelo tamanho do *loop* e, este contém aminoácidos presentes nos sítios chaves responsáveis pela de ligação com o antígeno. Na década de 90, Padlan et al., definiu resíduos determinantes da especificidade (SDR) como os que se ligam diretamente ao antígeno e que essa ligação ocorre por forças de van der Waals's numa distância de +0,5 Å (LÉGER et al., 2011; AHMADZADEH et al., 2014 ; ZHANG et al., 2017). Tramontano et al. (2000) e Studnicka et al. (1994) *apud* Ahmadzadeh et al. (2014), demonstraram que os resíduos de FR também podem fazer contato com o antígeno. Em 2012, Ofran et al. definiram a região de ligação com o antígeno como paratome CDRs.

O maior desafio das pesquisas atuais tem sido reduzir a imunogenicidade dos anticorpos monoclonais enquanto retêm sua função biológica. A geração de anticorpos quimeras, nos quais possuem domínios variáveis murinos ligados a regiões constantes humanas foi o primeiro método para reduzir imunogenicidade em humanos (menos de 85% de identidade com anticorpo humano) (FIGURA 12).

Rituximab, aprovado em 1997, foi o primeiro anticorpo monoclonal quimera usado para tratamento de pacientes com baixo grau de linfoma não Hodgkin (LNH). Embora muitos anticorpos monoclonais são encontrados na prática clínica, seus domínios variáveis ainda são de origem murina, com a possibilidade de gerar HAMA. As pesquisas têm focado no desenvolvimento de uma nova geração de anticorpos com 85~90.4% e 90.5~92.3% de identidade com anticorpos humanos, denominados humanizados e humanos, respectivamente, de acordo com a definição da Organização Mundial da Saúde (OMS) e Nomes Não Proprietários Internacionais (INN) (FIGURA 12) (ZHANG et al., 2017; LAUSTEN et al., 2018).

FIGURA 12: RESUMO ESQUEMÁTICO DAS ESTRATÉGIAS ABORDADAS PARA ENGENHARIA DE ANTICORPOS.



## Imunogenicidade

FONTE: adaptada de LOPES et al., 2015.

A humanização de anticorpos foi descrita em 1986 e vários procedimentos tem sido propostos para humanizar as regiões variáveis, dentre eles a humanização por transplante de CDR (CDR grafting), por mutações reversas de resíduos chave murinos, com base na análise dos resíduos de superfície, humanização por SDR (resíduos determinantes de especificidade) e superhumanização (LÉGER et al., 2011; SAFDARI et al., 2013; AHMADZADEH et al., 2014).

O método de *grafting* de CDRs tem sido o mais utilizado no processo de humanização e, este pode começar com a seleção da região aceptora de *framework* humano. Sugere-se identificar quatro modelos para cada domínio variável não humano, afim de otimizar propriedades em termos de imunogenicidade, segurança, atividade de ligação com o antígeno, estabilidade estrutural. Para isso alguns passos para o processo de humanização são indicados como análise estrutural dos domínios variáveis da molécula parental não humana pela identificação dos CDRs e FRs, das estruturas canônicas, avaliação do grau de humanização (Escore Z) entre outros. Em seguida é feito o desenho dos domínios variáveis humanizados, considerando as regiões de FRs humanos aceptores, o sítio de ligação para proteína L, transplantes de CDRs (*Grafting* dos CDRs) e mutações reversas (*backmutation*). (LÉGER et al., 2011; AHMADZADEH et al., 2014; ZHANG et al., 2017; AUBREY et al., 2019). O sucesso de cada método e combinação dos mesmos pode variar sendo que a eficácia deve ser demonstrada pela produção e caracterização estrutural e funcional de cada fragmento.

Como alternativa à instabilidade molecular de alguns fragmentos, Muzard et al. (2009), Rodrigo et al. (2015) e Lakhri et al. (2016), sugerem a inserção de um sítio de ligação a proteína L. Segundo os autores, tal modificação confere maior estabilidade às moléculas bem como permite o isolamento das mesmas pelas técnicas de cromatografia e/ou detecção em diferentes ensaios. A proteína L (PpL) é proveniente da parede celular de *Peptostreptococcus magnus*, tem a capacidade de ligar-se a imunoglobulinas através de interação com a cadeia leve, restritamente àqueles anticorpos (recombinantes) que contêm a cadeia leve kappa (VLk). Interage com a região de Framework 1 (FR1) a partir de ligações por pontes de hidrogênio sem interferir na ligação com o antígeno. Existe alguns resíduos da cadeia kappa humana capaz de interagir com a PpL: D17, Thr5, Pro8, Ser9, Ser10, Leu11, Ser12, Ala13, Arg(R)18, Thr20, Thr22 [FR1], Lys127 [FR4]. Se na posição 12 tiver uma prolina, por impedimento estérico, a PpL não se liga. Como aminoácidos em posições chave para forte interação com PpL não são sempre os mesmos nos diferentes fragmentos de anticorpos, a interação com a PpL é mais dependente na integridade da estrutura terciária da FR1 e da conformação da cadeia principal, do que na identidade da sequência de aminoácidos (MUZARD et al., 2009). Segundo Lakhri et al. (2016), o resíduo arginina na posição 18 confere uma melhor interação com a PpL e, a prolina na posição 8 é essencial para interação forte com a PpL.





### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 VENENOS E ANTICORPOS

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

A proteína dermonecrótica recombinante, rLiD1, de *L. intermedia* foi cedida pelo Dra Liza Felicori (UFMG, Belo Horizonte, MG, Brazil) (número de acesso ao Genbank: AY340702).

Anticorpos policlonais de cavalo específico para *Loxosceles intermedia*, foram obtidos através da purificação do soro antiloxoscélico, por cromatografia de afinidade utilizando veneno de *L. intermedia* imobilizado à coluna de Sepharose CNBr-. Os anticorpos foram recuperados da coluna por eluição ácida (glicina 0,1 M pH 2,8) (CHAVEZ-OLORTÉGUI et al., 1998).

O anticorpo monoclonal murino proveniente do hibridoma LimAb7 produzido por ALVARENGA et al., 2003 foi obtido pela purificação em cromatografia de afinidade Sepharose-proteína A CNBr- (Sigma®) nas condições descritas pelo fabricante.

Todas as amostras foram quantificadas pelo método de *Bradford* (1976) ou determinadas pela absorbância à 280 nm. Após a dosagem as amostras foram aliquotadas e armazenadas em -20°C.

#### 3.2 DESENHO E OBTENÇÃO DOS FRAGMENTOS DE ANTICORPOS RECOMBINANTE HUMANIZADOS PROVENIENTE DO LimAb7

##### 3.2.1 Primeira geração de fragmentos de anticorpos, scFv<sub>15hLi7</sub>

O sequenciamento das regiões de cadeias variáveis leve (VL) e pesada (VH) do hibridoma LimAb 7 (número do acesso do GenBank KT381972) (JIACOMINI et al., 2016), foi utilizado como molde para o desenho e construção da humanização da primeira geração de fragmentos. O método utilizado para humanização deu-se pelo transplante dos CDRs murinos para regiões de *framework* humanos, respeitando as classes canônicas e o percentil de identidade. Após a mudança dos CDRs, cada

substituição aminoacídica foi inspecionada individualmente baseada nas características físico-químicas. O escore de humanidade (Z-score) foi comparado com a sequência da linhagem germinativa com o objetivo de ficar mais próximo de zero (0). O ângulo (*packing angle*) entre VH e VL também foi verificado, a fim de manter a correta ligação com o antígeno. Refinamentos adicionais, T (L90) e K (L127), foram realizados para gerar a capacidade de ligação da proteína L em IGKV-FR1 sem alterar a humanização e imunogenicidade (AUBREY, BILLIALD, 2019). Após análises do desenho da sequência que codifica a primeira geração do fragmento humanizado proveniente do anticorpo monoclonal Limab7 (scFv<sub>15</sub>hLi7), este foi sintetizado e produzido pela Genscript® (Genscript, Piscataway, NJ, USA). A concentração do fragmento após purificação com proteína L agarose pela Genscript® foi ajustada para 0,57 mg/mL em PBS pH7.2. Alíquotas foram mantidas a -20°C.

### 3.2.2 scFv<sub>15</sub>-C<sub>H</sub>3hLi7 (*minibody*)

Para a construção de um novo formato de fragmento foi adicionado no desenho do gene uma sequência codificante para cadeia variável pesada (C<sub>H</sub>3), dessa forma obteve-se o *minibody* (VH-linker-VL-hinge-C<sub>H</sub>3) O gene foi sintetizado pela Genscript® e clonado em vetor de expressão procarioto, pSW1 (plasmídeo modificado vide mapa em anexo). Sítios de restrição, *Pst*1 e *Xho*1, foram introduzidos antes e depois da sequência. O plasmídeo recombinante pSW foi inserido em bactérias *Escherichia coli* AD494pLysS (derivada de K-12), BL21 (DE3), HB21, Rosetta 2. Posteriormente, as bactérias foram isoladas e testadas para verificar a presença do inserto de DNA através de PCR de colônia. Ao verificar o inserto, fez-se então o pré-inóculo, no qual foram incubadas *E. coli* em meio 2xYT (1,6% (w/v) triptona, 1% (w/v) extrato de levedura e 0,085 M de cloreto de sódio) pH 7,4 contendo ampicilina (50 µg/mL), sob agitação de 250 rpm a 37 °C por 16 horas. No dia seguinte, foi realizada a amplificação a partir de 0,5 mL do pré-inóculo para cada 100 mL de meio 2xYT acrescido de ampicilina (50 µg/mL), sob agitação de 250 rpm, até atingir a fase exponencial de crescimento A<sub>600nm</sub> alcançando entre 0,650 – 0,800. Procedeu-se à indução da expressão nestas células através da adição de 0.8 mM isopropylthiogalactoside (IPTG) sendo incubadas por mais 16 horas a 16 °C (120 rpm). As células foram coletadas após centrifugação (5000 xg, 20 min, 4 °C),

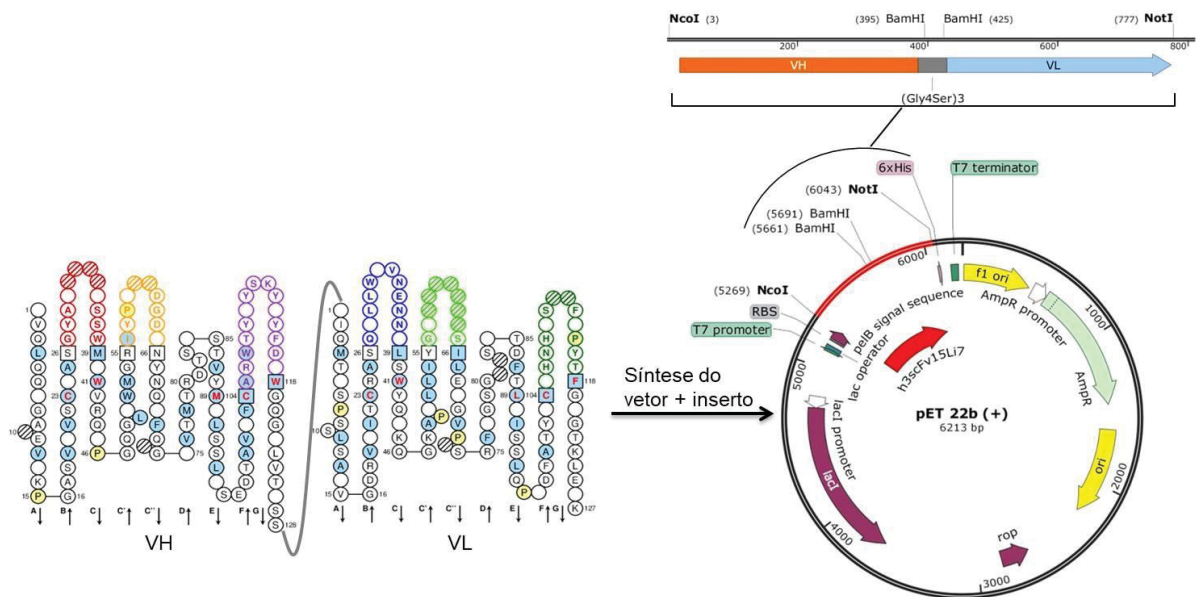
ressuspendidas em tampão TES (0,2 M tris-HCl, pH 8.0; 0,5 mM EDTA; 0,5 M sucrose) (20 mL por litro de cultura original) por 15 minutos e, logo após, foram submetidas a um choque osmótico pela adição de TES, diluído 1:4 em água destilada (30 mL por litro de cultura original). Após incubação em gelo por durante 30 minutos, a suspensão foi centrifugada (10.000 xg, 4°C, 10 min). Em seguida, as proteínas foram extensivamente dialisadas contra solução salina tamponada em PBS (0,5 mM fosfato de sódio, 15 mM de NaCl) a pH 7,4 e centrifugadas a 20.000 xg, 4°C, 20 min (MUZARD et al., 2009; ZAHID et al., 2011).

### 3.2.3 Fragmentos após mutação reversa: scFv<sub>15</sub>hLi7m e scFv<sub>5</sub>hLi7m

#### 3.2.3.1 Segunda geração de fragmentos de anticorpos, scFv<sub>15</sub>hLi7m

O gene do scFv<sub>15</sub>hLi7 sofreu duas mutações pontuais (F103> Y em IGHV e P46> Q em IGKV de acordo com a numeração gerada pelo IMGT) levando a segunda geração de fragmentos, scFv<sub>15</sub>hLi7m. O novo fragmento foi sintetizado de maneira a conter uma região codificante para um ligante peptídico (*linker*) de 15 aminoácidos (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub> que contém dois sítios de restrição para a enzima *BamHI*. O fragmento mutado 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 13).

FIGURA 13: DESENHO DA SEGUNDA GERAÇÃO DE FRAGMENTOS DE ANTICORPOS, scFv<sub>15hLi7m</sub>.

FONTE: MORETTO, 2018.

LEGENDA: clonagem do gene sintético no plasmídeo de expressão pET-22b (+) após a realização de mutações pontuais.

Para a clonagem do vetor pET-22b (+) contendo o inserto de scFv, células bacterianas cepa *Escherichia coli* TOP10 (genótipo F-*mcrA*  $\Delta$  (*mrr-hsdRMS-mcrBC*)  $\Phi$ 80/*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$  *lacX74* *recA1* *araD139*  $\Delta$  (*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 por 10 minutos) e, ao *pellet* foi adicionado 25 mL de cloreto de cálcio ( $CaCl_2$  0,1M). As bactérias foram mantidas a temperatura de 4°C por 1 hora e, após nova centrifugação (5.000 xg, 4°C, 10 minutos), ressuspensas em 2 mL de  $CaCl_2$ . Para a transformação, um volume de 100  $\mu$ L de bactérias competentes adicionado de 150 ng 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 400  $\mu$ L de meio S.O.C. (2% triptona, 0,5% extrato de levedura, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM  $MgCl_2$ , 10 mM  $MgSO_4$  e 20 mM de glucose).

As bactérias foram mantidas a 37°C por 45 minutos com 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<sup>®</sup> Spin PCRapace (Stratec, 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 à 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.

### 3.2.3.2 Segunda geração de fragmentos de anticorpos, scFv<sub>5hLi7m</sub> (*diabody*)

Para a construção do inserto que forma o dímero de scFv<sub>5hLi7m</sub> (*diabody*), o vetor pET-22b (+) contendo o inserto de interesse (scFv<sub>15hLi7m</sub>) foi submetido a

uma digestão enzimática com *BamHI* a fim de diminuir o ligante peptídico para cinco resíduos de aminoácido (Gly<sub>4</sub>Ser).

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 para o scFv<sub>15</sub>hLi7m.

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

### 3.2.3.3 Expressão do scFv<sub>15</sub>hLi7m e scFv<sub>5</sub>hLi7m (*diabody*)

O vetor recombinante pET-22b (+) foi inserido em bactérias cepas *E. coli* AD494 pLysS (genótipo  $\Delta(\text{araABC-leu})7697 \Delta\text{lacX74} \Delta\text{malF3} \Delta\text{phoAPvuII} \text{phoR} \text{trxB}::\text{Kanr} \lambda(\text{DE3}) \text{F}'[\text{lacIq} \text{lacZ}\Delta\text{M15} \text{proAB}^+]$  pLysS), Rosetta (genótipo F-, *ompT hsdSB(rB- mB-) gal dcm*  $\lambda(\text{DE3})$  pRARE<sup>6</sup> (Cam<sup>R</sup>)), HB2151 (genótipo K12, *ara, (lac-pro), thi/F' proA<sup>+</sup>B<sup>+</sup>, lac<sup>q</sup> lacZM15*) e BL21 star (genótipo F-, *ompT lon hsdS<sub>B</sub> (rB-mB-) gal dcm me131*  $\lambda(\text{DE3})$ ), e, após a transformação das bactérias quimiocompetentes, de acordo com o protocolo descrito no item 3.2, foi realizada uma PCR de colônia (TABELA 3) a fim de verificar a presença do inserto nas cepas escolhidas para expressão.

TABELA 3: REAÇÃO DE PCR EM COLÔNIA.

Reagente	Tubo de reação (μL)	Controle negativo (μL)
H <sub>2</sub> O DEPC	23,35	23,35
MgCl <sub>2</sub> buffer [10x]	3	3
MgCl <sub>2</sub> 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).

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 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 2xYT contendo ampicilina (50 µg/mL), sob agitação de 250 rpm, até atingir a fase exponencial ( $A_{600nm}$  0,6 - 0,8). Posteriormente, foi feita a indução da expressão proteica nestas células através da adição de 0.8 mM  $\beta$ - d -1-tiogalactopiranosídeo de isopropil (IPTG), incubadas por mais 16 horas a 16°C (100 rpm).

A extração desses fragmentos foi de acordo com a metodologia descrita pelo scFv<sub>15</sub>-C<sub>H</sub>3hLi7 (*minibody*).

### 3.3 PURIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS

#### 3.3.1 scFv15-C<sub>H</sub>3hLi7 (*minibody*)

Os fragmentos de anticorpos recombinantes scFv15-C<sub>H</sub>3hLi7 (*minibody*) foram purificados por cromatografia de afinidade a partir do extrato periplasmático (50 mL obtido com 1000 mL de cultura bacteriana), sob diferentes estratégias (MA et al., 2017). A coluna preparada com 1 mL de proteína L agarose (Pierce Biotechnology, Thermo Scientific) foi suavemente agitada por 16 horas à 4°C. Após lavagem com 100 mL de PBS (pH 7,4), as proteínas recombinantes foram eluídas em frações de 0,5 mL com glicina (0,1 M , pH 2,2) e imediatamente neutralizadas com Tris 1 M (40 µL) em gelo . As frações que continham as proteínas recombinantes foram selecionados em  $A_{280nm}$ , reunidas, dialisadas contra PBS (pH 7,4), e centrifugadas (10.000 xg, a 4°C por 20 min) . Preparações de proteína foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida sulfato de sódio dodecil - (SDS - PAGE) a 12,5 % e coloração com azul de *Coomassie*, ou por nitrato de prata (WILSON e WALKER, 2010).

A purificação em coluna de Níquel (Ni-NTA Sepharose GE Healthcare®; Ni Agarose Qiagen®), assim como a de veneno de *Loxosceles intermedia* (Li)



Sepharose (Sepharose 4CNBr<sup>-</sup> Sigma Aldrich®), proteína A e proteína G (Sepharose GE Healthcare®) também foram realizadas. As estratégias de cromatografia empregadas seguiram o protocolo citado acima, entretanto a eluição na purificação da coluna de níquel agarose deu-se com uma solução contendo 150 mM, 250 mM e 500 mM de Imidazol, enquanto que nas colunas de Sepharose (níquel, Li, proteína A ou proteína G) foi adicionada uma solução com glicina (0,1 M, pH 2,8). Todas as purificações descritas acima foram realizadas manualmente na bancada; porém, outra estratégia de purificação foi empregada utilizando a coluna HITrap SP HP 1mL (GE Healthcare Life Sciences) com o auxílio do cromatógrafo AKTA pure (GE Healthcare), no qual as amostras foram eluídas com gradiente de 0-100% de uma solução de 500 mM imidazol.

As preparações contendo o *minibody* (maior rendimento foi em coluna de veneno de Li e HITrap SP HP com 15 µg/L de cultura bacteriana) foram dosadas pelo método de *Bradford* e armazenadas a -20 °C até à sua utilização (MURPHY et al, 2016).

### 3.3.2 scFv<sub>15</sub>hLi7m e scFv<sub>5</sub>hLi7m (*diabody*)

O scFv<sub>15</sub>hLi7m e scFv<sub>5</sub>hLi7m 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 por 16 horas.

O scFv<sub>5</sub>hLi7m foi purificado também com coluna de Ni-Sepharose, eluído com diferentes concentrações molares de imidazol ou com glicina pH 2,4. Entretanto, entre esses métodos apresentou-se com maior pureza quando eluído com 500 mM de imidazol.

As amostras purificadas com rendimento aproximado de 30 µg/L (scFv<sub>15</sub>hLi7m) e 47 µg/L (scFv<sub>5</sub>hLi7m) em Ni-Sepharose eluído com 500 mM de imidazol foram armazenados a -20°C até sua utilização.

### 3.4 CARACTERIZAÇÃO DOS FRAGMENTOS RECOMBINANTES

#### 3.4.1 Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

##### 3.4.1.1 ELISA indireto

Placas de 96 poços foram revestidas com venenos de *L. intermedia* (Li), *L. gaucho* (Lg) e/ou *L. laeta* (LI) em 0,02 M de tampão de carbonato de sódio (pH 9,6) durante 16 horas a 4 °C e depois saturou-se com caseína 2% durante 1 hora a 37 °C. As placas foram então incubadas durante 1 hora com as preparações de fragmentos de anticorpos, extratos periplasmáticos e/ou anticorpo monoclonal LimAb7 (100 µL/poço) e em seguida durante 1 hora com anti HIS, anti IgG de mouse-HRP ou proteína-L-HRP (peroxidase de rábano) (Pierce Biotechnology). Para evidenciar a reação uma solução de orto – fenilendiamina (OPD) ou tetrametilbenzidina (TMB) foi adicionada (100 µL/poço). Após 15 minutos adicionou-se H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1:20 (20 µL/poço) para parar a reação. A absorbância foi avaliada a 490 nm (OPD) ou 450 nm (TMB) num leitor de placas de ELISA (microplate reader 550, BIORAD). Entre cada incubação, o excesso de reagentes foi removido através de lavagens com solução específica (0,15 M NaCl, 0,05% Tween 20). Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

##### 3.4.1.2 ELISA sanduíche

Nesse formato de ELISA as placas foram primeiramente revestidas com anti-Li cavalo, seguidas de veneno de *Loxosceles spp.* para então serem reconhecidos com a molécula parental LimAb7 ou seus fragmentos recombinantes. A detecção e os passos intermediários foram realizados da mesma forma que o ELISA indireto.

