

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARIA EDUARDA DE FRAGA FERREIRA

AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE PROTETIVA DE UMA VACINA CONTRA O  
LOXOSCELISMO SISTÊMICO E CUTÂNEO DESENVOLVIDA COM  
FOSFOLIPASES-D RECOMBINANTES MUTADAS

CURITIBA

2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARIA EDUARDA DE FRAGA FERREIRA

AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE PROTETIVA DE UMA VACINA CONTRA O  
LOXOSCELIISMO SISTÊMICO E CUTÂNEO DESENVOLVIDA COM  
FOSFOLIPASES-D RECOMBINANTES MUTADAS

Monografia apresentada ao curso de Graduação  
em Ciências Biológicas, Setor de Ciências  
Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como  
requisito à aprovação na disciplina BIO028 –  
Estágio Supervisionado em Biologia.

Orientadora: Professora. Dra. Luiza Helena  
Gremski.

Coorientador: Pedro Henrique de Caires Schluga.

CURITIBA

2023

“Lute com determinação, abrace a vida com paixão, perca com classe e vença com ousadia, porque o mundo pertence a quem se atreve e a vida é muito para ser insignificante.”

Charles Chaplin

## **AGRADECIMENTOS**

Estar entregando este trabalho é a realização de vários sonhos. O sonho de estudar na Universidade Federal do Paraná, sonho de estar em Curitiba, e por fim, o sonho de pesquisar e estudar o que faço hoje. Para isso, o apoio e ajuda de diversas pessoas foram essenciais, dentre as quais eu agradeço:

Meus pais, as pessoas que mais acreditaram em mim durante todo esse processo. Eles, que não mediram esforços para me dar uma educação de qualidade, estiveram comigo na maior loucura da minha vida, que foi mudar de cidade a 800 km de distância para poder estudar. São as minhas duas maiores inspirações de força e resiliência e passaram comigo os piores e melhores momentos dessa caminhada, seja pessoalmente ou pelas milhares de ligações que fizemos.

Meu irmão, o amor da minha vida, que foi o motivo da minha felicidade por tantos dias difíceis. Sem o seu amor eu não teria conseguido.

Meus familiares e amigos, por todo o carinho e amor que recebi de vocês ao longo de toda a minha vida. Sou rodeada de pessoas muito guerreiras, principalmente as mulheres, que me inspiraram e inspiram a vida toda com a trajetória vivida. Pela preocupação e cuidado, mesmo que de longe, e por me apoiarem sempre.

Aos meus amigos do LME, que acompanharam e fizeram parte de todo o processo, trabalho e experimentos. Agradeço imensamente a paciência para me ensinar, toda a ajuda com os ELISAS e idas as CPPI. Sem vocês nada disso seria possível. Em especial a Nyanne, Pedro, João e Samira, que fazem a rotina mais leve e hoje são minha família em Curitiba.

Aos meus orientadores, Prof. Dra. Luiza Helena Gremski e Prof. Dr. Silvio Sanches Veiga pela oportunidade que me foi dada. Vocês me abriram as portas do laboratório e me mostraram o que é fazer ciência, realizando um sonho de criança. A vocês, minha eterna gratidão e admiração.

A todos aqueles que estiveram ou estão presentes e me auxiliaram nessa trajetória.

À CNPQ, CAPES e familiares pelo apoio financeiro.

## RESUMO

As aranhas do gênero *Loxosceles*, conhecidas como aranhas-marrom, são os agentes do loxoscelismo, quadro clínico ocasionado pela sua picada. O envenenamento gera uma lesão dermonecrótica que em casos mais graves pode levar ao óbito, sendo assim, um desafio para a saúde pública no Brasil. O veneno dessas aranhas contém uma mistura de enzimas, glicoproteínas e peptídeos com destaque para as fosfolipases-D (FLDs), descritas como toxinas dermonecróticas, que sozinhas têm a capacidade de reproduzir experimentalmente quase todos os sintomas do loxoscelismo. FLDs recombinantes com mutações sítio-dirigidas foram desenvolvidas revelando a importância de aminoácidos-chave no processo catalítico e tóxico. Além disso, apesar do alto número de acidentes, o tratamento do loxoscelismo ainda não é padronizado, envolvendo a aplicação de soros antiloxoscélicos em casos sistêmicos moderados e graves, mas a eficácia depende da administração rápida, o que é desafiado pela picada muitas vezes indolor e pela falta de um diagnóstico específico. Sendo assim, o objetivo desse trabalho é avaliar a capacidade protetiva de uma vacina loxoscélica frente aos danos locais e sistêmicos utilizando fosfolipases-D recombinantes mutadas no reconhecimento do substrato, atividade catalítica e coordenação do cofator da enzima (LiRecDT1-W230A, LiRecDT1H12-H47A e LgRecDT1E32-D34A, respectivamente) como antígeno. As construções com as fosfolipases-D mutadas foram transformadas em cepas de bactérias BL21(DE3) pLysS, expressas, purificadas e sua pureza avaliada através de uma eletroforese em gel de poliacrilamida. Em seguida, camundongos e coelhos foram vacinados com 3 doses contendo um *pool* das FLDs mutadas para avaliar as proteções sistêmica e cutânea, respectivamente. O esquema vacinal dos camundongos consistiu em 100, 60 e 30 µg de proteína e dos coelhos foram testadas duas formulações, de maior (300, 600 e 1000 µg) e menor massa (75, 150 e 250 µg). Em seguida, o soro dos coelhos foi coletado e realizado o ensaio de ELISA. A proteção sistêmica foi demonstrada com 90% de sobrevivência dos camundongos vacinados e desafiados com veneno de *L. intermedia*. Já em coelhos, foi observada macroscopicamente a diminuição da lesão cutânea dos grupos vacinados em relação aos controles, além da redução de 70% da área de dermonecrose até 96h e 60% do edema durante todo o tempo de análise. Com o ensaio de ELISA pôde-se comprovar a produção dos anticorpos nos animais. Portanto, os resultados desse estudo têm importância científica e biotecnológica, já que reforçam a utilização de FLDs mutadas como antígenos e demonstram sua eficácia e segurança. Além disso, poderá contribuir futuramente para a produção de insumos empregados no tratamento ou prevenção do loxoscelismo.

Palavras-chave: Aranha-marrom. Fosfolipase-D. Vacina.

## ABSTRACT

Spiders from the *Loxosceles* gender, also known as Brown spiders, are agents of loxoscelism, a clinical condition caused by its sting. Envenoming generates a dermonecrotic lesion that in more severe cases can lead to death, therefore, becoming a challenge to public health in Brazil. The venom from these spiders contains a mix of enzymes, glycoproteins and peptides, with an emphasis on phospholipases D (PLDs), described as dermonecrotic toxins, that by themselves have the capacity to experimentally reproduce almost every symptom of loxoscelism. Recombinant PLDs with site-directed mutations were developed showing the importance of key amino acids on the catalytic and toxic process. Besides that, despite the high number of accidents, loxoscelism treatment is still not standard, involving the application of anti-loxoscelic serum in moderate and severe systemic cases, but the efficiency depends on quick administration, which is challenging due to usually painless stings and to the lack of a specific diagnosis. Therefore, the objective of this work is to evaluate the protective capacity of a loxoscelic vaccine facing local and systemic damages using recombinant mutated phospholipases D on the recognition of substrate, catalytic activity, and enzyme cofactor coordination (LiRecDT1 W230A, LiRecDT1 H12-H47A and LgRecDT1 E32-D34A, respectively) as antigen. The construction of mutated phospholipases D were transformed into strains of bacteria BL21(DE3) pLysS, expressed, purified and its purity evaluated through an electrophoresis in polyacrylamide gel. Next, mice and rabbits were vaccinated with 3 doses containing a pool of mutated PLDs to evaluate the systemic and cutaneous protections, respectively. The vaccination scheme for mice consisted in 100, 60 and 30 µg of protein, and for rabbits two formulations were tested, with larger (300, 600 and 1000 µg) and smaller (75, 150 and 250 µg) mass. Then, the rabbit serum was collected, and the ELISA assay was performed. The systemic protection was demonstrated with 90% survival rate of vaccinated mice and challenged with *L. intermedia* venom. In rabbits, the decrease of cutaneous lesion of vaccinated groups was macroscopically observed in comparison to the control group, besides a 70% reduction of dermonecrosis area in 96 hours, and 60% of the edema during the whole analysis period. With the ELISA assay it was able to prove the production of antibodies on animals. Thus, the results of this study have scientific and biotechnological importance since it reinforces the utilization of mutated PLDs as antigens and shows its efficiency and safety. Furthermore, it will be able to contribute to the production of inputs used on the treatment or prevention of loxoscelism in the future.

**Keywords:** Brown spider. Phospholipase D. Vaccine.

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                           |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 - Aranhas do gênero <i>Loxosceles</i> .....                                      | 14 |
| Figura 2 - Progressão do loxoscelismo cutâneo.....                                        | 16 |
| Figura 3 - Proporção das toxinas do veneno de <i>Loxosceles</i> sp. ....                  | 18 |
| Figura 4 - Comparação da sequência aminoacídica das três espécies de relevância.<br>..... | 21 |
| Figura 5 - Conformação estrutural representativa das FLDs.....                            | 22 |
| Figura 6 - Expressão e purificação de fosfolipases-D com mutações sítio dirigidas. ....   | 29 |
| Figura 7 - Aspecto macroscópico da lesão dos grupos vacinados .....                       | 31 |
| Figura 8 - Aspecto macroscópico da lesão do grupo controle. ....                          | 31 |
| Figura 9 - Evolução de dermonecrose e edema por grupo. ....                               | 32 |
| Figura 10 - Titulação de anticorpos de coelhos vacinados com 3 doses.....                 | 33 |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                          |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1 - Notificações de acidentes com <i>Loxosceles</i> sp. no Brasil de 2012-2022... | 15 |
| Tabela 2 - Letalidade em camundongos vacinados com 3 doses. ....                         | 30 |



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|          |                                                              |
|----------|--------------------------------------------------------------|
| APC      | <i>Antigen Presenting Cells</i>                              |
| CPPI-PR  | Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos do Paraná   |
| DL       | Dose letal                                                   |
| DMN      | Dose Mínima Necrosante                                       |
| FLD      | Fosfolipase-D                                                |
| ICK      | <i>Inhibitor Cystine Knot</i>                                |
| IRA      | Insuficiência Renal Aguda                                    |
| KDa      | Quilodalton                                                  |
| LALLT    | <i>Loxosceles Allergen-Like Toxin</i>                        |
| LALPS    | <i>Loxosceles Astacins-Like Proteases</i>                    |
| LiRecDT  | <i>Loxosceles intermedia Recombinant Dermonecrotic Toxin</i> |
| LIRecDT  | <i>Loxosceles laeta Recombinant Dermonecrotic Toxin</i>      |
| LgRecDT  | <i>Loxosceles gaucho Recombinant Dermonecrotic Toxin</i>     |
| SAl ox   | Soro Anti-loxoscélico                                        |
| SDS-PAGE | Gel de poliacrilamida em Dodecil sulfato de sódio            |
| SUS      | Sistema Único de Saúde                                       |
| TCTP     | <i>Translationally Controlled Tumor Protein</i>              |
| UFPR     | Universidade Federal do Paraná                               |

## SUMÁRIO

|          |                                                                                                  |           |
|----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO .....</b>                                                                          | <b>11</b> |
| 1.1      | OBJETIVOS .....                                                                                  | 13        |
| 1.2      | OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....                                                                      | 13        |
| <b>2</b> | <b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>                                                               | <b>14</b> |
| 2.1      | ARANHAS-MARROM .....                                                                             | 14        |
| 2.2      | LOXOSCELISMO.....                                                                                | 15        |
| 2.3      | VENENO LOXOSCÉLICO.....                                                                          | 17        |
| 2.4      | FOSFOLIPASES-D .....                                                                             | 19        |
| 2.5      | VACINAS.....                                                                                     | 23        |
| 2.6      | IDENTIFICAÇÃO E TRATAMENTO DO LOXOSCELISMO .....                                                 | 24        |
| <b>3</b> | <b>METODOLOGIA.....</b>                                                                          | <b>24</b> |
| 3.1      | EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DOS ANTÍGENOS .....                                                      | 24        |
| 3.2      | CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DOS ANTÍGENOS.....                                                     | 26        |
| 3.3      | VACINAÇÃO E ENSAIO DE LETALIDADE EM CAMUNDONGOS POR DANO SISTÊMICO .....                         | 26        |
| 3.4      | VACINAÇÃO DE COELHOS E AVALIAÇÃO DA LESÃO CUTÂNEA .....                                          | 27        |
| 3.5      | VERIFICAÇÃO DO TÍTULO DE ANTICORPOS POR ELISA ( <i>ENZIME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY</i> ) ..... | 28        |
| <b>4</b> | <b>RESULTADOS.....</b>                                                                           | <b>28</b> |
| 4.1      | EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DOS ANTÍGENOS .....                                                      | 28        |
| 4.2      | VACINAÇÃO E ENSAIO DE LETALIDADE EM CAMUNDONGOS POR DANO SISTÊMICO .....                         | 29        |
| 4.3      | VACINAÇÃO DE COELHOS E AVALIAÇÃO DA LESÃO CUTÂNEA .....                                          | 30        |
| 4.4      | VERIFICAÇÃO DO TÍTULO DE ANTICORPOS POR ELISA ( <i>ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY</i> ) ..... | 32        |
| <b>5</b> | <b>DISCUSSÃO .....</b>                                                                           | <b>33</b> |
| <b>6</b> | <b>CONCLUSÃO.....</b>                                                                            | <b>37</b> |
|          | <b>REFERÊNCIAS.....</b>                                                                          | <b>38</b> |
|          | <b>ANEXO I – COMITÊ DE ÉTICA .....</b>                                                           | <b>48</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

As aranhas do gênero *Loxosceles* pertencentes a família *Sicariidae* compõem o filo Arthropoda, mais numeroso dentre os animais terrestres. Essas aranhas têm como particularidade morfológica o prossoma contendo um desenho que lembra um violino e de cor marrom, que deram origem aos seus dois nomes populares: aranha-marrom ou aranhas violino (Futrell, 1992). São pequenas, possuindo entre 1 e 5 cm, não são agressivas (picando somente quando têm seu corpo pressionado) e mantêm hábitos noturnos. Além disso, seus três pares de olhos dispostos em semicírculo diferem do padrão encontrado em outras aranhas (Chaim *et al.*, 2011; Hogan, Barbaro, Winkel, 2004).

