



# Padronização de método alternativo *in vitro* para análise do título de soro antiloxoscélico

## Standardization of an alternative *in vitro* method for analyzing the titer of antiloxoscelic serum

Vitor Emanuel Bohrer de Oliveira<sup>1</sup>, Luís Felipe Minozzo Figueiredo<sup>2</sup>

### RESUMO

Loxoscelismo é a denominação dada à enfermidade causada por acidentes com aranhas do gênero *Loxosceles* e que é um dos tipos de araneísmo mais relevantes na América do Sul, e pode ser tratado clinicamente com o uso de soros antiloxoscélicos. Nesse estudo, lotes de soros hiperimunes equinos antiloxoscélicos, obtidos de cavalos imunizados com venenos de aranhas do gênero *Loxosceles*, foram avaliados com o objetivo de padronizar um ensaio imunológico *in vitro* utilizando o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) para avaliar a reação específica das imunoglobulinas do soro com antígenos presentes no veneno, para posterior avaliação da correlação com o potencial neutralizante *in vivo* dos soros. O ensaio ainda requer mais análises de diferentes formatos para que seja analisada a possibilidade de redução do uso de animais na validação da potência neutralizante.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Loxosceles* spp.; loxoscelismo; soroterapia.

### ABSTRACT

Loxoscelism is the term used to refer the condition caused by accidents involving spiders of the genus *Loxosceles*, and it is one of the most relevant types of arachnidism in South America. It can be clinically treated with the use of antiloxoscelic serums. In this study, batches of hyperimmune equine antiloxoscelic serums, obtained from horses immunized with venoms from spiders of the genus *Loxosceles*, were evaluated with the aim of standardizing an *in vitro* immunological assay using the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to assess the specific reaction of serum immunoglobulins with venom-present antigens for subsequent evaluation of their *in vivo* neutralizing potential. The assay still requires further analysis in different formats to explore the possibility of reducing the use of animals in validating the neutralizing potency.

**KEYWORDS:** *Loxosceles* spp.; loxoscelism; serum therapy.

### INTRODUÇÃO

O loxoscelismo é a denominação da enfermidade causada pelo acidente da picada de aranhas-marrons do gênero *Loxosceles*, que leva à inoculação do veneno nos acidentados, sendo a forma mais importante de araneísmo na América do Sul, apresentando-se como a principal causa de acidentes por animais venenosos em alguns países, como no Chile (Schenone *et al.*, 1970). No Brasil, em 2022, 6,456 casos de acidente com aranhas *Loxosceles* foram identificados, sendo o mais comum dentre os acidentes com aranhas peçonhentas (Brasil, 2022, 2023). Dentre os sintomas da picada estão a inflamação, com inchaço e vermelhidão na área afetada, tendo o potencial de

<sup>1</sup> Bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Universidade tecnológica federal do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil E-mail: voliveira.2020@alunos.utfpr.edu.br. ID Lattes: 8917683474676369.

<sup>2</sup> Docente no Curso de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia. Universidade tecnológica federal do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil E-mail: luisfigueiredo@utfpr.edu.br. ID Lattes: 8965106762277460.



causar necrose na pele circundante, resultando no desenvolvimento de úlceras. Além disso, podem ocorrer sintomas sistêmicos em um a cada dez casos, na média variando com a espécie, como febre e mal-estar que em casos graves pode afetar órgãos internos, como levando mesmo a falência dos rins. Portanto, buscar atendimento médico imediato é crucial para o tratamento adequado e a prevenção de complicações, e o tratamento mais efetivo para os casos agravados é o uso de soro antiloxoscélico (Isbister, 2011). Os cavalos são usados para a produção em escala do antiveneno, e os lotes de novas tropa são validados com o uso de coelhos, os quais ao ser injetado o veneno das *Loxosceles* apresenta uma reação e necrose equiparáveis as humanas, e assim são a escolha usual. Separados em dois grupos um recebe o veneno, já outro recebe tanto o veneno como o soro, e caso o segundo grupo não apresente complicações e o soro seja efetivo no tratamento, o lote e os cavalos são validados para uso e produção (Furlanetto, 1961 apud Pauli, 2008; Guilherme, Fernandes, Barbaro, 2001).

