

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARTINA BELTRAMINO

CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL *in vitro* DE UM ANTICORPO QUE RECONHECE TOXINAS DOS VENENOS DE *Loxosceles intermedia*, *Loxosceles laeta* e *Loxosceles gaucho*.

CURITIBA

2021

MARTINA BELTRAMINO

**CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL *in vitro* DE UM ANTICORPO QUE
RECONHECE TOXINAS DOS VENENOS DE *Loxosceles intermedia*, *Loxosceles
laeta* e *Loxosceles gaucho*.**

Monografia apresentada como requisito para conclusão do Curso de Ciências Biológicas – Bacharelado, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Larissa Magalhães Alvarenga
Co-orientadora: Profa. Alessandra Becker Finco

CURITIBA

2021

TERMO DE APROVAÇÃO

MARTINA BELTRAMINO

CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL *in vitro* DE UM ANTICORPO QUE RECONHECE TOXINAS DOS VENENOS DE *Loxosceles intermedia*, *Loxosceles laeta* e *Loxosceles gaucho*.

Monografia apresentada ao Curso de Graduação da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas pela seguinte banca examinadora:

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

Prof. Dr. Breno Castello Branco Beirão
Departamento de Patologia Básica
Setor de Ciências Biológicas – UFPR

Prof. Dr. Luís Felipe Minozzo Figueiredo
Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Campus Toledo

Curitiba, 21 de março de 2021.

AGRADECIMENTOS

À Deus, que me acompanha e ilumina todos os âmbitos da minha vida.

À minha orientadora, Professora Larissa Magalhães Alvarenga, pelo conhecimento transmitido de forma clara e atenta, pelo incentivo e confiança a mim depositados. Sempre disposta a me aconselhar e dividir experiências memoráveis com muito bom humor e carinho.

À minha co-orientadora, Professora Alessandra Becker Finco, por todo suporte oferecido e conhecimento transmitido com tanta serenidade. Aos conselhos muito bem recebidos e que chegavam sempre em boa hora.

À professora Juliana de Moura, que sempre tão atentamente me auxiliou quando necessário. Agradeço pelo carinho e disponibilidade.

Aos meus colegas de laboratório que foram e são sem dúvida grandes amigos que levo para vida. Isabella (Bella), Bruno, Bianca (Bi), Chaara (Chacha), Mariana (Mari) e Jéssica (Jé). Agradeço pela parceria dentro e fora do laboratório, pelo conhecimento e experiências divididas, pelo bom humor e disposição de todos sempre muito amáveis.

Aos meus pais, Soledad e Daniel, que sempre me incentivaram a ser um ser humano melhor e valorizar todos que estão à minha volta. Por todo apoio e suporte que não poderia ser melhor, minha eterna gratidão.

Aos meus irmãos, José Maria e Augusto, que mesmo de longe me dão todo apoio e amor incondicional. Pelos conselhos e ajudas que foram sempre sanadas com prontidão.

À todos meus amigos que de alguma forma contribuíram para minha formação dentro da academia e fora dela. Aqueles que me apoiaram e dispuseram de seu tempo para me ouvir e me aconselhar. Assim como aqueles que até participaram da reforma do laboratório com muita parceria e dedicação.

Aos membros da banca, Prof. Dr. Breno Castello Branco Beirão e Prof. Dr. Luís Felipe Minozzo Figueiredo, por aceitarem avaliar meu trabalho com muita prontidão e consideração.

À Universidade Federal do Paraná, essencial no meu processo de formação profissional, pela dedicação dos professores, e por tudo o que aprendi ao longo dos anos do curso.

Por fim, sou grata pela vida de todos que de alguma forma fizeram com que esse trabalho fosse possível. Meus mais sinceros agradecimentos.

“Para ser grande, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és
no mínimo que fazes.
Assim em cada lago a lua toda
Brilha, porque alta vive.”
(*Fernando Pessoa*)

RESUMO

O araneísmo no Brasil configura um problema de saúde pública, devido a grande quantidade de notificações. Mais especificamente no estado do Paraná, temos em evidência as espécies *Loxosceles intermedia*, *Loxosceles laeta* e *Loxosceles gaucho*, pertencentes ao gênero *Loxosceles*. O envenenamento por tais aranhas causam sintomatologias com características dermonecroticas desencadeando resposta inflamatória na região da picada. Em casos mais severos, pode haver aparecimento de sintomas a nível sistêmico, tais como hemólise e anemia, podendo levar o indivíduo a óbito. O diagnóstico de loxoscelismo em muitos casos pode ser confundido com outras patologias de sintomatologia similar. Seu tratamento, no Brasil, se dá por meio de remédios que aliviam os processos inflamatórios desencadeados pelo veneno, ou pela administração de fragmentos de anticorpos heterólogos provenientes do soro equino anti-loxoscélico (SALOX), que em alguns casos pode induzir efeitos adversos. Os desafios acerca do mecanismo de ação, do diagnóstico e tratamento do loxoscelismo motivam muitos grupos a estudarem e desenvolverem ferramentas que possam ser empregadas para promoção de melhorias no contexto dessa patologia. Anticorpos monoclonais, produzidos pelo nosso grupo, ajudaram a elucidar as funções e interações que ocorrem entre os venenos e o seu alvo, e como podemos proteger o organismo dessas ações deletérias. O presente trabalho objetivou a caracterização de um anticorpo monoclonal murino, previamente produzido pelo nosso grupo, LimAb12, a partir da imunização com os venenos das espécies *Loxosceles intermedia*, *Loxosceles laeta* e *Loxosceles gaucho*. Por meio da realização de imunoenaios, foi possível confirmar o alvo específico desse anticorpo, presente nos venenos de três espécies de aranhas do gênero *Loxosceles*. Para melhor caracterização funcional do LimAb12 foi padronizado um ensaio de hemólise *in vitro*, a fim de avaliar a influência do sistema do complemento na destruição das hemácias provocada pelos diferentes venenos, assim como o potencial inibitório desse efeito, pela adição do anticorpo.

Palavras-chave: *Loxosceles*, veneno, envenenamento, anticorpo monoclonal, hemólise.

ABSTRACT

Due to the large number of notifications and cases, araneism is a public health problem in Brazil. More specifically, in the state of Paraná, there is strong evidence of the prevalence of species *Loxosceles intermedia*, *Loxosceles laeta*, and *Loxosceles gaucho*, all which belong to the genus *Loxosceles*, being the main drivers on this national health concern. Envenomation by such spiders causes symptoms with dermonecrotic characteristics, triggering an inflammatory response in the biting region. In more serious cases, symptoms, such as hemolysis and anemia may appear at the systemic level, which in severe occasions may lead to death. The diagnosis of loxoscelism can often be confused with other pathologies that present similar symptoms. Its treatment, in Brazil, is based on employing drugs that relieve the inflammatory processes triggered by the venom, or more specifically, by the administration of heterologous antibody fragments from an anti-loxoscelic equine serum (SALOX), which can, in some cases induce adverse effects. The challenges regarding the mechanism of action, diagnosis, and treatment of loxoscelism motivates many groups to study and develop tools that can be used to promote improvements in the context of this pathology. Monoclonal antibodies (mAb), produced by our group, helped to elucidate the functions and interactions that occur between their target and the venom, and how we can protect the organism from these harmful effects. The present study aimed to characterize a murine monoclonal antibody, previously produced by our group, LimAb12, from the immunization of mice with the venoms of *Loxosceles intermedia*, *Loxosceles laeta*, and *Loxosceles gaucho*. Through the employment of immunoassays, it was possible to confirm the specific target of this antibody, present in the venoms of the three analyzed species of the *Loxosceles* genus analyzed. For a better functional characterization of LimAb12, an *in vitro* hemolysis assay was standardized to assess the influence of the complement system on the lysis of red blood cells elicited by different venoms, as well as the mAbs inhibitory potential of this effect.

Keywords: *Loxosceles*, venom, envenomation, monoclonal antibody, hemolysis.

LISTA DE FIGURAS:

Figura 1. Fotografia de espécimes adultos do gênero <i>Loxosceles</i>	16
Figura 2. Perfil eletroforético dos venenos e anticorpo..	24
Figura 3. ELISA para confirmar a reatividade dos sobrenadantes celulares produzidos pelo hibridoma secretor de LimAb12.	33
Figura 4. Fotografia do perfil eletroforético dos anticorpos purificados (LimAb12 Ven e LimAb12 A/G).	36
Figura 5. Fotografia da revelação das membranas de western Blot por DAB/Cloronaftol e ECL.	37
Figura 6. Gráfico representando reatividades obtidas dos anticorpos purificados frente ao veneno de <i>L. intermedia</i>	39
Figura 7. Fotografia do perfil eletroforético de LimAb12 frente os três venenos loxoscélicos.	40
Figura 8. Ensaio hemolítico <i>in vitro</i>	41
Figura 9. Ensaio hemolítico <i>in vitro</i> preliminar.	42

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 Epidemiologia	14
2.2 O gênero <i>Loxosceles</i>	15
2.3 Loxoscelismo - desafios no diagnóstico e tratamento.	17
2.4 Veneno e toxinas	18
2.5 Hemólise - como ferramenta para o estudo das toxinas loxoscélicas.....	21
2.6 Anticorpos, fragmentos recombinantes e biosensores	22
3 OBJETIVOS	25
3.1 Objetivo Geral	25
3.2 Objetivos Específicos.....	25
4 MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1 Descongelamento do hibridoma 4F10E12 e avaliação da secreção funcional de LimAb12	26
4.1.1 ELISA – <i>Enzyme-Linked immunofluorescent assay</i> para avaliação do sobrenadante celular.	26
4.2 Purificação do anticorpo monoclonal LimAb12 através de dois métodos distintos: (i) coluna de venenos de <i>Loxosceles sp.</i> imobilizados em <i>Sepharose</i> (ii) coluna de proteína A e G imobilizadas em <i>Sepharose</i>	27
4.2.1 Construção de coluna de proteína A e G imobilizadas em matriz de Sepharose.	27
4.2.2 Construção de coluna de venenos loxoscélicos imobilizados em matriz de Sepharose.	27
4.3 Avaliação da pureza e rendimento de purificação do LimAb12	28
4.3.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	28
4.3.2 <i>Western Blot</i> com soro anti-BSA.....	28
4.4 Caracterização Imunoquímica do LimAb12	29
4.4.1 ELISA.	29
4.4.2 SDS-PAGE/ <i>Western Blot</i>	29

4.5 Ensaio de hemólise na presença de venenos Loxoscélicos dependente e independente do sistema complemento	30
4.5.1 Padronização do ensaio de hemólise dependente do sistema de complemento.	30
4.5.2 Potencial hemolítico dos venenos de <i>L. intermedia</i> , <i>L. gaucho</i> e <i>L. laeta</i> dependente e independente do sistema de complemento.	31
4.6 Ensaio de neutralização da hemólise na presença de LimAb12	32
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5.1 Descongelamento e amplificação do hibridoma secretor de LimAb12.....	33
5.2 Produção e purificação do anticorpo monoclonal LmAb12.	34
5.3 Avaliação da pureza dos anticorpos purificados	34
5.3.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida 12.5 %.	34
5.3.2 <i>Western Blot</i>	36
5.4 Caracterização do anticorpo murino LimAb12	38
5.4.1 ELISA.	38
5.5. Reatividade de LimAb12 frente aos venenos.....	39
5.6 Padronização de um ensaio hemolítico na presença dos venenos de <i>L. intermedia</i>, <i>L. gaucho</i> e <i>L. laeta</i>.....	41
5.7 Capacidade de neutralização hemolítica do anticorpo LimAb12.	42
6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.	43
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45

1 INTRODUÇÃO

Os envenenamentos por animais são causados por uma ampla gama de espécies. Dentre estas estão as serpentes dos gêneros *Bothrops spp.*, *Crotalus spp.*, *Lachesis spp.* e *Micrurus spp.*, escorpiões pertencentes ao gênero *Tityus spp.* Os gêneros de aranhas mais populares nesses casos são, *Loxosceles spp.*, *Phoneutria spp.* e *Latrodectus spp.* Assim como anuros, lagartas, abelhas, vespas e formigas (SINAN, SUS).

Acidentes com aracnídeos são considerados de grande relevância clínica no Brasil, e também uma questão de saúde básica devido à sua alta incidência. Cerca de 8.400 acidentes foram reportados apenas no ano de 2019 no Brasil (SINAN, SUS), sendo as regiões Sul e Sudeste as com maior predominância de casos notificados. Dentre os gêneros de aracnídeos responsáveis por um maior número de notificações, encontramos o gênero *Loxosceles*, popularmente conhecido como aranhas marrons. Neste encontram-se espécies como *Loxosceles intermedia*, *Loxosceles gaúcho* e *Loxosceles laeta*, responsáveis por um alto número de casos clínicos de envenenamento reportados na América do Sul (EICKSTEDT, 1994).

O envenenamento pela picada dessas aranhas pode levar o indivíduo desde a assintomatologia a quadros mais leves como edema, bolhas e eritema no local de inoculação do veneno e mesmo necrose local com cicatrização bastante lenta e até comprometimento da funcionalidade desse tecido. Em casos mais severos, definidos com loxoscelismo sistêmico, os sintomas do agravamento do envenenamento compõe principalmente falência renal e anemia hemolítica aguda (GREMSKI et al., 2014; DIAS-LOPES et al., 2018) e podem levar as vítimas a óbito por falência múltipla de órgãos. Adicionalmente, a picada pode passar despercebida nos primeiros estágios devido a seu caráter indolor, de forma que o quadro inicial pode ser facilmente confundido com outra patologia, visto que não há um diagnóstico específico para loxoscelismo empregado no sistema de saúde atual (DA SILVA et al., 2004; DIAS-LOPES et al., 2018).

A composição complexa do veneno, bem como a presença de sinergismo entre seus componentes torna o entendimento dos processos relacionados ao diagnóstico e tratamento do loxoscelismo mais dificultosos, além das subnotificações de casos, de sintomas erroneamente diagnosticados por serem similares à de outras patologias e a

falta de identificação do animal que causou o acidente. Tendo isso em vista, se faz necessário um estudo mais aprofundado dos componentes que constituem o veneno e de como atuam no organismo humano.