O loxoscelismo é o quadro clínico decorrente do envenenamento pela picada da aranha-marrom (Futrell, 1992; Gremski *et al.*, 2020) e dentre as espécies mais relevantes na América do Sul estão *Loxosceles intermedia*, *Loxosceles laeta* e *Loxosceles gaucho* devido ao grande número de acidentes registrados (Isbister & Fan, 2011). No Brasil, o loxoscelismo é considerado um problema de saúde pública, tendo a média de 7.619 casos por ano (2012-2022) (Ministério da Saúde, 2023). As manifestações podem ser divididas entre cutâneas e sistêmicas, sendo a primeira mais comum e característica pelo aparecimento da lesão dermonecrotica; e a segunda é menos comum, porém de ocorrência clínica mais grave podendo levar a óbito (Isbister & Fan, 2011; Gremski *et al.*, 2014).

O veneno dessas aranhas é uma mistura incolor de enzimas, glicoproteínas e peptídeos, com a prevalência de proteínas entre 4 e 40 kDa (Gremski *et al.*, 2014; Chaves-Moreira *et al.*, 2017). Segundo o transcriptoma da glândula de veneno de *L. intermedia*, 43,5% dos transcritos são toxinas (Gremski *et al.*, 2010). Dentre as toxinas encontram-se as fosfolipases-D (FLDs), uma das mais expressas, caracterizadas e estudadas devido a capacidade de sozinhas reproduzirem experimentalmente grande parte dos sintomas do loxoscelismo (Gremski *et al.*, 2014; Gremski *et al.*, 2020).

Análises de estrutura cristalográfica e dinâmica molecular demonstraram que a ação catalítica das FLDs está relacionada aos aminoácidos His47 e His12, que atuam na ligação fosfodiéster dos fosfolipídeos alvo. O seu principal substrato é a esfingomielina e, após clivagem, libera colina e ceramida-1-fosfato (Masood *et al.*,

2017; Gremski *et al.*, 2020). Estes metabólitos bioativos são responsáveis por desencadear a dermonecrose e o processo inflamatório (Gomez-Munoz *et al.*, 2013; Maceyka e Spiegel, 2014; Gremski *et al.*, 2020).

Ainda que possua um alto índice de notificação de acidentes, o tratamento para o loxoscelismo ainda não é padronizado. Dos tratamentos disponíveis têm-se o soro antiloxoscélico (SAlox), contendo anticorpos contra as toxinas dos venenos das três espécies acima mencionadas. Sua produção acontece no Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos do Paraná (CPPI-PR) a partir do isolamento do plasma de equinos hiperimunizados. Além desse, o Instituto Butantan produz um soro mais abrangente, o antiaracnídico, que contém anticorpos contra o veneno de três gêneros (*Loxosceles*, *Phoneutria* e *Tityus*) (Ministério da Saúde, 2001).

Entre as problemáticas envolvidas têm-se o correto diagnóstico considerando que a dermonecrose não é uma manifestação exclusiva do loxoscelismo. Além disso, a recomendação do Ministério da Saúde é que a aplicação dos soros seja realizada em casos moderados e graves para diminuir os sintomas sistêmicos e a ação gravitacional da lesão dermonecrotica (Polli *et al.*, 2021; Ministério da Saúde, 2001). Porém, devido a picada ser geralmente indolor, os pacientes acabam demorando por buscar ajuda, o que dificulta o tratamento considerando que a eficácia desses soros depende de uma rápida administração (Pauli *et al.*, 2009; Da Silva *et al.*, 2004).

A obtenção de isoformas mutadas recombinantes foi essencial para entender melhor o mecanismo de ação dessas enzimas. Com mutações sítio-dirigidas, as isoformas apresentaram atividade enzimática reduzida e toxicidade ausente. Substituindo aminoácidos-chave por alanina, as moléculas perderam a capacidade de clivar esfingomielina, estimular a dermonecrose e aumentar a permeabilidade vascular, porém mantiveram a sua conformação tridimensional e epítomos imunológicos (Gremski *et al.*, 2014; Chaim *et al.*, 2006; Da Silva *et al.*, 2021; Vuitika *et al.*, 2016). Assim, o presente trabalho visa estudar a vacinação a partir das FLDs mutadas LiRecDT1W230A, com modificação nos domínios de reconhecimento de substrato; LIRecDT1H12-H47, mutada no domínio relacionado a atividade catalítica da enzima; e LgRecDT1E32-D34A, com alteração no domínio coordenação do cofator  $Mg^{2+}$ .

Dessa forma, imunógenos não tóxicos feitos a partir de isoformas recombinantes têm sido estudados a fim produzir antivenenos e vacinas protetoras contra o loxoscelismo. Em trabalhos anteriores, Polli e colaboradores (2021) e Antunes e colaboradores (2023) demonstraram a elaboração de uma vacina protetora e soro de segunda geração, respectivamente, a partir de FLDs recombinantes mutadas reconhecidas pelo sistema imune e capaz de proteger parcialmente coelhos contra a dermonecrose. Além disso, foi demonstrado também a redução de 79% da taxa de letalidade em camundongos contra o veneno de *L. intermedia* (Polli *et al.*, 2021). Mas estes resultados exigem um refinamento adicional para ajustar o esquema vacinal. Assim, o presente estudo investigou diversos protocolos de imunização e sua eficácia para proteger coelhos do aracnidismo dermonecrótico e camundongos da letalidade induzida pelo veneno de *Loxosceles*.

## 1.1 OBJETIVOS

Avaliar comparativamente a capacidade protetiva de diferentes protocolos de imunização referentes a uma vacina loxoscélica frente aos danos locais e sistêmicos utilizando fosfolipases-D recombinantes mutadas (LiRecDT1W230A, LiRecDT1H12-H47A e LgRecDT1E32-D34A) como antígeno.

## 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obter FLDs mutadas em cepa bacteriana de expressão;
2. Comparar a capacidade de proteção vacinal contra a letalidade de camundongos;
3. Comparar a capacidade de proteção de diferentes protocolos de vacinação contra os danos locais em coelhos;
4. Avaliar a produção de anticorpos em coelhos submetidos a diferentes protocolos de vacinação.

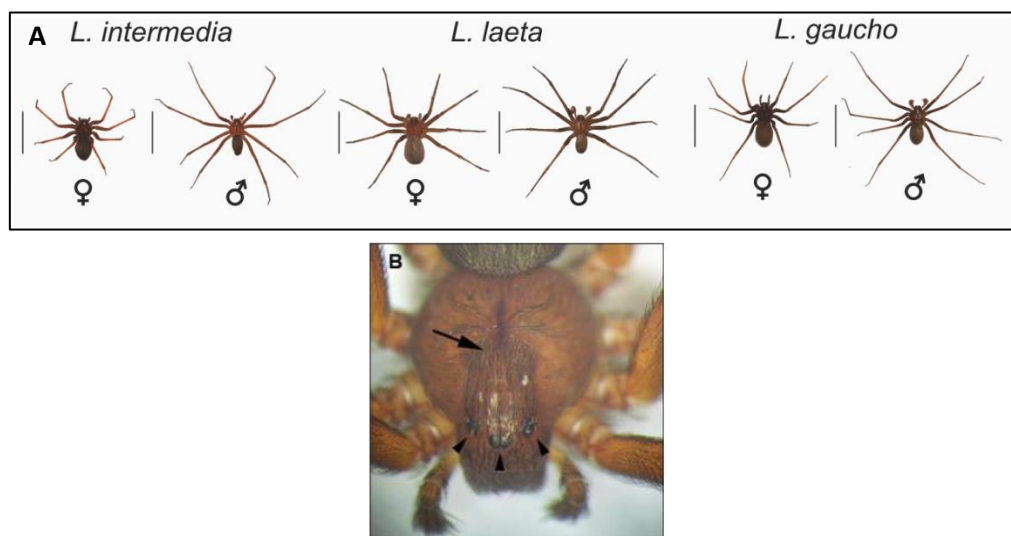
## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 ARANHAS-MARROM

Aranhas são animais do filo Arthropoda, sendo esse o grupo mais numeroso dentre os animais terrestres. Dentre suas características principais, as aranhas têm o exoesqueleto quitinoso, um par de quelíceras e quatro pares de pernas (Brusca, Moore, Shuster, 2018). O nome *Loxosceles* significa “pernas inclinadas” em referência a sua posição durante o modo de repouso (Vetter, 2008). São encontradas aproximadamente 130 espécies desse gênero distribuídas pelo mundo (Platnick, 2013). Dentre essas, as aranhas-marrom ou aranhas violino, ficaram assim conhecidas popularmente, por suas características morfológicas do prossoma com desenho de violino e cor marrom (Futrell, 1992).

Medindo entre 1 e 5 cm, possuem dimorfismo sexual, com a fêmea com corpo maior e o macho com as pernas mais alongadas (FIGURA 1). Além disso, possuem três pares de olhos dispostos em semicírculos, diferindo do padrão encontrado na maioria das espécies (Chaim *et al.*, 2011). Essas aranhas são capazes de viver meses sem água e comida suportando temperaturas entre 8 °C e 43 °C. Assim, o Brasil se enquadra como um país com o clima adequado, possuindo 12 espécies conhecidas (Da Silva *et al.*, 2004; Bertani *et al.*, 2010; Gonçalves-de-Andrade *et al.*, 2012).

Figura 1 - Aranhas do gênero *Loxosceles*.



As três espécies de maior ocorrência clínica no Brasil, mostrando o dimorfismo sexual entre macho e fêmea e as diferenças interespecies (A) (Adaptado de Polli *et al.*, 2021) e setas indicando os olhos em semicírculo e desenho em violino do prossoma (B) (Adaptado de Chaim *et al.*, 2011).

Nos últimos 10 anos (2012-2022) o número de acidentes registrados foi de 83.805 casos no Brasil (TABELA 1) e desses, quase metade no estado do Paraná, com 42.298 casos registrados. Devido ao grande número de acidentes registrados, as espécies de maior relevância clínica no Brasil são *Loxosceles intermedia*, *Loxosceles laeta* e *Loxosceles gaucho* (Pauli *et al.*, 2006). Dos óbitos, foram 72 no país e 9 no estado em questão (Ministério da Saúde, 2023), sendo assim considerado um problema para a saúde pública. Esses animais são encontrados em locais escuros, como no meio de roupas, dentro dos calçados e móveis; e embora não sejam espécies agressivas, quando têm seu corpo pressionado, picam e injetam seu veneno (Málaque *et al.*, 2002; Futrell, 1992; Hogan, Barbaro, Winkel, 2004).

Tabela 1 - Notificações de acidentes com *Loxosceles* sp. no Brasil de 2012-2022.

| Ano do acidente | Número de casos confirmados |
|-----------------|-----------------------------|
| 2012            | 7.542                       |
| 2013            | 7.870                       |
| 2014            | 7.263                       |
| 2015            | 7.885                       |
| 2016            | 7.474                       |
| 2017            | 8.111                       |
| 2018            | 8.658                       |
| 2019            | 8.900                       |
| 2020            | 7.200                       |
| 2021            | 6.512                       |
| 2022            | 6.390                       |
| <b>Total</b>    | <b>83.805</b>               |

Fonte: adaptado de Sistema De Informação De Agravos de Notificação – Ministério da Saúde, 2023.

## 2.2 LOXOSCELISMO

O quadro clínico desenvolvido em decorrência da picada da aranha-marrom é conhecido como loxoscelismo (Futrell, 1992; Gremski *et al.*, 2020). Os sinais e sintomas podem ser apresentados na forma cutânea, com a dermonecrose sendo a principal manifestação, ou sistêmica com alterações hematológicas e renais (Isbister & Fan, 2011; Futrell, 1992).

O quadro cutâneo contempla a maioria dos casos, sendo relacionado diretamente com o local da picada e ao efeito do veneno sobre os componentes da membrana (Machado *et al.*, 2005; Futrell, 1992). No primeiro momento, há sintomas como ardência e dor, que surgem entre 2 e 8 horas após a picada, além de pontos de eritema, coceira, inchaço e sensibilidade local. Entre 12 e 24 horas, há a formação de um halo de tecido isquêmico e nos dias subsequentes assume uma coloração azul-arroxeadada e opaca com propagação gravitacional (FIGURA 2) (Futrell, 1992). Perda tecidual, cicatrizes desfigurantes e infecções secundárias são as principais complicações do quadro clínico (Ministério da Saúde, 2001).