## MATERIAL E MÉTODOS

### Reagentes imunoquímicos

Amostras de soros equinos previamente imunizados com uma mistura de venenos proveniente das espécies *Loxosceles intermedia*, *Loxosceles gaucho* e *Loxosceles laeta*, assim como soros de animais não imunizados (pré-ímmunes) e amostras dos três venenos loxoscélicos foram gentilmente cedidos pelo Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos (CPPI), localizado na cidade de Piraquara-PR. Esse trabalho não envolveu o uso de animais, mas o procedimento de produção dos soros equinos foi aprovado no Comitê de Ética no Uso de Animais CEUA/SESA-CPPI n°06/2022. Essas amostras são naturalmente colhidas para a produção do soro antiloxoscélico. O anticorpo anti-IgG (molécula íntegra) produzido em coelho conjugado à peroxidase (do inglês, HRP) foi adquirido da empresa Sigma-Aldrich (código A6917).

### Concentração proteica do veneno

Através do método de Bradford (Bradford, 1976) para quantificação de proteínas, adaptado para ser conduzido em microplacas de 96 poços, conduzido em triplicata, com quatro padrões de albumina bovina, sob as concentrações de 0,1 mg/mL, 0,075 mg/mL, 0,05 mg/mL, e 0,025 mg/mL.

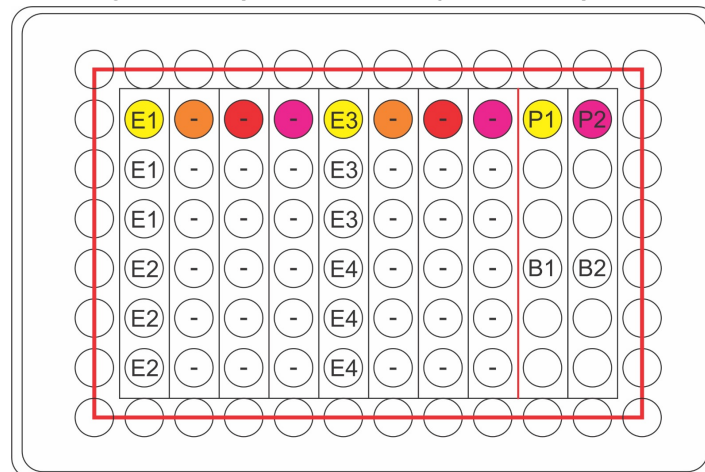
### Padronização do ELISA

Como primeiro método de análise selecionou-se o ensaio de ELISA indireto (Lin, 2015), que tem por objetivo no trabalho atestar a ligação dos anticorpos, nesse caso presentes nos soros, com um antígeno adsorvido na microplaca, nesse caso as proteínas do veneno de *L. intermedia*. Para o ensaio preliminar, idealizou-se um planejamento experimental com as seguintes variáveis: concentração do antígeno (1, 3, 5 e 7 µg/mL), diluição dos soros ímmunes (1:2000 e 1:64.000), enquanto o soro pré-ímmune foi avaliado apenas em 1:1.000 e diluição do conjugado (1:10.000 e 1:40.000),



conforme apresentado na Figura 1 e na Figura 2. Esses pontos não representam a totalidade dos pontos amostrais a serem avaliados, pois os soros deverão ser avaliados de 1:1.000 a 1:128.000 em diluições seriadas, assim como existirão diluições intermediárias do anticorpo conjugado. Para o ensaio utilizou-se microplacas de 96 poços de fundo chato Costar 3590 *high binding* (Corning), e o veneno de *L. Intermedia* nas diferentes diluições foi diluído em *coating buffer*, tampão carbonato de sódio 0,06 M pH 9,6 sendo aplicado o volume de 100 µL por poço, sendo esse o volume de trabalho para as demais etapas, exceto a de bloqueio. A placa foi incubada *overnight* a 4 °C. Após lavagem com solução de lavagem (cloreto de sódio 0,9 % m/v, Tween 20 0,5 % v/v), foi realizado o bloqueio com tampão de bloqueio (tampão fosfato-salino 0,05 M pH 7,4, caseína 2 % m/v) que foi incubado por 1 h a 37 °C em uma estufa preaquecida. Outra etapa de lavagem foi realizada, e os soros foram aplicados nas respectivas diluições em tampão de incubação (tampão fosfato-salino 0,05 M pH 7,4, caseína bovina 0,25 % m/v, Tween 20 0,05 % v/v) foram incubados por 1 h a 37 °C. Em seguida, nova etapa de lavagem, o anticorpo conjugado nas respectivas diluições em tampão de incubação foram incubados por 1 h a 37 °C. Após última etapa de lavagem, a solução substrato, composta por o-fenilenodiamina 0,2 mg/mL, peróxido de hidrogênio 0,006 % em tampão citrato de sódio 0,03 M pH 5,0 que ficou exposta por 25 minutos, quando foi realizado a interrupção de reação com solução de ácido sulfúrico 0,9 M. Então, as absorbância foram determinadas a 492 nm utilizando leitor de microplaca Polaris (Celer Biotecnologia S.A.).