As imunoglobulinas G (IgG) são amplamente empregadas para estudo de uma variedade de moléculas e processos biológicos devido a sua constituição e aplicabilidade (ABBAS et al., 2017; FIELDS et al., 2013). Aliado a essas características, o emprego das técnicas de engenharia genética torna possível o rearranjo das sequências das cadeias variáveis e assim, permite a produção de moléculas recombinantes alternativas, e mais bem adaptadas às diferentes formas de emprego (AUBREY et al., 2003; FIELDS et al., 2013).

A produção, a caracterização e a utilização de anticorpos tornam-se promissoras no sentido de promover melhorias na detecção, tratamento e estudo dos efeitos deletérios dos venenos (CHAVES-MOREIRA et al., 2017; ALVARENGA et al., 2013; SILVA et al., 2018, RONCOLATO et al., 2013). Nosso grupo produziu alguns anticorpos monoclonais, dentre eles o LimAb12, tema do presente estudo, que reconhece os venenos das três espécies loxoscélicas de maior relevância médica na América do Sul, *L. intermedia*, *L. gauch*o e *L. laeta*. Mais especificamente demonstrando afinidade pelas notinas (ou peptídeos ICK) e fosfolipases dos venenos, essas últimas reconhecidas por um mecanismo de reação cruzada. Esse mecanismo de reação cruzada foi investigado e os desdobramentos foram avaliados neste trabalho.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Epidemiologia

Envenenamentos causados por animais peçonhentos, sejam eles serpentes, aracnídeos, anuros ou insetos são reportados anualmente. Devido a distribuição endêmica destes animais, na maioria dos continentes, esses acidentes tornaram-se uma questão de saúde pública mundial. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2020), anualmente, entre 4,5 e 5,4 milhões de pessoas são vítimas de mordidas por serpentes no mundo. Já no tocante aos acidentes relacionados a aracnídeos, reportam-se aproximadamente 1,2 milhões de casos por ano de acidentes com escorpiões (ABROUG et al., 2020). Adicionalmente, aracnídeos possuem mais de

41.000 representantes de diversas espécies e pelo menos 23 gêneros têm algum caso reportado e amplamente citado na literatura científica mundial (PORRAS-VILLAMIL et al., 2020). Os envenenamentos provocados por aranhas são relativamente recorrentes, e dentre os gêneros de relevância médica estão *Latrodectus*, *Loxosceles*, *Phoneutria* (APPEL et al., 2015; ISBISTER et al., 2011).

Somente no ano de 2019, foram notificados 265.701 casos de acidentes por animais peçonhentos no Brasil. Destes, 30.482, 36.399 e 154.812 foram causados por serpentes, aranhas e escorpiões, respectivamente (SINAN, SUS). No estado do Paraná, foram registrados 3.810 casos de envenenamentos por aranhas oriundas do gênero *Loxosceles*, descrito por Heineken e Lowe em 1832 (LUCAS et al., 2015; SINAN).

2.2 O gênero *Loxosceles*

Loxosceles spp. ou aranhas marrons, como são conhecidas popularmente, pertencem a família Sicariidae e possuem o corpo dividido em cefalotórax com quatro pares de pernas; abdômen com fiandeiras (necessárias para produção de teia); e apêndices articulados localizados próximos à boca (um par de palpos e quelíceras) que auxiliam na captura da presa e inoculação do veneno, respectivamente (RUPPERT et al., 2005). Podem habitar cascas de árvores ou serapilheira, quando na natureza, e no ambiente doméstico, podem ser encontradas em móveis, roupas e calçados. Endêmicas da América do Sul e por sua vez do estado do Paraná, as espécies *Loxosceles intermedia*, *Loxosceles laeta* e *Loxosceles gaucho* (Figura 1) são consideradas as espécies mais relevantes devido sua importância médica (LOPES et al., 2020).



Figura 1. Fotografia de espécimes adultos do gênero *Loxosceles*. Fêmea de *L. gaucho* (A), fêmea de *L. intermedia* (B) fêmea de *L. laeta* (C), macho adulto de aranha marrom com ooteca (seta) (D), macho de *L. gaucho* (E), macho de *L. intermedia* (F), macho de *L. laeta* (G) e padrão em formato violino (seta) na região dorsal do cefalotórax de macho de *L. gaucho* (H). Fonte: adaptado de GREMSKI et al., 2014.

Apesar de pertencer ao mesmo gênero, cada espécie apresenta particularidades não somente em seu fenótipo mas também, na composição bioquímica de seus venenos. Pequenas diferenças na quantidade de ESTs (do inglês *tags* de sequências expressas) de toxinas do veneno foram demonstradas através de transcriptomas realizados das glândulas de veneno. As fosfolipases D (PLD) e metaloproteases possuem uma maior representatividade de transcritos nos três venenos, entretanto em *L. intermedia* e *L. laeta* há uma maior quantidade de ESTs de proteínas de baixa massa quando comparadas com *L. gaucho* (MACHADO et al., 2005; FERNANDES-PEDROSA et al., 2008; GREMSKI et al., 2010; CALABRIA et al., 2019).

O veneno das três espécies apresenta ação hemolítica dependente de complemento e foi observado que o veneno de *L. intermedia* causa lise das células devido a sensibilização destas pela ação das fosfolipases presentes no veneno, desencadeando a resposta do sistema complemento. Foi reportado também, que o veneno *L. laeta* induz a hemólise em maior grau que quando comparado com *L. gaucho* (LOPES et al., 2020).

Uma análise proteômica desenvolvida com os três venenos revelou a presença de proteínas de mesma massa molecular (30-35 kDa, representando as PLD) nas três espécies. Apesar de demonstrarem funções dermonecróticas similares na ação causada, foi demonstrado um maior potencial dermonecrótico do veneno de *L. laeta* comparado ao de *L. intermedia* (MACHADO et al., 2005; GREMSKI et al., 2014).

2.3 Loxoscelismo - desafios no diagnóstico e tratamento

Se dá o nome de Loxoscelismo às reações adversas características causadas pelo envenenamento por aranha-marrom. Esses sintomas podem ser cutâneos (70 % dos casos), como vermelhidão na região da picada, edema, inchaço devido ao aumento de irrigação e permeabilidade vascular, dermonecrose e dor na região da picada. Já em casos mais severos as reações podem atingir um nível sistêmico (cerca de 15 % dos casos), desencadeando respostas tais como febre, náuseas seguido de emese, hemólise intravascular e comprometimento da função renal, podendo culminar em falência múltipla de órgãos e resultar no óbito da vítima (3 % dos casos) (ALBUQUERQUE et al., 2018; DIAS-LOPES et al., 2018; LODEN et al., 2020).

De maneira geral, o diagnóstico de envenenamento por aranha marrom é realizado através da observação de sinais clínicos e análise de parâmetros físicos e bioquímicos do sangue da vítima, observando-se a hemólise evidente e presença de creatinina quinase no soro (em caso de suspeita de loxoscelismo sistêmico). Também é levado em conta o local da picada, identificação do animal, caso tenha sido levado ao local de assistência médica, e se a espécie em questão é endêmica daquela região onde o indivíduo foi acometido. Apesar disso, o loxoscelismo pode ainda ser confundido com outras patologias de sintomas e reações similares. Dessa forma, torna-se bastante necessária uma melhoria na especificidade dos métodos diagnósticos empregados para que seja realizado o tratamento mais adequado (MALAQUE et al., 2011).

No que concerne ao tratamento, apesar dos variados estudos acerca do loxoscelismo, ainda não existe um tratamento padrão amplamente utilizado (TAMBOURGI et al., 2010). Cada unidade de saúde utiliza diferentes estratégias e recursos para tratar seus pacientes. Seja o uso de antibióticos, anti-histamínicos, corticóides e analgésicos em casos mais leves e até transfusão sanguínea em casos mais severos. Todavia, esses tratamentos auxiliam no controle da sintomatologia do envenenamento, mas não possuem eficácia concreta em todos os casos (MALAQUE et al., 2011; ALBUQUERQUE et al., 2018).

No Brasil, o uso de soroterapia para o tratamento é mais difundido. E tem como objetivo a neutralização das toxinas presentes no veneno por meio de anticorpos de animais hiperimunes. Os animais são usualmente imunizados com um *pool* de venenos

de diversas espécies loxoscélicas e, assim, produzem imunoglobulinas contra esses antígenos, as quais são obtidas no soro. Contudo, o soro, de origem equina, possui anticorpos com diferentes especificidades, inclusive para componentes presentes nos venenos que não são tóxicos para o homem. Tendo isso em vista, a utilização deste tratamento deve ser feita com cautela pois, mesmo após uma série de etapas de processamento, o soro ainda pode provocar reações adversas, devido à natureza heteróloga das moléculas utilizadas. Esses efeitos colaterais podem ser desde pequenas alergias a reações severas, como choques anafiláticos e doença do soro, fisiopatologia desencadeada pela hipersensibilidade ao soro, formando imunocomplexos entre proteínas do sangue e do ativo injetado (CHAVES-MOREIRA et al., 2017; LODEN et al., 2020; RIXE et al., 2021).

O uso de anticorpos para neutralização de toxinas foi inicialmente descrito por volta do fim do século XIX e ainda hoje é utilizado para tratar envenenamentos por animais peçonhentos. Os fragmentos ligadores de antígeno Fabs e $F(ab')_2$, podem ser obtidos através da fragmentação de imunoglobulinas com a enzima proteolítica papaína e pepsina, e são muito utilizados na soroterapia para tratamento de envenenamento de serpentes, escorpiões e aranhas. As instituições responsáveis por produzirem soros antivenenos, no Brasil, são: o Instituto Butantan em São Paulo, o qual produz o soro antiaracnídico contra *Loxosceles gaucho*, *Phoneutria nigriventer*, *Tityus serrulatus* e *Tityus bahiensis*, e o Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos (CPPI) no Paraná, o qual produz o soro especificamente antiloxoscélico. Esse, é produzido unicamente pelo CPPI, e é denominado desta forma por ser um antiveneno específico contra o veneno das espécies *L. intermedia*, *L. Laeta* e *L. gaucho* (GREMSKI et al., 2014; SQUAIELLA-BAPTISTÃO et al., 2018).

2.4 Veneno e toxinas

O veneno de *Loxosceles* consiste em uma mistura complexa e de tom incolor, de proteases biologicamente ativas, as quais possuem peso molecular entre 3 kDa a 150 kDa. Dentre essas, as notinas ou peptídeos ICK (*Inhibitor cystine knot*) correspondem a 53,5 % do transcriptoma do veneno (MATSUBARA et al., 2013). Na literatura, já foram identificadas as notinas LiTx1, LiTx2, LiTx3 (DE CASTRO et al., 2004) e LiTx4, U2- SCRTX-Li1b (MATSUBARA et al., 2013). Sua estrutura consiste em

uma cadeia única de massa molecular de 3-10 kDa, que contém 6-14 cisteínas formando pontes de dissulfeto intramoleculares. Tais pontes formam uma estrutura que se assemelha a um nó, dando o nome à família. Sua ação neurotóxica depende da interação com canais iônicos neuronais, causando paralisia na presa (insetos dos quais as aranhas se alimentam) (GREMSKI et al., 2010; MATSUBARA et al., 2013).

As astacinas são metaloproteases dependentes de zinco e foram os primeiros componentes descritos do veneno loxoscélico (*Loxosceles* astacin-like proteinase - LALPs). Dentre estas, encontram-se dois tipos principais de metaloproteases: Loxolisina A (20-28 kDa) a qual degrada fibrinogênio e fibronectina e a Loxolisina B (32-35 kDa), que tem ação gelatinolítica (32-35 kDa). Estudos recentes caracterizaram a existência de cinco isoformas de astacinas sendo elas, LALP1, LALP2, LALP3, LALP4 e LALP5. Sua característica biológica consiste em facilitar a permeabilidade de outras toxinas do veneno no tecido danificado, exacerbando os efeitos dermonecróticos, a irrigação do local lesionado e a adesão plaquetária, entretanto, seu papel específico ainda não é bem compreendido (GRASHOF et al., 2020; GREMSKI et al., 2010; GREMSKI et al., 2020).

As fosfolipases-D pertencem à classe de toxinas mais estudada dentre os componentes do veneno de *Loxosceles*. Também conhecidas como esfingomielinases-D (PLD), devido a sua função hidrolítica de fosfolipídios, principalmente de esfingomielina, essas proteínas atuam na degradação de fosfolipídios da membrana celular, como seu nome sugere. Ao hidrolisar a esfingomielina, as fosfolipases D produzem ceramida-1-fosfato (C1P) e lisofosfatidilcolina (LPC), que por sua vez formam o ácido lisofosfatídico (LPA), o qual desencadeia respostas celulares inflamatórias, tais como: migração celular e produção de prostaglandinas. Sabe-se também que outros substratos suscetíveis à ação de fosfolipases D são glicerofosfolipídeos e lisofosfolipídeos. Essas enzimas possuem peso molecular entre 30-35 kDa e são classificadas de acordo com a quantidade de pontes de dissulfeto em seus sítios catalíticos. As PLDs de classe I contém apenas uma ponte de dissulfeto, e as de classe II contém duas pontes de dissulfeto. Os principais eventos biológicos associados à atividade das fosfolipases D loxoscélicas incluem dermonecrose, hemólise, aumento da permeabilidade vascular, edema e citotoxicidade (GREMSKI et al., 2010; CHAVES-MOREIRA et al., 2016; GREMSKI et al., 2020).

As hialuronidases (41-43 kDa) degradam principalmente o ácido hialurônico (constituente da membrana celular dos vertebrados), condroitina, sulfato de condroitina

e dermatan sulfato. Dessa forma atuam na destruição da matriz celular, agravando a dermonecrose e facilitando o alastramento gravitacional de outras substâncias do veneno, a partir do local da lesão (GREMSKI et al., 2020).