Figura 2 - Progressão do loxoscelismo cutâneo.



A- 1 dia; B- 9 dias; C- 16 dias; D- 25 dias (Isbister e Fan, 2011).

O quadro sistêmico ocorre quando o veneno atravessa a barreira epidérmica e chega à circulação sanguínea. É mais raro, porém quando desenvolvido é potencialmente mais severo (Barbaro *et al.*, 1992; Futrell, 1992). Dentro das primeiras 24-48 horas os sintomas mais comuns são febre, fraqueza, calafrio, mal-estar e vômitos. Além disso, tem-se alterações nos mecanismos de hemostasia e coagulação, hemólise intravascular seguida de anemia hemolítica e insuficiência renal aguda (IRA) (Appel *et al.*, 2005; Ministério da Saúde, 2001; Futrell, 1992). Dos sintomas mencionados, a IRA é o principal causador de complicações, podendo levar a óbito. É caracterizado por hemoglobinúria, hematúria e proteinúria e em casos extremos



pode levar a obstrução da luz tubular por acúmulo de proteínas ou pelo edema das células epiteliais (Lung & Mallory, 2000; Futrell, 1992).

Assim, outros fatores além da espécie, como sexo e estágio de desenvolvimento da aranha, quantidade de veneno inoculado e tempo de exposição ao veneno sem tratamento, podem relacionar-se com a gravidade do quadro desenvolvido. Além também, dos fatores envolvendo o paciente, como a quantidade de tecido adiposo no local da picada, idade e a variação genética (Pauli *et al.*, 2009; Ministério da Saúde, 2001; Sezerino *et al.*, 1998; Da Silva *et al.*, 2004; Hogan, Barbaro, Winkel, 2004; de Oliveira *et al.*, 2005; Tambourgi *et al.*, 2010).

### 2.3 VENENO LOXOSCÉLICO

O veneno loxoscélico é uma substância incolor e cristalina que é produzido por um par de glândulas localizadas no cefalotórax do animal e unidas nas quelíceras. Sua composição possui uma mistura complexa de glicoproteínas, enzimas, moléculas orgânicas, com predominância de peptídeos e proteínas com baixa massa molecular, de 5 a 40 kDa (Da Silva *et al.*, 2004; Gremski *et al.*, 2014).

Gremski e colaboradores (2010) apresentaram o transcriptoma da glândula de veneno de *L. intermedia* e dividiram as toxinas em dois grupos: das menos expressas e das mais expressas. Dentre as menos expressas, tem-se as hialuronidases, TCTP, serpina e alérgenos que desempenham um papel importante na manifestação dos sintomas decorrentes da picada das aranhas do gênero *Loxosceles* sp. Já no grupo das mais expressas encontram-se os peptídeos ICK, metaloproteases e fosfolipases-D (FLDs), correspondendo juntas a 95% dos transcritos (FIGURA 3) (Gremski *et al.*, 2021; Gremski *et al.*, 2010).

Figura 3 - Proporção das toxinas do veneno de *Loxosceles* sp.

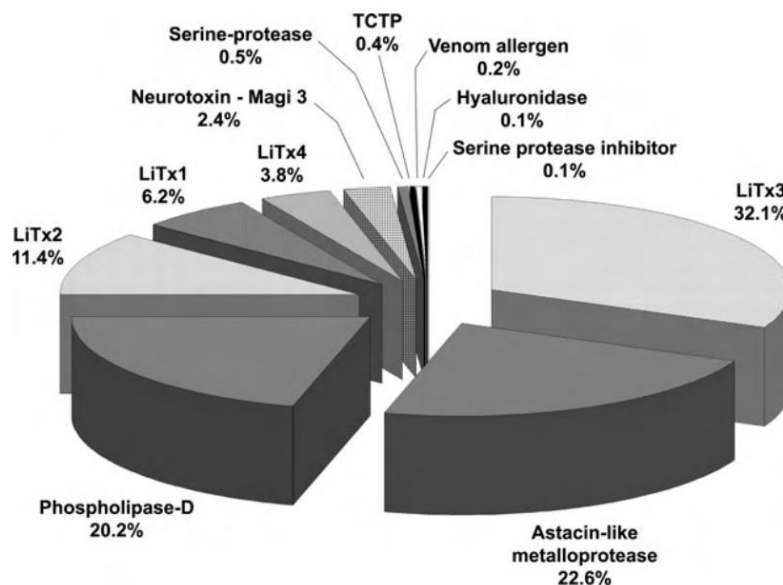


Gráfico mostrando as toxinas do veneno de *Loxosceles* sp. a partir do transcriptoma da glândula de *L. intermedia*. São vistas as proteínas menos expressas (TCTP, Alérgenos, Hialuronidases, Serinoproteases e Serpinas) e as mais expressas (peptídeos ICK, metaloproteases e fosfolipases-D) (Gremski *et al.*, 2010).

As hialuronidases agem como fator de dispersão e não como um elemento tóxico, por hidrolisarem o ácido hialurônico presente na matriz extracelular (Geren *et al.*, 1976; Schenone e Suarez, 1978). Desse modo, tendem a agir localmente, perto do local da picada, permitindo que os outros componentes do veneno se difundam. Portanto, no loxoscelismo, aumentam a área dermonecrótica e do edema, além de desencadear a propagação gravitacional (Ferrer *et al.*, 2013, Gremski *et al.*, 2021). A TCTP e a molécula alergênica (LALLT) manifestam muito dos sintomas cutâneos como edema, eritema, coceira, também degranulação de mastócitos e aumento da permeabilidade vascular reforçando a resposta inflamatória exacerbada (Gremski *et al.*, 2014; Chaves-Moreira *et al.*, 2017; Makris *et al.*, 2009; Lane, McCoppin e Dyer, 2011; Gremski *et al.*, 2021; Sade *et al.*, 2012; Boia-Ferreira *et al.*, 2019; Justa *et al.*, 2020).

Por fim, as serino proteases e as serpinas (inibidores de serino proteases) são as moléculas que não possuem a função esclarecida pela literatura. Para a primeira, supõe-se que ajam como tesouras ativando precursores moleculares e/ou participam como enzimas digestivas após o envenenamento da presa. Já a segunda, sugere-se que sua atividade inibitória é responsável por manter a integridade das outras

moléculas presentes no veneno e assim, aumentar a vida útil das toxinas quando expostas no ambiente externo (Dos Santos *et al.*, 2009; Gremski *et al.*, 2021).

No grupo das moléculas mais expressas, correspondendo mais de 20% de todos os transcritos da glândula de veneno de *L. intermedia* tem-se as toxinas inseticidas, compostas por uma alta quantidade de resíduos de cisteína na sua sequência aminoacídica, os quais formam pontes dissulfeto. Formam assim, um nó de cisteína do tipo inibidor (ICK), possuindo 4 isoformas (De Castro *et al.*, 2004; Craik, Daly e Waine, 2001; Moore *et al.*, 2013). Relacionam-se principalmente com atividades inseticidas ligadas ao comportamento de predação de insetos pelas aranhas e também foram descritas com função de defesa contra predadores (Herzig *et al.*, 2018; De Castro *et al.*, 2004; Matsubara *et al.*, 2017; Gremski *et al.*, 2021).

Já as metaloproteases são moléculas presentes em diversos venenos e compõem 9,8% do veneno de *Loxosceles* sp., segundo o transcriptoma da glândula de *L. intermedia* (Gremski *et al.*, 2010). Essas proteínas são pertencentes a família das metzincinas sendo dependentes de zinco para sua ativação (Gremski *et al.*, 2010; Bode *et al.*, 1993). Sua função é descrita pela capacidade de degradar proteínas de matriz extracelular como fibronectina, gelatina e fibrinogênio (Feitosa *et al.*, 1998), sendo assim, caracterizadas como LALPs (*Loxosceles Astacin-Like Proteases*) (Da Silveira *et al.*, 2007). Possui 5 isoformas descritas, sendo 3 em *L. intermedia* (LALP1, LALP2 e LALP5), 1 em *L. laeta* (LALP4) e 1 em *L. gaucho* (LALP5). Atuam dificultando a regeneração do tecido através do aumento da permeabilidade, permitindo com que outras moléculas do veneno se espalhem com mais agilidade (Trevisan-Silva *et al.*, 2010).

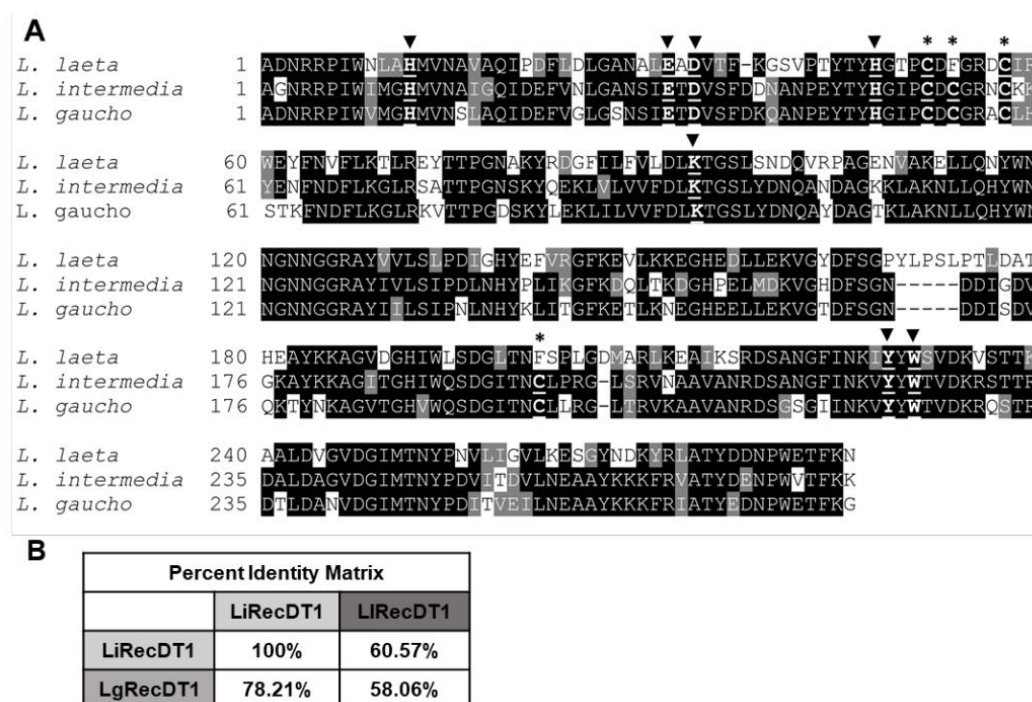
## 2.4 FOSFOLIPASES-D

As fosfolipases-D (FLDs), que também fazem parte das toxinas mais expressas, correspondem a 20% dos transcritos de toxinas da glândula de veneno de *L. intermedia* e 16% dos transcritos da glândula de veneno de *L. laeta* (Gremski *et al.*, 2010). Um estudo proteômico do veneno das três espécies demonstrou que as toxinas de FLDs estão em uma mesma região correspondente, entre 30 e 35 kDa (Machado *et al.*, 2005). As FLDs têm um amplo espectro de fosfolipídeos cliváveis e com o auxílio

de análises cristalográficas, o entendimento da sua estrutura auxiliou no entendimento do mecanismo de ação (Masood *et al.*, 2018).

A comparação da sequência de aminoácidos das FLDs do veneno de aranha indica que contêm 284 ou 285 aminoácidos com um grau significativo de homologia (de Santi Ferrara *et al.*, 2009). Essa cadeia polipeptídica dobra-se na conformação de ( $\alpha/\beta$ ) 8 barril, com resíduos de aminoácidos cataliticamente ativos no sítio ativo, sítios catalíticos e sítio de ligação do magnésio ( $Mg^{2+}$ ) (Fernandes Pedrosa *et al.*, 2002; Appel *et al.*, 2008; Chaim *et al.*, 2006; Murakami *et al.*, 2006). Além disso, são classificadas com base no número de pontes dissulfeto presentes na sua estrutura. O *loop* catalítico (*loop* C) é altamente conservado entre as espécies devido a sua estabilização por uma ponte dissulfeto entre os aminoácidos C51 e C57, assim classificando a classe I de FLDs da qual faz parte LiRecDT1 (*L. laeta*), a isoforma de PLD mais expressa na glândula de veneno dessa espécie. LiRecDT1 (*L. intermedia*) e LgRecDT1 (*L. gaucho*), as isoformas de FLD mais expressas na glândula dessas espécies, estão na classe II, pois possuem uma segunda ponte dissulfeto entre C53 e C201 que liga o *loop* C com o *loop* flexível, diminuindo a flexibilidade. As isoformas mais expressas das três espécies mencionadas possuem sequências aminoacídicas variando entre 58% e 78% (FIGURA 4) o que contribui para as diferenças de imunogenicidade e funcionalidade (Murakami *et al.*, 2006; Coronado *et al.*, 2015; Giuseppe *et al.*, 2011; Justa *et al.*, 2023).