**Figura 1 – Mapa da Sensibilização da microplaca**



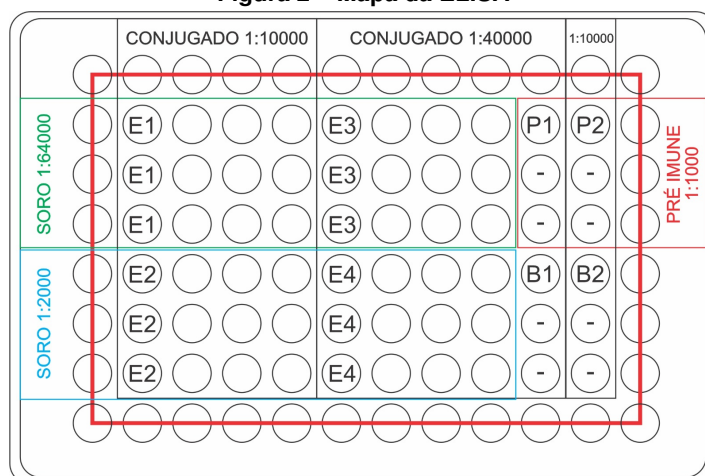
### CONCENTRAÇÕES DE VENENO

- 100 ng/poço
- 500 ng/poço
- 300 ng/poço
- 700 ng/poço

Fonte: Autoria própria (2023).



Figura 2 – Mapa da ELISA



Fonte: Autoria própria (2023).

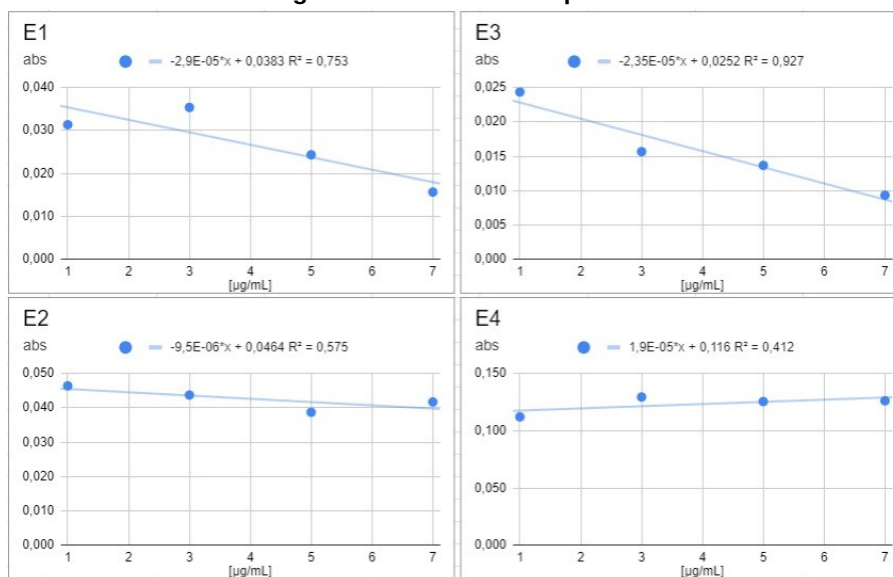
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com o ensaio de Bradford determinamos as concentrações das amostras de venenos de *Loxosceles* spp. que foram utilizadas no ensaio, sendo as seguintes concentrações obtidas: *L.gaucho* 0,644 mg/mL; *L.laeta* 0,621 mg/mL; e *L.intermedia* 0,563 mg/mL.