Alerginas são enzimas pertencentes a porção de proteínas de baixa massa do veneno. Responsáveis principalmente por edema ao redor da picada, coceira, vermelhidão, urticárias e, em alguns casos, reações de hipersensibilidade, promovendo uma ativação do sistema imune a nível celular (GREMSKI et al., 2020; JUSTA et al., 2020).

As TCTPs (do inglês *Translation Controlled Tumor Protein*) tem essa denominação por terem sido identificadas em tumores mamários humanos. São conhecidas também como *Histamin Releasing Factors* (HRFs) e estão envolvidas no processo alérgico decorrente do envenenamento, ativando mastócitos e basófilos, consequentemente desencadeando reações inflamatórias (GREMSKI et al., 2014; BOIA-FERREIRA et al., 2019; GREMSKI et al., 2020).

Por fim, as serino proteases são enzimas que têm como função principal a digestão das presas capturadas pelas aranhas, possuindo um papel proteolítico importante. Podem também interferir na coagulação sanguínea e destruição da derme em casos de envenenamento. Possuem peso molecular entre 85 e 95 kDa (GREMSKI et al., 2014; GREMSKI et al., 2020). Essas proteínas podem ser inibidas por outro componente do veneno, os inibidores de serino proteases, os quais têm como função proteger as próprias toxinas do veneno através da inativação das serino proteases (GREMSKI et al., 2014).

Apesar de diversos componentes do veneno estarem descritos na literatura, o uso de proteínas recombinantes foi um grande facilitador em termos técnicos, de forma que não é mais necessário o uso exclusivo de aranhas para a realização de estudos com os componentes do veneno. Além de ser possível a produção em larga escala destes componentes, dependendo das demandas experimentais. Alguns grupos de enzimas citadas anteriormente tiveram sua forma recombinante produzida e caracterizada, como é o caso de algumas isoformas das fosfolipases D, dentre elas a Smase I (FERNANDES PEDROSA et al., 2002) e Smase II (DE SANTE FERREIRA et al., 2009) derivadas de *Loxosceles laeta* e LiRecDT1, LiRecDT2 LiRecDT3 (RIBEIRO et al., 2007), LiRecDT4 e LiRecDT5 (DA SILVEIRA et al., 2007), LiRecDT6 (APPEL et al., 2008), LiRecDT7 (VUITIKA et al., 2013) e LiD1 (KALAPOTHAKIS et al., 2002) de *Loxosceles intermedia*; Smase D de *Loxosceles reclusa* (LEE et al., 2005) e LgRec1 de

Loxosceles gaucho (MAGALHÃES et al., 2013). Também foi avaliado o potencial protetor de anticorpos equinos produzidos pela imunização utilizando como imunógeno uma proteína quimérica recombinante construída/desenhada a partir de epitopos uma toxina dermonecrótica presente no veneno de *L. intermedia* (rLiD1), (FIGUEIREDO et al., 2014). Recentemente, foram caracterizadas também duas outras isoformas de PLDs, LoxTox1A e LoxTox11A, ambas de *Loxosceles similis* (LEAL et al., 2020).

2.5 Hemólise - como ferramenta para o estudo das toxinas loxoscélicas

São desencadeadas diversas reações por conta da inoculação do veneno. Normalmente são poucos microlitros injetados por picada, dependendo do tamanho, nutrição e dimorfismo da aranha. As características biológicas do acometido também são levadas em conta devido às reações geradas após o envenenamento (GREMSKI et al., 2014; CHAVES-MOREIRA et al., 2017).

A reação de hemólise é desencadeada por componentes do veneno loxoscélico que ao ligarem-se aos fosfolipídios da membrana celular dos eritrócitos, desencadeiam reações de hidrólise que resultam no distúrbio desta, causando lise (CHAVES-MOREIRA et al., 2016). Sabe-se que nesse processo são liberados metabólitos que disparam respostas inflamatórias associadas a presença do sistema complemento (GREMSKI et al., 2020). Tais interações vêm sendo elucidadas ao longo dos anos com diferentes protocolos *in vivo* e *in vitro* e em diferentes formatos, utilizando ou não o sistema complemento (TAMBOURGI et al., 1995; MANZONI DE ALMEIDA et al., 2018).

A literatura dispõe de estudos pioneiros feitos *in vitro* em 1977 por Futrell e colaboradores demonstrando a atividade hemolítica do veneno de aranhas do gênero *Loxosceles*. No estudo, é evidenciada a hemólise quando incubados os eritrócitos sensibilizados com veneno de *L. reclusa*, na presença de complemento. Não há ocorrência de hemólise quando realizado o mesmo ensaio, na ausência do sistema complemento. Revelando assim, a necessidade do uso do sistema complemento para ocorrência da hemólise *in vitro* e assemelhando-se ao que ocorre *in vivo* (MORGAN et al., 1978).

A respeito das vias responsáveis pela ativação do sistema complemento, tem-se de maneira geral as vias clássica, alternativa e das lecitinas. Estudos realizados sugeriram que a via utilizada pelo veneno loxoscélico ao disparar a cascata do

complemento seria a via alternativa, visto que as lesões na membrana provocadas pelas ações das fosfolipases D desencadeiam respostas deste tipo (KURPIEWSKI et al., 1981). Em 1995, Tambourgi e colaboradores desenvolveram um ensaio hemolítico *in vitro*, na presença do sistema de complemento, constatando hemólise na presença do veneno de *Loxosceles intermedia*. Este protocolo tem sido utilizado pelo grupo até a atualidade, inclusive demonstrando hemólise dependente do sistema complemento na presença de venenos de outras espécies do gênero *Loxosceles*, como *L. laeta*, *L. amazonica*, *L. willianilsoni* (TAMBOURGI et al., 1995; TAMBOURGI et al., 2021).

Entretanto, em 2009, um grupo de pesquisadores realizou um ensaio hemolítico direto, sem a adição do sistema complemento. O novo formato foi adaptado de Harris & Phoenix (1997), que avaliaram o potencial hemolítico de toxinas de *E. coli*. Desta forma, foi comprovada a ocorrência de hemólise também independentemente da adição do sistema complemento, em hemácias incubadas com veneno de *L. intermedia*, por 24 horas (FUTRELL et al., 1979; HARRIS et al., 1997; CHAVES-MOREIRA et al., 2009).

2.6 Anticorpos, fragmentos recombinantes e biosensores

Os primeiros estudos de identificação de imunoglobulinas (Ig) estão datados por volta do fim do século XIX, sendo estas inicialmente descritas como agentes sanguíneos, ou cadeias laterais, capazes de neutralizar toxinas (SCHROEDER et al., 2010). Sabemos que a produção endógena de anticorpos é decorrente do funcionamento do sistema imunológico, uma vez que células B, pertencentes ao sistema imune adaptativo, são ativadas por linfócitos T-helper ou quando seus receptores de superfície entram em contato com moléculas distintas e estranhas ao organismo próprio. Uma vez ativas, diferenciam-se em plasmócitos, que por sua vez secretam imunoglobulinas em sua forma solúvel (ABBAS et al., 2012).

Podemos definir como anticorpos policlonais imunoglobulinas originadas de diferentes clones de células B específicos para diversos epítomos de um mesmo antígeno e monoclonais quando originados por um único clone específico para um único epítomo antigênico, conhecidos como mAbs (*monoclonal antibodies*) (LIU et al., 2012).

As IgGs são o isotipo mais frequentemente encontrado no nosso corpo e são as Igs mais estudadas dentre todas as classes. Sua estrutura consiste basicamente em duas cadeias pesadas e duas leves idênticas, divididas em regiões constantes e

variáveis. As regiões variáveis são denominadas dessa forma, por serem a porção onde há maior variabilidade de sequência de aminoácidos e consequente a interação com o antígeno, possuindo assim porções denominadas, regiões determinantes de complementaridade (CDRs – do inglês). Tais domínios estão localizados nas regiões hipervariáveis da molécula, entre os *loops* das correntes beta (SCHROEDER et al., 2010; FIELDS et al., 2013).

A produção em larga escala de mAbs, para o *teranóstico* de diferentes patologias, foi facilitada quando, em 1975, Milstein e Köhler desenvolveram a tecnologia do hibridoma, onde células de mieloma foram fusionadas com células B de animais já imunizados contra um determinado antígeno. Devido sua alta especificidade, caracterização facilitada e redução na variabilidade de lotes, foi um grande passo na área da engenharia molecular e na imunologia (SCHROEDER et al., 2010; LIU et al., 2012).

Como consequência, houveram diversos estudos voltados à produção de anticorpos monoclonais e fragmentos recombinantes de anticorpos em diferentes formatos (CHEN et al., 2020) para que pudessem contribuir no entendimento, diagnóstico e tratamento de diferentes patologias (CHOW et al., 2012).

Com o avanço de trabalhos nessa área abriram-se caminhos no que se trata ao estudo de toxinas presentes em diversas espécies do reino animal (MARIUTTI et al., 2016). No geral, notamos que quando venenos entram em contato com o organismo humano, são desencadeadas diferentes reações celulares e como consequência, ocorrem distintos efeitos deletérios (BARMAN et al., 2018). Parte desses efeitos tóxicos foram elucidados através de ensaios que avaliaram sua ação direta sobre células e moléculas, através do emprego de anticorpos específicos, os quais permitiram um melhor entendimento do mecanismo de ação dos componentes presentes nos venenos, e também através do bloqueio parcial ou total da atividade dessas moléculas.

Para os venenos de serpentes, aracnídeos e abelhas já se tem descrito anticorpos monoclonais e/ou recombinantes específicos para diferentes componentes tóxicos, como mAb3 e mAb4 contra as miotoxinas I e II do veneno de *Bothrops atrox* (LOMONTE et al., 1992). Adicionalmente, Stoyanova e colaboradores (2012) produziram fragmentos recombinantes de anticorpos (scFvs) contra uma fosfolipase bothropica neurotóxica. Foram elaborados também scFv contra uma fosfolipase presente no veneno da abelha *Apis mellifera* (FUNAYAMA et al., 2012; SANTOS et al., 2013; PESSENDA et al., 2016). Em relação às toxinas presentes no veneno de

escorpiões, tem-se desde uma IgG produzida por Bahraoui e colaboradores (1988) contra toxina AahII presente no veneno de *Androctonus australis*, o monoclonal murino Ts1 que reconhece toxinas presentes no veneno *T. serrulatus* (Alvarenga et al., 2005), bem como um scFv (humano) contra o veneno total de *Tityus serrulatus* produzido por Pucca e colaboradores em 2012 e em 2014.

No contexto do loxoscelismo, em 2001, Guilherme e colaboradores produziram quatro anticorpos monoclonais (MoALg1, MoALg2, MoALg3 e MoALg4) contra uma PLAD de *L. gaucho* e demonstraram efeitos neutralizantes com uso no clone MoALg4. Dias-Lopes e colaboradores (2014), produziram o monoclonal Lid1mAb16 contra PLD de *L. intermedia* rLid1, com afinidade à uma região homóloga entre as PLDs das três espécies de aranhas, *L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta*, demonstrando potencial protetor de aproximadamente 80 % dos efeitos tóxicos hemorrágicos e dermonecróticos dos três venenos em coelhos.

Ao longo dos anos, nosso grupo produziu alguns anticorpos monoclonais e fragmentos que foram capazes de detectar e neutralizar alguns efeitos dos venenos de *L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta*. Em 2003, Alvarenga e colaboradores, produziram um anticorpo monoclonal murino, o LimAb7, que neutraliza a atividade de fosfolipases D do veneno de *L. intermedia*, consequentemente neutralizando a dermonecrose *in vivo* e a hemólise *in vitro*, com 100 % de eficácia nas condições avaliadas. Posteriormente, fragmentos recombinantes de anticorpos foram produzidos em diversos formatos (JIACOMINI et al., 2016 e KARIM-SILVA et al. 2016) e humanizados (KARIM-SILVA et al., 2020) a partir dos hibridomas secretores do LimAb7, com potencial uso na detecção e neutralização das fosfolipases.

Paralelamente, foram produzidos pelo nosso grupo dois outros anticorpos monoclonais reativos contra o veneno, não somente, de *Loxosceles intermedia*, mas para *Loxosceles gaucho* e *Loxosceles laeta*; o LimAb2 e o LimAb12.

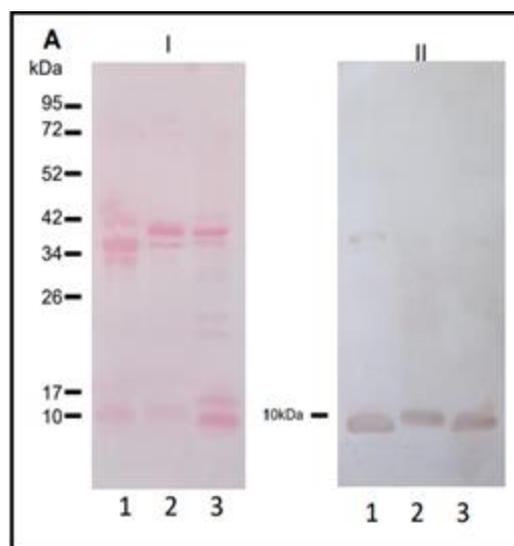


Figura 2. Perfil eletroforético dos venenos e anticorpo. (I) Perfil eletroforético dos venenos: *L. intermedia* (1), *L. gaucho* (2) e *L. laeta* (3) e reatividade (II) do LimAb12. PM: padrão molecular (kDa). Fonte: adaptado de MONDINI, 2018.

Em relação ao LimAb12, observamos que este reconhece componentes distintos do veneno quando comparado ao LimAb7, denominados notinas ou peptídeos ICK, e de forma cruzada as fosfolipases D (MONDINI et al., 2018 – dissertação mestrado). Além de descrever a produção do LimAb12, nosso grupo havia demonstrado em caráter preliminar o potencial do mesmo em inibir a hemólise provocada pelo veneno de *L. intermedia*. Para complementar os estudos previamente realizados por Camila Mondini (Figura 2), foram delineados outros ensaios de hemólise e frente aos demais venenos, com vista a melhor caracterização do LimAb12.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliação funcional do anticorpo monoclonal LimAb12 e de seu potencial de inibição da hemólise *in vitro*, provocada pelos venenos de *L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta*, na ausência e presença do sistema de complemento.