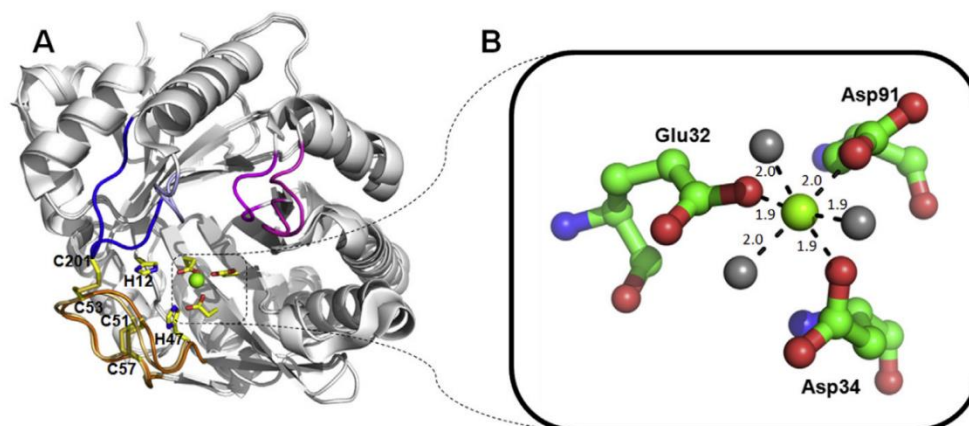
Figura 4 - Comparação da sequência aminoacídica das três espécies de relevância.



Alinhamento múltiplo de aminoácidos, com as regiões conservadas em preto, substituições em cinza e regiões não conservadas em branco. Asteriscos indicam as cisteínas com pontes dissulfeto e as flechas pretas os aminoácidos conservados do loop catalítico (A). Percentual da matriz de identidade mostrando semelhanças (B). LiRecDT1 (GenBank: DQ218155.1), LgRecDT1 (GenBank: JX866729.1), e LiRecDT1 (GenBank: AY093599.1) (Adaptado de: Justa *et al.*, 2023).

A ação catalítica dessa enzima sobre a esfingomielina é principalmente dependente dos resíduos de aminoácidos His47 e His12 presentes em sua estrutura. Esses resíduos atuam, respectivamente, na ligação fosfodiéster para liberar colina e na formação da ceramida-1-fosfato (produto da degradação da esfingomielina), (Masood *et al.*, 2017; Gremski *et al.*, 2020; Murakami *et al.*, 2005). Além disso, os aminoácidos Glu32, Asp34 e Asp91 estão envolvidos na coordenação de um íon  $Mg^{2+}$  que participa no reconhecimento, ligação dos substratos clivados por FLDs e na estabilização do complexo enzima-substrato (Murakami *et al.*, 2005) (FIGURA 5). Desse modo, gerando metabólitos bioativos, como ceramida-1-fosfato a partir de esfingomielina e ácido lisofosfatídico a partir da clivagem de lisofosfatidilcolina, as FLDs são responsáveis principalmente por desencadear um processo inflamatório, com aumento da permeabilidade vascular e migração de monócitos e neutrófilos (Gomez-Munoz *et al.*, 2013; Maceyka e Spiegel, 2014; Gremski *et al.*, 2020).

Figura 5 - Conformação estrutural representativa das FLDs.



Esquema estrutural onde as hélices  $\alpha$  e as cadeias  $\beta$  são representadas. Em A, temos a sobreposição das estruturas das isoformas LiRecDT1 (GenBank: DQ218155.1), LgRecDT1 (GenBank: JX866729.1), e LIRecDT1 (GenBank: AY093599.1). Resíduos envolvidos na ligação de íons e ação catalítica estão destacados. O loop catalítico está em laranja, o flexível em azul e o variável em magenta. As cores escuras e claras representam as FLDs de classe I e II, respectivamente, o íon magnésio é uma esfera verde e as pontes dissulfeto estão representadas por bastões amarelos (A). A esfera de coordenação do íon magnésio com os aminoácidos e ligações envolvidas (B) (Gremski *et al.*, 2014).

Mutações sítio-dirigidas de FLDs recombinantes de *Loxosceles* sp. permitiram a produção de moléculas com atividade enzimática reduzida. A troca por alanina dos aminoácidos-chave para a ocorrência da ação catalítica possibilitou a produção de isoformas sem atividade tóxica que mantêm a sua estrutura conformacional. Com as substituições, as isoformas foram incapazes de clivar esfingomielina, estimular a dermonecrose e aumentar a permeabilidade vascular (Gremski *et al.*, 2014; Chaim *et al.*, 2006; Da Silva *et al.*, 2021; Vuitika *et al.*, 2016).

As isoformas recombinantes mutadas utilizadas foram LiRecDT1 W203A, com alteração no reconhecimento do substrato; LIRecDT1 H12-H47A, com diminuição da atividade catalítica; e LgRecDT1 E32-D34A, com modificação na coordenação do íon  $Mg^{2+}$  (Gremski *et al.*, 2014; Vuitika *et al.*, 2016). A escolha dessas isoformas baseou-se em alguns critérios como inatividade tóxica, conservação dos epítomos, da estrutura tridimensional das proteínas e bom rendimento após a purificação. A estrutura das proteínas mutadas foi analisada quanto a sua tridimensionalidade por meio de testes de dicroísmo circular. Os resultados não indicaram diferenças significativas em relação ao grupo de controle, composto pelas proteínas FLD selvagens (Vuitika *et al.*, 2016).

Assim, estudos anteriores testaram a seguridade das FLDs mutadas em comparação com as selvagens com testes *in vivo* e *in vitro*. Com coelhos e camundongos, não foi observado a manifestação de lesões dermonecrótica e/ou alterações na permeabilidade vascular quando expostas as toxinas mutadas. Além disso, corroborando com os ensaios não houve nenhuma atividade citotóxica contra eritrócitos (Vuitika *et al.*, 2016). Além disso, as isoformas recombinantes mutadas foram testadas quanto a sua atividade e imunogenicidade pelos testes de *Amplex red* e *Western Blotting*, respectivamente. Desse modo, quando comparadas com as isoformas selvagens, as FLDs mutadas não apresentavam atividade catalítica através de 0% da degradação de esfingomieline (Antunes *et al.*, 2023). Ademais, a imunogenicidade das FLDs mutadas, ou seja, o quanto são reconhecidas por anticorpos foi igual a das toxinas selvagens (Polli *et al.*, 2021).

## 2.5 VACINAS

As vacinas são hoje uma das formas mais eficazes de proteção contra doenças no mundo. Dessa forma, além da proteção, as vacinas possuem uma ótima relação custo-eficácia, fazendo com que planos de imunização básica fossem desenvolvidos para atender a população ao redor do mundo todo (OMS, 2009). A primeira vacina desenvolvida foi contra a varíola, em 1798 por Edward Jenner, que observou que a inoculação prévia do vírus gerava uma manifestação mais branda da doença e por consequência, proteção contra as formas graves e novas infecções (Lahariya, 2014).

A partir disso, começou-se a buscar entender o mecanismo de ação das vacinas no corpo humano. Atualmente, sabe-se que partir de um antígeno, 3 elementos chave são estimulados: células apresentadoras de antígeno (APC), que capturam, processam e expõe o antígeno na sua membrana para que seja reconhecido pelas células de defesa; linfócitos T, que reconhecem o antígeno e ativa as células B; e linfócitos B, que estimulam a resposta humoral e consequentemente, de memória do organismo (Male *et al.*, 2006; Perrie *et al.*, 2007; Sprent e Webb, 1987). Assim, diferentes tipos de antígenos vêm sendo explorados no mundo, dentre eles as proteínas.

## 2.6 IDENTIFICAÇÃO E TRATAMENTO DO LOXOSCELISMO

O correto diagnóstico do loxoscelismo pela equipe médica é dificultoso porque depende, na maioria das vezes, da captura e identificação do espécime de aranha após o acidente. Exames histológicos como uma biópsia na região da picada podem ser requeridos, mas a presença de dermonecrose não é necessariamente um sinal clínico específico de acidente com as aranhas-marrom (Gremski *et al.*, 2020).

Como tratamento mais indicado para o loxoscelismo têm-se o soro antiloxoscélico (SAlox), contendo anticorpos contra as toxinas do veneno de *L. intermedia*, *L. laeta* e *L. gaucho*. Sua produção é feita no Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos do Paraná (CPPI-PR) a partir do isolamento do plasma de equinos hiperimunizados com os venenos das três espécies. A recomendação do Ministério da Saúde é que a aplicação dos soros seja realizada em casos moderados e graves para diminuir os sintomas sistêmicos e a ação gravitacional da lesão dermonecrotica (Polli *et al.*, 2021; Ministério da Saúde, 2001). Porém, considerando que a picada da aranha é indolor e que os sintomas aparecem entre 24 e 72 horas após a inoculação do veneno, o paciente frequentemente não busca ajuda de imediato. Com isso, a eficácia desses soros diminui (Pauli *et al.*, 2009; Da Silva *et al.*, 2004). Estudos para uma segunda geração de tratamentos têm sido realizados, considerando que o único disponível hoje possui desvantagens: as reações adversas devido à sua origem animal, a dificuldade intrínseca em atingir os tecidos da pele e aliviar as reações locais e, como já mencionado, a ineficácia quando aplicado tardiamente (Antunes *et al.*, 2023).

## 3 METODOLOGIA

### 3.1 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DOS ANTÍGENOS

Fosfolipases-D recombinantes com mutações sítio-dirigidas das espécies de *L. intermedia* (LiRecDT1W230A), *L. laeta* (LiRecDT1H12-H47A) e *L. gaucho* (LgRecDT1E32-D34A) foram expressas no vetor pET14-b. A transformação foi realizada em cepa bacteriana de expressão *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS quimiocompetente e plaqueadas em meio LB ágar (triptona 10 g/L; extrato de levedura



5 g/L; NaCl 10 g/L; ágar-ágar 15 g/L), contendo os antibióticos ampicilina (100 µg/mL) e cloranfenicol (34 µg/mL) e mantidas em BOD 37°C por 24 horas.

Para a expressão de cada proteína recombinante mutada, uma colônia isolada foi selecionada das placas. A partir da escolha da colônia, um pré-inóculo foi realizado contendo 20 mL de LB líquido (triptona 10 g/L; extrato de levedura 5 g/L; NaCl 10 g/L) com os antibióticos ampicilina e cloranfenicol na proporção 1:1 e mantido sob agitação constante a 180 rpm, 37 °C por 12 horas. Na sequência, o inóculo foi preparado a partir do pré-inóculo na proporção 1:1000 em Erlenmeyer de 1 litro, previamente autoclavado com LB líquido. A expressão foi mantida sob agitação constante a 200 rpm, 37 °C, até atingir a D.O (densidade óptica) entre 0,4-0,6 (aproximadamente 3 horas) medida em espectrofotômetro. Para a indução das toxinas, foi adicionado 0,05 mM de Isopropil-Beta-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) e a expressão seguiu sob agitação de 200 rpm a 30 °C por 3,5 horas.

Para avaliar a expressão foram coletadas duas amostras de 1 mL de cada cultura, sendo uma logo após a indução por IPTG (T0h) e outra ao final (T3,5h). Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 3 minutos a 3500 xg e o seu sobrenadante descartado. O precipitado de bactérias formado foi congelado para análise por gel de eletroforese SDS-PAGE 12,5% sob condições redutoras. Ao final, os inóculos expressos foram centrifugados por 5 minutos a 3500 xg e ressuspensos em tampão de ligação (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, NaCl 500 mM, imidazol 10 mM, pH 8.0) e lisozima (1mg/mL). A suspensão bacteriana foi congelada por pelo menos 16 horas a -20°C e lisadas por *French Press*.

A purificação foi realizada por meio do sistema de cromatografia ÄKTA pure em coluna de afinidade níquel-agarose HP e para isso as amostras foram filtradas. No processo, foram utilizados o Tampão A (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20mM, NaCl 50mM) e o Tampão B (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20mM, NaCl 50Mm, Imidazol 500Mm) previamente filtrados. As frações eluídas com as proteínas de interesse purificadas foram dialisadas 3 vezes com PBS (NaCl 100 mM, Tampão fosfato de sódio 10 Mm, pH 7.3) e centrifugadas a 20.000 xg por 15 minutos a 4°C.

### 3.2 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DOS ANTÍGENOS

A pureza das fosfolipases-D recombinante mutadas das três espécies estudadas foi analisada através de eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5% contendo detergente aniônico Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE). A solução de poliacrilamida utilizada foi aplicada com os catalisadores APS e TEMED, entre duas placas de vidro. A solução de empacotamento foi preparada e aplicada, junto aos catalisadores já citados, por cima do gel, e o pente para formação dos poços foi posicionado sobre ela. 5 µg de cada amostra foram fervidas, diluídas em tampão redutor de amostra e aplicadas no gel juntamente com um marcador de massa. Para a corrida eletroforética, foi utilizado o tampão de corrida 1x (Tris 30,3 g/L, Glicina 144 g/L, SDS 10 g/L) e as amostras foram submetidas a uma corrente constante de 25 mA. Após o término da corrida, os géis foram corados com Azul de Comassie e, para sua descoloração, foi utilizada uma solução de metanol 30%. Além disso, as amostras foram previamente dosadas a partir do método de Bradford, M. M. (1976).

### 3.3 VACINAÇÃO E ENSAIO DE LETALIDADE EM CAMUNDONGOS POR DANO SISTÊMICO

Camundongos Swiss (n=10 por grupo) (29-39 gramas) receberam, via intraperitoneal, um *pool* de antígenos (as 3 proteínas mutadas) e adjuvante na proporção 1:1. O *pool* das proteínas foi formado pelas FLDs LiRecDT1W230A, LIRecDT1H12-H47A e LgRecDT1E32-D34A com massas iguais e o adjuvante utilizado, o hidróxido de alumínio 4%. Os animais foram divididos em dois grupos, dos imunizados (que receberam as FLDs recombinantes mutadas) e dos controles, que receberam apenas o adjuvante com *Phosphate Buffered Saline* (PBS) na mesma proporção 1:1. O esquema de imunização ocorreu com três doses com massas de 100, 60 e 30 µg do *pool* de FLDs com três semanas entre cada aplicação. Após 10 dias da última dose, os animais foram desafiados com veneno loxoscélico de *L. intermedia*. A quantidade de veneno utilizada foi calculada para cada animal na medida de 11 µg de veneno para cada 20 g de peso do animal, que é a dose letal (DL50). O acompanhamento ocorreu em 24, 48 e 72h após o desafio.