##### 3.4.1.3 ELISA de competição

A metodologia desse ensaio segue de acordo com o ELISA indireto; porém, concentração fixa de LimAb7 é incubado concomitante com diferentes concentrações de scFv<sub>15</sub>hLi7 por 1h/37°C. Imunocomplexos formados entre o

veneno adsorvido na placa e o LimAb7 foram detectados pela adição de anti IgG camundongo-HRP (1:4.000, Sigma). A percentagem de reatividade é dada de acordo com o valor da absorbância, considerando o ponto sem competidor (sem fragmento recombinante scFv<sub>15</sub>hLi7) como ponto máximo.

### 3.4.2 SDS-PAGE e *Imunoblotting* (*dot blot*, *western blot*)

Proteínas do veneno de *L. Intermedia*, *L. gaucho* ou *L. laeta* foram separadas por SDS-PAGE usando tampão de amostra sem agente redutor (tris-HCl 0,5 mol/L, pH 6,8, glicerol 10%, SDS 10% (m/v) e azul de bromofenol 0,1% (m/v)), a 150 V. Em seguida, os géis foram corados por azul de *Coomassie* ou por coloração por prata para identificação das proteínas, ou ainda transferidos para membrana de nitrocelulose ou PVDF 0,45 µm. A transferência se faz pelo contato do gel com a membrana no interior de um uma cuba eletroforética 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), que permanece no gelo por 2 horas sob corrente elétrica de 100 V. Após a transferência, as proteínas transferidas foram evidenciadas pela coloração de *Ponceau* (1 g de *ponceau*, 50 mL de ácido acético, q.s.p. 1000ml de água destilada). As regiões da membrana sem presença de proteínas foram saturadas durante 1h com solução de PBS contendo 5% (m/v) de leite seco sem gordura e 0,3% (v/v) de Tween 20 (LAEMMLI, 1970; ALVARENGA et al., 2003). A membrana contendo as proteínas presentes nos venenos foram incubados com os extratos periplasmáticos, fragmentos de anticorpos purificados, anticorpos monoclonais e/ou SALox. A reação foi detectada por incubação com proteína L-peroxidase (1:4000) (Sigma-Aldrich), anti histidina mouse (1:1000) (Invitrogen®), anti IgG mouse-HRP (1:4000) (Sigma-Aldrich) anti Li cavalo-HRP (1:800) (laboratório de imunoquímica) ou anti cavalo-HRP (1:30.000) (Sigma-Aldrich). Os imunocomplexos foram evidenciados com solução apropriada (diaminobenzidina (DAB) ou quimioluminescência (ECL)) (*Thermo Fisher Scientific*, Rockford, IL, EUA). As incubações foram realizadas durante 1 hora a 37 °C sob agitação e a membrana foi lavada cinco vezes com PBS, pH 7,4, contendo 0,05% de Tween 20, entre as etapas descritas.

Para validar a produção dos fragmentos de anticorpos, extratos periplasmáticos ou fragmentos purificados foram separados em gel de eletroforese a 12% e transferidos para membranas de nitrocelulose. Para a separação das

proteínas utilizou-se 30  $\mu$ L da amostra adicionada de agente redutor (beta-mercapetanol) mantidas a temperatura de 95 °C por 3 minutos. Após a transferência das proteínas, os fragmentos foram detectados pela adição de anti histidina seguida de anti mouse-HRP ou proteína L-HRP. Os imunocomplexos foram evidenciados com o substrato apropriado (diaminobenzidina ou quimioluminescência (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, EUA).

Com o objetivo de confirmar a especificidade dos fragmentos frente ao veneno de *L. Intermedia*, os extratos periplasmáticos foram analisados por *dot blot*. Primeiramente, 2,5  $\mu$ g veneno de *L. Intermedia*, *L. gaucho* ou *L. Laeta* foram imobilizados diretamente na membrana de nitrocelulose. Os passos seguintes foram de acordo com a metodologia descrita no *western blot*.

### 3.5 CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO MOLECULAR

Para a cromatografia líquida de alta pressão com exclusão de tamanho (SEC-HPLC) 140  $\mu$ L de fragmentos de anticorpos (Fabs) purificados por PpL a 0,98 AU<sub>280nm</sub> ou diluído 1: 2 foram analisados usando uma coluna Superdex 75 10 / 300GL pré-empacotada calibrada de acordo com os padrões da GE Healthcare. As proteínas foram eluídas com PBS pH 7,2 a uma taxa de 0,5 ml/min e detectadas com um leitor de UV a 280 nm (especificações do aparelho). Foram realizadas duas injeções por amostra.

### 3.6 MODELAGEM E DOCKING

Com o uso da ferramenta MODELLER (9.2v) foi realizada a modelagem homológica do anticorpo monoclonal LimAb7 e seu fragmento humanizado, scFV<sub>15hLi7</sub>. A escolha do modelo foi baseada de acordo com o critério de Desvio da Raiz Quadrada Média (RMSD) e a porcentagem da identidade. Além disso, a minimização de energia de *Gibs* e o refinamento do *loop*, usando o software Chimera, foram realizados na tentativa de aumentar a qualidade do modelo. Após a modelagem das estruturas, o servidor ClusPro2.036 foi utilizado para prever as interações entre os anticorpos modelados e a Fosfolipase D com a rLid1 (PDB:

3RLH), sendo que o menor escore de energia ClusPro, representa a maior probabilidade de interação antígeno-anticorpo no qual foi selecionado. Os contatos de aminoácidos e os parâmetros de interação entre os anticorpos e seus alvos foram avaliados através da plataforma *online* PDBSum.

### 3.7 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE NEUTRALIZAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA

Sangue de doadores humano foi coletado em tubos contendo tampão citrato de sódio (BD Plastipak, Franklin Lakes) e após centrifugação a 166 xg por 15 minutos para retirada do plasma as hemácias foram lavadas 3 vezes com solução de Ringer Lactato (0,6% NaCl, 0,03% KCl, 0,02% CaCl, 0,31% lactato de sódio) ou Tris Sucrose - TBS (250 mM sucrose, 10 mM Tris/HCl, pH7,4, 280 mOsm/kg H<sub>2</sub>O). Eritrócitos humanos a uma concentração de 10<sup>8</sup> foram incubados com solução de anticorpos e veneno por 24 horas a 37 °C sob agitação suave, as amostras foram centrifugadas a 166 xg por 5 minutos e, o sobrenadante analisado em espectrofotômetro com comprimento de onda à 570 nm (CHAVES-MOREIRA et al., 2009; KARIM-SILVA et al., 2016; VUITIKA et al., 2016).

Os ensaios foram realizados em triplicata, em dois experimentos independentes, tendo como controle negativo (ringer lactato) e positivo (hemácias em água destilada ou 0,01% (v/v) de Triton X-100). Os valores de absorbância foram convertidos em porcentagem de hemólise.

Subsequentemente, foi avaliada a porcentagem de hemólise na presença de componentes do sistema complemento. A metodologia deu-se de acordo com o descrito anteriormente; porém, o sangue foi coletado em tubos sem anticoagulante e deixados por 30 min a 37 °C para ativação do sistema de coagulação antes de seguir com a centrifugação para obtenção do soro e as lavagens dos eritrócitos. Após as 24hs de incubação o sangue foi lavado três vezes antes de ser incubado com soro normal humano (NHS) na diluição 1:2 por 1h a 37 °C sob agitação suave. Só então seguiu com a leitura do sobrenadante a 570 nm. A porcentagem de hemólise foi calculada considerando a soma da absorbância do veneno na ausência e presença do NHS, de acordo com a seguinte fórmula:

$$\% \text{ Hemólise} = (\text{absorbância}_{\text{amostra}} \times 100) / (\text{absorbância}_{\text{veneno sem NHS}} + \text{absorbância}_{\text{veneno com NHS}})$$

Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética Humana do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná (Curitiba, PR, Brasil) sob o certificado número CEP/SD2911004.

## 4 RESULTADOS

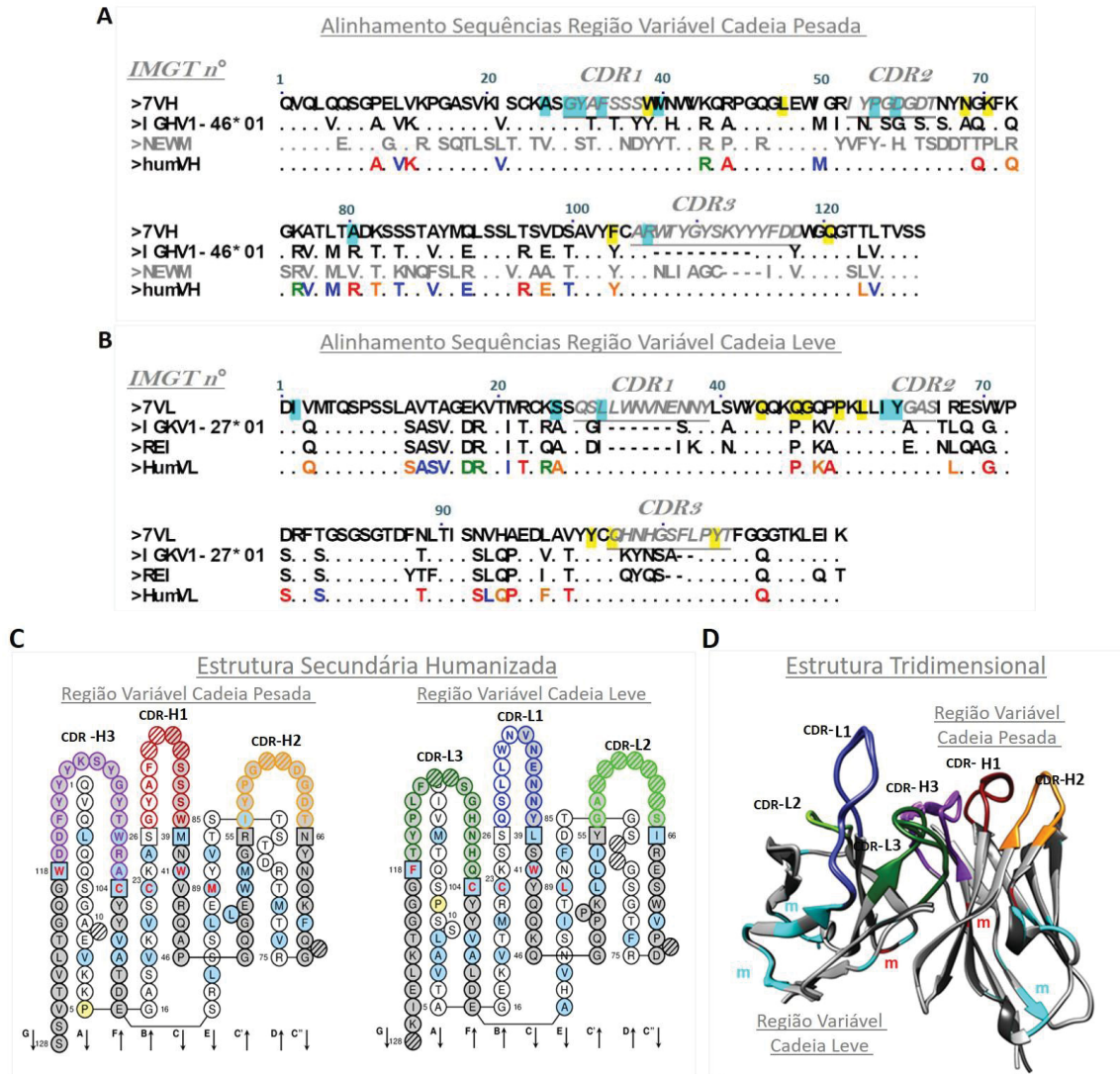
### 4.1 DESENHO, CONSTRUÇÃO E ANÁLISE ESTRUTURAL DO FRAGMENTO DE ANTICORPO RECOMBINANTE scFv<sub>15</sub>hLi7, PRIMEIRA GERAÇÃO, PROVENIENTE DO MONOCLONAL LimAb7

Com o auxílio do programa computacional IMGT, foi possível a análise de parâmetros para desenho e construção da humanização das regiões variáveis de cadeia pesada e leve do anticorpo monoclonal LimAb7. Primeiramente realizou-se o alinhamento das sequências aminoacídicas murinas de LimAb 7 regiões variáveis de cadeia pesada IGHV e leve IGKV com as sequências germinativas humana IGHV1\_46\*01 e IGKV1\_27\*01, respectivamente. O alinhamento permitiu a identificação das regiões de CDR e *framework* (FR). Na Figura 14A e 14B estão destacadas em cinza e itálico as regiões de CDR e em azul os resíduos chaves referentes à estrutura canônica. Baseando-se nos achados do alinhamento entre a sequência murina e a linhagem germinativa humana de anticorpo humano, a identificação das regiões de CDR e *framework*, estrutura canônica e avaliação das características físico-químicas dos aminoácidos procederam-se algumas substituições para a construção da sequência humanizada. As sequências aminoacídicas das regiões de CDR não foram alteradas. Substituições foram realizadas apenas em *framework* e, durante todo o processo do desenho da nova sequência para a construção do fragmento humanizado, as modificações foram analisadas em detalhe para confirmar a melhoria das principais características de humanização. Com o intuito de favorecer a estabilidade da molécula, todos os resíduos da região de *framework* 1 da cadeia leve foram modificados para sequência idêntica a encontrada na linhagem germinativa humana, além disso optou-se por não modificar os resíduos T(L90) e K(127). Essa estratégia foi empregada para o estabelecimento de um sítio de interação a proteína L (PpL) o que permitirá a recuperação dessa molécula após processo de produção. Para a IGVH, 23 resíduos de aminoácidos foram modificados e, em IGKV, 26 resíduos. Conforme a Figura 14, as modificações são claramente identificadas nas sequências referentes à humanização humVH (FIGURA 14A) e humVL (FIGURA 14B). No esquema, representando a estrutura secundária das sequências das regiões variáveis após a humanização, identificam-se as regiões de CDR que permanecem sem modificações



e as regiões de *framework* modificadas (FIGURA 14C). Um modelo estrutural 3D dos domínios variáveis humanizados de LimAb7 é mostrado na FIGURA 14D.

FIGURA 14: ALINHAMENTO E ESTRUTURAS DOS DOMÍNIOS VARIÁVEIS DO LimAb7 HUMANIZADO.



FONTES: a AUTORA, 2019

LEGENDA: A- Alinhamento da sequência de cadeia variável pesada murina do LimAb7 IGHV (7VH) com a sequência germinativa humana IGHV1-46\*01, a sequência da proteína NEWM e desenho da sequência humanizado LimAb7 IGHV (humVH). B- Alinhamento da sequência murina do LimAb7 IGKV (7VL) com a sequência germinativa humana IGKV1-27\*01, a sequência da proteína REI e o humanizado LimAb7 IGKV (humVL). C- Estrutura secundária dos domínios variáveis do LimAb7 humanizado esquematizada em forma de colar de pérolas (do francês "*collier de perles*"). D- Vista estereó do scFv<sub>15hLi7</sub> Fv com CDRs coloridos (H1: vermelho; H2: alaranjado; H3: roxo; L1: azul; L2: verde claro; L3: verde escuro). Resíduos mutados expostos na superfície estão em ciano e os internos estão em vermelho.

\*CDRs de acordo com o IMGT estão em itálico e em cinza. Sítios de resíduos chave (Chothia et al, 1992, Chothia et al, 1987) para estrutura canônica estão destacados em azul. Interfaces em VH/VL estão realçados em amarelo. \*Baseado nas classes físico químicas dos aminoácidos (AA), as diferenças das regiões de framework murina do LimAb7 e seus variantes humanizados são classificados em AA muito similar (verde), AA similar (azul), AA dissimilar AA (alaranjado) e AA muito dissimilar (vermelho).

Com base no estudo de alinhamento e análises das estruturas das regiões variáveis do LimAb 7, obtidas por sequenciamento, foi possível determinar o ângulo entre os domínios variáveis VH e VL (*packing angle*) que foi igual -42,8. Esse ângulo é importante na topografia do paratopo e consequente interação com o antígeno. O grau de humanização (escore – Z) das sequências VH e VL murinas foram -1,132 para VH e -1,164 para VL o que sugere risco de imunogenicidade já que o considerado como valores de baixa imunogenicidade encontram-se próximos de 0. É possível observar na TABELA 4 que após a humanização das sequências variáveis houve um aumento geral na porcentagem de identidade quando comparado com a linhagem germinativa humana. Também se verificou melhoria nos valores de escore – Z, sugerindo possível diminuição na imunogenicidade. As regiões de *framework* nas quais foram realizadas a maioria das substituições quando analisadas separadamente das regiões de CDR apresentaram mais de 95% de identidade com a linhagem germinativa humana para região variável pesada e 100% para região de cadeia leve.

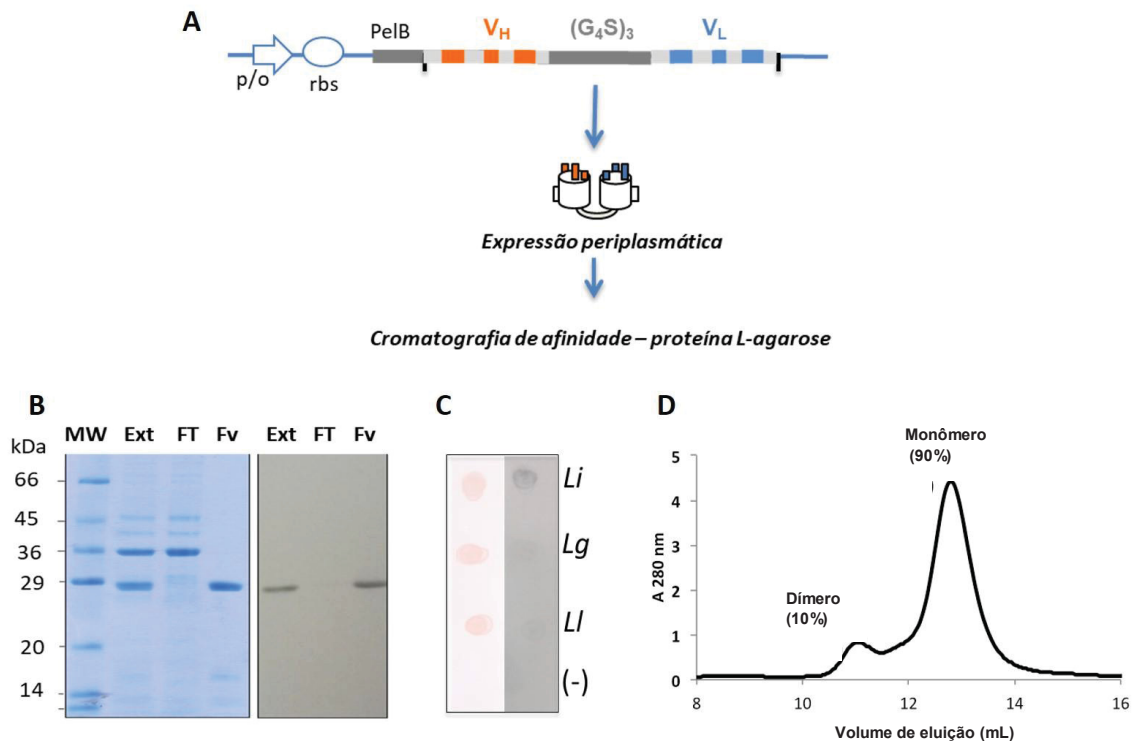
TABELA 4: ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE AS SEQUENCIAS DAS REGIÕES VARIÁVEIS MURINAS DO ANTICORPO LimAb7 E AS SEQUÊNCIAS MODIFICADAS APÓS HUMANIZAÇÃO COM SEQUENCIAS DAS LINHAGENS GERMINATIVAS HUMANA.

	Domínio Variável Total (CDR + <i>Framework</i> )				Região de <i>Framework</i>		
	Murino		Humanizado		Humanizado		
	% identidade	Escore - Z	% identidade	Escore - Z	FR1	FR2	FR3
IGHV	67,3	-1,132	86,7	-0,080	96	100	95
IGKV	71,0	-1,644	84,2	-0,232	100	100	100
<i>Packing angle</i>	-42,8		-45,4				

FONTE: a AUTORA, 2019

Com base em todas as análises comparativas das sequências das regiões variáveis do anticorpo LimAb 7 e modificações para humanização um gene novo sintético foi projetado. Esse gene teve seus códons otimizados para melhor expressão em sistema procarioto e codifica o fragmento variável de cadeia única (scFv) construído de maneira a conter o domínio VH fusionado ao domínio VL humanizado por meio de um ligante flexível de 15 resíduos, denominado scFv<sub>15</sub>hLi7 (single chain fragment variable, 15 resíduos de aminoácidos como ligante, humanizado, anti *L. intermedia*) (FIGURA 15A). O gene sintético otimizado foi

inserido em vetor pET 22b (+) que contém o peptídeo sinal PelB e após a transformação de bactérias, direciona a expressão do fragmento para o periplasma. O fragmento de anticorpo recombinante foi recuperado de outras proteínas periplasmáticas por cromatografia de afinidade utilizando resina de proteína L-agarose. A verificação por eletroforese em gel de poliacrilamida da expressão e purificação do fragmento scFv<sub>15hLi7</sub> a partir do extrato periplasmático de bactérias mostrou a presença de uma proteína com massa molecular de aproximadamente 29 kDa (massa esperada para o fragmento) em todas as amostras analisadas após a coloração com *Coomassie blue*. O *Western blotting* confirmou a presença desta proteína única de 29 kDa evidenciada pelo conjugado PpL-peroxidase sugerindo a eficiência na produção e purificação do fragmento (**FIGURA 15B**). Para avaliar a habilidade de interação do fragmento expresso com o veneno de *L. intermedia* uma triagem através da técnica de *dot blot* permitiu a observação do scFv<sub>15hLi7</sub> em ligar ao veneno de *L. intermedia* de maneira específica, sem reatividade cruzada detectável com venenos de *L. laeta* e *L. gaucho* (**FIGURA 15C**). Para confirmar a pureza e presença de agregados e / ou produto de degradação do fragmento a amostra scFv<sub>15hLi7</sub> purificada em solução foi analisada por cromatografia de exclusão molecular em fluxo contínuo (SEC-HPLC). Dois picos de eluição foram observados, um menor com produto que apresentava uma massa molecular aproximada de 40-50 kDa e, um pico maior (correspondendo a 90%) com proteínas com massa na faixa de 25-30 kDa (**FIGURA 15D**). Estima-se que o primeiro pico corresponda a forma dimérica do fragmento scFv<sub>15hLi7</sub>, podendo ser resultado de agregados de proteínas mal dobradas no processo de expressão e/ou purificação, este último pelo emprego de tampões em condições ácidas. O segundo pico provavelmente corresponde a forma correta do fragmento uma proteína monomérica, o scFv<sub>15hLi7</sub>.