3.2 Objetivos Específicos

- Descongelar o hibridoma murino LimAb12.
- Purificar os anticorpos monoclonais empregando diferentes técnicas de enriquecimento.
- Caracterizar de maneira imunoquímica os anticorpos purificados através de ensaios de ELISA e *Western Blot*.
- Padronizar o ensaio de hemólise *in vitro* induzida pelos venenos de *L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta*.
- Avaliar a capacidade do LimAb12 em inibir a hemólise *in vitro*, provocada pelos diferentes venenos, tanto na ausência quanto na presença do sistema de complemento.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

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

Para realização dos seguintes passos serão utilizados os protocolos descritos em Fields et al, 2013.

4.1 Descongelamento do hibridoma 4F10E12 e avaliação da secreção funcional de LimAb12

Alíquotas do hibridoma secretor do LimAb12, armazenadas a -80 °C, foram descongeladas e transferidas para um tubo contendo 5 mL de meio DMEM. O tubo foi centrifugado a 125 xg, 20 °C por 6 min, e após a centrifugação o agente crioprotetor (dimetil sulfoxido - DMSO) foi removido e as alíquotas foram ressuspensas em 3 mL de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium – Sigma ®) e incubadas à 37 °C, 5 % CO₂. O meio de cultivo foi suplementado com 10 % soro fetal bovino (Gibco), 1 % de glutamina (Sigma Aldrich) e 1 % de penicilina-estreptomicina (Gibco).

4.1.1 ELISA – *Enzyme-Linked immunofluorescent assay* para avaliação do sobrenadante celular.

O antígeno, veneno de *L. intermedia* (5 µg.mL⁻¹ em cada poço), foi imobilizado na placa e mantido a 4 °C por 16 horas. Após esse passo, a placa foi lavada com PBS 1X, 200 µL de solução de bloqueio (caseína 2 %, PBS 1X) foi adicionada em cada poço e a placa foi incubada por 1 hora à 37 °C. A placa foi lavada novamente e os sobrenadantes celulares foram adicionados (100 µL de forma direta). A placa foi novamente incubada à 37 °C por 1 hora, lavada e, por fim, incubada com IgG anti-mouse *horseradich peroxidase* (HRP), na diluição de 1:6000 (Sigma Aldrich), por 1 hora à 37 °C. O ensaio foi revelado utilizando-se OPD (Ortofenilenodiamina) /H₂O₂.

4.2 Purificação do anticorpo monoclonal LimAb12 através de dois métodos distintos: (i) coluna de venenos de *Loxosceles sp.* immobilizados em *Sepharose* (ii) coluna de proteína A e G immobilizadas em *Sepharose*.

Para a purificação do anticorpo monoclonal murino LimAb12 duas estratégias distintas foram empregadas.

4.2.1 Construção de coluna de proteína A e G immobilizadas em matriz de Sepharose.

A purificação do LimAb12 foi realizada a partir do sobrenadante do hibridoma secretor LimAb12, por cromatografia de afinidade utilizando uma coluna com proteína A e proteína G immobilizadas em *Sepharose* CNBr - (Sigma Aldrich ®), segundo as etapas descritas em (ALVARENGA et al., 2003; WEBER-LIMA et al., 2020). 100 mL do sobrenadante celular, contendo os anticorpos de interesse, foram incubados com a coluna durante 16 horas a 4 °C, sob agitação leve. No dia seguinte, a resina foi lavada com PBS pH 7.3 e realizou-se a etapa de recuperação dos anticorpos pela adição de 4 mL de Glicina 0,1 M; pH 2,8; 0,15 M NaCl. O LimAb12 purificado foi então dialisado contra PBS 1X, 16 horas, a 4 °C. Após diálise, o material foi dosado pelo método de Bradford (BRADFORD et al., 1976) e armazenado a -20 °C. O produto final dessa purificação recebeu o nome de LimAb12 A/G

4.2.2 Construção de coluna de venenos loxoscélicos immobilizados em matriz de Sepharose.

Seguindo o protocolo descrito pelo fabricante, os venenos loxoscélicos de *Loxosceles intermedia*, *Loxosceles laeta* e *Loxosceles gaucho* foram immobilizados na resina *Sepharose*, para a purificação do anticorpo monoclonal murino LimAb12. Resumidamente, 1g de *Sepharose* CNBr - (Sigma ®) foi pesado e hidratado em solução de HCL (1 mM). Essa mistura foi posteriormente centrifugada (3000 rpm; 5 min; 4 °C) e seu sobrenadante retirado. Foram feitas duas lavagens com tampão de ligação (NaHCO₃ 0,1M; pH 8,3; 0,5M de NaCl), e o preparado foi centrifugado novamente (3000 rpm; 5 min; 4 °C), posteriormente descartando o sobrenadante. Um *pool* composto pelos três venenos (3,2 mg) foi adicionado e permaneceu sob incubação por 2 horas,

sob leve agitação, à temperatura ambiente, e posteriormente por 16 horas a 4 °C. Para o bloqueio dos grupos que permaneceram livres e ativos na resina, a coluna foi incubada em solução de glicina (0,2 M; pH 8,0; 0,5 M NaCl) durante 2 horas à temperatura ambiente durante 16 horas à 4 °C. Ao final, foi lavada alternadamente com dois tampões de diferentes pH, tampão acetato (0,1 M de acetato de sódio; pH 4,0; 0,5 M NaCl) e tampão carbonato (0,1 M de carbonato de sódio; pH 8,3; 0,5 M NaCl), para remoção de resíduos ligados fracamente à resina. Após as lavagens, a coluna foi centrifugada (3000 rpm; 5 min; 4 °C) uma última vez, o sobrenadante descartado, e armazenada em azida de sódio 0,1 %.

Para a purificação, a solução de azida 0,1 % foi retirada e a coluna foi lavada com PBS 1X. Subsequentemente, 100 mL do sobrenadante coletado foram incubados com a coluna overnight, a 4 °C, sob agitação leve. No dia seguinte, a coluna foi lavada com PBS 1X e a etapa de eluição realizada com 4 mL de Glicina (0,1 M; pH 2,8; 0,15 M NaCl). O LimAb12 purificado foi então dialisado contra PBS 1X, overnight, a 4 °C. No dia seguinte, o dialisado foi retirado da membrana e dosado pelo método de Bradford (BRADFORD et al., 1976) e armazenado a -20 °C. O produto final dessa purificação recebeu o nome de LimAb12 Ven.

4.3 Avaliação da pureza e rendimento de purificação do LimAb12

4.3.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Amostras contendo 3 µg de LimAb12 (LimAb12 Ven, purificado em coluna de veneno), LimAb12 (LimAb12 A/G, purificado em coluna de proteína A e G) e BSA (Albumina bovina sérica), foram analisados em um gel de poliacrilamida 12,5 %, na presença e ausência do agente redutor β-mercaptoetanol, a 150 V, por 2 horas à temperatura ambiente. Após finalizada a migração eletroforética, o gel foi corado com Coomassie Blue.

4.3.2 Western Blot com soro anti-BSA.

Após realização de um SDS-PAGE, mesmas condições descritas anteriormente, as proteínas resolvidas no gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, por 16 horas a 24 V. Posteriormente, a membrana foi saturada com solução de bloqueio

(caseína 5% + Tween 0.05%) por 1 hora à temperatura ambiente. A membrana foi incubada com soro anti-BSA 1:100, a 37°C, sob leve agitação. Em seguida, a membrana foi submetida a três lavagens com PBS 1X + Tween 0,05% e incubada com anti-mouse conjugado à HRP (Sigma Aldrich) 1:5000, 37°C sob leve agitação. A visualização dos imunocomplexos foi verificada por dois métodos: quimiluminescência (ECL) em filme ultrasensível e por DAB/Cloronaftol.

4.4 Caracterização Imunoquímica do LimAb12

Para testar a especificidade dos anticorpos monoclonais frente às proteínas do veneno das três espécies de loxoscélicas – *L. intermedia*, *L. gaucho*, *L. laeta* - testes de ELISA e *western blot* foram realizados, segundo o protocolo descrito e empregado por Karim-Silva et al, 2016.

4.4.1 ELISA.

O veneno de *L. intermedia* (0, 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) foi adsorvido na placa (NUNC Maxisorp) e mantido a 4 °C, por 16 horas. No dia seguinte, a placa foi submetida a lavagens com PBS 1X, saturada com 200 μL de solução de bloqueio (caseína 2 %, PBS 1X) em cada poço e incubada por 1 hora à 37 °C. Posteriormente, a placa foi lavada, e LimAb12 Ven e LimAb12 A/G foram testados em diferentes concentrações (8 - 0,06 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) por 1 hora à 37°C. Após esse tempo, a placa foi lavada e, por fim, incubada com IgG anti-mouse HRP diluída 1:6000 (Sigma Aldrich), por 1 hora à 37 °C. A revelação foi realizada utilizando-se OPD/H₂O₂.

4.4.2 SDS-PAGE/*Western Blot*.

Uma separação eletroforética das toxinas de *Loxosceles intermedia*, *Loxosceles gaucho* e *Loxosceles laeta* (5,0 $\mu\text{g/canaleta}$) foi realizada em gel de poliacrilamida 12,5 % (SDS-PAGE). Para o ensaio de *Western Blot*, o gel foi transferido para uma membrana de nitrocelulose, *overnight* a 24 V. No dia seguinte, a membrana foi saturada com solução de bloqueio (caseína 5 % + Tween 0.05%) durante uma hora, à temperatura ambiente e, após esse tempo, a membrana foi cortada em três tiras, sendo

cada tira uma réplica. As 3 partes da membrana foram incubadas com (i) LimAb12 A/G ($10 \mu\text{g.mL}^{-1}$), (ii) mAb3 purificado ($10 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e (iii) SALOX 1:30.000, respectivamente, a 37°C sob leve agitação. Em seguida, as membranas passaram por três lavagens de PBS 1X + Tween 0,05% e foram incubadas com anti-mouse conjugado à HRP (Sigma Aldrich) diluído 1:5.000 (i e ii) e anti-horse HRP 1:30.000 (iii), a 37°C sob leve agitação. A revelação foi realizada por dois métodos: por ECL em filme ultrassensível e DAB/Cloronaftol.

4.5 Ensaio de hemólise na presença de venenos Loxoscélicos dependente e independente do sistema complemento

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 registro de número CEP/SD2911004.

4.5.1 Padronização do ensaio de hemólise dependente do sistema de complemento.

Para padronização deste ensaio, o sangue de doadores saudáveis foi coletado em tubos contendo citrato de sódio (BD Plastipak, Franklin Lakes) e centrifugado a 200 xg por 15 minutos, possibilitando a separação da série vermelha e do soro. Após o fracionamento, os eritrócitos foram lavados 3 vezes com Lactato de Ringer (LR) – Jp Indústria Farmacêutica S.A. Em seguida, foi realizada a contagem das células em câmara de Neubauer e 10^8 eritrócitos/mL foram incubados em tubos de 2 mL com 1,25 μg de veneno de *L. intermedia* diluídos em Lactato de Ringer. Como controle negativo, utilizou-se apenas Lactato de Ringer e como controle positivo de lise, água destilada e 0.1 % (v/v) de Triton X-100. O volume final de cada tubo foi ajustado para 1 mL e todas as condições foram testadas em duplicatas. Os tubos foram incubados à 37°C por 24 horas, sob agitação. No dia seguinte, os tubos foram centrifugados a 200 xg por 5 minutos e o sobrenadante analisado em espectrofotômetro a 570 nm, conforme o protocolo descrito por Chaves-Moreira et al., 2009. Subsequentemente, para adição do sistema de complemento, as células foram lavadas 2 vezes com Lactato de Ringer e centrifugadas a 500 xg em cada etapa. Após retirado o sobrenadante, soro humano (do

mesmo doador de sangue utilizado na hemólise indireta) foi adicionado às células em 3 diluições: 1:2, 1:4 e 1:8, e os tubos foram incubados por mais uma hora, a 37 °C, sob agitação. Por fim, os tubos foram centrifugados à 200 xg por 5 min e o sobrenadante analisado em no espectrofotômetro, no comprimento de onda de 570 nm. A taxa de hemólise foi calculada, primeiramente, pela subtração da absorbância a 570 nm do branco (Tampão Lactato Ringer) em todas as amostras sem e com complemento. Posteriormente, foi feita a divisão entre a absorbância a 570 nm da amostra e a soma das absorbâncias a 570 nm do veneno sem e com complemento, e o resultado foi multiplicado por 100. Foram considerados os valores de 100 % de hemólise a soma das absorbâncias a 570 nm do veneno antes e após a adição do complemento. A média e o desvio padrão foram determinados a partir de amostras duplicadas.

4.5.2 Potencial hemolítico dos venenos de *L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta* dependente e independente do sistema de complemento.

Para padronização da atividade hemolítica direta e indireta *in vitro* provocada pelos venenos das três espécies de *Loxosceles*, o sangue de doadores saudáveis foi coletado em tubos contendo citrato de sódio (BD Plastipak, Franklin Lakes) e centrifugado a 200 xg por 15 minutos, possibilitando assim a separação da série vermelha e do soro. Os eritrócitos foram recuperados, dispostos em tubos e lavados 3 vezes com Lactato de Ringer – Jp Indústria Farmacêutica S.A. Diferentes concentrações de cada um dos três venenos loxoscélicos (1,25; 2,5; 5,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) foram incubadas com 10^8 eritrócitos humanos, diluídos em lactato de ringer, em um volume final de 1mL/tubo. Como controle negativo, utilizou-se apenas Lactato de Ringer e como controle positivo, água destilada e 0.1 % (v/v) de Triton X-100. Todas as condições foram testadas em duplicata. Os tubos foram incubados à 37°C por 24 horas, sob agitação leve. No dia seguinte, os tubos foram centrifugados à 200 xg por 5 minutos e o sobrenadante lido em espectrofotômetro no comprimento de onda de 570 nm, de acordo com as etapas descritas por Chaves-Moreira et al., 2009. Em seguida, os tubos foram lavados novamente com Lactato de Ringer, centrifugados e seus sobrenadantes descartados. O soro normal humano (do mesmo doador) foi adicionado aos tubos na diluição de 1:4, e esses foram incubados à 37 °C, por uma hora, sob agitação leve.