Os dados foram analisado através do programa estatístico GraphPad Prism 6, utilizando a análise de variância (ANOVA - dupla sem repetição). Para a comparação entre os grupos tratados e controles foi utilizado o teste de Tukey para comparar o nível de significância, sendo que os dados com  $*p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes.

### 3.4 VACINAÇÃO DE COELHOS E AVALIAÇÃO DA LESÃO CUTÂNEA

Foram vacinados coelhos New Zealand ( $n=5$  por grupo) fêmeas com uma solução contendo um *pool* de proteínas e adjuvante na proporção 1:1. O *pool* de proteínas consiste nas FLDs recombinantes mutadas LiRecDT1W230A, LIRecDT1H12-H47A e LgRecDT1E32-D34A contendo massas iguais de cada uma e o adjuvante hidróxido de alumínio 4%. Os animais foram vacinados via intramuscular com três doses de massas progressivas, sendo três grupos diferentes: o primeiro recebeu 300, 600 e 1000  $\mu\text{g}$  do *pool* de FLDs; o segundo 75, 150 e 250  $\mu\text{g}$ ; e o terceiro é o grupo controle que recebeu o adjuvante e PBS. O esquema de vacinação foi realizado com a aplicação das doses com 30 dias de intervalo entre cada uma delas, e após 10 dias da última dose os animais foram desafiados. O desafio consistiu na aplicação de 3,5 dose mínima necrosante (DMN) do veneno de *L. intermedia* via intradérmica na região dorso-lateral. Então, foi fotografada e acompanhada a área de aplicação por 24, 48, 72, 96h e 10 dias após o desafio em cada animal. Por fim, foram medidas por meio de um paquímetro o diâmetro de edema na horizontal e vertical e a área do círculo/lesão calculada.

As áreas de dermonecrose e edema foram medidas com o auxílio do programa ImageJ. Em seguida, os dados foram analisado através do programa estatístico GraphPad Prism 6, utilizando a análise de variância (ANOVA - dupla sem repetição). Para a comparação entre os grupos tratados e controles foi utilizado o teste de Tukey para comparar o nível de significância, sendo que os dados com \*\*\*\*  $p < 0,0001$ , \*\*\*  $p < 0,001$  foram considerados estatisticamente significantes.

### 3.5 VERIFICAÇÃO DO TÍTULO DE ANTICORPOS POR ELISA (*ENZIME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY*)

Placas de 96 poços MaxiSorp (Nunc, ThermoFisher) foram sensibilizadas com 3000 ng do veneno de *L. intermedia* por poço em tampão de bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub> 0,02 M pH 9,6) por 16 horas a 4 °C. Após lavagem com PBS Tween 20 0,05% os poços foram bloqueados com solução de PBS caseína 2% durante 1 hora a 37°C. Em seguida, após novas lavagens os poços receberam os soros obtidos na vacinação na diluição 1:400, 1:1600 ou 1:6400 e incubados por mais 1 hora a 37 °C. Posteriormente, os poços novamente lavados foram incubados com anti-IgG coelho conjugada com peroxidase em uma diluição de 1:5000 por 60 minutos a 37°C. Então, imediatamente após nova lavagem foi adicionado orto-fenileno diamina (OPD) com 4 µL/mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em tampão citrato para peroxidase (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, C6H8O7 pH 5,0) por 30 minutos a fim de conseguir a reação colorimétrica. Por fim, a reação foi interrompida com 50 µL de ácido sulfúrico 1M e lida a absorbância em 492 nm. Para que fossem descartadas reações inespecíficas dos soros e reagentes, soros pré-ímmunes foram utilizados como controle negativo para o ensaio.

Para estabelecer o ponto de corte (*cut off*) da reação entre soros reagentes e não reagentes foram utilizadas as médias dos valores de absorbância dos soros dos animais controle negativo, acrescentando-se ao valor 3 desvios padrão da média. Os títulos de anticorpos específicos para o veneno loxoscélico foram determinados por interpolação usando a fórmula de 4-parâmetros da curva padrão no programa SoftMax Pro (Molecular Devices). Para garantir a acurácia da quantificação, uma curva padrão foi padronizada com densidade óptica (D.O) de 1,0 a 0,2. Os resultados foram analisados no programa GraphPadPrism 6 utilizando teste estatístico Two-Way ANOVA com significância de \*p<0,05 (Cajaraville, 2019; Dias, 2016).

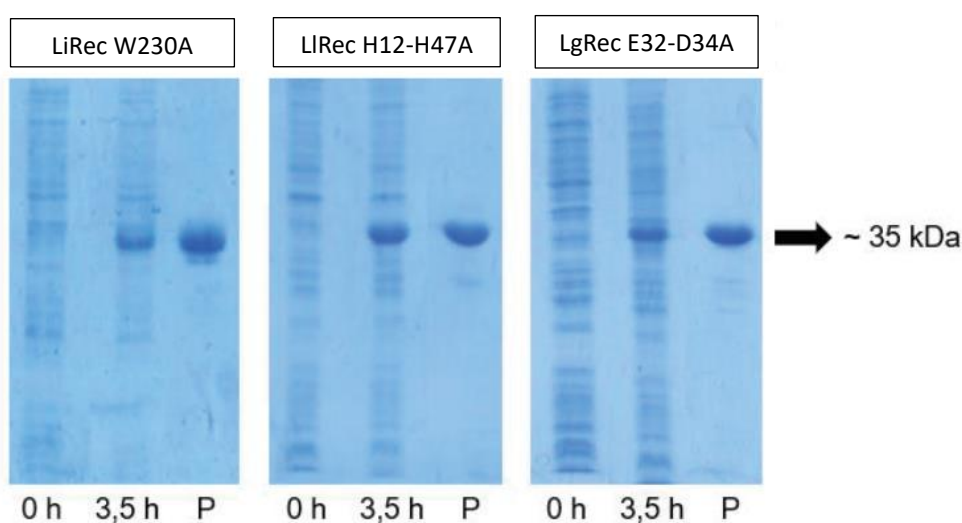
## 4 RESULTADOS

### 4.1 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DOS ANTÍGENOS

As fosfolipases-D das três espécies foram expressas, purificadas, dosadas e sua pureza analisada através da eletroforese do gel de poliacrilamida SDS-PAGE

12,5%. Assim, pode-se comprovar que as três toxinas purificadas apresentam alto grau de pureza quando comparadas com as amostras de tempo inicial (antes da indução com IPTG) e tempo final (após a indução com IPTG), visto que suas bandas apareceram na altura de 35 kDa aproximadamente (FIGURA 6).

Figura 6 - Expressão e purificação de fosfolipases-D com mutações sítio dirigidas.



SDS-PAGE redutor 12,5% demonstrando o perfil eletroforético geral referente às fosfolipases-D com mutações sítio dirigidas: LiRecY228A, LIRecH12A/H47A e LgRecE32A/D34A. Bandas de 0h referentes à amostra obtida em tempo inicial de expressão (antes da indução por IPTG), nota-se a ausência de banda na faixa de 30 a 35 kDa. Perfil eletroforético da amostra obtida no tempo final de expressão (após 3,5h da indução por IPTG), é notável o aumento da banda referente a fosfolipase-D, na altura aproximada de 35 kDa. Apenas a toxina purificada em altura característica de 35kDa em P.

## 4.2 VACINAÇÃO E ENSAIO DE LETALIDADE EM CAMUNDONGOS POR DANO SISTÊMICO

A avaliação da proteção do loxoscelismo sistêmico com a vacinação foi realizada pelo ensaio de letalidade em camundongos com o veneno de *L. laeta*. Os dados mostrados na tabela 2 demonstram a porcentagem de proteção obtida com as três doses aplicadas.

Tabela 2 - Letalidade em camundongos vacinados com 3 doses.

| Tempo        | 3 doses |           |
|--------------|---------|-----------|
|              | C-      | Vacinados |
| 0h           | 0/10    | 0/10      |
| 24h          | 2/10    | 0/10      |
| 48h          | 6/10    | 0/10      |
| 72h          | 10/10   | 1/10      |
| Proteção (%) |         | 90%       |

Fonte: a Autora (2023)

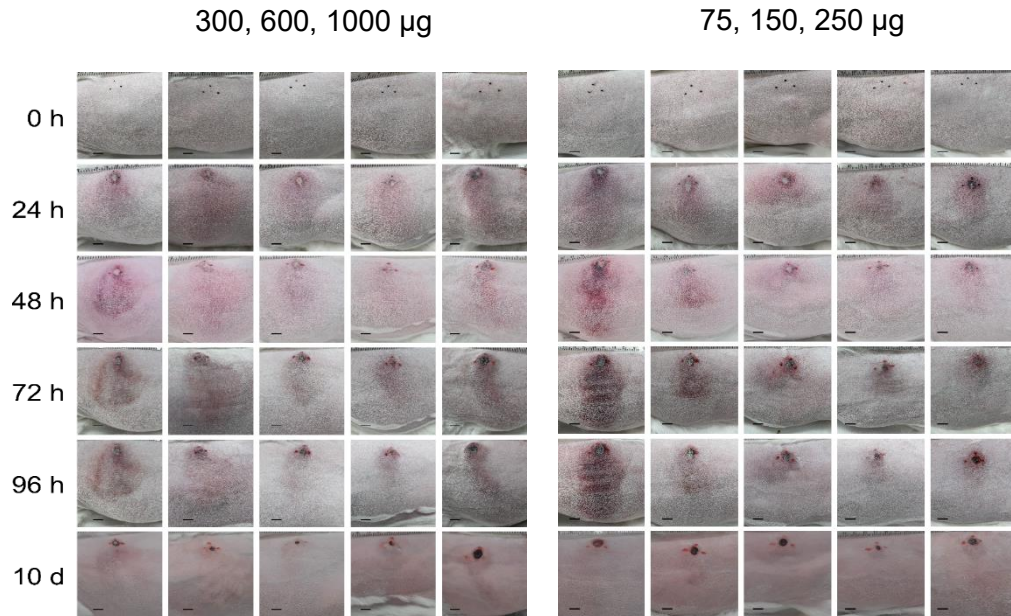
Para os animais controle negativo, que receberam apenas PBS caseína 2% e adjuvante, foi observada a morte de 2 animais com 24h após o desafio, 6 após 48h e de todos os 10 animais com 72h de aplicação, demonstrando a integridade do veneno utilizado. Já para os animais do grupo vacinado, que recebeu um *pool* das três proteínas mutadas, a proteção obtida foi de 90%, considerando que ocorreu apenas 1 morte com 72h da realização do desafio.

#### 4.3 VACINAÇÃO DE COELHOS E AVALIAÇÃO DA LESÃO CUTÂNEA

As vacinas utilizadas foram avaliadas quanto a sua capacidade protetiva em coelhos frente a 3,5 DMN de *L. intermedia*. Os três grupos receberam 3 doses, e exceto o controle, com massas progressivas de antígeno. A proteção cutânea foi avaliada pela medição das áreas das lesões macroscópicas, isto é, mensuração da dermonecrose e edema formados em 24, 48, 72 e 96 horas, e também, 10 dias após o desafio (240 horas).

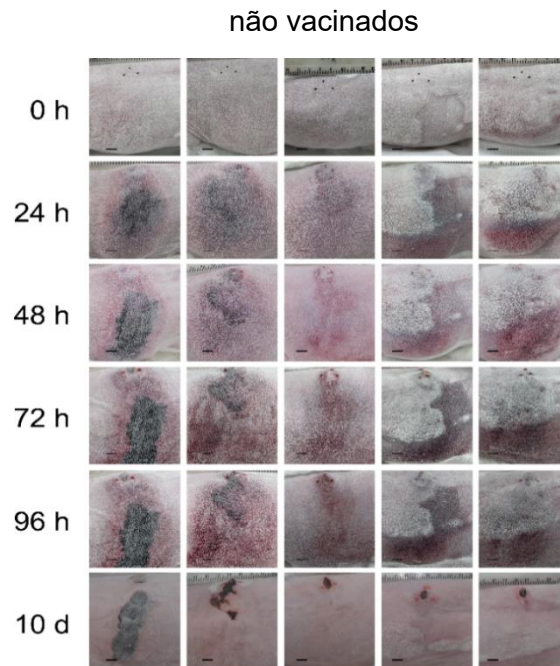
Os grupos que receberam a formulação vacinal apresentaram uma melhora geral no aspecto da lesão (FIGURA 7), tanto com maiores e menores massas, em comparação ao grupo controle (FIGURA 8).

Figura 7 - Aspecto macroscópico da lesão dos grupos vacinados



Acompanhamento da evolução da lesão dermonecrótica em coelhos vacinados. Na vertical, a alteração temporal de cada animal, por 24h durante 5 dias e 10 dias após o desafio. Na horizontal, o agrupamento dos diferentes animais de acordo com a massa de proteínas recebida. A linha preta no canto inferior esquerdo de cada imagem dimensiona 1 cm.