FIGURA 15: DESENHO, EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DO scFv<sub>15</sub>hLi7.

FONTE: a AUTORA, 2019

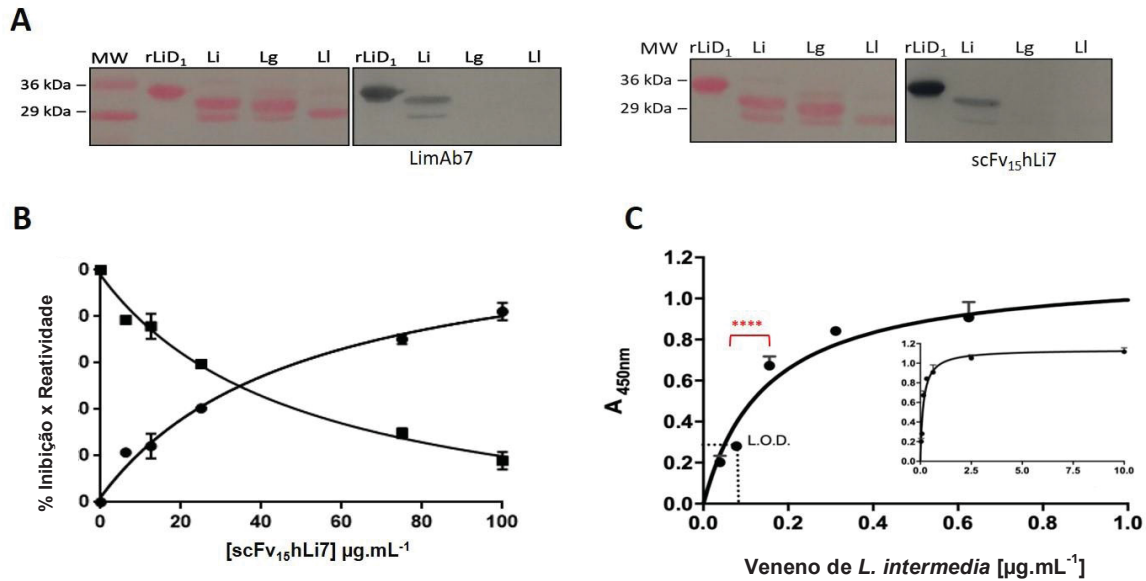
LEGENDA: A- Representação esquemática do cassete de expressão. A estrutura de leitura aberta está sob o controle de um promotor T7 e contém uma sequência de sinal PelB para expressão periplasmática seguida por um cDNA que codifica V<sub>H</sub> e V<sub>L</sub> humanizado fundidos por meio de um ligante (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub>. Isso permite a expressão de scFv<sub>15</sub>hLi7 monomérico não marcado. B- Análise da expressão do fragmento scFv<sub>15</sub>hLi7 no extrato periplásmico por eletroforese em gel de poliácridamida (SDS-PAGE) e *Western blot* antes e após purificação em cromatografia de afinidade resina de PpL-agarose. À esquerda SDS-PAGE a 12,5% em condições não redutoras corado com azul de Coomassie. Frações recuperadas da cromatografia de afinidade resina PpL correspondem (Ext) extrato periplásmico bruto; (FT) fração que não ligou à coluna, (FV) proteínas eluídas pela solução ácida pH 2,0; (MW) Marcador de massa molecular. À direita membrana de nitrocelulose para análise de *Western blot* evidenciada com conjugado PpL-peroxidase (1: 4000). C- Análise de *Dot blot* do extrato periplásmico contendo scFv<sub>15</sub>hLi7 recombinante. Os venenos de *L. intermedia* (Li), *L. laeta* (Li) e *L. gaucho* (Lg) foram adsorvidos diretamente na membrana de nitrocelulose a uma concentração de 2,5µg. Lado esquerdo: Confirmação da presença dos venenos na membrana por coloração reversível de *Ponceau*. Lado direito: membrana de nitrocelulose incubada com extrato periplásmico contendo scFv<sub>15</sub>hLi7 recombinante evidenciada com PpL-peroxidase. (-) sem veneno adsorvido. D- Cromatografia por exclusão de tamanho usando a coluna de Superdex 200 10/30, apresentando a percentagem de monômeros do fragmento.

#### 4.2 CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DO FRAGMENTO DE ANTICORPO scFv<sub>15</sub>hLi7

A habilidade de interação do fragmento de anticorpo scFv<sub>15</sub>hLi7 foi comparada à especificidade do anticorpo parental LimAb 7 frente aos venenos totais de *Loxosceles* e a toxina recombinante rLiD1. Após a separação dos componentes dos venenos por migração eletroforética e transferências das proteínas para membrana de nitrocelulose foi possível a observação de uma banda referente a uma

proteína com aproximadamente 35 kDa para o perfil de rLiD1 e duas bandas de aproximadamente 32 e 35 kDa apenas para o veneno de *L. intermedia* mostrando que o fragmento permanece com o mesmo padrão de reconhecimento e especificidade da molécula parental LimAb7. O epítipo reconhecido por esse fragmento é compartilhado pelas isoformas PLD pertencente somente ao veneno de *L. intermedia* (FIGURA 16A). Para avaliar se o scFv<sub>15</sub>hLi7 interage com o mesmo epítipo de ligação que o LimAb7 frente ao veneno de *L. intermedia* diferentes concentrações do fragmento foram testadas para verificar a habilidade de competição. O fragmento scFv<sub>15</sub>hLi7 foi capaz de competir com a IgG parental LimAb7 de maneira dose-dependente. A FIGURA 16B mostra os perfis de inibição e reatividade do LimAb 7 na presença do fragmento de anticorpo recombinante. Concentrações mais altas do fragmento demonstraram inibir a ligação da molécula parental ao veneno e, assim, resultar em uma diminuição na reatividade. Foi estimado que cerca de 38 µg/mL de scFv<sub>15</sub>hLi7 são necessários para inibir 50% da ligação com 1 µg/mL do LimAb7. Na Figura 16C, conforme se aumenta a quantidade de fragmento verifica-se também um aumento na reatividade frente ao veneno de forma dose dependente. Ainda foi possível verificar que o fragmento foi eficiente em reconhecer toxinas do veneno de *L. intermedia* em solução com um limite de detecção de até 78 ng.mL<sup>-1</sup> para toxinas solúveis.



FIGURA 16: CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DO scFv<sub>15</sub>hLi7.

FONTES: a AUTORA, 2019

LEGENDA: A- *Western blot* após transferência do SDS-PAGE 15% de rLiD<sub>1</sub> (10  $\mu\text{g}$ ) ou venenos de *Loxosceles* (10  $\mu\text{g}$ ) sob condições não redutoras. À esquerda proteínas coradas por Ponceau e a direita membrana de nitrocelulose incubada com LimAb7 (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ou extrato periplasmático contendo scFvLi<sub>15</sub>hLi7, evidenciados por anti IgG de mouse-HRP (1:4000) e PpL-peroxidase (1:4000), respectivamente. Li: *L. intermedia*; Lg: *L. gaucho*; Ll: *L. laeta*. B- ELISA competição: imobilizado *L. intermedia* (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e adicionado 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de LimAb7 com quantidades crescente de scFv<sub>15</sub>hLi7. Imunocomplexos foram detectados usando anti IgG de mouse-HRP (1:4.000). A percentagem de inibição e reatividade é representada em (●) e (■), respectivamente. C- ELISA sanduíche: imobilizado anti-*L. intermedia* F(ab)<sub>2</sub> de cavalo (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e capturado quantidades graduadas de veneno de *L. intermedia*, em seguida foi adicionado 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de scFv<sub>15</sub>hLi7. Imunocomplexos foram detectados com PpL-peroxidase 1:2.000.

#### 4.3 MODELAGEM E DOCKING DO FRAGMENTO DE ANTICORPO scFv<sub>15</sub>hLi7

Para entender melhor o mecanismo de neutralização do LimAb7, procedeu-se a modelagem dos domínios variáveis de LimAb7 e scFv<sub>15</sub>hLi7 antes da predição do *docking in silico* com rLiD<sub>1</sub>. Modelos (*templates*) de alta identidade com as sequências alvo do LimAb7 e scFv<sub>15</sub>hLi7 foram apresentados através de pesquisas no BLAST. As pesquisas permitiram a seleção de estruturas para a modelagem de maneira confiável baseando-se na preservação dos resíduos CDR e cálculo da probabilidade de identidade (valor-E). Baseando-se em observações do gráfico de *Ramachandran*, que permite avaliar combinações possíveis de ângulos diédricos  $\Psi$  (psi) versus os  $\phi$  (phi) nos aminoácidos de um polipeptídeo, foi determinado uma possível estrutura secundária e conformacional da proteína sendo seus modelos escolhidos mostrados na TABELA 5. A avaliação do gráfico de *Ramachandran* para os anticorpos selecionados mostrou mais de 90% dos resíduos de aminoácidos em

regiões favoráveis. A qualidade do modelo (*template*) também foi analisada comparando a estrutura predita do anticorpo selecionado com o modelo via sobreposição dos conjuntos de coordenadas atômicas, e verificação da distância média quadrática mínima (RMSD, do inglês *Root Mean Square Deviation*) entre as estruturas básicas das proteínas sobrepostas. De acordo com essas avaliações a estrutura predita para o anticorpo LimAb7 e também para o fragmento scFv<sub>15hLi7</sub> apresentaram aproximadamente 60% de identidade ao modelo, resolução de 1,35 Ångstroms (Å) considerada alta resolução já que para proteínas esse valor encontra-se entre 1,0 Å e 1,8 Å com valores de RMSD na ordem de ~0,7 Å considerado valor de alta similaridade tendo em vista que quanto menor o RMND entre as estruturas maior a similaridade (TABELA 5).

TABELA 5: DADOS DA MODELAGEM *IN SILICO*.

Alvo (anticorpos)	Modelo (PDB:cadeia)	Identidade (%)	Resolução (Å)	RMSD (Å)
LimAb7	5YD3_A	59	1.35	0.871
scFv <sub>15hLi7</sub>	5YD3_A	61.5	1.35	0.659

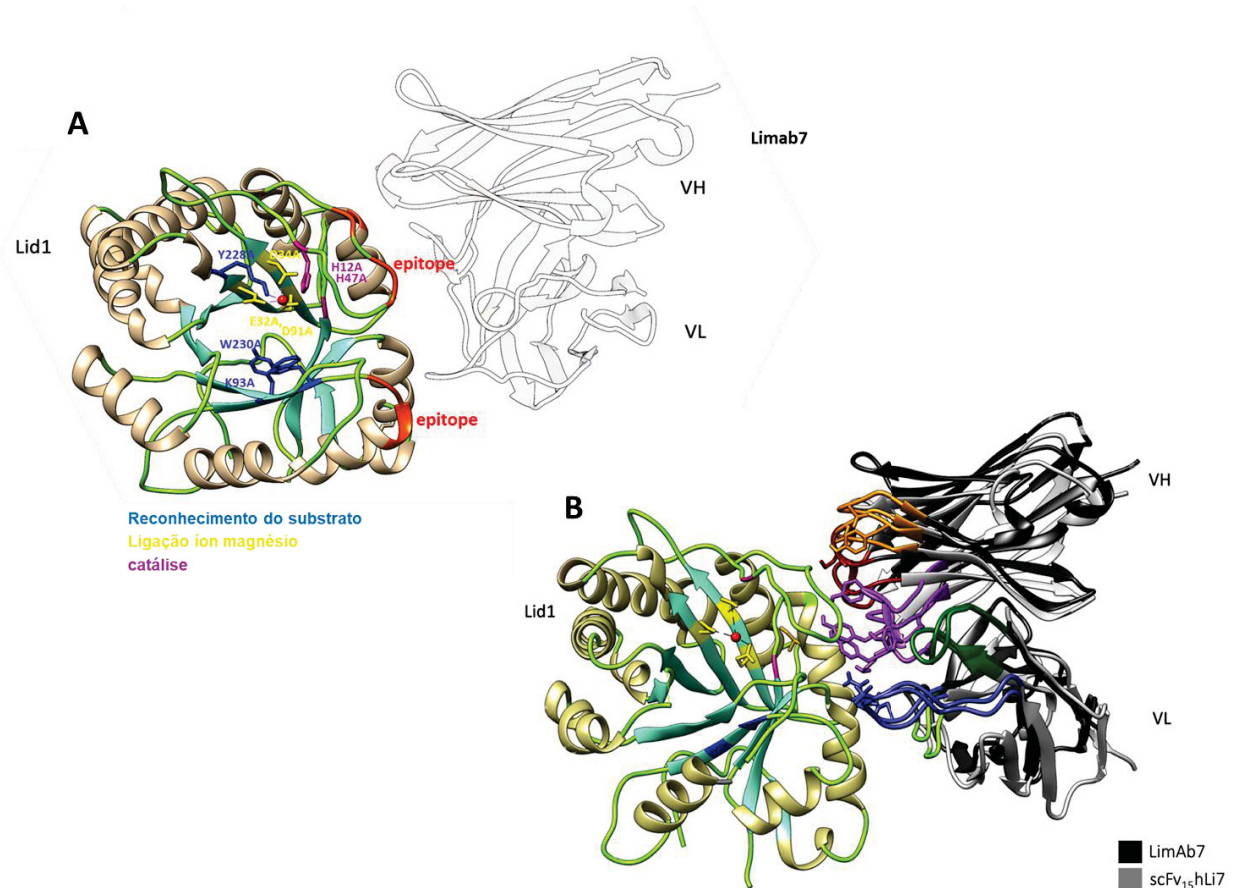
FONTE: a AUTORA, 2019

As avaliações do *docking* entre o anticorpo LimAb7 ou o fragmento scFv<sub>15hLi7</sub> com a rLiD1 permitiu a identificação dos possíveis sítios de interação entre essas moléculas. O *docking* exhibe os resíduos pertencentes ao epítipo da rLiD (D233, K234, R235, Y253) com às interações dos CDR das cadeias VH e VL do LimAb7. Alguns resíduos presentes na interação entre LimAb7 e rLiD1 (K58, K59) ou scFv<sub>15hLi7</sub> e rLiD1 (D21, E22, D25), são considerados altamente imunogênicos. Outras regiões pertencentes a rLiD1 resíduos 58-72 (CYGSKKYENFNDFLKGLR) e resíduos 25-51 (NLGANSIETDVSFDDNANPEYTYHGIP) foram identificados como importantes alvos para anticorpos neutralizantes. Os resíduos G32, N34, D91, H12 e H47 foram descritos como parte do sítio ativo da enzima e do local de ligação ao íon Mg<sup>2+</sup>. Os resíduos de aminoácidos G54 e R55 (conservado entre algumas isoformas das fosfolipase) são importantes para a estabilização da interação do *loop* catalítico e do substrato e, foram reconhecidos pelo LimAb7. A análise de *docking* entre o scFv<sub>15hLi7</sub>: rLiD1 ainda mostra contatos nas mesmas regiões que o anticorpo LimAb7, no entanto, alguns contatos com aminoácidos importantes foram perdidos (D233, G54). Além disso, novos contatos foram observados, incluindo os resíduos



D21, E22, N25, D255, sugerindo um deslocamento no local da interação quando comparado ao LimAb7 (FIGURA 17) (MIETHE et al., 2016).

FIGURA 17: DOCKING DO LimAb7, scFv<sub>15</sub>hLi7 COM A RECOMBINANTE Lid1.



FONTE: a AUTORA, 2019

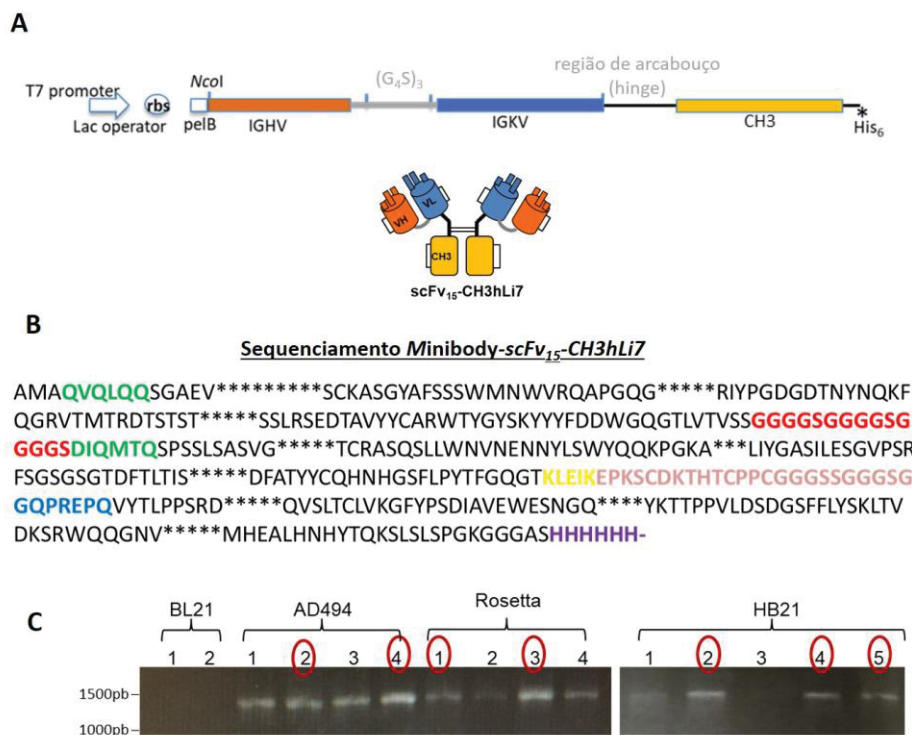
LEGENDA: A- *Docking* do LimAb7 com rLiD evidenciando os sítios de interação. Aminoácidos envolvidos na catálise estão em roxo (H12A, H47A), sítios de ligação ao íon magnésio estão em amarelo (E32A, D34A, D91A), reconhecimento do substrato está em azul (K93A, Y228A, and W230A) e a predição do epítipo proposto para Limab7 está em vermelho. B- Sobreposição dos modelos para LimAb7 e scFv<sub>15</sub>hLi7. CDRs das cadeias VL e VH estão representados de acordo com o esquema de cores (verde, azul, roxo, alaranjado, vermelho) e as regiões de *framework* estão em preto para LimAb7 e cinza para scFv<sub>15</sub>hLi7.

#### 4.4 MINIBODY-scFv<sub>15</sub>-C<sub>H</sub>3hLi7 - DESENHO, CONSTRUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO FRAGMENTO DE ANTICORPO RECOMBINANTE.

Com intuito de aumentar o tamanho da molécula e favorecer o processo de reconhecimento e neutralização das fosfolipases por impedimento estérico, foi adicionado à sequência do scFv<sub>15</sub>hLi7 um domínio constante pesado (CH3) de imunoglobulina IgG1 humana após a região de arcabouço (*hinge*) o que permite a dimerização deste fragmento e a expressão com tamanho intermediário, de aproximadamente 80 kDa. O gene, denominado scFv<sub>15</sub>-C<sub>H</sub>3hLi7 (*minibody*), foi

construído e sintetizado pela Genscript® em vetor de clonagem pUC57, constituído das sequências humanizadas de IGHV de LimAb7 ligado ao domínio IGVK através de um ligante flexível  $(Gly_4Ser)_3$  e fusionado ao CH3. Sítios de restrição foram introduzidos nas extremidades 3' e 5', de modo a facilitar a clonagem (FIGURA 18A). Após a confirmação do sequenciamento (FIGURA 18B) o gene foi transferido para vetor de expressão pSW e utilizado para transformar diferentes cepas de bactérias *E. coli* AD494pLysS, BL21 (DE3), HB21 e Rosetta. A FIGURA 18C mostra a presença do inserto contendo aproximadamente 1.200 pares de bases, nas bactérias que foram corretamente transformadas e os números circulos correspondem aos clones selecionados para a expressão da proteína recombinante. Apenas bactérias da cepa BL21 não apresentaram o inserto.

FIGURA 18: *MINIBODY* scFv<sub>15</sub>-C<sub>H</sub>3hLi7.