Finalmente, os tubos foram centrifugados à 200 xg por 5 minutos e seus sobrenadantes lidos em um espectrofotômetro no comprimento de onda de 570 nm.

Os valores de absorvância obtidos foram transformados em porcentagem de hemólise considerando-se o controle positivo (Triton X-100) como representativo de 100 % de lise.

A taxa de hemólise total na presença dos venenos foi calculada, primeiramente, pela subtração da absorvância a 570 nm do controle negativo (Lactato de Ringer) em todas as amostras sem e com complemento, posteriormente foi feita a divisão entre a absorvância a 570 nm da amostra e a soma das absorvâncias a 570 nm do veneno sem e com complemento, e o resultado multiplicado por 100. Foram considerados os valores de 100 % de hemólise a soma das absorvâncias a 570 nm do veneno antes e após a adição do complemento. A média e o desvio padrão foram determinados a partir de amostras duplicadas.

4.6 Ensaio de neutralização da hemólise na presença de LimAb12

4.6.1 Avaliação do potencial neutralizante de hemólise do anticorpo Limab12 frente aos venenos de *L. intermedia*, *L. laeta* e *L. gaucho*.

Com o objetivo de se avaliar o potencial neutralizante do anticorpo LimAb12 frente aos venenos das três espécies de *Loxosceles*, o sangue de voluntário saudável foi coletado em tubos contendo citrato de sódio (BD Plastipak, Franklin Lakes) e centrifugado a 200 xg por 15 minutos, separando-se, assim, o soro da série vermelha. Os eritrócitos foram dispostos em tubos e lavados três vezes com Lactato de Ringer (LR) – Jp Indústria Farmacêutica S.A. Subseqüentemente, 10^8 eritrócitos humanos foram incubados com diferentes concentrações de LimAb12 (12,5; 25; 50 pmol) junto aos venenos de *L. intermedia* ($10 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e diluídos em lactato de ringer, em volume final ajustado de 1 mL. Como controle negativo, foi utilizado mAb3 (50 pmol) e como controle positivo, LimAb7 (50 pmol). Todas as condições foram testadas em duplicata. Os tubos foram incubados à 37 °C por 24 horas, em agitação leve. No dia seguinte, as células foram centrifugadas à 200 xg por 5 minutos e o sobrenadante lido em um espectrofotômetro no comprimento de onda de 570 nm, de acordo com o protocolo descrito por Chaves-Moreira et al., 2009.

Os resultados foram expressos em porcentagem de hemólise, considerando o veneno sem a presença de anticorpo como 100% de hemólise.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Descongelamento e amplificação do hibridoma secretor de LimAb12

Após o descongelamento do clone 4F10A12 e manutenção do hibridoma, o sobrenadante celular foi coletado em diferentes tempos para isolamento das imunoglobulinas. Os sobrenadantes foram testados frente ao veneno de *L. intermedia* para avaliar se após descongelamento os anticorpos se mantinham funcionais. Conforme a Figura 3, foi possível avaliar a reatividade dos sobrenadantes testados, confirmando a funcionalidade dos anticorpos secretados. Apenas um dos tempos de coleta apresentou baixa reatividade. Tendo em vista tal reatividade com os antígenos específicos, foi feito um *pool* dos sobrenadantes reativos para prosseguir com a purificação das imunoglobulinas.

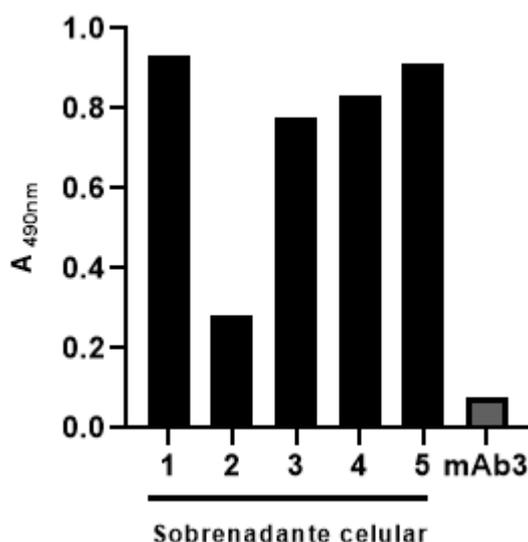


Figura 3. ELISA para confirmar a reatividade dos sobrenadantes celulares produzidos pelo hibridoma secretor de LimAb12.

Foi imobilizado o veneno de *L. Intermedia* (10 µg.mL⁻¹) e adicionado 100 uL de amostras de sobrenadantes celulares coletados em diferentes períodos de cultivo, 15/12/2020 (1), 28/12/2020 (2), 31/12/2020 (3), 02/01/2021 (4) e 04/01/2021 (5). Como controle negativo foi empregado sobrenadante do mAb3 (anticorpo irrelevante). Imunocomplexos foram detectados pela adição de anti-IgG de mouse-HRP (1:6.000). FONTE: a AUTORA.

Também foi observado em outros trabalhos publicados pelo nosso grupo que a manutenção dos hibridomas em condições adequadas de temperatura, é possível com o descongelamento, a obtenção de células viáveis e capazes de secretar anticorpos funcionais (WEBER-LIMA et al., 2020). Sobre a manutenção da reatividade, somente num dos pontos testados isso não foi verificado, que pode ser explicado pelo longo período transcorrido entre as coletas, que gerou uma condição desfavorável para a viabilidade das células e consequente secreção dos anticorpos.

5.2 Produção e purificação do anticorpo monoclonal LmAb12.

O anticorpo LimAb12 foi purificado utilizando-se o princípio de imunocromatografia de afinidade, *Immobilized metal affinity chromatography* (IMAC), em dois diferentes formatos, para comparar a eficácia no enriquecimento das imunoglobulinas específicas. O primeiro, um dos formatos mais comuns para purificação de anticorpos, consistiu em uma matriz de *Sepharose* ligada às proteínas A e G de *Streptococcus* (ARORA et al., 2016) e o segundo formato, consistiu na construção de uma coluna com um *pool* de venenos loxoscélicos imobilizados na matriz de *Sepharose*.

Nas condições descritas na metodologia o rendimento obtido $0,8 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de proteína pelo método *Sepharose-Li* e $15,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$, pelo método *Sepharose* proteína A e G. Os resultados obtidos demonstram um rendimento baixo segundo Goding (1996), o qual relata que o rendimento da produção de anticorpo monoclonal, em sobrenadantes de cultura celular, varia de 5 a $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$, dependendo de fatores como desenvolvimento individual e densidade cultura celular (FREITAS et al., 2009).

5.3 Avaliação da pureza dos anticorpos purificados

5.3.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida 12.5 %.

Para confirmar a pureza das imunoglobulinas purificadas, as amostras foram submetidas a uma separação eletroforética. Os anticorpos foram resolvidos, assim

como BSA (Albumina Bovina Sérica), em um gel de poliacrilamida posteriormente corado por *Coomassie blue*.

Os anticorpos purificados em *Sepharose-Li* (LimAb12 Ven) estão indicados pelos números 1 e 3, já os purificados por *Sepharose- Prot. A/G* (LimAb12 A/G) pelos números 2 e 4. É possível visualizar em 1 uma banda com massa molecular de aproximadamente 60 kDa (indicada pela seta branca), sugerindo que mesmo após purificação existe uma contaminação por BSA. Nota-se, também, a presença de três bandas na amostra 4 na qual o LimAb12 A/G foi resolvido na presença do agente redutor, sugerindo a presença de IgG bovina na totalidade do purificado. As imunoglobulinas G de origem bovina possuem pequenas diferenças no seu peso molecular e na maneira em que são clivadas na presença do agente redutor, β -mercaptoetanol. Quando reduzidas suas cadeias pesadas (55 kDa) de peso similar as murinas, situam-se na mesma altura formando uma única banda, indicada pela seta preta na figura 4. Enquanto as cadeias leves bovinas com peso molecular de 28 kDa (indicado pela seta azul na Figura 4) diferenciam-se das murinas de 25 kDa (assinalada pela seta vermelha) formando duas bandas no perfil eletroforético (RASMUSSEN et al., 2005).

Um estudo realizado por Gall-Debreceni e colaboradores (2016), também demonstrou a presença de IgG bovina, ainda que baixa concentração, entre 0.3 e 8.3 %. O resultado foi obtido por meio do desenvolvimento de um teste ELISA sanduíche para detecção de contaminantes, em cultura de anticorpos monoclonais de origem murina. Em solução para evitar a presença de impurezas derivadas da suplementação de origem bovina, nas culturas celulares, é sugerido ainda, o uso de soros depletadas ou seja, com ausência de IgG bovinas e BSA (GALL-DEBRECENI et al., 2016). Contudo alguns estudos comprovam, que ainda assim pode haver contaminação com IgG de origem bovina, mesmo que em escalas reduzidas (RASMUSSEN et al., 2005).

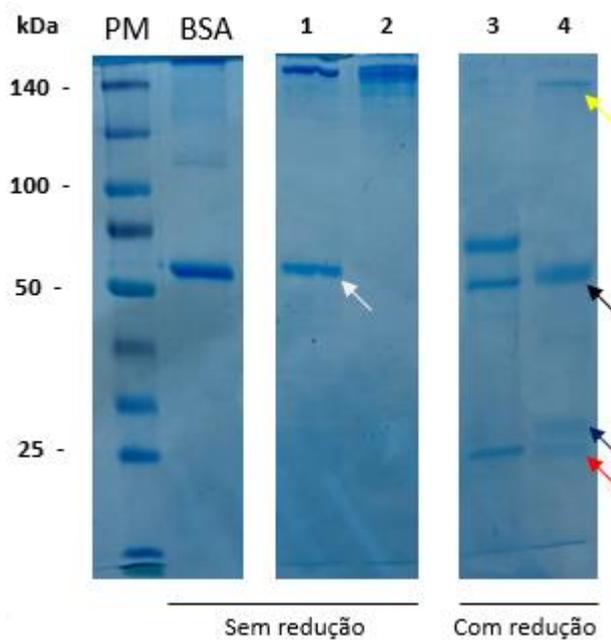


Figura 4. Fotografia do perfil eletroforético dos anticorpos purificados (LimAb12 Ven e LimAb12 A/G). 3 μ g de BSA (BSA), LimAb12 Ven na ausência do agente redutor β -mercaptoetanol (1), seta em branco indicando a possível contaminação por BSA no purificado; LimAb12 A/G ausência do agente redutor β -mercaptoetanol (2), LimAb12 Ven na presença do agente redutor β -mercaptoetanol (3) e LimAb12 A/G presença do agente redutor β -mercaptoetanol (4), seta amarela indicando IgG não resolvidas (150-160 kDa), seta preta indicando a banda de cadeia pesada de IgG murina e bovina (50-55 kDa), seta azul indicando a cadeia leve de IgG bovina (28 kDa) e seta vermelha indicando as cadeias leves de IgG murina (25 kDa) resolvidos em um gel de poliacrilamida 12,5 % e corado com Coomassie Blue. PM: padrão molecular (kDa). Fonte: a AUTORA.

5.3.2 Western Blot.

Com intuito de confirmar a possível contaminação por BSA no *pool* dos anticorpos purificados por coluna de veneno, foi realizado uma eletroforese nas mesmas condições do ensaio supracitado e um *Western blot*. Através da utilização de um soro anti-BSA, foram observadas, por meio de dois métodos de revelação, bandas com massa molecular de aproximadamente 60 kDa (Figura 5, seta branca), confirmando a presença da albumina bovina.

Com a utilização da técnica de purificação *Sepharose-Li*, uma maior seletividade na separação era esperada, uma vez que no outro método de purificação, as proteínas A e G poderiam reter a imunoglobulina bovina presente no meio de cultura enriquecido com soro fetal bovino. Contudo, de acordo com os resultados obtidos, podemos concluir

que o método utilizando *Sepharose-Li* também levou a presença de contaminantes, no caso a albumina bovina.

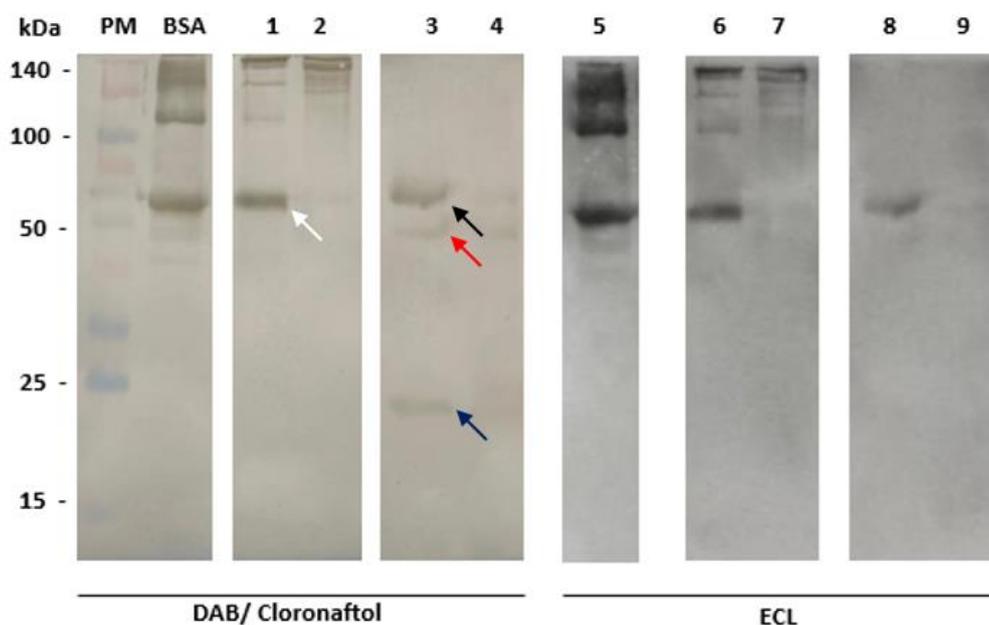


Figura 5. Fotografia da revelação das membranas de western Blot por DAB/cloronaftol e ECL.