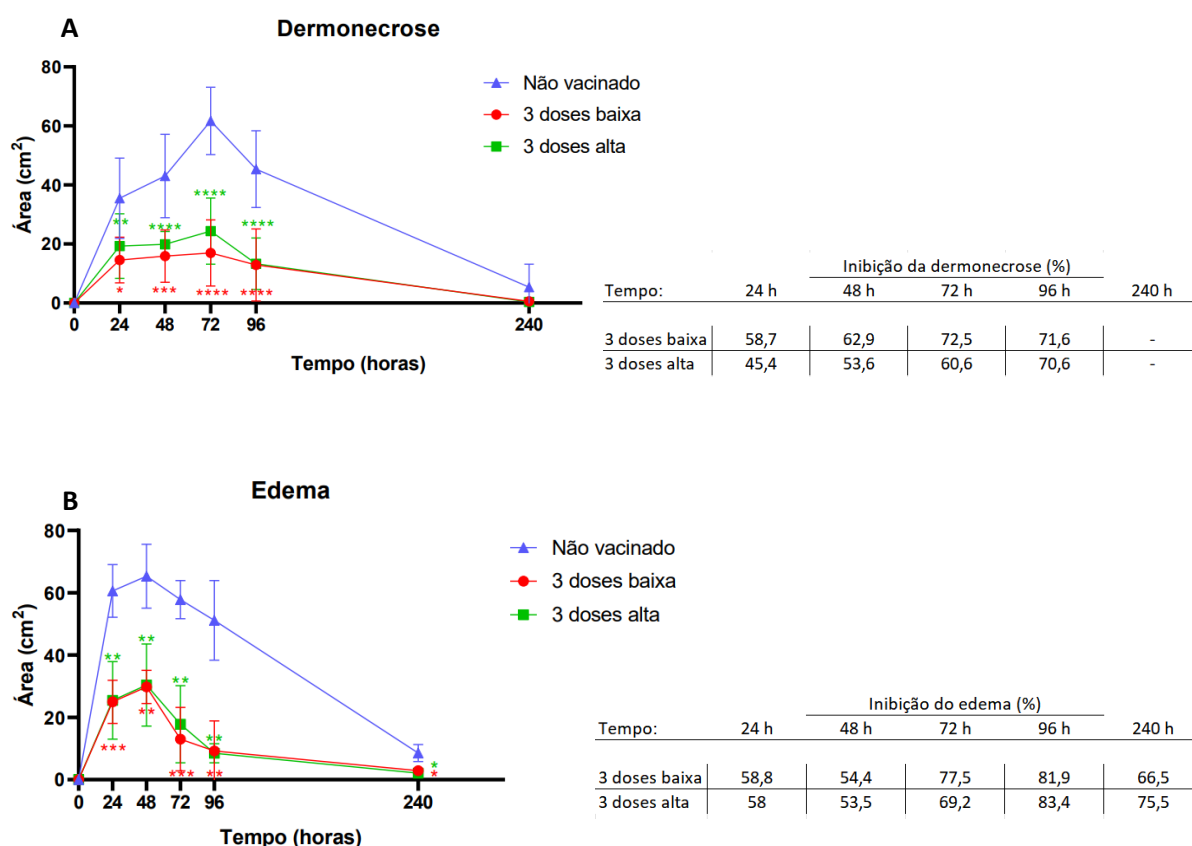
Figura 8 - Aspecto macroscópico da lesão do grupo controle.



Acompanhamento da evolução da lesão dermonecrótica em coelhos não vacinados. Na vertical, a alteração temporal de cada animal, por 24h durante 5 dias e 10 dias após o desafio. Na horizontal, o agrupamento dos diferentes animais do grupo que receberam apenas PBS-caseína 2% e adjuvante. A linha preta no canto inferior esquerdo de cada imagem dimensiona 1 cm.

Além disso, as formulações apresentaram pouca diferença, entre elas, na capacidade de reduzir dermonecrose (FIGURA 9A) e edema (FIGURA 9B). Porém, as duas foram capazes de reduzir em pelo menos 70% até 96 horas a formação da dermonecrose e aproximadamente 60% do edema em todos os tempos medidos e em comparação ao grupo controle.

Figura 9 - Evolução de dermonecrose e edema por grupo.



Avaliação de dermonecrose e edema comparando os animais vacinados com o grupo controle. O grupo de 3 doses baixa recebeu menor massa de FLDs mutadas (75, 150 e 250 µg), o grupo de 3 doses alta recebeu maior massa (300, 600 e 1000 µg) e o não vacinado recebeu PBS. Evolução da área de dermonecrose e a taxa de redução pelo tempo (A) e da área e redução do edema pelo tempo (B). ANOVA com pós teste Tuckey \*\*\*\* p < 0,0001, \*\*\* p < 0,001.

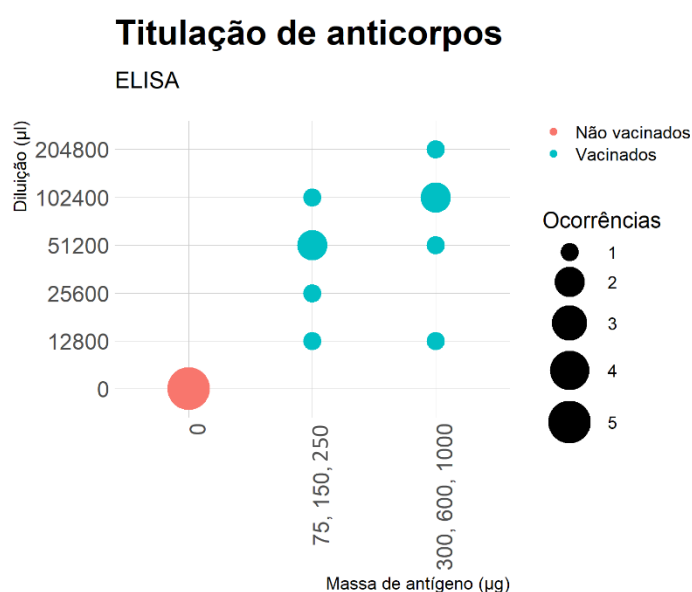
#### 4.4 VERIFICAÇÃO DO TÍTULO DE ANTICORPOS POR ELISA (ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY)

Para a análise da produção de anticorpos em coelhos e sua capacidade de reconhecimento do veneno de *L. intermedia* foram executados ensaios de ELISA. A resposta do grupo de vacinados com menores doses (75 µg, 150 µg e 300 µg) teve



uma titulação de 0,2 nm entre as diluições de 12.800 e 102.400. Já os grupos vacinados com maiores doses, apresentaram detecção entre 12.800 e 204.800, sendo possível observar uma diferença principal nas ocorrências, sendo a maior dose com capacidade de detecção para diluições maiores (FIGURA 10).

Figura 10 - Titulação de anticorpos de coelhos vacinados com 3 doses.



Titulação de anticorpos dos animais vacinados (azul) e não vacinados (vermelho). Na vertical, a diluição necessária para a detecção de 0,2 nm e na horizontal, as massas de FLDs mutadas recebidas. Círculo laranja: animais não vacinados. Círculos azuis: animais vacinados. O tamanho dos círculos representa o número de animais com determinado título, conforme detalhado no lado direito de cada figura (ocorrências).

## 5 DISCUSSÃO

O loxoscelismo, quadro clínico ocasionado pela picada da aranha-marrom, é um problema de saúde pública no Brasil. As duas formas de desenvolvimento da doença são a cutânea e a sistêmica, e apesar do alto número de casos registrados, não há uma terapia definitiva estabelecida.

O tratamento disponível atualmente consiste na soroterapia a partir do soro hiper imune de equinos imunizados com o veneno bruto. Dessa forma, além de demandar trabalho com extração e sofrimento animal na produção, a sua

administração tardia pode levar a ineficácia (principalmente na lesão cutânea). Assim, a busca por terapias alternativas ou a melhora das existentes se faz necessária (Pauli *et al.*, 2009; Polli *et al.*, 2021; Antunes *et al.*, 2023).

O veneno de *Loxosceles* sp. possui diferentes toxinas que são o foco de múltiplos estudos para insumos biotecnológicos. Dentre elas destacam-se as FLDs, amplamente pesquisadas pela sua capacidade de experimentalmente reproduzirem todos os sintomas do loxoscelismo e estão entre as toxinas mais expressas que são altamente conservadas e antigênicas (Gremski *et al.*, 2010; Gremski *et al.*, 2014).

As FLDS recombinantes mutadas são as isoformas sem a atividade enzimática e biológica, mas que mantém a conformação estrutural nativa com suas características antigênicas (Chaim *et al.*, 2006; Da Silva *et al.*, 2021; Vuitika *et al.*, 2016). A conformação estrutural das proteínas mutadas foi verificada por similaridade de precisão no dobramento através do teste de dicroísmo circular, por Vuitika e colaboradores (2016), que não demonstraram diferença significativa do controle, se comparada a FLD selvagem. Além disso, as isoformas recombinantes mutadas foram examinadas quanto à sua atividade e imunogenicidade usando os testes *Amplex Red* e *Western Blotting*, que ao serem comparadas com as proteínas selvagens, não exibiram atividade catalítica, indicando 0% de degradação de esfingomielina (Polli *et al.*, 2021). As proteínas mutadas utilizadas foram LiRecDT1W230A (*L. intermedia*) com modificação nos domínios de reconhecimento de substrato; LIRecDT1H12-H47 (*L. laeta*) mutada no domínio relacionado a atividade catalítica da enzima; e LgRecDT1E32-D34A (*L. gaucho*) com alteração no domínio coordenação do cofator  $Mg^{2+}$  (Da Silva *et al.*, 2021).

A utilização de FLDs mutadas mostrou-se eficiente para a soroterapia de segunda geração, segundo Antunes e colaboradores (2023) com soros produzidos de FLDs mutadas sendo capazes de diminuir o edema e a lesão dermonecrótica (para o soro REC) em comparação ao soro convencional (SAlox). Além disso, esses antígenos também demonstraram resultados positivos para a vacinação em coelhos, sendo observado o reconhecimento por anticorpos e proteção de 95% contra a dermonecrose e 90% contra o edema. Ainda, mostrou-se eficaz na redução de 80% da mortalidade em camundongos (Polli *et al.*, 2021).

No presente estudo, buscou-se testar se alterações no esquema vacinal de camundongos e coelhos acarretariam mudanças na proteção de animais imunizados, além do tempo para o desafio com o veneno. Para o loxoscelismo sistêmico, entende-se pela chegada do veneno à corrente sanguínea como um agravo do quadro, possuindo complicações como coagulação disseminada, insuficiência renal aguda e óbito (Barbaro *et al.* 1992; Futrell, 1992; Appel *et al.*, 2005). A ação sistêmica em camundongos pode ser observada devido a rápida nefrotoxicidade gerada pelo veneno da aranha-marrom e morte decorrente (Chaim *et al.*, 2006, Kusma *et al.*, 2008; Da Silva *et al.*, 2004; Appel *et al.*, 2008; Okamoto *et al.*, 2017). A relação entre o veneno loxoscélico e danos renais já foi demonstrada através de biópsias que confirmaram a destruição tecidual, principalmente necrose nos glomérulos, afetando a sua permeabilidade (Luciano *et al.*, 2004) e acarretando piora do paciente. Assim, para avaliar a proteção contra esses danos sistêmicos causados pelo veneno, no presente trabalho, os camundongos que foram vacinados com doses de massa decrescente (100 µg, 60 µg e 30 µg) conseguiram 90% de proteção contra a letalidade induzida pelo veneno do *L. laeta* até 72 horas (TABELA 2), em relação ao grupo controle. Desse modo, entende-se que o esquema vacinal com massas decrescentes de antígeno também é eficiente e mantém a proteção por, ao menos, mais 24 horas quando comparado com os resultados de Polli e colaboradores (2021).

O loxoscelismo cutâneo relaciona-se intimamente com o local da inoculação do veneno (Machado *et al.*, 2005; Futrell, 1992). Assim, exibe alterações na pele, como um halo azul-arroxeadado após 12-24 horas, com formação da lesão dermonecrotica, edema e as complicações incluem perda de tecido, cicatrizes e infecções secundárias (Futrell, 1992; Ministério da Saúde, 2001). Os aspectos avaliados foram a diminuição da dermonecrose e do edema, além do aspecto geral da lesão. Polli e colaboradores (2021) já haviam realizado testes com a formulação maior, de 300 µg, 600 µg e 1000 µg, conseguiram diminuir 95% a dermonecrose e 90% do edema.

Desse modo, neste trabalho adicionou-se uma formulação com menor massa de antígeno por dose, de 75 µg, 150 µg e 250 µg, a fim de comparar a resposta das diferentes formulações vacinais com o controle. O resultado obtido demonstra que não houve diferença significativa em relação as massas de FLDs utilizadas. Foi visto que, os picos de dermonecrose para os três grupos ficou em 72 horas, mas para os grupos vacinados com redução de 70% até 96 horas em relação ao controle do experimento.

Já para o edema, o pico máximo foi em 48 horas, tendo ao final a redução de 60% para todos os tempos avaliados.

Além disso, para confirmar os dados obtidos *in vivo* foi realizado o ELISA que demonstrou alta titulação de anticorpos para os dois grupos vacinados. Ainda que o grupo de maior massa possua uma maior titulação, a maior ocorrência se deu na mesma titulação que a máxima do grupo de menor massa. Portanto, entende-se com esses resultados a utilização das menores massas de proteína podendo ser a mais vantajosa, dado que diminuiria o custo da produção e obteria uma resposta imunológica e local sem diferença significativa entre eles, mas com diferença significativa em relação ao controle negativo.