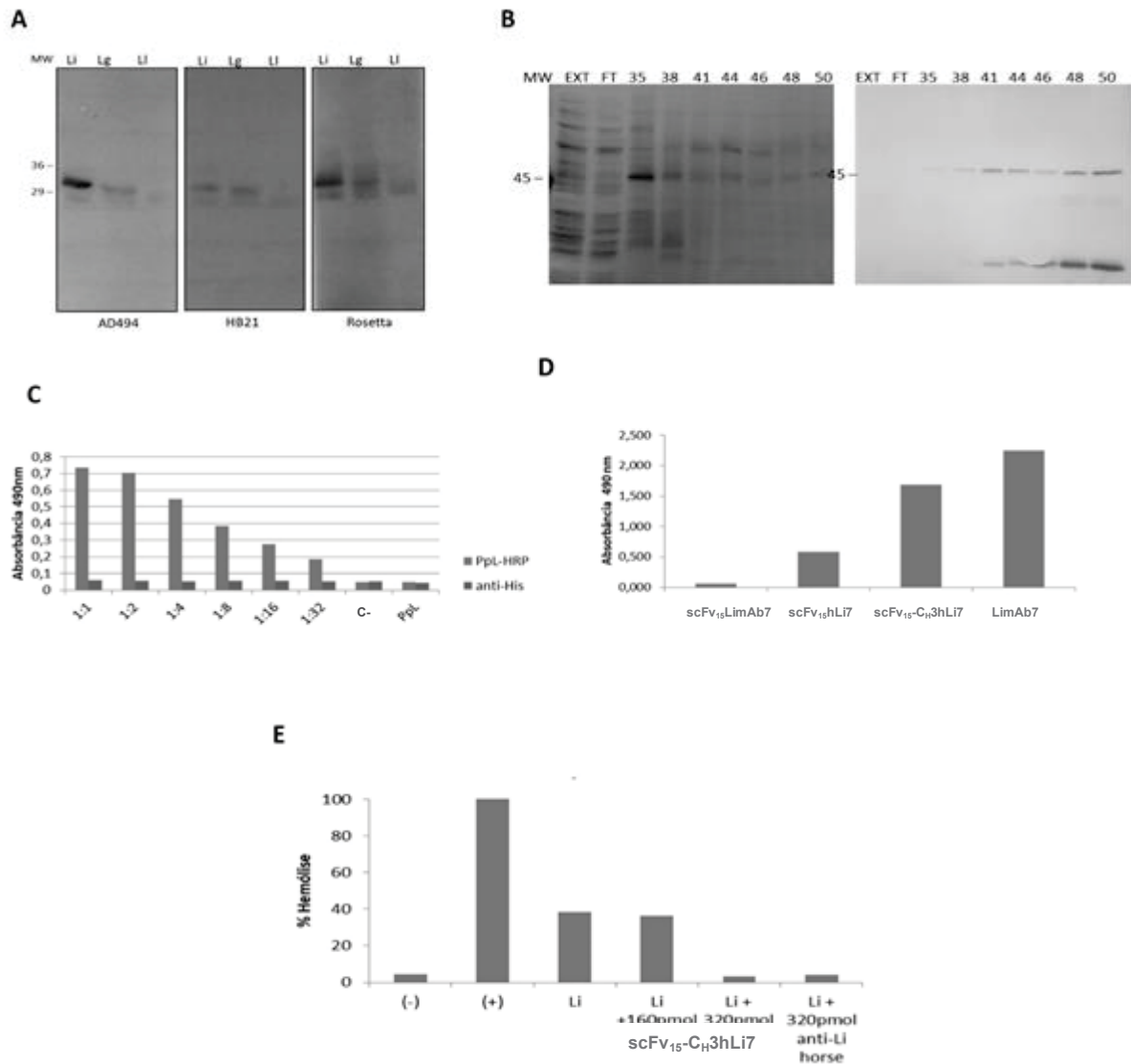


FONTE: a AUTORA, 2019.

LEGENDA: desenho, construção e sequenciamento do gene sintético. A- Representação esquemática do scFv<sub>15</sub>-C<sub>H</sub>3hLi7 (*minibody*). B- Sequencia do scFv<sub>15</sub>-C<sub>H</sub>3hLi7 contendo cadeia variável pesada, *linker*, cadeia variável leve, região de arcabouço (*hinge*), cadeia constante CH3. C- Gel agarose 1,5% mostrando o inserto nas diferentes cepas de *E. coli* após reação de PCR. Os números circulos correspondem às colônias escolhidas de cada cepa.

As diferentes cepas foram submetidas à expressão da proteína recombinante na tentativa de selecionar a mais eficaz para expressão desse fragmento. Na FIGURA 19A verificou-se que o fragmento proveniente da cepa

Rosetta apresentou baixo reconhecimento e inespecificidade frente às proteínas do veneno, o mesmo perfil de interação foi observado para a cepa HB21 com reatividade ainda menor. Apenas o extrato da bactéria AD494 contendo o scFv<sub>15</sub>-C<sub>H</sub>3hLi7 foi eficiente em reconhecer prioritariamente proteínas presentes no veneno de *L. intermedia* mantendo o mesmo perfil da molécula parental LimAb7. Dessa forma esse fragmento foi expresso e obtido sob diferentes estratégias de purificação (Sephacrose-proteína A, Sepharose-proteína G, Sepharose-veneno Li, Sepharose-Ni, Agarose-Ni, Hi-Trap 1mL). No entanto, para todas essas estratégias verificou-se um baixo rendimento, em torno de 9 µg/L e, mesmo com a HITRAP teve eficiência de 15 µg/L. A FIGURA 19B mostra que o fragmento, purificado pela HITRAP, foi eluído com gradiente de 0-100% de uma solução contendo 500 mM imidazol. Os números da FIGURA 19B inferem às frações eluídas e a presença do scFv<sub>15</sub>-C<sub>H</sub>3hLi7 nas últimas frações correspondem a concentração de aproximadamente 500 mM de imidazol. Os dímeros formados após expressão apresentam massa molecular de aproximadamente 85 kDa e quando não estão dimerizados a massa molecular avaliada é de aproximadamente 43 kDa. Esses dados permitiram a verificação da eficiência de expressão e purificação do *minibody* através de análise de SDS-PAGE e *Western Blotting*. O extrato periplasmático do fragmento scFv<sub>15</sub>-C<sub>H</sub>3hLi7 foi avaliado em diferentes diluições frente ao veneno de *L. intermedia*. Como visto anteriormente para os ensaios de ELISA, o marcador do fragmento com o sítio de interação para a proteína L mostrou melhores resultados quando comparado ao marcador com tag de histidina. Observou-se que a reatividade frente ao veneno diminui à medida que o extrato periplasmático é diluído sugerindo a presença do fragmento no extrato, sendo que quanto maior a reatividade possivelmente maior a concentração deste, bem como a interação com o veneno sugere que este fragmento é funcional (FIGURA 19C). A habilidade de ligação do extrato periplasmático contendo o scFv<sub>15</sub>-C<sub>H</sub>3hLi7 à toxina foi comparada com outros extrato contendo o scFv<sub>15</sub>LimAb7 ou o scFv<sub>15</sub>hLi7. A reatividade para o scFv<sub>15</sub>-C<sub>H</sub>3hLi7 foi maior frente ao veneno que os demais fragmentos testados (FIGURA 19D). Para avaliar o potencial de neutralização *in vitro* deste fragmento, diferentes concentrações de scFv<sub>15</sub>-C<sub>H</sub>3hLi7 foram incubados com eritrócitos humanos na presença de 2,5 µg/mL de veneno de *L. intermedia*. Na concentração de 320 pmol do fragmento houve diminuição da atividade hemolítica (FIGURA 19E).

FIGURA 19: CARACTERIZAÇÃO IMUNOQUÍMICA E FUNCIONAL DO scFv<sub>15</sub>-C<sub>H</sub>3hLi7 (MINIBODY).

FONTES: a AUTORA, 2019

LEGENDA: A- *Western blotting*. 10 µg de proteínas dos venenos foram separadas por SDS-PAGE 12,5% e transferidas para membrana de PVDF. Incubado extratos periplasmáticos das diferentes cepas de *E. coli* por 16h/4°C. As bandas foram detectadas com uso de anti-histidina (1:1000) por 1h/37°C seguido de anti-mouse HRP(1:4000) por 1h/37°C. Revelação foi observada por 2min de exposição no filme de raio-x por quimioluminescência (ECL). B- 30 µL de scFv<sub>15</sub>-C<sub>H</sub>3hLi7 (purificado em Hi-Trap) com agente redutor (betamercaptoetanol) foram separadas por SDS-PAGE 15% e transferidas para membrana de nitrocelulose. Os números representam os tubos referentes ao gradiente de eluição com imidazol (0-100%). Após bloqueio por 16h/4°C, o fragmento de anticorpo foi detectado com anti-histidina (1:1000) por 1h/37°C seguido de anti-mouse HRP (1:4000) por 1h/37°C. A membrana foi exposta a DAB e cloronaftol para visualização das bandas. C e D - ELISA indireto. Imobilizado 5 µg/mL de veneno de Li por 16h/4°C, incubado com extrato periplasmático contendo C<sub>H</sub>3hLi7 titulado ou sem inserto (controle negativo, C-) (C) ou 100 µL de diferentes extratos periplasmáticos contendo fragmentos (scFv<sub>15</sub>LimAb7, scFv<sub>15</sub>hLi7 ou scFv<sub>15</sub>-C<sub>H</sub>3hLi7). Detecção deu-se com proteína L-HRP (1:2000) (C e D), anti histidina (1:1000) (C) ou anti-mouse HRP(1:4000) (D) por 1h/37°C. Solução contendo OPD foi adicionada e após 15 minutos a absorbância foi lida em um leitor a 490 nm. E- eritrócitos humanos (10<sup>8</sup> células) foram incubados com 2,5 µg/mL de veneno de Li e diferentes concentrações do anticorpo scFv<sub>15</sub>-C<sub>H</sub>3hLi7 (0 - 320 pmol). Controle para neutralização: 320 pmol de anticorpo policlonal de cavalo anti Li (anti Li). A porcentagem de reatividade foi determinada utilizando os valores do controle positivo (Triton X-100) como 100% de hemólise (C+). Ringer foi usado como controle negativo (C-). A leitura da absorbância foi realizada a 570 nm.

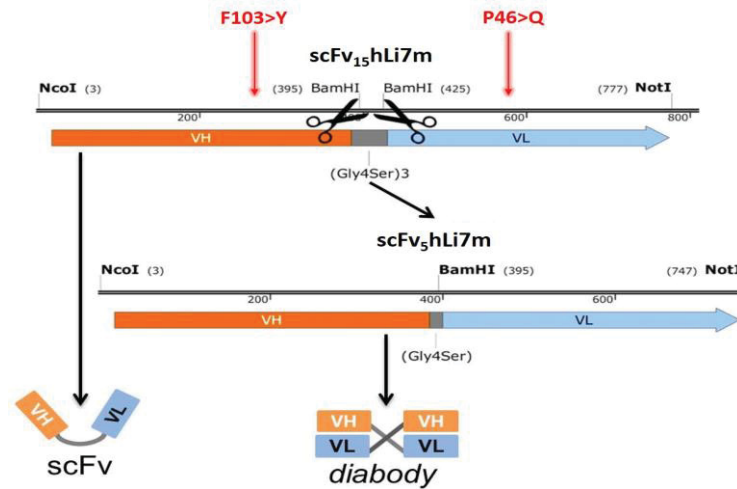
No entanto, de acordo com o observado pelo SDS-PAGE e *western blotting* não foi possível a obtenção do fragmento puro tendo necessidade de altas concentrações da molécula para neutralização da atividade hemolítica. Apesar das bactérias apresentarem-se como bons sistemas de expressão de proteínas heterólogas dependendo da construção da proteína a ser expressa, sistemas evolutivamente mais desenvolvidos são necessários para a expressão de fragmentos mais elaborados como no caso do scFv<sub>15</sub>-C<sub>H</sub>3hLi7. Contudo, independente do sistema de expressão, faz-se necessário avaliar a sequência da molécula, pois esta pode interferir na estabilidade e, assim influenciar na expressão, rendimento e funcionalidade da mesma.

#### 4.5 REDESENHO, CONSTRUÇÃO E ANÁLISE ESTRUTURAL DO FRAGMENTO DE ANTICORPO RECOMBINANTE scFv<sub>15</sub>hLi7m E scFv<sub>5</sub>hLi7m (*DIABODY*)

Considerando os achados na literatura e a análise de *docking* que sugerem que o epítipo reconhecido pelo LimAb7 é próximo ao sítio catalítico da rLiD e que o processo de humanização da primeira geração de fragmentos scFv<sub>15</sub>-hLi7 conduziu a um deslocamento entre a ligação da molécula ao epítipo e, uma possível alteração na interação antígeno-anticorpo, tornou-se necessário redesenhar o fragmento, pois alterando apenas o tamanho da molécula (scFv<sub>15</sub>-C<sub>H</sub>3hLi7) não foi capaz de solucionar essa questão. Primeiramente, duas mutações reversas (*backmutation*) (F 103> Y em IGHV e P 46> Q em IGKV de acordo com a numeração fornecida pelo IMGT) na sequência do fragmento de anticorpo humanizado foram realizadas. Posteriormente, essa nova versão do anticorpo humanizado foi produzido em dois formatos: um scFv monomérico designado como scFv<sub>15</sub>hLi7m e um scFv dimérico denominado *diabody* scFv<sub>5</sub>hLi7m. Para a construção do *diabody* o inserto referente ao scFv monomérico foi utilizado. O inserto gênico que codifica o scFv apresenta entre o gene de VH e VL uma região que codifica 15 aminoácidos responsáveis pela junção do VH ao VL. Nessa região estão contidos dois sítios para a enzima *BamHI*. Ao submeter esse inserto a digestão enzimática com *BamHI*, foi possível reduzir a região de junção para uma região que codifica apenas 5 resíduos de aminoácidos. A diminuição na região de junção impede a flexibilidade de dobramento da molécula, o que favorece a dimerização entre elas (FIGURA 20).



FIGURA 20: REDESENHO DO GENE PARA O FRAGMENTO DE ANTICORPO HUMANIZADO COM A MUTAÇÃO REVERSA.



FONTE: MORETTO, 2018

LEGENDA: Representação esquemática do cassete do gene para o fragmento no formato monomérico  $scFv_{15}hLi7m$  e no formato dimérico (diabody)  $scFv_{5}hLi7m$  através da reação de digestão enzimática pela enzima de restrição *BamHI*, reduzindo o *linker* a cinco resíduos de aminoácidos.

Análises realizadas após as mutações reversas mostraram que o *packing angle* entre VH / VL (-42,8) do fragmento de anticorpo foi restaurado sugerindo o reestabelecimento da topografia original do local de ligação ao antígeno e possivelmente a estabilidade estrutural do paratopo. A pontuação de humanização (escore - Z) das sequências de VH e VL humanizadas após mutações reversas foram -0,1 e -0,4, respectivamente; valores diminuídos consideravelmente quando comparados aos valores para o fragmento murino e/ou o humanizado o que sugere menor risco de imunogenicidade já que o considerado como valores de baixa imunogenicidade encontram-se próximos de 0 (TABELA 6).

TABELA 6: ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE AS SEQUÊNCIAS DAS REGIÕES VARIÁVEIS MURINAS DO ANTICORPO LimAb7 COM AS HUMANIZADAS ANTES E APÓS MUTAÇÃO REVERSA

	Domínio Variável Total (CDR + <i>Framework</i> )						Região de <i>Framework</i>		
	Murino		Humanizado		Humanizado após mutação reversa		FR1	FR2	FR3
	Identidade %	Escore - Z	Identidade %	Escore - Z	Identidade %	Escore - Z			
IGHV	67,3	-1,132	86,7	-0,080	87,8	-0,1	100	100	91,1
IGKV	71,0	-1,644	84,2	-0,232	83,0	-0,4	88	93,3	100
<i>Packing angle</i>	-42,8		-45,4		-42,8				

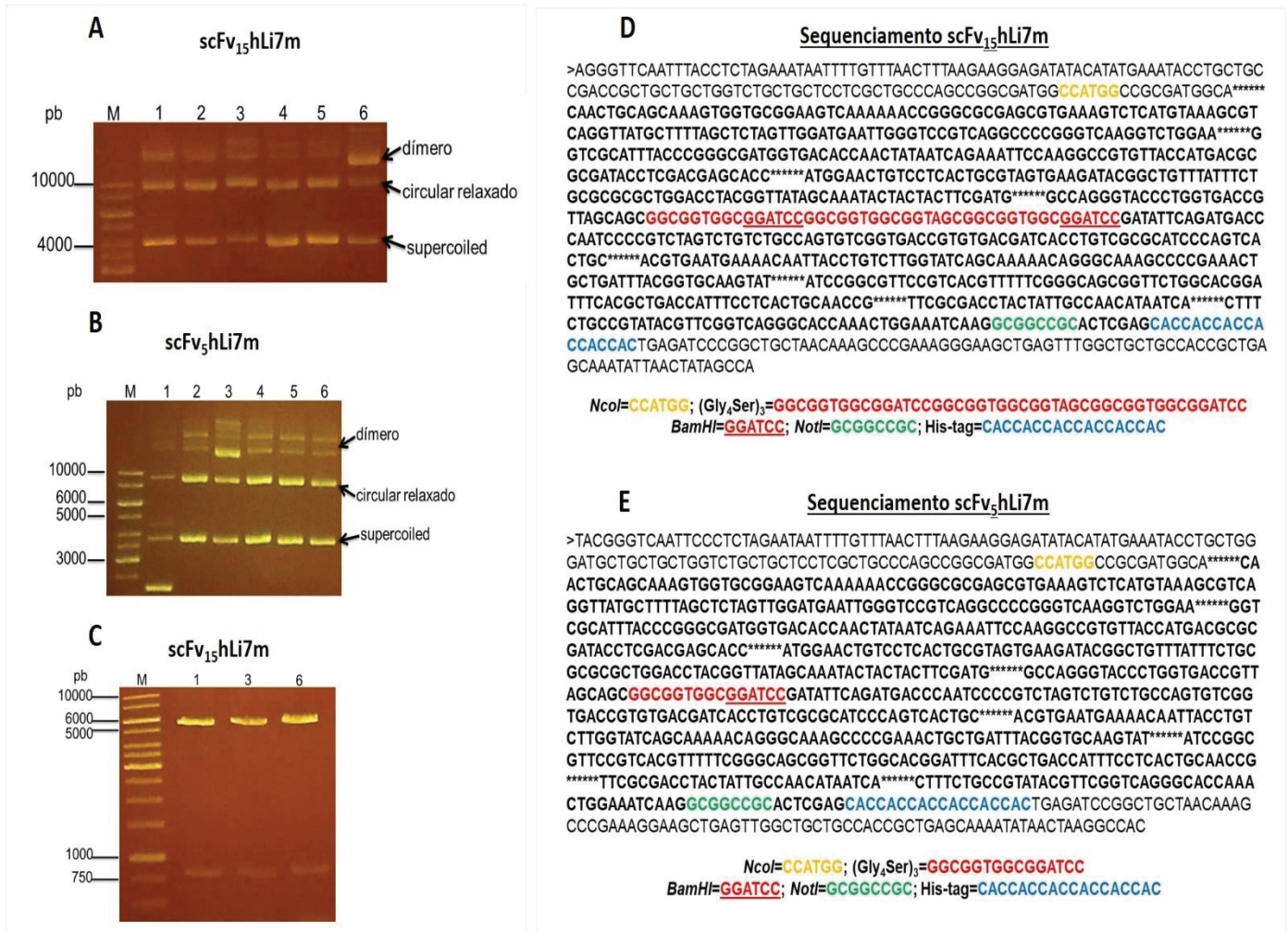
FONTE: a AUTORA, 2019

#### 4.6 CLONAGEM E AMPLIFICAÇÃO DOS GENES CODIFICANTES PARA OS FRAGMENTOS HUMANIZADOS APÓS MUTAÇÃO REVERSA scFv<sub>15</sub>hLi7m E scFv<sub>5</sub>hLi7m.

Para clonar os insertos referentes aos fragmentos scFv<sub>15</sub>hLi7m e scFv<sub>5</sub>hLi7m estes foram inseridos separadamente no vetor pET-22b (+) e bactérias TOP 10 foram transformadas para a amplificação do inserto. Os clones crescidos em meio LB ágar (na presença de antibiótico) foram selecionados para a confirmação da transformação. Após extração e purificação do vetor, foi possível visualizar em gel de agarose o vetor nas suas três formas conformacionais: 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 21A e 21B). Após confirmação da transformação das 6 colônias, os 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 fragmento de anticorpo, já que para a cadeia pesada temos 450 pb e cadeia leve 350 pb mais a região codificante do ligante (total ~800pb), e o vetor linearizado sem inserto com 5493 pares de base (FIGURA 21C resultado para scFv<sub>15</sub>hLi7m). Os mesmos resultados foram visualizados para scFv<sub>5</sub>hLi7m (dados não mostrados). Realizou se também o sequenciamento do material genético obtido das colônias de *E. coli* positivas para o pET-22b (+) + inserto scFv<sub>15</sub>hLi7m ou inserto scFv<sub>5</sub>hLi7m. Verificou-se que nenhuma mutação foi inserida ao longo dos processos de amplificação do vetor (FIGURA 21D e 21E).



FIGURA 21: CLONAGEM E AMPLIFICAÇÃO DOS GENES CODIFICANTES PARA OS FRAGMENTOS HUMANIZADOS APÓS MUTAÇÃO REVERSA scFv<sub>15</sub>hLi7m e scFv<sub>5</sub>hLi7m.



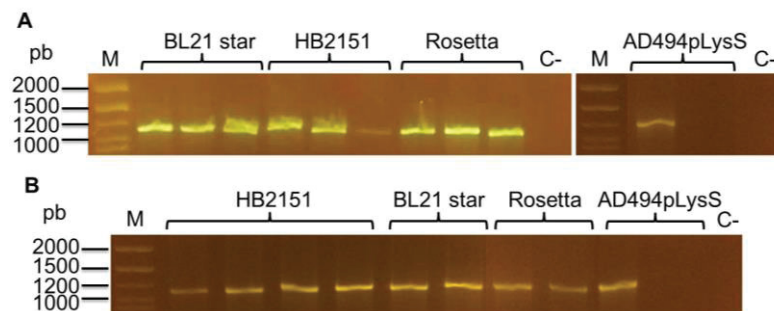
FONTE: a AUTORA, 2018

LEGENDA: A e B - Gel de agarose 1% após extração de DNA plasmidial confirmando a presença do vetor na bactéria TOP10. Números representam as colônias. As setas indicam as possíveis formas do vetor. C - 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. pb=pares de base. D e E- resultado do sequenciamento obtido a partir do produto de *miniprep* purificado confirmando o gene para o scFv<sub>15</sub>hLi7m e scFv<sub>5</sub>hLi7m. \*=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 dois 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 22).

FIGURA 22: PCR DE COLÔNIA DAS CEPAS DE EXPRESSÃO.