Três μg de BSA na presença do agente redutor β -mercaptoetanol (BSA), LmAb12 Ven na ausência do agente redutor β -mercaptoetanol (1), (seta branca indicando possível contaminação por BSA); LmAb12 A/G na ausência do agente redutor β -mercaptoetanol (2), LmAb12 Ven (seta preta indicando possível contaminação por BSA) (3), seta vermelha indicando cadeia pesada do anticorpo e seta azul indicando cadeia leve do anticorpo) e LmAb12 A/G na presença do agente redutor β -mercaptoetanol (4), BSA na ausência do agente redutor β -mercaptoetanol (5), LmAb12 Ven (6) e LmAb12 A/G (7) na ausência do agente redutor β -mercaptoetanol, LmAb12 Ven (8) e LmAb12 A/G (9) presença do agente redutor β -mercaptoetanol foram separadas por SDS-PAGE 12,5 % e transferidas para membrana de nitrocelulose. Incubada com soro anti-BSA 1:100. As bandas foram detectadas pela adição de anti-mouse HRP(1:5000) por 1 h/37 °C. A revelação foi observada por 2 minutos de exposição no filme de raio-x por quimioluminescência (ECL) e exposta a DAB e Cloronaftol para visualização das bandas. PM: padrão molecular (kDa). Fonte: a AUTORA.

Sabe-se que BSA é utilizado em diversas soluções como estabilizador de enzimas (DUSKEY et al., 2020), sem alterar a atividade catalítica das mesmas. A albumina também é empregada na entrega de várias drogas por apresentar vários sítios de interações (LÜHMANN e MEINEL, 2016), muitas inespecíficas, e provavelmente por esta razão foi capaz de se ligar a componentes do veneno no processo de purificação.

No entanto, a presença da albumina não interferiu na interação do LimAb12 Ven com as toxinas do veneno, como demonstrado em ensaios posteriores.

Também foi observado que a amostra de LimAb12 Ven apresenta mais IgG murina que na amostra de LimAb12 A/G (Figura 5), visto que foi utilizado anti-mouse para revelação e este não evidenciou a IgG bovina nessas condições. Este resultado foi, da mesma forma evidenciado por Gall-Debreceni e colaboradores (2016) ao demonstrar por meio de um *Western blot* que a anti-IgG murina não reagiu com a IgG bovina impregnada na membrana.

5.4 Caracterização do anticorpo murino LimAb12

5.4.1 ELISA.

Para caracterização da interação dos anticorpos com seus alvos, empregou-se um teste de ELISA indireto na presença do veneno de *L. intermedia*. Ambos os anticorpos apresentaram reatividade frente ao antígeno, porém o lote purificado por Sepharose-Li apresentou aproximadamente o dobro de reatividade frente ao antígeno em praticamente todos os pontos testados, mesmo que aparentemente possua uma maior taxa de contaminação por BSA (Figura 4). Nota-se também, que a partir do ponto de $2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ essa reatividade apresentada pelo LimAb12 Ven triplica em relação ao LimAb12 A/G.

Embora tenham sido observadas tais diferenças de reatividade entre os dois purificados, foi confirmada a reatividade contra o antígeno, veneno de *Loxosceles intermedia*. Este perfil reativo é descrito também, por Mondini (2018), em ensaio de caracterização do LimAb12 realizado anteriormente. O aumento de reatividade nos pontos citados anteriormente podem evidenciar a presença de anticorpos bovinos que reagem de forma inespecífica na reação.

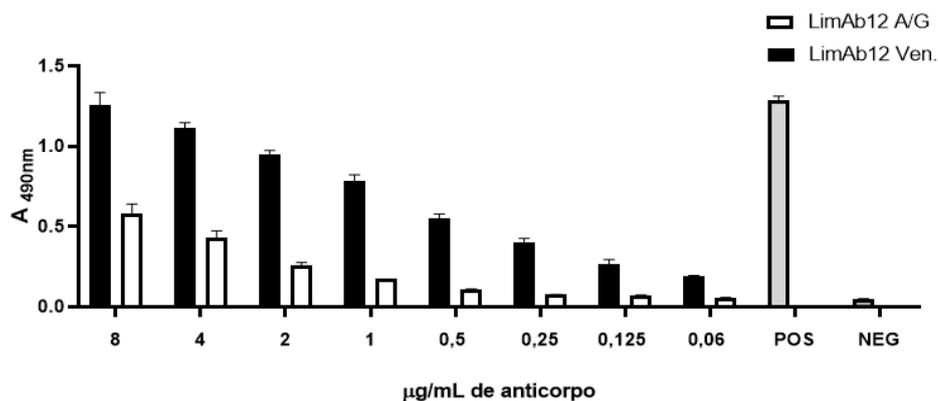


Figura 6. Gráfico representando reatividades obtidas dos anticorpos purificados frente ao veneno de *L. intermedia*.

ELISA direto: Imobilizado $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de veneno de *L. intermedia* por 16h/4°C, incubado com $8 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em 100 μL de diferentes amostras de LimAb12 A/G, LimAb12 Ven, LimAb7 (controle +) (ALVARENGA et al., 2003) e mAb3 (controle -). Detecção deu-se pela adição do anti-mouse HRP (1:4000) por 1 h/37 °C. A solução contendo OPD foi adicionada e após 15 minutos a absorbância foi lida em um leitor a 490 nm. Fonte: a AUTORA.

5.5. Reatividade de LimAb12 frente aos venenos.

Com intuito de confirmar a reatividade do LimAb12, evidenciada no teste de ELISA, foi realizado ensaio de *Western blot*, no qual os venenos das três espécies de *Loxosceles* foram resolvidas em gel de eletroforese, transferidos para uma membrana de nitrocelulose e posteriormente, incubadas com LimAb12.

O anticorpo LimAb12 demonstrou maior afinidade por um grupo de proteínas com massa entre 10 a 15 kDa, que provavelmente corresponde às notinas, toxinas de baixa massa presentes nos venenos loxoscélicos, como mostrado na Figura 7. Uma maior reatividade foi evidenciada pelas toxinas contidas no veneno de *L. intermedia*. Tal interação já foi observada por Mondini (2018), entretanto, neste mesmo trabalho foi demonstrado também, reatividade cruzadas do LimAb12 com as fosfolipases D, presente nos três venenos, porém não verificadas no presente trabalho devido, provavelmente, a quantidade aplicada ter sido inferior, (10 μg de anticorpo) ao que foi utilizado por Mondini e colaboradores (20 μg de anticorpo). Dessa forma não observamos tal reação cruzada. Como discutido por Mondini, 2018 esta reação cruzada também poderia ser justificada pela homologia de sequência (DCSR em *L. intermedia*

e *L. laeta* e DGSK em *L. gaucho*) encontrada entre as notinas e fosfolipases, e por esta razão, encorajou ao emprego do LimAb12 nos ensaios com eritrócitos visando a inibição da hemólise, uma vez que a região conservada entre as toxinas, apresenta alguns aminoácidos próximos aos sítios ativos das fosfolipases.

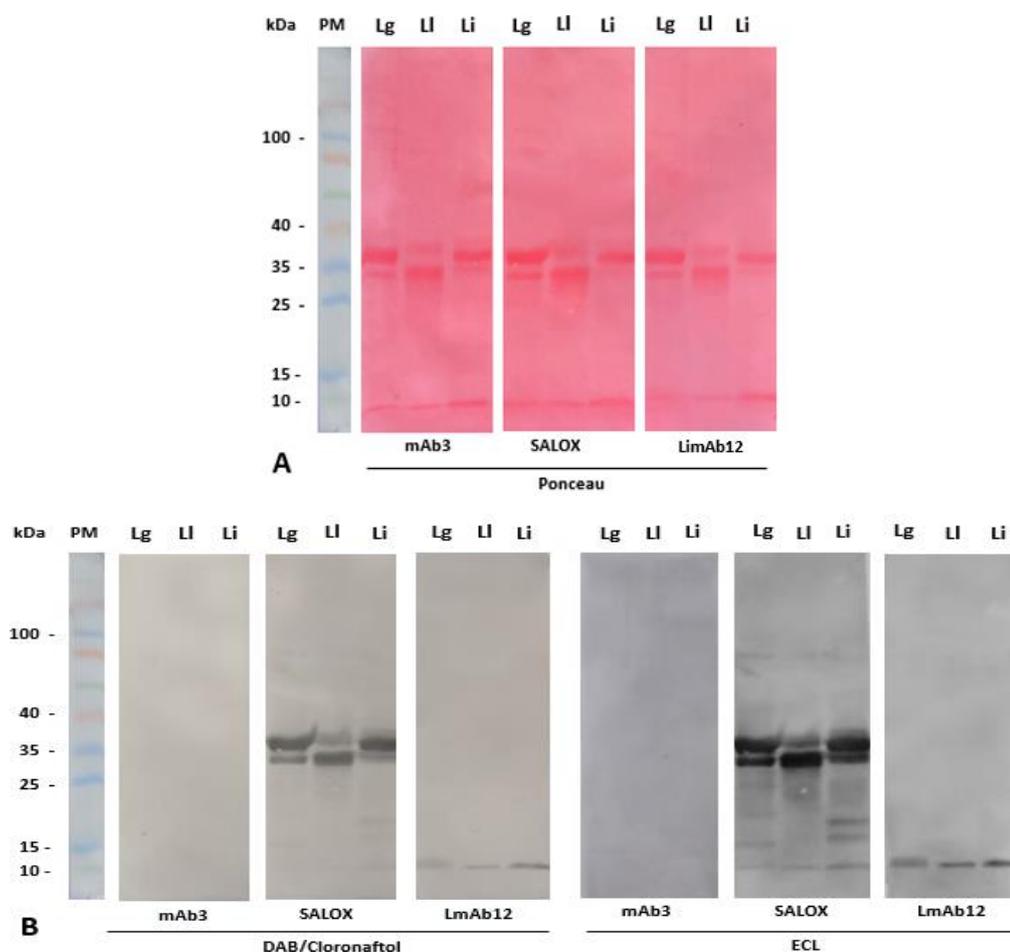


Figura 7. Fotografia do perfil eletroforético de LimAb12 frente os três venenos loxoscélicos. Cinco μg de veneno total de *Loxosceles gaucho*, *Loxosceles laeta* e *Loxosceles intermedia* foi resolvido por SDS-PAGE 12,5 % na presença do agente redutor (β -mercaptoetanol). (A) Transferido a uma membrana de nitrocelulose corada com vermelho Ponceau e (B) incubada com $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de LimAb12 A/G, $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de mAb3 e SALOX (1:30.000). Os anticorpos monoclonais murinos foram revelados com anti-mouse HRP (1:6.000) e o soro anti-loxoscélico com anti-horse HRP (1:30.000). As membranas foram reveladas por quimioluminescência (ECL) por 10 minutos de exposição. Assim como foram expostas a DAB/Cloronaftol. PM: padrão molecular (kDa). Fonte: a AUTORA.

5.6 Padronização de um ensaio hemolítico na presença dos venenos de *L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta*

Venenos das 3 espécies loxoscélicas foram concomitantemente caracterizados quanto ao seu potencial hemolítico, na presença e ausência do sistema complemento, e empregando as condições previamente padronizadas. Foi visto que nas diferentes diluições de soro empregadas (1:2, 1:4 e 1:8) somente a diluição de 1:8 reduziu a capacidade hemolítica do soro (dados não mostrados). Dessa forma, os ensaios seguintes foram realizados na diluição de 1:4.

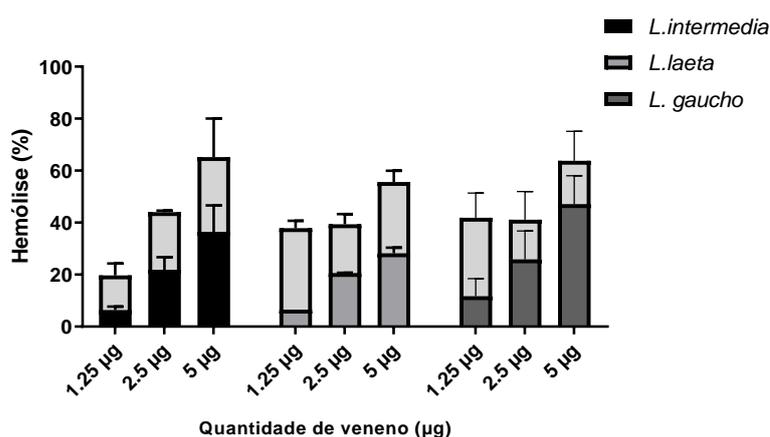


Figura 8. Ensaio hemolítico *in vitro*.

Eritrócitos humanos (10^8) incubados com 1.25, 2.5, 5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ dos três venenos separadamente de *Loxosceles gaucho*, *Loxosceles laeta* e *Loxosceles intermedia*, na presença (barras cinza claro) e ausência (barras pretas e cinzas mais escuras) do sistema complemento. A leitura da absorbância foi realizada a 570 nm. Fonte: a AUTORA.