Ademais, a conservação dos epítomos no *pool* devido as diferentes mutações pode ser um fator chave para a eficácia da vacina, como demonstrado por Novak e colaboradores (2021) no estudo que utilizou uma toxina proteica inativada como antígeno. O uso de proteínas como antígeno vêm sendo testado em diferentes estudos em relação ao uso de venenos. Dentre as vantagens tem-se a menor necessidade do manejo dos animais, além da utilização de apenas uma toxina e não todos os componentes do veneno, sendo assim, mais específica, controlada e diminuindo as chances de efeitos adversos. Porém, mesmo com a facilidade na sua produção, o seu custo ainda é elevado, o que dificulta o processo (Rathore, Kumar, Tiwari, 2023).

Além disso, é visto que um esquema vacinal com mais doses garante uma melhor imunidade, já que está intimamente ligado ao estímulo de uma resposta eficiente de anticorpos neutralizantes (Novak *et al.*, 2021; Polli *et al.*, 2021). Os resultados aqui demonstrados com o ensaio de ELISA e *in vivo* mostram que há uma alta titulação de anticorpos para as duas formulações vacinais, sendo melhor correlacionada com a quantidade de doses e não a massa de antígenos. Outro ponto importante a ser observado é a melhora geral no aspecto da lesão e dos dados de dermonecrose com a formulação de maior massa, entendendo-se assim a melhora do aspecto cutâneo frente ao maior estímulo e produção de anticorpos indicando sua conexão.

Desse modo, os próximos passos no que diz respeito ao loxoscelismo são o entendimento da duração da proteção adquirida nesse estudo, além do mais a

avaliação da proteção renal dos coelhos frente as diferentes formulações vacinais e complicações geradas pela disseminação sistêmica do veneno. Outra alternativa também, seria testar vacinas com antígenos diferentes, como os de construções de DNA, RNA e anticorpos monoclonais, por exemplo. O presente trabalho tem relevância científica, social e de contribuição para a melhora e entendimento de insumos biotecnológicos.

## 6 CONCLUSÃO

As FLDs mutadas recombinantes do veneno de *L. intermedia*, *L. laeta* e *L. gaucho* foram obtidas por sistema procarioto de expressão e, após purificação, utilizadas como antígenos em esquemas vacinais em camundongos e coelhos. Assim, deixando em aberto diferentes perguntas a serem respondidas, como novos esquemas vacinais como número de aplicações e avaliar o tempo de duração da proteção obtida após a imunização. Dos dados obtidos, pode-se comprovar a importância para estudos envolvendo tratamento do loxoscelismo com proteínas mutadas, sendo um resultado que pode melhorar a forma de produção e bem-estar animal envolvidos no processo. Além disso, o presente trabalho é o início da compreensão de uma nova tecnologia para a proteção contra o loxoscelismo, sendo essencial entender a duração da proteção obtida, o teste de novos protocolos vacinais e/ou tecnologias e a avaliação mais aprofundada de proteção renal e cutânea.

## REFERÊNCIAS

ANTUNES, B.C. *et al.* Production and Functional Evaluation of Anti-Loxosceles Sera Raised by Immunizations of Rabbits with Mutated Recombinant Phospholipases-D. **Biomedicines** 2023, 11, 79. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11010079>. Acesso em: 20 ago. 2023.

APPEL, M. H. *et al.* Insights into brown spider and loxoscelism. **ISJ-Invertebrate Survival Journal**, [S.L.], v. 2, n. 2, p. 152-158, 27 dez. 2005. Disponível em: <https://www.isj.unimore.it/index.php/ISJ/article/view/116>. Acesso em: 16 ago. 2023.

APPEL, M. H. *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**, [S.L.], v. 1780, n. 2, p. 167-178, fev. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2007.11.007>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18082635/>. Acesso em: 19 out. 2023.

BARBARO, K. C. *et al.* IgG antibodies to *Loxosceles* sp. spider venom in human envenoming. **Toxicon**, [S.L.], v. 30, n. 9, p. 1117-1121, set. 1992. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0041-0101\(92\)90057-c](http://dx.doi.org/10.1016/0041-0101(92)90057-c). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/004101019290057C>. Acesso em: 19 out. 2023.

BERTANI, R. *et al.* *Loxosceles chapadensis* (Araneae: sicariidae). **Journal Of Arachnology**, [S.L.], v. 38, n. 2, p. 364-367, ago. 2010. American Arachnological Society. <http://dx.doi.org/10.1636/a09-92.1>. Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/biblio-1063801>. Acesso em: 16 out. 2023.

BODE, W.; GOMIS-RÜTH, F.; STÖCKLER, W. Astacins, serralysins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the “metzincins.” **FEBS Letters**, v. 331, n. 1-2, p. 134–140, 1993. Acesso em: 16 ago. 2023.

BOIA-FERREIRA, M. *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. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31766608/>. Acesso em: 16 ago. 2023.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-54, May 7 1976.

BRUSCA, R. C.; MOORE, W.; SHUSTER, S. M. **Invertebrados, 3ª edição**. Grupo GEN, 2018. 9788527733458. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788527733458/>. Acesso em: 16 ago. 2023.

CAJARAVILLE, A. C. DOS R. A. **Vacinas experimentais para febre amarela como modelo de estudo de novos adjuvantes**. 2019. Tese (Doutorado). Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2019. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/37271>. Acesso em: 27 set. 2023.

CHAIM, O. M. *et al.* Brown spider dermonecrotic toxin directly induces nephrotoxicity. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 211, n. 1, p. 64–77, 2006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16005484/>. Acesso em: 16 ago. 2023.

CHAIM, O. M. *et al.* Brown spider (*Loxosceles* genus) venom toxins: tools for biological purposes. **Toxins** (Basel), v. 3, n. 3, p. 309-44, Mar 2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3202818/>. Acesso em: 16 ago. 2023.

CHAVES-MOREIRA, D. *et al.* Highlights in the knowledge of brown spider toxins. **Journal Of Venomous Animals And Toxins Including Tropical Diseases**, [S.L.], v. 23, n. 1, p. 1-12, 8 fev. 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28194160/>. Acesso em: 16 ago. 2023.

CRAIK, D. J.; DALY, N. L.; WAINE, C. The cystine knot motif in toxins and implications for drug design. **Toxicon**, [S.L.], v. 39, n. 1, p. 43-60, jan. 2001. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0041-0101\(00\)00160-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0041-0101(00)00160-4). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10936622/>. Acesso em: 19 out. 2023.

CORONADO, M.A. *et al.* Structural Insights into Substrate Binding of Brown Spider Venom Class II Phospholipases D. **Current Protein & Peptide Science**, [S.L.], v. 16, n. 8, p. 768-774, 28 ago. 2015. Bentham Science Publishers Ltd. <http://dx.doi.org/10.2174/1389203716666150505231625>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25961401/>. Acesso em: 17 out. 2023.

DA SILVA, P. H. *et al.* Brown spiders and loxoscelism. **Toxicon**, v. 44, n. 7, p. 693–709, 2004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15500846/>. Acesso em: 23 mar. 2023. Acesso em: 24 set. 2023.

DA SILVA, T. P. *et al.* Brown Spiders' Phospholipases-D with Potential Therapeutic Applications: functional assessment of mutant isoforms. **Biomedicines**, [S.L.], v. 9, n. 3, p. 320, 21 mar. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/biomedicines9030320>. Acesso em: 23 set. 2023.

DA SILVEIRA, R. B. *et al.* Two novel dermonecrotic toxins LiRecDT4 and LiRecDT5 from Brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom: from cloning to functional characterization. **Biochimie**, [S.L.], v. 89, n. 3, p. 289-300, mar. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2006.12.002>. Acesso em: 25 ago. 2023.

DE OLIVEIRA, K. C. *et al.* Variations in *Loxosceles* spider venom composition and toxicity contribute to the severity of envenomation. **Toxicon**, [S.L.], v. 45, n. 4, p. 421-429, mar. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2004.08.022>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15733563/>. Acesso em: 19 out. 2023.

DE CASTRO, C. S. *et al.* Identification and molecular cloning of insecticidal toxins from the venom of the brown spider *Loxosceles intermedia*. **Toxicon**, [S.L.], v. 44, n. 3, p. 273-280, set. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2004.05.028>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15302533/>. Acesso em: 16 out. 2023.

DIAS, P. C. G. **AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE INDUZIDA POR DIFERENTES ADJUVANTES E SUA APLICAÇÃO NO DESENVOLVIMENTO DE UMA VACINA DE SUBUNIDADE CONTRA LEPTOSPIROSE**. 2016. Dissertação (Mestrado). Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2016.

FEITOSA, L. *et al.* Detection and characterization of metalloproteinases with gelatinolytic, fibronectinolytic and fibrinogenolytic activities in Brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. **Toxicon**, [s.l.], v. 36, n. 7, p.1039-1051, jul. 1998.

FERNANDES-PEDROSA, M. F. *et al.* Molecular cloning and expression of a functional dermonecrotic and haemolytic factor from *Loxosceles laeta* venom. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, [S.L.], v. 298, n. 5, p. 638-645, nov. 2002. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0006-291x\(02\)02521-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0006-291x(02)02521-4). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12419302/>. Acesso em: 19 out. 2023.



FERRARA, G. I. S. *et al.* SMase II, a new sphingomyelinase D from *Loxosceles laeta* venom gland: molecular cloning, expression, function and structural analysis. **Toxicon**, [S.L.], v. 53, n. 7-8, p. 743-753, jun. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.02.013>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19249326/>. Acesso em: 17 out. 2023.

FERRER, V. P. *et al.* A Novel Hyaluronidase from Brown Spider (*Loxosceles intermedia*) Venom (Dietrich's Hyaluronidase): from cloning to functional characterization. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [S.L.], v. 7, n. 5, p. 1-12, 2 maio 2013. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0002206>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3642055/>. Acesso em: 16 out. 2023.

FUTRELL, J. M. Loxoscelism. **Am J Med Sci**, v. 304, n. 4, p. 261-7, Oct 1992. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1415323/>. Acesso em: 15 ago. 2023.

GEREN, C. R. *et al.* Isolation and characterization of toxins from brown recluse spider venom (*Loxosceles reclusa*). **Archives Of Biochemistry And Biophysics**, [S.L.], v. 174, n. 1, p. 90-99, maio 1976. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-9861\(76\)90327-1](http://dx.doi.org/10.1016/0003-9861(76)90327-1). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/820263/>. Acesso em: 26 out. 2023.

GREMSKI, L. H. *et al.* A novel expression profile of the *Loxosceles intermedia* spider venomous gland revealed by transcriptome analysis. **Molecular bioSystems**, v. 6, n. 12, p. 2403–2416, dez. 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20644878/>. Acesso em: 15 ago. 2023.

GREMSKI, L. H. *et al.* Recent advances in the understanding of brown spider venoms: From the biology of spiders to the molecular mechanisms of toxins. **Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology**, v. 83, p. 91–120, jun. 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24631373/>. Acesso em: 15 ago. 2023.

GREMSKI, L. H. *et al.* Forty Years of the Description of Brown Spider Venom Phospholipases-D. **Toxins**, v. 12, n. 3, p. 164, mar. 2020. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6651/12/3/164>. Acesso em: 15 ago. 2023.

GREMSKI, L. H. *et al.* Brown spider venom toxins: what are the functions of astacins, serine proteases, hyaluronidases, allergens, tctp, serpins and knottins? **Journal Of Venomous Animals And Toxins Including Tropical Diseases**, [S.L.], v. 27, p. 1-15, jul. 2021. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1678-9199-jvatitd-2020-0188>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/jvatitd/a/Lc3gMTJPcbQ3w43hTBFBVxx/?lang=en&format=pdf>. Acesso em: 19 out. 2023.

GIUSEPPE, P. O. de *et al.* Structure of a novel class II phospholipase D: catalytic cleft is modified by a disulphide bridge. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, [S.L.], v. 409, n. 4, p. 622-627, jun. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.05.053>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21616057/>. Acesso em: 17 out. 2023.

GOMEZ-MUÑOZ, A. *et al.* New insights on the role of ceramide 1-phosphate in inflammation. **Biochimica Et Biophysica Acta (Bba) - Molecular And Cell Biology Of Lipids**, [S.L.], v. 1831, n. 6, p. 1060-1066, jun. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbalip.2013.02.001>. Acesso em: 19 out. 2023.

GONÇALVES-DE-ANDRADE, R. *et al.* *Loxosceles niedeguidonae* (Araneae, Sicariidae) a new species of brown spider from Brazilian semi-arid region. **Zookeys**, [S.L.], v. 175, p. 27-36, 16 mar. 2012. Pensoft Publishers. <http://dx.doi.org/10.3897/zookeys.175.2259>. Disponível em: [https://ecoevo.com.br/publicacoes/pesquisadores/rogerio\\_bertani/1020%20loxosceles%20niedeguidonae%20a%20new%20species%20of%20brown%20spider%20from%20brazilian%202012.pdf](https://ecoevo.com.br/publicacoes/pesquisadores/rogerio_bertani/1020%20loxosceles%20niedeguidonae%20a%20new%20species%20of%20brown%20spider%20from%20brazilian%202012.pdf). Acesso em: 15 out. 2023.