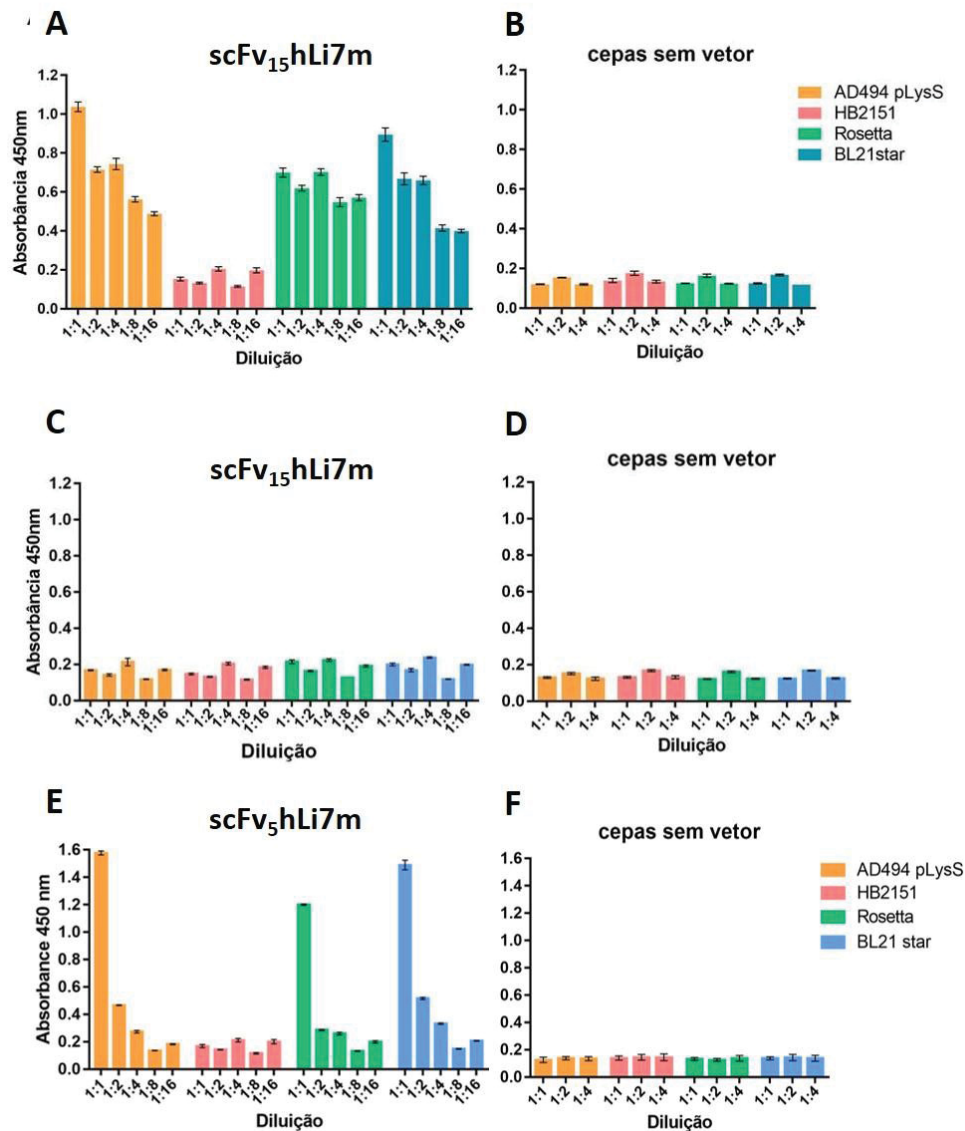
FONTE: a AUTORA, 2019

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.

Ambos os fragmentos scFv<sub>15</sub>hLi7m e scFv<sub>5</sub>hLi7m foram expressos nas diferentes cepas de bactérias aqui transformadas, sendo induzidos 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 enzima HRP e proteína L também marcada com uma enzima. Primeiramente, os extratos periplasmáticos contendo o fragmento

scFv<sub>15</sub>hLi7m 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 (FIGURA 23A e 23C). Não foi possível evidenciar reatividade do fragmento frente ao veneno quando a detecção foi realizada pela adição de IgG anti-histidina, sendo estas reatividades comparáveis ao controle negativo que são os extratos periplasmáticos de bactérias não transformadas (FIGURA 23C e 23D). No entanto, a detecção com proteína L-HRP 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 (FIGURA 23B). Os extratos periplasmáticos do fragmento scFv<sub>5</sub>hLi7m também 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 do tag 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 (FIGURA 23E), assim como observado para o scFv<sub>15</sub>hLi7m. O extrato da cepa HB2151 apresentou reatividade muito baixa, similar à dos extratos das cepas não transformadas usadas como controle negativo da reação (FIGURA 23F).

FIGURA 23: ELISA DIRETO DO EXTRATO PERIPLASMÁTICO DAS CEPAS DE EXPRESSÃO DO scFv<sub>15</sub>hLi7m e scFv<sub>5</sub>hLi7m.



FONTE: a AUTORA, 2019.

LEGENDA: 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) (A, B, E e F) e anticorpo anti-histidina (1:1000) e anti-mouse-HRP (1:4000) (C e 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.

O objetivo da utilização de várias cepas de bactérias, com respectiva caracterização foi tentar identificar qual a cepa mais adaptada para a produção dos fragmentos de interesse e se estes se apresentavam em condição funcional. Neste sentido, a escolha de uma das cepas para expressão e purificação dos fragmentos foi baseada na reatividade (absorbância) dos extratos frente ao veneno total de Li. Esta reatividade sugere a presença do fragmento no extrato, sendo que quanto

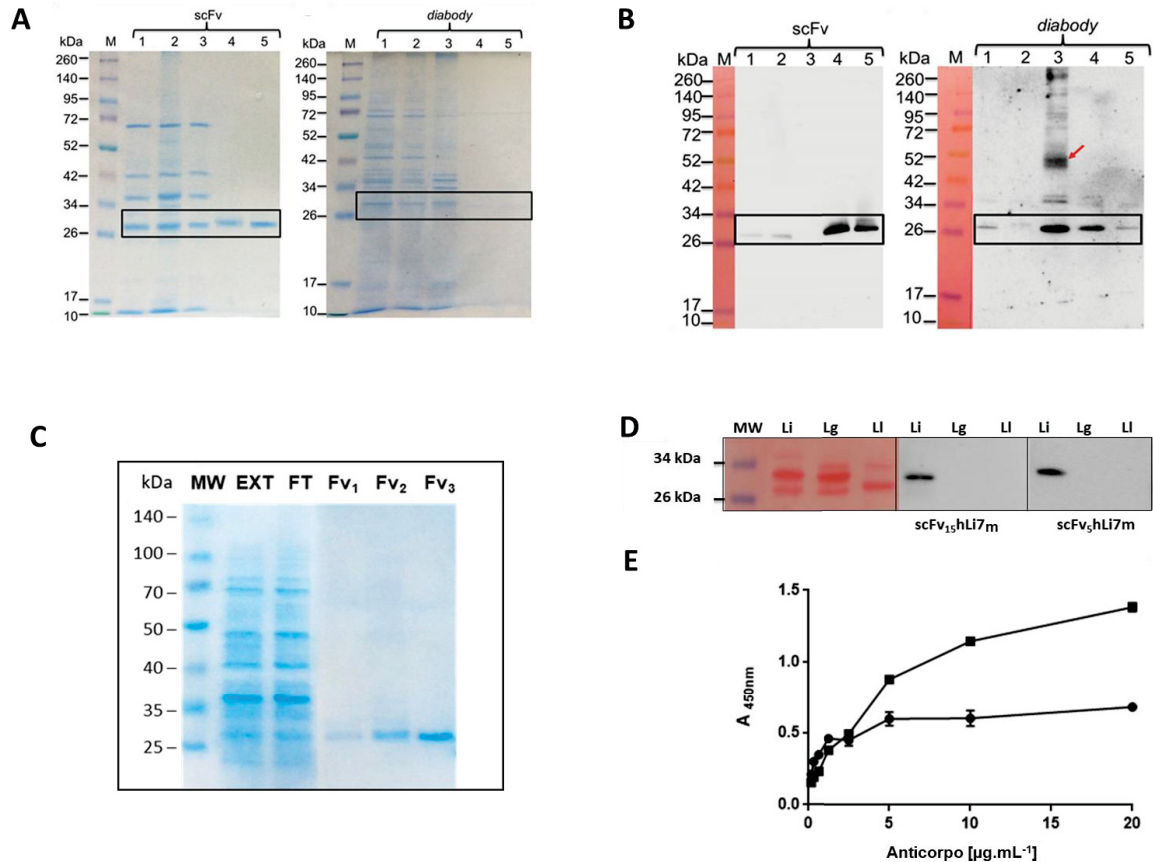
maior a reatividade possivelmente maior a concentração de fragmento, bem como a interação com o veneno sugere que estes fragmentos são funcionais. As cepas que produziram os fragmentos scFv e *diabody* e que apresentaram maior reatividade foram a AD494pLysS, seguida da BL21 star. Levando em consideração 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.

#### 4.7 CARACTERIZAÇÃO IMUNOQUÍMICA E FUNCIONAL DOS FRAGMENTOS scFv<sub>15</sub>hLi7m E scFv<sub>5</sub>hLi7m.

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 protéico das amostras após a extração periplasmática e purificação dos fragmentos. O fragmento recombinante scFv<sub>15</sub>hLi7m 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. O *diabody* scFv<sub>5</sub>hLi7m, 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 24A**). 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*. 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. 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 ou formação de agregados (**FIGURA 24B**). Tendo em vista que, o fragmento no formato scFv<sub>5</sub>hLi7m apresentou contaminantes e baixo rendimento quando purificado por proteína L, foi utilizado a coluna de Ni-Sepharose e eluição manual com 250 mM e 500 mM de imidazol, no qual o resultado da eluição é demonstrado na FIGURA 24C. A eluição com concentração de 500 mM apresentou maior rendimento, com 47 µg/L de cultura bacteriana. Para a confirmação da especificidade de reconhecimento dos fragmentos scFv<sub>15</sub>hLi7 e scFv<sub>5</sub>hLi7m, os componentes dos venenos de *Loxosceles* foram separados por migração eletroforética e transferências das proteínas para membrana de nitrocelulose. Após a realização do *western blot* foi possível observar duas bandas de aproximadamente 32 e 35 kDa apenas para o veneno de *L. intermedia* mostrando que o fragmento permanece com o mesmo perfil de reconhecimento e especificidade da molécula parental LimAb 7 (**FIGURA 24D**). A habilidade de interação entre o fragmento humanizado não mutado scFv<sub>15</sub>hLi7 e o fragmento com a mutação reversa scFv<sub>5</sub>hLi7m frente a toxina também foi avaliada. A **FIGURA 24E** demonstra que o scFv<sub>5</sub>hLi7m foi capaz de reconhecer o veneno de *L. intermedia* com maior reatividade que o scFv<sub>15</sub>hLi7.

FIGURA 24: VALIDAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS FRAGMENTOS scFv<sub>15</sub>hLi7m e scFv<sub>5</sub>hLi7m.

FONTE: a AUTORA, 2019

LEGENDA: A - SDS-PAGE 12,5% corado por azul de Coomassie. B - Western blotting dos fragmentos purificados. A revelação foi feita com anti-histidina (1:1000) e anti-mouse-HRP (1:4000), e evidenciada com ECL. Amostras: extrato periplasmático dialisado centrifugado (linha 1); fração que não se ligou à 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) M – membranas de nitrocelulose coradas por ponceau após transferência, evidenciando o marcador de massa molecular.. O retângulo indica as proteínas referentes ao scFv e diabody. A seta indica a provável presença do diabody na forma dimérica. C - Análise da purificação do scFv<sub>5</sub>hLi7m por SDS-PAGE sob condições não redutoras. (Ext) extrato periplasmático; (FT) fração que não se ligou à coluna; (Fv<sub>1</sub>) e (Fv<sub>2</sub>) fragmento variável purificado por cromatografia de imunoafinidade Ni-sepharose, eluído com 250 mM e 500 mM, respectivamente; (Fv<sub>3</sub>) scFv irrelevante; (MW) Marcador de massa molecular. Gel corado com Coomassie blue. D- Western blot após transferência do SDS-PAGE 15% de venenos de *Loxosceles* (10 µg) sob condições não redutoras. À esquerda proteínas coradas por Ponceau e à direita membranas de nitrocelulose incubadas com extratos periplasmático contendo scFvLi<sub>15</sub>hLi7m ou scFvLi<sub>5</sub>hLi7m, evidenciados por PpL-peroxidase (1:4000). (MW) Marcador de massa molecular (Sigma M3913). Li: *L. intermedia*; Lg: *L. gaucho*; LI: *L. laeta*. E- ELISA direto: imobilizado *L. intermedia* (2,5 µg/mL) e adicionado quantidades crescentes de scFv<sub>15</sub>hLi7m (●) ou scFv<sub>5</sub>hLi7m (■). Imunocomplexos foram detectados com PpL-peroxidase (1:2.000).

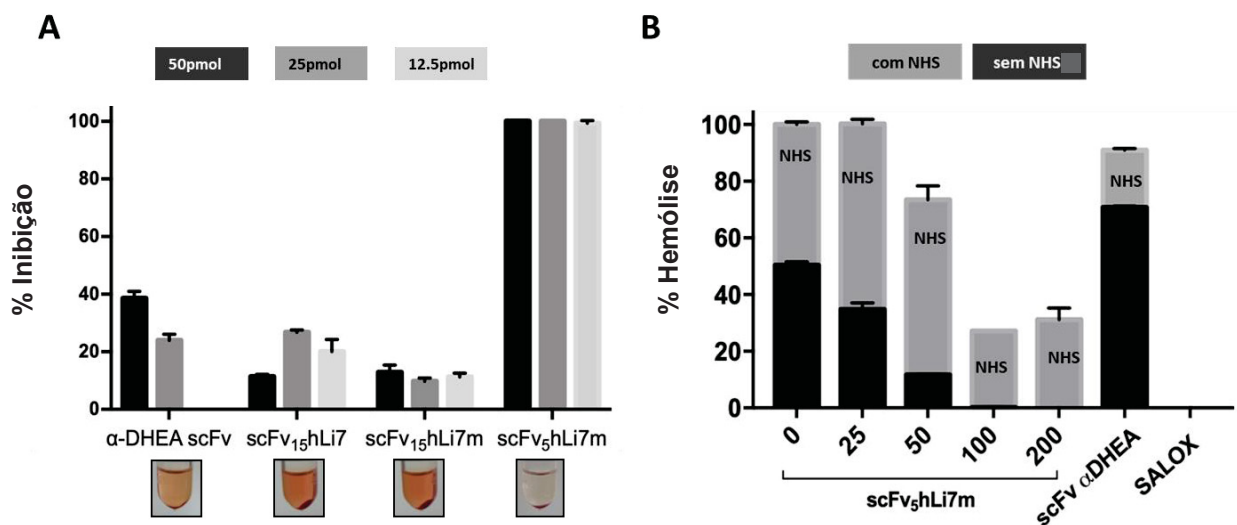
#### 4.8 POTENCIAL DE NEUTRALIZAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA *IN VITRO* DOS DIFERENTES FRAGMENTOS PRODUZIDOS

Para avaliar a capacidade dos fragmentos de anticorpos humanizados em inibir os efeitos hemolíticos do veneno de *L. intermedia*, foram realizados ensaios de



hemólise, na presença ou ausência do sistema complemento. Diferentes quantidades de fragmentos de anticorpos humanizados foram incubadas com eritrócitos humanos na presença de veneno de *L. intermedia* (0,75 e 10 µg/mL). O scFv<sub>5</sub>hLi7m (em todas as molaridades) foi capaz de inibir 100% da atividade hemolítica do veneno (0,75 µg/mL), quando comparado às variantes humanizadas scFv<sub>15</sub>hLi7 / scFv<sub>15</sub>hLi7m (FIGURA 25A). A hemólise dos eritrócitos desafiados com veneno (10 µg) foi fortemente inibida (> 90%) na presença de 200 pmol scFv<sub>5</sub>hLi7m, quando o sistema complemento estava ausente. Quando o soro normal humano (NHS) foi adicionado aos eritrócitos previamente incubados com veneno+scFv<sub>5</sub>hLi7m, foi observada uma inibição de até 68% da hemólise dependente do complemento (FIGURA 25B). O soro policlonal de cavalo anti-Li (1:500) foi usado como controle positivo para a inibição da hemólise. Um scFv anti-DHEA (FOGAÇA et al., 2018) irrelevante também foi empregado como controle negativo.

FIGURA 25: ENSAIO DE NEUTRALIZAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA *IN VITRO*.



FONTE: a AUTORA, 2019.

LEGENDA: A- Inibição da atividade hemolítica. Eritrócitos humanos foram incubados com veneno de *L. intermedia* (Li) (0,75 µg) na presença de diferentes concentrações molares de anticorpos (em preto 50 pmol, cinza escuro 25 pmol e cinza claro 12,5 pmol) por 24 h sob agitação suave (37 °C). Tampão ringer foi usado como controle negativo. Inspeção visual das amostras é representada em relação aos respectivos fragmentos de anticorpos. B- Ensaio hemolítico *in vitro*. Eritrócitos humanos foram incubados com veneno de Li (10 µg) e diferentes concentrações de anticorpos na presença (cinza) ou ausência (preto) de soro normal humano (NHS). scFv αDHEA (200 pmol) e SALOX (1:500) foram usados como controles negativo e positivo, respectivamente. Os resultados são expressos em porcentagem de lise, considerando o veneno sem a presença de anticorpo como 100% de hemólise.

## 5 DISCUSSÃO

O loxoscelismo é considerado um problema de saúde pública e, em especial no Paraná, onde o número de casos triplicou na última década em relação ao trabalho publicado por Marques-da-Silva e Fischer (2005). Há mais de um século o tratamento com antiveneno, produzido em cavalo, tem sido usado na clínica terapêutica para o envenenamentos; porém, o soro empregado contém uma mistura de proteínas que pode ocasionar reações adversas, principalmente quando administrado em múltiplas doses (LÉGER et al., 2011 ; LAUSTSEN et al., 2016 ; WANG et al., 2019). A produção do soro antiloxoscélico ou antiaracnídico é laboriosa, e assim como a maioria de outros antivenenos, necessita de ambiente adequado para o animal imunizado, longo período (12 meses) para a obtenção do soro, além de grandes quantidades de venenos (ALVARENGA et al., 2014; LOVRECEK e TOMIC, 2011; LUCAS, 2015). No Brasil, a demanda pelo soro antiloxoscélico é de 22.000 ampolas por ano, aproximadamente. Para isso, estima-se que são necessárias mais de 36.000 aranhas que devem produzir 1.800 mg de veneno (FIGUEIREDO et al., 2014). Alguns autores apontam o uso de anticorpo monoclonal como futura alternativa para tratamento de loxoscelismo (ALVARENGA et al., 2003; DIAS-LOPES et al., 2014). O anticorpo monoclonal LimAb7 (ALVARENGA et al., 2003) reconhece e neutraliza a ação esfingomielinásica do veneno de *L. intermedia*. Existem trabalhos que sugerem o uso de fragmentos de anticorpos recombinantes a partir do anticorpo monoclonal para envenenamento por serpentes e escorpiões (AUBREY et al., 2003; DI TOMMASO et al., 2012; RONCOLATO et al., 2013; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ et al., 2016). Karim-Silva et al. (2016) e Jiacomini et al. (2016) propuseram os primeiros fragmentos de anticorpos murinos com capacidade de detectar toxinas do veneno, como também neutralizar *in vitro*, alguns dos principais efeitos deletérios do loxoscelismo, respectivamente.

A humanização de anticorpos, descrita em 1986, tem sido proposta a fim de reduzir a imunogenicidade de anticorpos murinos empregados em tratamento em humanos, e para isso, são propostos diferentes métodos (SAFDARI et al., 2013; AHMADZADEH et al., 2014 ; LAUSTEN et al., 2018). Apesar de existirem scFvs humanos capazes de reconhecerem toxinas escorpiônicas, ainda não existe nenhum trabalho para aranhas (LAUSTSEN et al., 2016). Nesse estudo foi sintetizado o

fragmento de anticorpo recombinante no formato de scFv com mutações pontuais em região de *framework* (scFv<sub>15</sub>hLi7) para assim aproximar a identidade do fragmento com uma molécula humana. Os resultados obtidos sugerem que o scFv humanizado manteve o mesmo padrão de reconhecimento frente ao veneno de Li apresentado pela IgG nativa, semelhante ao demonstrado por Di Tommaso et al. (2012), com fragmentos de anticorpos; no entanto, dirigidos contra toxinas escorpiônicas. Entretanto, apesar do scFv<sub>15</sub>hLi7 manter a capacidade de reconhecimento observada por testes de ELISA, este necessita de pelo menos 38 µg/mL para competir em 50% com 1 µg/mL de LimAb7. Holliger et al. (2005) e Kim et al. (2014) referem que as mutações necessárias para humanização podem aumentar e/ou diminuir a afinidade de ligação, assim como a orientação de VH-VL pode favorecer a solubilidade do fragmento e, conseqüente estabilidade.

Tendo em vista que o scFv<sub>15</sub>hLi7 possui um tamanho reduzido quando comparado com o anticorpo inteiro, acredita-se que essa característica possa influenciar na capacidade de neutralização por impedimento estérico (DE MOURA et al., 2011; KARIM-SILVA et al., 2016; LAUSTSEN et al., 2018). Para confirmar essa hipótese foi produzido um fragmento maior, monomérico de 43 kDa que se dimeriza após sua expressão formando uma molécula de aproximadamente 86 kDa denominado scFv<sub>15</sub>-C<sub>H</sub>3hLi7, ou seja, *minibody*. Esse fragmento recombinante foi expresso em diferentes cepas de *E. coli*. No entanto, independente da cepa utilizada, a expressão do *minibody* não foi promissora. Dificuldades semelhantes foram observadas por Holliger e cols. (2015) que consideram a expressão limitada para esse formato de fragmento.