Dentre os principais efeitos do veneno das aranhas do gênero *Loxosceles*, está sua ação hemolítica (CHÁVEZ-OLÓRTEGUI et al., 1998). Estudos realizados com venenos de diferentes espécies demonstraram que existe, mesmo que pouco expressiva, uma diferença de porcentagem de ação hemolítica entre diferentes espécies (LOPES et al., 2021). Dessa maneira, observou-se uma maior taxa de hemólise direta para o veneno de *L. gaucho*, diferente do que é demonstrado no estudo feito por Magalhães e colaboradores (2013), onde obtiveram uma menor taxa de hemólise direta, cerca de 5 %, na presença do veneno completo. No entanto, a adição do sistema complemento parece exacerbar a ação hemolítica do veneno de *L. laeta* (Figura 8) em maior quantidade em detrimento dos demais venenos. Demonstrando

resultado similar, em relação ao veneno de *L. laeta* ao estudo feito por Pedrosa e colaboradores em 2002, na mesma concentração de $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de veneno de *L. laeta*.

5.7 Capacidade de neutralização hemolítica do anticorpo LimAb12.

O LimAb12 é um anticorpo monoclonal, produzido a partir da imunização dos três venenos de *L. intermedia*, *L. laeta* e *L. gaucho*. Mesmo tendo apresentado especificidade predominante dirigida para componentes de baixa massa, a reatividade cruzada observada nos ensaios de *Western Blot* e as condições de sinergismo relatada entre as toxinas presentes nos venenos (BUSTILLO et al., 2012), nos encorajou ao emprego dessa imunoglobulina em um ensaio, para avaliar a inibição da hemólise. Foi realizado um ensaio com os anticorpos LimAb12 A/G juntamente com o veneno de *L. intermedia* e foi observado inibição de 20,5 % da hemólise causada pelo veneno no ponto de 50 pmol. Também foi notada neutralização de 50,5 % pelo anticorpo, LimAb7 (ALVARENGA et al., 2003), na mesma concentração. A modificação da concentração de veneno incubado junto aos anticorpos se deve à mudança de lote do veneno utilizado (DE OLIVEIRA et al., 2005).

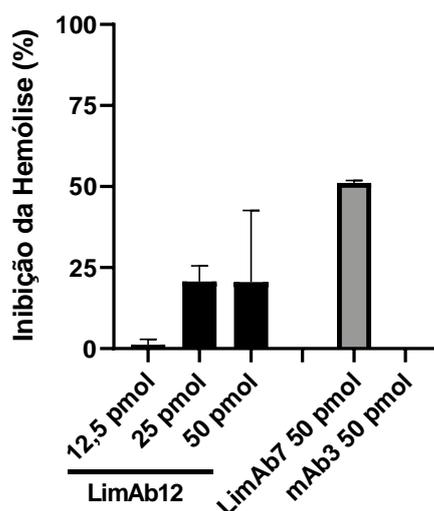


Figura 9. Ensaio hemolítico *in vitro* preliminar. Eritrócitos humanos (10^8) incubados com $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de *Loxosceles intermedia* na presença de três quantidades de anticorpo 12,5, 25 e 50 pmol de LimAb12 A/G, e LimAb7 (ALVARENGA et al., 2003 - obtido previamente); 50 pmol de mAb3 (controle negativo) e $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de *Loxosceles intermedia*. Na ausência de sistema complemento. A leitura da absorbância foi realizada a 570 nm. Fonte: a AUTORA.

Atualmente, anticorpos policlonais anti-loxoscélicos de origem equina (PAULI et al., 2006) são as principais ferramentas utilizadas na neutralização das atividades deletérias do veneno de *Loxosceles spp.*, dentre estas, a hemolítica. Apesar de seu amplo espectro de reconhecimento de toxinas e possíveis efeitos adversos devido sua origem heteróloga, surge a necessidade da produção de anticorpos monoclonais com maior especificidade e afinidade ante o antígeno responsável pelos efeitos hemolíticos do veneno. Estudos prévios do nosso grupo, evidenciaram o potencial protetor de anticorpos murinos e recombinantes (KARIM-SILVA et al, 2016 e 2020) pela inibição da hemólise provocada pelo veneno de *L. intermedia*, entretanto, para o LimAb12A/G não foi possível observar uma inibição significativa quando testado na concentração de 50 pmol. Como neste ensaio foi empregado anticorpos com contaminação de imunoglobulinas bovinas, tal condição pode ter favorecido uma competição com moléculas de baixa especificidade. Para confirmar esse efeito, um novo ensaio deverá ser realizado utilizando LimAb12 Ven, o qual não foi observada a presença de imunoglobulinas bovinas. Acreditamos que concentrações menores de anticorpos mais específicos poderão efetuar uma inibição mais expressiva, quando comparada com a promovida pelo anticorpo irrelevante.

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.

Foi possível confirmar a capacidade dos hibridomas 4F10A12 secretar anticorpos funcionais, mesmo após longo período de congelamento.

Foram observadas diferenças quanto ao rendimento e pureza ao comparar os métodos de purificação e enriquecimento das imunoglobulinas. O tipo de contaminante teve reflexo direto na reatividade do anticorpo frente a seu alvo.

Foram evidenciadas diferenças entre o potencial hemolítico dos três venenos estudados, com importante influência do sistema do complemento. A padronização desse ensaio permitirá seu emprego em caracterizações futuras de anticorpos que estão sendo preparados pelo nosso grupo.

A reatividade com os venenos loxoscélicos, como também a confirmação do potencial de neutralização do LimAb12 Ven precisam ser investigados em ensaios posteriores, assim que as condições sanitárias permitirem.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. H.; PILLA I, S. *Imunologia Celular e Molecular*. London: **Elsevier Health Sciences Brazil**, 2012.

ABROUG, F.; OUANES-BESBES, L.; TILOUCHE, N.; ELATROUS, S. Scorpion envenomation: state of the art. **Intensive Care Medicine**, v. 46, n. 3, p. 401–410, 2020.

ALBUQUERQUE, P. L. M. M.; TESSAROLO, L. D.; MENEZES, F. H.; et al. Acute kidney injury due to systemic Loxoscelism: a cross-sectional study in Northeast Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 51, n. 5, p. 695–699, 2018.

ALOULO, A.; ALI, Y. B.; BEZZINE, S.; GARGOURI, Y.; GELB, M. H. Phospholipases: An Overview. In: G. Sandoval (Org.); **Lipases and Phospholipases**. v. 861, p.63–85, 2012. Totowa, NJ: Humana Press.

ALVARENGA, L. M.; MARTINS, M. S.; MOURA, J. F.; 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, n. 7, p. 725–731, 2003.

ALVARENGA, L.; ZAHID, M.; TOMMASO, A.; et al. Engineering Venom's Toxin-Neutralizing Antibody Fragments and Its Therapeutic Potential. **Toxins**, v. 6, n. 8, p. 2541–2567, 2014.

APPEL, M. H.; DA SILVEIRA, R. B.; CHAIM, O. M.; et al. Identification, cloning and functional characterization of a novel dermonecrotic toxin (phospholipase D) from brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1780, n. 2, p. 167–178, 2008.

AUBREY, N.; MUZARD, J.; CHRISTOPHE PETER, J.; et al. Engineering of a recombinant Fab from a neutralizing IgG directed against scorpion neurotoxin Aahl, and functional evaluation versus other antibody fragments. **Toxicon**, v. 43, n. 3, p. 233–241, 2004.

BAHRAOUI, E.; PICHON, J.; MULLER, J.M.; DARBON, H.; ELAYEB, M.; GRANIER, C.; MARVALDI, J.; ROCHAT, H. Monoclonal antibodies to scorpion toxins. Characterization and molecular mechanisms of neutralization. **J Immunol**. 1988 Jul 1;141(1):214-20. Erratum in: J Immunol 1988 Nov 1;141(9):3241. PMID: 2454259.

BARMAN, A.; GOHAIN, D.; BORA, U.; TAMULI, R. Phospholipases play multiple cellular roles including growth, stress tolerance, sexual development, and virulence in fungi. **Microbiological Research**, v. 209, p. 55–69, 2018.

BOIA-FERREIRA, M.; MORENO, K. G.; BASÍLIO, A. B. C.; et al. TCTP from *Loxosceles Intermedia* (Brown Spider) Venom Contributes to the Allergic and Inflammatory Response of Cutaneous Loxoscelism. **Cells**, v. 8, n. 12, p. 1489, 2019.

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, n. 1–2, p. 248–254, 1976.

BUSTILLO, S. et al., 2012. Synergism between baltergin metalloproteinase and Ba SPII RP4 PLA2 from *Bothrops alternatus* venom on skeletal muscle (C2C12) cells. **Toxicon**, 22 novembro, Volume 59, pp. 338-343.

CHAVANAYARN, C.; THANONGSAKSRIKUL, J.; THUENG-IN, K.; et al. Humanized-Single Domain Antibodies (VH/VHH) that Bound Specifically to *Naja kaouthia* Phospholipase A2 and Neutralized the Enzymatic Activity. **Toxins**, v. 4, n. 7, p. 554–567, 2012.

CHAVES-MOREIRA, D.; CHAIM, O. M.; SADE, Y. B.; et al. 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, n. 4, p. 655–666, 2009.

CHAVES-MOREIRA, D.; SENFF-RIBEIRO, A.; WILLE, A. C. M.; et al. Highlights in the knowledge of brown spider toxins. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 23, n. 1, p. 6, 2017.

CHAVES-MOREIRA, D.; DE MORAES, F. R.; CARUSO, Í. P.; et al. Potential Implications for Designing Drugs Against the Brown Spider Venom Phospholipase-D:

POTENTIAL IMPLICATIONS FOR DESIGNING DRUGS. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 118, n. 4, p. 726–738, 2017.

CHATZAKI, M.; HORTA, C. C.; ALMEIDA, M. O.; et al. Cutaneous loxoscelism caused by *Loxosceles similis* venom and neutralization capacity of its specific antivenom. **Toxicon**, v. 60, n. 1, p. 21–30, 2012.

CHEN, S. W.; TAN, D.; YANG, Y. S.; ZHANG, W. Investigation of the effect of salt additives in Protein L affinity chromatography for the purification of tandem single-chain variable fragment bispecific antibodies. **mAbs**, v. 12, n. 1, p. 1718440, 2020.

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

DA SILVEIRA, R. B.; PIGOZZO, R. B.; CHAIM, O. M.; et al. Two novel dermonecrotic toxins LiRecDT4 and LiRecDT5 from Brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom: From cloning to functional characterization. **Biochimie**, v. 89, n. 3, p. 289–300, 2007.

DE SANTI FERRARA, G. I.; FERNANDES-PEDROSA, M. DE F.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. DE L. M.; et al. SMase II, a new sphingomyelinase D from *Loxosceles laeta* venom gland: Molecular cloning, expression, function and structural analysis. **Toxicon**, v. 53, n. 7–8, p. 743–753, 2009.

DE CASTRO, C. S.; SILVESTRE, F. G.; ARAÚJO, S. C.; et al. Identification and molecular cloning of insecticidal toxins from the venom of the brown spider *Loxosceles intermedia*. **Toxicon**, v. 44, n. 3, p. 273–280, 2004.

DE OLIVEIRA, K. C.; GONÇALVES DE ANDRADE, R. M.; PIAZZA, R. M. F.; et al. Variations in *Loxosceles* spider venom composition and toxicity contribute to the severity of envenomation. **Toxicon**, v. 45, n. 4, p. 421–429, 2005.

DENNIS, E. A. Introduction to Thematic Review Series: Phospholipases: Central Role in Lipid Signaling and Disease. **Journal of Lipid Research**, v. 56, n. 7, p. 1245–1247, 2015.

DIAS-LOPES A, L. FELICORI A, L. RUBRECHT B, S. COBO B, L. MOLINA B, C. NGUYENB, P. GALÉA, C. GRANIER B, F. MOLINA B, C. CHÁVEZ-OLÓRTEGUI.

Generation and molecular characterization of a monoclonal antibody reactive with conserved epitope in sphingomyelinases D from *Loxosceles* spider venoms. **Vaccine**. **32:2086–2092**. 2014.

DIAS-LOPES, C.; PAIVA, A.; GUERRA-DUARTE, C.; MOLINA, F.; FELICORI, L. Venomous Arachnid Diagnostic Assays, Lessons from Past Attempts. **Toxins**, v. 10, n. 9, p. 365, 2018.

DUSKEY, J. T.; DA ROS, F.; OTTONELLI, I.; et al. Enzyme Stability in Nanoparticle Preparations Part 1: Bovine Serum Albumin Improves Enzyme Function. **Molecules**, v. 25, n. 20, p. 4593, 2020.

FANG, Y.-M.; LIN, D.-Q.; YAO, S.-J. Adsorption of IgG and BSA on Two Chromatographic Resins—Poly(ethylenimine)-4FF Resin and Tetrapeptide-poly(ethylenimine)-4FF Resin. **Journal of Chemical & Engineering Data**, p. acs.jced.8b00535, 2018.

FERNANDES PEDROSA, M. DE F.; JUNQUEIRA DE AZEVEDO, I. DE L. M.; GONÇALVES-DE-ANDRADE, R. M.; et al. Molecular cloning and expression of a functional dermonecrotic and haemolytic factor from *Loxosceles laeta* venom. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 298, n. 5, p. 638–645, 2002.

FIELDS, C.; O'CONNELL, D.; XIAO, S.; et al. Creation of recombinant antigen-binding molecules derived from hybridomas secreting specific antibodies. **Nature Protocols**, v. 8, n. 6, p. 1125–1148, 2013.

FIGUEIREDO, L. F. M.; DIAS-LOPES, C.; ALVARENGA, L. M.; et al. Innovative immunization protocols using chimeric recombinant protein for the production of polyspecific loxoscelic antivenom in horses. **Toxicon**, v. 86, p. 59–67, 2014.

FREITAS, Theonys Diógenes et al . Produção e caracterização de anticorpos monoclonais contra toxina épsilon de *Clostridium perfringens* Tipo D. **Cienc. Rural**, Santa Maria , v. 39, n. 1, p. 269-271, Feb. 2009 . Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782009000100046&lng=en&nrm=iso>. access on 19 Mar. 2021. Epub Sep 04, 2008. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782008005000051>.