HERZIG, V. *et al.* Evaluation of Chemical Strategies for Improving the Stability and Oral Toxicity of Insecticidal Peptides. **Biomedicines**, [S.L.], v. 6, n. 3, p. 90, 28 ago. 2018. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/biomedicines6030090>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30154370/>. Acesso em: 16 out. 2023.

HOGAN, C. J.; BARBARO, K. C.; WINKEL, K. Loxoscelism: old obstacles, new directions. **Annals Of Emergency Medicine**, [S.L.], v. 44, n. 6, p. 608-624, dez. 2004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15573037/>. Acesso em: 15 ago. 2023.

ISBISTER, G. K; FAN, H. W. Spider bite. **The Lancet**, [S.L.], v. 378, n. 9808, p. 2039-2047, dez. 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21762981/>. Acesso em: 15 ago. 2023.

JUSTA, H. C. *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**, [S.L.], v. 164, p. 3984-3999, dez. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.08.212>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32871121/>. Acesso em: 19 out. 2023.

JUSTA, H. C. *et al.* Comparative Biochemical, Structural, and Functional Analysis of Recombinant Phospholipases D from Three *Loxosceles* Spider Venoms. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 24, n. 15, p. 1-23, 26 jul. 2023. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms241512006>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/24/15/12006>. Acesso em: 19 out. 2023.

KUSMA, J. *et al.* Nephrotoxicity caused by brown spider venom phospholipase-D (dermonecrotic toxin) depends on catalytic activity. **Biochimie**, [S.L.], v. 90, n. 11-12, p. 1722-1736, nov. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2008.07.011>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18760322/>. Acesso em: 02 nov. 2023.

LAHARIYA, C. Uma breve história de vacinas e vacinação na Índia. **Indiano J Med Res**, India, p. 491-511, abr. 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4078488/>. Acesso em: 01 nov. 2023.

LUCIANO, M. N. *et al.* Experimental Evidence for a Direct Cytotoxicity of *Loxosceles intermedia* (Brown Spider) Venom in Renal Tissue. **Journal Of Histochemistry & Cytochemistry**, [S.L.], v. 52, n. 4, p. 455-467, abr. 2004. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/002215540405200404>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15033997/>. Acesso em: 02 nov. 2023.

LUNG, J. M.; MALLORY, S. B. A child with spider bite and glomerulonephritis: a diagnostic challenge. **International Journal Of Dermatology**, [S.L.], v. 39, n. 4, p. 287-289, abr. 2000. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-4362.2000.00928.x>.

MACEYKA, M.; SPIEGEL, S. Sphingolipid metabolites in inflammatory disease. **Nature**, [S.L.], v. 510, n. 7503, p. 58-67, 4 jun. 2014. Springer Science and Business Media LLC.. Acesso em: 24 ago. 2023.

MACHADO, L.F. *et al.* Proteome analysis of brown spider venom: Identification of loxnecrogin isoforms in *Loxosceles gaucha* venom. **Proteomics**, 2005, 5, 2167–2176. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15852345/>. Acesso em: 16 ago. 2023.

MAKRIS, M. *et al.* Acute Generalized Exanthematous Pustulosis (AGEP) Triggered by a Spider Bite. **Allergology International**, [S.L.], v. 58, n. 2, p. 301-303, 2009. Japanese Society of Allergology. <http://dx.doi.org/10.2332/allergolint.08-cr-0035>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19307779/>. Acesso em: 16 out. 2023.

MALAUQUE, C. M. S. *et al.* Clinical picture and laboratorial evaluation in human loxoscelism. **Toxicon**, v. 58, n. 8, p. 664–671, 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21986355/>. Acesso em: 16 ago. 2023.

MALE, D. *et al.* Vacinação. In: MALE, David *et al.* **Imunologia**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. Cap. 18. p. 288-303. Tradução: Grupo GEN. Disponível em: [https://integrada.minhabiblioteca.com.br/reader/books/9788595151451/epubcfi/6/2\[%3Bvnd.vst.idref%3Da9788535279597\\_cover\]/4/2/2%4051:75](https://integrada.minhabiblioteca.com.br/reader/books/9788595151451/epubcfi/6/2[%3Bvnd.vst.idref%3Da9788535279597_cover]/4/2/2%4051:75). Acesso em: 01 nov. 2023.

MASOOD, R. *et al.* Spider's venom phospholipases D: a structural review. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [S.L.], v. 107, n. 1, p. 1054-1065, fev. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.09.081>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28951301/>. Acesso em: 19 out. 2023.

MATSUBARA, F. H. *et al.* Insecticidal activity of a recombinant knottin peptide from *Loxosceles intermedia* venom and recognition of these peptides as a conserved family in the genus. **Insect Molecular Biology**, [S.L.], v. 26, n. 1, p. 25-34, 15 out. 2016. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/imb.12268>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27743460/>. Acesso em: 16 out. 2023.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (BRASIL). **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. Brasília: Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde, 2001. Disponível em: <https://www.icict.fiocruz.br/sites/www.icict.fiocruz.br/files/Manual-de-Diagnostico-e-Tratamento-de-Acidentes-por-Animais-Pe--onhentos.pdf>. Acesso em: 16 ago. 2023.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (BRASIL). Disponível em: **TabNet Win32 3.2: ACIDENTE POR ANIMAIS PEÇONHENTOS - Notificações registradas no Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net (datasus.gov.br)**. Acesso em: 16 ago. 2023.

MOORE, S. J. *et al.* Engineering Agatoxin, a Cystine-Knot Peptide from Spider Venom, as a Molecular Probe for In Vivo Tumor Imaging. **Plos One**, [S.L.], v. 8, n. 4, p. 1-11, 3 abr. 2013. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0060498>. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0060498>. Acesso em: 19 out. 2023.

MURAKAMI, M. T. *et al.* Structural Basis for Metal Ion Coordination and the Catalytic Mechanism of Sphingomyelinases D. **Journal Of Biological Chemistry**, [S.L.], v. 280, n. 14, p. 13658-13664, abr. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m412437200>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15654080/>. Acesso em: 19 out. 2023.

MURAKAMI, M. T. *et al.* Structural insights into the catalytic mechanism of sphingomyelinases D and evolutionary relationship to glycerophosphodiester phosphodiesterases. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, [S.L.], v. 342, n. 1, p. 323-329, mar. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.01.123>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16480957/>. Acesso em: 16 out. 2023.

NOVAK, H. *et al.* Durable Immunity to Ricin Toxin Elicited by a Thermostable, Lyophilized Subunit Vaccine. **Msphere**, [S.L.], v. 6, n. 6, p. 1-11, 22 dez. 2021. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/msphere.00750-21>. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/msphere.00750-21>. Acesso em: 03 nov. 2023.

OKAMOTO, C. *et al.* Tetracycline Reduces Kidney Damage Induced by Loxosceles Spider Venom. **Toxins**, [S.L.], v. 9, n. 3, p. 90-106, 2 mar. 2017. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/toxins9030090>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5371845/>. Acesso em: 02 nov. 2023.

OMS. Organização Mundial de Saúde. State of the world's vaccines and immunization – third edition. Genebra: OMS, 2009. Disponível em: [https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/44169/9789241563864\\_eng.pdf](https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/44169/9789241563864_eng.pdf). Acesso em: 01 nov. 2023.

PAULI, I. *et al.* Analysis of therapeutic benefits of antivenin at different time intervals after experimental envenomation in rabbits by venom of the brown spider (*Loxosceles intermedia*). **Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology**, v. 53, n. 6, p. 660–671, maio 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19673081/>. Acesso em: 20 ago. 2023.

PERRIE, Y. *et al.* Recent Developments in Particulate-Based Vaccines. **Bentham Science Publishers Ltd**: Recent Patents on Drug Delivery & Formulation, Sharjah, v. 1, n. 2, p. 117-129, jan. 2007. Acesso em: 01 nov. 2023.

PLATNICK, N.I., 2013. The World Spider Catalog, Version 14.0. **American Museum of Natural History**. Online at: <http://research.amnh.org/iz/spiders/catalog> (Acesso em: 17 out. 2023).

POLLI, N. L. C. *et al.* A protective vaccine against the toxic activities following Brown spider accidents based on recombinant mutated phospholipases D as antigens. **International Journal Of Biological Macromolecules**, Curitiba, v. 192, n. 1, p. 757-770, dez. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.10.005>. Acesso em: 20 ago. 2023.

RATHORE, A. S.; KUMAR, R.; TIWARI, O. S. Recent advancements in snake antivenom production. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [S.L.], v. 240, n. 1, p. 1-15, jun. 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.124478>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813023013727?via%3Dihub#s0010>. Acesso em: 03 nov. 2023.

SADE, Y. B. *et al.* Molecular cloning, heterologous expression and functional characterization of a novel translationally-controlled tumor protein (TCTP) family member from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. **The International Journal Of Biochemistry & Cell Biology**, [S.L.], v. 44, n. 1, p. 170-177, jan. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2011.10.013>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22051631/>. Acesso em: 19 out. 2023.

SANTOS, L. dos *et al.* Brown Recluse Spider Venom: proteomic analysis and proposal of a putative mechanism of action. **Protein & Peptide Letters**, [S.L.], v. 16, n. 8, p. 933-943, 1 ago. 2009. Bentham Science Publishers Ltd. <http://dx.doi.org/10.2174/092986609788923383>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19689420/>. Acesso em: 8 out. 2023.

SEZERINO, U. M. A clinical and epidemiological study of *Loxosceles* spider envenoming in Santa Catarina, Brazil. **Transactions Of The Royal Society Of Tropical Medicine And Hygiene**, [S.L.], v. 92, n. 5, p. 546-548, set. 1998. Oxford University Press (OUP). [http://dx.doi.org/10.1016/s0035-9203\(98\)90909-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0035-9203(98)90909-9). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0035920398909099>. Acesso em: 19 out. 2023.

SCHENONE, H., SUAREZ, G. (1978). Venenos de Scytodidae. Gênero Loxosceles. In: Bettini, S. (eds) Venenos de Artrópodes. **Manual de Farmacologia Experimental** / Handbuch der experimentelle Pharmakologie, vol 48. Springer, Berlim, Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-45501-8\\_11](https://doi.org/10.1007/978-3-642-45501-8_11)

SPRENT, J.; WEBB, S. R. Function and Specificity of T Cell Subsets in the Mouse. **Advances In Immunology Volume 41**, [S.L.], v. 41, p. 39-133, 1987. Elsevier. [http://dx.doi.org/10.1016/s0065-2776\(08\)60030-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0065-2776(08)60030-9).

TAMBOURGI, D. V. *et al.* Loxoscelism: from basic research to the proposal of new therapies. **Toxicon**, [S.L.], v. 56, n. 7, p. 1113-1119, dez. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.01.021>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010110000371>. Acesso em: 19 out. 2023.

TREVISAN-SILVA, D. *et al.* Astacin-like metalloproteases are a gene family of toxins present in the venom of different species of the brown spider (genus Loxosceles). **Biochimie**, v. 92, n. 1, p. 21–32, 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19879318/>. Acesso em: 20 ago. 2023.

VETTER, Richard S. *et al.* Seasonality of brown recluse spiders, Loxosceles reclusa, submitted by the general public: implications for physicians regarding loxoscelism diagnoses. **Toxicon**, [S.L.], v. 58, n. 8, p. 623-625, dez. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.09.009>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21964630/>. Acesso em: 8 out. 2023.

VUITIKA, L. *et al.* Active site mapping of Loxosceles phospholipases D: biochemical and biological features. **Biochimica Et Biophysica Acta (Bba) - Molecular And Cell Biology Of Lipids**, [S.L.], v. 1861, n. 9, p. 970-979, set. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbalip.2016.05.009>.

## ANEXO I – COMITÊ DE ÉTICA

05/03/2021

SEI/UFPR - 3345847 - CEUA/BIO: Certificado



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Nº 1393

### CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO – UFPR), instituída pela Resolução Nº 86/11 do Conselho de Ensino Pesquisa e Extensão (CEPE), de 22 de dezembro de 2011, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos (DBCA) estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e com as normas internacionais para a experimentação animal.

### STATEMENT

The Ethics Committee for Animal Use from the Biological Sciences Section of the Federal University of Paraná (CEUA/BIO – UFPR), established by the Resolution Nº 86/11 of the Teaching Research and Extension Council (CEPE) on December 22<sup>nd</sup> 2011, **CERTIFIES** that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the Brazilian Guidelines for Care and Use of Animals for Scientific and Teaching purposes established by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and with the international guidelines for animal experimentation.

**PROCESSO/PROCESS:** 23075.003280/2021-72

**APROVADO/APPROVAL:** 23/02/2021 – R.O. 01/2021

**TÍTULO:** Avaliação do Uso de Fosfolipases-D Mutadas Recombinantes no Tratamento e Prevenção do Loxoscelismo.

**TITLE:** Evaluation of Using Recombinant Mutated D-Phospholipases in Treatment and Prevention of Loxoscelism.

**AUTORES/AUTHORS:** Luiza Helena Gremski, Nayanne Louise Costacurta Polli, Bruno César Antunes, Hanna Câmara da Justa, Pedro Henrique Schluga, Kamila Moreno.

**DEPARTAMENTO/DEPARTMENT:** Biologia Celular

Profa. Dra. Katya Naliwaiko  
Coordenadora da CEUA



Documento assinado eletronicamente por **ISELEN ABREU FLORENTINO IVANOSKI, Institucional**, em 03/03/2021, às 14:41, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



A autenticidade do documento pode ser conferida [aqui](#) informando o código verificador **3345847** e o código CRC **409892A9**.