Os fragmentos de anticorpos recombinantes podem ser expressos em bactérias que são considerados o sistema mais utilizado por ter baixo custo e alta taxa de crescimento em curto intervalo de tempo (AHMAD et al., 2012; SPADIUT et al., 2014). Contudo, a qualidade de expressão pode variar de molécula para molécula, o que justifica o baixo rendimento do scFv produzido em diferentes cepas de *E. coli*. Alguns grupos, com intuito de aumentar o rendimento de expressão desses fragmentos, optaram pela inserção de um peptídeo sinal que direciona o anticorpo para o ambiente oxidativo do periplasma, que contribui na formação de pontes de sulfeto. Existem alternativas para correto dobramento da proteína como: desnaturação e redobrimento de agregados do citoplasma, aumento de expressão de chaperonas no citoplasma criando mutações em redutases (aumentou

rendimento de Fab), criação de anticorpos livres de cisteína, expressão oxidase citoplasmática (aumentou rendimento do fragmento de domínio único, VhH). Otimização do meio de crescimento e aditivos, tempo e duração de indução, concentração de reagentes usados na indução e outros parâmetros podem aumentar a expressão significativamente. Contudo, esses parâmetros diferem de caso a caso. Uma alternativa para expressão fora do periplasma é a introdução de enzimas (proteína dissulfeto isomerase) (LAUSTEN et al., 2018).

A célula de mamífero, em contraste com a procariota, produz a maioria das moléculas recombinantes numa condição funcional, mas tem maior custo, dificuldade de manuseio e baixa taxa de crescimento (LEBOZEC et al., 2018 ; LAUSTEN et al., 2018). No entanto, para secreção da molécula faz-se necessário peptídeo sinal (5 a 30 aminoácidos) na região N-terminal. Esse peptídeo sinal é extremamente heterogêneo e substituível entre as espécies, assim, ele exerce grande impacto na eficiência de secreção das proteínas, para resolver isso, alguns grupos vêm estudando a otimização dessa sequência (HARYADI et al., 2015). Expressão em leveduras é uma alternativa quando a produção em bactérias torna-se difícil. Esse sistema pode gerar de 2 a 5 g/L de cultura em 5 dias de fermentação. Outros sistemas de expressão menos comum são: algas, plantas e, nunca testados para desenvolvimento industrial, os insetos (SEVASTSYANOVICH et al., 2009; LEBOZEC et al., 2018).

O uso de anticorpos na terapêutica levou a necessidade de diferentes técnicas de purificação de acordo com a molécula. Uma alternativa é inserir uma *tag*, sendo a mais comum a polihistidina, entretanto, não é específica e sua ligação é pH dependente. Proteína A e G, provenientes de bactérias, são as mais predominantes no processo de purificação, porém ligam-se a região de C<sub>H</sub>2 e C<sub>H</sub>3 da molécula de anticorpo. A eluição por baixo pH pode desestabilizar a proteína ou causar perda da função e formação de agregados (MURPHY et al., 2016). Os fragmentos produzidos nesse trabalho não foram reconhecidos eficientemente por anti-histidina no ensaio de ELISA, o que poderia estar relacionado com a desestabilização da molécula. Tendo em vista, que o *minibody* é uma molécula proveniente do scFv<sub>15hLi7</sub> (primeira geração de fragmentos humanizados) e, que esta perdeu estabilidade em relação a molécula parental pode-se justificar a dificuldade em purificar esse fragmento e o seu baixo rendimento. Acredita-se também que não foi possível purificar o *minibody* com proteína A/G, pois os aminoácidos da região de *hinge* possivelmente

influenciaram nessa interação (dados não mostrados) (MURPHY et al., 2016). Em relação à purificação manual com histidina foi constatado um baixo rendimento e a presença de contaminantes. Na automatização do método algumas condições foram modificadas (concentração de sal, centrifugações, velocidade de infusão, pressão, quantidade de extrato incubado (2,5x mais)) favorecendo assim a ligação do *tag* na coluna. Foi observada uma baixa reatividade dos fragmentos quando testados frente a anticorpos anti-histidina em alguns imunoenaios, muito provavelmente devido à exposição inadequada desses resíduos dificultando o reconhecimento do anticorpo específico (MURPHY et al., 2016; LEBOZEC et al., 2018). Acredita-se, pelos resultados apresentados, que o *minibody* não apresentou estabilidade após produção, tendo em vista a dificuldade de obter a molécula purificada. Sendo assim, após nova análise da sequência de aminoácidos da primeira geração de scFv humanizado e, com base nos achados da literatura (AUBREY et al., 2019) questiona-se sobre a importância na manutenção de alguns resíduos murinos.

A humanização da molécula de anticorpo baseado no transplante de CDR (*grafting* CDR) com refinamento nas análises de modelagem *in silico* é uma das estratégias mais utilizadas, pois possibilita a geração de fragmentos menos imunogênicos (SAFDARI et al., 2013 ; LEBOZEC et al., 2017). O maior problema desse método, *grafting* CDR, é a possível perda da afinidade, como visualizado na primeira geração de fragmentos (scFv<sub>15hLi7</sub>), pois tem-se demonstrado que alguns resíduos de FR afetam a conformação dos CDRs. Esses resíduos de FR estão localizados próximos às regiões de CDRs (SAFDARI et al., 2013). Segundo Clothia (1987,1989) apud Fields cols. (2013), alguns resíduos em região de FR de cadeia variável são considerados conservados entre eles: cisteína na posição 23, triptofano na 41, aminoácido hidrofóbico na 89, cisteína na 104 e fenilalanina ou triptofano na 118.

A perda parcial ou completa da afinidade pode ser restaurada pela reintrodução de resíduos (*backmutation*) (OLIMPIERI et al., 2015). Para humanização da molécula foram respeitados os resíduos chaves na interação com o antígeno (KABAT et al., 1970, CLOTHIA et al., 1980, PADLAN et al., 1990, OFRAN et al., 2012 apud FIELDS et al., 2013). No entanto, novos resíduos tem sido demonstrado relevantes na orientação da molécula (ZHANG et al., 2017 ; XU et al., 2018) e, que não devem ser mutados (L44, L46, L47, L50, L52, L103 (VL); H38, H47, H50, H68, H70, H103, H120 (VH)). Também devem ser observados alguns

resíduos em CDRs que tem maior propensão de sofrer modificações químicas, entre eles: metionina, triptofano, asparagina e ácido aspártico (XU et al., 2018). A posição 71 de VH murino tem demonstrado afetar a posição e orientação de CDR-H2 e H1 (ZHANG et al., 2017). Com base nos achados acima citados, consideramos que a mudança no resíduo L46 pode ter levado a uma perda da afinidade na primeira geração da molécula, scFv<sub>15</sub>hLi7, de modo que foi realizada *backmutation* na segunda geração (F 103> Y em IGHV e P 46> Q em IGKV de acordo com a numeração IMGT), para a geração do fragmento scFv<sub>15</sub>hLi7m, o qual após produção e caracterização foi confirmado o aumento da reatividade frente ao veneno total. Entretanto, podem haver alguns resíduos considerados relevantes e que ainda não foram caracterizados (AUBREY et al., 2019).

As mutações pontuais são mais complexas, e alterações em resíduos da região N-terminal, resíduos murinos e humanos de hipermutação somática, podem influenciar na ligação com o antígeno, levando a necessidade de *backmutations*. Existem programas que ajudam na previsão da melhor estratégia a ser utilizada, porém, varia de anticorpo para anticorpo, não sendo uma verdade absoluta para todos necessitando sempre de comprovação experimental da estabilidade e funcionalidade das moléculas sugeridas *in silico* (LÉGER et al., 2011).

Alguns autores vêm estudando a influência do *linker* na conformação, sendo o de glicina-serina contendo 15 resíduos o mais utilizado. Foi visto que o *linker* não altera a conformação, porém os de menor tamanho podem aumentar a constante de afinidade (SAFDARI et al., 2013). Foi constatada a formação de dímeros de scFv, denominados *diabody*, nos casos em que o *linker* apresentava apenas cinco resíduos de aminoácidos em sua composição. De modo semelhante, Safdari et al. (2013) confirmaram a formação de dímeros nos fragmentos com *linker* de até doze resíduos de aa. Contudo percebe-se que apenas o *linker* não é suficiente para aumentar a afinidade, mas sim uma série de parâmetros em conjunto. A produção da primeira geração de anticorpos no formato de scFv manteve o perfil de reconhecimento frente ao veneno, apesar de diminuir sua capacidade de detecção e neutralização das toxinas do veneno. No entanto, a neutralização é um processo mais complexo, pois depende da manutenção da interação sítio específica entre alguns resíduos como foi constatado com o potencial de neutralização recuperado na segunda geração de fragmentos, *diabody* (scFv<sub>5</sub>hLi7m), após *backmutation*.



Algumas mutações interferem diretamente na mudança conformacional do anticorpo, outras aparentemente mantêm o mesmo padrão, como sugerido pela análise utilizando o algoritmo de modelagem *WAM*. Contudo, podem diminuir a capacidade de reconhecimento frente ao antígeno de interesse. Os ensaios realizados com o *diabody* humanizado (segunda geração) mostraram que esta molécula apresentava uma homologia estrutural (*packing angle*), reconhecimento (*western blotting*) e neutralização (ensaio hemolítico) mais próxima da molécula parental (MIETHE et al., 2016).

É importante considerar algumas propriedades biofísicas, pois mesmo com capacidade de ligação preservada, pode-se ter propensão para agregação, bem como alterar estabilidade termodinâmica e farmacocinética. Foi verificado por alguns autores que a instabilidade térmica pode aumentar a agregação e influenciar no processo de expressão, e alguns elementos podem contribuir para isso como a escolha e mutações adicionais no FR, que podem comprometer a energia de interação entre os domínios VH e VL (LONESCUD et al. apud LÉGER et al., 2011).

A molécula de scFv<sub>15hLi7</sub>, primeira geração, pode ter diminuído sua estabilidade o que, segundo Lausten et al. (2018) pode implicar na sua capacidade de neutralização. Contudo, alguns métodos, como a conjugação dos anticorpos com nanopartículas, por exemplo, podem aumentar a estabilidade térmica, contribuindo em uma menor concentração utilizada para neutralização (LAUSTEN et al., 2018). De acordo com McConnell et al. (2014) a termoestabilidade também pode ser ajustada utilizando FR já caracterizados como mais estáveis ou aqueles aprovados pelo FDA.

A partir da análise de cristalografia e alinhamento das fosfolipases D, foi possível inferir sobre a presença de resíduos altamente conservados como a His12, Glu32, Asp34, His47, Asp52, Asp91, Trp230, Asp233, e Asn252, como também, foi proposto que a interação entre a enzima e o fosfolipideo é estabilizada pela interação do íon Mg<sup>2+</sup> com o grupo fosfato do substrato. Esse íon é coordenado pelos resíduos Glu32, Asp34 e Asp 91 e moléculas de água. Esse processo catalítico também envolve resíduos “chaves”, como His12 e His47, os quais são suportados por uma rede de pontes de hidrogênio entre os resíduos Asp34, Asp52, Trp 230, Asp233 e Asn 252 (VUITIKA et al., 2016). Segundo Vuitika e cols (2016), o efeito hemolítico da toxina de *L. intermedia* é fortemente influenciado pelo resíduo



Y228 (100%), K93 e W30 (50%), C53-201 (responsáveis pela estabilização do *loop*) (38%).

Apesar do uso crescente de anticorpos recombinantes, dado pela alta especificidade, sensibilidade e estabilidade dessas moléculas, que podem ser facilmente otimizadas por modificação química e genética, o processo de humanização frequentemente implica na diminuição da afinidade e da capacidade de neutralização das moléculas (HONEGGER et al., 2009 ; LAUSTEN et al., 2016 ; MA et al., 2017), isso também foi observado na humanização da molécula de sFv<sub>15hLi7</sub> em relação a parental LimAb7. Pois, a interação do fragmento de anticorpo primeira geração (scFv<sub>15hLi7</sub>) com a rLiD1 levou ao aparecimento de novos resíduos (D21, E22, D25) e perda de outros (K58, K59) em relação a sua molécula parental. Segundo Miethe et al. (2016), a humanização pode levar a mudança na estrutura, o que foi confirmado quando realizado a sobreposição entre a molécula murina e a humanizada (primeira geração), denotando um deslocamento no sítio de interação com a rLiD1.

Mesmo com a diminuição da afinidade da primeira geração de fragmentos, foi realizada uma *backmutation* que se mostrou eficaz na produção de uma nova molécula, na qual o reconhecimento e o potencial de neutralização das toxinas presentes no veneno de Li, foram restabelecidos, em especial manteve-se a condição de impedimento estérico observada por De Moura et al. (2011) na molécula parental e necessária para eficácia do anticorpo.

Diferentes achados da literatura abordam a lise de eritrócitos, provocada pelo veneno, de maneira dependente do complemento (TAMBOURGI et al., 1998, 2000, 2005, 2007; VAN DEN BERG et al., 2002; FELICORI et al., 2006; MAGALHÃES et al., 2013; MYAMOTO et al., 2016), como também de maneira independente do complemento (CHAVES-MOREIRA et al., 2009, 2011), comprovando a importância biológica desse evento no contexto do envenenamento. Ensaio *in vitro* para reprodução da hemólise e neutralização da mesma vêm sendo amplamente empregados para caracterizar componentes do veneno e moléculas candidatas ao tratamento do Loxoscelismo (TAMBOURGI et al., 2007; FELICORI et al., 2006; CHAVES-MOREIRA et al., 2009; KARIM-SILVA et al., 2016). As análises dos ensaios hemolíticos confirmaram o potencial promissor do fragmento de anticorpo no formato de *diabody*, que foi capaz de neutralizar a atividade lítica das hemácias (dependente ou não do sistema do complemento) provocada pelos

componentes presentes veneno, validando a hipótese de que as modificações propostas para este novo formato foram necessárias para conferir estabilidade e capacidade de impedir a ligação das toxinas ao sítio ativo das fosfolipases. Adicionalmente, a condição de incubação direta veneno/anticorpo, sem pré-incubação, nos ensaios valida ainda mais o potencial de neutralização dessa molécula, como discutido por Laustsen et al., 2018.

Embora, o scFv<sub>15hLi7</sub> (primeira geração) individualmente não tenha tido um efeito neutralizante seria possível que quando somado a última geração em formato de *diabody* pudesse ser aditivo visto que se adere a outros aminoácidos. Segundo Chow e Casadevall (2012), Di Tommaso et al. (2012) e Laustsen et al. (2016), a combinação de múltiplos anticorpos favorece a proteção nos casos de envenenamentos, já que a neutralização de diferentes epítomos favorece um sinergismo na proteção. Nesse sentido, os scFv murinos podem ser considerados ainda como bons protótipos para o desenvolvimento de fragmentos de anticorpos humanizados, que poderão ser usados em conjunto e compor um antiveneno mais eficaz. No contexto do Loxoscelismo, novas terapias vêm sendo propostas como a utilização de inibidores de metaloproteases, como as tetraciclinas, fármacos (TAMBOURGI et al., 2000, 2010; VAN DEN BERG et al., 2012; CORREA et al., 2016; CHAVES-MOREIRA et al., 2016), como também inibidores de complemento (TAMBOURGI et al., 2010), mesmo não sendo específicas para os componentes do veneno. Entretanto, o uso de fragmentos de anticorpos recombinantes dirigidos contra alvos tóxicos constituiria componentes mais específicos e efetivos na neutralização do veneno, e ainda poderiam ser empregados em conjunto com outras terapias propostas a fim de melhorar os tratamentos empregados nos dias de hoje (LOVRECEK e TOMIC, 2011).

## 6 CONCLUSÃO

- A estratégia empregada para humanização do fragmento recombinante de anticorpo murino LimAb7, permitiu a obtenção de uma molécula com capacidade de reconhecer as fosfolipases presentes no veneno de Li, mantendo as condições de especificidades do seu *template* e, supostamente menos imunogênica para o homem dada a alta homologia com anticorpos humanos.
- Os estudos *in vitro* e *in silico* realizados com o scFv<sub>15</sub>hLi7 sugerem que a perda da afinidade e estabilidade dessa molécula pode estar associada ao deslocamento do paratopo, em relação à sua molécula parental ao veneno.
- Apesar do baixo rendimento, o sistema procarioto mostrou-se eficaz quanto à produção dos fragmentos de anticorpos recombinantes, sendo que maiores limitações foram observadas para a obtenção do *minibody*, que provavelmente estavam associadas a condições intrínsecas desse formato.
- Todos os fragmentos de anticorpos recombinantes purificados produzidos nesse trabalho foram capazes de reconhecer especificamente toxinas presente no veneno de *L. intermedia* na faixa de 30-35 kDa.
- Os fragmentos no formato scFv<sub>5</sub>hLi7m foram os mais eficazes em inibir a atividade hemolítica do veneno (dependente e independente do sistema de complemento). Dada a importância da hemólise no contexto do envenenamento, acreditamos no potencial dessa molécula pra ser empregada como uma alternativa no tratamento específico do loxoscelismo.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

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).

Os resultados apresentados nessa tese suportam a hipótese do uso de fragmentos de anticorpos recombinantes para terapêutica de envenenamentos conforme estudado por Tommaso et al. (2012), Roncolato et al. (2013) e Laustsen et al. (2016). Visto que o fragmento de anticorpo recombinante scFv<sub>5</sub>hLi7m tem potencial para ser utilizado no tratamento de acidentes por *Loxosceles intermedia*, pois reconhece e impede a ação hemolítica das toxinas consideradas como mais relevantes no envenenamento .

Sendo assim, os resultados obtidos com o scFv<sub>5</sub>hLi7m são uma motivação para produção de outros fragmentos dirigidos para proteínas das principais espécies de *Loxosceles* do Brasil. Além disso, esse foi o primeiro trabalho a descrever a produção e caracterização de um fragmento de anticorpo recombinante humanizado que reconhece e neutraliza proteínas tóxicas do veneno de *Loxosceles intemedia*.

## REFERÊNCIAS

AUBREY N, DEVAUX C, DI LUCCIO E, GOYFFON M, ROCHAT H, BILLIALD P. A recombinant scFv/streptavidin-binding peptide fusion protein for the quantitative determination of the scorpion venom neurotoxin **Aahl.Biol Chem.**, v. 382, p. 1621-1628, nov. 2001.

AUBREY N, DEVAUX C, SIZARET PY, ROCHAT H, GOYFFON M, BILLIALD P. 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.

AUBREY N. AND BILLIALD P.. Antibody fragments humanization: beginning with the end in mind. Human monoclonal antibodies: methods and protocols, methods in molecular biology. vol. 1904. **Nature** 2019. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8958-4\\_10](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8958-4_10)

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

AHMADZADEH V., FARAJNIA S., FEIZI M. A. H., NEJAD R. A. K.. Antibody Humanization Methods for Development of Therapeutic Applications. **Monoclonal antibodies in immunodiagnosis and immunotherapy**. Volume 33, Number 2, 2014. DOI: 10.1089/mab.2013.0080

ALMEIDA D.M., FERNANDES-PEDROSA M.F., ANDRADE R.M.G., MARCELINO J.R., GONDO-HIGASHI H., AZEVEDO I.L.M.J., HO P.L., VAN DEN BERG C., TAMBOURGI D.V.. A New Anti-loxoscelic Serum Produced Against Recombinant Sphingomyelinase D: Results of Preclinical Trials. **Am. J. Trop. Med. Hyg**, v. 79, p. 463–470, 2008.

ALVARENGA 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.

ALVARENGA L.M., ZAHID M., TOMMASO A., JUSTE M. O., AUBREY N., BILLIALD P., MUZARD J.. Engineering venom's toxin-neutralizing antibody fragments and its therapeutic potential. **Toxins**, v. 6,p. 2541-2567. 2014

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. **ImmunolLett**, v. 139, p. 73-79, 2011.

AUBREY N, DEVAUX C, SIZARET PY, ROCHAT H, GOYFFON M, BILLIALD P. 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.

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.

BRASIL – Ministério da Saúde. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. 2ª ed. - Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 2001. Disponível em < [ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc\\_tec/zoo/manu\\_peco01.pdf](ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/zoo/manu_peco01.pdf) > acessado em 3 de agosto de 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia de Vigilância epidemiológica**. 1ª edição. Brasília/DF. 2014. Disponível em: < [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia\\_vigilancia\\_saude\\_unificado.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_saude_unificado.pdf)>. Acesso em: 13 junho 2016.

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.

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.

CABRERIZO S., DOCAMPO P.C., CARI C., ROZAS M.O., DIAZ M., ROODT A.R., CURCI O.. Loxoscelismo: epidemiología y clínica de una patología endémica en el país. **Arch Argent Pediatr**, v. 107, p. 152-159, mar. 2009

CHAGAS F.B, et al... Aspectos epidemiológicos dos acidentes por aranhas no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Evidência**, Joaçaba v.10 n1-2, p121-130, jan/dez 2010.

CHAIM O.M., SADE Y.B., da SILVEIRA R.B., TOMA L., KALAPOTHAKIS E., CHAVEZ-OLORTEGUI C., MANGILI O.C., GREMSKI W., VON DIETRICH C.P., NADER H.B., VEIGA S.S.. Brown spider dermonecrotic toxin directly induces nephrotoxicity. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 211, p. 64–77, fev. 2006.

CHAVES-MOREIRA D., CHAIM O.M., SADE Y.B., PALUDO K.S.,GREMSKI L.H., DONATTI L., MOURA J., MANGILI O.C., GREMSKI W., SILVEIRA R.B., SENFF-RIBEIRO A., VEIGA S.S.. Identification of a Direct Hemolytic Effect Dependent on the Catalytic Activity Induced by Phospholipase-D (Dermonecrotic Toxin) From Brown Spider Venom. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 107, p. 655–666, 2009.

CHAVES-MOREIRA D., SOUZA F.N., FOGAÇA R.T., MANGILI O.C., GREMSKI W., SENFF-RIBEIRO A., CHAIM O.M., VEIGA S.S.. The relationship between calcium and the metabolism of plasma membrane phospholipids in hemolysis induced by brown spider venom phospholipase-D toxin. **J Cell Biochem.**, v. 112, p. 2529-2540, set. 2011.

CHAVES-MOREIRA, MORAES F. R., CARUSO I. P., CHAIM O. M., SENFF-RIBEIRO A., ULLAH A., SILVA L. S., CHAHINE J., ARNI R. K., VEIGA S.S..

Potential Implications for Designing Drugs Against the Brown Spider Venom Phospholipase-D. **Journal of Cellular Biochemistry**. v. 118, p. 726-738, 2016.

CHAVES-MOREIRA, SENFF-RIBEIRO A., WILLE A.C.M., GREMSKI L.H., CHAIM O.M., VEIGA S.S.. Highlights in the knowledge of brown spider toxins. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases** 23:6. 2017.