FUNAYAMA, J. C.; PUCCA, M. B.; RONCOLATO, E. C.; et al. Production of Human Antibody Fragments Binding to Melittin and Phospholipase A2 in Africanised Bee Venom: Minimising Venom Toxicity. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 110, n. 3, p. 290–297, 2012.

FUTRELL, J. M.; MORGAN, B. B.; MORGAN, P. N. An in vitro model for studying hemolysis associated with venom from the brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*). **Toxicon**, v. 17, n. 4, p. 355–362, 1979.

GALL-DEBRECENI, A.; LAZAR, J.; KADAS, J.; et al. Specific detection and quantitation of bovine IgG in bioreactor derived mouse mAb preparations. **Journal of Immunological Methods**, v. 438, p. 26–34, 2016.

GRASHOF, D.; ZDENEK, C. N.; DOBSON, J. S.; et al. A Web of Coagulotoxicity: Failure of Antivenom to Neutralize the Destructive (Non-Clotting) Fibrinogenolytic Activity of *Loxosceles* and *Sicarius* Spider Venoms. **Toxins**, v. 12, n. 2, p. 91, 2020.

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, n. 9, p. 1333–1342, 2001.

GODING, J.W. Monoclonal antibodies: principles and practice. **London: Academic**, 1996. 544p.

GSTRAUNTHALER, G.; LINDL, T.; VAN DER VALK, J. A plea to reduce or replace fetal bovine serum in cell culture media. **Cytotechnology**, v. 65, n. 5, p. 791–793, 2013.

GREMSKI, L. H.; DA SILVEIRA, R. B.; CHAIM, O. M.; et al. A novel expression profile of the *Loxosceles intermedia* spider venomous gland revealed by transcriptome analysis. **Molecular BioSystems**, v. 6, n. 12, p. 2403, 2010.

GREMSKI, L. H.; TREVISAN-SILVA, D.; FERRER, V. P.; et al. Recent advances in the understanding of brown spider venoms: From the biology of spiders to the molecular mechanisms of toxins. **Toxicon**, v. 83, p. 91–120, 2014.

GREMSKI, L. H.; DA JUSTA, H. C.; DA SILVA, T. P.; et al. Forty Years of the Description of Brown Spider Venom Phospholipases-D. **Toxins**, v. 12, n. 3, p. 164, 2020.

HANEY, P. J.; DRAVELING, C.; DURSKI, W.; ROMANOWICH, K.; WALID QORONFLEH, M. SwellGel: a sample preparation affinity chromatography technology for high throughput proteomic applications. **Protein Expression and Purification**, v. 28, n. 2, p. 270–279, 2003.

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

ISBISTER, G. K.; FAN, H. W. Spider bite. **The Lancet**, v. 378, n. 9808, p. 2039–2047, 2011.

JAYME, D. W.; EPSTEIN, D. A.; CONRAD, D. R. Fetal bovine serum alternatives. **Nature**, v. 334, n. 6182, p. 547–548, 1988.

JIACOMINI, I.; SILVA, S. K.; AUBREY, N.; et al. Immunodetection of the “brown” spider (*Loxosceles intermedia*) dermonecrotxin with an scFv-alkaline phosphatase fusion protein. **Immunology Letters**, v. 173, p. 1–6, 2016.

JUSTA, H. C. DA; MATSUBARA, F. H.; DE-BONA, E.; et al. LALLT (*Loxosceles* Allergen-Like Toxin) from the venom of *Loxosceles intermedia*: Recombinant expression in insect cells and characterization as a molecule with allergenic properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 164, p. 3984–3999, 2020.

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

KALAPOTHAKIS, E.; ARAUJO, S. C.; DE CASTRO, C. S.; et al. Molecular cloning, expression and immunological properties of LiD1, a protein from the dermonecrotic family of *Loxosceles intermedia* spider venom. **Toxicon**, v. 40, n. 12, p. 1691–1699, 2002.

KÖHLER, G.; MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature**, v. 256, n. 5517, p. 495–497, 1975.

HOLLIGER, P.; HUDSON, P. J. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. **Nature Biotechnology**, v. 23, n. 9, p. 1126–1136, 2005.

KURPIEWSKI, G.; FORRESTER, L. J.; BARRETT, J. T.; CAMPBELL, B. J. Platelet aggregation and sphingomyelinase D activity of a purified toxin from the venom of *Loxosceles reclusa*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 678, n. 3, p. 467–476, 1981.

LAFAYE, P.; CHOUMET, V.; DEMANGEL, C.; BON, C.; MAZIÉ, J.-C. Biologically active human anti-crotoxin scFv isolated from a semi-synthetic phage library. **Immunotechnology**, v. 3, n. 2, p. 117–125, 1997.

LEE, S.; LYNCH, K. R. Brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*) venom phospholipase D (PLD) generates lysophosphatidic acid (LPA). **Biochemical Journal**, v. 391, n. 2, p. 317–323, 2005.

LIU, J. K. H. The history of monoclonal antibody development – Progress, remaining challenges and future innovations. **Annals of Medicine and Surgery**, v. 3, n. 4, p. 113–116, 2014.

LÜHMANN, T.; MEINEL, L. Nanotransporters for drug delivery. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 39, p. 35–40, 2016.

LODEN, J. K.; SEGER, D. L.; SPILLER, H. A.; WANG, L.; BYRNE, D. W. Cutaneous-hemolytic loxoscelism following brown recluse spider envenomation: new understandings. **Clinical Toxicology**, v. 58, n. 12, p. 1297–1305, 2020.

LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J.; RAMÍREZ, M.; DÍAZ, C. Neutralization of myotoxic phospholipases A2 from the venom of the snake *Bothrops asper* by monoclonal antibodies. **Toxicon**, v. 30, n. 3, p. 239–245, 1992.

LOPES, P. H.; SQUAIELLA-BAPTISTÃO, C. C.; MARQUES, M. O. T.; TAMBOURGI, D. V. Clinical aspects, diagnosis and management of *Loxosceles* spider envenomation: literature and case review. **Archives of Toxicology**, v. 94, n. 5, p. 1461–1477, 2020.

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, n. 1, p. 21, 2015.

MANZONI-DE-ALMEIDA, D.; SQUAIELLA-BAPTISTÃO, C. C.; LOPES, P. H.; VAN DEN BERG, C. W.; TAMBOURGI, D. V. *Loxosceles* venom Sphingomyelinase D activates human blood leukocytes: Role of the complement system. **Molecular Immunology**, v. 94, p. 45–53, 2018.

MAGALHÃES, G. S.; CAPORRINO, M. C.; DELLA-CASA, M. S.; et al. Cloning, expression and characterization of a phospholipase D from *Loxosceles gaucho* venom gland. **Biochimie**, v. 95, n. 9, p. 1773–1783, 2013.

MALAQUE, C. M. S.; SANTORO, M. L.; CARDOSO, J. L. C.; et al. Clinical picture and laboratorial evaluation in human loxoscelism. **Toxicon**, v. 58, n. 8, p. 664–671, 2011.

MARIUTTI, R. B.; CHAVES-MOREIRA, D.; VUITIKA, L.; et al. Bacterial and Arachnid Sphingomyelinases D: Comparison of Biophysical and Pathological Activities: BACTERIAL AND A RACHNID S PHINGOMYELINASES D. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 118, n. 8, p. 2053–2063, 2017.

MASOOD, R.; ULLAH, K.; ALI, H.; et al. Spider's venom phospholipases D: A structural review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 107, p. 1054–1065, 2018.

MATSUBARA, F. H.; GREMSKI, L. H.; MEISSNER, G. O.; et al. A novel ICK peptide from the *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom gland: Cloning, heterologous expression and immunological cross-reactivity approaches. **Toxicon**, v. 71, p. 147–158, 2013.

MONDINI, C. A. Engenharia de anticorpos aplicada ao estudo e neutralização de componentes presentes no veneno de *Loxosceles* sp.. 2016-2018. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia) - Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Universidade Federal do Paraná. Paraná, p. 81. 2021.

MORGAN, B. B.; MORGAN, P. N.; BOWLING, R. E. Lysis of human erythrocytes by venom from the brown recluse spider, *Loxosceles reclusa*. **Toxicon**, v. 16, n. 1, p. 85–88, 1978.

OLIVEIRA, J. G.; SOARES, S. G.; SOARES, A. M.; et al. Expression of Human Recombinant Antibody Fragments Capable of Partially Inhibiting the Phospholipase Activity of *Crotalus durissus terrificus* Venom. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 105, n. 2, p. 84–91, 2009.

PAULI, I.; MINOZZO, J. C.; HENRIQUE DA SILVA, P.; 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, n. 6, p. 660–671, 2009.

PEREZ-RIVEROL, A.; LASA, A. M.; DOS SANTOS-PINTO, J. R. A.; PALMA, M. S. Insect venom phospholipases A1 and A2: Roles in the envenoming process and allergy. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 105, p. 10–24, 2019.

PESSENDA, G.; SILVA, L. C.; CAMPOS, L. B.; et al. Human scFv antibodies (Afrimumabs) against Africanized bee venom: Advances in melittin recognition. **Toxicon**, v. 112, p. 59–67, 2016.

PUCCA, M. B.; ZOCCAL, K. F.; RONCOLATO, E. C.; et al. Serrumab: a human monoclonal antibody that counters the biochemical and immunological effects of *Tityus serrulatus* venom. **Journal of Immunotoxicology**, v. 9, n. 2, p. 173–183, 2012.

PORRAS-VILLAMIL, J. F; OLIVERA, M. J. Análisis de casos de araneísmo a nivel global en el período 2000-2020. **Rev Argent Salud Publica**. 2020;12:e24. Publicación electrónica 14 Dic 2020.

RIBEIRO, R. O. S.; CHAIM, O. M.; DA SILVEIRA, R. B.; et al. Biological and structural comparison of recombinant phospholipase D toxins from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. **Toxicon**, v. 50, n. 8, p. 1162–1174, 2007.

RIXE, N.; TAVAREZ, M. M. Serum Sickness. StatPearls, 2021. Treasure Island (FL): **StatPearls Publishing**. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538312/>>. Acesso em: 7/3/2021.

RONCOLATO, E. C.; PUCCA, M. B.; FUNAYAMA, J. C.; et al. Human antibody fragments specific for *Bothrops jararacussu* venom reduce the toxicity of other *Bothrops* sp. venoms. **Journal of Immunotoxicology**, v. 10, n. 2, p. 160–168, 2013.

RASMUSSEN, L. K.; LARSEN, Y. B.; HØJRUP, P. Characterization of different cell culture media for expression of recombinant antibodies in mammalian cells: Presence of contaminating bovine antibodies. **Protein Expression and Purification**, v. 41, n. 2, p. 373–377, 2005.

RUPPERT, E. E.; FOX, R. S.; BARNES, R. D. Zoologia dos invertebrados: uma abordagem funcional-evolutiva. **Sao Paulo: Roca**, 2005.

SANTOS, K. S.; STEPHANO, M. A.; MARCELINO, J. R.; et al. Production of the First Effective Hyperimmune Equine Serum Antivenom against Africanized Bees. **PLOS ONE**, v. 8, n. 11, p. e79971, 2013.

SCHROEDER, H. W.; CAVACINI, L. Structure and function of immunoglobulins. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 125, n. 2, p. S41–S52, 2010.

SINANWEB - **Dados Epidemiológicos Sinan**. Disponível em: <<http://www.portalsinan.saude.gov.br/dados-epidemiologicos-sinan>>. Acesso em: 13/2/2021

Snakebite envenoming. Disponível em: <<https://www.who.int/westernpacific/health-topics/snakebite>>. Acesso em: 13/2/2021.

STOYANOVA, V.; ALEKSANDROV, R.; LUKARSKA, M.; et al. Recognition of *Vipera ammodytes meridionalis* neurotoxin vipoxin and its components using phage-displayed scFv and polyclonal antivenom sera. **Toxicon**, v. 60, n. 5, p. 802–809, 2012.

TAMBOURGI, D. V.; MAGNOLI, F. C.; VON EICKSTEDT, V. R.; et al. Incorporation of a 35-kilodalton purified protein from *Loxosceles intermedia* spider venom transforms human erythrocytes into activators of autologous complement alternative pathway. **Journal of Immunology** (Baltimore, Md.: 1950), v. 155, n. 9, p. 4459–4466, 1995.

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, n. 7, p. 1113–1119, 2010.

TAMAROZZI, M. B.; SOARES, S. G.; MARCUSSI, S.; GIGLIO, J. R.; BARBOSA, J. E. Expression of recombinant human antibody fragments capable of inhibiting the phospholipase and myotoxic activities of *Bothrops jararacussu* venom. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1760, n. 9, p. 1450–1457, 2006.

TANG, W.-H.; WANG, C.-F.; LIAO, Y.-D. Fetal bovine serum albumin inhibits antimicrobial peptide activity and binds drug only in complex with α 1-antitrypsin. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1267, 2021.

VAN DER VALK, J. Fetal bovine serum (FBS): Past – present – future. **ALTEX**, p. 99–118, 2018.

VUITIKA, L.; GREMSKI, L. H.; BELISÁRIO-FERRARI, M. R.; et al. Brown spider phospholipase-D containing a conservative mutation (D233E) in the catalytic site: Identification and functional characterization: Novel Phospholipase-D From Brown Spider Venom. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 114, n. 11, p. 2479–2492, 2013.

WEBER-LIMA, M. M.; PRADO-COSTA, B.; BECKER-FINCO, A.; et al. Acanthamoeba spp. monoclonal antibody against a CPA2 transporter: a promising molecular tool for acanthamoebiasis diagnosis and encystment study. **Parasitology**, v. 147, n. 14, p. 1678–1688, 2020.

YAO, T.; ASAYAMA, Y. Animal-cell culture media: History, characteristics, and current issues. **Reproductive Medicine and Biology**, v. 16, n. 2, p. 99–117, 2017.

ZHANG, C.; RODRIGUEZ, E.; BI, C.; et al. High performance affinity chromatography and related separation methods for the analysis of biological and pharmaceutical agents. **The Analyst**, v. 143, n. 2, p. 374–391, 2018.