Na Figura 3 percebe-se que os resultados obtidos não apresentaram linearidade de resposta em função da concentração de veneno na sensibilização. De forma geral, percebe-se que os valores para as absorvâncias foram todos baixos, o que não era esperado. A avaliação no momento da atividade do anticorpo conjugado nos sugeriu que havia um problema com o anticorpo conjugado, que pode ter sofrido com variações de temperatura no refrigerador. Contudo, atestou-se que os soros pré-ímmunes (P1 e P2) não apresentaram reatividade elevada, com os valores de absorvância em média iguais a 0,009 e 0,006, respectivamente. Isso nos indica que não houve problema com a etapa de bloqueio, visto que o soro pré-ímmune contém imunoglobulinas que os animais produzem contra diferentes antígenos a que são naturalmente expostos. Um fato a ser apontado é de que teste branco apresentou leitura de absorvância maior quando foi adicionado conjugado na diluição 1:40.000 (0,137), comparado com a diluição 1:10.000 (0,089). Tal fato deverá ser avaliado com relação à calibração do equipamento ou a outras variáveis que podem gerar variações no ensaio, visto que não espera-se que uma solução mais diluída gere resultados mais elevados. As evidências sugerem que o conjugado usado não reagiu conforme esperado, tanto ao reagir por conta no branco em função da concentração. Para verificar se as diluições estavam foram do intervalo esperado, diluições menores serão avaliadas posteriormente, assim como outras diluições dos soros ímmunes.



Figura 3 – Gráficos de dispersão



Dispersões e retas de tendência para os ensaios E1, E2, E3 e E4, com pontos em concentrações da sensibilização de 100, 300, 500, e 700 ng/poço; Diluição do soro para E2 e E4 de 1:2.000, e para E1 e E3 de 1:64.000; Diluição do conjugado para E1 e E2 de 1:10.000, e para E3 e E4 de 1:40.000.

Fonte: Autoria própria (2023).

## CONCLUSÃO

Utilizando o protocolo de Bradford foi possível determinar a concentração das proteínas presentes nos venenos de *Loxosceles spp.* Contudo, com o ensaio preliminar de ELISA indireto não foi possível determinar a melhor condição para avaliar a potência de neutralização do soro *in vitro* para posterior correlação com os dados dos ensaios *in vivo*. Dessa forma, novos ensaios se fazem necessários para atingir os objetivos.

## EXPECTATIVAS FUTURAS

A curto prazo, se espera desenvolver o protocolo de ELISA padronizado para os soros, e conduzir a avaliação de todos os soros, para que se possa garantir sua efetividade ao avaliar os testes futuros *in vitro*.

## AGRADECIMENTOS

Esse trabalho teve o suporte financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) através do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Venenos e Antivenenos (INCT-INOVATOX, 406816/2022-0) e da Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Agradecemos também o Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos (CPPI), Piraquara-PR, pela doação das amostras de venenos de *Loxosceles spp.* e dos soros equinos utilizados nesse trabalho.



## CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram, que não há conflito de interesse por sua parte.

## REFERÊNCIAS

SCHENONE, H.; Rojas, A.; Reyes, H.; Villar loel, F.; Suarez, G.. Prevalence of *Loxosceles laeta* in Houses in Central Chile. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 19, n. 3, p. 564–567, 1 maio 1970.

BRASIL. Ministério da Saúde. Dados Epidemiológicos Sinan. **Acidentes por animais peçonhentos** - notificações regridadas no sistema de informação de agravos de notificação - Brasil. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sinanet/cnv/animaisbr.def>. Acesso em: 23/09/2023

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim epidemiológico**, Vol. 53, N° 31, Agosto de 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologico/epidemiologico-vol-53-no31/view>. Acesso em: 22/09/2023

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos**. 2001. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/a/animais-peconhentos/aguas-vivas-e-caravelas/materiais-e-multimedia/manual-de-diagnostico-e-tratamento-de-acidentes-por-animais-peconhentos.pdf/view>. Acesso em: 22/09/2023.

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**, v. 53, n. 6, p. 660–671, 1 maio 2009.

GUILHERME P.; FERNANDES, I.; BARBARO, K. C. Neutralization of dermonecrotic and lethal activities and differences among 32–35 kDa toxins of medically important *Loxosceles* spider venoms in Brazil revealed by monoclonal antibodies. **Toxicon**, v. 39, n. 9, p. 1333–1342, set. 2001.

BRADFORD, M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248–254, 7 maio 1976.

LIN, A. V. Indirect ELISA. **Methods in Molecular Biology**, v. 1318, p. 51–59, 2015.