CHAVEZ-OLORTEGUI C., ZANETTI V.C., FERREIRA A.P., MINOZZO J.C., MANGILI O.C. E GUBERT I.C.. Elisa for the detection of venom antigens in experimental and clinical envenoming by *Loxosceles intermedia* spiders. **Toxicon** v. 36, p. 563-569, 1998.

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., GONÇALVES-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**, v. 11, p. 1-39, abr., 2016.

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

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.

DIAS-LOPES C., GUIMARÃES G., FELICORI L., FERNANDES P., EMERY L., KALAPOTHAKIS E., NGUYEN C., MOLINA F., GRANIER C., CHÁVEZ-OLÓRTEGUI C.. A protective immune response against lethal, dermonecrotic and hemorrhagic effects of *Loxosceles intermedia* venom elicited by a 27-residue peptide. **Toxicon**, v. 55, p. 481-487, 2010

DIAS-LOPES C., FELICORI L., RUBRECHT L., COBO S., MOLINA L., NGUYEN C., GALÉA P., GRANIER C., MOLINA F., CHÁVEZ-OLORTEGUI C.. 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.

DIAS-LOPES C., PAIVA A. L., GUERRA-DUARTE C., MOLINA F., FELICORI L.. Venomous Arachnid Diagnostic Assays, Lessons from Past Attempts. **Toxins** 2018, 10, 365; doi:10.3390/toxins10090365

DUARTE C.G., BONILLA C., GUIMARÃES C., MACHADO DE AVILA R.A., MENDES T.M., SILVA W., TINTAYA B., YARLEQUE A., CHAVEZ-OLORTEGUI C.. Anti-loxoscelic horse serum produced against a recombinant dermonecrotic protein



of Brazilian *Loxosceles intermedia* spider neutralize lethal effects of *Loxosceles laeta* venom from Peru. **Toxicon**, v. 93, p. 37-40, 2015.

ESPINO-SOLIS G.P., RIAÑO-UMBARILA L., BECERRIL B., POSSANI L.D.. Antidotes against venomous animals: State of the art and prospectives. **Journal of Proteomics**, v. 72, p. 183-199, mar. 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**, v. 8, p. 1125-1148, 2013

FELICORI L., ARAUJO S.C., MACHADE DE ÁVILA R.A., SANCHEZ E.F., GRANIER C., KALAPOTHAKIS E., CHAVEZ-OLORTEGUI C.. Functional characterization and epitope analysis of a recombinant dermonecrotic protein from *Loxosceles intermedia* spider. **Toxicon**, v. 48, p. 509-519, out. 2006.

FELICORI L, FERNANDES P, GIUSTA M, DUARTE C, KALAPOTHAKIS E, NGUYEN C, MOLINA F, GRANIER C, CHÁVEZ-OLÓRTEGUI C. 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.

FIGUEIREDO L.F.M, DIAS-LOPES C., ALVARENGA L.M, MENDES T.M., MACHADO-DE-AVILA R.A., MCCORMACK J., MINOZZO J.C., KALAPOTHAKIS E., CHAVEZ-OLORTEGUI C.. Innovative immunization protocols using chimeric recombinant protein for the production of polyspecific loxoscelic antivenom in horses. **Toxicon**, v. 86, p. 59-67, 2014.

FOGAÇA, R. L., ALVARENGA, L. M., WOISKI, T. D., BECKER-FINCO, A., TEIXEIRA, K. N., SILVA, S. K., MOURA, J. DE. (2019). Biomolecular engineering of antidehydroepiandrosterone antibodies: a new perspective in cancer diagnosis and treatment using single-chain antibody variable fragment. **Nanomedicine**. doi:10.2217/nnm-2018-0230

FUTRELL J.M., MORGAN P.N.. Identification and Neutralization of Biological Activities Associated with Venom from the Brown Recluse Spider, *Loxosceles reclusa*. **Am J Trop Med Hyg**, v. 26, p. 1206-1211, nov. 1977.

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.

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., TREVISAN-SILVA D., FERRER V.P., MATSUBARA F.H., MEISSNER G.O., WILLE A.C.M., VUITIKA L., DIAS-LOPES C., ULLAH A., MORAES F.R., CHÁVEZ-OLÓRTEGUI C., BARBARO K.C., MURAKAMI., ARNI R.K., SENFF-RIBEIRO A., CHAIM O.M., VEIGA S.S.. 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.

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

GUIMARÃES G., DIAS-LOPES C., DUARTE C.G., FELICORE L., MACHADO DE AVILA R.A., FIGUEIREDO L.F.M., DE MOURA J., FALEIRO B.T., BARRO J., FLORES K., SILVA W., TINTAYA B., YARLEQUE A., BONILLA C., KALAPOTHAKIS E., SALASA C.E., CHÁVEZ-OLORTEGUI C.. Biochemical and immunological characteristics of Peruvian *Loxosceles laeta* spider venom: Neutralization of its toxic effects by anti-loxoscelic antivenoms. **Toxicon**, v. 70, p. 90-97, 2013.

HARYADI R., HO S., KOK Y. J., PU H. X., ZHENG L., PEREIRA N. A., LI B., BI X., GOH L. T., YANG Y., SONG Z.. Optimization of Heavy Chain and Light Chain Signal Peptides for High Level Expression of Therapeutic Antibodies in CHO Cells. **PLoS ONE** 10(2): e0116878. doi:10.1371/journal.pone.0116878

HOLLIGER P., HUDSON P.J.. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. **Nature biotechnology**. V23,num 9, p1126-1136, sept 2005.

HONEGGER A., MALEBRANCHE A. D., ROTH LISBERGER D., PLUCKTHUN A.. The influence of the framework core residues on the biophysical properties of immunoglobulin heavy chain variable domains. **Protein Engineering, Design & Selection** vol. 22 no. 3 pp. 121–134, 2009. doi:10.1093/protein/gzn077

HU S., SHIVELY L., RAUBITSCHKE A., SHERMAN M., WILLIAMS L.E., WONG J.Y., SHIVELY J.E., WU A.M.. Minibody: A novel engineered anti-carcinoembryonic antigen antibody fragment (single-chain Fv-CH3) which exhibits rapid, high-level targeting of xenografts. **Cancer Res**. 1996 Jul 1;56(13):3055-61.

JACOMINI I., SILVA S.K., AUBREY N., MUZARD J., CHAVEZ-OLORTEGUI C., DE MOURA J., BILLIALD P., ALVARENGA L.M.. Immunodetection of the “brown” spider (*Loxosceles intermedia*) dermonecrotic toxin with an scFv-alkaline phosphatase fusion protein. **Immunology Letters**, v. 173, p. 1-6, 2016.

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.

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

KIM YP., PARK D., KIM J.J., CHOI W.J., LEE S.H., LEE S.Y., KIM S., CHUNG J.M., JEON J., LEE B.D., SHIN J.H., LEE Y.I., CHO H., LEE J.M., KANG H.C.. Effective therapeutic approach for head and neck cancer by an engineered minibody targeting

the EGFR receptor. **PLoS One**. 2014 Dec 1;9(12):e113442. doi: 10.1371/journal.pone.0113442. eCollection 2014

KROH H. K., CHANDRASEKARAN R., ROSENTHAL K., WOODS R., JIN X., OHI M.D., NYBORG A.C., RAINEY G. J., WARRENER P., SPILLER B.W., LACY D.B.. Use of a neutralizing antibody helps identify structural features critical for binding of *Clostridium difficile* toxin TcdA to the host cell surface. **The American Society for Biochemistry and Molecular Biology**, July, 2017.

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, May 2002.

KUSMA J., CHAIM O.M., WILLE A.C.M., FERRER V.P., SADE Y.B., DONATTI L., GREMSKI W., MANGILI O.C., VEIGA S.S.. Nephrotoxicity caused by brown spider venom phospholipase-D (dermonecrotic toxin) depends on catalytic activity. **Biochimie**, v. 90, p. 1722-1736, Nov/Dec. 2008.

LAKHRIF Z., PUGNIÈRE M., HENRIQUET C., DI TOMMASO A., DIMIER-POISSON I., BILLIALD P., JUSTE M.O., AUBREY N.. A method to confer Protein L binding ability to any antibody fragment. **MAbs**. 2016;8(2):379-88. doi: 10.1080/19420862.2015.1116657

LAUSTSEN A. H., SOLÀ M., JAPPE E. C., OSCOZ S., LAURIDSEN L. P., ENGMARK M.. Biotechnological trends in spider and scorpion antivenom development. **Toxins**, v. 8, p. 1-33, 2016.

LAUSTSEN A.H., GUTIÉRREZ J. M., KNUDSEN C., JOHANSEN K. H., BERMÚDEZ-MÉNDEZ E., CERNI F. A., JÜEGENSEN J. A., LEDSGAARD L., MARTOS-ESTEBAN A., OHLENSCHLAEGER M., PUS U., ANDERSEN A. R., LOMONTE B., ENGMARK M., PUCCA M. B.. Pros and cons of different therapeutic antibody formats for recombinant antivenom development. **Toxicon** 146 (2018) 151-175. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.03.004>

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

LEBOZEC K., JANDROT-PERRUS M., AVENARD G., FAVRE-BULLE O., BILLIALD P.. Design, development and characterization of ACT017, a humanized Fab that blocks platelet's glycoprotein VI function without causing bleeding risks. **MABS** 2017, VOL. 9, NO. 6, 945–958. <https://doi.org/10.1080/19420862.2017.1336592>

LEBOZEC K., JANDROT-PERRUS M., AVENARD G., FAVRE-BULLE O., BILLIALD P.. Quality and cost assessment of a recombinant antibody fragment produced from mammalian, yeast and prokaryotic host cells: a case study prior to pharmaceutical development. **New biotechnology** 44 (2018) 31–40

LÉGER O. AND SALDANHA J. W.. Humanization of Antibodies. **Molecular Medicine and Medicinal Chemistry**: volume 4. 492pp Dec 2011

LIU H, MAY K. Disulfide bond structures of IgG molecules: Structural variations, chemical modifications and possible impacts to stability and biological function. **mAbs**. 2012;4(1):17-23. doi:10.4161/mabs.4.1.18347.

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.

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

LOPES T. Z. Z. **Expressão de fragmentos de anticorpos que reconhecem o antígeno CD20 humano**. Dissertação (Mestrado em Patologia Molecular) – Universidade de Brasília, Brasília, 2015.

LUCAS S.M.. The history of venomous spider identification, venom extraction methods and antivenom production: a long journey at the Butantan Institute, São Paulo, Brazil. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 21, p. 1-3, 2015

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.

MA, H., & O’KENNEDY, R. (2017). Recombinant antibody fragment production. **Methods**, 116, 23–33. doi:10.1016/j.ymeth.2016.11.008

MACHADO L.F, LAUGESEN S., BOTELHO E.D., RICART C.A., FONTES W., BARBARO K.C., ROEPSTORFF P., SOUSA M.V.. Proteome analysis of brown spider venom: Identification of loxnecrogin isoforms in *Loxosceles gaucho* venom. **Proteomics**, v. 5, p.2167-2176, 2005.

MAGALHAES G. S., CAPORRINO M. C., DELLA-CASA M. S., KIMURA L. F., PREZOTTO-NETO J. P., FUKUDA D. A., PORTES-JUNIOR J. A., NEVES-FERREIRA A. G. C., SANTORO M. L., BARBARO K. C.. Cloning, expression and characterization of a phospholipase D from *Loxosceles gaucho* venom gland. **Biochimie**. v.95, p. 1773-1783, 2013.

MARQUES-DA-SILVA E; FISCHER M.L.. Distribuição da espécie 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. doi:10.1590/s0037-86822005000400010

MARTINS F.J. et al... Perfil dos acidentes causados por aranhas na área de abrangência sanitária do município de Juiz de Fora – MG. **Rev APS**, v. 14, p. 303-312, jul/set. 2011.

MANZONI-DE-ALMEIDA, D., SQUAIELLA-BAPTISTÃO, C. C., LOPES, P. H., VAN DEN BERG, C. W., & TAMBOURGI, D. V. (2018). *Loxosceles* venom

Sphingomyelinase D activates human blood leukocytes: Role of the complement system. **Molecular Immunology**, 94, 45–53. doi:10.1016/j.molimm.2017.12.009

McGLASSON D.L., GREEN J.A., STOECKER W.V., BABCOCK J.L., CALCARA D.A.. Duration of *Loxosceles* reclusa Venom Detection by ELISA from Swabs. **Clin Lab Sci**, v. 22, p. 216-22, 2009.

MCCONNELL A. D., ZHANG X., MACOMBER J. L., CHAU B., SHEFFER J. C., RAHMANIAN S., HARE E., SPASOJEVIC V., HORLICK R. A., KING D. J., BOWERS P. M.. A general approach to antibody Thermostabilization. **mAbs** 6:5, 1274–1282; September/October 2014.

MIETHE S., MAZUET C., LIU Y., TIERNEY R., RASETTI-ESCARGUEIL C., AVRIL A., FRENZEL A., THULLIER P., PELATA P., URBAIN R., FONTAYNE A., SESARDIC D., HUST M., POPOFF M. R.. Development of Germline-Humanized Antibodies Neutralizing Botulinum Neurotoxin A and B. **PLOS ONE**. DOI:10.1371/journal.pone.0161446 August 25, 2016.

MØLGAARD M. , COMPTE M. , NUÑEZ-PRADO N. , HARWOOD S.L. , SANZ L., ALVAREZ-VALLINA L.. Balanced secretion of anti-CEA × anti-CD3 diabody chains using the 2A self-cleaving peptide maximizes diabody assembly and tumor-specific cytotoxicity. **Gene Therapy**, p. 208 – 214, 2017.

MORETTO S. L.. **Biotechnologia de anticorpos recombinantes com potencial terapêutico no loxoscelismo**. Monografia (Bacharel em ciências biológicas). Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 2018.

MOUSLI M, DEVAUX C, ROCHAT H, GOYFFON M, BILLIALD P. 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.

MYAMOTO D.T., PIDDE-QUEIROZ G., GONÇALVES-DE-ANDRADE R.M., PEDROSO A., VAN DEN BERG C.W., TAMBOURGI D.V.. Characterization of a Gene Coding for the Complement System Component FB from *Loxosceles* laeta Spider Venom Glands. **PLoS One**, v. 11, p. 1-40, 2016.

MURAKAMI, M.T., FERNANDES-PEDROSA, M.F., TAMBOURGI, D.V., Arni, R.K.. Structural basis for metal-ion coordination and the catalytic mechanism of sphingomyelinases D. **J. Biol. Chem**, v. 280, p. 13658–13664, 2005.

MUZARD J., ADI-BESSALEM S., JUSTE M., LARABA-DJEBARI F., AUBREY N., BILLIALD P.. Grafting of protein L-binding activity onto recombinant antibody fragments. **Analytical Biochemistry**, v. 388, p. 331-338, 2009.

MURPHY C., DEVINE T., O’KENNEDY R.. Technology advancements in antibody purification. **Antibody Technology Journal** 2016:6 17–32

OKAMOTO C.K.. **Análise do papel do sistema complemento na injúria a células renais causada pelo veneno da aranha *Loxosceles***. Tese de doutorado. USP. São Paulo, 2012. Disponível em <

[www.teses.usp.br/teses/.../CinthyaKimoriOkamoto\\_Doutorado\\_P.pdf](http://www.teses.usp.br/teses/.../CinthyaKimoriOkamoto_Doutorado_P.pdf)>. Acessado em 05 de agosto de 2013.

OLAFSEN T., SIRK S.J., BETTING D.J., KENANOVA V.E., BAUER K.B., LADNO W., RAUBITSCHKEK A.A., TIMMEMAN J.M., WU A.M.. ImmunoPET imaging of B-cell lymphoma using  $^{124}\text{I}$ -anti-CD20 scFv dimers (diabodies). **Protein Eng Des Sel.**, v. 23, p. 243-249, abr. 2010.

OLAFSEN T., TAN G.J., CHEUNG C.W., YAZAKI P.J., PARK J.M., SHIVELY J.E., WILLIAMS L.E., RAUBITSCHKEK A.A., PRESS M.F., WU A.M.. Characterization of engineered anti-p185HER-2 (scFv-CH3)<sub>2</sub> antibody fragments (minibodies) for tumor targeting. **Protein Eng Des Sel.** 2004 Apr;17(4):315-23.

OLIMPIERI P. P., MARCATILI P., TRAMONTANO A.. Tabhu: tools for antibody humanization. **BIOINFORMATICS APPLICATIONS NOTE**. Vol. 31 no. 3 2015, pages 434–435. doi:10.1093/bioinformatics/btu667

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, GGUBERT I, MINOZZO J. The efficacy of antivenom in loxoscelism treatment. **Toxicon**, v. 48, p. 123-137, 2006.

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

PINTO L. R. **Loxoscelismo em Curitiba/PR: uma abordagem geográfica.** 147fls. Dissertação de Mestrado - Setor de Ciência da Terra, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

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.

RIBEIRO R.O.S. **Análise comparativa estrutural e das propriedades biológicas das toxinas dermonecróticas recombinantes LiRecDT1, LiRecDT2 e LiRecDT3 do veneno da aranha-marrom (*Loxosceles intermedia*).** Dissertação de Mestrado – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

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



RONCOLATO, E.C.; PUCCA, M.B.; FUNAYAMA, J.C.; BERTOLINI, T.B.; CAMPOS, L.B.; BARBOSA, J.E.. Human antibody fragments specific for *Bothrops jararacussu* venom reduce the toxicity of other *Bothrops* sp. venoms. **J. Immunotoxicol.** 2013, 10, 160–168.

RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ E.R., OLAMENDI-PORTUGAL T., SERRANO-POSADA H., ARREDONDO-LÓPEZ JN., GÓMEZ-RAMÍREZ I., FERNÁNDEZ-TABOADA G., POSSANI LD., ANGUIANO-VEGA GA., RIAÑO-UMBARILA L., BECERRIL B.. Broadening the neutralizing capacity of a family of antibody fragments against different toxins from Mexican scorpions. **Toxicon**, v. 119, p. 52-63, mai. 2016.

SAFDARI Y., FARAJNIA S., ASGHARZADEH M., KHALILI M.. Antibody humanization methods – a review and update, **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews** (2013), 29:2, 175-186, DOI: 10.1080/02648725.2013.801235

SEVASTSYANOVICH Y, ALFASI S, COLE J.. Recombinant protein production: a comparative view on host physiology. **N Biotechnol.** 2009; 25 (4): 175-180.

SESA – PR (Secretaria de Estado da Saúde do Paraná), 2014. **Dados Sobre os Acidentes com Animais Peçonhentos no Estado do Paraná.** Curitiba: Centro de Saúde Ambiental / Div. Zoonoses e Animais Peçonhentos, SESA – PR. Disponível em: <http://www.saude.pr.gov.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=2752>.

SILVA E.M. **Loxoscelismo no Estado do Paraná: análise epidemiológica dos acidentes causados por *Loxosceles Heinecken & Lowe*, 1832, no período de 1993 a 2000.** Dissertação de mestrado. Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro. 2002. Disponível em <  
[http://www.saude.pr.gov.br/arquivos/File/zoonoses\\_intoxicacoes/anim\\_pec/Loxoscelismo\\_no\\_Pr.pdf](http://www.saude.pr.gov.br/arquivos/File/zoonoses_intoxicacoes/anim_pec/Loxoscelismo_no_Pr.pdf)> Acessado em 5 de agosto de 2013.

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.

TAMBOURGI D.V., MAGNOLI F.C., VAN DEN BERG C.W., MORGAN B.P., DE ARAUJO P.S., ALVES E.W., DA SILVA W.D. . Sphingomyelinases in the venom of the spider *Loxosceles intermedia* are responsible for both dermonecrosis and complement-dependent hemolysis. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 251, p. 366-373, out. 1998.

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 glycoporphins from the erythrocyte surface and facilitating complement-mediated lysis. **BLOOD**, v.95, p. 683-691, jan. 2000.

TAMBOURGI D.V., PAIXÃO-CAVALCANTE D., GONÇALVES DE ANDRADE R.M., FERNANDES-PEDROSA M.DE F., MAGNOLI F.C., PAUL MORGAN B., VAN DEN BERG C.W.. *Loxosceles* sphingomyelinase induces complement-dependent



dermonecrosis, neutrophil infiltration, and endogenous gelatinase expression. **J Invest Dermatol.**, v.124, p. 725-731, abr. 2005.

TAMBOURGI D.V., FERNANDES PEDROSA M.F., GONÇALVES DE ANDRADE R.M., BILLINGTON<sup>B</sup> S.J., GRIFFITHS M., VAN DEN BERG C.W.. Sphingomyelinases D induce direct association of C1q to the erythrocyte membrane causing complement mediated autologous haemolysis. **Molecular Immunology**, v. 44, p. 576–582, jan. 2007.

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 DEN BERG C.W., GONCALVES DE ANDRADE R.M., MAGNOLI F.C., MARCHBANK K.J., TAMBOURGI D.V.. *Loxosceles* spider venom induces metalloproteinase mediated cleavage of MCP/CD46 and MHC I and induces protection against C-mediated lysis. **Immunology**, v. 107, p. 102-110, 2002.

VAN DEN BERG C.W., GONÇALVES-DE-ANDRADE R.M., OKAMOTO C.K., TAMBOURGI D.. C5a receptor is cleaved by metalloproteases induced by sphingomyelinase D from *Loxosceles* spider venom. **Immunobiology**, v. 217, p. 935-941, 2012.

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.

VUITIKA L., CHAVES-MOREIRA D., CARUSO I., LIMA M.A., MATSUBARA F.H., MURAKAMI M.T., TAKAHASHI H.K., TOLEDO M.S., CORONADO M.A., NADER H.B., SENFF-RIBEIRO A., CHAIM O.M., ARNI R.K., VEIGA S.S.. Active site mapping of *Loxosceles* phospholipases D: Biochemical and biological features. **Biochimica et Biophysica Acta** 1861 (2016) 970–979

WASSERMAN G.S., CALCARA D.A., GREEN J.A., STOECKER W.V., LARKIN K.. Systemic Loxoscelism Confirmation by Bite-Site Skin Surface ELISA: This case illustrates the most common symptomatic effect in systemic loxoscelism hemolytic anemia. **Missouri medicine**, v. 106, p. 425-431, nov/dez 2009.

WANG X. Y., WANG B., WEN Y. M.. From therapeutic antibodies to immune complex vaccines. npj **Vaccines** (2019) 4:2 ; <https://doi.org/10.1038/s41541-018-0095-z>

WILSON K., WALKER J.. **Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology**. 7 ed., 2010.

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

XU A., KIM H. S., ESTEE S., VIAJAR S., GALUSH W. J., GILL A., HÖTZEL I., LAZAR G. A., MCDONALD P., ANDERSEN N., SPIESS C.. Susceptibility of Antibody CDR Residues to Chemical Modifications Can Be Revealed Prior to Antibody

Humanization and Aid in the Lead Selection Process. **Molecular Pharmaceutics** 2018 15 (10), 4529-4537. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.8b00536

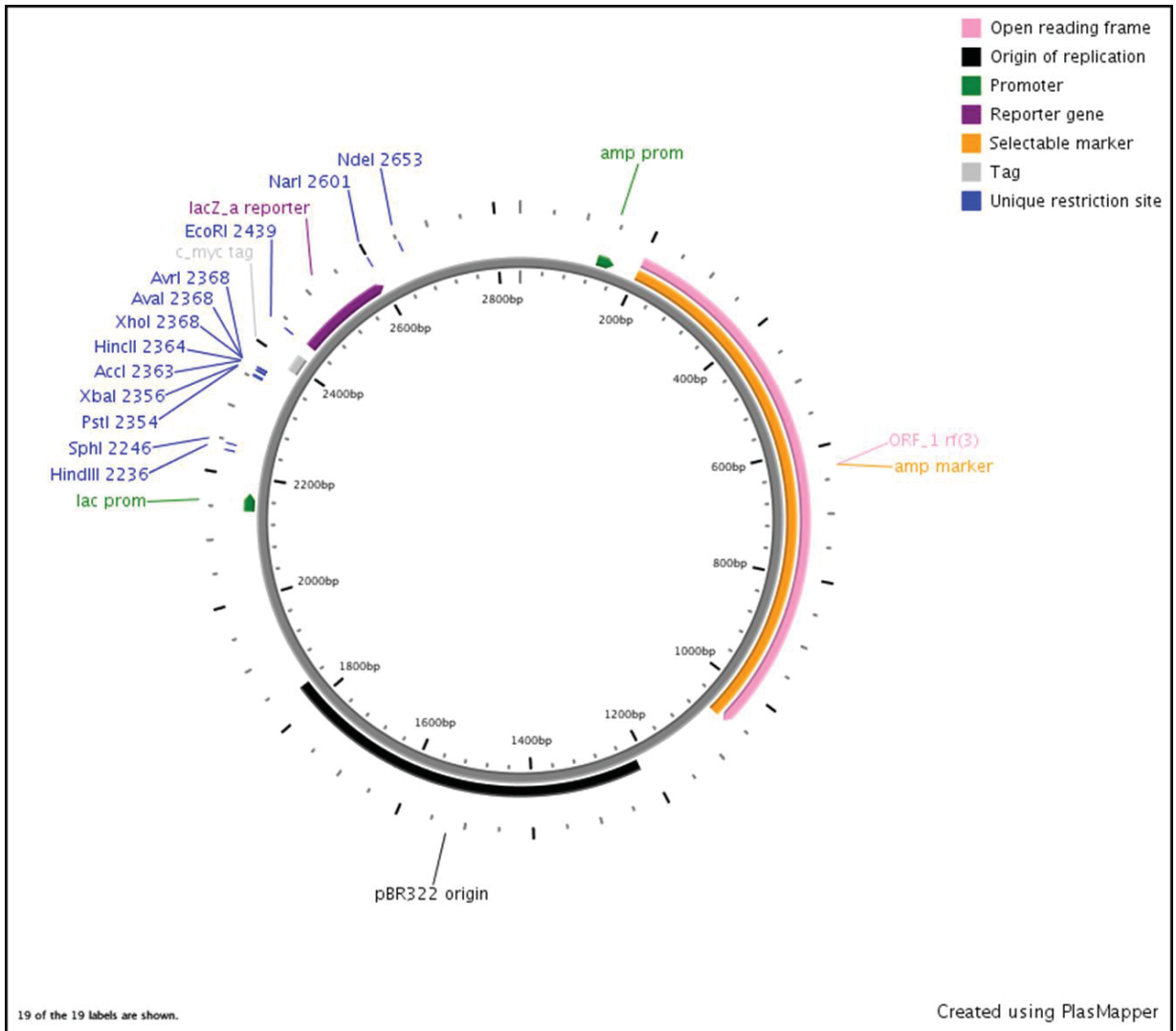
YAZAKI P.J., WU A.M., TSAI S.W., WILLIAMS L.E., IKLE D.N., WONG J.Y.C, SHIVELY J.E., RAUBITSCHEK A.A.. Tumor Targeting of Radiometal Labeled Anti-CEA Recombinant T84.66 Diabody and T84.66 Minibody: Comparison to Radioiodinated Fragments. **Bioconjugate Chem.** 2001, 12, 220–228

ZHANG Y. F. AND HO M.. Humanization of rabbit monoclonal antibodies via grafting combined Kabat/IMGT/Paratome complementarity-determining regions: Rationale and examples. **MABS**, 2017, VOL. 9, NO. 3, 419–429.  
<http://dx.doi.org/10.1080/19420862.2017.1289302>

## ANEXO 1 – INTERAÇÕES ENTRE OS RESÍDUOS DE AMINOÁCIDOS DOS ANTICORPOS E rLID1

<i>Anticorpo</i>	<i>Domínio anticorpo</i>	<i>Aminoácidos</i>	<i>Pontos críticos relevantes no antígeno</i>	<i>Distância (Å)</i>	
	<b>Anticorpo</b>	<b>Antígeno</b>			
<i>LimAb7</i>	H:CDR1	Ser31	Lys59	Felicori et al; 2006	2.68
	H:CDR2	Tyr52	Asn56	Murakami et al; 2005	2.87
	H:CDR2	Tyr52	Lys58	Felicori et al; 2006	2.84
	H:CDR2	Asp55	Lys58	Felicori et al; 2006	2.41
	H:CDR3	Tyr103	Gly18		2.73
	H:CDR3	Tyr103	Lys59		2.69
	H:CDR3	Tyr106	Arg55	Murakami et al; 2005	3.03
	H:CDR3	Tyr107	Gly54	Murakami et al; 2005	2.74
	L:CDR2	Val33	Lys234	De Moura et al; 2011	2.66
	L:CDR2	Asn34	Arg235	De Moura et al; 2011	3.29
	L:CDR2	Asn34	Asp233	De Moura et al; 2011	3.01
	L:CDR2	Glu35	Arg235		3.02
	L:CDR2	Glu35	Ser236		3.00
	L:CDR2	Asn36	Arg235		2.61
	H:CDR1	Ser31	Lys59	Felicori et al; 2006	2.58
	H:CDR1	Asp55	Asn56	Murakami et al; 2005	3.08
	H:CDR2	Asp55	Lys58	Felicori et al; 2006	2.77
	H:CDR2	Tyr101	Arg55		2.84
	H:CDR2	Tyr103	Asp21		2.91
	<i>scFv<sub>15h</sub>Li7</i>	H:CDR2	Lys105	Asp21	Felicori et al; 2009
H:CDR2		Lys105	Asp25	Felicori et al; 2009	2.56
H:CDR2		Tyr106	Glu22		2.91
H:CDR2		Tyr106	Arg55	Murakami et al; 2005	2.79
H:CDR3		Tyr107	Asp255		2.85
H:CDR3		Tyr108	Asp255		2.81
L:CDR2		Val33	Lys234	De Moura et al; 2011	2.74
L:CDR2		Asn34	Arg235	De Moura et al; 2011	2.92
L:CDR2		Glu35	Arg235		2.85
L:CDR2		Glu35	Arg235		3.02
L:CDR2		Glu35	Ser236		2.95
L:CDR2		Asn36	Arg235		2.87
L:CDR2		Asn36	Arg235		2.90
L:CDR2		Asn36	Asp255		2.77
L:CDR2	Asn37	Arg235		2.74	

### ANEXO 2 – MAPA PLASMIDEO pSW



## ANEXO 3 – ARTIGO PUBLICADO 2018

## Research Article

For reprint orders, please contact: [reprints@futuremedicine.com](mailto:reprints@futuremedicine.com)

## Nanomedicine



## Biomolecular engineering of antidehydroepiandrosterone antibodies: a new perspective in cancer diagnosis and treatment using single-chain antibody variable fragment

Rafaela L Fogaça<sup>†,1,3</sup>, Larissa M Alvarenga<sup>†,1,2,3</sup>, Thiago D Woiski<sup>4</sup>, Alessandra Becker-Finco<sup>3</sup>, Kadima N Teixeira<sup>5</sup>, Sabrina K Silva<sup>2,3</sup>, Rosana N de Moraes<sup>6</sup>, Lúcia de Noronha<sup>2,7</sup>, Magali Noiray<sup>8</sup>, Bonald C de Figueiredo<sup>4</sup>, Philippe Billiald<sup>\*\*8,9</sup> & Juliana de Moura<sup>\*,1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Pós-graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Curitiba, Brazil

<sup>2</sup>Pós graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Curitiba, Brazil

<sup>3</sup>Departamento de Patologia Básica – UFPR, Curitiba, Brazil

<sup>4</sup>Instituto Pele Pequeno Príncipe, Faculdades Pequeno Príncipe, Curitiba, Brazil

<sup>5</sup>Faculdade de Medicina – UFPR, Toledo, Brazil

<sup>6</sup>Departamento de Fisiologia – UFPR, Curitiba, Brazil

<sup>7</sup>Departamento de Medicina, PUCPR, Curitiba, Brazil

<sup>8</sup>Université Paris-Sud, Faculté de Pharmacie, INSERM UMR S1193 & UMS IPSIT, Châtenay-Malabry, France

<sup>9</sup>Muséum National d'Histoire Naturelle, CNRS UMR 7245, Paris, France

\*Author for correspondence: Juliana de Moura; Tel.: +55 41 3361 1692, Fax: +55 41 3266 2042; [julianademoura@ufpr.br](mailto:julianademoura@ufpr.br)

\*\*Author for correspondence: [philippe.billiald@u-psud.fr](mailto:philippe.billiald@u-psud.fr)

†Authors contributed equally

**Aim:** To develop a monoclonal antibody against dehydroepiandrosterone (DHEA) and miniaturize it, generating a single-chain antibody variable fragment (scFv) against DHEA as an adrenocortical carcinoma (ACC) marker. **Material & methods:** DHEA conjugated to keyhole limpet hemocyanin was used as an immunogen to obtain anti-DHEA hybridomas. Variable fragments were cloned from hybridoma 5B7 total RNA, and used to detect DHEA in normal adrenal tissue and ACC cells. **Results:** IgM monoclonal antibody was highly specific, and the recombinant scFv preserved parental antibody characteristics, allowing tissue localization of DHEA. **Conclusion:** Undefined small lesions are challenges for clinicians and impact clinical adrenocortical tumor management. Generating an anti-DHEA scFv facilitates development of imaging tests for early diagnosis of pediatric ACC.

First draft submitted: 4 July 2018; Accepted for publication: 6 December 2018; Published online: 29 January 2019

**Keywords:** adrenal cortex • adrenocortical carcinoma • dehydroepiandrosterone • DHEA • monoclonal antibody • scFv • tumor marker • zona reticularis

Dehydroepiandrosterone (3 $\beta$ -hydroxy-5-androsten-17-one, DHEA) is a steroid hormone secreted mainly by the adrenal cortex, although the gonads, brain, adipose tissue and gastrointestinal tract can also produce it. Readily converted to its sulfated metabolite DHEA sulfate (DHEA-S), DHEA and DHEA-S are the most abundant circulating steroid hormones of the adrenocortical system [1].

In the course of human fetal development, the fetal zone represents around 85% of the adrenal cortex and is responsible for high DHEA production [2,3]. Usually, within 6 months after childbirth DHEA and DHEA-S concentrations tend to decrease drastically and begin to rise again at the age of 6–8 years when the adrenarche period initiates and the zona reticularis layer of the adrenal cortex becomes the main source of DHEA [4].

DHEA and DHEA-S are highly sensitive and reliable markers of functioning childhood adrenocortical tumors because they increase progressively when the tumor mass is still undetectable by imaging methods [5]. Adrenocortical

Future  
Medicine



## ANEXO 4 – ARTIGO PUBLICADO 2018

Carbohydrate Polymers 185 (2018) 63–72



Contents lists available at ScienceDirect

Carbohydrate Polymers

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

## Physicochemical and immunological characterization of chitosan-coated bacteriophage nanoparticles for *in vivo* mycotoxin modeling



Carla Yoko Tanikawa de Andrade<sup>a</sup>, Isabel Yamanaka<sup>a</sup>, Laís S. Schlichta<sup>b</sup>, Sabrina Karim Silva<sup>a</sup>,  
Guilherme F. Picheth<sup>b</sup>, Luiz Felipe Caron<sup>a</sup>, Juliana de Moura<sup>a</sup>, Rilton Alves de Freitas<sup>b,\*</sup>,  
Larissa Magalhães Alvarenga<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> *Limq, Basic Patology Department, Federal University of Paraná, 81530-900 Curitiba, PR, Brazil*

<sup>b</sup> *Biopol, Chemistry Department, Federal University of Paraná, 81531-980 Curitiba, PR, Brazil*

## ARTICLE INFO

## Keywords:

Phage display  
Mimotope  
Aflatoxin B1  
Peptide carrier  
Mucosal vaccine  
Chitosan

## ABSTRACT

To propose a novel modeling of aflatoxin immunization and surrogate toxin conjugate from AFB1 vaccines, an immunogen based on the mimotope, (i.e. a peptide-displayed phage that mimics aflatoxins epitope without toxin hazards) was designed. The recombinant phage 3P30 was identified by phage display technology and exhibited the ability to bind, dose dependent, specifically to its cognate target – anti-AFB1 antibody. In immunization assay, the phage-displayed mimotope and its peptide chemically synthesized were able to induce specific anti-AFB1 antibodies, indicating the proof of concept for aflatoxin mimicry. Furthermore, the phage 3P30 was homogeneously coated with chitosan, which also provided a tridimensional matrix network for mucosal delivery. After intranasal immunization, chitosan coated phages improved specific immunogenicity compared to the free antigen. It can be concluded that affinity-selected phage may contribute to the rational design of epitope-based vaccines in a prospectus for the control of aflatoxins and possibly other mycotoxins, and that chitosan coating improved the vectorization of the vaccine by the mucosal route.

## 1. Introduction

Aflatoxins are secondary metabolites produced mainly by two *Aspergillus* species, namely *A. flavus* and *A. parasiticus* (WHO, 2002). These non-proteinaceous toxins responsible for aflatoxicosis, a disease which may affect both humans and animals, cause severe liver intoxication, usually leading to hemorrhagic necrosis of the organ, bile duct proliferation and edema (Wild, Miller, & Groopman, 2015).

The main route of exposure to aflatoxins is through the diet by the ingestion of aflatoxin-contaminated maize, peanuts (groundnuts), oil seeds, and tree nuts (Gibb et al., 2015). Although more than 20 aflatoxins have been identified, aflatoxin B1 (AFB1) is the most toxic and generally present in the largest quantity (Liu & Wu, 2010). AFB1 is also associated with the development of hepatocellular carcinoma, being classified since 1993 as group I human carcinogen by the International Agency for Research on Cancer (WHO, 1993).

Notably, 4.5 billion people from developing countries are chronically exposed to high amounts of aflatoxins and the intake of such toxins over a long period of time, even at low concentrations, significantly increases the risk of hepatocellular carcinoma and extrahepatic tumors (Gnonlonfin et al., 2013). AFB1 has a wide range of

biological activities, including genotoxicity, teratogenicity, hepatotoxicity, nephrotoxicity and immunosuppression (Wild et al., 2015).

As animals ingest aflatoxin-contaminated grains, important parameters of production are compromised and attributed to AFB1-induced tissue damage: highly reactive aflatoxin metabolites (e.g. AFM1) are formed in animal tissues and, consequently, meat and dairy products might also represent a potential risk to human health (WHO, 2002, 1993).

The best strategy to avoid aflatoxin intake by the general population is preventing fungal growth in agricultural products (Wild et al., 2015). However, when outbreaks occur, any physical or chemical detoxifying methodologies is able to guarantee complete safety (WHO, 2005; Baek, Lee, & Choi, 2012). Nonetheless, recent control strategies have been based on aflatoxin vaccines which perform immune-interception of the toxin using circulating or site specific antibodies (Wilkinson et al., 2003; Polonelli et al., 2011 and Giovati et al., 2014). The AFB1-derived vaccines, however, have been reported to produce a limited immunogenicity likewise such haptens (i.e. small molecule, not antigenic by itself) may be potentially toxic also when conjugated with protein carriers.

Therefore, one approach to avoid the toxicity of AFB1 derivatives

\* Corresponding authors.

E-mail addresses: [rilton@ufpr.br](mailto:rilton@ufpr.br), [rilton@quimica.ufpr.br](mailto:rilton@quimica.ufpr.br) (R.A. de Freitas), [lmalvarenga@ufpr.br](mailto:lmalvarenga@ufpr.br) (L.M. Alvarenga).

<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.12.063>

Received 29 September 2017; Received in revised form 6 December 2017; Accepted 22 December 2017

Available online 28 December 2017

0144-8617/ © 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.



## ANEXO 5 – ARTIGO SUBMETIDO EM OUTUBRO 2019



## **Loxoscelism: Advances and challenges in the design of antibody fragments with therapeutic potential**

1 [Sabrina Karim-Silva](#)<sup>1</sup>, [†](#), [Alessandra Becker-Finco](#)<sup>1</sup>, [Isabella Gizzi Jiacomini](#)<sup>1</sup>, [Arnaud Leroy](#)<sup>2</sup>, [Magali](#)  
2 [Noiray](#)<sup>2</sup>, [Juliana de Moura](#)<sup>1</sup>, [Nicolas Aubrey](#)<sup>3</sup>, [Philippe Billiald](#)<sup>2,4#</sup>, [Larissa M. Alvarenga](#)<sup>1#</sup>

3 <sup>1</sup> [Laboratorio de Imunoquimica](#), Departamento de Patologia Basica, Universidade Federal do Parana,  
4 Curitiba, PR, Brazil

5 <sup>2</sup>IPSIT, School of Pharmacy, University Paris-Saclay, Châtenay-Malabry, France

6 <sup>3</sup> INRA, UMR 1282, Faculté de Pharmacie, Université de Tours, Tours, France

7 <sup>4</sup>MCAM, UMR MNHN-CNRS 7245, Muséum national d'Histoire naturelle, Paris, France

8

9

### 10 \* Correspondence:

11 Larissa M. Alvarenga, Philippe Billiald

12 [lmalvarenga@gmail.com](mailto:lmalvarenga@gmail.com), [philippe.billiald@u-psud.fr](mailto:philippe.billiald@u-psud.fr)

13 **Keywords:** [venom](#), [antivenom](#), [neutralization](#), [loxosceles](#), [sphingomyelinase D](#), [humanization](#),  
14 [scFv](#)

15 **Running Title:** Humanized neutralizing antibody fragments for [loxoscelism](#)

16

### 17 Abstract

18 Envenoming due to [Loxosceles](#) spider bites still remains a neglected disease with particular medical concern in  
19 South America. To date, there is no consensus treatment for the management of [patients](#), still horse polyclonal  
20 [antivenoms](#) are available and usually infused to all patients with severe clinical and biological signs. Proteins  
21 of 30-35 kDa with [sphingomyelinase D](#) enzymatic activity, isolated from the whole venom, reproduce most of  
22 the toxic effects observed in [loxoscelism](#). For all these reasons, we believe that monoclonal antibody  
23 fragments targeting such toxins might lead to alternate safe and effective treatments.

24 In the present study, starting from the mouse monoclonal antibody LimAb7 which was previously shown to  
25 target (SMase) D from the venom of *L. intermedia* and neutralize the [dermonecrotic](#) activity of the whole  
26 venom, we designed humanized antibody V-domains which were then produced and purified as recombinant  
27 antibody fragments (scFvs). These molecules were characterized in terms of humanness, structural stability,  
28 antigen-binding activity and capacity of venom-neutralization. During this process, we clearly identified some  
29 blocking points that can impact the antigen-binding activity and neutralizing capacity. *In silico* docking  
30 analysis of the antigen/antibody interactions also allowed a better understanding of the antibody's  
31 neutralization mechanism and led to the reformatting of [the](#) humanized antibody fragment which, ultimately,  
32 recovered the functional characteristics required for efficient *in vitro* neutralization of the venom.

33

## ANEXO 6 – ARTIGO EM REVISÃO PARA SUBMISSÃO

IDENTIFICATION OF THE COMMON EPITOPE IN NOTINES AND SPHINGOMYELINS PRESENT IN LOXOSCELES SP VENOM BY MONOCLONAL ANTIBODY.

Camila Alves-Mondini<sup>a\*</sup>, Sabrina Karim-Silva<sup>a\*</sup>, Nicolle dos Santos Antunes<sup>a</sup>, Isabella Gizzi Giacomini<sup>a</sup>, Juliana de Moura<sup>a</sup>, Nicolas Aubrey<sup>b</sup>, Philippe Billiald<sup>c,d</sup>, Larissa M. Alvarenga<sup>a#</sup>, Alessandra Becker-Finco<sup>a#</sup>

<sup>a</sup> Universidade Federal do Parana, Departamento de Patologia Basica, Laboratorio de Imunoquimica, Curitiba, PR, Brazil

<sup>b</sup> Université de Tours - INRA, UMR 1282, Faculté de Pharmacie, 31 Avenue Monge, 37200 Tours Cedex, France.

<sup>c</sup> Muséum national d'Histoire naturelle et Centre National de la Recherche Scientifique, UMR 7245, 57 rue Cuvier, 75231 Paris Cedex 05, France

<sup>d</sup>University Paris-Sud, School of Pharmacy, UMS IPSIT, 5 rue J.-B. Clément, 92296 Châtenay-Malabry, France

\*Both authors contributed equally to this manuscript

#corresponding author

Larissa M. Alvarenga: lmalvarenga@gmail.com, lmalvarenga@ufpr.br

Alessandra Becker-Finco: abeckerfinco@gmail.com